



PEDECIBA BIOLOGÍA
SUB-ÁREA BIOQUÍMICA

**Asimilación de amonio y acumulación de osmolitos
nitrogenados en condiciones de déficit hídrico en la
leguminosa modelo *Lotus japonicus***

**Tesis de Doctorado
Pedro Díaz Gadea**

**Orientador: Prof. Jorge Monza
Departamento de Biología Vegetal
Facultad de Agronomía - UDELAR**

**Co-Orientador: Prof. Antonio Márquez
Departamento de Bioquímica Vegetal
Facultad de Química - Universidad de Sevilla**

Montevideo, 2011

AGRADECIMIENTOS

A Jorge Monza por su continuo apoyo en la realización y corrección del trabajo.

A Antonio Márquez por recibirme en su laboratorio para trabajar en el metabolismo del nitrógeno en lotus e involucrarse incondicionalmente con los proyectos de estrés.

A Omar Borsani por sus valiosos consejos en la corrección del trabajo.

A Marco Betti por su invaluable ayuda en la transcriptómica.

A los compañeros del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía y del Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla por compartir los ratos de mesada

A PEDECIBA, LOTASSA-517-617, FONTAGRO-Lesis 787 y Junta de Andalucía-FEDER-FSE (P-07-CVI-3026, P10-CVI-6368 y BIO-163) por el financiamiento recibido.

TRIBUNAL

Q.F. Alicia Arias
Dra. Susana Castro
Dr. Omar Borsani

ABREVIATURAS

AAT	alanina aminotransferasa
AOA	amino oxi acetato
APX	ascorbato peroxidasa
AsGAT	asparragina glioxilato amino transferasa
AspAT	aspartato aminotransferasa
BH	balance hídrico
CAT	catalasa
CRA	contenido relativo de agua
DH	déficit hídrico
Fd-GOGAT	glutamato sintasa ferredoxina dependiente
FDR	tasa de falsos positivos
GA	ganancia de agua
GABA	y amino butirato
GC-MS	gas chromatography-mass spectroscopy
GDC	glutamato descarboxilasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GGAT	glutamato glioxilato amino transferasa
GliDC	glicina descarboxilasa
GO	glicolato oxidasa
GPX	glutathiona peroxidasa
GR	glutathiona reductasa
GS	glutamina sintetasa
GSA	glutamato semi aldehído
GSAAT	glutamato semialdehído aminotransferasa
GT	glutathiona transferasa
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
HPR	hidroxipiruvato reductasa
MV	metil viológeno
OAT	ornitina amino transferasa
OPA	o-ftaldialdehído
P5CDH	pirrolina 5 carboxilato deshidrogenasa
P5CR	pirrolina 5 carboxilato reductasa
P5CS	pirrolina 5 carboxilato sintetasa
PDH	prolina deshidrogenasa
PEG	polietilenglicol
PF	peso fresco
POX	prolina oxidasa
PS	peso seco
PT	peso turgente
ROS	especies reactivas del oxígeno
SGAT	serina glioxilato amino transferasa
SOD	superóxido dismutasa
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBST	tris buffer salino con detergente Tween
U	unidad enzimática

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Estrés Abiótico en plantas	3
2. Asimilación de amonio	4
2.1. Glutamina sintetasa	5
2.1.1. Características moleculares y funcionales de las isoformas	5
2.1.2. Regulación de la GS	7
2.1.3. La GS y el estrés abiótico	7
2.2. Glutamato sintasa	8
2.2.1. Características moleculares y funcionales de las isoformas	8
2.2.2. Regulación de la GOGAT	10
2.2.3. La GOGAT y el estrés abiótico	11
2.3. Glutamato deshidrogenasa	11
2.3.1. Características moleculares y funcionales de las isoformas	11
2.3.2. Regulación de la GDH	12
3. GSp y ciclo C2	12
4. Mutantes de <i>Lotus japonicus</i> deficientes en GSp	14
5. Acumulación de osmolitos derivados del glutamato y de la glutamina en condiciones de estrés osmótico	17
5.1. Metabolismo de prolina	17
5.1.1. Síntesis y oxidación de prolina	17
5.1.2. Regulación del metabolismo de la prolina	19
5.2. Síntesis de asparragina	21
5.3. Síntesis de γ amino butirato	22
MATERIALES Y METODOS	25
1. Material vegetal	25
2. Cultivo de plantas	25
2.1. Escarificación, esterilización y germinación de semillas	25
2.2. Condiciones de crecimiento	25
2.3. Imposición del déficit hídrico	26

3. Preparación de extractos crudos de hojas	26
3.1. Extracción de enzimas	25
3.1.1. GS, Fd-GOGAT y GDH	25
3.1.2. OAT	25
3.1.3. P5CS	25
3.1.4. GO, GGAT, SGAT y AsGAT	26
3.1.5. HPR	26
3.2. Extracción de prolina, amonio y aminoácidos	26
3.3. Extracción de TBARS	27
4. Determinaciones enzimáticas	27
4.1. GS	27
4.2. Fd-GOGAT	27
4.3. GDH	28
4.4. OAT	28
4.5. P5CS	29
4.6. GO	29
4.7. GGAT, SGAT y AsGAT	29
4.8. HPR	30
5. Determinaciones analíticas	30
5.1. Proteínas totales	30
5.2. Prolina y amonio	30
5.3. Identificación y cuantificación de aminoácidos por HPLC	31
5.4. Determinación de TBARS	32
6. Ácidos nucleicos	33
6.1. Extracción de RNA	33
6.2. Obtención de cDNA	33
6.3. qRT-PCR	34
6.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	34
7. Contenido relativo de agua, déficit hídrico, ganancia de agua y balance hídrico	36
8. Inmunodetección de GS y Fd-GOGAT	37
8.1. SDS-PAGE	37

8.2. Transferencia de proteínas a membranas (<i>Western blot</i>)	37
8.3. Inmunodetección	38
9. Ómicas	38
9.1. Metabolómica	38
9.2. Transcriptómica	40
10. Análisis estadísticos	40
RESULTADOS	41
1. La actividad y cantidad de proteína GS y Fd-GOGAT no cambian en condición de déficit hídrico	41
2. La deficiencia de GSp se relacionó con la menor acumulación de prolina en condición de déficit hídrico	42
3. El déficit hídrico indujo mayor daño oxidativo en el mutante	44
4. La recuperación del estatus hídrico de hojas jóvenes se ve afectada por la deficiencia de GSp	44
5. La ausencia de GSp determinó cambios en el metaboloma de compuestos nitrogenados	47
6. La cantidad de genes que variaron su expresión en condición de déficit hídrico es mayor en el mutante	49
6.1. El nivel de expresión-represión de genes alterados por el déficit hídrico fue mayor en el mutante	49
6.2. Los genes que se inducen por déficit hídrico en el mutante se reprimen en la condición control y viceversa	50
6.3. Un grupo de genes están regulados por déficit hídrico exclusivamente en el mutante	53
7. La ausencia de GSp modificó la expresión de genes del metabolismo de la prolina	58
8. La ausencia de GSp afectó la actividad de enzimas del ciclo C2	61
9. La nutrición nitrogenada afecta la asimilación de amonio y acumulación de prolina	64
9.1. Nutrición nitrogenada y acumulación de prolina	64
9.2. Actividad de enzimas de asimilación de amonio y del metabolismo de la prolina	65
9.3. Expresión de genes de la asimilación de amonio y metabolismo de la prolina	67
10. Cambios en la relación asn/asp y gln/glu modifican las actividades de enzimas del metabolismo de la prolina	70
DISCUSIÓN	73

1. Respuestas al déficit hídrico en ausencia de GSp	73
1.1. Análisis de expresión génica	73
1.2. Acumulación de prolina y GABA	75
1.3. Actividad del ciclo C2	80
1.4. Metabolismo de la asparragina	82
2. Efecto de la fuente de nitrógeno en la asimilación de amonio y metabolismo de la prolina	83
3. Acumulación de prolina en respuesta a la aplicación de asparragina	85
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFIA	88
ANEXO: Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolismo and transcriptomic response in <i>Lotus japonicus</i> under drought stress.	

RESUMEN

Cambios en la asimilación de amonio y la acumulación de osmolitos son ajustes metabólicos comunes en las células vegetales que conducen a superar la situación de déficit hídrico. Las enzimas que participan en la asimilación de amonio son la glutamina sintetasa (GS), la glutamato sintasa (GOGAT) y la glutamato deshidrogenasa (GDH). En condición de déficit hídrico se incrementa la acumulación de osmolitos como prolina y GABA y ocurren cambios en la actividad del ciclo C2. Ambos procesos son dependientes de glutamato y glutamina, y en las plantas participan en la respuesta a déficit hídrico. En la primera parte de la tesis se buscó determinar el rol de la GS plastídica (GSp) en las respuestas a déficit hídrico, para lo que se usó el mutante *Ljgln2-2* deficiente en GSp. En la segunda parte, el objetivo fue establecer si el nitrato y el amonio determinan la vía de síntesis de prolina en el modelo *Lotus japonicus*.

El análisis del transcriptoma mostró que el mutante carente de GSp, isoforma involucrada en la asimilación de amonio en plastos, en condición de déficit hídrico induce-reprime tres veces más genes que el salvaje. Mientras 7915 secuencias de genes fueron inducidos-reprimidos por déficit hídrico en el mutante, 2608 lo fueron en el salvaje. Del total de genes inducidos-reprimidos, 2070 fueron comunes en los dos genotipos, y el grado de inducción-represión fue siempre mayor en el mutante que en el salvaje. Entre los genes que se indujeron se encuentran los relacionados a proteínas transportadoras de aminoácidos y transaminasas, y entre los que se reprimieron se encuentran los que codifican para proteínas estructurales de los fotosistemas y para la defensa antioxidante enzimática. El mutante *Ljgln2-2* también se usó para analizar la relación entre la asimilación de amonio por la GSp con la acumulación de prolina y GABA, y actividad del ciclo C2. La deficiencia de GSp se acompañó de la sobreexpresión de algunos genes del metabolismo de prolina y GABA, aunque la concentración de estos osmolitos fue menor en el mutante. A su vez, el mutante presentó mayor daño oxidativo, establecido a través de la concentración de TBARS. La menor concentración de prolina en el mutante, además de la ausencia de la isoforma GSp, sería también consecuencia de la menor disponibilidad de poder reductor fotosintético, dada la represión de genes de componentes estructurales de los fotosistemas. El transcriptoma de *Ljgln2-2* mostró que la ausencia de GSp se acompañó de cambios en la expresión de genes involucrados en ciclo C2. Por

esto se analizaron las actividades de enzimas que participan en este ciclo, lo que evidenció ausencia de actividad AsGAT y disminución de actividad SGAT en condición de déficit hídrico.

En *L. japonicus* la nutrición nitrogenada no determina la vía de síntesis de prolina, dado que independientemente de la fuente de nitrógeno suministrada a la planta el glutamato es el único precursor para su acumulación. Además, no varió la expresión del gen *OAT* ni la actividad de la enzima *OAT*, y la aplicación de un inhibidor de esa enzima no afectó la concentración de prolina acumulada en condición de déficit hídrico. La concentración de prolina en esa condición fue mayor en plantas cultivadas con amonio respecto a las cultivadas con nitrato, aunque se encontró una mayor concentración de glutamato en estas últimas. En plantas cultivadas con nitrato el suministro de glutamato para la síntesis de prolina es a partir de la Fd-GOGAT, mientras que en las cultivadas con amonio se suma la actividad GDH aminante. En esta tesis se aportan evidencias del papel de la GDH aminante en la acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico en plantas cultivadas con amonio.

INTRODUCCIÓN

1. Estrés abiótico en plantas

Las plantas están sometidas a situaciones ambientales desfavorables generadoras de estrés, que pueden ocasionar perturbaciones en su crecimiento y desarrollo. Los factores generadores de estrés pueden ser bióticos, como virus, bacterias, hongos y animales, o abióticos, como radiaciones, temperaturas extremas, disponibilidad de agua, salinidad, desbalances en la nutrición mineral y compuestos tóxicos (Bohnert y Sheveleva, 1998; Zhu, 2002).

La sequía, las elevadas concentraciones salinas y las temperaturas extremas llevan a un incremento en la concentración de solutos, a cambios del volumen y forma celular por alteración del potencial hídrico; así como pérdida de la integridad de la membrana celular y desnaturalización de proteínas, entre otras consecuencias (Bray, 1997; Bray, 2002). A su vez las respuestas que generan las plantas en condiciones de estrés dependen de su forma de imposición, lenta o rápida, de la duración del mismo, así como del genotipo y estado de desarrollo de la planta (Bray, 1993; Bray, 1997).

Para sobrellevar el estrés las plantas cuentan con diferentes formas de protección, como adaptaciones a nivel de las hojas o del sistema radical, y otras a nivel celular relacionado al ajuste osmótico y la tolerancia a la desecación a través de la síntesis de proteínas en embriogénesis tardía y dehidrinas (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1993; Bray *et al.*, 2000; Bray, 2002). De todas formas, mientras que las adaptaciones morfológicas no son comunes a todas las plantas, las respuestas celulares básicas sí parecen serlo (Zhu *et al.*, 1997).

La tolerancia a la sequía, pese a tener una base genética, no es consecuencia de la acción de un gen específico (Zhu *et al.*, 1997) y la capacidad de las plantas de soportar el déficit hídrico es una característica multigénica. Las rutas bioquímicas responsables de productos o procesos que mejoran la tolerancia en general, actúan aditivamente, y es posible que también sinérgicamente (Bohnert *et al.*, 1995).

La sequía, las bajas temperaturas y la salinidad generan respuestas metabólicas comunes, en la medida de que producen un descenso de la actividad agua dentro de la célula (Bray, 2002; Zhu 2002). Cuando esto ocurre, las células son capaces de detectar esa variación y desencadenar respuestas metabólicas que conducen a la protección frente al estrés, como la acumulación de un osmolito, y así como también variaciones en los patrones de asimilación de carbono y nitrógeno, entre otros.

2. Asimilación de amonio

El amonio utilizado por las plantas proviene del medio externo, de donde puede ser absorbido como tal o del interior de la planta como consecuencia de la reducción de nitrato, o de la reducción de N_2 mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN). A su vez, en el interior de la planta se genera amonio por procesos tales como la fotorrespiración, reciclaje de nitrógeno y vía fenilpropanoide, entre otros (Hirel y Lea, 2001). Independientemente del origen del amonio, las enzimas requeridas para su asimilación son las mismas: la glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), o eventualmente la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Figura 1).

La GS cataliza la incorporación del amonio a una molécula de glutamato mediante una amidación dependiente de la hidrólisis de ATP, produciendo glutamina y es la única vía de síntesis de glutamina en los seres vivos. La GOGAT utiliza la glutamina, el 2-oxoglutarato y dos equivalentes de reducción para generar dos moléculas de glutamato, una de las cuales será utilizada por la GS y la otra es el resultado neto del ciclo GS/GOGAT (Figura 1). La funcionalidad de este ciclo depende del metabolismo del carbono, porque consume energía, poder reductor y esqueletos carbonados en forma de 2-oxoglutarato (Hirel y Lea, 2001). La GDH cataliza tanto la aminación reductiva del 2-oxoglutarato como la desaminación oxidativa del glutamato (Figura 1) (Skopelitis *et al.*, 2006).

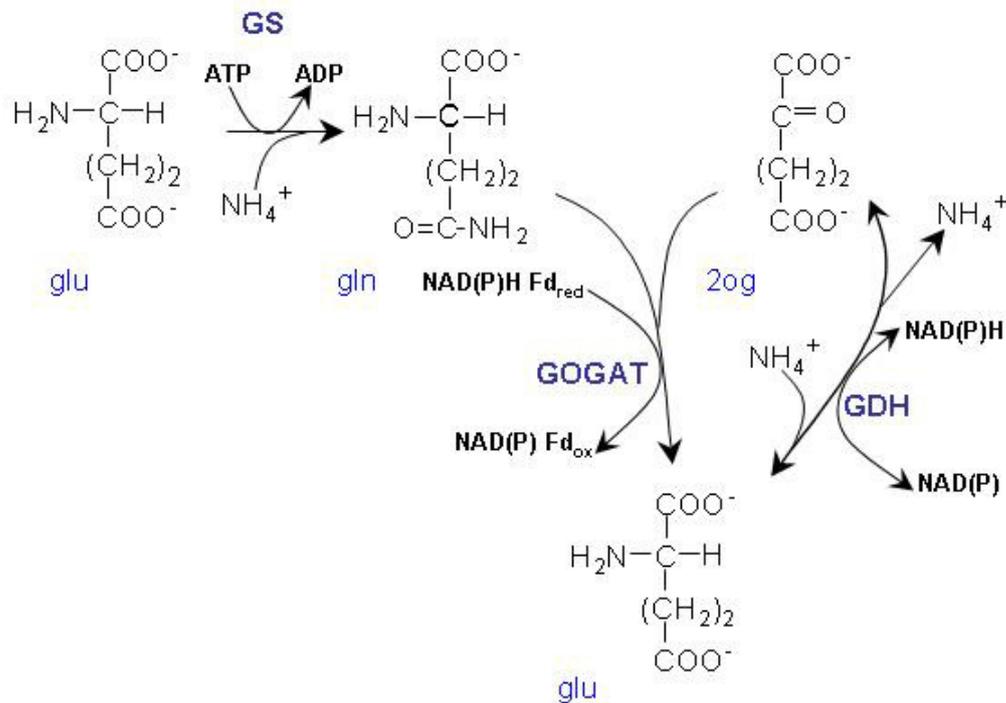


Figura 1. Esquema de la asimilación de amonio en plantas. Glutamato (glu), glutamina (gln) y 2-oxoglutarato (2og), Glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) con actividades aminante y desaminante.

2.1. Glutamina sintetasa

2.1.1. Características moleculares y funcionales de las isoformas

La GS (EC 6.3.1.2) de plantas es una proteína octamérica con un peso molecular de entre 350 y 400 kDa, compuesta por subunidades de 38 a 45 kDa (Betti *et al.*, 2006; Llorca *et al.*, 2006), aunque algunos resultados recientes indican que se pueden cristalizar estructuras decaméricas de GS (Unno *et al.*, 2006).

Se han identificado diferentes isoformas de GS en hojas, raíces y nódulos según las subunidades que la conforman: En hojas se han aislado dos isoenzimas, la GS localizada en el citosol (GS_c) y la GS localizada en los plastos (GS_p). La proporción de estas isoformas varía de una especie a otra, según el estado de desarrollo y por factores ambientales como la luz, entre otros (Forde y Cullimore, 1989; Tobin y Yamaya, 2001; Valadier *et al.*, 2008). La GS_c de hojas está

formada por dos tipos de polipéptidos mientras que la GSp es un único polipéptido que puede presentar o no variantes post-traduccionales. En las raíces es mayoritaria la isoforma GSc, a veces denominada GS_r, muy similar a la forma citosólica de hojas. Algunas plantas, fundamentalmente leguminosas de clima templado, presentan en plastos de células radiculares y nódulos una GSp análoga a la de hojas, pero en cantidades pequeñas (Márquez y Canovas, 2004).

La base molecular que determina la presencia de distintas isoformas de GS en plantas ha sido establecida a partir de la clonación de cDNAs, que codifican para las distintas subunidades. Los genes que las codifican presentan una homología entre 86 y 91 %, lo cual sugiere que esta familia de genes ha evolucionado a partir de un gen ancestral común (Pesole *et al.*, 1991). La homología se extiende hasta un 55 % cuando se compara con genes para GS de algunos animales, y hasta un 22 % con las secuencias de GS bacterianas. Se trata entonces de una proteína conservada, que se ha propuesto como reloj evolutivo molecular (Pesole *et al.*, 1991). La comparación de secuencias de GS indica que hay regiones conservadas y otras divergentes entre las diferentes GS procariotas y eucariotas. Entre estas últimas, las GSp cuentan con extensiones N-terminal propias de péptidos señales, que no están presentes en las GSc (Hirel y Lea, 2001).

La identificación de clones genómicos ha revelado la existencia de 5 a 6 genes en los diferentes organismos, que codifican para las distintas subunidades de la GS de plantas. Se han aislado mutantes de GS con fenotipo fotorrespiratorio, afectados específicamente en la GSp. Estos mutantes se han obtenido en cebada y en *Lotus japonicus* (Blackwell *et al.*, 1988; Orea *et al.*, 2002) y a partir de ellos se pudo confirmar que un único gen es responsable de la GSp y que la GSc no puede compensar esta deficiencia en lo que hace a la reasimilación de amonio fotorrespiratorio (Blackwell *et al.*, 1988). En *Arabidopsis* se ha encontrado que este mismo gen se expresa en la matriz mitocondrial (Taira *et al.*, 2004).

Los estudios de localización tisular de las diferentes isoenzimas utilizando métodos inmunológicos, han revelado que la presencia de GSc es mayoritaria en células acompañantes del floema (Brugière *et al.*, 1999), mientras que la GSp es característica de tejidos fotosintéticos. Existe controversia sobre si GSc y GSp tienen funciones fisiológicas distintas. La interpretación actual relaciona funcionalmente a la GSp con la asimilación primaria y secundaria de amonio, esta última

corresponde a la reasimilación del amonio fotorrespiratorio, mientras que a la GSc se la vincula con la síntesis de aminoácidos a ser translocados hacia los tejidos en crecimiento, o en la senescencia para remobilizar nitrógeno hacia otros órganos (Edwards *et al.*, 1990; Teixeira *et al.*, 2005; Kichey *et al.*, 2005).

2.1.2. Regulación de la GS

En relación a la regulación transcripcional de la GSp en plantas, está comprobado el papel inductor de la luz sobre el gen de esa isoforma, cuya transcripción también es estimulada en oscuridad con sacarosa, pero si se agregan aminoácidos la transcripción es reprimida (Oliveira y Coruzzi, 1999). Los resultados obtenidos a partir de la transcriptómica en *Arabidopsis* pusieron en evidencia que el nitrato induce la transcripción del gen de la GSp (Wang *et al.*, 2000). De esta forma, el metabolismo carbono-nitrogenado determina la expresión de la GSp, lo que permite una coordinación con las demás enzimas de la reducción de nitrato y asimilación de amonio (Wang *et al.*, 2000).

Un tema de creciente interés es la regulación de la actividad de las isoformas de la GS por modificación post-traducciona. Se ha comprobado que tanto las GSp como la GSc son susceptibles de fosforilación y unión a proteínas 14-3-3, que las estabilizan (Finnemann y Schjoerring, 2000; Riedel *et al.*, 2001). Experimentos de mutagénesis dirigida han confirmado el papel de las dos cisteínas características de las GSp (Márquez y Canovas, 2004). Esto podría indicar una relación con el mecanismo de regulación a través del sistema tiorredoxina - ferredoxina reductasa en respuesta a la luz (Márquez y Canovas, 2004).

2.1.3. GS y el estrés abiótico

Las dos isoformas de GS parecen tener diferentes roles durante el estrés abiótico. La actividad GSc está relacionada con la producción de prolina en las células acompañantes del floema en plantas de tabaco sometidas a estrés por sal (Brugière *et al.*, 1999) y a la remobilización de nitrógeno en plantas de tomate sometidas a déficit hídrico (Bauer *et al.*, 1997). Por otra parte la

sobreexpresión de GSp confiere mayor tolerancia a estrés lumínico en tabaco y estrés salino en arroz (Kozaki y Takeba, 1996; Hoshida *et al.*, 2000).

Los resultados publicados en relación a la respuesta de las GSc y GSp a condiciones de estrés osmótico no son consistentes, y dependiendo de la planta estudiada la actividad GS total se incrementa, disminuye o no cambia en respuesta a estrés osmótico. Tampoco se ha determinado la contribución de cada isoforma en la actividad total de la enzima (Bernard y Habash, 2009). De todas formas, en plantas de trigo se encontró que la actividad total se incrementa respecto al control con el agregado de 150 mM de NaCl y disminuye cuando la concentración es de 500 mM, lo que indica que la respuesta de la GS a estrés osmótico depende de la intensidad de éste (Wang *et al.*, 2007).

2.2. Glutamato sintasa

2.2.1. Características moleculares y funcionales de las isoformas

En plantas se ha descrito la existencia de dos proteínas distintas con actividad GOGAT: una que usa como donador de electrones fundamentalmente NADH y secundariamente NADPH, denominada NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14), y otra que usa específicamente ferredoxina reducida, denominada Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) (Lancien *et al.*, 2002; Feraud *et al.*, 2005).

La Fd-GOGAT, de localización plastídica, es la forma mayoritaria en hojas, donde también se ha comprobado la presencia de NADH-GOGAT. La NADH-GOGAT está localizada principalmente en plastos del parénquima de raíces y de nódulos de leguminosas. En algunas plantas como arroz, tabaco y *Arabidopsis* hay Fd-GOGAT en plastos de raíz, pero parece ser una proteína distinta a la de hojas, que en cebada sería la misma (Hirel y Lea, 2001).

La diferente distribución de las dos isoformas en distintos órganos sugiere funciones distintas. Así mientras la Fd-GOGAT estaría relacionada a procesos que ocurren en las hojas, como la fotosíntesis y la fotorrespiración, la NADH-GOGAT de nódulos estaría implicada en la asimilación del amonio obtenido por FBN, y la de raíces en la asimilación del amonio o en la reasimilación del amonio liberado del catabolismo aminoacídico (Lancien *et al.*, 2002; Feraud *et al.*, 2005; Suzuki y Knaff, 2005).

La enzima Fd-GOGAT ha sido purificada de distintas especies vegetales y se trata de una proteína monomérica, de peso molecular comprendido entre 130 y 180 kDa, que en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* contiene como grupos prostéticos flavina y un centro sulfoférico del tipo [3Fe-4S] habiéndose reportado unas características similares en otros organismos fotosintéticos, incluidas las plantas superiores. (Márquez *et al.*, 1988).

La obtención de clones de cDNA para la Fd-GOGAT de distintos vegetales ha permitido evidenciar homología del orden del 85 % entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas correspondientes. En las secuencias aminoacídicas de las Fd-GOGAT se han identificado las regiones implicadas en la unión con el grupo prostético flavínico, en base a la homología existente con el flavocitocromo b₂ de levadura (Srivastava *et al.*, 2002). También se ha identificado otra región que incluye 3 cisteínas conservadas, que se demostró participan en la unión del centro sulfoférico. Ambas regiones se localizan en la mitad de la región C-terminal de la proteína (Srivastava *et al.*, 2002).

El número de genes de Fd-GOGAT por genoma varía. En cebada, maíz, espinaca y pino se ha sugerido la presencia de un único gen por genoma y en arábido se demostró la existencia de dos genes, el *glu1* que se expresa predominantemente en hojas, y el *glu2* que lo hace en hojas y raíces (Srivastava *et al.*, 2002).

Al igual que ocurre con la GS, tan sólo se han obtenido mutantes afectados en Fd-GOGAT de pocas especies vegetales (arábido, cebada y tabaco), todos con fenotipo fotorrespiratorio (Morris *et al.*, 1988; Joy *et al.*, 1992; Ferrario-Méry *et al.*, 2000). El análisis de los mutantes fotorrespiratorios de arábido deficientes en Fd-GOGAT mostró el papel esencial de esta enzima en la reasimilación del amonio fotorrespiratorio. En condiciones no fotorrespiratorias esta función puede ser sustituida por la actividad NADH-GOGAT o por la GDH, y en esas condiciones la planta no exhibe el fenotipo mutante (Morris *et al.*, 1988).

La NADH-GOGAT es también monomérica, pero de mayor tamaño que la Fd-GOGAT con un peso molecular entre 158 y 240 kDa, que contiene flavina y un centro sulfoférico como grupos

prostéticos. Se han obtenido clones de cDNA a partir de alfalfa y arabidopsis y se han identificado dos regiones con homología con los genes para las subunidades grande y pequeña de la NADPH-GOGAT de *E. coli*, microorganismo en el cual la enzima es dimérica. La región con homología para la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli* presenta también homología con la Fd-GOGAT (Srivastava *et al.*, 2002). La actividad NADH-GOGAT es máxima en tejidos jóvenes en desarrollo, por lo que junto con la GSc estaría involucrada en la síntesis de glutamato a partir de la glutamina, que es transportada desde los tejidos senescentes hasta los tejidos no verdes, que actuarían como sumidero. El papel más claro de la NADH-GOGAT es en los nódulos donde se ha comprobado la inducción de una isoforma específica, concomitantemente con el proceso del desarrollo del nódulo.

2.2.2. Regulación de GOGAT

Al igual que GSp la cantidad de Fd-GOGAT es diferente según el estado de desarrollo de la hoja y es máxima en hojas maduras (Pajuelo *et al.*, 1997). Existe entonces una relación entre la regulación de la GSp y la Fd-GOGAT, lo que evidencia una posible vinculación entre sus funciones (Forde y Lea, 2007).

La Fd-GOGAT es también regulada por la luz, a la que parece responder mediante control transcripcional, y postranscripcional a través del fitocromo (Srivastava *et al.*, 2002). De todas formas, plantas de cebada transferidas a oscuridad mantienen durante un tiempo considerable altos niveles de mRNA, proteína y actividad Fd-GOGAT. Esto indicaría que la luz *per se* no es el único factor responsable de la regulación de la expresión de la Fd-GOGAT (Pajuelo *et al.*, 1997). Resultados obtenidos a partir de la transcriptómica en arabidopsis pusieron en evidencia que el nitrato induce la transcripción del gen de la Fd-GOGAT y se duda si es específica por el nitrato, o se induce también con otras fuentes nitrogenadas (Wang *et al.*, 2000).

2.2.3. GOGAT y el estrés abiótico

Estudios *in vivo* con precursores marcados: $^{14}\text{Cglu}$, $^{15}\text{NH}_4^+$ o $^{15}\text{NO}_3^-$, sugieren que el glutamato es el principal precursor de la síntesis de prolina acumulada en condiciones de estrés (Bogges *et al.*, 1976; Rhodes *et al.*, 1986). Además, en tomate se encontró que la enzima Fd-

GOGAT incrementa su cantidad y actividad en condiciones de estrés salino y que el glutamato producido es el principal precursor para la síntesis de prolina (Berteli *et al.*, 1995). Sin embargo, en *Vicia faba* la salinidad produce disminución de las actividades NADH-GOGAT y Fd-GOGAT (Rus-Álvarez y Guerrier, 1994).

En *L. corniculatus*, en condiciones de déficit hídrico, se encontró que la cantidad y actividad Fd-GOGAT se incrementa en plantas cultivadas con nitrato y descende en plantas cultivadas con amonio (Díaz *et al.*, 2005b). Por otro lado, en *L. japonicus* cultivado con nitrato y amonio, sometido a déficit hídrico, no varió la actividad ni la cantidad de Fd-GOGAT (Márquez *et al.*, 2005). Sin embargo, en la halófito *Mesembryantum crystallinum* sometida a estrés salino se producen descensos de la actividad de esta enzima (Popova *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la Fd-GOGAT puede tener una regulación diferente en condiciones de estrés, que estaría determinada por la especie, la nutrición nitrogenada, o por el tipo de estrés.

2.3. Glutamato deshidrogenasa

2.3.1. Características moleculares y funcionales de las isoformas

Se han descrito GDH de localización citosólica y mitocondrial, hexaméricas y compuestas por subunidades de 45 y 41 kDa denominadas α y β respectivamente, que según la cantidad relativa de cada subunidad tienen diferente actividad. La isoforma α tiene actividad aminante y utilizando como dador de electrones el NADPH (EC 1.4.1.4), mientras que la isoforma β tiene actividad desaminante y los aceptores de electrones puede ser NAD^+ (EC 1.4.1.2) y NADP^+ (EC 1.4.1.3) (Turano *et al.*, 1997).

La K_M de la GDH para el amonio está en el rango de 10 a 80 mM, razón que hizo pensar que no es funcionalmente la más importante en su asimilación, dado que en las plantas en condiciones normales no se dan estas concentraciones de amonio (Labboun *et al.*, 2009). El papel de esta enzima en el metabolismo del glutamato en las plantas ha estado sujeto a discusión (Dubois *et al.*, 2003; Terce-Laforge *et al.*, 2004), y durante décadas se le asignó como función la aminación reductiva del 2-oxoglutarato sintetizando glutamato. De esta forma su actividad constituía la reacción

clave en la asimilación del amonio en las plantas. Hoy se considera que la GDH participa predominantemente en procesos catabólicos, en la medida que su actividad se estimula en la oscuridad, senescencia, germinación y situaciones de limitación de carbono. Mutantes deficientes en GDH obtenidos en *arabidopsis* y maíz indican respectivamente una deficiencia para el crecimiento en alto nitrógeno (20 mM NH_4^+ + 40 mM NO_3^-) o a bajas temperaturas en la oscuridad (Márquez y Canovas, 2004).

2.3.2. Regulación de la GDH

Forde y Lea (2007), revisaron la relevancia del papel de la GDH en la asimilación de amonio. Los autores proponen que su actividad aminante es importante durante la senescencia y en condiciones de estrés, situaciones en las que aumenta la concentración de amonio. En estas condiciones la enzima participaría en la asimilación del amonio y actuaría como un sistema de detoxificación de este ión. En plantas de tabaco, vid y trigo, en respuesta a estrés salino la cantidad de proteína GDH aminante se incrementa, y es el resultado de la inducción del gen correspondiente a la subunidad α (Skopelitis *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

3. GSp y ciclo C2

La enzima rubisco carboxila u oxigena a la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) y mientras la carboxilación da origen al ciclo C3, la oxigenación pone en marcha una serie de reacciones conocidas como fotorrespiración o ciclo C2. En este proceso se libera amonio que es reasimilado en el cloroplasto por la vía GS/GOGAT. La oxigenación de la RuBP produce 2-fosfoglicolato (2-PG) y 3-PG, que se incorpora al ciclo C3. En el cloroplasto el 2-PG por acción de fosfoglicolato fosfatasa se transforma en glicolato (Figura 2), que en el peroxisoma es oxidado a glioxilato por la glicolato oxidasa (GO EC 1.1.3.15). El glioxilato alimenta a una serie de reacciones que se conocen como ciclo C2, que libera glicina (Figura 2).

El mutante fotorrespiratorio *Ljgln2-2* no tiene actividad GSp, por lo que el amonio liberado en la fotorrespiración no es reasimilado, lo que hace que esas plantas cultivadas en concentración normal de CO_2 presenten un fenotipo característico, con signos de clorosis derivados de la

acumulación de amonio (Orea *et al.*, 2002). Cuando los mutantes crecen en alta concentración de CO_2 , la fotorrespiración se anula y las plantas no exhiben el fenotipo clorótico, y no se diferencian de las salvajes cultivadas crecidas en concentración normal de CO_2 .

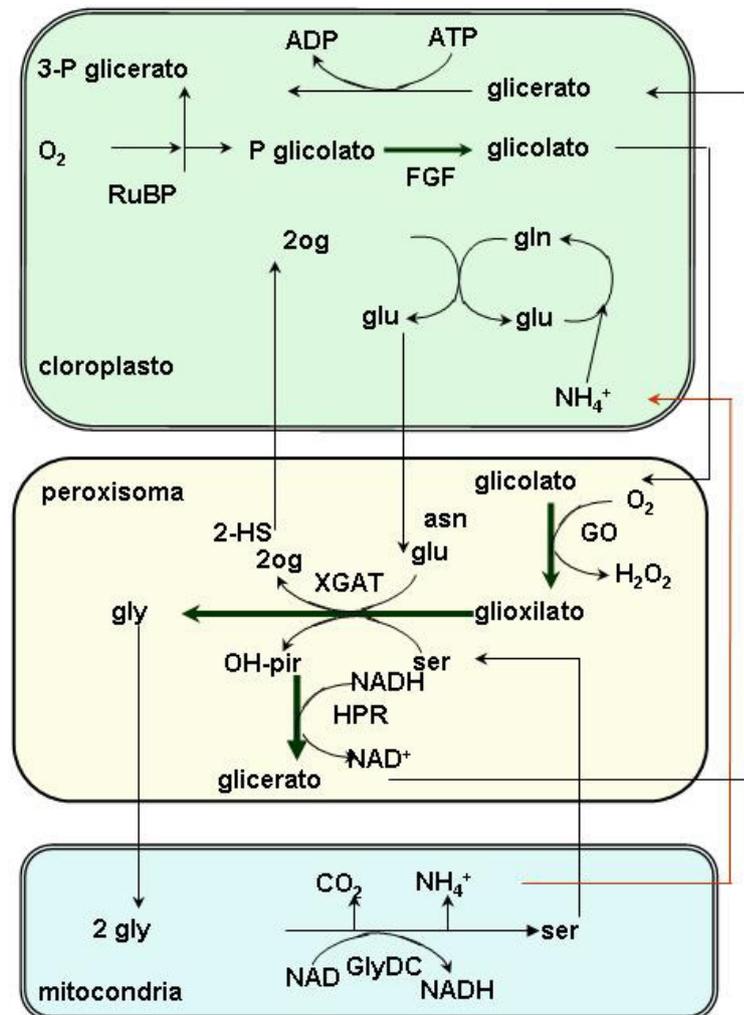


Figura 2. Esquema del ciclo C2. 2-oxoglutarato (2og), glutamato (glu), glutamina (gln), 2-hidroxisuccinamato (2hs), asparragina (asn), glicina (gly), serina (ser) fosfoglicolato fosfatasa (FGF), glicolato oxidasa (GO), hidroxipiruvato reductasa (HPR), glicina descaboxilasa (GlyDC) y aminoácido glioxilato aminotransferasa (XGAT) en donde X puede ser serina, asparragina, alanina, aspartato o glutamato. Tomado de Monza *et al.* (2004).

En el ciclo C2 participan transaminasas que permiten la conversión del glioxilato en glicina. Estas transaminasas tienen como sustratos, además del glioxilato, serina, glutamato, aspartato, alanina y asparragina. Es característico de estas transaminasas transferir el grupo amino del aminoácido al grupo aldehído del glioxalato en un único sentido. En condiciones experimentales la

determinación de la actividad de las transaminasas del ciclo C2 es diferente según el aminoácido que se suministre como sustrato. Por esto, para determinar la actividad de estas enzimas se agregan a la mezcla de ensayo, por separado, los aminoácidos serina (SGAT), glutamato (GGAT), aspartato, asparragina (AsGAT) o alanina (Lea *et al.*, 1990). El ciclo se cierra con la condensación de 2 glicinas por acción de la glicina descarboxilasa rindiendo CO₂, amonio y serina que es utilizada nuevamente en las transaminaciones (Figura 3). Por otra parte el glicerato que se incorpora al ciclo C3 se origina por reducción del hidroxipiruvato (Figura 2), reacción catalizada por la hidroxipiruvato reductasa (HPR EC 1.1.1.26).

Hay controversias respecto a cual de los aminoácidos contribuye más con la síntesis de glicina a través del ciclo C2. Estimaciones basadas en la aplicación de aminoácidos marcados con ¹⁵N a hojas, demostraron que la alanina aporta 3 veces más grupos amino que el glutamato (Betsche, 1983). Sin embargo, Yu *et al.* (1984) cuando aplicaron aminoácidos marcados con ¹⁵N a peroxisomas aislados concluyeron que el glutamato aporta más nitrógeno que la alanina.

En condiciones de déficit hídrico, el ciclo C2 presenta respuestas difíciles de generalizar. En cebada, la actividad SGAT no cambia en diferentes condiciones de déficit hídrico (Wingler *et al.*, 1999) y controla el flujo de carbono a través de la glicina (Somerville and Ogren, 1980), por eso la SGAT y GGAT podrían funcionar cooperativamente en la producción del aminoácido glicina (Igarashi *et al.*, 2006).

4. Mutantes de *Lotus japonicus* deficientes en GSp

L. japonicus es una leguminosa que debido a sus características bioquímicas, fisiológicas y genéticas ha sido propuesta como planta modelo (Handberg y Stougaard, 1992). Las limitaciones que derivan del uso de leguminosas de interés agrícola en estudios de biología molecular y su transformación y regeneración de transgénicas en estas especies, se han podido superar con el uso de modelos como *L. japonicus*. Esta leguminosa tiene un genoma pequeño que ha sido secuenciado, un ciclo corto y se transforma y regenera con facilidad. Esto ha posibilitado avances en el conocimiento de los procesos simbióticos relacionados con la fijación de nitrógeno y micorrización, identificándose nuevos genes claves en estos mecanismos (Udvardi *et al.*, 2005). La utilización de

las técnicas “ómicas” ha posibilitando un salto cualitativo en los avances que pueden producirse en la comprensión de las respuestas bioquímicas y genéticas en condiciones de estrés abiótico (Desbrosses *et al.*, 2005; Udvardi *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008). *L. japonicus* fue la primera leguminosa y la segunda especie vegetal de la que obtuvieron mutantes fotorrespiratorios deficientes en GSp, y el mutante *Ljgln2-2* fue usado en esta tesis como una herramienta para evaluar la participación de la GSp en las respuestas bioquímicas y genéticas al déficit hídrico.

Las condiciones utilizadas para la búsqueda de mutantes fotorrespiratorios parten de la idea formulada por Somerville y Ogren (1979) basada en que la modificación de la concentración de CO₂ presente en la atmósfera permite seleccionar a los mutantes del salvaje. Utilizando esta técnica, se consiguieron aislar mutantes de arabis afectadas en el ciclo C₂. Entre las siete clases de mutantes aislados, no se encontraron en esta planta mutantes afectados en las enzimas catalasa y GS (Somerville, 1984). Un programa de selección de mutantes similar al usado por Somerville y Ogren (1979) fue utilizado posteriormente en cebada y guisante por Blackwell *et al.* (1988), para aislar mutantes en enzimas implicadas en el ciclo C₂, pudiéndose aislar los primeros mutantes fotorrespiratorios deficientes en GSp de cebada (Wallsgrave *et al.*, 1987). Entre las siete clases de mutantes, los afectados en las enzimas catalasa y GS no habían sido descritos en arabis (Somerville, 1984).

También se obtuvieron mutantes de arabis (Somerville y Ogren, 1980), de cebada (Blackwell *et al.*, 1987) y de poroto (Kendall *et al.*, 1987) deficientes en GOGAT. Estos mutantes, junto con los deficientes en la actividad GSp han sido de gran importancia para el estudio de la reasimilación del amonio derivado de la fotorrespiración (Wallsgrave *et al.*, 1987). Como ambos mutantes contenían niveles normales de la actividad GDH en hojas (Wallsgrave *et al.*, 1987), se pensó que la actividad de esa enzima podía suplir la deficiencia de GSp y GOGAT en lo que hace a la asimilación del amonio fotorrespiratorio. El hecho de que no se hayan encontrado mutantes de GS en arabis podría deberse, como se ha sugerido, a que las dos isoformas citosólica y plastídica se encuentren en el mismo tipo celular, y por tanto, la pérdida de actividad de una de las isoformas sería compensada por la otra (Coruzzi, 2003).

También se han usado plantas transgénicas en el estudio del ciclo C2. Para esto se han obtenido plantas transgénicas que expresan una construcción antisentido de los genes GSc y GSp y otras que sobreexpresan estos genes, lo que constituye una estrategia interesante para el estudio de la funcionalidad de las isoformas GS (Temple *et al.*, 1998; Migge *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2004).

Más recientemente se han obtenido y caracterizado dos mutantes fotorrespiratorios de *L. japonicus* deficientes en GSp: *Ljgln2-1* y *Ljgln2-2* (Orea *et al.*, 2002; Betti *et al.*, 2006). Estos mutantes se obtuvieron por mutagénesis con EMS, un agente alquilante capaz de provocar transiciones GC-AT. La selección de estos mutantes se realizó a través del cultivo de las plantas en una atmósfera con 0,7% CO₂, concentración suficiente para suprimir la fotorrespiración, por lo que los mutantes crecían con un fenotipo similar a los salvajes. Después de varias semanas de crecimiento en alto CO₂, las plantas fueron transferidas a una atmósfera normal donde los mutantes fueron identificados porque mostraron síntomas como clorosis y necrosis, en principio afectando más a las hojas jóvenes. Si estas plantas eran devueltas a la atmósfera con alto CO₂ recuperaban su fenotipo normal, y así pudieron ser mantenidas y propagadas. A partir de retrocruces entre los mutantes y salvaje se eliminaron las mutaciones no deseadas, y cruzando los mutantes entre sí, para estudiar la genética de las mutaciones, lo que permitió confirmar que éstas eran monogénicas, recesivas y alélicas (Orea *et al.*, 2002).

A nivel bioquímico se encontraron diferencias entre los mutantes *Ljgln1-1* y *Ljgln2-2*, lo que sugiere que las mutaciones que les afectan son distintas. Orea *et al.* (2002) pusieron de manifiesto que ambos mutantes presentaban una disminución del orden del 60% de la actividad GS transferasa en extractos crudos de hojas. De esta forma se demostró que esas diferencias son atribuibles a una deficiencia específica en la isoforma GSp, y que la actividad remanente es atribuible exclusivamente a la GSc. La estimación de la cantidad de GSc y GSp mediante *western blot* permitió determinar que la GSp está presente a niveles muy bajos, pero detectables, tanto en hojas como en raíces del mutante *Ljgln2-1*, mientras que el mutante *Ljgln2-2* carece de GSp en esos órganos, lo que indica que ambas mutaciones son diferentes.

Se aislaron los cDNA *GLN2* completos de las plantas mutantes (Betti *et al.*, 2006) y fueron secuenciados dos productos de RT-PCR independientes, lo que permitió detectar una única

mutación en la secuencia codificante para *GLN2* de cada uno de los mutantes. Las mutaciones observadas fueron una transversión GC-AT y una transición AT-TA, que provocaron sustituciones aminoacídicas de la glicina-85 por arginina en *Ljgln2-1* y de la leucina-278 por histidina en *Ljgln2-2*. Se demostró así que los mutantes estaban específicamente afectados en la región codificante del gen *GLN2*, gen estructural para la GSp. Mediante expresión heteróloga *in vitro* se comprobó que las mutaciones en cuestión anulaban por completo la actividad de la GSp, y además, que afectaban a la estabilidad y/o estructura cuaternaria de la enzima GSp (Betti *et al.*, 2006).

5. Acumulación de osmolitos derivados del glutamato y de la glutamina en condiciones de estrés osmótico

El glutamato derivado del ciclo GS/GOGAT es utilizado para la síntesis de prolina (Rhodes *et al.*, 1986) que puede representar el 30 % de los aminoácidos en condiciones de déficit hídrico (Díaz *et al.*, 2005b). El GABA se sintetiza también a partir de glutamato y su concentración también se incrementa en la condición de estrés osmótico (Shelp *et al.*, 1999). Por otro lado, en algunas plantas como lotus, independientemente del agua disponible, la mayor parte de la glutamina derivada del ciclo GS/GOGAT, es usada en la síntesis de asparragina, que puede representar el 25% de los aminoácidos totales (Waterhouse *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 2005a) y su proporción se incrementa en condiciones de déficit hídrico (Díaz *et al.*, 2005a).

5.1. Metabolismo de prolina

5.1.1. Síntesis y oxidación de prolina

Los estudios *in vivo* realizados en plantas, en los que se usó glutamato marcado, demostraron que en condición de déficit hídrico esta molécula es el principal precursor de la síntesis de prolina, y que el descenso del potencial osmótico determina el aumento de la velocidad de su biosíntesis (Rhodes *et al.*, 1986; Samaras *et al.*, 1995).

En la vía de síntesis de prolina a partir de glutamato (Figura 3), éste es reducido por la pirrolina 5 carboxilato sintetasa (P5CS, EC 1.5.1.12) a glutamato semialdehído (GSA), que se cicla

espontáneamente formando pirrolina 5 carboxilato (P5C). La prolina también puede ser sintetizada a partir de la ornitina que es transformada en GSA (Figura 3) por la ornitina aminotransferasa (OAT, EC 2.6.1.13) (Funck *et al.*, 2008). Seguidamente la P5C reductasa (P5CR, EC 1.5.1.2) reduce el P5C que utiliza NADPH como cofactor al igual que la P5CS (Hare *et al.*, 1998) (Figura 3). Las enzimas P5CS y P5CR se localizan en el citosol y en los plastos, mientras que la OAT se localiza en la mitocondria (Szabados y Savouré, 2010). Se ha encontrado una única copia del gen *OAT* en el genoma de *arabidopsis* y *Medicago truncatula*, que presenta una secuencia característica de un péptido de tránsito mitocondrial (Armengaud *et al.*, 2004; Liepman y Olsen, 2004). En la mitocondria se encuentra la enzima arginasa, responsable de la producción de ornitina (Roens *et al.*, 1998).

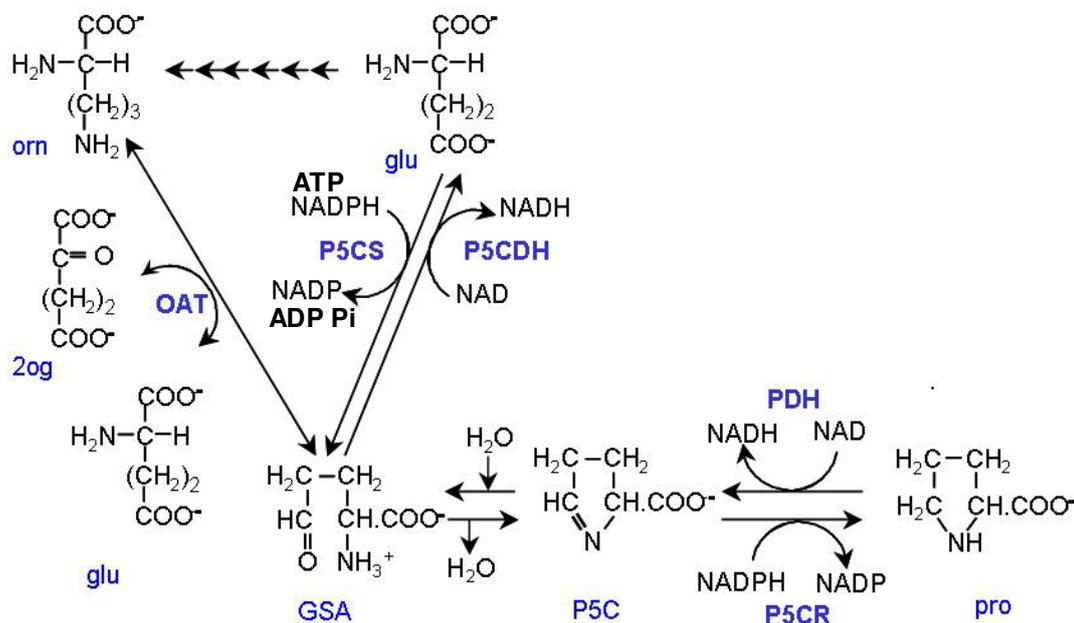


Figura 3. Esquema del metabolismo de la prolina en plantas. Ornitina (orn), glutamato (glu), 2 oxoglutarato (2og), glutamato semialdehído (GSA), pirrolina 5 carboxilato (P5C), prolina (pro), ornitina aminotransferasa (OAT), P5C sintetasa (P5CS), P5C deshidrogenasa (P5CDH), prolina deshidrogenasa (PDH) y P5C reductasa (P5CR). Tomado de Díaz *et al.* (2004).

La vía de oxidación de prolina a glutamato consta de dos pasos (Figura 3), el primero es su oxidación a P5C, reacción catalizada por la prolina deshidrogenasa (PDH, EC 1.5.1.2) (Kiyosue *et al.*, 1996), que utiliza NAD como cofactor y dona electrones a la cadena respiratoria (Kiyosue *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha identificado en la PDH de *arabidopsis* una secuencia amino terminal característica de proteínas que se exportan a mitocondrias (Kiyosue *et al.*, 1996). En el paso siguiente (Figura 3) el P5C es oxidado en una reacción catalizada por la enzima P5C deshidrogenasa

(P5CDH), (E.C. 1.5.1.12), enzima localizada en la mitocondria que utiliza NAD⁺ como cofactor (Forlani *et al.*, 1997). La PDH y P5CDH catalizan las reacciones inversas a las catalizadas por la P5CS y P5CR respectivamente (Figura 3), aunque su localización y regulación son diferentes (Szabados y Saviouré, 2010).

El incremento de la concentración de prolina está determinado, en buena parte, por la disponibilidad de sus precursores al momento de imposición del estrés (Hare *et al.*, 1998). En plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan P5CS, Kavi Kishor *et al.* (1995) demostraron que el glutamato es limitante en la acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico o salinidad. Por otro lado, en plantas de *Brassica napus* también se encontró que la baja concentración de glutamato se relaciona con una baja concentración de prolina en condiciones de déficit hídrico (Trotel *et al.*, 1996).

5.1.2. Regulación del metabolismo de la prolina

La acumulación de prolina es el resultado de la inducción y activación de enzimas implicadas en su biosíntesis y de la disminución de las involucradas en su oxidación, esto último a través de un mecanismo de retroinhibición (Samaras *et al.*, 1995). Por otra parte, se han identificado transportadores de prolina que se expresan en condiciones de estrés osmótico (Rentsch *et al.*, 1996; Schwacke *et al.*, 1999) que también pueden contribuir a su acumulación (Rentsch *et al.*, 1996).

La P5CS es un punto de control de la vía de síntesis de prolina (Yoshida *et al.*, 1997) y su actividad está regulada competitivamente por prolina por un mecanismo de retroinhibición (Zhang *et al.*, 1995). En *Arabidopsis* se han descrito dos genes *P5CS* muy relacionados que están regulados en forma diferente por el déficit hídrico, salinidad y ácido abscísico, sugiriendo que tienen roles específicos en el control de la síntesis de prolina (Székely *et al.*, 2008).

En relación a la *P5CR* en plantas de soja, arveja y *Arabidopsis*, aumenta la abundancia de sus transcritos en condiciones de estrés osmótico, pero no está claro si esto contribuye a incrementar la acumulación de prolina durante esa situación (Kavi Kishor *et al.*, 1995 Szabados y Saviouré, 2010). De hecho, cuando se sobreexpresó en tabaco el gen *P5CR* de soja no aumentó la

concentración de prolina, aunque la actividad P5CR se incrementó 100 veces respecto al salvaje. En plantas de tabaco en las que se sobreexpresaron los genes *P5CS* o *P5CR* de *V. aconitifolia* se incrementaron ambos transcritos, pero sólo aumentó la concentración de prolina en plantas que sobreexpresaban *P5CS*. Por esto, se ha propuesto que la *P5CS* catalizaría el paso limitante en la síntesis de prolina (Szabados y Saviouré, 2010).

De la misma forma que la *P5CS*, la *OAT* puede ser un punto de control de la síntesis de prolina, y esta vía tendría importancia en algunas plantas cuando son cultivadas con altos niveles de nitrógeno (Delanuey *et al.*, 1993). En arroz se ha encontrado que la cantidad de amonio suministrado se relaciona positivamente con la actividad *OAT* y los contenidos de prolina (Lim y Kao, 2001). Sin embargo en *arabidopsis*, Funck *et al.* (2008) encontraron que la actividad *OAT* no se relaciona con la síntesis y acumulación de prolina, pero sí con su oxidación (Figura 3).

Otro aspecto a considerar en relación a la acumulación de prolina es el control que opera sobre su catabolismo, aunque en términos relativos la contribución de la inhibición de la oxidación es menor que la de la biosíntesis (Chiang y Dandekar, 1995; Szabados y Saviouré, 2010). La oxidación de prolina a glutamato (Figura 3) se ve inhibida en situaciones de déficit hídrico, pero se activa una vez que las plantas son rehidratadas (Kiyosue *et al.*, 1996). La actividad *PDH* parece estar fuertemente inducida por prolina y reprimida por bajos potenciales hídricos en la célula. Durante la rehidratación se induce la transcripción de esta enzima, lo que se debería al efecto conjunto de dos factores: la falta de represión por déficit hídrico y el alto contenido de prolina acumulada durante el estrés (Kiyouse *et al.*, 1996).

La otra enzima involucrada en la oxidación de la prolina es la *P5CDH*, que en *arabidopsis* está codificada por un único gen que se expresa en nivel basal y se induce por prolina. En condiciones de estrés osmótico el RNAm de la *P5CDH* genera un antisentido natural que forma un RNA de doble cadena que es procesado por la maquinaria de silenciamiento a pequeños RNA endógenos, los cuales llevan a la hidrólisis de RNAm de la *P5CDH* y reducen los niveles de transcritos durante la situación de estrés (Borsani *et al.*, 2005).

La concentración de nitrógeno en la célula también está relacionada con la vía de síntesis de prolina que predomina. En *V. aconitifolia* cuando la concentración de nitrógeno es alta, y en condiciones de estrés salino, la principal vía de síntesis de prolina es a partir de la ornitina, mientras que en la misma condición de estrés pero con menor concentración de nitrógeno predomina la síntesis a partir de glutamato (Zhang *et al.*, 1995; Delauney *et al.*, 1993). Por otro lado, la forma de nitrógeno combinado también incide sobre la vía de síntesis de prolina. En *L. corniculatus* se ha establecido que en plantas cultivadas con nitrato predomina la vía de síntesis a partir de glutamato, mientras que en las cultivadas con amonio predomina la vía a partir de ornitina (Díaz *et al.*, 2005b).

5.2. Síntesis de asparragina

Se han clonado distintos cDNAs de la familia de genes *ASN* para la asparragina sintetasa (AS, E.C. 6.3.5.4.). En *arabidopsis*, planta que transporta nitrógeno como glutamina, la AS presenta un mecanismo de regulación por luz, carbono o nitrógeno orgánico inverso respecto a la *GSp*. La luz, sacarosa o glucosa, reprimen su expresión, que se favorece en oscuridad o limitación de carbono, al igual que con alta concentración de nitrógeno orgánico (Coruzzi, 2000). Sin embargo en alfalfa, que transporta el nitrógeno como asparragina (Girossue *et al.*, 199), la AS juega un papel crucial en la síntesis de asparragina, molécula carbono-nitrogenada utilizada por las plantas en el transporte de nitrógeno y carbono (Gaufichon *et al.*, 2010).

También la nutrición nitrogenada determina la concentración relativa de glutamina y asparragina. Estas amidas se encuentran en mayor concentración en plántulas de trigo cultivadas con amonio respecto a las cultivadas con nitrato de amonio que presentan niveles intermedios, y las cultivadas con nitrato tienen los niveles más bajos. En tomate se observa un comportamiento similar, cuando las plantas son cultivadas con amonio se acumula más glutamina que en las cultivadas con nitrato, que presentan altos niveles de aspartato y glutamato (Fernandes y Rossiello, 1995).

En diferentes condiciones de estrés como la oscuridad prolongada, la infección por patógenos, o en estados fisiológicos como la germinación y la senescencia foliar, en los que se incrementa la proteólisis y el catabolismo de aminoácidos, se acumula amonio en la planta. La síntesis de asparragina en tales situaciones sirve para evitar los efectos tóxicos del amonio, así

como para almacenar y movilizar el nitrógeno (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2004; Olea *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004).

5.3. Síntesis de γ - amino butirato

El γ -amino butirato (GABA) es un aminoácido no proteico, derivado de la descarboxilación del glutamato. Su acumulación se estimula en condiciones de exceso y déficit hídrico, choque térmico, daño mecánico y frente a diferentes agentes bióticos (Shelp *et al.*, 1999). Esta molécula tiene alta solubilidad en agua y flexibilidad, molecular que le permite adoptar formas espaciales diferentes, incluyendo una estructura cíclica similar a la prolina (Shelp *et al.*, 1999).

La enzima responsable de la síntesis de este osmolito es la glutamato descarboxilasa (GDC, EC 4.1.1.5) que se localiza exclusivamente en el citoplasma y tiene como cofactor al fosfato de piridoxal. Aunque el GABA puede sintetizarse a partir de la amina putrescina, su acumulación en condiciones de estrés es primariamente por acción de la GDC. El incremento de la actividad GDC, que tiene un pH óptimo de 5.8, se debe a la acidificación del citoplasma como consecuencia de la situación de estrés. El hecho que la reacción catalizada por esta enzima consume H^+ , puede interpretarse como una respuesta adaptativa de la planta que contribuye a regular el pH citoplasmático (Bouché y Fromm, 2004).

Se ha encontrado que altos niveles de glutamato estimulan la actividad GDC. A su vez la GDC es activada por calmodulina- Ca^{+2} , lo que es interesante dado que la reducción del pH citosólico contribuye a aumentar los niveles de Ca^{+2} , que resultan de la movilización de este catión desde la vacuola (Shelp *et al.*, 1999).

En *arabidopsis*, los cambios en la cantidad de proteína GDC y la expresión diferencial del gen a nivel de mRNA sugieren que la actividad de esta enzima está regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional. En esta especie, se han detectado dos isoformas de GDC, una que se encuentra en todos los órganos y otra que es específica de raíz la cual se incrementaría en plantas cultivadas con amonio respecto a plantas cultivadas con nitrato (Shelp *et al.*, 1999).

El GABA actúa como osmolito compatible, en el almacenamiento de nitrógeno, en el desarrollo y crecimiento de la planta, así como en la inducción de un transportador común para prolina, glicina betaína y GABA (Schwacke *et al.*, 1999). Se ha encontrado además una relación entre la concentración de GABA en tilacoides aislados con la protección frente al daño por enfriamiento y estrés salino, que supera las propiedades crioprotectoras de la prolina (Shelp *et al.*, 1999). Además, el GABA posee un índice de captura del radical hidroxilo que supera a los índices de captura de prolina y glicina betaína (Smimoff y Cumbes 1989).

Los estudios realizados en nuestro laboratorio con la leguminosa modelo *L. japonicus* y las leguminosas de interés agronómico *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* y *L. subbiflorus* han mostrado que en *L. corniculatus* y *L. uliginosus* la concentración de GABA se incrementa en la condición de déficit hídrico, mientras que en la especie modelo, *L. glaber* y *L. subbiflorus* la concentración de este aminoácido no cambia (Díaz *et al.* 2005a; Díaz *et al.*, 2005b). Esto indicaría que pueden existir diferencias entre especies en relación a los cambios en el metabolismo del nitrógeno en repuestas al déficit hídrico.

Según lo expuesto, en condiciones de déficit hídrico se ve afectada la síntesis de prolina, GABA, asparragina y el ciclo C2, que son parte de la respuesta al déficit hídrico de las plantas y dependientes del suministro de glutamato y glutamina para su síntesis. Dado ese marco conceptual se plantearon los siguientes objetivos específicos, centrados en el estudio de la leguminosa modelo *Lotus japonicus*, haciendo uso para ello de plantas salvajes y mutantes *Ljgln2-2* deficientes en GSp:

- Evaluar el rol de la GSp en las respuestas a déficit hídrico.
- Establecer si el nitrato y el amonio determinan la vía de síntesis de prolina.

MATERIALES Y METODOS

1. Material vegetal

Las semillas de *Lotus japonicus* ecotipo Gifu fueron provistas por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA Estanzuela, Uruguay. El mutante deficiente en la GS plástica (GSp), denominado *Ljgln 2-2*, fue obtenido en el laboratorio del Prof. Antonio Márquez por mutagénesis con etilmetil sulfonato (Orea *et al.*, 2002). Este mutante presenta niveles normales de RNAm de GSp, pero la proteína GSp tiene afectada la estructura cuaternaria por lo que se degrada (Betti *et al.*, 2006).

2. Cultivo de plantas

2.1. Escarificación, esterilización y germinación de semillas

Las semillas fueron escarificadas con papel de lija fino durante 1 min, y se esterilizaron superficialmente con etanol 96° GL durante 1 min, se enjuagaron con H₂O estéril y se trataron con NaClO 10 % (v/v) durante 3 min. Posteriormente, se lavaron varias veces con H₂O estéril, donde permanecieron 3 h para eliminar taninos de la cubierta, y mejorar la germinación y el desarrollo de las plántulas. Las semillas se transfirieron a placas de Petri con agar-agua 1.5 % (p/v). La germinación se realizó a temperatura ambiente hasta un largo de radícula de 2 a 5 mm (1 - 2 días) y las plántulas se sembraron a razón de 7 por maceta. Como sustrato se usó una mezcla de arena-vermiculita (1:1) estéril. A las tres semanas de sembradas las plantas se ralearon y se dejaron 5 por maceta.

2.2. Condiciones de crecimiento

Se usaron dos condiciones de cultivo de plantas, una para *L. japonicus* ecotipo Gifu y otra para el mutante *Ljgln 2-2*. *L. japonicus* se cultivó en cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad) y 22/18° C de temperatura. La intensidad lumínica sobre la superficie de las plantas fue de 250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, para esto se usaron lámparas de halogenuro metálico frío. *Ljgln 2-2* se cultivó en cámara con 0.7 % de CO₂, con la misma intensidad lumínica pero suministrada por tubos

fluorescentes. Para el riego se usó solución nutritiva Homum (Handberg y Stougaard, 1992) modificada, en mM: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.4, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7; y en μM : Fe-NaEDTA 54, H_3BO_3 19.4, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.4, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3. Para los ensayos en que se trabajó con *Ljgln* 2-2 se usó la misma solución Homum original que contiene KNO_3 8 mM y NH_4NO_3 5 mM. Para los ensayos realizados con Gifu en distintas fuentes nitrogenadas se usó para las plantas cultivadas en nitrato KNO_3 10 mM y cuando se cultivaron con amonio NH_4Cl 10 mM.

Las plantas se cultivaron hasta el estado fenológico de 7 trifolios totalmente desarrollados, que se logró aproximadamente a los 35 días.

2.3. Imposición del déficit hídrico

El déficit hídrico se impuso en planta entera o en hojas separadas de la planta. Para lograr estrés hídrico en planta entera, se interrumpió el riego durante 4 días, mientras que los controles se mantuvieron con riego cada 2 días.

Para evaluar el efecto de la aplicación de aminoácidos sobre las actividades enzimáticas y expresión de genes del metabolismo de la prolina, los ensayos de déficit hídrico se hicieron en hojas cosechadas. Para esto se realizó un *pool* de hojas de 60 plantas y se dividió el material en cantidades de 2.5 g. Con ese material se realizaron tratamientos que consistieron en aplicar los aminoácidos aspartato, asparragina, glutamato, o glutamina mediante incubación en placas de Petri con 30 mL de agua, o con 30 mL de solución de PEG 8000 al 30 % (p/v) que genera un potencial hídrico de -1.3 MPa (Díaz *et al.*, 2005b). La concentración de amidas y aminoácidos utilizada fue 10 mM, la incubación se realizó durante 24 h y la concentración de estos compuestos en hojas se determinó por HPLC.

Para los ensayos de transcriptómica y metabolómica, las plantas del salvaje y del mutante se cultivaron en cámara de alto CO_2 . La mitad de las plantas se mantuvo con riego y la otra mitad se sometió a déficit hídrico por 4 días.

3. Preparación de extractos crudos de hojas

3.1. Extracción para determinación de enzimas

La extracción se realizó a 4° C sobre el material biológico que había sido previamente recogido, macerado y almacenado a -80 °C, y la actividad enzimática correspondiente se ensayó inmediatamente después de la extracción. Los diferentes procedimientos de extracción llevados a cabo se describen a continuación.

3.1.1. GS, Fd-GOGAT y GDH

Para la determinación de las enzimas GS, Fd-GOGAT y GDH se utilizó el procedimiento descrito por Orea *et al.* (2002). Se maceraron 2 g de hojas con 4 mL de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.2, 2-mercaptoetanol 14.3 mM, PMSF 1 mM y 2-oxoglutarato 2 mM, este último para proteger el sitio activo de la Fd-GOGAT (Márquez *et al.*, 1988). El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 20000 x g durante 30 min.

3.1.2. OAT

La extracción de la enzima OAT se hizo según Lim y Kao (2001). Se maceró 1 g de hojas con 2 mL de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.4, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM y fosfato de piridoxal 1 mM. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa, se centrifugó a 12000 x g durante 20 min y el sobrenadante se pasó por una columna PD10 Sephadex G-25 (Pharmacia Inc) y se recogieron los primeros 3.5 mL del eluido. Las proteínas se monitorearon determinado su concentración según Bradford (1976) según se describe en el apartado 5.1.

3.1.3. P5CS

La P5CS se extrajo según Sánchez *et al.* (2002). Se maceraron 100 mg de hojas con 5 % de PVP (p/p) y 500 µL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 7 mM, KCl 0.6 M, EDTA 3 mM y DTT 1mM. Se centrifugó a 20000 x g durante 20 min. Un volumen de 250 µL del sobrenadante se pasó a

través de una columna con 2 mL de Sephadex G-25 equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Previo a la elución de las proteínas la columna se lavó con 450 μ L de tampón de elusión consistente en Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con 10 % de glicerol (v/v) que se descartó. Para eluir las proteínas se pasaron 500 μ L del mismo tampón y se recogió el eluido que constituyó el extracto desalado. Las proteínas se monitorearon determinado su concentración según Bradford (1976).

3.1.4. GO, GGAT, SGAT y AsGAT

La extracción se realizó según Lea *et al.* (1990). Se maceraron 100 mg de tejido con 500 μ L de tampón HEPES 100 mM pH 6.5, fosfato de piridoxal 100 mM, 2-mercaptoetanol 100 mM y PMSF 100 mM. Se centrifugó a 10000 x g durante 10 min.

3.1.5. HPR

La extracción se realizó según Lea *et al.* (1990). Se maceraron 100 mg de tejido con 500 μ L de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.4 y se centrifugó a 10000 x g durante 10 min.

3.2. Extracción para determinación de prolina, amonio y aminoácidos

La extracción de prolina se realizó según Charest y Phan (1990) con modificaciones (Díaz *et al.*, 2005). Se maceraron 30 mg de PF de muestra en 1 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (12-5-1) y el homogenado se centrifugó a 5000 x g durante 2 min a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante al que se adicionaron 250 μ L de cloroformo, 375 μ L de agua y se centrifugó a 5000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. La fase superior (acuosa) se utilizó para la determinación de prolina. Los aminoácidos y el amonio se extrajeron según Izaguirre-Mayoral *et al.* (1992). Se maceraron 100 mg de folíolos en 250 μ L de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7.2/etanol 96° GL (1/1). El macerado se centrifugó a 5000 x g durante 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se usó para cuantificar amonio y aminoácidos totales.

El peso seco (PS) se obtuvo pesando el precipitado resultado de las extracciones.

3.3. Extracción de TBARS

Para la determinación de la peroxidación de lípidos se siguió la técnica propuesta por Iturbe-Ormaetxe *et al.* (1998). Se maceraron 50 mg de hojas con 500 μ L de tampón fosfato sódico 0.2 M pH 7.6, TRITON X100 1 % (p/v) y butilhidroxitolueno 1 % (p/v, disuelto en etanol). La mezcla se centrifugó a 15000 x g durante 2 min a 4° C y a 150 μ L del sobrenadante se le agregaron 300 μ L de ácido tri cloroacético 10 % (p/v). Se calentó a 100° C durante 20 min, se enfrió en hielo y se centrifugó a 12000 x g durante 2 min y el sobrenadante se usó para la determinación de los TBARS.

4. Determinaciones enzimáticas

4.1. GS

La actividad GS se determinó según Betti *et al.* (2006) por cuantificación del fosfato liberado como consecuencia de la hidrólisis de ATP durante la formación de glutamina. La mezcla de reacción consistió en 50 μ L de tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.5, glutamato de sodio 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM, NH_4Cl 100 mM y ATP 10 mM. La reacción se inició con el agregado de 50 μ L del extracto obtenido según se indica en 3.1.1 y se incubó durante 15 min a 37°C. Después de ese tiempo se agregó 1 mL de verde malaquita 0.3 mM y se estabilizó el color con 100 μ L de citrato trisódico 1.2 M. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin glutamato. Para cuantificar el fosfato se construyó una curva patrón con $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ a concentraciones entre 2 y 50 nmol/mL. Se definió una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima capaz de formar 1 μ mol.min⁻¹ de fosfato y la actividad se expresó en U mg⁻¹ de proteína.

4.2. Fd-GOGAT

La actividad Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) se determinó según Márquez *et al.* (1988). Como donador de electrones se usó metilviológeno (MV), y el glutamato producido por la enzima se separó y cuantificó por HPLC. La mezcla de reacción consistió en 3.4 mL de tampón fosfato potásico 125 mM pH 7.5, 2-oxoglutarato 10 mM, glutamina 10 mM, aminooxiacetato 10 mM (inhibidor de aminotransferasas), MV 100 mM y 0.5 mL de extracto enzimático obtenido en 3.1.1. La reacción se inició con el agregado de 100 μ L de $Na_2S_2O_4$ 575 mM, disuelto en $NaHCO_3$ 200 mM. Después de 30

min de incubación a 30° C la reacción se detuvo agitando vigorosamente la mezcla hasta oxidar el ditionito y se colocó en un baño a 100° C durante 10 min. Seguidamente se centrifugó a 10000 x g durante 3 min y en el sobrenadante se analizó el glutamato por HPLC según se describe en el apartado 5.3. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin MV. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de formar 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de glutamato y la actividad se expresó en U mg^{-1} de proteína.

4.3. GDH

La actividad GDH (EC 1.4.1.2) aminante y desaminante se determinó según Turano *et al.* (1997). La mezcla de reacción aminante consistió en 1.0 mL de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8, 2-oxoglutarato 20 mM, NH_4Cl 200 mM, CaCl_2 1.0 mM y NADH 0.2 mM. La mezcla desaminante consistió en 1.0 mL Tris-HCl 100 mM pH 9.3, glutamato 100 mM, CaCl_2 0.5 mM y NAD^+ 0.5 mM. La reacción se inició con el agregado del extracto enzimático obtenido en 3.1.1 y se siguió el incremento o disminución de la absorbancia del NAD^+ a 340 nm durante 2 min. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin 2-oxoglutarato para la reacción GDH aminante y sin glutamato para la reacción GDH desaminante. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de utilizar 1 μmol de NAD(H)^+ durante 1 min y la actividad se expresó en U mg^{-1} de proteína.

4.4. OAT

La actividad OAT (EC 2.6.1.13) se determinó según Kim *et al.* (1994) por cuantificación con ninhidrina ácida del P5C producido por la enzima. La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, ornitina 35 mM, 2 oxoglutarato 5 mM y fosfato de piridoxal 1 mM (Díaz *et al.*, 2005b). La reacción se inició con el agregado de 0.5 mL de extracto obtenido en 3.1.2 y se incubó durante 1 h a 30° C, la reacción se detuvo con el agregado de 0.2 mL de HClO_4 11.6 M para desnaturalizar las proteínas y generar el medio ácido para el desarrollo de color. Seguidamente se agitó, se agregó 0.2 mL de ninhidrina al 2 % (p/v), se llevó a un baño a 100° C durante 10 min, se centrifugó a 13000 x g durante 3 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado, producto de la reacción entre P5C y ninhidrina se resuspendió en 1 mL de etanol y se centrifugó nuevamente a 13000 x g durante 3 min. La absorbancia se leyó a 510 nm utilizando un coeficiente de extinción

molar para el producto de P5C-ninhidrina de $16.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Kim *et al.*, 1994). Como blanco se usó la mezcla de reacción sin ornitina ni 2-oxoglutarato. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de formar $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de P5C y la actividad se expresó en U mg^{-1} de proteína.

4.5. P5CS

La actividad P5CS (EC 1.5.1.12) se determinó según Sánchez *et al.* (2002) por cuantificación del fosfato liberado como consecuencia de la formación del GSA. La mezcla de reacción consistió en $50 \mu\text{L}$ de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7, glutamato de sodio 50 mM , MgCl_2 20 mM , ATP 10 mM y como inhibidor de la actividad GS se agregó γ glutamil hidroxamato 100 mM (Sánchez *et al.* 2002). La reacción se inició con el agregado de $50 \mu\text{L}$ del extracto desalado obtenido en 3.1.3 y se incubó durante 5 min a 37° C . Después de ese tiempo se agregó 1 mL de verde malaquita 0.3 mM y se estabilizó el color con $100 \mu\text{L}$ de citrato trisódico 1.2 M . Como blanco se usó la mezcla de reacción sin glutamato. Para cuantificar el fosfato se construyó una curva patrón con $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones entre 2 y 50 nmol/mL . Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de formar $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de fosfato y la actividad se expresó en U mg^{-1} de proteína.

4.6. GO

La actividad GO (EC 1.1.3.15) se determinó según Lea *et al.* (1990), por cuantificación del consumo de oxígeno con electrodo de Clark. La mezcla de reacción consistió 2 mL tampón Tris-HCl 50 mM pH 7 y glicolato de sodio 50 mM . La reacción se inició agregando $100 \mu\text{L}$ de extracto obtenido en 3.1.4 y se determinó el consumo de oxígeno durante 3 min a 25° C . Como blanco se usó la mezcla de reacción sin glicolato. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de consumir $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de oxígeno y la actividad se expresó en U mg^{-1} de proteína.

4.7. GGAT, SGAT y AsGAT

Para determinar la actividad de las transaminasas SGAT, GGAT y AsGAT, se siguió la metodología propuesta por Lea *et al.* (1990), basada en la cuantificación de la glicina. La mezcla de reacción consistió en $500 \mu\text{L}$ de tampón MES 50 mM pH 6.5, glioxalato de sodio 50 mM y serina,

glutamato o asparagina 50 mM, según se midiera la actividad SGAT, GGAT o AsGAT respectivamente. La reacción se inició con el agregado de 100 μ L de extracto obtenido según 3.1.4, se incubó durante 1 h a 37° C y se detuvo calentando a 100° C durante 10 min. Seguidamente se centrifugó a 12000 x g durante 10 min y en el sobrenadante se analizó la concentración de glicina por HPLC según se describe en el apartado 5.3. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin el aminoácido. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de formar 1 μ mol.min⁻¹ de glicina y la actividad se expresó en U mg⁻¹ de proteína.

4.8. HPR

La actividad HPR se determinó según Lea *et al.* (1990) a través de la capacidad de oxidar el NADH. La mezcla de reacción consistió en 800 μ L de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.4 y hidroxipiruvato 100 mM. Se agregaron 100 μ L de extracto enzimático obtenido en 3.1.5, 100 μ L de NADH 50 mM y se midió la variación de absorbancia a 340 nm durante 3 min Como blanco se usó la mezcla de reacción sin hidroxipiruvato. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de utilizar 1 μ mol de NADH durante 1 min y la actividad se expresó en U mg⁻¹ de proteína.

5. Determinaciones analíticas

5.1. Proteínas totales

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976). A 100 μ L de muestras obtenidas de los extractos enzimáticos en estudio se le agregaron 5 mL de reactivo Azul de Comassie G250 0.1 mM, etanol 0.8 M y H₃PO₄ 1.5 M. La absorbancia se midió a 595 nm después de 2 min y como estándar se utilizó seroalbúmina bovina.

5.2. Prolina y amonio

La prolina se cuantificó según Troll y Lindsley (1955). Al volumen total de la fase acuosa (aproximadamente 1 mL) obtenido según se describe en 3.2 se le agregaron 1 mL de ácido acético y 1 mL de ninhidrina ácida (0.14 M de ninhidrina en H₃PO₄ 6 M y ácido acético 12.6 M). Los tubos

tapados se calentaron en baño de agua a 90° C durante 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A cada tubo se adicionó 1 mL de tolueno, se agitó vigorosamente 5 min y se dejó decantar durante 8 h hasta la formación de dos fases. Para cuantificar la prolina se tomaron muestras de la fase superior, se leyó la absorbancia a 515 nm, como estándar se usó L-prolina entre 5 y 100 nmoles/mL y la concentración de prolina se expresó en $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$.

El amonio se determinó según Solorsano (1969). A muestras de 1000 μL , extraídas según se describe en 2.3.2, se le agregaron 200 μL de fenol 1.1 M en etanol; 200 μL de nitroprusiato de sodio 16.8 mM; 400 μL de citrato de sodio 0.7M, NaOH 0.3 M y 100 μL de NaClO 1.3 M. Luego de agregar cada reactivo se agitó y después se incubó en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 640 nm, como estándar se utilizó NH_4OH entre 2 y 50 nmoles/mL y la concentración de amonio se expresó en $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$.

5.3. Identificación y cuantificación de aminoácidos por HPLC

Los aminoácidos extraídos según se describe en 3.2 se derivatizaron con o-ftaldialdehído (OPA) de acuerdo a Hunkapiller *et al.* (1984) con modificaciones. A 13 μL de extracto se le adicionaron 27 μL de tampón borato-NaOH 0.4 M pH 10, 2-mercaptoetanol 0.7 M y OPA 86 μM en metanol-agua (1/1). Las muestras se agitaron a 2500 rpm durante 4 min, se centrifugaron a 12000 x g durante 2 min y se inyectaron los 40 μL en un HPLC provisto de un *loop* de 20 μL .

La elusión y separación de los aminoácidos se realizaron empleando una columna C18, como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron dos solventes, tampón acetato 20 mM pH 5.5 (solvente A) y metanol (solvente B). Las condiciones de elusión en gradiente, a un flujo de 1 mL/min y 25°C se presentan en el cuadro 1.

Para la identificación de los aminoácidos derivatizados con OPA se usó un detector de arreglo de fotodiodo a 337 nm. Los diferentes aminoácidos-OPA se identificaron por comparación con los tiempos de retención de cada aminoácido-OPA inyectado solo, ó en mezcla con los otros aminoácidos igualmente derivatizados. Las concentraciones de los aminoácidos de las muestras se determinaron previa realización de curvas de calibración de los aminoácidos-OPA de

concentraciones conocidas (entre 2 y 30 nmoles) y la concentración de aminoácidos se expresó en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS. Las variables y parámetros de la curva de calibración se presentan en el cuadro 2 y son significativos, al menos al 5 % (prueba F).

Cuadro 1. Condiciones de elución en gradiente para los aminoácidos derivatizados con OPA.

Tiempo (min)	% A	% B
0	80	20
45	20	80
46	80	20
65	80	20

Cuadro 2. Ecuaciones de las curvas de calibración de aminoácidos-OPA.

aminoácido	ecuación	r^2
aspartato	$y = 111748x + 4851$	0.958
glutamato	$y = 174985x + 4477$	0.920
asparragina	$y = 148031x + 8483$	0.964
serina	$y = 141689x + 7546$	0.995
glutamina	$y = 235357x + 3402$	0.977
arginina	$y = 218144x + 13024$	0.959
glicina	$y = 134138x + 9439$	0.959
alanina	$y = 154088x + 10715$	0.980
GABA	$y = 245985x + 2780$	0.953
ornitina	$y = 285704x + 3904$	0.971

y = área, en unidades arbitrarias x = cantidad, en nmol.

5.4. Determinación de TBARS

Los TBARS se determinaron según Iturbe-Ormaetxe *et al.* (1998). A 150 μL del sobrenadante, obtenido según se describe en 3.3, se agregaron 150 μL de SDS 3 % (p/v), 250 μL de ácido tiobarbitúrico 3 % (p/v) disuelto en NaOH 50 mM y 250 μL de HCl 3 N, con agitación luego del agregado de cada solución. La mezcla se calentó en baño a 80° C durante 20 min, se enfrió en hielo y extrajo el cromógeno con 1.5 mL de butanol. La absorbancia se leyó a 532 nm y se descontó la absorbancia inespecífica a 600 nm. Se usó como coeficiente de extinción molar $156 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La peroxidación lipídica se expresó en $\mu\text{moles de TBARS g}^{-1}$ PS.

6. Ácidos nucleicos

6.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó según Sánchez *et al.* (2008). Las muestras se mantuvieron siempre a 4° C y se usaron materiales libres de RNAasa. A 150 mg de tejido previamente molido con nitrógeno líquido se le agregó 1 mL de tampón a 95° C que consistió en tetraborato de sodio 200 mM pH 9, EGTA 30 mM, EDTA 5 mM, SDS 1 % (p/v), deoxicolato de sodio 1 % (p/v), DTT 10 mM, 2-mercaptoetanol 100 mM, PVPP 2 % (p/v) y PVP40 2 % (p/v). Seguidamente se enfrió en hielo 10 min, se agregaron 0.15 mg de proteinasa K y se incubó a 37° C durante 1 h. Posteriormente se agregaron 100 µL de KCl 2M y se incubó en hielo durante 30 min.

La mezcla se centrifugó a 14000 x g durante 10 min, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se agregó igual volumen de cloroformo:isoamílico 24:1, se agitó y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se agregó igual volumen de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1, se agitó y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min. Esta última etapa se repitió las veces que fuera necesario para que la interfase entre el extracto y fenol:cloroformo:isoamílico estuviera clara. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se agregó igual volumen de isopropanol a -20° C y se incubó a -20° C durante 30 min. Después se centrifugó a 14000 x g durante 10 min, se resuspendió el precipitado con 200 µL de H₂O-DEPC, se agregó igual volumen de LiCl 4M y se incubó toda la noche a -20° C. Se centrifugó a 14000 x g durante 10 min y se lavó con etanol 70 %. La muestra se secó y resuspendió en 20 µL de H₂O libre de RNAasa (SIGMA) y se trató con DNAasa (Invitrogen). El RNA se cuantificó con espectrofotómetro (Sambrook *et al.*, 1989) o por microespectrofotometría (Nanodrop 1000) y su integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa 2 % o por electroforesis automatizada (Bioanalyzer). Se verificó que el RNA no estuviera contaminado con DNA por RT-PCR con los cebadores LjHar1 que amplifican una región de un intrón de un gen de nodulación.

6.2. Obtención de cDNA

Para la reacción de retrotranscripción se siguió estrictamente el protocolo descrito por el fabricante SuperScript III First-Strand Syntesis System for RT-PCR, (Invitrogen). El cDNA se conservó en alícuotas de 1 μ L a -80° C hasta su uso.

6.3. qRT-PCR

La RT-PCR cuantitativa se realizó en placas de 96 pocillos con 5 μ L *SensiMix Plus SYBR*, 1 μ L de cDNA y 4 μ L de los cebadores en un termociclador de tiempo real Eppendorf Mastercycler EP o Line-geneK BIOER. El programa consistió en 40 ciclos de 15 s a 95° C y 60 s a 60° C. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin cDNA. Los resultados de expresión evaluados como CT (ciclo umbral) fueron normalizados a través de la media geométrica de los CT de los genes de las ubiquitinas LjUBQ4 y LjUBC10 y el gen de una proteína de anclaje LjGPI. Los cebadores que se usaron se presentan en la cuadro 3 y su diseño están descrito en Sánchez *et al.* (2008).

La RT-PCR semicuantitativa se realizó en microtubos que contenían en 50 μ L: cDNA, tampón Tris-HCl 100 mM, dNTP 0.2 mM, $MgCl_2$ 3mM, cebadores 0.4 mM y Taq 1U. El programa fue el mismo que se usó para la qRT-PCR.

6.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La determinación de la integridad del RNA se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa 2 % en condiciones desnaturalizantes (Sambrook *et al.* 1989). Las muestras de RNA (3 μ g) se desnaturalizaron calentándolas a 55° C durante 5 min en 16 μ L de una solución de tampón MOPS 200 mM pH 7, formamida 60 % (v/v), formaldehído 20 % (v/v), glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.1 % (p/v) y bromuro de etidio 0.2 % (p/v). Como tampón de corrida se usó MOPS 200 mM pH 7, acetato de sodio 40 mM, EDTA 10 mM. La electroforesis se realizó a 70 mA durante 2 h.

Cuadro 3. Cebadores usados para la RT-PCR y qPCR. Formación de raíces aberrante hipemodulantes (FRAH), gliceraldehído 3 P deshidrogenasa (G3PD), proteína de anclaje (PA), pirrolina 5 carboxilato sintetasa (P5CS), pirrolina 5 carboxilato reductasa (P5CR), ornitina amino transferasa (OAT), prolina oxidasa (POX) y pirrolina 5 carboxilato deshidrogenasa (P5CDH).

Categoría	Denominación	Gen	Secuencia del oligonucléotido (5'→3')
Contaminación con DNA	LjHar1_F	FRAH	TCATTTTCCATATTGGTCCTTCG
	LjHar1_R	FRAH	GAATTGTTCTGTAATGGGTTTGG
Control de integridad	LjGAPDH5'_F	G3PD1	AAGGATCGGGCGTTTGG
	LjGAPDH5'_R	G3PD1	AGCAACAAGTTCAACATCGTCTCT
	LjGAPDH3'_F	G3PD2	CGGTTACACTGAAGATGATGTGG
	LjGAPDH3'_R	G3PD2	GATACTTGACCTGTTGTGCGCA
Housekeeping	LjGPI-ap_F	PA	AGGTTGTTCCGTGAATTTCCG
	LjGPI-ap_R	PA	GGTCCTTTGCATTTGCTTGT
	LjUBC10_F	Ubiquitina10	GCTCTTATCAAGGGACCATCAG
	LjUBC10_R	Ubiquitina10	ACTGCTCTGGAACAGAAAAAGC
	LjUBQ4_F	Ubiquitina4	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC
	LjUBQ4_R	Ubiquitina4	AACAACAGCACACACAGACAATC
Asimilación de amonio	GS1.1_F GSc	GS1.1	TGGACCACAGGGCCCATAC
	GS1.1_R GSc	GS1.1	AATGTCACGCCCATAGGCTTT
	LjGS1.2_F GSc	GS1.2	TGAGGTGTGGGTTGCTCGTT
	LjGS1.2_R GSc	GS1.2	AAGGACCACCCAGCAATCT
	GS1.3_F GSc	GS1.3	GGGTAGGCAGGGAGACTGAAA
	GS1.3_R GSc	GS1.3	GAAGCTGGCCTCCTGTCCTC
	GS2_F GSp	GS2	GGAAGAGGGAGGCTTTGAGGT
	GS2_R GSp	GS2	CTGGTGCGAAGGGATAGATT
	Fd-GOGAT_F	Fd-GOGAT	ATTCAACGAGTAACAGCGCCA
	Fd-GOGAT_R	Fd-GOGAT	CATGGGCTTCAATAAGGCTTCTC
	NADH-GOGAT_F	NADH-GOGAT	TGGTGCTGATGCTATATGCC
	NADH-GOGAT_R	NADH-GOGAT	GTCAACCTGCAGTCGCCAA
	GDH1_F	GDH1	GCTGCTGATGTGAAGGCAAAG
	GDH1_R	GDH1	GCTTCAGGGTCAGTGGGATGA
	GDH2_F	GDH2	ACATGACAATGCTCGTGGTCC
	GDH2_R	GDH2	AGGGTCAACCTCAGGGTGGTA
GDH3_F	GDH3	GGAGATGTGCAAAACCCATGA	
GDH3_R	GDH3	CGGTTAACTCCCAGGGTGAAA	
Metabolismo de la prolina	P5CS1-1_F	P5CS1-1	GCTCACCTTGAACCTCCATCG
	P5CS1-1_R	P5CS1-1	GGCACTGGCTTTTGTCTGC
	P5CS2-1_F	P5CS2-1	TCTGTCTGCGTCTTCATTGCA
	P5CS2-1_R	P5CS2-1	CTCGAGTGGGATCCATGGTG
	P5CS1-2_F	P5CS1-2	ATGGCGAAGCAGATCGTGC
	P5CS1-2_R	P5CS1-2	CCATGGCATTGCAGCCTG

P5CS3-1_F	P5CS3-1	CCCGTGGCCCTGTAGGAGT
P5CS3-1_R	P5CS3-1	TCCCGTCCCTCTCAATATCCA
P5CR_F	P5CR	GGTGTGAAGTTGAAGCCGC
P5CR_R	P5CR	TCCAGCAGCAACAGAGACCAA
OAT_F	OAT	CAGGCAGAAAGCCTGACTGTG
OAT_R	OAT	CAAACAGCGGAAAGCGATCA
pro ox 1_F	POX1	AGTTTGGCTTCGTCTTTGGGA
pro ox1_R	POX1	TGTGCGTGCCTGGATGGTAT
pro ox2_F	POX2	GTGTACGGCGTGGAAGATGC
pro ox2_R	POX2	GGAAGCCGTTAGCGTTACGG
P5CDH_F	P5CDH	TGGGTCTGTGACCAGGATGC
P5CDH_R	P5CDH	ACAATGATTGTGCCGAGCACT
Arginase1_F	Arginasa1	TGAATTCAACCCACAGCGTG
Arginase1_R	Arginasa1	CAGCTTAGCAGCCACCATGG
Arginase2_F	Arginasa2	TTCCTTCAAGGGCCTGCATT
Arginase2_R	Arginasa2	TGCTGCCACACCAAATAGCTT

La visualización del cDNA y de fragmentos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 o al 2 % respectivamente (Sambrook *et al.* 1989). A 10 µL de muestra se agregaron 2 µL de tampón de carga consistente en glicerol 50 % (v/v), azul de bromofenol 0.1 % (p/v) y xilenxianol 0.1 % (p/v).

Como tampón de electroforesis se usó Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 80 mM y EDTA 3 mM. La electroforesis se realizó a 100 mA durante 1 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sambrook *et al.* 1989). Los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador UV provisto de un sistema de captura de imagen Gel Logic 100 Imaging System (Kodak).

7. Contenido relativo de agua, déficit hídrico, ganancia de agua y balance hídrico

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó según Antolín *et al.* (1995). Se pesaron aproximadamente 100 mg de peso fresco de hojas (PF), se colocaron en placas de Petri con agua destilada a temperatura ambiente durante 12 h, se secaron entre toallas de papel, y se volvieron a pesar, considerando a esta medida como peso turgente (PT). Posteriormente las muestras de hojas se secaron en estufa a 60° C hasta peso constante y se determinó el peso seco (PS). El CRA se calculó a partir de la fórmula:

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

Cuando se expresó el estatus hídrico como déficit hídrico (DH) se usó la siguiente fórmula:

$$\text{DH (\%)} = 100 - \text{CRA}$$

Cuando se expresó como ganancia de agua (GA) se usó la siguiente fórmula:

$$\text{GA (\%)} = (\text{PT} - \text{PF}) / \text{PF} \times 100$$

El balance hídrico (BH) se realizó según describen Xiong *et al.* (2001). Se tomaron 100 mg de folíolos (PF₁) y a intervalos de 1 h se determinó el peso fresco, hasta un máximo de 8 h. La diferencia entre los sucesivos pesos frescos es el agua perdida, que se expresó como porcentaje del PF₁. Después de 5 h las muestras se pusieron en agua destilada, para que llegara a su máximo peso turgente (PT). El agua ganada se expresó como el porcentaje de la diferencia entre el PT – PF, en relación al PF₁.

8. Inmunodetección de GS y Fd-GOGAT

8.1 SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas totales en condiciones desnaturizantes se realizó en geles de poliacrilamida-SDS, según Sambrook *et al.* (1989). La concentración de poliacrilamida de los geles concentrador y separador fue 5 % y 8 % respectivamente para Fd-GOGAT, y 5 % y 12 % para GS. Como tampón de electroforesis se usó Tris-HCl 25 mM y glicina 192 mM pH 8.3, SDS 0.15 % (p/v).

Los extractos obtenidos según se indican en 3.1.1 se mezclaron en una proporción 2/1 con tampón de carga consistente en Tris-HCl 0.192 M pH 6.8; azul de bromofenol 0.002 % (p/v); SDS 2 % (p/v); 2-mercaptoetanol 5 % (v/v) y glicerol 10 % (v/v). Las muestras se calentaron por 5 min a 90° C y los pocillos se cargaron con 20 µg de proteína. La electroforesis, que se realizó en una cuba Bio-Rad ® (MiniProtean ® II), se inició a 15 mA hasta que la muestra entró al gel separador y se continuó a 25 mA hasta la salida del frente del azul bromofenol del gel.

8.2. Transferencia de proteínas a membranas (*Western blot*)

Para la transferencia de proteínas los geles se equilibraron durante 10 min en tampón de transferencia Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol 20 % (Berteli *et al.*, 1995). Previamente se saturó en el mismo tampón una membrana de nitrocelulosa, cortada 0.5 cm más grande que el gel, y cuatro hojas de papel Whatman 1. Las membranas y los papeles Whatman se montaron en un equipo de transferencia semi-seco (Amersham-LKB). La electrotransferencia se realizó a 40 mA durante 3 h para Fd-GOGAT y 1 h para GS. La transferencia de proteínas a la membrana se comprobó por tinción con rojo Ponceau 0.5 % (p/v) en ácido acético 1 % (v/v) hasta la aparición de las bandas y posteriormente las membranas se lavaron 2 veces con H₂O-MQ.

8.3. Inmunodetección

Para la inmunodetección de las proteínas Fd-GOGAT y GS se utilizaron anticuerpos policlonales cedidos por el Prof. Antonio Márquez (Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España), obtenidos respectivamente frente a Fd-GOGAT de cebada (Márquez *et al.*, 1988) o frente a GS recombinante (Betti *et al.*, 2006). Las membranas se incubaron en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y NaCl 500 mM (TBS) en agitación a 30 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Como solución de bloqueo se usó leche en polvo libre de grasa 5 % (p/v) en TBS. Las membranas se incubaron con agitación a 30 rpm durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con TBS-Tween-20 0.1 % (TBST) durante 10 min. Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en tampón TBST con leche en polvo libre de grasa al 5 % (p/v) y solución de anticuerpo primario anti-Fd-GOGAT (dilución 1/250) o anti-GS (dilución 1/2000) con agitación a 30 rpm.

Las membranas se lavaron tres veces con TBST durante 10 min cada vez y se incubaron 1 h en solución TBST con leche en polvo libre de grasa 5 % (p/v) y el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (1/3000). Las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 10 min cada vez y se incubaron durante 5 min en solución con sustrato a la que se adicionó 5 % (v/v) de potenciador, según las instrucciones del fabricante, General Electric Healthcare. Las membranas se cubrieron con *rolopack* y se expusieron a películas de Rayos X entre 1 y 3 min. Las películas se revelaron según las recomendaciones del fabricante (Kodak Film).

9. Ómicas

9.1. Metabolómica

La extracción de metabolitos y su posterior derivatización y análisis se llevó a cabo según el protocolo descrito por Desbrosses *et al.* (2005), combinando la cromatografía de gases (GC) como método de separación de los distintos compuestos y la espectrometría de masas (MS) como método de detección. Los espectros de GC-MS se obtuvieron en el laboratorio de Michael Udvardi (Max Planck Institute) con un cromatógrafo GC8000 acoplado a un espectrómetro de masas Voyager tipo cuadrupolo con el software MassLab. Cada metabolito es representado por uno o varios fragmentos iónicos de masa precisa, que generan picos que sirven para identificarlos. Estos picos de masas espectrales se obtuvieron mediante el ordenamiento automático de los cromatogramas de GC-MS utilizando *software* disponible públicamente (<http://www.nist.gov/srd/nist1.cfm>). Los análisis permiten examinar un total de 1020 etiquetas de masas espectrales de las cuales 417 estaban asignadas mediante los correspondientes patrones a un total de 134 metabolitos diferentes. Los metabolitos nitrogenados identificados por esta técnica se muestran en el Cuadro 4. Se efectuaron dos experimentos independientes de extracción y análisis de muestras de 30 a 60 mg de PF de hojas de plantas silvestres y mutantes, en los cuales se procesaron al menos 2 réplicas biológicas de cada genotipo y cada condición. El análisis numérico de los datos obtenidos se efectuó según Desbrosses

Cuadro 4. Metabolitos nitrogenados determinados mediante análisis de GC-MS.

Acido cafeolquinico	Docosano	Acido nicotínico	Siloxano
Acido aconítico	Dopamina	Nonadecano	S-metilcisteína
Adenina	Dotriacontano	Noradrenalina	Espemidina
Adenosina	Acido β -aminobutírico	Norleucina	t-4-hidroxi prolina
Alanina	Acido glutámico	Norvalina	Acido t-cafeico
Alantoina	Glutamina	O-acetilserina	Acido t-ferulico
Arginina	Glicina	Octacosano	Acido treonico
Asparagina	Guanina	Ononitol	Treonina
Acido aspártico	Homocisteína	Ornitina	Timina
β -alanina	Homoserina	Ac. p-aminobenzoico	Triptamina
Acido benzoico	Hidroxilamina	Acido p-coumarico	Triptofano
Acido c-cafeico	Isoleucina	Fenilalanina	Acido t-sinapico
Acido c-ferulico	Leucina	Prolina	Tiramina
Acido citramalico	Lisina	Putrescina	Tirosina
Acido sinapico	Metionina	Acido piroglutamico	Uracilo
cy-siloxano 5	N-acetilserina	Serina	Acido urico
Cisteína		Acido shikimico	Valina

et al. (2005). Las áreas de los picos son equivalentes a las respuestas de cada fragmento. Las áreas se normalizaron frente al PS de la muestra y a la respuesta del ribitol (el estándar interno utilizado en los análisis). En un siguiente paso, las respuestas relativas de un fragmento se dividen entre la media de las respuestas normalizadas de todas las muestras de un experimento. Todos los cocientes de las respuestas se combinan en una única matriz que describe el conjunto completo de cocientes de respuestas de los metabolitos de todas las muestras de un experimento, o grupo de experimentos. Los datos obtenidos fueron examinados mediante planillas Excel en las cuales se compararon los resultados obtenidos de la integración realizada por el software para cada fragmento.

9.2. Transcriptómica

Para realizar la transcriptómica, el mRNA se extrajo y cuantificó según se indica en 6.1. y se retrotranscribió a cDNA según 6.2. El cDNA, se marcó según las indicaciones del fabricante del kit *One-Cycle Target Labelling* (Affymetrix) y la hibridación se realizó con el *Lotus Genechip® Lotula520343*, que reconocen los transcritos que hibridan con alrededor de 52.000 secuencias parciales de genes de *L. japonicus*. La hibridación y escaneado se hizo según las instrucciones del fabricante (Affymetrix).

10. Análisis estadísticos

Para metabolitos, actividades enzimáticas y qRT-PCR se usó el análisis de varianza y para ver diferencias entre medias se aplicó el Test de Tukey. Para el análisis e interpretación del metaboloma la comparación de medias se hizo a través de la prueba T de Student. Los resultados de la transcriptómica se analizaron según el test FDR (tasa de falsos positivos).

RESULTADOS

1. La actividad y cantidad de GS y Fd-GOGAT no cambian en condición de déficit hídrico

El mutante *Ljgln2-2* deficiente en GSp, se usó como una herramienta para establecer el rol de esa isoforma en la asimilación de amonio en condición de déficit hídrico. En este sentido, Brugière *et al.* (1999) demostraron el rol de la GSc en la acumulación de prolina en condiciones de estrés salino, pero no se había establecido la participación de la GSp en la acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico, como se demostró en esta tesis.

Hasta 5 días después de suspendido el riego la pérdida de agua de plantas del salvaje y del mutante fue la misma (Figura 4), y al cuarto y quinto día, ésta se situó en 40 %, tiempo que se definió para realizar los ensayos de esta actividad.

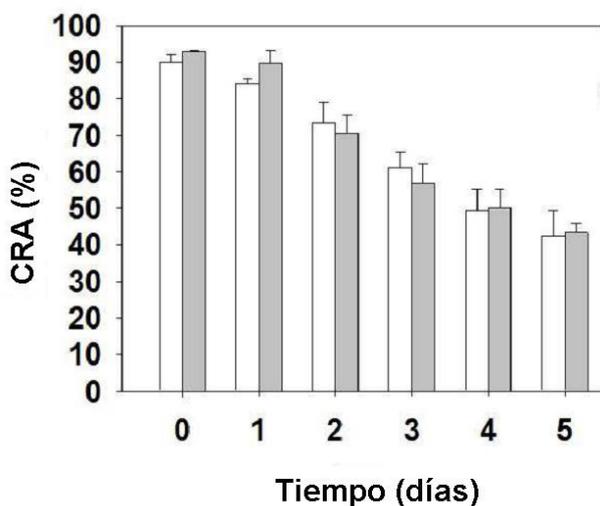


Figura 4. Pérdida de agua evaluada como CRA en diferentes días de suspendido el riego en hojas de plantas del salvaje y del mutante. Salvaje (barras blancas) y mutante (barras grises). Los resultados son media de dos experimentos con tres repeticiones cada uno. Las barras indican el desvío estándar.

La actividad GS total no varió como consecuencia del déficit hídrico en ninguno de los genotipos estudiados (Figura 5 a), sin embargo la actividad GS total en las hojas del mutante fue aproximadamente 80 % menor que la actividad en hojas del salvaje. Por otra parte, en ambos genotipos la actividad Fd-GOGAT no varió cuando las plantas se sometieron al déficit hídrico (Figura 5 b).

La cantidad de proteína GSc y Fd-GOGAT detectada por *Western blot* fue la misma en ambos genotipos tanto en condición control como en déficit hídrico (Figura 5 c). La cantidad de proteína GSp tampoco se modificó como consecuencia de la sequía.

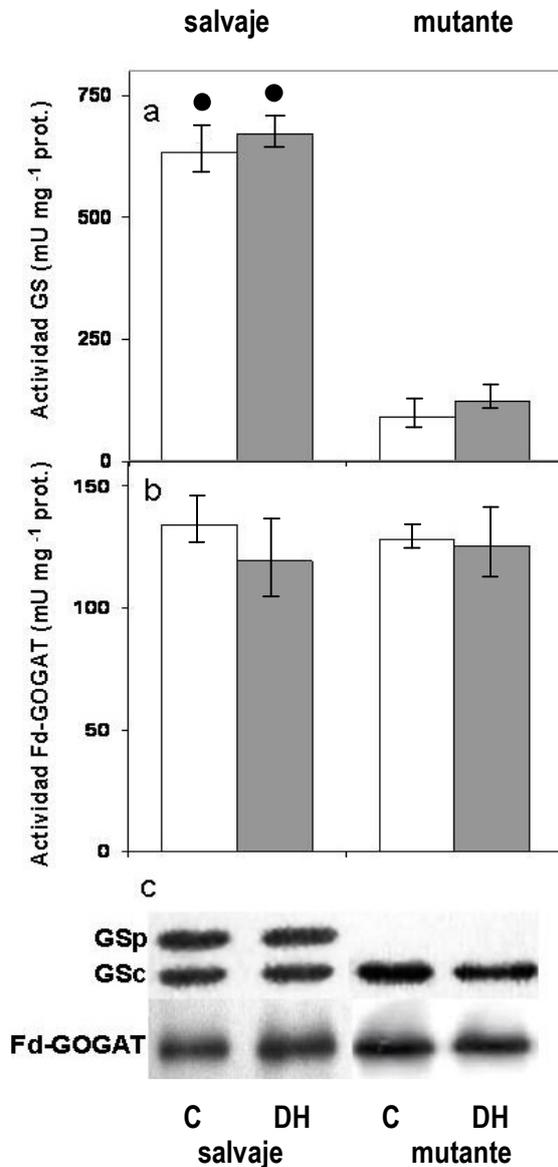


Figura 5. Actividad y cantidad de GS y Fd-GOGAT en hojas. **a.** actividad GS y **b.** actividad Fd-GOGAT. Tratamiento control (barras blancas) y déficit hídrico (barras grises). Los resultados son media de dos experimentos con tres réplicas biológicas. • Las medias de la actividad GS y de la actividad Fd-GOGAT entre el salvaje y el mutante son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. **c.** *Western blot* de GS y Fd-GOGAT. C, indica control y DH, déficit hídrico.

2. La deficiencia de GSp se relacionó con la menor acumulación de prolina en condición de déficit hídrico

Para estimar la contribución de la GSp en la biosíntesis de prolina en condiciones de déficit hídrico, las plantas salvajes y mutantes fueron sometidas a déficit hídrico durante 4 días, período en

el que se midió el déficit hídrico y la concentración de prolina de las hojas. En ambos genotipos se observó un aumento de la concentración de prolina a medida que aumentaba el déficit hídrico de la hoja (Figura 6 a). Sin embargo, el mutante acumuló menos prolina que el salvaje cuando el déficit hídrico superó el 20 % (Figura 6 a).

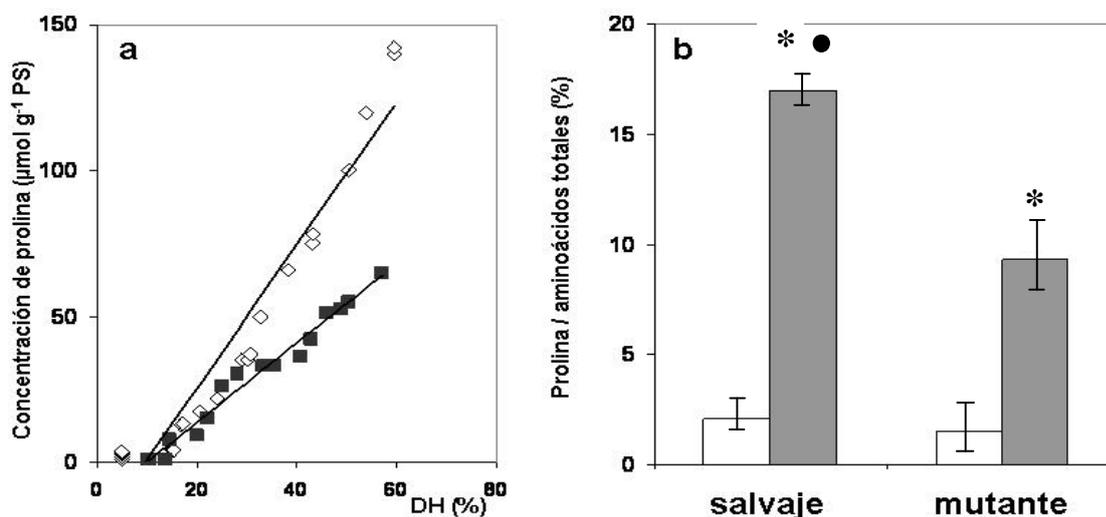


Figura 6. Acumulación de prolina en relación al déficit hídrico. **a.** Relación entre la pérdida de agua expresada como déficit hídrico (DH) y la concentración de prolina en hojas de plantas salvajes (símbolos blancos) y mutantes (símbolos negros). **b.** Prolina respecto al total de aminoácidos (%). Tratamiento control (barras blancas) y déficit hídrico (barras grises). Los valores son media de dos experimentos con tres repeticiones. * Las medias del porcentaje de la concentración de prolina en relación a los aminoácidos totales del control y de la condición de sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. • Las medias del porcentaje de la concentración de prolina en relación a los aminoácidos totales entre el salvaje y el mutante en condición de sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

A los 4 días sin riego, con el DH situado en un 40 %, la concentración de prolina en el mutante fue significativamente inferior que en el salvaje, 42 y 66 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PS respectivamente (Figura 6 a). A su vez, dentro de cada genotipo no se observaron diferencias significativas en la concentración de prolina entre hojas jóvenes y maduras. En la condición control, no hubo diferencias significativas en la concentración de prolina entre el salvaje y el mutante (Figura 6 b).

Cuando el déficit hídrico de las hojas fue de 40 % la prolina representó el 17 % del contenido de aminoácidos totales en el salvaje y el 9 % en el mutante (Figura 6 b). Dado que la cantidades de proteínas y aminoácidos totales no cambió (Cuadro 5), se puede concluir que la prolina acumulada se sintetizó *de novo*.

Cuadro 5. Proteínas y aminoácidos totales en hojas de plantas del salvaje y del mutante.

	Genotipo	Control	Déficit hídrico
Proteínas totales (mg g ⁻¹ PS)	salvaje	115 ± 25	107 ± 15
	mutante	112 ± 17	105 ± 14
Aminoácidos totales (μmol g ⁻¹ PS)	salvaje	250 ± 62	296 ± 68
	mutante	330 ± 136	335 ± 124

Los valores son media de cuatro repeticiones seguidas del desvío estándar.

3. El déficit hídrico indujo mayor daño oxidativo en el mutante

En respuesta al déficit hídrico las plantas salvajes y mutantes mostraron un aumento significativo del daño oxidativo estimado a través de TBARS (Figura 7). Esto evidencia un mayor daño oxidativo a nivel de las membranas como consecuencia del déficit hídrico, que fue mayor en plantas del mutante que en las plantas del salvaje (Figura 7).

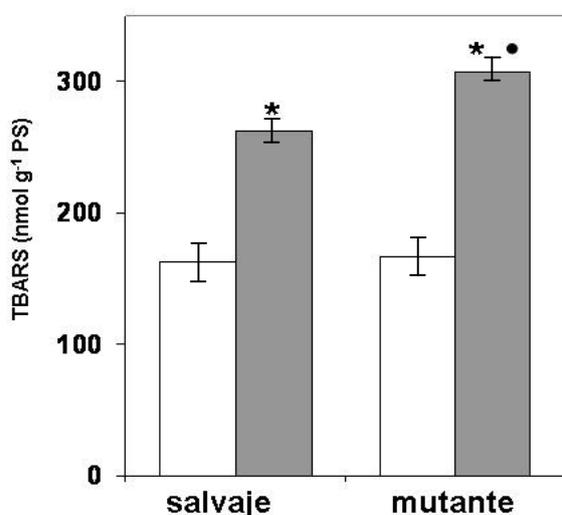


Figura 7. Daño oxidativo estimado a través de TBARS. Tratamiento control (barras blancas) y déficit hídrico (barras grises). Los resultados son media de dos experimentos con tres repeticiones. *Las medias de la concentración de TBARS de las hojas de plantas control y de las plantas sometidas a déficit hídrico son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. • Las medias de la concentración de TBARS entre el salvaje y el mutante sometidos a sequía son significativamente diferentes al 10 % del test de Tukey.

4. La recuperación del estatus hídrico de hojas jóvenes está afectada por la ausencia de GSp

Al sexto y séptimo día de suspendido el riego en las plantas salvajes y mutantes se analizó la ganancia de agua por las hojas. Para esto las hojas se pusieron en agua para determinar el peso turgente y determinar a partir de ese valor la ganancia de agua. Tanto al sexto como el séptimo día

la ganancia de agua de hojas del mutante fue menor que en las hojas del salvaje (Figura 8 a). A partir del sexto día las hojas del mutante no se rehidrataron completamente, lo que si hicieron las hojas de las plantas salvajes.

Al sexto y séptimo día se restableció el riego de las plantas y a las 24 horas se determinó el peso turgente de las hojas de ambos genotipos y se confirmó la incapacidad de las hojas de plantas del mutante de rehidratarse (Figura 8 b), razón por la cual los ensayos de esta tesis se realizaron a los 4 días de suspendido el riego.

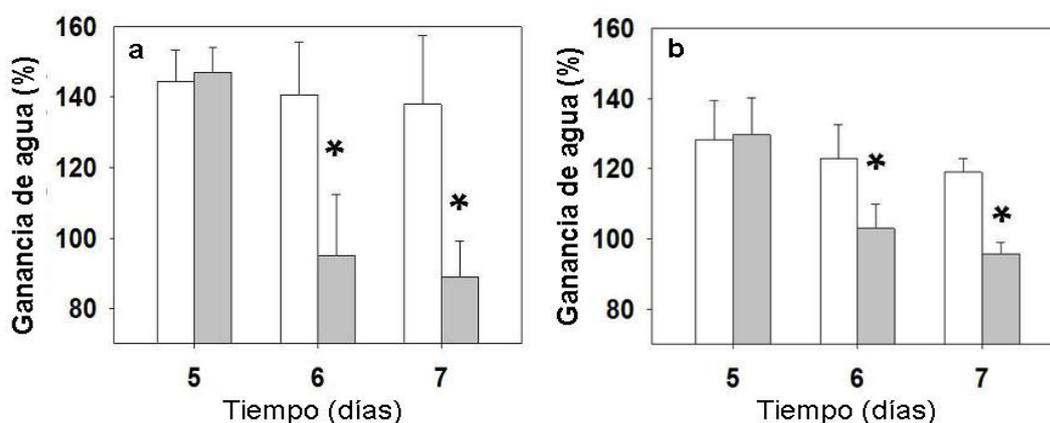


Figura 8. Ganancia de agua por hojas del mutante y del salvaje en diferentes días de suspendido el riego. **a.** Capacidad de rehidratación de hojas provenientes de plantas sometidas a déficit hídrico y puesta en H₂O durante 12 h. **b** Capacidad de rehidratación de hojas de plantas sometidas a déficit hídrico y regadas durante 24 h y puestas en H₂O durante 12 h. Salvaje (barras blancas) y mutante (barras grises). Las barras indican el desvío estándar y * diferencias significativas entre el salvaje y el mutante al 5% del test de Tukey. Los resultados son media de dos experimentos con tres repeticiones cada uno.

El balance hídrico (BH) es la cantidad de agua perdida en situación de déficit hídrico en relación al agua ganada hasta restablecer el peso turgente. Para determinar esto se cosecharon hojas jóvenes y maduras que permanecieron en agua (condición control) o en aire (déficit hídrico). La capacidad de restablecer el estatus hídrico se logró poniendo en agua a las hojas que estaban en déficit hídrico.

En plantas del salvaje y del mutante sin GSp se determinó la capacidad de recuperar el estatus hídrico de hojas jóvenes (hojas 1 a 3) y maduras (hojas 5 a 7) según se muestra en la figura 9 a. Por otro lado se determinó la cantidad de las proteínas GSc y GSp en esas hojas. En hojas del

salvaje la cantidad de GSc fue menor que la de GSp (Figura 9 b) y ambas isoformas se incrementaron en las hojas maduras, donde la cantidad de GSc fue mayor que la de GSp (Figura 9 b). A su vez, en las hojas del mutante la cantidad de GSc mostró el mismo patrón que el encontrado en el salvaje, pero con ausencia de la isoforma GSp.

En relación al BH, las hojas maduras del mutante y del salvaje, así como las hojas jóvenes del salvaje, recuperaron parte de su estatus hídrico (Figura 9 c y d), sin embargo las hojas jóvenes del mutante fueron incapaces de recuperarse (Figura 9 c). Los resultados obtenidos indican de que las hojas jóvenes del mutante deficiente en GSp tienen afectada la capacidad de rehidratación una vez reestablecida el agua, lo que indica una relación entre la GSp y la capacidad de reestablecer el estatus hídrico celular en *L. japonicus*.

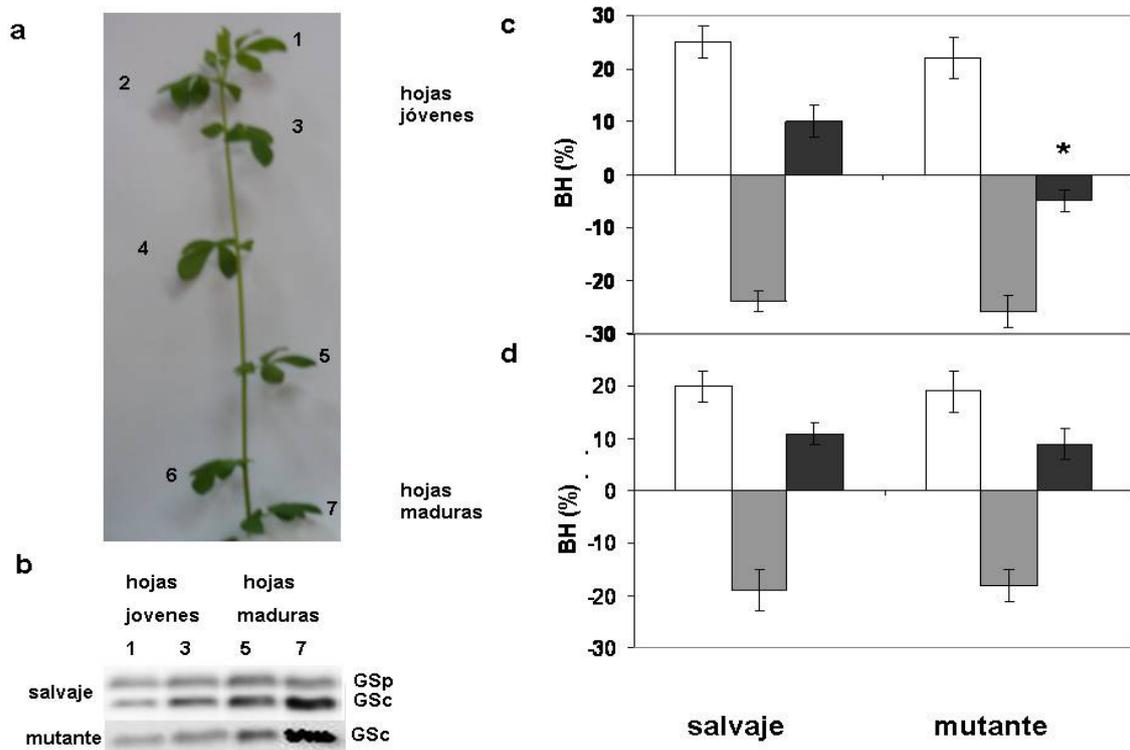


Figura 9. Balance hídrico (BH) en hojas en diferente estado de desarrollo. **a.** Hojas jóvenes (1 a 3) y maduras (4 a 7). **b.** Western blot de GSp y GSc. **c.** BH de hojas jóvenes y **d.** BH de hojas maduras. Tratamiento en condición control (barras blancas), en condición déficit hídrico (barras grises) y después de la rehidratación (barras negras). * Las medias del BH entre hojas jóvenes del mutante y del salvaje difieren significativamente al 5 % del test de Tukey.

5. La ausencia de GSp determinó cambios en el metaboloma de compuestos nitrogenados

El análisis de los compuestos nitrogenados realizado con GC-MS, mostró que los niveles de prolina, arginina, asparragina se incrementaron en plantas del salvaje y del mutante en condición de déficit hídrico (Figura 10). En la misma condición, los incrementos de prolina fueron mayores en plantas del salvaje, mientras que los niveles de arginina fueron mayores en las del mutante (Figura 10).

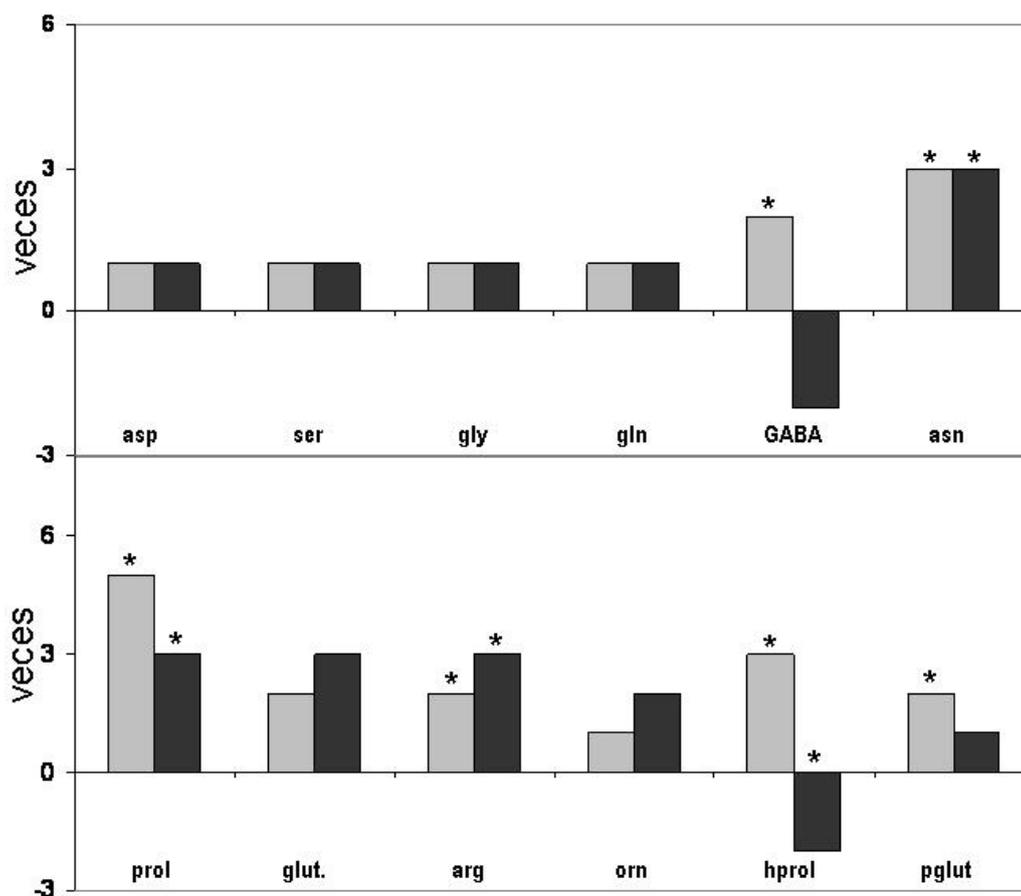


Figura 10. Metaboloma de compuestos nitrogenados. Salvaje (barras grises) y mutante (barras negras). Se representa como veces el incremento o disminución de la concentración en la condición de déficit hídrico respecto al control con riego. Aspartato (asp), serina (ser), glicina (gly), glutamina (gln), gama amino butirato (GABA), asparragina (asn), prolina (prol), glutamato (glu), arginina (arg), ornitina (orn), hidroxiprolina (hprol) y piroglutamato (pglut), y, Los resultados son media de al menos 3 repeticiones. * La media de las veces que incrementa o disminuye respecto al control es significativamente diferente al 5 % de la prueba T de student.

A pesar que el metaboloma mostró que la arginina se incrementó, el análisis por HPLC confirmó que en la condición control la concentración de arginina fue la misma en el mutante y en el salvaje, y que no hubo cambios en condición de déficit hídrico (Figura 11). También la concentración

de asparragina en plantas en condición de déficit hídrico se incrementó significativamente en ambos genotipos y la serina descendió en el salvaje (Figura 11).

Por otro lado, el nivel de hidroxiprolina, piroglutamato y GABA se incrementaron significativamente en el salvaje en condición de déficit hídrico (Figura 10) a diferencia de lo observado en el mutante, donde los niveles de hidroxiprolina y GABA descendieron y los de piroglutamato no variaron (Figura 10). Sin embargo, el análisis por HPLC mostró que la concentración de GABA se incrementó significativamente en el salvaje y no cambió en el mutante (Figura 11) en condición de déficit hídrico. Las diferencias encontradas entre los resultados del metaboloma y del HPLC se analizan en la discusión.

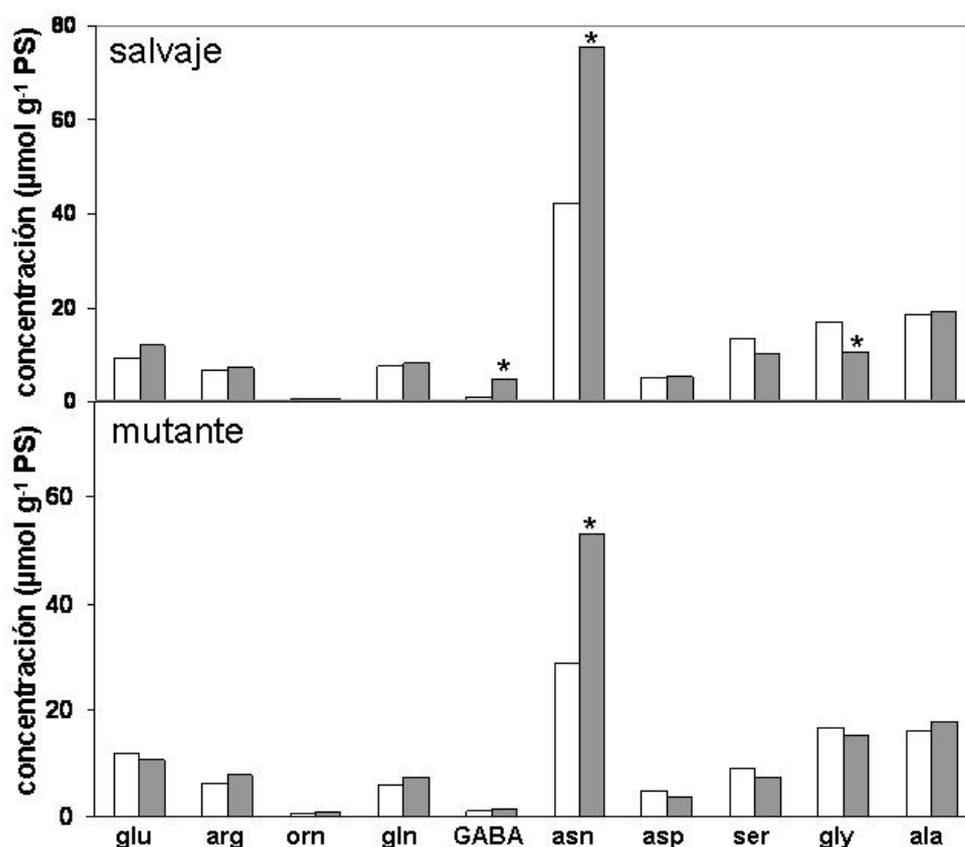


Figura 11. Análisis por HPLC de la concentración de amidas, aminoácidos y GABA. Glutamato (glu), arginina (arg), ornitina (orn), glutamina (gln), gama amino butirato (GABA), asparragina (asn), serina (ser) glicina (gly) y alanina (ala). Tratamiento control (barras blancas) y sequía (barras grises). Los resultados son media de dos experimentos con tres repeticiones. * Las medias de las concentraciones analizadas en las plantas control y en las sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

Además, el metaboloma puso en evidencia que los niveles de glutamato, glutamina, ornitina, aspartato, serina y glicina no variaron ni en el salvaje ni en el mutante en la condición de déficit hídrico (Figura 10), resultados que se confirmaron cuando se analizaron las concentraciones por HPLC (Figura 11).

6. La cantidad de genes que variaron su expresión en condición de déficit hídrico fue mayor en el mutante

La condición de déficit hídrico, modificó la expresión de 3 veces más genes en el mutante respecto al salvaje. De un total de 7915 secuencias de genes que variaron su expresión por el déficit hídrico en el genotipo mutante, sólo 2070 lo fueron en el genotipo salvaje (Figura 12 a). Sin embargo el 80 % de los genes afectados por el déficit hídrico en el salvaje lo fueron también en el mutante. Por otra parte, 538 y 5845 genes se vieron afectados sólo en el salvaje y sólo en el mutante, respectivamente (Figura 12 a).

6.1 El nivel de inducción-represión de genes alterados por el déficit hídrico fue mayor en el mutante

De los 2070 genes que variaron su expresión en ambos genotipos en la condición de déficit hídrico, el grado de inducción o de represión, fue siempre mayor en el mutante respecto al salvaje. Cuando se comparó el \log_2 de las veces que cambia la expresión de genes en ambos genotipos, se obtuvo una correlación lineal (Figura 12 b) que mostró que en promedio el nivel de expresión de genes del mutante cambia 3 veces ($2^{1.6}$) respecto al salvaje.

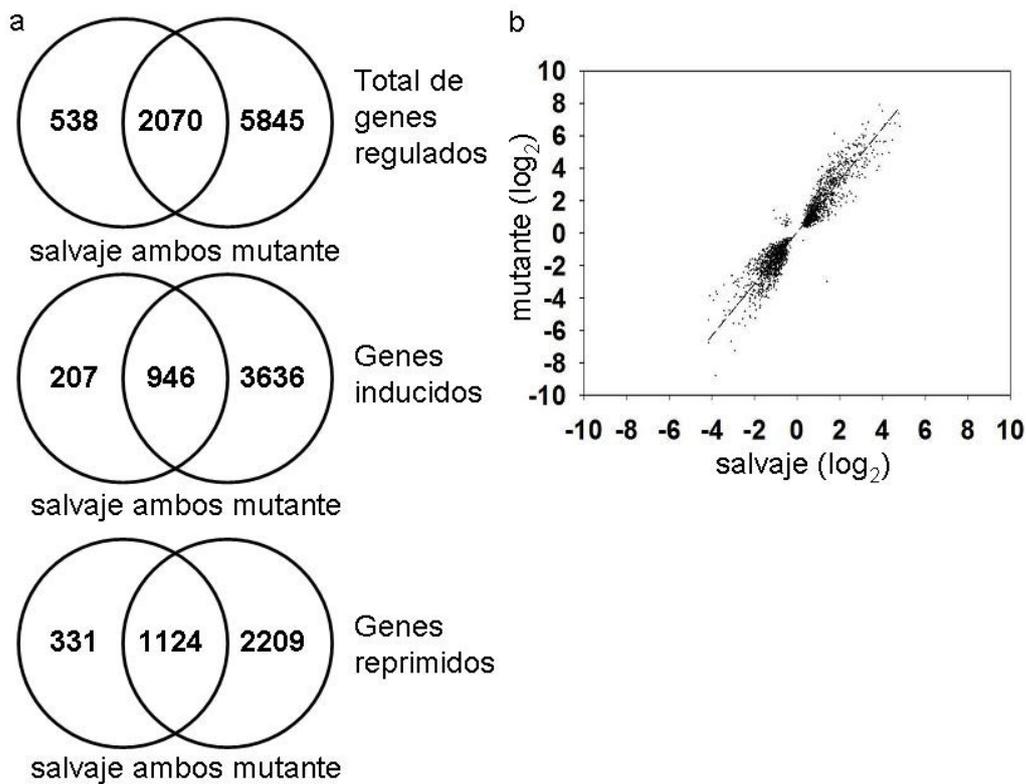


Figura 12. Transcriptómica en plantas salvajes y mutantes sometidas a déficit hídrico. **a.** Diagramas de Venn que muestran el número de genes que variaron su expresión en la condición de déficit hídrico ($FDR < 0.05$). **b.** Comparación de las veces que cambia significativamente la expresión de genes en la condición de déficit hídrico. Los resultados son el equivalente a 2070 sondas en la intersección en el primer diagrama de Venn (a). La correlación tiene un coeficiente angular de 1.6 y un coeficiente de determinación 0.95.

De entre los 2070 genes que cambiaron su expresión en la condición de déficit hídrico en ambos genotipos (Figura 12 a) se encuentran los genes de *P5CS2*, *P5CS3*, *GDC*, *GDH*, *GO1* y el gen de la asparraginasa (Cuadro 6) y los genes relacionados con la fotosíntesis (Díaz *et al.*, 2010, supporting information), entre los que se encuentra la subunidad mayor de la Rubisco y proteínas estructurales del aparato fotosintético. Estos datos en su conjunto indicarían que la función del cloroplasto se altera en ambos genotipos en respuesta al déficit hídrico.

6.2 Los genes que se inducen por déficit hídrico en el mutante se reprimen en la condición control y viceversa

Las diferencias en el transcriptoma entre plantas salvajes y mutantes en ausencia de déficit hídrico, fueron analizadas para identificar genes regulados por la deficiencia de GSp. Por un lado se encontró en condiciones control que 594 genes presentaron diferencias en su expresión entre

ambos genotipos ($FDR < 0.05$), de estos genes 168 estaban inducidos, mientras que 426 estaban reprimidos en el mutante respecto al salvaje. Además en el mutante, 460 genes de los 594 (77%) estaban regulados por el déficit hídrico.

La diferencia en el cambio de expresión de estos genes entre el mutante y el salvaje en condición control se relacionó con los cambios correspondientes en el mutante en la condición de déficit hídrico (Figura 13 a). El resultado mostró una correlación lineal negativa con un coeficiente angular de 1.83 y un coeficiente de determinación 0.91.

La pendiente negativa de esta regresión lineal muestra que el grupo de genes que varía su expresión en las plantas del mutante y del salvaje en condición control están regulados en forma contraria en mutante por el déficit hídrico. De esta forma los genes que se inducen en estrés hídrico en el mutante están reprimidos en condiciones control y viceversa. Un resultado a resaltar es que el grupo de genes relacionados al metabolismo de los aminoácidos (Figura 13 c), que está reprimido como consecuencia de la deficiencia de GSp en plantas control, son los que están más expresados en la condición de déficit hídrico (Figura 13 b). Dentro de este grupo de genes, se encuentran transportadores de amonio, urea y la GSc. Asimismo genes del ciclo C2 como *GO* y *AspAT* se encuentran en este grupo (Figura 13 b).

Los genes que muestran expresión diferencial entre las plantas mutantes y salvajes en condición control se pueden agrupar en 10 categorías funcionales, mientras que al 39 % restante no se les pudo asignar una categoría funcional. De estas categorías 4 interesan en particular para esta tesis dada su relación con el déficit hídrico y la asimilación de amonio. La categoría 1 (14%) corresponde a genes involucrados en el marcaje-degradación de proteínas, la categoría 3 (8%) a genes que participan en el transporte, la categoría 8 (4%) a genes involucrados en la señalización de estrés biótico-abiótico y la categoría 9 (9%) a genes que participan en el metabolismo de los aminoácidos (Figura 13 c).

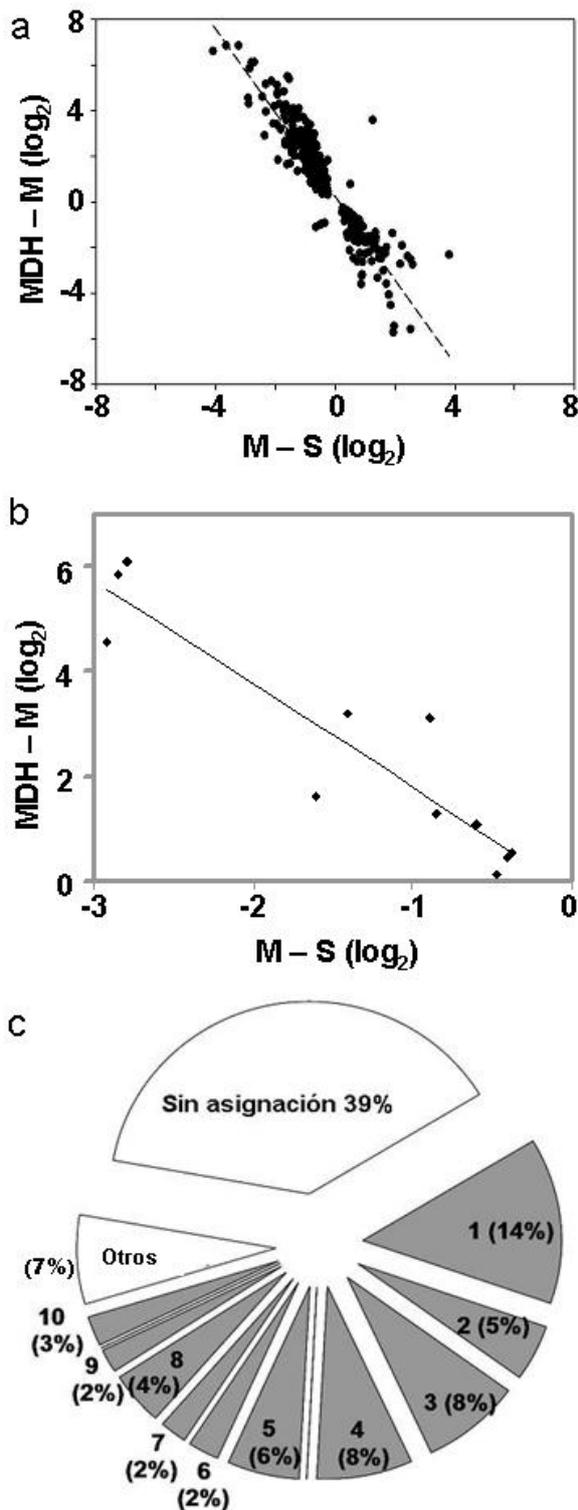


Figura 13. Transcriptómica comparativa de genes expresados en el mutante y en el salvaje con riego y en condición no fotorespiratoria.

a. Comparación de las veces que cambia la expresión de los genes (\log_2) en el mutante menos los que se expresan en el salvaje en condición control (M - S) con los regulados por déficit hídrico en el mutante menos los expresados en el control (MDH - M). El coeficiente de determinación fue 0.84 y el FDR < 0.05.

b. Comparación de las veces que cambia la expresión de genes (\log_2) de la fotorespiración y asimilación de nitrógeno en el mutante menos los que se expresan en el salvaje en condición control (M - S) con regulados por déficit hídrico en el mutante menos los expresados en el control (MDH - M). El coeficiente de determinación fue 0.86 y el FDR < 0.05.

c. Clasificación en categorías funcionales de los genes expresados diferencialmente: 1. marcaje-degradación de proteínas, 2. enzimas de gran tamaño, 3. trasportadores, 4. transcripción-procesamiento de RNA, 5. señalización, 6. metabolismo del C, 7. división celular y desarrollo, 8. señalización estrés biótico-abiótico, 9. metabolismo de aminoácidos y 10. hormonas.

6.3 Un grupo de genes están regulados por déficit hídrico exclusivamente en el mutante

Entre los genes inducidos por déficit hídrico exclusivamente en el mutante se encuentran *LjAMT1:1* (transportador de amonio), *LjAS2* (isoforma de la asparragina sintetasa), *Ljwgs_021753.1* (transportador de prolina) (Cuadro 6) y el gen de la glutatona S transferasa. Por el contrario, otros genes fueron reprimidos exclusivamente en el mutante como *LjAMT2* y *Ljwgs037968* (proteínas transportadoras de amonio) (Cuadro 6).

En el mutante la expresión de las isoformas de la GS y la GOGAT estuvo modulada por el déficit hídrico, mientras que en el salvaje la expresión no varió (Cuadro 6). En el mutante los genes de la GSp y Fd-GOGAT se reprimieron en el orden de 2 veces, mientras que el gen de la GSc se indujo promedialmente 2 veces por déficit hídrico (Cuadro 6).

También se encontraban inducidos exclusivamente en el mutante genes del catabolismo de los aminoácidos, como varios relacionados a la degradación de la lisina, entre ellos el de la enzima 2-oxoglutarato reductasa (OR), que genera glutamato. De esta forma la inducción de los transcriptos OR en el mutante, apoyaría la hipótesis de que cuando no hay GSp, la lisina puede ser degradada para abastecer la síntesis de metabolitos como la prolina y el GABA en condición de déficit hídrico.

En relación a genes de enzimas que participan en el ciclo C2, se observó exclusivamente en el mutante la represión de 1 de los 3 genes de la GO, del gen de la glicina descarboxilasa y el de la HPR y la inducción de uno de los genes de la GO (Cuadro 6).

Los genes relacionados con la defensa antioxidante presentaron resultados disímiles entre el salvaje y el mutante. En ambos genotipos se indujeron los genes de peroxidasa 1 y de la glutatona transferasa, y se reprimió el de la ascorbato peroxidasa, aunque el nivel de expresión (inducción-represión) fue mayor en el mutante (Cuadro 7 y Figura 14). Por otro lado, otros genes que sólo se indujeron en el mutante fueron el de la CuZnSOD citosólica, la peroxidasa 3, la glutatona peroxidasa y la glutatona reductasa y se reprimieron los genes de la FeSOD 2, CuZnSOD plastídica y la peroxidasa 4 (Cuadro 7 y Figura 14).

Cuadro 6. Expresión de genes en condición de déficit hídrico en relación a la condición control.

	salvaje	mutante
<u>Metabolismo del glutamato y glutamina</u>		
GSc o GS1-1	1.0	2.5
GSc o GS1-3	1.0	1.5
GSp o GS2	1.0	- 2.6
Fd-GOGAT	- 1.8	- 2.2
GDH	2.1	5.4
GDC	9.8	18.0
Transportador de amonio <i>LjAMT1:1</i>	1.2	2.5
Transportador de amonio <i>LjAMT2</i>	1.4	- 2.7
Transportador de amonio (<i>Ljwgs037968</i>)	1.0	- 3.8
<u>Metabolismo de la prolina</u>		
P5CS 1	1.0	1.0
P5CS 2	1.2	2.6
P5CS 3	3.7	5.3
P5CDH	2.4	3.2
Arginasa	1.4	3.7
Transportador de prolina (<i>Ljwgs021753.1</i>)	1.0	6.3
<u>Aminotransferasas</u>		
AspAT 1	1.0	3.3
AspAT 2	1.0	2.9
AspAT 3	- 1.2	- 11.1
AspAT 4	1.0	60.0
AAT	- 2.1	- 2.7
GSAAT	- 2.7	- 4.2
Transportador de aminoácidos 1	1.0	- 3.1
Transportador de aminoácidos 2	1.7	3.9
Transportador de aminoácidos 3	2.1	9.0
Transportador de aminoácidos 4	4.0	8.1
<u>Ciclo C2</u>		
GlyDC	- 1.6	- 4.0
GO1	2.2	8.6
GO2	- 1.4	- 3.7
GO3	- 1.9	8.6
HPR	- 1.7	- 4.4
<u>Varios</u>		
Asparraginasa	3.5	4.2
Asparragina sintetasa	1.2	2.5
Lisina descarboxilasa	1.0	3.7
2 oxoglutarato reductasa	4.5	31.6

Glutamato deshidrogenasa (GDH), glutamato descarboxilasa (GDC), pirrolina 5-carboxilato sintetasa (P5CS), aspartato aminotransferasa (AspAT), alanina aminotransferasa (AAT), glutamato semialdehído aminotransferasa (GSAAT), glicina descarboxilasa (GlyDC) e hidroxipiruvato reductasa (HPR). Los resultados son la media de tres repeticiones biológicas y los números resaltados son significativos al FDR < 0.05.

Cuadro 7. Expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante enzimática. El nivel de expresión de los genes en condición de déficit hídrico está referido al control con riego.

	salvaje	mutante
MnSOD	1.0	1.0
FeSOD 1	1.0	1.0
FeSOD 2	1.0	- 4.0
CuZnSODc	1.0	2.5
CuZnSODp	1.0	- 2.1
CAT	1.0	1.0
PER1	5.0	10.0
PER2	2.0	1.0
PER3	1.0	4.5
PER4	1.0	- 2.5
APX	-3.0	- 11.0
GPX	1.6	2.4
GR	1.0	2.0
GT	5.0	12.0

Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (PER), ascorbato peroxidasa (APX), glutatióna peroxidasa (GPX), glutatióna reductasa (GR) y glutatióna transferasa (GT) Los resultados son la media de tres repeticiones biológicas y los números resaltados son significativos al FDR < 0.05.

También se observó en el mutante la represión de genes relacionados al metabolismo fotosintético, así como una modulación de genes del metabolismo secundario, fermentativo, activación de la degradación de lípidos y represión de su síntesis (Figura 14).

En ambos genotipos los genes de proteínas que anclan a la ferredoxina en el fotosistema I (*psaD*) y la subunidad γ de la ATP sintetasa (*atpG*) se reprimieron más en el mutante que en el salvaje en la condición de déficit hídrico (Cuadro 8 y Figura 14). Además de la mayor represión de estos genes en el mutante, también es llamativa la mayor cantidad de genes de los fotosistemas reprimidos en relación al salvaje. Entre los genes que se reprimen solo en el mutante se encuentran los del fotosistema I, los del centro de reacción (*psaB*) y el de una proteína que ancla a la plastocianina (*psaM*) (Cuadro 8). También se reprimieron genes del fotosistema II, como los del complejo partidor de agua (*psbO*, *psbP*, *psbQ2*), de enzimas involucradas en la fotoprotección (*psbH*) y de la NADH plastoquinona reductasa (*ndhA*, *ndhD*). Independientemente de la represión de estos genes relacionados a la fotosíntesis las concentraciones de clorofilas a y b fueron las mismas en el mutante y el salvaje (Díaz *et al.*, 2010).

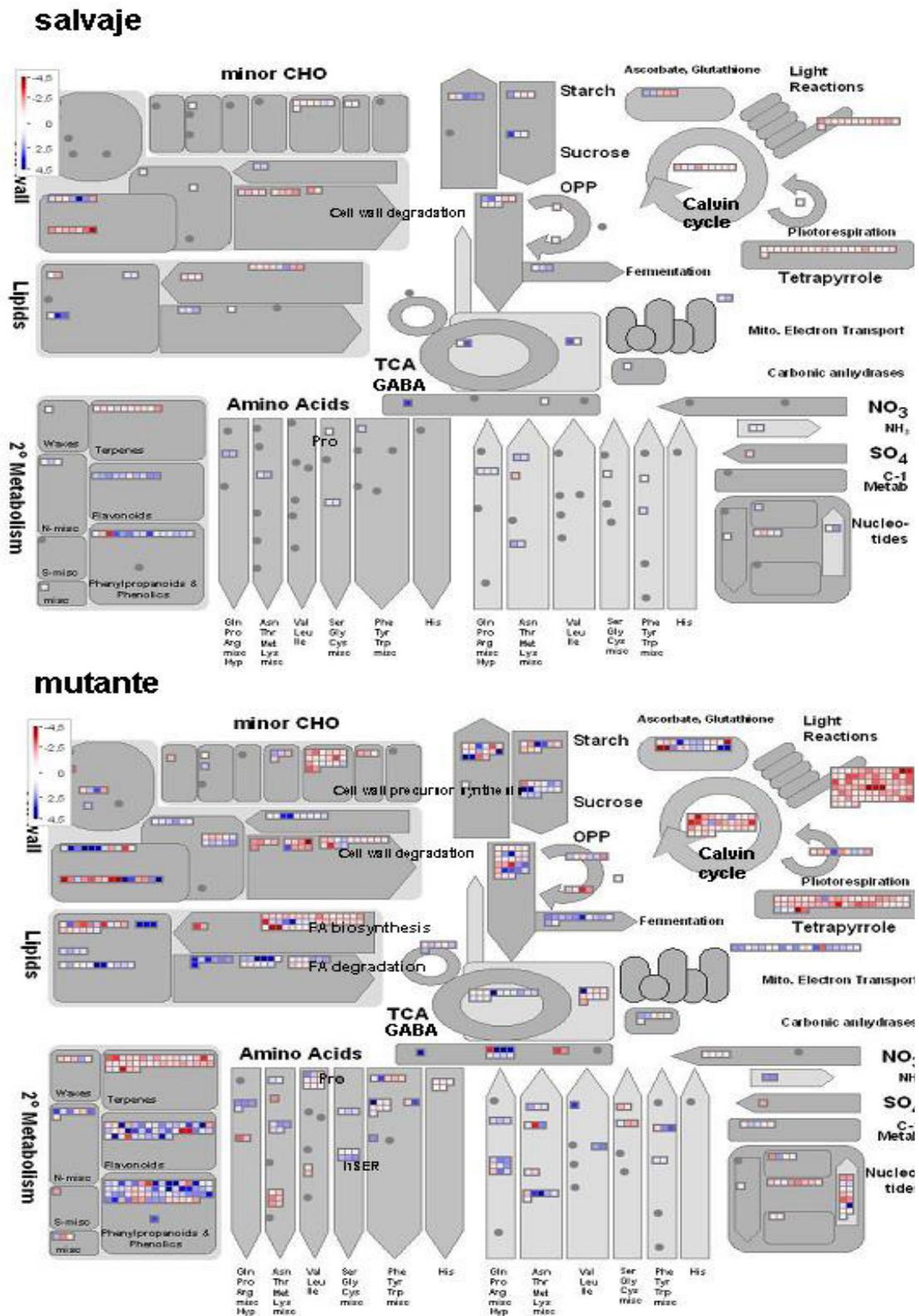


Figura 10. Esquema (simplificado) de la redacción representativa de genes de los metabolismos en salvaje y mutante en sequía. Cada recuadro corresponde a un gen, en rojo reprimido y azul inducido (arriba a la izquierda se muestra la escala de color). La intensidad está normalizada respecto a la condición control.

Cuadro 8. Expresión de genes de relacionados a la fotosíntesis. El nivel de expresión de los genes en condición de sequía está referido al control con riego.

	Salvaje	mutante
<u>Antena</u>		
Proteína que se une a la clorofila	-1.4	-4.1
<i>lhca2</i>	-1.2	-2.4
<i>lhcb3</i>	-2.4	-6.3
<u>Fotosistema I</u>		
<i>psaA</i>	-2.2	-1.1
<i>psaB</i>	-2.1	-3.1
<i>psaC</i>	-1.1	-1.2
<i>psaD</i>	-1.1	-2.2
<i>psaD2</i>	-2.5	-4.1
<i>psaH</i>	-1.3	-2.8
<i>psaI</i>	-1.5	-2.6
<i>psaJ</i>	-1.4	-2.6
<i>psaL</i>	-1.3	-2.7
<i>psaN</i>	-1.5	-4.7
<u>Fotosistema II</u>		
<i>psbA</i>	2.6	2.1
<i>psaB</i>	1.3	-1.3
<i>psaC</i>	-1.2	-1.3
<i>psaD</i>	-1.8	-2.7
<i>psbE</i>	-1.7	-5.5
<i>psbF</i>	-1.6	-4.4
<i>psbG</i>	-3.0	-4.3
<i>psbH</i>	-1.6	-3.2
<i>psaI</i>	-1.1	-1.4
<i>psbJ</i>	-1.4	-3.6
<i>psbK</i>	-1.7	-2.7
<i>psbL</i>	-1.4	-3.4
<i>psbM</i>	1.1	-1.2
<i>psbN</i>	1.6	-2.0
<i>psbO</i>	-1.3	-3.2
<i>psbO2</i>	1.0	-1.0
<i>psbP</i>	-1.5	-4.4
<i>psbQ2</i>	-1.5	-3.6
<i>psbS</i>	1.0	1.1
<i>psbT</i>	1.2	1.6
<i>psbW</i>	-2.1	-1.8
<u>Otros genes plastídicos relacionados a fotosíntesis</u>		
<i>atpA</i>	-1.3	-4.6
<i>atpG</i>	-2.3	-5.4
<i>atpF</i>	-1.1	-3.1
<i>ndhA</i>	-1.2	-1.8
<i>ndhD</i>	1.0	-2.4
<i>petB</i>	1.0	-3.2
<i>petE2</i>	-1.3	-2.8
<i>petG</i>	-1.2	-4.6

7. La ausencia de GSp modificó la expresión de los genes del metabolismo de la prolina

Se evaluó si la falta de GSp y la menor acumulación de prolina observada en el mutante estaban asociadas a cambios en los niveles de expresión de los genes de su metabolismo. Para esto se analizaron por qRT-PCR los niveles de expresión de los genes implicados en la síntesis y oxidación de la prolina, en plantas salvajes y mutantes con riego y sometidas a déficit hídrico.

Para analizar la expresión de los genes del metabolismo de la prolina, se buscaron en las bases de datos (<http://www.kazusa.or.jp/lotus>) secuencias homólogas para diseñar cebadores que permitieran la amplificación específica de estos genes. Se encontraron ocho secuencias correspondientes al gen *P5CS*, dos secuencias para arginasa, dos para *POX* y una para *P5CR*, *OAT* y *P5CDH*. El análisis de expresión de los diferentes genes se realizó con los valores de expresión normalizados a 1 respecto al control.

P5CS mostró niveles de expresión que permiten definir tres categorías en función de la respuesta de los correspondientes transcritos a déficit hídrico: *P5CS-1* comprende secuencias que no se inducen, *P5CS-2* comprende secuencias que se inducen moderadamente y *P5CS-3* secuencias que se inducen fuertemente en ambos genotipos (Figura 15 a).

La inducción por déficit hídrico de los genes *P5CS-2* y *P5CS-3* fue siempre mayor en el mutante que en el salvaje a similar estatus hídrico y no se observó inducción de *P5CR* (Figura 15 a). En relación a la vía de síntesis de prolina a partir de ornitina, se observó un ligero incremento en la expresión del gen de la arginasa, de aproximadamente 1.5 veces en el salvaje y de 3 veces en el mutante. La inducción de la expresión del gen *OAT* sólo se observó en el mutante en condición de déficit hídrico (Figura 15 b).

En relación a la oxidación de la prolina sólo se encontró inducción del gen de la *P5CDH* en el salvaje en respuesta al déficit hídrico (Figura 15 c), condición que no indujo cambios del gen *POX* en ninguno de los genotipos.

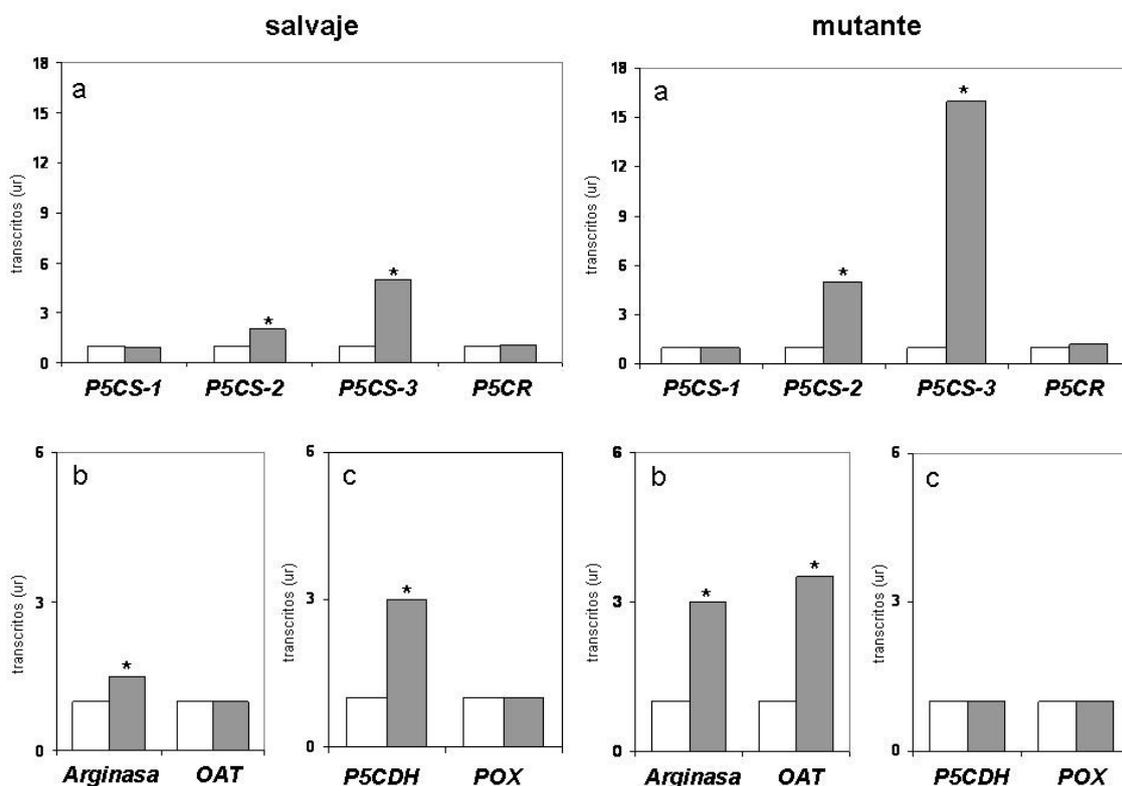


Figura 15. Expresión de genes que participan en el metabolismo de la prolina en respuesta a sequía. **a.** vía de síntesis de prolina a partir de glutamato, **b.** vía de síntesis de prolina a partir de ornitina y **c.** vía de oxidación de la prolina. Pirrolina 5 carboxilato sintetasa (*P5CS*), pirrolina 5 carboxilato reductasa (*P5CR*), ornitina amino transferasa (*OAT*), pirrolina 5 carboxilato deshidrogenasa (*P5CDH*) y prolina oxidasa (*POX*). Tratamiento control (barras blancas) y sequía (barras grises). Los valores están expresados en unidades relativas (ur) y normalizados a 1 respecto al control. * Las medias de nivel de expresión entre control y la condición de sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

En el mutante en condición de déficit hídrico los genes de la síntesis de prolina están sobrepresados respecto al salvaje a pesar de tener menos prolina que este último. Al mismo tiempo, no se indujo *P5CDH*, que sí se indujo en el salvaje (Figura 16). Estos resultados muestran que las vías de síntesis y degradación de prolina ven alterada su regulación como consecuencia de la ausencia de GSp, por lo que se infiere que esa isoforma es clave en la síntesis y acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico.

Es importante resaltar que cuando se compararon los resultados de los análisis de expresión de genes del metabolismo de la prolina obtenidos por la transcriptómica y por qRT-PCR se obtuvo una sólida relación entre ambos resultados (Figura 17).

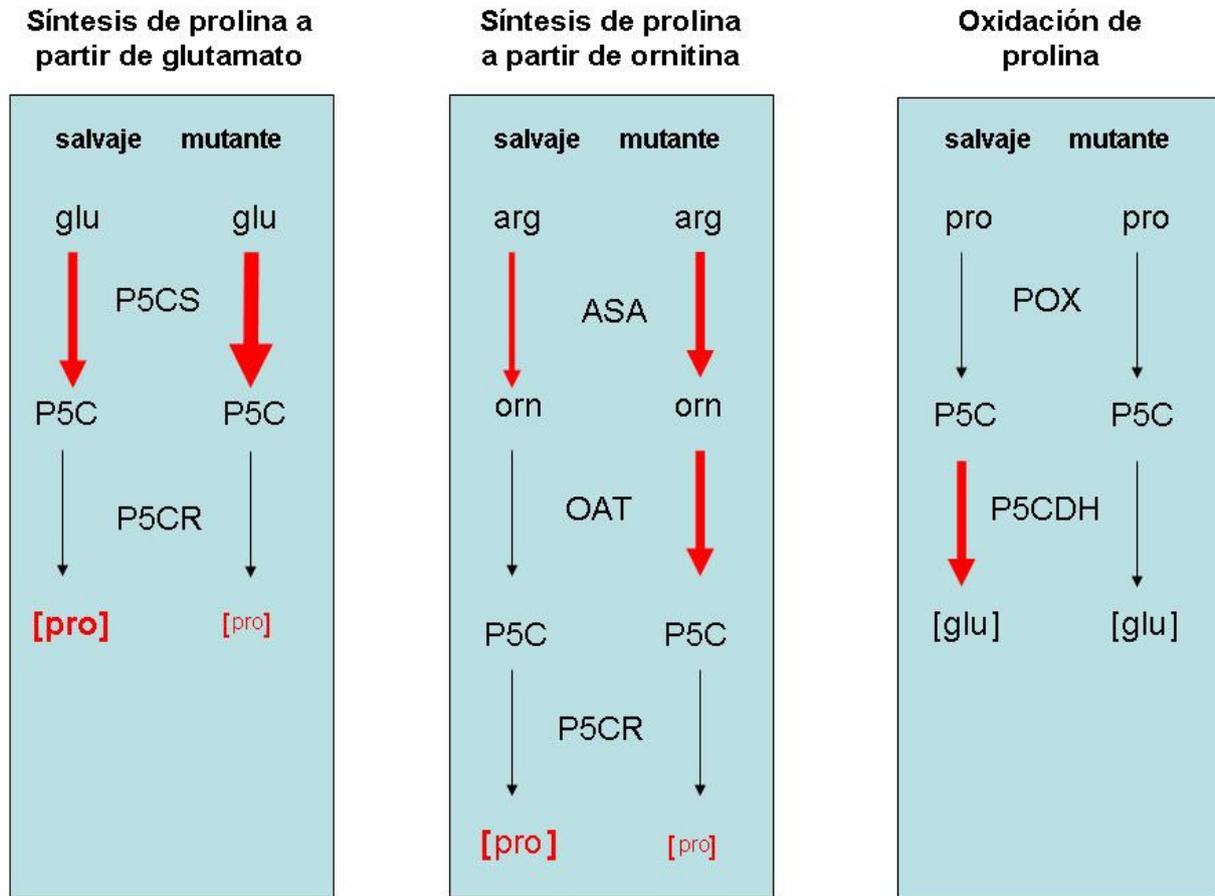


Figura 16. Esquema que muestra la expresión de los genes del metabolismo de prolina en el salvaje y mutante en condiciones de déficit hídrico. Las flechas rojas indican los genes que se inducen y el grosor de la misma indica la magnitud de esa inducción cuyo valor se ve en la Figura 15. Pirrolina 5 carboxilato sintetasa (*P5CS*), pirrolina 5 carboxilato reductasa (*P5CR*), ornitina amino transferasa (*OAT*), pirrolina 5 carboxilato deshidrogenasa (*P5CDH*) y prolina oxidasa (*POX*). El tamaño relativo de [pro] indica la mayor o menor concentración de prolina.

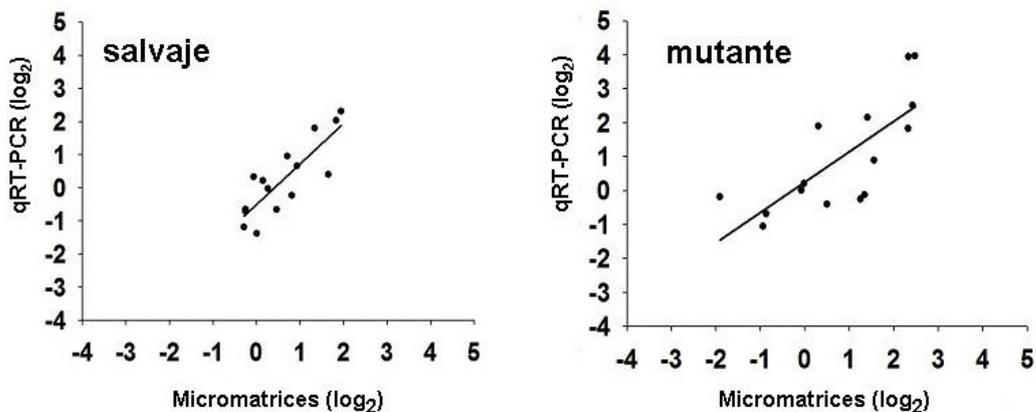


Figura 17. Comparación de los datos obtenidos por transcriptómica y por qRT-PCR de la expresión de los genes del metabolismo de la prolina. Cada punto representa una sonda de los genes del metabolismo de la prolina. Los valores representados en las gráficas son el \log_2 de la diferencias de los niveles de expresión entre plantas regadas y plantas sometidas a déficit hídrico. La regresión lineal de los datos de micromatrices y qRT-PCR da los coeficientes de determinación de $r^2=0.70$ y $r^2=0.57$ para el salvaje y el mutante respectivamente. Los resultados son media de tres réplicas biológicas.

8. La ausencia de GSp afectó la actividad de enzimas del ciclo C2

Dado los cambios observados en el transcriptoma como consecuencia de la ausencia de la GSp, pareció necesario evaluar las actividades de las enzimas GGAT, SGAT, AsGAT, GO y HPR del ciclo C2.

En condiciones no fotorrespiratorias la concentración de amonio fue la misma en el salvaje y en el mutante y promedió en $3.2 \pm 0.7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PS}$, concentración que no cambió como consecuencia de la situación de déficit hídrico.

En la condición control la actividad GGAT fue significativamente mayor en el mutante que en el salvaje y se observó un incremento significativo de su actividad en respuesta a déficit hídrico en el salvaje (Figura 18 a). La actividad SGAT fue tres veces mayor en el salvaje que en el mutante en condición control y disminuyó en respuesta al déficit hídrico en ambos genotipos (Figura 18 b). Por otro lado la actividad AsGAT sólo detectada en el salvaje, no respondió al déficit hídrico (Figura 18 c).

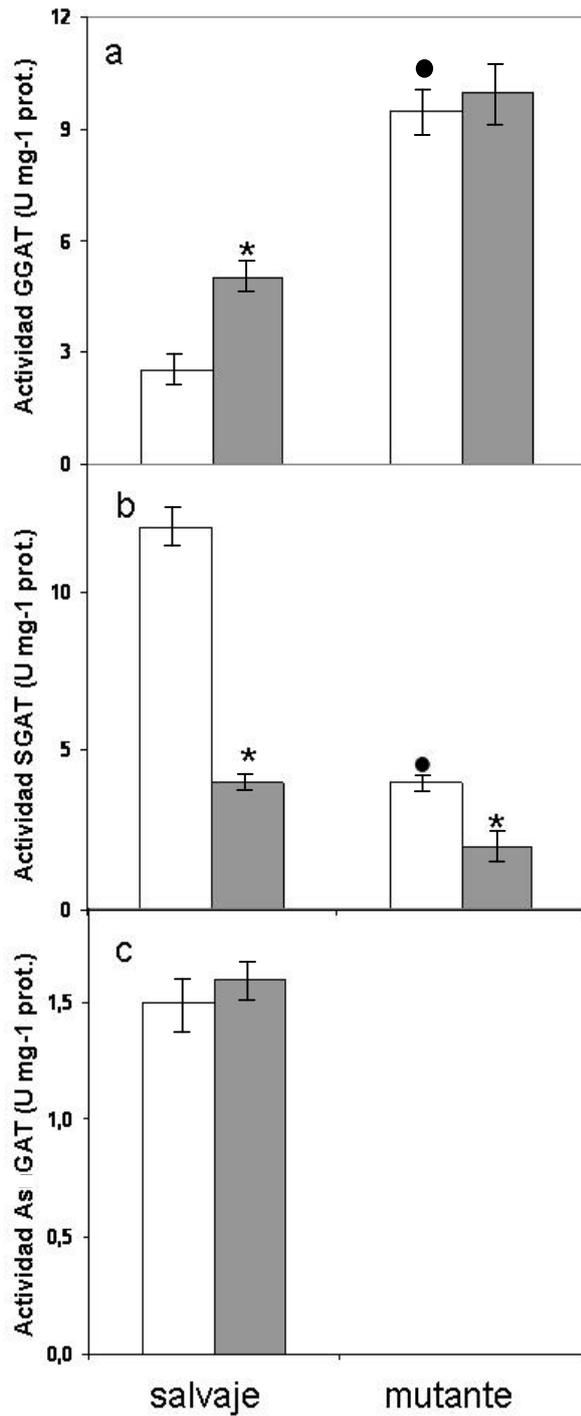


Figura 18. Biosíntesis de glicina por las transaminasas GGAT, SGAT y AsGAT. **a.** Actividad GGAT, **b.** SGAT y **c.** AsGAT en folíolos de plantas salvajes y mutantes. Tratamiento control (barras blancas) y sequía (barras grises). Los resultados son la media de dos experimentos con tres repeticiones. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de formar 1 μmol de glicina. min^{-1} . Las medias de las actividades entre plantas del salvaje y mutante son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. * Las medias de las actividades enzimáticas de plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

Las actividades de las transaminasas GGAT, SGAT y AsGAT tienen como producto la glicina. Cuando se consideró la suma de estas actividades, se observó mayor actividad en el salvaje, la que descendió significativamente en condiciones de déficit hídrico (Figura 19 a). A su vez cuando se relacionó la actividad total de esas enzimas con el contenido de glicina se encontró que al descender la suma de las actividades la concentración de glicina descendió (Figura 19 b).

Otras enzimas involucradas en la fotorrespiración son la HPR y la GO. La actividad HPR fue similar en ambos genotipos y disminuyó significativamente en respuesta al déficit hídrico (Figura 20 a). Por otro lado la actividad GO también fue la misma en ambos genotipos en la condición control, pero presentó un comportamiento diferente en respuesta al déficit hídrico, dado que la actividad en el salvaje se incrementó y en el mutante disminuyó (Figura 20 b).

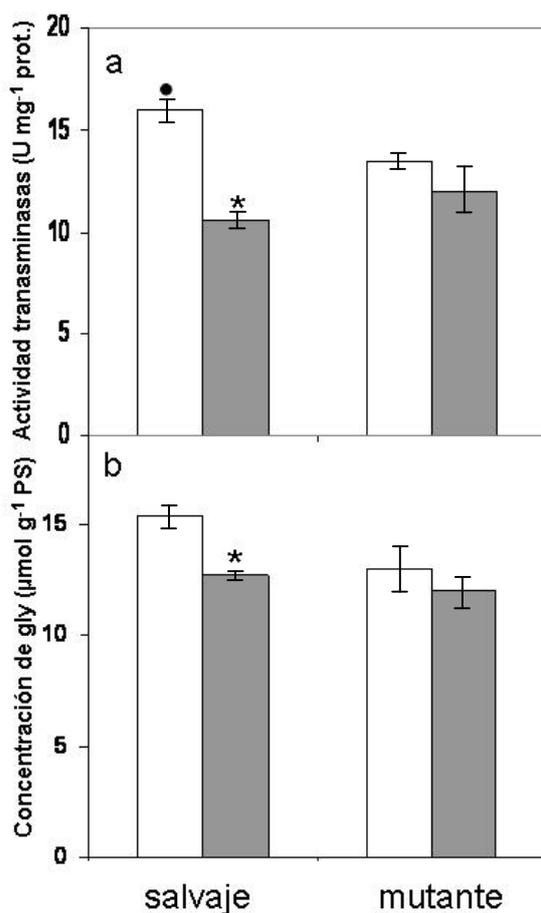


Figura 19. Actividad de las transaminasas y concentración de glicina. **a.** Suma de las actividades de las transaminasas GGAT, SGAT y AsGAT y **b.** concentración de glicina en hojas de plantas salvajes y mutantes. Tratamiento control (barras blancas) y sequía (barras grises). Los resultados son media de dos experimentos con tres replicas biológicas. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de formar 1 μmol de glicina. min^{-1} . • Las medias de las actividades entre plantas del salvaje y mutante son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. * Las medias de las actividades de las transaminasas y de la concentración de glicina entre las plantas control y las sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

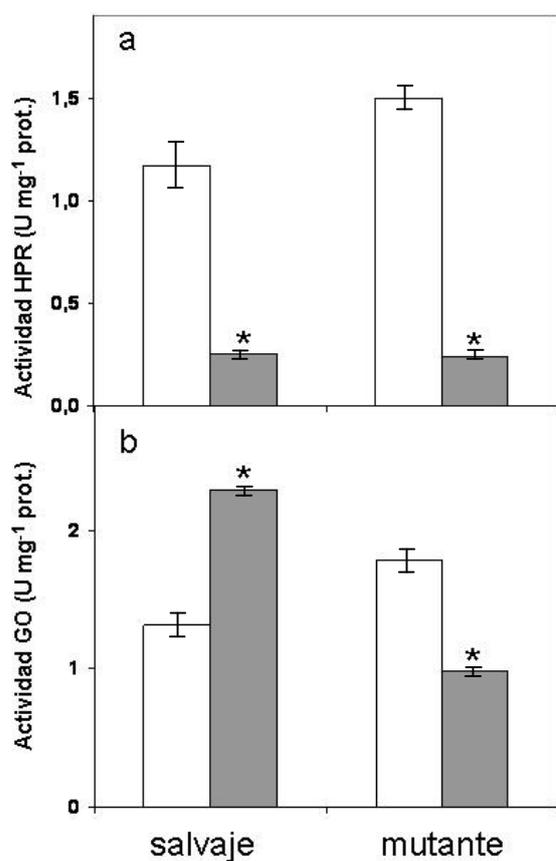


Figura 20. Actividades de enzimas del ciclo C2. **a.** HPR y **b** GO en hojas de plantas salvajes y mutantes. Tratamiento control (barras blancas) y sequía (barras grises). Los resultados son media de dos experimentos con tres repeticiones. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de formar 1 μmol de producto. min^{-1} . * Las medias de los valores de las actividades enzimáticas entre plantas control y sometidas a déficit hídrico son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

9. La nutrición nitrogenada afecta la asimilación de amonio y acumulación de prolina

9.1. Nutrición nitrogenada y acumulación de prolina

Tanto las plantas cultivadas con nitrato como las cultivadas con amonio incrementaron la concentración de prolina en respuesta al déficit hídrico respecto al control. Sin embargo en la condición de déficit hídrico la concentración de prolina en las plantas cultivadas con amonio fue mayor respecto a la encontrada en plantas cultivadas en nitrato (Figura 21). La diferencia en la acumulación de prolina entre las plantas cultivadas con ambas fuentes de nitrógeno en condición de déficit hídrico no se debió a diferencias en el estatus hídrico, dado que el contenido relativo de agua en las plantas estresadas cultivadas con nitrato y cultivadas con amonio fue el mismo (54 ± 5 y 57 ± 5 , respectivamente).

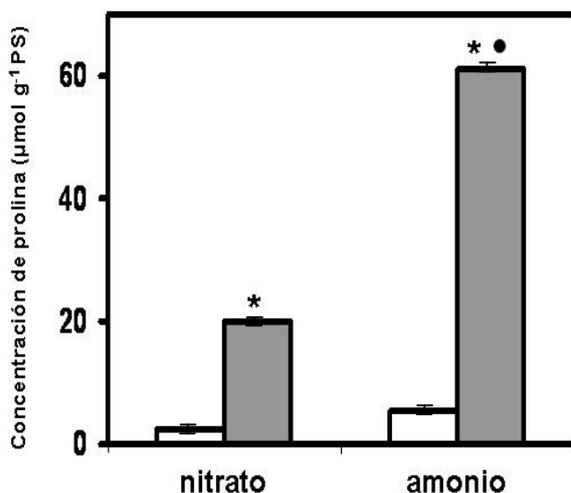


Figura 21. Concentración de prolina en plantas crecidas con diferente fuente de nitrógeno. Plantas control (barras blancas) y sometidas a sequía (barras grises). Los resultados son media de tres repeticiones. * Las medias de la concentración de prolina entre plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. • Las medias de la concentración de prolina entre plantas cultivadas con nitrato y con amonio son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

9.2. Actividad de enzimas de la asimilación de amonio y del metabolismo de la prolina

Como la concentración de prolina acumulada fue diferente según la fuente de nitrógeno, se analizaron las actividades de enzimas relacionadas a su metabolismo: P5CS, OAT, GS, GOGAT y GDH. La actividad P5CS se incrementó como consecuencia del déficit hídrico en ambas condiciones nitrogenadas. Sin embargo en esta condición la actividad de esta enzima fue significativamente mayor en las plantas cultivadas con amonio que en las cultivadas con nitrato (Figura 22 a). Por otro lado, la actividad de la enzima OAT no mostró cambios significativos en respuesta al déficit hídrico en ninguna condición nitrogenada (Figura 22 b).

Por otro lado, para establecer la magnitud de la participación de la OAT en la acumulación de prolina en *L. japonicus* se usó un inhibidor de transaminasas, el amino oxiacetato (AOA). La inhibición de la OAT mostró que la acumulación de prolina en la condición de déficit hídrico fue similar con y sin la aplicación de AOA, (53 ± 4 y 48 ± 6 respectivamente) en plantas cultivadas con amonio y como en plantas cultivadas con nitrato (22 ± 5 y 20 ± 3 respectivamente).

La prolina se sintetiza principalmente a partir de glutamato y en plantas la principal fuente de este aminoácido es el ciclo GS/GOGAT, razón por la que se evaluaron las actividades de estas enzimas. Si bien no hubo cambios en la actividad GS en respuesta a déficit hídrico con ninguna de las dos fuentes de nitrógeno (Figura 23 a), la actividad Fd-GOGAT en plantas control y sometidas a déficit hídrico fue el doble cuando las plantas se cultivaron con amonio respecto a cuando se

cultivaron con nitrato (Figura 23 b). Sólo en las plantas cultivadas con nitrato se incrementó la actividad Fd-GOGAT como consecuencia del déficit hídrico.

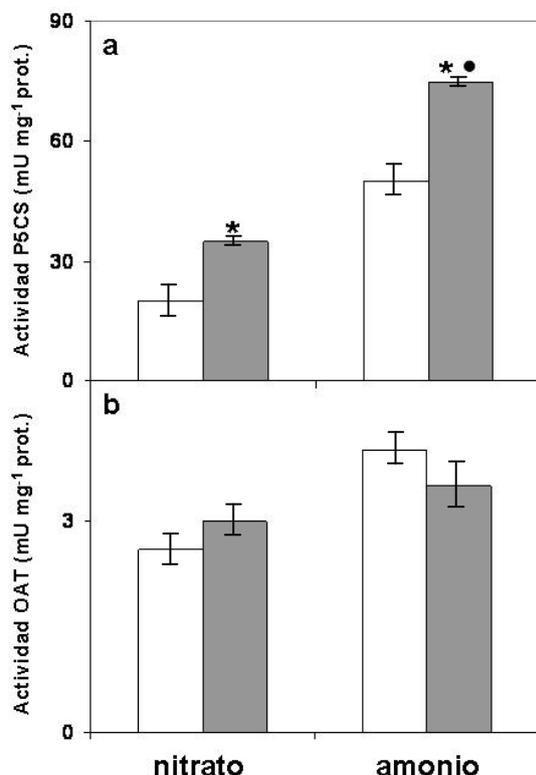


Figura 22. Actividades P5CS y OAT en plantas salvajes crecidas con nitrato y con amonio. **a.** Actividad P5CS y **b.** Actividad OAT. Plantas control (barras blancas) y sometidas a sequía (barras grises). Los resultados son media de tres repeticiones. Las medias de la actividad enzimática entre plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey. • Las medias de la actividad enzimática entre plantas cultivadas con nitrato y con amonio son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

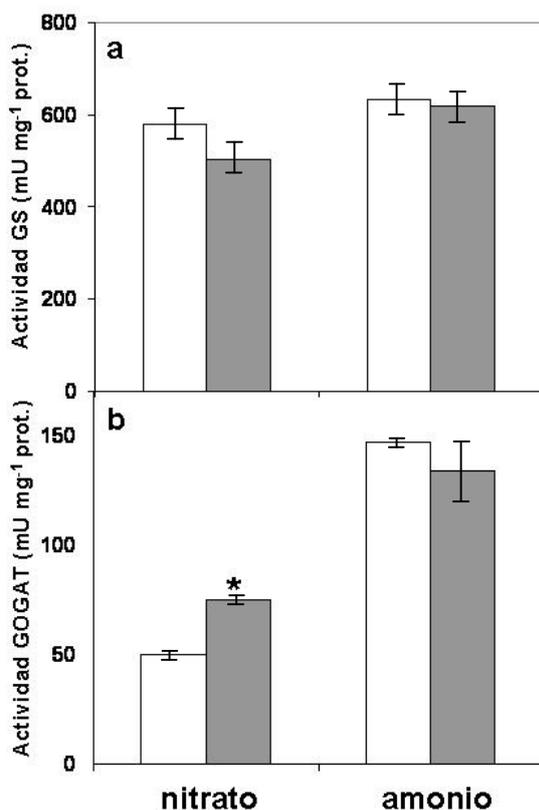


Figura 23. Actividades GS y Fd-GOGAT en plantas crecidas con nitrato y con amonio. **a.** Actividad GS y **b.** Actividad Fd-GOGAT. Plantas control (barras blancas) y sometidas a sequía (barras grises). Los resultados son media de tres repeticiones. * Las medias de la actividad enzimática entre plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

Otra fuente de glutamato es la actividad aminante de la GDH. En las plantas cultivadas con amonio la actividad GDH aminante se incrementó en la condición de déficit hídrico, mientras que disminuyó en las plantas cultivadas con nitrato (Figura 24 a). Por otro lado, la actividad GDH desaminante no varió en plantas cultivadas con nitrato pero disminuyó en plantas cultivadas con amonio (Figura 24 b).

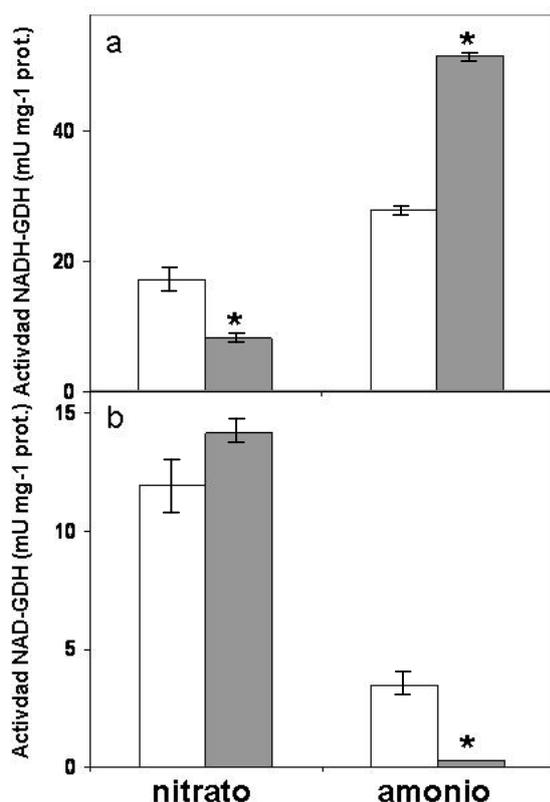


Figura 24. Actividad GDH aminante y desaminante en plantas crecidas con nitrato y con amonio **a.** Actividad GDH aminante y **b.** Actividad GDH desaminante. Plantas control (barras blancas) y sometidas a sequía (barras grises). Los resultados son media de tres repeticiones. * Las medias de la actividad enzimática entre plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

9.3. Expresión de genes de la asimilación de amonio y metabolismo de la prolina

La expresión de los genes *GS1.3* (GSc), *GS2* (GSp), *Fd-GOGAT* y *NADH-GOGAT* disminuyeron en las plantas sometidas a sequía en las dos condiciones de nutrición nitrogenada (Figura 25 a y b). A su vez la expresión de *GDH1* disminuyó en plantas en condición de sequía cuando fueron cultivadas con nitrato, mientras que *GDH2* se incrementó en plantas cultivadas con amonio (Figura 25 b).

Los genes *P5CS2* y *P5CS3* incrementaron su expresión en respuesta al déficit hídrico en ambas nutriciones nitrogenadas pero la expresión *P5CS2* fue mayor en plantas cultivadas con nitrato, mientras que la expresión de *P5CS3* fue mayor en plantas cultivadas con amonio (Figura 26 c). Por otra parte, los genes *OAT* y *P5CR* no variaron su expresión en condición de déficit hídrico con ambas fuentes de nitrógeno (Figura 26 a y b). A su vez la expresión de los genes de la arginasa 2 y *P5CDH* se incrementaron en respuesta al déficit hídrico con ambas fuentes de nitrógeno, pero la expresión de *P5CDH* fue mayor en plantas cultivadas con nitrato. Los genes *POX* se reprimieron en la condición de déficit hídrico con ambas fuentes de nitrógeno (Figura 26 c).

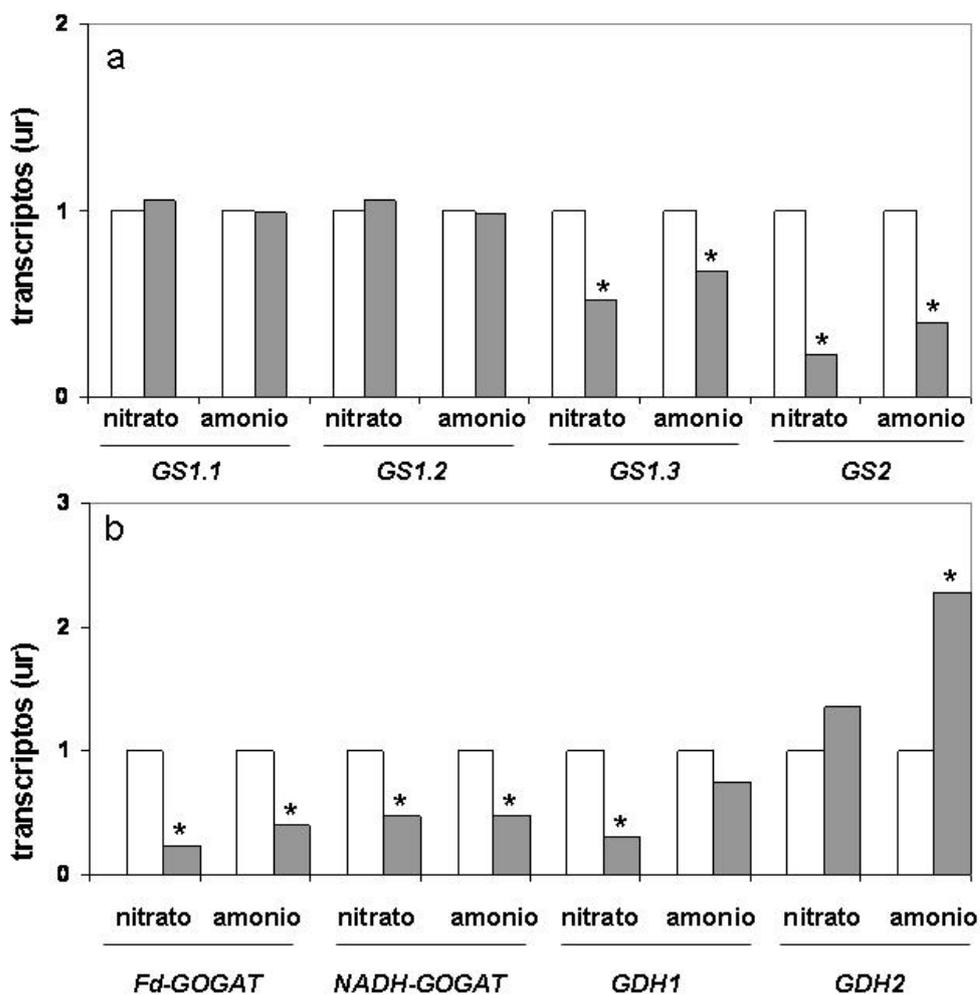


Figura 25. Transcripción de genes a asimilación de amonio **a.** Genes de GS. **b.** Genes de GOGAT y GDH. Las barras están normalizadas a uno respecto a las plantas control, expresados en unidades (ur). Plantas control (barras blancas) y sometidas a sequía (barras grises). Los resultados son media de tres repeticiones. * Las medias de los niveles de transcritos entre plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

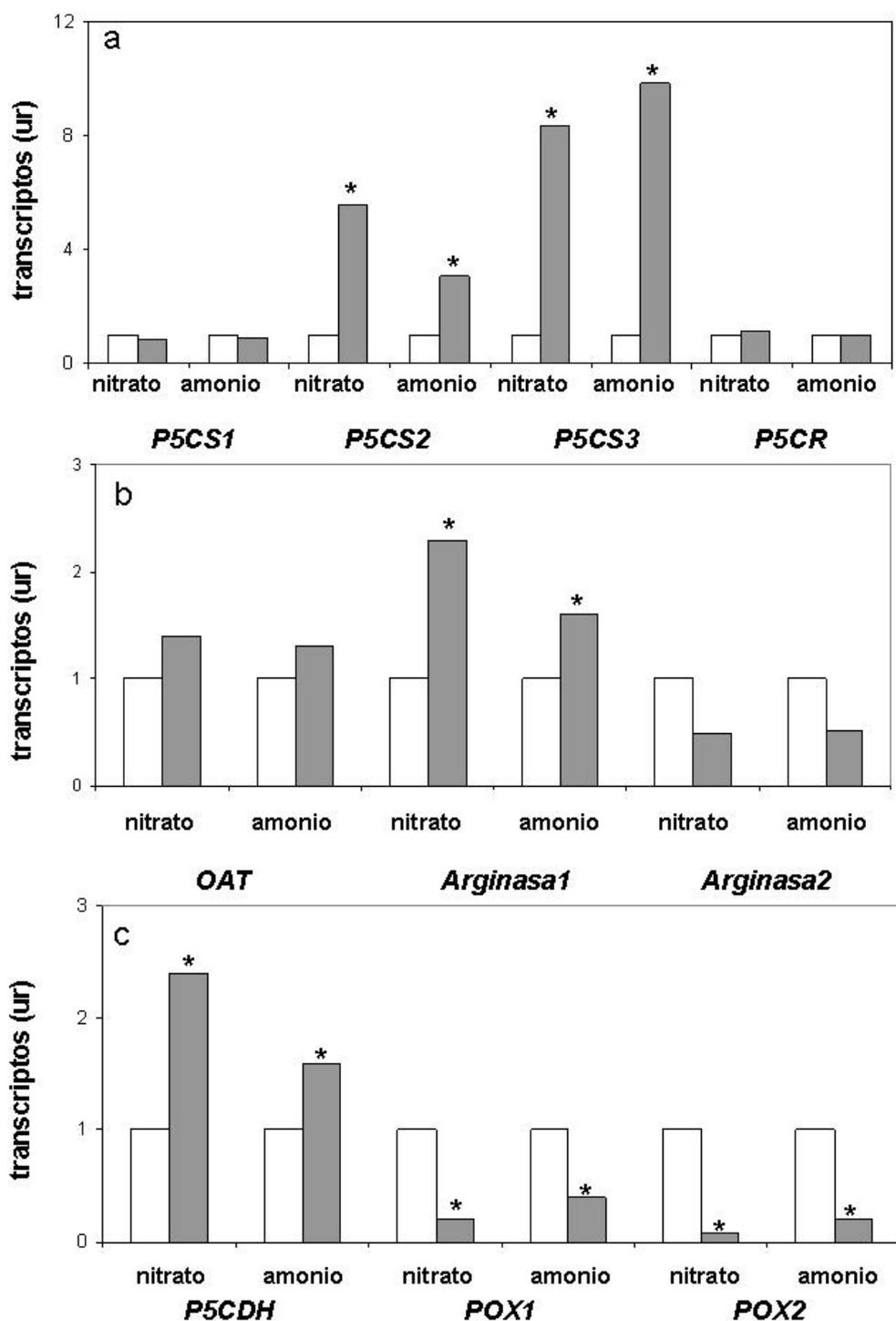


Figura 26. Transcripción de genes del metabolismo de la prolina. **a.** Genes de síntesis de prolina a partir de glu. **b.** Genes de síntesis de prolina a partir de orn y **c.** Genes de la oxidación de la prolina. Las barras están normalizadas a uno respecto a las plantas control, expresados en unidades (ur). Plantas control (barras blancas) y sometidas a sequía (barras grises). Los resultados son media de tres repeticiones. * Las medias de los niveles de transcritos entre plantas control y sometidas a sequía son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

10. Los cambios en la relación asn/asp y gln/glu modificaron las actividades de enzimas del metabolismo de la prolina

Se ha propuesto que la relación entre la amida y el aminoácido correspondiente puede afectar la actividad de determinadas enzimas (Wingler *et al.*, 1999). Por esto se analizaron las relaciones asn/asp y gln/glu.

Después de 4 días de suspendido el riego, en las plantas cultivadas con nitrato aumentó la concentración de asparragina y glutamina, y disminuyó la de glutamato y aspartato (Cuadro 9). Sin embargo la concentración de estos aminoácidos no varió en la condición de déficit hídrico cuando las plantas se cultivaron en alto CO₂. En las plantas cultivadas con amonio sólo disminuyó la concentración de asparragina en respuesta al déficit hídrico (Cuadro 9). No se observaron cambios significativos en la concentración de ornitina, alanina, arginina, glicina ni serina así como tampoco la de GABA. El hecho de que no se observen cambios en los contenidos de ornitina y arginina y que la actividad OAT no varíe refuerza la hipótesis ya planteada de que en *L. japonicus* la síntesis de prolina se realiza fundamentalmente a partir de glutamato.

Cuadro 9. Concentración de amidas, aminoácidos y relación asn/asp y gln/glu en hojas de plantas cultivadas con nitrato o con amonio en condiciones control y sometidas a sequía.

	nitrato		amonio	
	control	sequía	control	sequía
asn	21.6 ± 2.0	28.6 ± 2.9	18.6 ± 2.3	7.6 ± 1.4
asp	2.4 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2
gln	2.2 ± 0.3	3.6 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.3
glu	12.0 ± 1.2	6.0 ± 0.5	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.4
asn/asp	9.0	15.1	12.4	6.3
gln/glu	0.2	0.6	0.6	0.6

La concentración de amidas y aminoácidos se expresa en $\mu\text{moles g}^{-1}$ PS Los resultados son la media de cuatro repeticiones seguidas de su desvío estándar.

La relación gln/glu se incrementó en respuesta al déficit hídrico en plantas cultivadas con nitrato y no presentó cambios en respuesta al déficit hídrico en plantas cultivadas con amonio

(Cuadro 9). Por otro lado, cuando se analizó el impacto del déficit hídrico sobre la relación asn/asp se observó que esta se incrementó más que la relación gln/glu en las plantas cultivadas con nitrato pero disminuyó en las cultivadas con amonio (Cuadro 9).

Como en respuesta al déficit hídrico se modificaron las relaciones asn/asp y gln/glu se realizaron aplicaciones exógenas de amidas (gln, asn) y de sus formas ácidas correspondientes (glu,asp), conjuntamente con la aplicación PEG durante 24 h como inductor del déficit hídrico. Cuando se aplicaron las amidas, las relaciones asn/asp y gln/glu se incrementaron y cuando se aplicaron los aminoácidos disminuyeron, tanto en los controles como en los estresados (Figura 27). En el tratamiento sin aplicación de aminoácidos se observó un incremento de la relación asn/asp en condición de estrés osmótico, pero no hubo cambios en la relación gln/glu como se observó en los ensayos con planta entera (Cuadro 9).

En todos los tratamientos se observó un incremento en la concentración de prolina en condición de déficit hídrico y el incremento mayor fue en el tratamiento con asparagina, en el que su concentración en promedio fue 70 % mayor respecto a los otros tratamientos (Figura 27 a).

La actividad P5CS se incrementó en respuesta a déficit hídrico sólo en el tratamiento sin aplicación aminoácidos y amidas. El agregado de cualquiera de estos compuestos produjo descenso en la actividad P5CS en condición control, así como pérdida de la inducción por el estrés osmótico (Figura 27 b).

La actividad Fd-GOGAT se incrementó en respuesta a déficit hídrico sin aplicación de amidas o aminoácidos, así como con el agregado de asparagina, tanto en el tratamiento control como en el estresado. El agregado de glutamina no tuvo efecto sobre la actividad Fd-GOGAT mientras que el agregado de glutamato o aspartato tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad Fd-GOGAT (Figura 27 c).

La actividad GS no cambió en respuesta a déficit hídrico, a excepción que cuando se aplicó glutamina, que produjo un incremento de esa actividad. La aplicación de aspartato provocó un

incremento de la actividad GS tanto en el control como en estrés osmótico, respecto al tratamiento sin aplicación (Figura 27 d).

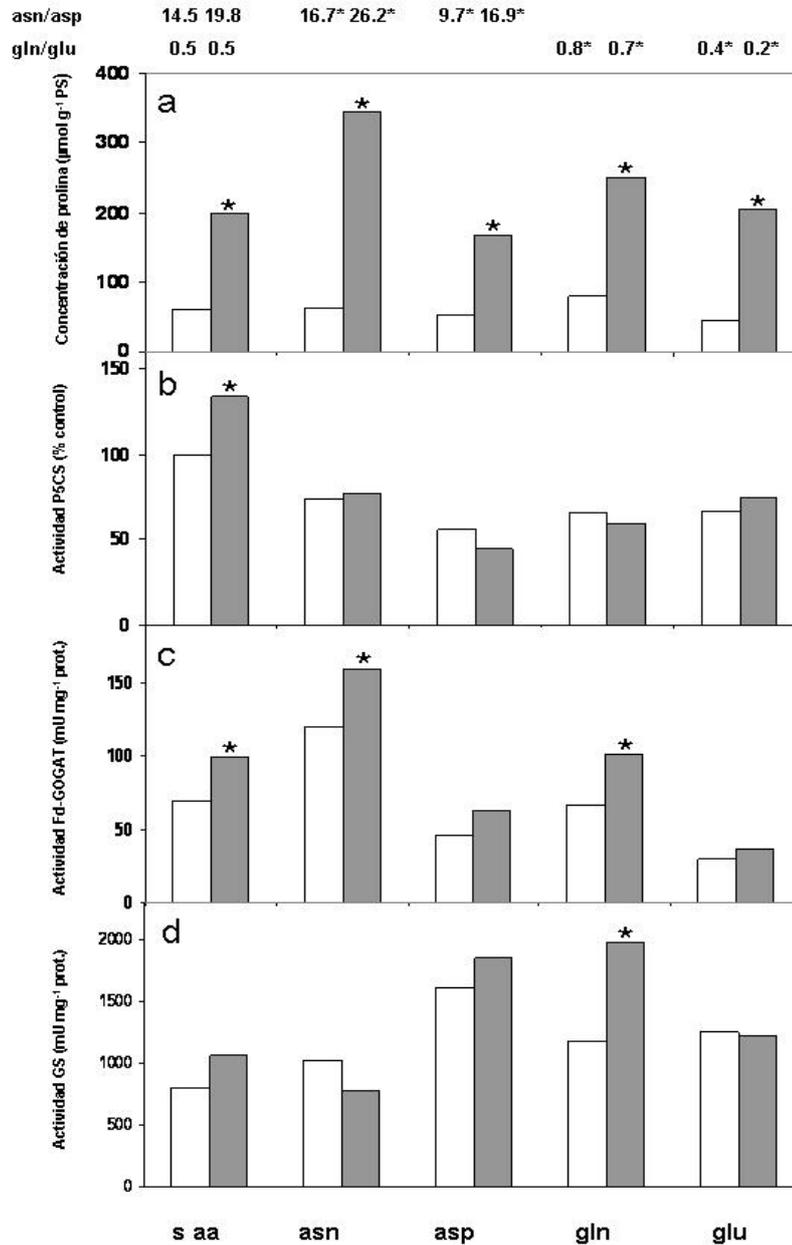


Figura 27. Concentración de prolina y actividades enzimáticas relacionadas su metabolismo según la aplicación de amidas o aminoácidos. **a.** Concentración de prolina. **b.** Actividad P5CS. **c.** Actividad Fd-GOGAT y **d.** actividad GS de hojas cosechadas. Plantas control (barras blancas) y sometidas a estrés osmótico (barras grises). Arriba de la figura se indican las relaciones asn/asp y gln/glu . La actividad P5CS se expresa como porcentaje del control sin estresar y sin aplicación de amida o aminoácido. Las actividades GS y Fd-GOGAT se expresan en $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Los resultados son media de cuatro repeticiones. * Las medias de la concentración de prolina y actividades enzimáticas entre hojas control y sometidas a déficit hídrico con PEG son significativamente diferentes al 5 % del test de Tukey.

DISCUSIÓN

1. Respuestas a déficit hídrico en ausencia de GSp

1.1 Análisis de la expresión génica

En la asimilación de amonio participan las enzimas GS y GOGAT, cuyos productos son la glutamina y el glutamato, que son utilizados para la síntesis de prolina y GABA, entre otros (Rhodes *et al.*, 1986; Shelp *et al.*, 1999). En esta Tesis se ha investigado la asimilación de amonio en condiciones de déficit hídrico en plantas de *L. japonicus*, comparando el comportamiento de un genotipo salvaje con el de un mutante deficiente en GSp, para determinar el papel de esta isoforma en la respuesta a déficit hídrico.

Una aproximación al rol de la GSp mediante el análisis de la expresión global de genes de plantas mutantes respecto a plantas salvajes mostró que el mutante presentaba diferencias en la cantidad y tipo de genes que se expresan en condición control y en respuesta a déficit hídrico. El análisis del transcriptoma mostró que en el mutante en condición de déficit hídrico un mayor número de genes variaron su expresión, y que la magnitud de esta respuesta también fue mayor en el mutante (Figura 12 a y b). Ese patrón de respuesta observado en el mutante es consecuencia de la ausencia de GSp, que se la ha relacionado con la tolerancia al estrés en plantas (Kozaki y Takeba, 1996). De hecho, las plantas que sobreexpresan GSp mostraron mayor tolerancia al estrés por luz y por sal, y en ambos casos se observó una mayor protección de los fotosistemas (Kozaki y Takeba, 1996; Hoshida *et al.*, 2000).

En el mutante un grupo de genes tuvo un comportamiento particular, mientras unos se indujeron en condición control como consecuencia de la ausencia de GSp y se reprimieron por déficit hídrico, y otros genes se reprimieron por la ausencia de GSp y se indujeron por déficit hídrico (Figura 13). Como esos genes están fuertemente regulados por déficit hídrico en el mutante, se puede proponer que la proteína GSp es crucial para la maquinaria de respuesta al estrés en plantas. Ese grupo de genes (Figura 13) está relacionado con la señalización de estrés biótico y abiótico, con

enzimas que participan en el metabolismo de aminoácidos, con la síntesis de transportadores de aminoácidos, así como con el marcaje y degradación de proteínas (Figura 13).

El análisis de expresión global de genes indica que el mutante está sometido a un mayor nivel de estrés, porque los genes relacionados a la defensa antioxidante tienen mayor nivel de expresión que en el salvaje (Cuadro 7 y Figura 14), incluso en ausencia de déficit hídrico (Figura 13). En ambos genotipos en condición de déficit hídrico se evidenció incremento de la concentración de TBARS (Figura 7), incremento que fue mayor en el mutante. También el transcriptoma de la planta mutante puso en evidencia que hubo activación de genes relacionados a la degradación de lípidos y a la represión de su síntesis, así como una diferente modulación de genes del metabolismo secundario (Figura 14).

Las diferencias encontradas en la expresión de genes entre ambos genotipos también se reflejaron en el comportamiento de las plantas frente al déficit hídrico. Cuando *Ljgln2-2* y el salvaje se sometieron al déficit hídrico, el mutante no fue capaz de recuperar su estatus hídrico, probablemente debido al mayor daño oxidativo de las membranas (Figura 7 y 8). Además, las hojas jóvenes del mutante tampoco recuperaron su estatus hídrico después de 5 horas de sequía inducida por exposición al aire (Figura 9).

Cuando se analizó la expresión de los genes de la asimilación de amonio utilizando este tipo de aproximaciones se observó que la expresión de éstos fue diferente en el salvaje y en el mutante (Cuadro 6). En el salvaje en condición de déficit hídrico, los transcriptos GS y Fd-GOGAT no se incrementaron (Figura 5 y Cuadro 6), lo que permite sugerir que los niveles basales de expresión o actividad de estas enzimas serían suficientes para mantener la síntesis de prolina en condición de déficit hídrico. Wingler *et al.* (1999), en cebada, encontraron que el contenido de GSp no varió en condición de déficit hídrico, como tampoco encontraron incrementos de esa isoforma en la misma condición Bauer *et al.* (1997) en plantas de tomate, en las que se incrementó la GSc.

El transcriptoma del mutante en condición de déficit hídrico puso en evidencia un incremento en la expresión de los genes de las dos isoformas de GSc y la disminución de la expresión de los genes Fd-GOGAT y GSp (Cuadro 6). Sin embargo no se observaron cambios en la actividad ni

contenido de las proteínas GSc y Fd-GOGAT en el mutante en condición control ni de déficit hídrico (Figura 5). Así, en *Ljgln2-2*, la transcripción de los genes GSc y Fd-GOGAT no se relacionó con los cambios de actividad enzimática, al menos en estos estados iniciales de imposición del déficit hídrico.

En cebada, se ha demostrado que la actividad y cantidad de proteína Fd-GOGAT es estable en oscuridad (Pajuelo *et al.*, 1997). En el mutante *Ljgln2-2* los contenidos de proteína Fd-GOGAT detectados podrían deberse a su estabilidad en oscuridad y no relacionarse con los niveles de expresión (Figura 5). Una interpretación alternativa a la diferencia entre cantidad de proteína Fd-GOGAT y cantidad de RNAm es el hecho de que los incrementos de éste no se relacionan necesariamente con incrementos en la cantidad y/o actividad de las enzimas correspondientes (Gygi *et al.*, 1999; Summer *et al.*, 2003). En este sentido, también se ha demostrado que la velocidad de traducción forma parte del mecanismo adaptativo de respuesta a estrés (Kawaguchi *et al.*, 2003; Branco-Price *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, estos autores demostraron que en condiciones de estrés por hipoxia disminuye el RNAm del gen de la alcohol deshidrogenasa, pero no varió la cantidad de esa proteína debido al aumento de la velocidad de traducción ese RNAm.

1.2 Acumulación de prolina y GABA

Como se ha mencionado, una respuesta común al estrés abiótico en plantas es la acumulación de prolina. Dado que la prolina es necesaria para la síntesis de proteínas, mutantes alterados en genes de su metabolismo presentan generalmente fenotipos alterados en forma severa, aún en ausencia de estrés abiótico (Székely *et al.* 2008). Sin embargo, el mutante *Ljgln2-2* de *L. japonicus*, deficiente en GSp, el cuál acumula menos prolina en condición de déficit hídrico respecto al salvaje, aunque no en condición control (Figura 6) fue una herramienta adecuada para estudiar la función de esa isoforma en las respuestas a ese tipo de estrés .

La GSp aporta glutamina, molécula precursora de la síntesis de prolina a nivel del plastos, mientras que la GSc es responsable del mismo aporte en el citoplasma (Szabados y Savouré, 2010). La menor cantidad de prolina en el mutante en condición de déficit hídrico (Figura 6) permite sugerir que la prolina acumulada en esa condición depende en un 40% de la GSp y en un 60% de la GSc. El

mutante *Ljgln2-2* no tiene alterada la cantidad ni actividad de la proteína GSc (Orea *et al.*, 2002), y dado que la vía OAT, no contribuye con la síntesis de prolina, su acumulación deriva de la GSc (Figura 5). Brugière *et al.* (1999) encontraron que en plantas de tabaco sometidas a estrés salino el 50% de la acumulación de prolina depende de la GSc. En *Arabidopsis*, la biosíntesis de prolina en condiciones normales es citoplasmática, mientras que la síntesis inducida por el déficit hídrico es cloroplástica (Székely *et al.*, 2008).

Sin embargo la concentración de glutamato, glutamina y ornitina, precursores de la síntesis de prolina, no varió en ambos genotipos en condición control ni como consecuencia del déficit hídrico (Figura 10 y 11), por lo que la menor acumulación de prolina en el mutante no se debería a la deficiencia de precursores.

El análisis del transcriptoma evidenció que en el mutante hubo represión de genes que codifican para componentes estructurales del aparato fotosintético y del metabolismo fotosintético (Figura 14 y Cuadro 8), lo que puede tener consecuencias a nivel del metabolismo del cloroplasto. La ausencia de GSp se relacionó con una mayor represión de esos genes en el mutante, lo que indicaría un mayor nivel de estrés en *Ljgln2-2*. La ausencia de GSp podría conducir a la disminución de la síntesis de prolina cloroplástica, que explicaría la menor concentración de prolina encontrada en el mutante. De todas formas, también puede plantearse que la represión de genes relacionados al aparato fotosintético conduciría a un descenso de la disponibilidad de NADPH. En este sentido cuando se aplicó a *L. corniculatus* un inhibidor del transporte de electrones fotosintéticos, y por lo tanto se inhibió la producción de NADPH las plantas tratadas con el inhibidor produjeron la mitad de prolina que las no tratadas, diferencia que se atribuyó a la menor disponibilidad de poder reductor fotosintético (Díaz *et al.*, 2005b). De todas formas, la relación F_v/F_m así como la eficiencia del fotosistema II, considerados parámetros indicadores de estrés en algunas especies (Rohacek y Bartak, 1999), no variaron en la condición de sequía en *Ljgln2-2* ni en el salvaje (Márquez *et al.*, 2008). Tampoco cambiaron su expresión genes de las proteínas D1 y D2 en ninguno de los dos genotipos en condición de déficit hídrico, lo que confirma los resultados obtenidos por Sainz *et al.* (2010) en *L. japonicus*. A diferencia de lo encontrados en *L. japonicus*, en plantas de arroz que sobreexpresaban la GSp, Hoshida *et al.*, (2000) encontraron que aumentó el rendimiento cuántico de

las plantas transgénicas respecto al salvaje, lo que se tradujo en una mejor performance de la fotosíntesis y mayor tolerancia a la salinidad.

En el mutante, conjuntamente con la menor cantidad de prolina acumulada, se encontró mayor daño oxidativo (Figura 7). El significado biológico de la acumulación de prolina durante el estrés abiótico es todavía cuestión de controversias, y se le atribuyen roles de osmolito, chaperona, fuente de carbono y nitrógeno y regulador del pH (Verbruggen y Hermans, 2008). Además, la prolina proveería de protección contra el daño oxidativo generado por el hidroxilo u oxígeno singulete de dos maneras, directamente reaccionando con ROS, e indirectamente consumiendo el NADPH durante su síntesis (Verbruggen y Hermans, 2008). Los mayores valores de TBARS detectados en el mutante (Figura 7) que acumuló menos prolina explicaría el papel protector de esta molécula como antioxidante. En este sentido, en plantas de tabaco también se le asignó a la prolina el papel de capturadora de ROS (Hong *et al.*, 2000) y en plantas transgénicas de trigo que acumularon más prolina se encontró que presentaban menor daño oxidativo (Vendruscolo *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la aplicación de prolina exógena reduce la peroxidación lipídica en plantas tratadas con metales pesados (Mehta y Gaur, 1999). Actualmente se está prestando mayor atención a la similitud de funciones entre prolina y GABA (Szábados y Saviouré 2010, Fait *et al.*, 2007). El índice de captura del radical hidroxilo del GABA es mayor al de otras moléculas como polioles y aminoácidos (Shelp *et al.*, 1999), incluso mayor que el de prolina (Fait *et al.*, 2007). El hecho de que *Ljgln2-2* presente menor concentración de prolina y de GABA que el salvaje, conjuntamente con mayor daño oxidativo, apoyan la hipótesis sobre el rol de estas molécula como capturadoras de ROS.

En plantas transgénicas de tabaco, que expresan una construcción de RNA antisentido de la GSc, se encontró que las hojas maduras que acumulaban menos prolina se deshidrataban más rápido que las salvajes como consecuencia del estrés salino (Brugière *et al.*, 1999). Por otro lado, plantas de arroz que sobrepresan el gen de la GSp presentaron menor daño oxidativo y mayor tolerancia a la salinidad (Hoshida *et al.*, 2000).

El análisis de las respuestas transcripcionales de los genes directamente relacionados al metabolismo de la prolina mostró diferencias marcadas entre el salvaje y el mutante (Figura 15).

Mientras que en el mutante se indujeron las dos vías de síntesis de prolina a partir del glutamato y de la ornitina, en el salvaje sólo se indujo la vía a partir del glutamato. Es interesante el hecho de que la expresión de los genes *P5CS2* y *P5CS3*, que codifican para enzimas del inicio de la vía de síntesis de prolina, fue tres veces mayor en el mutante que en el salvaje. El hecho de que el mutante carente de GSp muestre baja concentración de prolina (Figura 6) y sobreexpresión de genes de su síntesis (Figura 15) permite proponer que la sobreexpresión actúa como mecanismo compensatorio. Además, el incremento de la expresión de esos genes indicaría que éste es la principal forma de regulación de la vía, siendo menor la incidencia de la disponibilidad de los precursores glutamato y ornitina (Figura 10 y 11). En este sentido, en un mutante de *Arabidopsis* en el gen de la escualeno epoxidasa, que participa en la síntesis de esteroides, produce menos esteroides y aumenta la actividad de la hidroximetilglutaril CoA reductasa (Posé *et al.*, 2009), quizá también como un mecanismo compensatorio.

En cuanto a la vía de oxidación de la prolina, el gen de *P5CDH* tiene una expresión basal que se induce por prolina (Deuschle *et al.*, 2001). Nuestros resultados mostraron que el gen de *P5CDH* se indujo en condición de déficit hídrico en el salvaje pero no en el mutante (Figura 15), lo que puede tener al menos dos explicaciones: i. como el gen de la *P5CDH* se induce por prolina, la menor concentración de ésta en el mutante sería la causa de que ese gen no se induzca, y ii. como la expresión de un gen resulta del balance entre la síntesis y la degradación del RNAm, y el mutante tuvo mayor estrés oxidativo, el menor nivel de expresión podría deberse a mayor degradación del RNAm.

Es posible que el patrón de expresión anormal de los genes del metabolismo de la prolina en el mutante en condiciones de déficit hídrico sea consecuencia de una alteración en la regulación de la vía de síntesis (Majumder *et al.*, 2010). El suministro de prolina exógena a *Arabidopsis* mostró que ésta regulaba la expresión de genes que participan en su metabolismo (Deuschle *et al.*, 2001). También las diferencias en el patrón de expresión de genes del mutante y el salvaje pueden deberse a la concentración de intermediarios como el P5C, que regula la expresión de genes en condición de estrés osmótico (Iyer y Caplan, 1998) e induce estrés oxidativo (Szabados y Savouré, 2010).

Si bien son numerosos los trabajos sobre perfiles metabólicos realizados en condición de estrés salino, extensamente revisado por Shulaev *et al.* (2008), incluso con la leguminosa modelo *L. japonicus* (Sánchez *et al.*, 2008), son pocos los que se han realizado en condición de déficit hídrico. En las plantas salvajes en condición de déficit hídrico, conjuntamente con la concentración de prolina se incrementó la hidroxiprolina y el piroglutamato, ambos resultantes de la reacción de la prolina con ROS (Figura 10). En *Ljgln2-2* la menor concentración de prolina respecto al salvaje se acompañó de menor cantidad de hidroxiprolina, aunque la concentración de piroglutamato no varió. Sin embargo, en *L. japonicus* en estrés salino Sánchez *et al.* (2008) encontraron que la concentración de hidroxiprolina disminuye. Las diferencias encontradas en la concentración de hidroxiprolina y piroglutamato muestran que la deficiencia de GSp no sólo afecta la síntesis de prolina, sino también a la de metabolitos derivados de ella.

Otra vía que debe ser considerada cuando se analiza la acumulación de prolina en respuesta al déficit hídrico es la vía de síntesis dependiente de ornitina. Funck *et al.* (2008) proponen que la OAT participa en el catabolismo de la prolina, pero no en su biosíntesis, dado que en *Arabidopsis* mutantes en el gen *OAT* no mostraron alteraciones en la síntesis de prolina. Nuestros resultados indican que los genes de la arginasa y *OAT* se expresaron menos en el salvaje que en el mutante (Figura 15), pero la concentración de prolina en éste fue menor. En el salvaje el gen de la arginasa se indujo ligeramente mientras que el *OAT* no se indujo, aunque la concentración de prolina fue mayor que en el mutante. Estos resultados indicarían que la vía *OAT* no contribuiría de manera relevante a la acumulación de prolina en *L. japonicus*. Es posible que esta vía tenga un rol biosintético sólo en condiciones de estrés oxidativo, tales como en las que se encuentra el mutante (Figura 7). Consistente con esta idea, en plantas de *B. napus*, se indujo el gen *OAT* sólo después de un prolongado y severo estrés osmótico - oxidativo (Xue *et al.*, 2009). De todas formas el gen de la arginasa se expresó en el salvaje, lo que permite proponer que la vía de síntesis de prolina a partir de ornitina podría estar regulada a nivel del gen de la arginasa y no del de la *OAT*. Zhang *et al.* (1995) encontraron en frutos de tomate dos genes de la arginasa que se inducen en estrés por frío para proveer de sustratos para la síntesis de prolina y de poliaminas.

En el mutante *Ljgln2-2* la regulación opuesta de la vía biosintética arginasa/OAT y la vía degradativa probablemente evite un ciclo fútil, teniendo en cuenta que todas las enzimas involucradas en estas vías están localizadas en la mitocondria (Fuck *et al.*, 2008).

Al igual que la prolina, el GABA ha sido propuesto como un osmolito compatible (Smirnof y Cumbes, 1989) si bien su función tampoco ha sido aclarada. En el salvaje la condición de déficit hídrico incrementó la concentración de GABA, analizada por metabolómica y confirmada por HPLC (Figura 10 y 11). Sin embargo el metaboloma del mutante mostró menor concentración de GABA, pero el análisis por HPLC confirmó que no hay diferencias en su concentración. Sin embargo, el nivel de expresión del gen de la glutamato descarboxilasa (*GDC*) fue el doble en el mutante respecto al salvaje (Cuadro 6). Al igual que lo que ocurre en el mutante *Ljgln2-2* donde hay mayor expresión de genes del metabolismo de prolina, la sobreexpresión de *GDC* puede actuar como mecanismo compensatorio frente al descenso de la concentración de GABA. Es evidente que la respuesta del mutante a déficit hídrico en relación a la acumulación de estas moléculas y sobreexpresión de genes que participan en su síntesis, tienen un patrón común.

1.3 Actividad del ciclo C2

El análisis del transcriptoma del mutante mostró cambios significativos en la expresión de genes del ciclo C2 y genes codifican para transaminasas que proveen de sustratos a ese ciclo, entre ellos los genes *AspAT*, *AAT*, *GO* e *HPR* (Cuadro 6). Dado los cambios observados en el transcriptoma como consecuencia de la deficiencia del GSp y del déficit hídrico pareció necesario evaluar actividades las enzimas.

Independientemente de la condición hídrica, la ausencia de GSp afectó la actividad de enzimas del ciclo C2 (Figuras 18 y 20). En el mutante no se detectó actividad AsGAT, mientras que la actividad SGAT fue menor que en el salvaje y descendió en respuesta al déficit hídrico (Figura 18). En cebada se ha propuesto que las actividades SGAT y AsGAT serían resultado de la misma enzima (Murray *et al.*, 1987), pero en *L. japonicus* no se detectó actividad AsGAT pero si actividad SGAT, lo que indicaría que en *L. japonicus* serían proteínas diferentes. El hecho que no se haya detectado actividad AsGAT en el mutante (Figura 18) deja en evidencia que la GSp es necesaria

para la actividad de esta enzima. En *Arabidopsis* Jamai *et al.*, (2010) mostraron que la proteína Fd-GOGAT interactúa físicamente con la serina hidroximetiltransferasa y que esa interacción es necesaria para su actividad. En este sentido, sería necesaria la interacción GSp – AsGAT para que esta última tenga actividad. La actividad GGAT fue mayor en el mutante, lo que puede compensar la ausencia de AsGAT y la disminución de SGAT (Figura 18). En el salvaje, la actividad SGAT fue mayor y disminuyó significativamente en la condición de déficit hídrico. Estos resultados difieren de los encontrados en cebada por Wingler *et al.* (1999), donde la actividad SGAT no cambió en la condición de déficit hídrico. La SGAT juega un rol importante al controlar el flujo de carbono a través de la glicina (Somerville y Ogren, 1980), por eso GGAT y SGAT podrían funcionar cooperativamente en la producción de ese aminoácido (Igarashi *et al.*, 2006). Ha quedado demostrado que la glicina derivada del ciclo C2 es necesaria para la síntesis de glutatona, porque su aplicación a hojas en oscuridad, cuando el ciclo C2 no es operativo, llevó a incrementos de glutatona (Noctor *et al.*, 2006).

En el salvaje, la suma de las actividades de las transaminasas GGAT, SGAT y AsGAT responsables de la producción de glicina disminuyó en condición de déficit hídrico como también disminuyó la concentración de glicina (Figura 19), mientras que la concentración de serina no varió. Sin embargo Martino *et al.* (1999) comunicaron que en espinaca en condiciones de estrés salino hay incremento de la concentración de serina y glicina. Los resultados del transcriptoma mostraron que el nivel de represión del gen de la GlyDC fue mayor en el mutante que en el salvaje, lo que explicaría que no haya variado la concentración de glicina en ese genotipo.

En el salvaje, la actividad GO se incrementó en condición de déficit hídrico mientras en el mutante disminuyó, lo que indica que en esta situación la enzima se ve afectada por la ausencia de GSp o productos derivados de su actividad. También Fedina *et al.* (1994) observaron incremento de la actividad GO en *Pisum sativum* en condición de estrés por sal. El análisis del transcriptoma (Cuadro 6) mostró que en el salvaje de tres genes de GO, dos no cambiaron su expresión (GO2 y GO3) y uno se incrementó (GO1), mientras que en el mutante dos se incrementaron (GO1 y GO3) y otro disminuyó su expresión (GO2).

1.4 Metabolismo de la asparragina

Datos del transcriptoma (Figura 10), conjuntamente con resultados obtenidos por García-Calderón (2009) en relación al metabolismo del carbono, sugieren que la GSp puede estar involucrada en la regulación del balance C:N en *L. japonicus* en condición de déficit hídrico. Además, junto a la GSc, de su actividad depende el abastecimiento de metabolitos como la asparragina, cuya concentración se incrementó en condición de déficit hídrico en los dos genotipos (Figura 10 y 11), al igual que lo observado en *L. corniculatus* y *L. uliginosus* (Díaz *et al.*, 2005a). Sin embargo, la concentración de asparragina fue la misma en el salvaje y en el mutante (Figura 11) lo que muestra que su síntesis depende mayormente de GSc. El incremento de la concentración de asparragina en condición de déficit hídrico es una respuesta común en plantas (Chian y Dandekar, 1995; Gilbert *et al.*, 1998) y es necesaria para el transporte de nitrógeno entre los diferentes órganos y tejidos (Gaufichon *et al.*, 2010).

Las enzimas AS y asparraginasa son las responsables del mantenimiento del *pool* de asparragina. En plantas de trigo y girasol se encontró que los genes de la AS se inducen por estrés osmótico (Wang *et al.*, 2005; Herrera-Rodríguez *et al.*, 2007) y es una respuesta en general aceptada para condiciones de estrés osmótico (Gaufichón *et al.*, 2010). Por otro lado en plantas de soja se encontró que se induce el gen de la asparraginasa por estrés térmico (Cho *et al.*, 2007). El transcriptoma muestra que tanto en el salvaje como en el mutante el gen de la asparraginasa se induce en la condición de déficit hídrico, mientras que la AS se induce sólo en el mutante (Cuadro 6) lo que indicaría un mayor nivel de estrés en el mutante que en el salvaje.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la transcriptómica, proteómica y metabolómica no tienen necesariamente que acompañarse con los cambios del entramado metabólico en condiciones de estrés abiótico (Kwang Kim *et al.*, 2007). Por otra parte, los metabolitos se localizan en diferentes compartimentos celulares y además pueden ser transportados a o desde otros tejidos y órganos, lo que hace que la concentración no sea necesariamente el reflejo de la expresión de los genes ni de la actividad de las enzimas.

2. Efecto de la fuente de nitrógeno en la asimilación de amonio y metabolismo de la prolina

Para establecer si en condición de déficit hídrico la nutrición nitrogenada determina la vía de síntesis de prolina se cultivaron plantas de *L. japonicus* con amonio o con nitrato como únicas fuentes de nitrógeno. En ambos casos el déficit hídrico indujo la síntesis de prolina en hojas, pero la concentración de ésta fue mayor cuando las plantas se cultivaron con amonio. A su vez, tanto en hojas de plantas cultivadas con nitrato como cultivadas con amonio, no se observaron cambios en la concentración de aminoácidos y proteínas totales (Cuadro 5). La disminución de la concentración de glutamato en plantas cultivadas con nitrato puede explicar el aumento de la concentración de prolina en esas plantas en condición de déficit hídrico. Wingler *et al.* (1999) propusieron que hay un reciclaje de compuestos nitrogenados hacia la síntesis de prolina. En estrés salino Rhodes *et al.* (1999) y Sánchez *et al.* (2008) encontraron descensos de la concentración de glutamato e incremento de la concentración de prolina. De todas formas la disminución de la concentración de glutamato en las plantas cultivadas con nitrato, no es suficiente para explicar el aumento en la concentración de prolina en respuesta al déficit hídrico. Para esto son necesarios esqueletos carbonados, que derivan de la movilización de glúcidos de reserva, dado que la asimilación de CO₂ se encuentra inhibida en condiciones de déficit hídrico (Smimoff, 1993), y para la síntesis de glutamato se obtendría el grupo amino por transaminaciones (Chiang y Dandekar, 1995).

A diferencia de lo que ocurrió en plantas crecidas con nitrato, la concentración de glutamato en plantas crecidas con amonio no varió, aunque se incrementó la concentración de prolina (Cuadro 9). Esto permite proponer una explicación alternativa, basada en que el glutamato que se consume en la síntesis de prolina puede provenir de la Fd-GOGAT, así como de la asimilación de amonio mediada por la GDH aminante. En plantas crecidas con amonio, la actividad Fd-GOGAT, si bien no respondió al déficit hídrico, fue tres veces mayor a la encontrada en plantas cultivadas con nitrato (Figura 23) y la actividad GDH aminante se incrementó cuando se impuso el déficit hídrico (Figura 24).

En las plantas de *L. japonicus* que se cultivaron con nitrato, la actividad Fd-GOGAT se incrementó como consecuencia del déficit hídrico (Figura 23), pero el nivel de expresión disminuyó (Figura 25). El incremento de la actividad Fd-GOGAT fue observado en distintas especies en

respuesta a diferentes tipos de estrés (Berteli *et al.*, 1995; Borsani *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2005b), y podría asegurar el mantenimiento del suministro de glutamato. Contrariamente a lo encontrado en *L. japonicus*, en *Phaseolus vulgaris* en condiciones de déficit hídrico (Becker *et al.*, 1986) y maíz (Sengar *et al.*, 1995) disminuyó la actividad de la Fd-GOGAT. Sin embargo, nuestros resultados en relación al nivel de expresión del gen de la Fd-GOGAT coinciden con los encontrados por Popova *et al.* (2002) en *M. crystallinum* sometido a estrés salino, en el que disminuyó el nivel de transcritos de la Fd-GOGAT. Estos resultados ponen en evidencia que existen diferentes mecanismos de regulación de la Fd-GOGAT en distintas especies de plantas en condiciones de estrés osmótico (Srivastava *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2005).

La actividad aminante de la GDH y el nivel de expresión del gen *GDH2* se incrementó en respuesta al déficit hídrico en plantas de *L. japonicus* cultivadas con amonio (Figura 24 y 25). También se observó en plantas de tabaco y plántulas de trigo sometidas a estrés por sal un incremento de la actividad GDH aminante (Skopelitis *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). De esta forma el incremento de esa actividad y la mayor actividad Fd-GOGAT (Figuras 23 y 24) serían responsables del aporte de glutamato necesario para la acumulación de prolina observada en las plantas cultivadas con amonio.

En plantas cultivadas con amonio o con nitrato la actividad GS no varió como consecuencia del déficit hídrico (Figura 23). Tampoco varió el nivel de expresión de los genes *GS1-1* y *GS1-2*, pero descendió la expresión de los genes *GS1-3* y *GS2* (Figura 25). Los resultados publicados en relación a la respuesta de la actividad GS en condiciones de estrés osmótico no permiten generalizar un patrón, porque la actividad y expresión varía según la especie estudiada (Bernard y Habash, 2009). Debido a que la síntesis de prolina requiere glutamato, en las plantas cultivadas con amonio éste provendría del ciclo GS/GOGAT y de la GDH aminante. El glutamato aportado por estas vías sería utilizado por la P5CS, primera enzima en la vía de síntesis de prolina a partir de glutamato. En las plantas cultivadas con amonio encontramos que la actividad P5CS fue mayor que en las cultivadas con nitrato en condición control (Figura 22), y con ambas fuentes de nitrógeno hubo una clara respuesta a la condición de déficit hídrico. El análisis de expresión mostró que los genes *P5CS2* y *P5CS3* se inducen con ambas fuentes nitrogenadas. A su vez el aumento de transcritos *P5CS* en

plantas en condiciones de estrés, respondería a la necesidad de metabolizar el glutamato sintetizado por la Fd-GOGAT (Rhodes *et al.*, 1999) y por la GDH aminante (Skopelitis *et al.*, 2006).

En *L. japonicus* en condición de déficit hídrico no varió la actividad OAT ni la expresión del gen que la codifica (Figuras 22 y 26), lo que indica que esta enzima no contribuye en la síntesis y acumulación de prolina. Estos resultados se confirmaron porque la aplicación de AOA no modificó la concentración de prolina en respuesta a estrés osmótico ni en hojas de plantas cultivadas con nitrato ni en las cultivadas con amonio. Estos resultados son diferentes a los encontrados en *L. corniculatus*, donde la actividad OAT se incrementó en respuesta al déficit hídrico contribuyendo así a la acumulación de prolina (Díaz *et al.*, 2005 a). Sin embargo, el incremento de la expresión de arginasa y OAT que se encontró en el mutante *Ljgln2-2* que acumula menos prolina, podría indicar un mecanismo compensatorio similar a lo que ocurre con los genes P5CS.

En plantas cultivadas con nitrato, el descenso de la concentración de glutamato conjuntamente con el incremento en la actividad Fd-GOGAT y P5CS, serían responsables de la acumulación de prolina. En plantas cultivadas con amonio, la alta actividad Fd-GOGAT y el incremento de la actividad GDH aminante y P5CS se relacionó con la acumulación de prolina, que fue mayor a la encontrada en plantas cultivadas con nitrato. La actividad de estas enzimas, más que la disponibilidad de precursores para su síntesis, explicaría la mayor acumulación de prolina en las plantas cultivadas con amonio. En esta tesis se dan evidencias adicionales sobre el rol de la GDH aminante en condiciones de déficit hídrico, particularmente en plantas cultivadas con amonio.

3. Acumulación de prolina en respuesta a la aplicación de asparragina

En *L. japonicus* cultivado con nitrato en condición de déficit hídrico, se observó un incremento de la concentración de prolina y asparragina (Figura 21 y Cuadro 9). El incremento de la concentración de prolina y asparragina en condición de estrés osmótico ya había sido observado en *arabidopsis*, *B. napus* y *Coleus blumei* (Chiang y Dandekar, 1995; Gilbert *et al.*, 1998). Cuando se aplicó asparragina a hojas de *L. japonicus* cosechadas y sometidas a estrés osmótico inducido por PEG, se obtuvo un incremento en la concentración de prolina del 70% respecto al control sin

aplicación. También se aplicaron otros aminoácidos como el aspartato, glutamato y glutamina que no tuvieron efecto sobre su acumulación de prolina en condición de déficit hídrico.

La actividad Fd-GOGAT se incrementó en respuesta a la aplicación de asparragina en la condición control y en la condición de estrés, por lo que la asparragina tendría un efecto inductor sobre la actividad de la enzima. Por otro lado se encontró que el agregado de glutamato o aspartato causó una disminución de su actividad, coincidente con lo comunicado por Ávila *et al.* (1987) en plantas de tomate. Parece evidente que el resultado de la aplicación de aminoácidos sobre la actividad Fd-GOGAT es diferente según la especie, como lo proponen Srivastava *et al.*, (2002).

CONCLUSIONES

En el mutante carente de GSp el número y el nivel de expresión de genes fue mayor que en el salvaje, lo que indica la participación de esta isoforma en la respuesta a déficit hídrico.

La ausencia de GSp, en condición control, generó un patrón de inducción-represión de genes contrario en la condición de déficit hídrico.

La ausencia de GSp en condición de déficit hídrico determina variaciones en el nivel de expresión de los genes de asimilación de amonio (GSc, Fd-GOGAT y GDH).

Si bien en el mutante los genes de la defensa antioxidante enzimática están inducidos en mayor número y nivel esta no es suficiente para la protección contra el daño oxidativo.

La proteína GSp es necesaria para la actividad de la AsGAT, dado que en el mutante deficiente en GSp no se detectó actividad de esta enzima, independientemente del estatus hídrico.

La mayor expresión del gen *GDC*, implicado en la biosíntesis de GABA, puede ser interpretada como un mecanismo compensatorio frente a la menor acumulación de este compuesto.

La ausencia de GSp en condición de déficit hídrico produce incrementos de los transcritos de enzimas de la biosíntesis de prolina lo que puede interpretarse como una respuesta de las plantas para incrementar la concentración de prolina

La menor acumulación de prolina en el mutante puede ser consecuencia, además de la ausencia de GSp a limitaciones en el poder reductor dada la represión de los genes del aparato fotosintético.

En *L. japonicus* cultivado con amonio la GDH puede tener un papel complementario a la ruta GS-GOGAT para proveer del glutamato necesario para la síntesis de prolina.

La aplicación de asparagina exógena favorece la acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico por estimulación de la actividad Fd-GOGAT.

BIBLIOGRAFÍA

- Antolín M, Yoller J and Sánchez-Díaz M. 1995. Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. *Plant Sci.* **107**:159-165.
- Armengaud P, Thiery L, Buhot N, Grenier-De M G and Saviouré A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiol. Plant.* **120**:442-450.
- Avila C, Botella J, Canovas F, Nuñez de Castro I and Valpuesta V. 1987. Different characteristics of the two glutamate synthases in green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **85**:1036-1039.
- Bauer D, Biehler K, Fock H, Carrayol E, Hirel B, Miggie A, Becker T. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol. Plant.* **99**:241-247.
- Becker T, Hoppe M and Fock H. 1986. Evidence for the participation of dissimilatory process in maintaining high carbon fluxes through the photosynthetic carbon reduction and oxidation cycles in water stressed *Phaseolus* leaves. *Photosynthetica* **20**:153-157.
- Bernard S and Habash D. 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol.* **182**:608-620.
- Berteli F, Corrales E, Guerrero C, Ariza M, Pliego F and Valpuesta V. 1995. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiol. Plant.* **93**:259-264.
- Betsche T. 1983. Aminotransferase from alanine and glutamate to glycine and serine during photorespiration in oat leaves. *Plant Physiol.* **71**:961-965.
- Betti M, Arcondéguy T, Márquez A. 2006. Molecular analysis of two mutants from *Lotus japonicus* deficient in plastidic glutamine synthetase: functional properties of purified GLN2 enzymes. *Planta* **224**:1068-1079.
- Blackwell R, Murray A and Lea P. 1987. The isolation and characterization of photorespiratory mutants of barley and pea. In: *Progress in Photosynthesis Research* (J. Biggins, Ed.) **3**:625-628
- Blackwell R, Murray A, Lea P, Kendall A, Hall N, Turner J and Wallsgrove R. 1988. The value of mutants unable to carry out photorespiration. *Photosynth. Res.* **16**:155-176.
- Bogges S, Aspinall D and Paleg L. 1976. Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust. J. Plan Physiol* **3**:513-525.
- Bonhert H and Sheveleva E. 1998. Plant stress adaptations-making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**:267-274.
- Bonhert H, Nelson D and Jensen R. 1995. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* **7**:1099-1111.

- Borsani O, Díaz P and Monza J. 1999. Proline is involved in water stress responses of *Lotus corniculatus* nitrogen fixing and nitrate fed plants. *J. Plant Physiol.* **155**:269-273.
- Borsani O, Zhu J, Verslues P, Sunkar R and Zhu J. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* **123**:1279-1291
- Bouche N and Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite?. *Trends plant Sci.* **9**:110-115
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira R and Bailey-Serres J. 2005. Genome wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann. Bot.* **96**:647-660.
- Bray E, Bailey-Serres J and Weretilnyk E. 2000 Responses to abiotic stresses. In: Buchanan B, Gruissem W. and Jones R. (Eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists USA pp.1158-1203.
- Bray E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**:1035-1040.
- Bray E. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**:48-54.
- Bray E. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann. Bot.* **89**:803-811.
- Brugiere N, Dubois F, Limami A, Lelandais M, Roux Y, Sangwan R and Hirel B. 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* **11**:1995-2011.
- Charest C and Phan C. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): Properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol. Plant.* **80**:159-168.
- Chiang H and Dandekar M. 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environment.* **18**:1280-1290.
- Cho C, Lee H, chung E, Kim K, Heo J, Kim j, Chung J, Ma Y, Fukui K, Lee D, Kim D, Chung Y and Lee J. 2007. Molecular characterization of the soybean L-apsaraginase gene induced by low temperature stress. *Mol. Cells* **23**:280-286.
- Coruzzi G and Last R. 2000: Amino acids. In: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. (Buchanan et al Eds). 358-410.
- Coruzzi G. 2003. Primary-N assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*, American Society of Plant Biologists.

- Delauney A, Hu C, Kavi Kishor P and Verma D. 1993. Cloning of ornithine aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**:18673-18678.
- Desbrosses G, Kopka J and Udvardi M. 2005. *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interaction. *Plant Physiol.* **137**:1302-1318.
- Deuschle K, Funk D, Hellman H, Däschner K, Binder S and Frommer W. 2001. A nuclear gene encoding mitochondrial pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J.* **27**:345-355
- Díaz P, Betti M, Sánchez D, Udvardi M, Monza J and Márquez A. 2010. Deficiency in Plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *New Phytol.* **188**:1001-1013
- Díaz P, Borsani O and Valpuesta V. 2004. Moléculas nitrogenadas en respuesta esters abiótico. En: El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Monza y Márquez (eds). Editorial Almuzara pp139-154.
- Díaz P, Borsani O, Márquez A and Monza J. 2005a. Nitrogen metabolism in relation to drought stress responses in cultivated and model *Lotus* species. *Lotus Newsletter* **35**:83-92.
- Díaz P, Borsani O, Márquez A and Monza J. 2005a. Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. *Plant Growth Regul.* **46**:223-232.
- Dubois F, Terce-Laforgue T, Gonzales-Moro M, Estavillo M, Sangwan R, Gallais A and Hirel, B. 2003. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol. Biochem.* **41**:565-576.
- Edwards J, Walker E and Coruzzi G. 1990. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87**:3459-3463.
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G and Fernie A. 2007. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Cell* **13**:1360-1385.
- Fedina I, Tsonev T and Guleva E. 1994. ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. *J. Plant Physiol.* **143**:245-249.
- Feraud M, Masclaux-Daubresse C, Ferrario-Mery S, Pageau K, Lelandais M, Ziegler C, Leboeuf E, Jougllet T, Viret L, Spampinato A, Paganelli V, Hammouda M and Suzuki A. 2005. Expression of a ferredoxin-dependent glutamate synthase gene in mesophyll and vascular cells and functions of the enzyme in ammonium assimilation in *Nicotiana tabacum* (L.). *Planta,* **222**:667-677.
- Fernandes M and Rossiello R. 1995. Mineral nitrogen in Plant Physiology and plant nutrition. *Crit Rev Plant Sci* **14**:111-148.

- Ferrario-Méry S, Suzuki A, Kunz C, Valadier M, Roux Y, Hirel B and Foyer C. 2000. Modulation of amino acid metabolism in transformed tobacco plants deficient in Fd.GOGAT. *Plant Soil* **221**:67-79.
- Finnemen J and Schjoerring J. 2000. Post translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J.* **24**:171-181.
- Forde B and Cullimore J. 1989. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. En *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* (B.J. Miflin, Ed.), vol 6, Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 247-296.
- Forde B and Lea P. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation and signalling. *J. Exp. Bot.* **58**:2339-2358.
- Forlani G, Scainelli D and Nielsen E. 1997. Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultures cells of potato. *Plant. Physiol.* **113**:1413-1418.
- Funck D, Stadelhofer B and Koch W. 2008. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology* **8**:40-53.
- García-Calderón M. 2009. Consecuencias fisiológicas de la deficiencia de glutamina sintetasa plastídica en plantas de *Lotus japonicus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 257pp
- Gaufichon L, Reisdorf-Cren M, Rothstein S, Chardón F and Suzuki A. 2010. Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Sci* **179**:141-153.
- Gilbert G, Gadush M, Wilson C and Madore M. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. During salinity stress. *J. Exp. Bot.* **49**:107-114.
- Girossue C, Bournoville R and Bonnemain J. 1996. Water deficit induce changes in concentration in proline and some other amino acids in phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.* **111**:109-113.
- Gronwald J and Plaisance P. 1998. Isolation and Characterization of Glutathione S-Transferase Isozymes from Sorghum *Plant Physiol.* **117**:877-892.
- Gygi S, Rist B, Gerger A, Turecek F, Gelb, M and Aebersold R. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope coded affinity tags. *Nature Biotech.* **17**:994-999.
- Handberg K and Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* **2**:487-496.
- Hare P, Cress W and Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environmen.* **21**: 535-553.
- Herrera-Rodriguez M, Maldonado J and Pérez-Vicente R. 2004. Light and metabolic regulation of HAS1, HAS1.1 and HAS2, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**:511- 518

- Herrera-Rodriguez M, Pérez-Vicente R and Maldonado J. 2007. Expression of asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) under various environmental stresses Plant Physiol. Biochem. **45**:33-38.
- Hirel B and Lea P. 2001. Ammonia assimilation. In Plant Nitrogen. (Lea P and Morot-Gaudry F, Eds). pp 79-100.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z and Verma D. 2000. Removal of feedback inhibition of pyrroline 5 carboxylate reductase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. **122**:1129-1136.
- Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Takabe T and Takabe T. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. Plant Mol. Biol. **43**:403-111.
- Hunkapiller M, Strickler J and Wilson K. 1984. Contemporary methodology for protein structure determination. Science **226**: 304-311
- Igarashi D, Tsuchida H, Miyao M and Ohsumi C. 2006. Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. Plant Physiol. **142**:901-910.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo P, Arrese-Igor C and Becana M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiol. **116**:173-181.
- Iyer S and Caplan A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. Plant Physiol. **116**:203-211.
- Izaguirre-Mayoral M, Carballo O, Flores S, Sicardi de Mallorca M and Oropeza, T. 1992. Quantitative analysis of the symbiotic N₂-fixation, non-structural carbohydrates and chlorophyll content in sixteen native legume species collected in different Savanna sites. Symbiosis **12**:293-312.
- Jamai A, Salomé P, Schilling S, Weber A and McClung R. 2010. Arabidopsis Photorespiratory Serine Hydroxymethyltransferase Activity Requires the Mitochondrial Accumulation of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase. Plant Cell **21**:595-606
- Joy K, Blackwell R and Lea P. 1992. Assimilation of nitrogen in mutants lacking enzymes of the glutamate synthase cycle. J. Exp. Bot. **43**:139-145
- Kavi Kishor P, Hong Z, Miao G, Hu C, and Verma, D. 1995. Overexpression of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plant. Plant Physiol. **108**:1387-1394.
- Kavi Kishor P, Sangam A, Amrutha R, Sri Laxmi P, Naidu K, Rao K, Rao S, Reddy K, Therippan P and Sreenivasulu N. 2005 Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Sci. **88**:424-438.

- Kawaguchi R, Bray E and Bailey-serres. 2003. Water deficit induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Environment*. **26**:221-229.
- Kendall A, Bright S, Hall N, Keys A, Lea P, Turner J and Wallsgrave R. 1987. Barley photorespiration mutants. *Progress in Photosynthesis Research* (J. Biggens, Ed.) **9**:629-632.
- Kichey T, Le Gouis J, Sangwan B, Hirel B and Dubois F. 2005. Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol*. **46**:964-974.
- Kim H, Rho H, Park J, Park B, Kim J and Lee M. 1994. Assay of ornithine aminotransferase with ninhydrin. *Anal. Biochem*. **223**: 205-207.
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinosaki K and Shinosaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**:1323-1335.
- Kozaki A and Takeba G. 1996. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**:557-560.
- Kwang Kim J, Bamab T, Harada K, Fukusaki E and Kobayashi A. 2007. Time course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *J. Exp. Bot*. **58**:415-424.
- Labboun S, Tercé-Laforge T, Roscher A, Bedu M; Restivo F, Velanis C, Skopelitis D, Moshou P, Roubelakis-Angelakis K, Suzuki A and Hirel B. 2009. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. In vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. *Plant Cell Physiol* **50**:1761-1773.
- Lancien M, Martin M, Hsieh M, Leustek T, Goodman H and Coruzzi G. 2002. *Arabidopsis* glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant J*. **29**:347-358.
- Lea P, Blackwell R, Chen F and Hecht U. 1990. Enzymes of ammonia assimilation. In: *Methods in plant Biochemistry*. Academic Press: **5**:257-276.
- Liepmann A and Olsen L. 2004. Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Crit. Rev. Plant Sci*. **23**:73-89.
- Lim C and Kao C. 2001. Regulation of ammonium-induced proline accumulation in detached rice leaves. *Plant Growth Regul*. **35**:69-74.
- Llorca O, Betti M, Gonzalez J, Valencia A, Marquez A and Valpuesta J. 2006. The three-dimensional structure of an eukaryotic glutamine synthetase: functional implications of its oligomeric structure. *J. Struct. Biol*. **156**:469-479.
- Majumder A, Senupta S and Goswami L. 2010. Osmolyte regulation in abiotic stress. In *abiotic stress adaptive in plants* (Pareek et al Eds. Springer). pp 350-369.

- Márquez A y Cavovas F. 2004. Absorción y asimilación de amonio. En: El metabolismo del nitrógeno en plantas. (Monza J y Márquez Eds.) pp 65-94.
- Márquez A, Avila C, Forde B and Wallsgrave R. 1988. Ferredoxin-glutamate synthase from barley leaves: rapid purification and partial characterization. *Plant Physiol. Biochem.* **26**:645-651.
- Márquez A, Betti M, García-Calderón M, Pal'Ove-Balang P, Díaz P and Monza J. 2005. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* **56**:1741-1749.
- Márquez A, García-Calderón M, Díaz P, Roncel M, Betti M, Ortega J and Monza J. 2008. Changes in photosynthesis and proline metabolism in response to drought stress in glutamine synthetase mutants from *Lotus japonicus*. *Physiol. Plant.* **133**:107
- Martino C, Delfine S, Alvino A and Loreto F. 1999. Photorespiration rate in spinach leaves under moderate NaCl stress. *Photosynthetica* **36**:233-242.
- Mehta S and Gaur J. 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist* **143**:253-259.
- Migge A, Carrayol E, Hirel B and Becker T. 2000. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* **210**:252-260.
- Monza J, Borsani O y Arrese-Igor C. 2004. Relaciones entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno. En: El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Monza y Márquez (eds). Editorial Almuzara. pp121-138
- Morris P, Layzell D and Calvin D. 1988. Ammonia production and assimilation in glutamate synthase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **87**:148-154
- Murray A, Blackwell R, Joy K and Lea P. 1987. Photorespiratory N donors, aminotransferase specificity and photosynthesis in a mutant of barley deficient in serine glyoxylate aminotransferase activity. *Planta* **172**:106-113.
- Noctor G, Arisi A, Jouanin L, Valadier M, Roux Y and Foyer C. 2006: The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implications for glutathione production during stress. *Physiol. Plant.* **100**:255-263.
- Olea F, Pérez-García A, Canton F, Rivera M, Canas R, Avila C, Cazorla F, Canovas F and De Vicente A. 2004. Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiol.* **45**:770-780.
- Oliveira I and Coruzzi G. 1999. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**:301-309.
- Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero J and Márquez A. 2002. Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiol. Plant.* **115**:352-361.

- Ortega J, Temple S, Bagga S, Ghoshroy S and Sengupta-Gopalan C. 2004. Biochemical and molecular characterization of transgenic *Lotus japonicus* plants constitutively over-expressing a cytosolic glutamine synthetase gene. *Planta* **219**:807–818.
- Pajuelo P, Pajuelo E, Forde B and Márquez A. 1997. Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley. *Planta* **203**:517-525.
- Pesole G, Bozzetti M, Lanave C, Preparata G and Saccone C. 1991. Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:522-526
- Popova O, Ismailov S, Popova T, Dietz K and Gollmack D. 2002. Salt induced expression of NADP dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta* **215**:906-913.
- Posé D, Castanedo I, Borsani O, Nieto B, Rosado A, Taconnat L, Ferrer A, Dolan L, Valpuesta V and Botella M. 2009. Identification of the Arabidopsis *dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J.* **59**:63-73
- Rentsch D, Himer B, Schmelzer E and Frommer W. 1996. Salt stress induced proline transporters and salt stress repressed broad specificity amino acid permease identified by suppression of yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* **8**:1437-1446.
- Rhodes D, Handa S, and Bressan R. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* **82**:890-903.
- Rhodes D, Verslues P and Sharp R 1999. Role of amino acids in abiotic stress resistance. In: Singh BK (ed.). *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker. pp. 319-356.
- Riedel J, Tischner R and Mack G. 2001. The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta* **213**:396-401.
- Rohacek K and Bartak M. 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence basic concepts, useful parameters and some applications. *Photosynthetica* **37**:339-363.
- Rossens N., Thu T., Iskandar H. and Jacobs M. 1998. Isolation of ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **117**: 263-271.
- Rus-Alvarez A and Guerrier C. 1994. Proline metabolism pathways in calli from *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under salt stress. *Biol. Plant.* **36**:277-287.
- Sainz M, Díaz P, Monza J and Borsani O. 2010. Heat stress results in loss of chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase and increased damage to Photosystem II in combined drought-heat stressed *Lotus japonicus*. *Physiol. Plant.* **140**:46-56.
- Samaras Y, Bressan R, Csonka M, García-Ríos R, D'Urzo P and Rhodes D. 1995. Proline accumulation during drought and salinity. In: *Environment and Plant Metabolism flexibility and acclimation*. W.J Davies Bios Scientific Publisher UK.(Ed.) pp. 161-186.

- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez D, Lippold F, Redestig H, Hannah M, Erban A, Krämer U, Kopka J and Udvardi M.K. 2008. Integrative functional genomics of salt acclimatation in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J.* **53**:973-987.
- Sánchez E, Ruiz J and Romero L. 2002. Proline metabolism in response to nitrogen toxicity in fruit of French Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike). *Sci. Hort.* **93**:225-233.
- Sánchez-Díaz M y Aguirreolea J. 1993. Efectos fisiológicos que causa la falta persistente de agua en los cultivos. *Pythoma España* **51**:26-36.
- Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz K, Stransky E, Stransky H, Frommer W and Rentsch D. 1999. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine and amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* **11**:377-391.
- Sengar R, Pant R, Singh R and Srivastava R. 1995. Role and regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **22**:89-100.
- Shelp B, Bown A and McLean M. 1999. Metabolism and functions of gamma amino butyric acid. *Trend Plant Sci.* **4**:446-452.
- Shulaev V, Cortes D, Miller G and Mittler R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* **132**:199-208.
- Skopelitis D, Paranychinakis N, Paschalidis A, Pliakonis E, Delis I, Yakoumakis D, Kouvarakis A, Papadakis A, Stephanou E and Robelakis-Angelakis K. 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression and anionic glutamate dehydrogenase to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant cell* **18**:2767-2781.
- Smirnoff N and Cumbes Q. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatibles solutes. *Phytochemistry* **28**:1057-1060.
- Smirnoff N. 1993. Transley Review N° 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**:27-58.
- Solorzano L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypoclorite method. *Ocean Limno Oceanogr* **14**:799-801.
- Somerville C and Ogren W. 1979. A phosphoglycollate phosphatase deficient mutant of Arabidopsis. *Nature* **280**:833-836.
- Somerville C and Ogren W. 1980. Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**:257-259.

- Somerville C. 1984. The analysis of photosynthetic carbon dioxide fixation and photorespiration by mutant selection. En: Mifflin, B.J. (Ed.) Oxford surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Oxford: Oxford Univ. Press, pp. 103-131
- Srivastava H, Shankar N and Yamaya, T. 2002. Role and regulation of glutamate synthases in higher plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **8**:39-60.
- Summer L, Mendes P and Dixon R. 2003. Plants metabolomics large scales phytochemistry in the functional genomic era. *Phytochemistry* **62**:817-836.
- Suzuki A and Knaff D. 2005. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynth. Res.* **83**:191-217.
- Szabados L and Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**:89-97.
- Székely G, Ábraham E, Cséplő A, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J and Schmelzer E. 2008. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* **53**:11-28.
- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, and udwig R. 2004. *Arabidopsis thaliana* GLN2-Encoded Glutamine Synthetase Is Dual Targeted to Leaf Mitochondria and Chloroplasts. *Plant Physiol.* **16**:2048-2058.
- Taylor N, Day D and Millar H. 2002. Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J. Biol Chem.* **277**:42663-42668
- Teixeira J, Pereira S, Canovas F and Salema R. 2005. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J. Exp. Bot.* **56**:663-671
- Temple S, Bagga S and Sengupta-Gopalan C. 1998. Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol Biol.* **37**:535-547.
- Terce-Laforgue T, Mack G and Hirel B. 2004. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiol. Plant.* **120**:220-228.
- Tobin A and Yamaya T. 2001. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *J. Exp. Bot.* **52**:591-604.
- Troll W and Lindsley J. 1955. A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.* **215**:655-660.
- Trotel P, Bouchereau A, Niogret M and Larher F. 1996. The fate of osmo accumulated proline in leaf discs of rape (*Brassica napus* L.), incubated in a medium of low osmolarity. *Plant Sci.* **118**:31-45.

- Turano F, Thakkar Sang G and Weisemann J. 1997. Characterization and expression of NAD(H) dependent glutamate dehydrogenase genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **113**:1329-1341.
- Udvardi M, Kakar K, Wandrey M, Montanari O, Murray J, Andriankaja A, Zhang J, Benedito V, Hofer J, Chueng F and Town C. 2007. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol.* **144**:538-549.
- Udvardi M, Tabata S, Parniske M and Stougaard J. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast line. *Trends Plant Sci.* **10**:222-228.
- Unno H, Uchida T, Sugawara H, Kurisu G, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H, Hase T and Kusunoki M. 2006. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J. Biol. Chem.*, **281**:29287-29296.
- Valadier M, Yoshida A, Grandjean O, Morin H, Kronenberger J, Boutet S, Raballand A, Hase T, Yoneyama T and Suzuki A. 2008. Implication of the glutamine synthetase/glutamate synthase pathway in conditioning the amino acid metabolism in bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *FEBS J.* **275**:3193-3206.
- Vendruscolo E, Schuster I, Pileggi M, Scapim C, Molinari H, Marur C and Vieira L. 2007. Stress induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit. *J. Plant Physiol.* **164**:1367-1376.
- Verbruggen N and Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* **35**:753-759.
- Wallsgrave R, Turner J, Hall N, Kendall A and Bright S. 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.* **83**:155-158.
- Wang H, Liu D, Sun J and Zhang A. 2005. Asparagine synthetase gene TaASN1 from wheat is up regulated by salt stress osmotic stress and ABA. *J. Plant Physiol.* **142**:81-89.
- Wang R, Guegler K, LaBrie S and Crawford N. 2000. Genomic analysis of a nutrient response in arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate *Plant Cell* 2000 **12**:1491-1510
- Wang R, Xing X and Crawford N 2007. Nitrate acts as a transcriptome signal at micromolar concentration in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **145**:1735-1745
- Wang Z, Yuan Y, Qu J, Lin Q and Zhang C. 2007. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* **164**:695-701.
- Waterhouse R, Smyth A, Massonneau A, Prosser I and Clarkson D. 1996. Molecular cloning and characterisation of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: Dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant Mol. Biol.* **30**:883-897.

- Wingler A, Quick W, Bungard R, Bailey K, Lea P and Leegood R. 1999. The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant Cell Environmen.* **22**:361-373.
- Wong H, Chan H, Coruzzi G and Lam H. 2004. Correlation of ASN2 gene expression with ammonium metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**:332-338.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H and Zhu J. 2001. The Arabidopsis *LOS5/ABA3* Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress- and Osmotic Stress-Responsive Gene Expression. *Plant Cell* **13**:2063-2083.
- Xue X, Liu A and Hua X. 2009. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. *BMB reports* **42**:28-34.
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1997. Regulation of levels of proline as osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* **38**:1095-1102.
- Yu C, Liang Z and Huang A .1984. Glyoxylate transamination in intact leaf peroxisomes. *Plant Physiol* **75**:7-12
- Zhang C, Lu Q and Verma D. 1995. Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **270**:20491-20496.
- Zhu J, Hasegawa P and Bressan R. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev Plant Sci* **16**:253-277.
- Zhu J. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:247-73.