

03062  
8  
Ref.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y  
DE POSTGRADO DEL C.C.H.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION  
DE NITROGENO.



ANALISIS MOLECULAR Y FISIOLÓGICO DE  
PLANTAS TRANSGENICAS MODULADAS EN LA  
EXPRESION DE GLUTAMINO SINTETASA.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN INVESTIGACION**  
**BIOMEDICA BASICA**  
**P R E S E N T A :**  
**BIOL. SARA ISABEL FUENTES MEMBREÑO.**

CUERNAVACA, MORELOS.

1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

259038



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, bajo la dirección de la Dra. Georgina Hernández Delgado.

Cuernavaca, Morelos, 1998.

En este trabajo deseo hacer patente mi agradecimiento:

A la Dra. Georgina Hernández por su dirección, por la confianza que ha puesto en mi y por brindarme la oportunidad para realizar este trabajo de tesis con todo lo que ello significó.

A la Dra. Adriana Ortiz López como parte de mi comité tutorial, deseo agradecerle enormemente su ayuda, apoyo y asesoría a lo largo de la fase experimental de este trabajo.

A la Dra. Susana Brom Klanner como parte de mi comité tutorial y como Jurado le agradezco su asesoría y sus valiosas sugerencias.

Al Jurado integrado por los Dres. Jaime E. Padilla Acero, Mario Rocha Sosa y Jorge Vázquez Ramos por la minuciosa revisión a este escrito y por su valiosa crítica y sugerencias al mismo.

A todos y cada uno de mis compañeros (los que antes y los de ahora) del CIFN y amigos ahora, por su ayuda incondicional y por su apoyo SIEMPRE que lo necesite.

*Dedico este trabajo con todo mi amor a mi mamá la  
Profesora Juanita Membreño Lainez de Fuentes.*

# ANALISIS MOLECULAR Y FISIOLÓGICO DE PLANTAS TRANSGENICAS MODULADAS EN LA EXPRESION DE LA GLUTAMINO SINTETASA.

## INDICE DEL CONTENIDO.

### RESUMEN.

<b>1. INTRODUCCION.</b>	1
1.1 El papel de la glutamino sintetasa en el metabolismo nitrogenado en la planta.	1
1.1.1 El nitrógeno, un elemento esencial.	1
1.1.2 La reducción del nitrato en las plantas	2
1.1.3 La asimilación del amonio en las plantas.	2
1.1.4 La glutamino sintetasa (GS) en las plantas.	5
1.1.5 Características de la GS.	5
1.1.6 Función de las isoformas de la GS.	9
1.1.7 La función de la GS2 cloroplástica en la reasimilación del amonio liberado durante la fotorrespiración en la hoja.	9
1.1.8 La síntesis de glutamina translocable por las isoformas de GS1 citosólicas.	11
1.2 La ingeniería genética de plantas para modificar la expresión de genes específicos.	12
1.2.1 Transformación genética de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	12
1.2.2 Obtención de plantas transformadas con genes quiméricos.	14
1.2.3 El uso de fusiones génicas entre promotores nativos de la GS y el gene reportero de <i>gus</i> .	15
1.3 Modulación de la actividad de la GS en las plantas.	16
1.3.1 La inhibición de la actividad de la GS con TBL.	16
1.3.2 Inhibición de la expresión por RNA en "antisense".	17
1.3.3 La alteración de la GS y la tolerancia a L-PPT.	19
1.3.4 La sobreexpresión de la GS con genes quiméricos.	19
<b>2. OBJETIVOS.</b>	23
2.1 Objetivo general.	23
2.2 Objetivos particulares.	23
<b>3. MATERIAL Y METODOS.</b>	24
3.1 Transformación genética de tabaco con los transgenes de GS de alfalfa.	24
3.1.1 Cepas bacterianas y construcción de plásmidos.	24
3.1.2 Transformación genética de las plantas.	25

3.2 Germinación, crecimiento y mantenimiento de las plantas de tabaco.	25
3.2.1 Germinación, cultivo y selección de las plantas R1 de tabaco.	25
3.2.2 Crecimiento y mantenimiento de las plantas de tabaco.	26
3.3 Evidencias de la transformación genética de plantas de tabaco R1 seleccionadas.	27
3.3.1 Actividad histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa (GUS).	27
3.3.2 Amplificación por PCR del gene de <i>gus</i> integrado al genoma vegetal.	28
3.3.3 Amplificación por PCR de los transgenes 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense".	29
3.4 Caracterización molecular y fisiológica de las plantas transgénicas.	30
3.4.1 Cuantificación de la abundancia del RNAm de la GS.	30
3.4.2 Análisis de los polipéptidos de la GS.	31
3.4.3 Actividad específica de la GS.	32
3.4.4 Determinación de la concentración de la proteína.	33
3.4.5 Cuantificación de la clorofila total.	33
<b>4. RESULTADOS.</b>	34
4.1 Selección de la población R1 de plantas transgénicas de tabaco.	34
4.2 Evidencias de la transformación genética de las plantas de tabaco R1 seleccionadas.	34
4.2.1 Actividad histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa (GUS).	34
4.2.2 Amplificación por PCR de los transgenes integrados: <i>gus</i> y 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense".	35
4.3 Caracterización molecular de las plantas transgénicas.	37
4.3.1 Cuantificación de la abundancia de RNAm de la GS.	37
4.3.2 Análisis de los polipéptidos de la GS.	40
4.3.3 Actividad específica de la GS.	41
4.4 Caracterización fisiológica de las plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la GS.	43
4.4.1 Crecimiento en amonio (inorgánico) vs. en glutamato (orgánico) como fuente de nitrógeno.	45
4.4.2 Crecimiento en diferentes concentraciones de amonio como fuente de nitrógeno.	48
<b>5. DISCUSION.</b>	54
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.</b>	61
<b>7. BIBLIOGRAFIA CITADA.</b>	63

## RESUMEN

En las plantas la vía principal de asimilación de amonio es la que ocurre a través de las enzimas glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) (Lea y Miflin, 1980). La glutamino sintetasa es la enzima que directamente incorpora al amonio a una molécula de glutamato para sintetizar glutamina (Figura 1), de ahí su importancia en el metabolismo nitrogenado de las plantas.

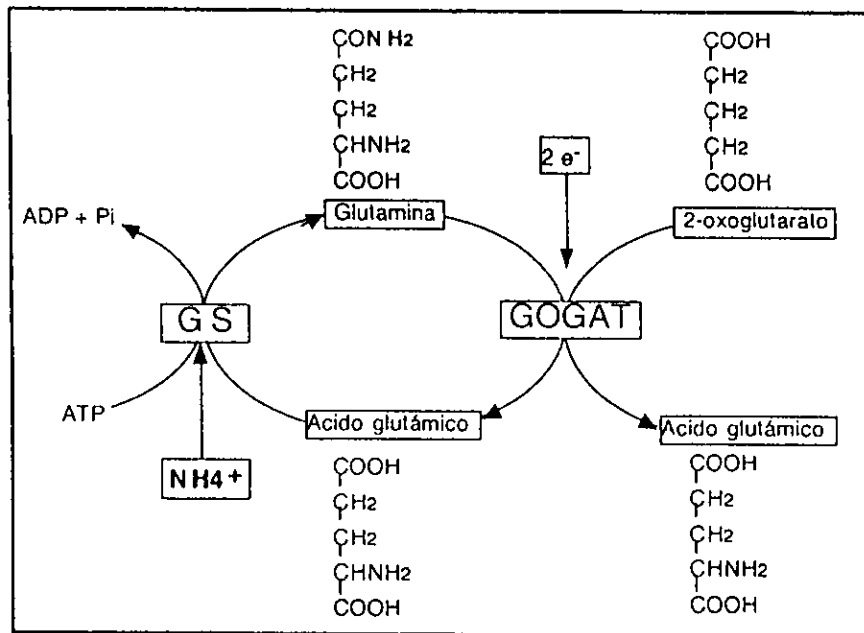


Figura 1. Ciclo GS-GOGAT de asimilación de amonio en las plantas. GS: glutamino sintetasa; GOGAT glutamato sintasa.

Para abundar en el conocimiento de la regulación de esta enzima en las plantas se alteró la expresión de la GS en plantas transgénicas de tabaco. Se caracterizaron plantas de tabaco R1 transformadas con un gene quimérico de GS1 citosólica de alfalfa (Das Sarma *et al*, 1986) colocado en sentido contrario ("antisense") para disminuir la actividad de la GS endógena y también se analizaron plantas con este gene quimérico de GS alfalfa en sentido directo (ó en "sense") bajo el promotor constitutivo p35SCaMV para aumentar la expresión de la GS.

En las plantas de tabaco con del gene quimérico de alfalfa 35S-GS en "antisense" seleccionadas por su resistencia a la kanamicina, actividad de GUS y amplificación por PCR del transgene 35S-GS; no hubo disminución de la actividad endógena de la GS ni se demostró la presencia del transgene en estas plantas por hibridación DNA:DNA (Southern blot). No es claro discriminar si las plantas seleccionadas contienen el



transgene ó que quizás no lo expresen ó bien que se haya seleccionado solo a aquellas plantas con niveles de inhibición de GS moderados que no alteraron la síntesis activa de la proteína nativa.

En cambio, si se obtuvieron plantas que constitutivamente expresaron el transgene 35S-GS en "sense", lo cual se reflejó en el aumento de RNAm y de 3 a 11 veces más actividad funcional de la GS. La expresión constitutiva se reflejó también en mayor nivel del polipéptido de GS1 en hoja de las plantas transformadas, donde usualmente el polipéptido nativo de GS1 muestra niveles de expresión mínima en comparación con el predominio de la GS2 en este órgano.

Aunque en nuestro sistema heterólogo de tabaco las plantas no mostraron una apariencia diferente por la expresión continua de la GS, se analizó el impacto fisiológico de esta alteración en estas plantas. Las plantas de tabaco con GS sobreexpresada no mostraron una mejoría notable por el suministro de glutamato como fuente nitrogenada, a diferencia de lo observado en el sistema homólogo de sobreexpresión de GS de alfalfa, dependiente de glutamato para la supervivencia de estas plantas.

En las plantas de tabaco que sobreexpresaron la GS también se evaluó el efecto del suministro de nitrógeno en cinco tratamientos de riegos entre limitación de nitrógeno hasta niveles tóxicos de amonio como fuente nitrogenada. A niveles tóxicos de 150 mM de amonio las plantas transformadas con GS en "sense" mostraron los efectos deletéreos de estas condiciones sin distinguirse de las plantas control. En el otro extremo, en limitación de nitrógeno, las plantas transformadas con GS en "sense", mostraron una apariencia ligeramente mejor que las plantas control. Esta mejoría se reflejó en términos de contenido de clorofila (50% más) y aumento en biomasa (entre 22% hasta 72% más de peso seco del follaje entre diferentes plantas). Se discute que la ventaja que tienen estas plantas que expresan continuamente la GS, es que gracias a esta característica se está asimilando de manera más eficiente el amonio presente en cantidades trazas ó aquel que este siendo liberado internamente por el reciclaje del nitrógeno dado en esta condición de estrés por inanición de nitrógeno.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 EL PAPEL DE LA GLUTAMINO SINTETASA EN EL METABOLISMO NITROGENADO DE LAS PLANTAS.

#### 1.1.1 El nitrógeno, un elemento esencial.

El nitrógeno es el cuarto elemento en abundancia en la composición de moléculas orgánicas de los organismos vivientes precedido por el carbono, oxígeno e hidrógeno. Este elemento forma parte de un vasto número de biomoléculas entre las que destacan proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares.

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que su disponibilidad, adquisición y asimilación son procesos seguidos en importancia después de la asimilación fotosintética del carbono.

En nuestro medio ambiente el nitrógeno existe bajo diferentes formas. Las continuas interconversiones de estas formas por procesos físicos y biológicos constituyen lo que se la ha llamado el ciclo del nitrógeno en la naturaleza. En la atmósfera está presente en grandes cantidades (78% v/v) pero energéticamente es difícil para los animales y las plantas convertir los dos átomos del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) en una forma útil. Para ello es necesario que este nitrógeno molecular sea fijado (reducido) y/o oxidado por procesos físicos o biológicos a formas acequibles como lo son los iones nitratos y el amonio (Salisbury y Ross, 1993).

En el suelo mismo la descomposición microbiana de plantas y animales muertos son naturalmente una fuente importante de nitrógeno. Gracias a los procesos microbianos de fijación, nitrificación y amonificación la mayoría de los suelos contienen iones nitratos, amonio y en pequeñas cantidades aminoácidos (Salisbury y Ross, 1993).

El principal nutriente nitrogenado que toman las plantas de manera directa son los nitratos ( $NO_3^-$ ), presentes en la mayoría de los suelos, aunque en suelos ácidos la forma predominante es el amonio ( $NH_4^+$ ) que también puede ser tomado directamente. En los suelos no ácidos solo hay trazas de amonio que significan una fuente mínima de nutrición directa para la mayoría de las plantas porque una parte se pierde al volatilizarse a la atmósfera bajo la forma de amoníaco o bien este amonio es rápidamente oxidado a nitrato por las bacterias nitrificantes.

Una importante fuente alternativa de amonio para algunas plantas es a través de la fijación biológica del nitrógeno, proceso efectuado por algunas bacterias, cianobacterias ó actinomicetos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y sintetizar amonio disponible para las plantas. Esto significa, que algunas plantas leguminosas y

de otras familias son capaces de utilizar el N<sub>2</sub> atmosférico mediante su asociación con estos organismos procarióticos de vida libre o que viven en simbiosis.

En resumen, las fuentes externas de nitrógeno para las plantas son: (1) directamente de el suelo bajo la forma de nitratos y amonio, formados mediante la mineralización de la materia orgánica indígena por los microorganismos del suelo ó añadidos como abonos y fertilizantes comerciales y (2) de la atmósfera mediante la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico.

### 1.1.2 La reducción del nitrato en las plantas.

Todo el nitrógeno inorgánico (nitratos del suelo y nitrógeno atmosférico) que entra a la planta, es convertido a amonio porque solo bajo esta forma puede ser utilizado para la síntesis de compuestos orgánicos (asimilación). La mayoría de las plantas son muy eficientes en extraer el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de la rizósfera. Este nitrato puede ser reducido directamente en las raíces, guardarse en vacuolas de las células de la raíz o puede ser transportado a los brotes para posteriormente ser reducido en las hojas. Se ha encontrado que en plantas tropicales y subtropicales, la reducción del nitrato ocurre principalmente en los brotes; en cambio, en plantas de clima templado la mayor parte de este proceso reductivo ocurre en las raíces (Layzell, 1990). En la planta el nitrato es reducido a amonio por las enzimas nitrato reductasa (NR) (Reacción 1) y nitrito reductasa (NiR) (Reacción 2); en cambio, los organismos fijadores de nitrógeno tienen al complejo enzimático nitrogenasa que reduce el nitrógeno atmosférico N<sub>2</sub> a amonio (Lea, 1993).

Reacción 1. Nitrato reductasa (**NR**) (EC 1.6.6.1).



Reacción 2. Nitrito reductasa (**NiR**) (EC 1.7.7.1).



### 1.1.3 La asimilación del amonio en las plantas.

Como el amonio en forma libre resulta tóxico para la célula, no se almacena, debe ser asimilado rápidamente en forma de metabolitos nitrogenados no tóxicos. Este proceso de adquisición del nitrógeno inorgánico a partir de fuentes externas (del suelo ó de la fijación de nitrógeno) y su incorporación en esqueletos de carbono para la síntesis de los aminoácidos L-glutamina y L-glutamato en primera instancia, es lo que se conoce

como la asimilación primaria del nitrógeno en la planta (Lam *et al.*, 1996).

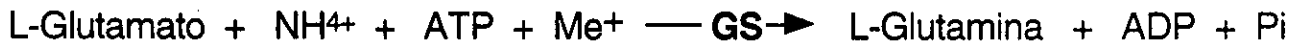
Además de la asimilación primaria del nitrógeno, dentro de la planta existen algunas fuentes secundarias generadoras de amonio resultado del metabolismo. Las más sobresalientes son: (1) de la fotorrespiración en hoja; (2) del metabolismo fenilpropanoide que ocurre cuando la planta es atacada por patógenos; (3) en la biosíntesis de metionina, isoleucina y lignina y (4) de reacciones catabólicas como la ruptura de las proteínas de reserva durante la germinación de la semilla y de la desaminación de aminoácidos durante la senescencia de las hojas (Forde y Cullimore, 1989; Lam *et al.* 1996) donde el amonio producido por estas vías secundarias internas de reciclaje también debe ser reasimilado rápidamente.

En la asimilación primaria y en la reasimilación del amonio están involucradas las enzimas glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) (Figura 1) que catalizan los primeros pasos de la incorporación del amonio a moléculas orgánicas. La GS es la enzima que cataliza la primera reacción de la asimilación del amonio y directamente incorpora el amonio al  $\alpha$ -carboxilo del glutamato para formar glutamina (Reacción 3) (Salisbury y Ross, 1993). La glutamina es una de las dos amidas especialmente importantes por su papel dentro de la planta como donadora de nitrógeno y como una importante forma de transporte de este elemento. Como donadora de nitrógeno, entra a una serie de reacciones de transamidación que dan lugar a otros transportadores translocables de nitrógeno como el glutamato, el aspartato y la asparagina, aunque en algunas especies de plantas se sintetizan otras moléculas transportadoras de nitrógeno como el ácido alantoico, alantoína, urea y citrulina (uréidos) (Salisbury y Ross, 1993). La asparagina y la glutamina colectivamente acarrean del 75% al 85% del nitrógeno a través de la savia del floema. También estas dos amidas participan directamente en la biosíntesis de aminoácidos como tirosina, triptofano y alanina. Finalmente, la glutamina también puede ser incorporada en proteínas importantes para el metabolismo celular y de la planta (Layzell, 1990).

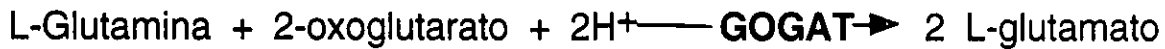
La reacción que cataliza la GS para sintetizar glutamina (Reacción 3) requiere glutamato como sustrato, por lo que debe haber un mecanismo que lo provea. Esto se completa por la reacción catalizada por la GOGAT que sintetiza glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato en presencia de poder reductor (Reacción 4). En esta vía de asimilación de amonio la GS y la GOGAT actúan coordinadamente. Una característica de la ruta GS-GOGAT es la naturaleza cíclica en la cual el glutamato actúa como aceptor (Reacción 3) y como producto de la asimilación del amonio (Reacción 4) (Mifflin y Lea, 1980). Lea y Mifflin (1974) denominaron a esta vía de asimilación del amonio (Reacción 3

y Reacción 4) como el ciclo GS-GOGAT (Figura 1) ó ciclo de la glutamato sintasa.

Reacción 3. Glutamino sintetasa (**GS**) (EC 6.3.1.2).

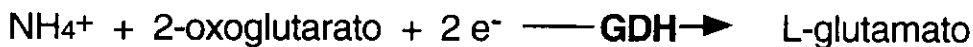


Reacción 4. Glutamato sintasa (**GOGAT**) (EC 1.4.7.1 ó EC 1.4.1.13).



Además del ciclo GS-GOGAT existe otra enzima capaz de asimilar el amonio: la glutamato deshidrogenasa (GDH) que cataliza la aminación reductiva directa del 2-oxoglutarato para sintetizar L-glutamato (Reacción 5). Aunque se ha detectado actividad de GDH en las plantas, al parecer, su papel no es predominante para la asimilación primaria del amonio como lo es la vía GS-GOGAT. Esta enzima se ha localizado en mitocondria y en cloroplasto. El donador de electrones puede ser NADH ó NADPH.

Reacción 5. Glutamato deshidrogenasa (**GDH**) (EC 1.4.1.2).



Inicialmente se demostró la actividad de la GOGAT en fuentes vegetales como en células en suspensión de zanahoria (Dougall, 1974) y en tejidos verdes de chícharo (Lea y Miflin, 1974). En estos trabajos también se observó que la actividad de la GOGAT está acoplada a la de la GS para asimilar el amonio. De entonces a la fecha algunas de las evidencias de que el ciclo GS-GOGAT (Figura 1) es la vía principal de asimilación del amonio en las plantas han sido: (1) la afinidad de las enzimas por el amonio como sustrato, la GS tiene una  $K_m$  de 10-50  $\mu\text{M}$  y GDH tiene una  $K_m$  de 3-80 mM, lo cual significa que la competencia de ambas enzimas por el amonio favorece a la GS; (2) se ha observado que el amonio se acumula y no se incorpora en aminoácidos cuando se utilizan inhibidores específicos de la GS y de la GOGAT como la metionina sulfoximina y la azaserina, los cuales no inhiben a la GDH; (3) utilizando el radioisótopo  $^{13}\text{N}$  de vida corta en experimentos de pulso se ha identificado que los primeros productos de la asimilación del amonio son glutamina en primer lugar y glutamato después; y (4) que plantas u hongos con el gene mutado de GDH no mueren (Layzell, 1990). Se ha propuesto, más bien, que la GDH de plantas participa en el catabolismo del glutamato

para liberar amonio en procesos de reciclaje del nitrógeno, lo cual se apoya en que su actividad se induce en la germinación y en la senescencia (Lam *et al*, 1996).

#### 1.1.4 La glutamino sintetasa (GS) en las plantas.

La glutamino sintetasa (GS, EC 6.3.2.1) es una enzima que ha sido caracterizada en bacterias, hongos, algas, plantas superiores y en animales. En las plantas superiores la GS se encuentra distribuída por toda la planta en: semillas, plántulas, hojas, raíces y en nódulos de plantas leguminosas (Stewart *et al*, 1980).

La reacción fisiológica de la glutamino sintetasa al catalizar la síntesis de L-glutamina a partir de amonio y de L-glutamato (Reacción 3) requiere ATP y un catión divalente ( $Me^{+}$ ) que puede ser  $Mg^{2+}$  ó  $Mn^{2+}$ . El pH óptimo de la cinética de la reacción depende del catión empleado: con  $Mg^{2+}$  el óptimo es pH 8 y con  $Mn^{2+}$  es pH 5-6. Con  $Mg^{2+}$  como cofactor la  $K_m$  por amonio es de 10-50  $\mu M$  (Layzell, 1990), lo cual demuestra una alta afinidad de la enzima por el amonio. En cambio, la afinidad de la GS es menor por el glutamato ( $K_m$  de 1-13 mM) y por el ATP ( $K_m$  0.1-1.5 mM) (Stewart *et al*, 1980).

También la actividad enzimática de la GS puede ser inhibida específicamente con algunos compuestos análogos estructurales del glutamato. Algunos de estos compuestos son: la metionina sulfoximina (MSO) y dos aminoácidos producidos por bacterias: la fosfotricina (L-PPT) y la tabtoxina  $\beta$ -lactama (TBL) (Lea, 1991). De estos tres inhibidores el que más se ha utilizado para ensayos experimentales es la MSO que se une fuertemente como MSO-fosfato. Esta inhibición se ha considerado altamente específica para la actividad de la GS (Miflin y Lea, 1980; Leason, 1982).

#### 1.1.5 Características de la GS.

La GS de plantas superiores es una enzima que tiene un peso molecular de entre 320-380 kDa (Stewart *et al*, 1980). Está constituida por ocho subunidades muy similares que tienen un peso molecular de 37 a 47 kDa cada una (Forde y Cullimore 1989; Lea 1990). McParland y colaboradores (1976) reportaron que en la GS de nódulo de soya las ocho subunidades están acomodadas en dos juegos de tetrámeros planos paralelos formando un cubo. En tamaño y estructura cuaternaria la GS de plantas y de mamíferos es muy similar; en cambio, con respecto a la GS de procariotes existen algunas diferencias: la GS de bacterias está constituída por doce subunidades y posee un peso molecular de 600 kDa (Stewart *et al*. 1980). A pesar de ello, las GS de eucariotes y procariotes comparten muchas características: tienen propiedades catalíticas similares;

requieren para su actividad de un catión divalente y se inactivan por MSO, lo cual sugiere que sus sitios activos y sus mecanismos de reacción son similares (Forde y Cullimore, 1989).

Una característica distintiva de la GS en las plantas superiores es que esta enzima se encuentra distribuída en toda la planta bajo diferentes isoformas o isoenzimas separables por cromatografía de intercambio iónico (Lara *et al*, 1984).

En tejidos no fotosintéticos, en el citosol de la célula, existen diferentes formas de GS1 (así llamada por ser la primera que se eluye de columnas de DEAE): GS1 de hoja, GS1 de semillas, GSr de raíces y GS<sub>n</sub> de nódulo de plantas leguminosas. En este órgano se ha descrito tanto la presencia de GS<sub>n</sub> como de otra GS citosólica no específica de nódulo, similar a la GSr. La GS<sub>n</sub> es activa de manera específica durante la nodulación en tiempo y función. Estas dos formas citosólicas tienen similar peso molecular, pero difieren en carga (Vézina *et al*, 1987) y en su expresión. Por simplicidad todas estas formas de GS citosólicas serán referidas como GS1. En los cloroplastos de tejidos verdes o en plástidos de células de la raíz se localiza otra isoforma: la GS2.

En hoja se localizan tanto GS1 como GS2, ambas son similares en su afinidad a los sustratos (Stewart *et al*, 1980), pero con diferente distribución subcelular. Su expresión también difiere de acuerdo a la función particular de cada una en la asimilación del amonio producto de varias fuentes. La proporción relativa de GS1/ GS2 en hoja se ha encontrado que es variable de acuerdo a la planta de procedencia, como lo reportan McNally y colaboradores (1983), quienes determinaron la proporción relativa de GS1/GS2 en hoja en 58 especies diferentes de gramíneas, halófitas, leguminosas, plantas inferiores, orquídeas, plantas con metabolismo C<sub>4</sub>, CAM y leguminosas tropicales. Ellos observaron cuatro diferentes patrones del contenido GS1/GS2 en hoja. Estos grupos se caracterizaron por tener: (1) sólo GS1 citosólica, en plantas parásitas nutricionalmente dependiente de sus hospederos; (2) una aparente ausencia de GS1 y la presencia predominante de GS2, en varias plantas C<sub>3</sub> (3) GS1 citosólica detectable en menor proporción que GS2 cloroplástica en algunas plantas C<sub>3</sub>, varias gramíneas, leguminosas de clima templado, algunas halófitas, plantas con tasas altas de fotorrespiración; y (4) actividades aproximadamente iguales de GS1 y GS2, en maíz, muchas plantas C<sub>4</sub>, CAM y algunas leguminosas tropicales.

Mediante la separación individual de las subunidades que conforman a la holoenzima (por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se ha estimado que cada subunidad de las GS1 citosólicas tienen un peso molecular de 37 a 43 kDa; en cambio, la subunidad cloroplástica de la GS2 es ligeramente más pesada,

de 43 a 47 kDa (Forde y Cullimore, 1989; Lea, 1990).

Las diferentes isozimas de GS están codificadas por una pequeña familia multigénica y se han caracterizado en varias plantas como en: frijol (Cullimore *et al*, 1984; Lightfoot *et al*, 1988), chícharo (Tingey *et al*, 1987), arroz (Sakamoto *et al*, 1989), *Arabidopsis thaliana* (Peterman y Goodman, 1991), maíz (Sakakibara *et al*, 1992; Li *et al*, 1993), soya (Hirel *et al*, 1987; Roche *et al*, 1993), alfalfa (Dunn *et al*, 1988; Tischer *et al*, 1986; Stanford *et al*, 1993; Temple *et al*, 1995), tabaco (Tingey y Coruzzi, 1987; Becker *et al*, 1992) y en tomate (Becker *et al*, 1992), mostrando en cada especie un único gene nuclear para la GS2 cloroplástica y múltiples genes para la GS1 citosólica.

Una de las familias de genes de GS que inicialmente se caracterizaron fué la de frijol (*Phaseolus*) por el interés inicial de conocer más fondo la fijación simbiótica de nitrógeno y la asimilación primaria del amonio en plantas leguminosas. Se identificaron tres polipéptidos de GS1 citosólica: las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , (Lara *et al*, 1984; Cullimore *et al*, 1984; Ortega *et al*, 1986, Bennet *et al*, 1989), cada una con un peso molecular de 39 KDa. Se encontró que estas tres subunidades se ensamblan en diferentes proporciones para producir una serie de hetero-octámeros u homo-octámeros para conformar a la holoenzima (Bennett y Cullimore, 1989). La GS1 citosólica de hoja y GS1 de raíz están conformadas por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . En raíz la proporción entre  $\alpha$  y  $\beta$  se modifica, siendo  $\alpha$  el principal componente en la raíz primaria y  $\beta$  el único componente en la raíz madura. La GS1 citosólica no-específica de nódulo se compone esencialmente de subunidades  $\beta$ ; en cambio, la isoforma GS<sub>n</sub> está compuesta principalmente por la subunidad  $\gamma$  (Lara *et al*, 1983, Bennett y Cullimore, 1989). Estas tres subunidades citosólicas tienen diferencias isoeléctricas y estan codificadas por tres genes homólogos designados: *gln- $\alpha$* , *gln- $\beta$*  y *gln- $\gamma$*  que se expresan diferencialmente durante el desarrollo (Gebhardt *et al*, 1986, Bennett *et al*, 1989). El gene *gln- $\beta$*  se expresa básicamente en raíces, en cambio, *gln- $\gamma$*  se induce fuertemente durante el desarrollo del nódulo (Bennett *et al*, 1989), aunque también se expresa en peciolo, tallos y cotiledones verdes pero a baja abundancia (Bennett *et al*, 1989, Swarup *et al*, 1990).

La GS2 cloroplástica en frijol está compuesta de un solo polipéptido: la subunidad  $\delta$ , con un peso molecular de 43 kD. Esta subunidad está codificada por un gene único: *gln- $\delta$* . Esta subunidad se sintetiza en el núcleo como un precursor con un peso molecular mas alto, el cual se corta en su transporte al cloroplasto (Lightfoot *et al*, 1988).

De estos cuatro genes estructurales homólogos de GS de frijol, los genes *gln- $\beta$*  y



*gln-γ* han sido clonados, mapeados y secuenciados. Se identificó también un posible gen más: *gln-ε*, que se localiza 3-4 kb antes de *gln-γ*, pero no se ha encontrado mRNA o polipéptido derivado de este pseudogene (Forde y Cullimore, 1989).

<u>Isozimas en <i>Phaseolus vulgaris</i> :</u>					
<u>Isozima</u>		<u>Polipéptido</u>		<u>gene</u>	<u>Localización</u>
GS1	→ GS <sub>1</sub>	→ α	39 kDa	<i>gln α</i>	- Hoja (citosol).
	→ GS <sub>r</sub>	→ β	39 kDa	<i>gln β</i>	- Raíz (citosol).
	→ GS <sub>n</sub>	→ γ	39 kDa	<i>gln γ</i>	- Nódulo (células infectadas).
GS2	→	→ δ	43 kDa	<i>gln δ</i>	- Hoja (cloroplasto).

En alfalfa (*Medicago sativa*) la familia génica de la GS es compleja aún. Inicialmente se clonó (Donn *et al*, 1984) y se secuenció (Tischer *et al*, 1986) un gene de una línea celular de alfalfa que corresponde a una GS1 citosólica conformada de polipéptidos de 39 kDa (Temple *et al*, 1993). En nódulo Groat y Schrader (1982) identificaron dos isoformas de GS1, pero sólo uno de los dos polipéptidos identificados es más activo que el otro, en este órgano. Dunn *et al* (1988) en este mismo órgano identificó una GS1 que se induce por la presencia de bacteroides. Temple *et al*, (1995) caracterizaron dos clones de cDNA de GS de nódulos de alfalfa que corresponden a dos clases distintas de genes GS1. Ninguna de las dos se consideró nódulo-específica de manera estricta, porque se expresan en otros órganos de la planta, aunque una clase de GS1 se consideró, más bien, nódulo-inducida y su expresión se limita a la zona simbiótica del nódulo. La otra clase de GS1 se distribuye por todo el nódulo. En este mismo trabajo se sugiere la presencia de más genes y/o alelos de cada clase de GS1 de acuerdo a resultados de hibridación de DNA genómico, lo que ejemplifica la complejidad de esta familia multigénica en alfalfa que es una planta tetraploide.

En *M. truncatula*, una especie diploide de alfalfa, la familia de las varias isoformas de GS1 también es múltiple. Stanford y coautores (1993) reportan la expresión diferencial de tres genes de isozimas citosólicas en varios órganos de la planta entre ellos en nódulos.

En tabaco, la hoja contiene la isoforma GS2 localizada en el estroma del cloroplasto. Esta GS2 está compuesta por subunidades de 44 kDa en *Nicotiana plumbaginifolia* (Tingey y Coruzzi, 1987) y de 43 kDa en *N. sylvestris* (Becker *et al*, 1992). La GS1 en hoja de Solanáceas prácticamente se había considerado ausente al no ser detectable ni su transcrito ni su polipéptido (McNally *et al*, 1983; Tingey y Coruzzi,

1987, Eckes *et al*, 1989), sin embargo, en reportes más recientes se ha detectado el polipéptido de la GS1 en hoja en baja abundancia (Carvalho *et al*, 1992; Temple *et al*, 1993). En raíz de *N. plumbaginifolia* se localiza un polipéptido de 38 kDa correspondiente a la GS1 citosólica (Tingey y Coruzzi, 1987) y por inmunocitoquímica en *N. tabacum* se ha localizado una isoforma de GS1 citosólica en tejidos vasculares de tallos y raíces y otra GS1 en células de raíz y de órganos florales (Dubois *et al*, 1996).

#### **1.1.6 Función de las isoformas de la GS.**

Aunque la actividad de la GS en bacterias está regulada por una serie de metabolitos, la regulación de la GS en plantas mas bien parece estar condicionada a la disponibilidad del amonio como sustrato (Lea 1993).

La familia multigénica de la GS, se expresa diferencialmente en aquellos tejidos y órganos de la planta involucrados en la asimilación y reasimilación del amonio como en hoja, raíz y nódulos de plantas leguminosas (Lea *et al*, 1990; Roche *et al*, 1993). En la mayoría de los casos la actividad de la enzima es mayor en la hoja que en la raíz, aunque esto puede revertirse cuando las plantas asimilan el nitrógeno a tasas elevadas en la raíz como en las leguminosas.

La función de las isoformas de GS se ha determinado experimentalmente cuantificando la actividad de la enzima, abundancia de transcritos y de polipéptidos, su expresión espacial en plantas transformadas genéticamente con genes reporteros, el análisis en plantas mutantes y la modulación de la expresión de algunas isoformas en plantas transgénicas.

#### **1.1.7 La función de la GS2 cloroplástica en la reasimilación del amonio liberado durante la fotorrespiración en la hoja.**

Uno de los productos de la actividad oxigenasa de la ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es el fosfoglicolato que al ser oxidado forma glioxalato y este a su vez es transaminado para formar glicina. La glicina es convertida a serina durante la fotorrespiración, proceso que se lleva a cabo simultáneamente a la fijación de CO<sub>2</sub> en la hoja. Durante la fotorrespiración se desprende CO<sub>2</sub> y amonio. El amonio producido es reasimilado por la GS para evitar que se acumule en las células de las hojas (Salisbury y Ross, 1993).

A la GS2 presente en hojas y tejidos verdes se le atribuye de reasimilación del amonio producido durante la fotorrespiración, proceso que ocurre de manera importante en las células del mesófilo de las hojas. Se ha evidenciado la expresión preferencial de

la GS2 en hoja de frijol, tabaco, chícharo, alfalfa, cebada, y *Arabidopsis*. El aumento de su expresión coincide con la maduración del cloroplasto de chícharo (Edwards y Coruzzi, 1989) y con el desarrollo de los cotiledones de frijol (Cock *et al*, 1991).

En tejidos fotosintéticos, la luz y la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire influyen en la liberación de amonio en la hoja. Ambos factores repercuten de manera indirecta en la regulación metabólica de GS2. En chícharo (Edwards y Coruzzi, 1989), maíz (Sakakibara *et al*, 1992), frijol (Cock *et al*, 1991) y *Arabidopsis* (Peterman y Goodman, 1991) se demostró que la expresión del gene de la GS2 está regulado positivamente por luz aumentando su actividad y abundancia de RNAm en tejidos jóvenes y maduros, aunque en hojas maduras y en tejidos etiolados hay niveles basales de polipéptidos  $\delta$  (Lara *et al*, 1984; Edwards y Coruzzi 1989; Cock *et al*, 1991; Becker *et al*, 1992).

Algunas evidencias que involucran a la GS2 como la responsable de asimilar específicamente el amonio generado en la hoja son; la expresión de fusiones de GS-GUS en que se detecta la expresión de GS2 células del mesófilo de la hoja, en contraste con la expresión de GS1 que ocurre en células del floema (Forde *et al*, 1989; Edwards *et al*, 1990) y la acumulación de mRNA de GS2 en hojas de plantas cultivadas bajo condiciones de fotorrespiración (Edwards y Coruzzi, 1989).

La función *in vivo* de la GS2 cloroplástica se ha podido deducir a partir de los trabajos con plantas mutantes alélicas semidominantes de cebada que no pueden sintetizar GS2 y que no son capaces de sobrevivir en condiciones de fotorrespiración porque pierden la habilidad de reasimilar el amonio aún teniendo niveles normales de GS1 citosólica en hoja (Wallsgrave *et al*, 1987).

Se ha reportado también la presencia de polipéptidos de GS2 en plástidos de las células de raíz de varias especies de plantas aunque su función no ha sido aclarada. Woodall y Forde (1996) analizaron la actividad y la presencia de los polipéptidos de GS1 citosólica y GS2 plastídica en raíces de 55 especies de leguminosas abarcando plantas de diferentes subfamilias. Ellos encontraron que ambas isoformas están presentes en raíces de 35 plantas leguminosas de clima templado y que la mayoría de las 20 plantas leguminosas que solo contienen los polipéptidos de GS1 son leguminosas tropicales. Se sugiere una fuerte correlación entre el origen climático de las especies y la presencia o ausencia de la GS2 en las raíces acorde a la disponibilidad del nitrógeno en suelos de climas templados y suelos tropicales.

Estos resultados sugieren que la GS2 localizada en cloroplasto es esencial para asimilar el amonio producto de la fotorrespiración; que GS1 y GS2 presentes en hoja

están codificadas por genes nucleares independientes; que la función de cada isoenzima no es sobrelapable entre sí y que en hoja GS1 y GS2 tienen claros patrones específicos de expresión temporal y espacial.

Tampoco han sido muy claros los resultados respecto a la regulación de la GS2 por el suplemento exógeno de nitratos o de amonio, a diferencia de la regulación positiva que se observa para la GS1.

### **1.1.8 La síntesis de glutamina translocable por las isoformas de GS1 citosólicas.**

En las plantas leguminosas la GS1 citosólica y la GS<sub>n</sub> nódulo-específica ó GS nódulo-inducida se encargan de asimilar el amonio recién producido y excretado por los bacteroides fijadores de nitrógeno (Lam *et al*, 1996). La especificidad de la expresión de la GS<sub>n</sub> en nódulo se ha evidenciado: al aumentar su actividad paralelamente a la de la nitrogenasa y a la aparición de la leghemoglobina (Lara *et al*, 1983; Cullimore y Bennett, 1988); que se sintetiza durante el desarrollo del nódulo; que se encuentra sólo en nódulos efectivos (Cullimore *et al*, 1983; Lara *et al*, 1983, 1984; Padilla *et al*, 1987); y se ha reportado su presencia específica en nódulo de frijol (Bennet *et al*, 1989) y de soya (Sengupta-Gopalan y Pitas, 1986; Roche *et al*, 1993). En nódulos de chícharo (Tingey *et al*, 1987; Walker y Coruzzi, 1989) y de alfalfa (Dunn *et al*, 1988; Temple *et al*, 1995) se han localizado varios polipéptidos de GS1-inducibles que no se han considerado muy específicos de este órgano porque se han detectado también en otros órganos.

Como la GS citosólica es la enzima involucrada en la asimilación de amonio fijado por *Rhizobium* y los primeros estudios de los genes de GS1 citosólica se realizaron en leguminosas, se pensó que la multiplicidad de genes para GS1 evolucionó en estas plantas por su papel en la fijación simbiótica del nitrógeno (Lam *et al*, 1996). Sin embargo, el hallazgo como el de que *Arabidopsis* también contiene tres genes para GS citosólicas (Peterman y Goodman, 1990) sugiere que la familia evolucionó de manera independiente de la fijación de nitrógeno. Los altos niveles de expresión de estos tres genes de *Arabidopsis* en raíces y la expresión de dos de ellos durante la germinación, sugiere el papel de la GS1 para la síntesis de glutamina transportable (Peterman y Goodman, 1990). En estudios con fusiones promotor GS-GUS en chícharo (Edwards *et al*, 1990) y de inmunolocalización en plantas de tabaco (Carvalho *et al*, 1992) se observó que GS1 se expresa en elementos del floema, lo cual apoya el papel de GS1 de generar glutamina para el transporte intercelular de nitrógeno. En las raíces la GS1 participa en asimilar el amonio de la solución del suelo (Roche *et al*, 1993).

La expresión de los genes que codifican a las diferentes GS1 citosólicas puede estar o no condicionada por la fuente nitrogenada. En soya se ha reportado la regulación positiva de GS de raíz y/ó nódulo por amonio suplementado ya sea de manera exógena (10mM de  $\text{NH}_4^+$ ) ó proveniente de la fijación de nitrógeno en los nódulos (Hirel *et al*, 1987). En plantas de *Lotus* transformadas con el promotor de la GS citosólica de soya inducible (Hirel *et al*, 1987), se observó también regulación positiva por amonio, pero no en plantas transgénicas de tabaco (Miao *et al*, 1991). En frijol tampoco se ha observado incremento en la expresión de GS1 por suplemento exógeno de amonio (Cock *et al*, 1990). En maíz el efecto de la adición de nitrato (10 mM) y de amonio (10 mM) reveló que en solo dos de las cinco isoformas citosólicas identificadas hay regulación positiva: por nitrato en raíz y por amonio en hoja (Sukanya *et al*, 1994).

Con estos datos simplemente se ilustra la complejidad de la regulación fisiológica de las isoformas de la GS como un reflejo de la diversidad y el patrón de expresión diferencial de cada isoenzima.

## **1.2 LA INGENIERIA GENETICA DE PLANTAS PARA MODIFICAR LA EXPRESION DE GENES ESPECIFICOS.**

La ingeniería genética comprende a una serie de herramientas moleculares que permiten manipular el material hereditario de un organismo. Esta manipulación genética ha sido posible gracias al conocimiento cada vez más amplio y más profundo de los principios que rigen la herencia en los seres vivos. La ingeniería genética de plantas es solo el refinamiento de técnicas antiquísimas de manipulación de las plantas realizada por el hombre desde tiempos remotos para obtener organismos modificados o mejorados. En las dos últimas décadas sus posibilidades aplicativas para el mejoramiento de cultivos ha progresado gracias al desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, de sistemas para transferir genes a las plantas superiores y de sistemas para la obtención de plantas transformadas a partir de una célula, órgano o tejido.

### **1.2.1 Transformación genética de plantas por *Agrobacterium tumefaciens*.**

El proceso por el cual una célula incorpora DNA exógeno se conoce como transformación genética. La transformación genética vegetal es la generación de plantas transformadas que porten un gene extraño de manera estable en su genoma y que pueda heredarse en cada división celular.

La introducción de este DNA extraño a las células de la planta puede realizarse a

través de patógenos naturales de las plantas como lo es la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal de una enfermedad conocida como "agalla del cuello de la corona" que forma un tumor en la planta y afecta a un gran número de especies de dicotiledóneas.

El mecanismo de infección natural de esta bacteria gram (-) se debe a que las cepas patógenas de *Agrobacterium* contienen un plásmido, el plásmido Ti ("inductor del tumor") responsable de la formación del tumor; la bacteria sin este plásmido no es capaz de producir el tumor (van Larekebe *et al*, 1985). La infección de la célula vegetal ocurre cuando una región del plásmido Ti llamada T-DNA (DNA-transferible) es transferida y dirigida al genoma vegetal (Chilton *et al*, 1980). El T-DNA está delimitado por dos secuencias "bordes" de 25 pares de bases repetidas directas, esenciales para su transferencia (Yadav *et al*, 1982; Barker *et al*, 1983). Internamente, el T-DNA codifica genes para enzimas que intervienen en la síntesis de precursores del ácido indolacético y de citocininas, que son hormonas vegetales cuyos niveles elevados de producción son los responsables del crecimiento anormal que tipifica la enfermedad (Klee *et al*, 1987; Kado, 1991). También en el T-DNA están codificadas enzimas para la síntesis de compuestos nitrocarbonados llamados opinas (nopalina, octopina, agropina) que sirven como fuente de carbono y nitrógeno a la bacteria misma (Kado, 1991; Hoykaas y Schilperoort, 1992). Podría decirse que la bacteria al infectar a la célula vegetal la utiliza como "fábrica de alimentos".

Cualquier DNA incluido en esta región del T-DNA entre los bordes puede ser movilizado al genoma vegetal. En este proceso participan una serie de proteínas que procesan, protegen y dirigen al T-DNA en su tránsito hacia el núcleo de la célula vegetal. Estas proteínas están codificadas fuera del T-DNA en el plásmido Ti en la región *vir* ("genes de virulencia") que contiene varios genes organizados en 8 operones (*virA-virH*) que están co-regulados (Hoykaas y Schilperoort, 1992). El control de la expresión de los genes *vir*, está mediado por las proteínas VirA y VirG que actúan como un sistema regulatorio de dos componentes. La proteína VirA actúa como "sensor" de compuestos fenólicos liberados por tejidos heridos de la planta susceptibles de ser infectados por *Agrobacterium*. La proteína VirA dispara su actividad de cinasa y se autofosforila. Esta señal es recibida por VirG que a su vez activa al resto de los genes *vir*. Las proteínas VirD1 y VirD2 reconocen específicamente las secuencias de los "bordes" que delimitan al T-DNA en el plásmido Ti y producen cortes de enlaces nucleotídicos para generar la "hebra-T" (T-DNA). La proteína Vir D2 permanece covalentemente unida al extremo 5' de la hebra-T formando el "complejo-T", que conserva su integridad en su tránsito hasta el

núcleo de la célula vegetal, gracias a que varias proteínas VirE también se asocian al complejo protegiéndolo de la acción de nucleasas. Se presume que varias proteínas codificadas por el locus VirB participan en la exportación del complejo-T. Se desconoce aún el mecanismo preciso de como ocurre el tránsito exitoso del complejo-T hasta el núcleo de la célula vegetal. La integración estable del DNA extraño al cromosoma de la planta es el paso final de este sistema de transferencia del T-DNA. (Binns y Tomashow, 1988; Kado, 1991; Hoykaas y Schilperoort, 1992; Zupan y Zambryski, 1995).

### 1.2.2 Obtención de plantas transformadas con genes quiméricos.

El conocimiento de este mecanismo natural de transformación de las células vegetales ha permitido utilizar al T-DNA como vector o transportador de genes de interés para transformar células vegetales. Los oncogenes del T-DNA, que codifican a los precursores de hormonas que inducen la formación del tumor, pueden ser reemplazados por los genes que se deseen introducir a las plantas de interés. Para lograr la expresión de un "gene quimérico" o extraño a la planta, se debe unir a una secuencia promotora y a un sitio de poliadenilación funcionales en plantas (Herrera-Estrella *et al*, 1983). Las secuencias promotoras incluidas en estas construcciones quiméricas han sido: promotores nativos cuya expresión esté condicionada al control metabólico o espacial (tejido-específico); ó a promotores constitutivos, que permitan la expresión continua del gene al que controlan.

Para identificar a las células, tejidos o plantas transformadas establemente se utilizan "genes reporteros", generalmente de procedencia procariótica y que codifican a enzimas detectables en los tejidos transformados utilizando los sustratos adecuados. Algunos genes reporteros que se han utilizado en las construcciones quiméricas son los que codifican a las enzimas: nopalino sintetasa (NOS); cloramfenicol acetil transferasa (CAT); luciferasa;  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), este último codificado por el gene *gus* (*uidA*), uno de los genes reporteros más ampliamente utilizado. Para seleccionar a los tejidos transformados también suelen utilizarse "genes marcadores de selección" que usualmente confieren resistencia a algún antibiótico ó a un herbicida. Algunos genes marcadores utilizados en las construcciones quiméricas son: *nptII* (neomicina fosfotransferasa) que confiere resistencia a los antibióticos neomicina, kanamicina y G-418; *hyh* que confiere resistencia a higromicina y el gene *bar* que sintetiza a la fosfinotricina-acetiltransferasa (PAT) capaz de reaccionar con el herbicida Bialaphos (Herrera-Estrella *et al*, 1983; Jefferson *et al*, 1987; De Block *et al*, 1987).

Con estos elementos, se han desarrollado diversos tipos de vectores, empleando varias cepas de *A. tumefaciens* siendo este el sistema más eficiente para la introducción y expresión de genes en plantas dicotiledóneas. También se han implementado técnicas de infección, transformación y obtención de plantas transformadas pero aún no es posible describir un método general para transformar cualquier planta.

Aunque no todas las especies vegetales son susceptibles de ser transformadas genéticamente por esta vía, como los cereales, se han obtenido plantas transformadas genéticamente de: *Arabidopsis thaliana* (Lloyd *et al*, 1986); de Solanáceas como: tabaco (Horsch *et al*, 1985; De Block *et al*, 1987); *Petunia* (Horsch *et al*, 1985) y tomate (McCormick *et al*, 1986); de leguminosas como alfalfa (Shahin *et al*, 1986), *Lotus corniculatus* (Petit *et al*, 1987) y *L. japonicus* (Handberg y Stougaard, 1992); entre otras especies vegetales. Debido a la relativa facilidad y tiempo corto (de 4-6 meses) para la obtención de plantas transgénicas, los sistemas de transformación con tabaco, *Lotus* y *Arabidopsis* han sido empleados como "sistemas modelo" y son utilizados para el estudio de la expresión genética de plantas.

La expresión de genes extraños en las plantas transgénicas se ha realizado en: (1) sistemas homólogos, esto es, obtener plantas transformadas con un gene de otra planta de la misma especie; (2) ó en sistemas heterólogos en que las plantas están transformadas con un gene ortólogo al gene nativo procedente de otra especie vegetal.

### **1.2.3 El uso de fusiones génicas entre promotores nativos de la GS y el gene reportero de *gus*.**

Para identificar la actividad *in vivo* de GS1 y GS2 se han utilizado fusiones del gene reportero de GUS bajo el control de secuencias promotoras de algunas isoformas de GS en plantas transgénicas de *Lotus* y de tabaco. Con esta estrategia se confirmó la expresión específica de *gln-δ* en nódulo y de *gln-β* en raíz de *Phaseolus* en plantas transformadas de *Lotus* (Forde *et al*, 1989). También con fusiones de las regiones promotoras de GS1 y de GS2 con GUS se observó claramente el patrón de expresión diferencial de GS1 en células del floema y de GS2 en células del mesófilo en hoja de plantas transgénicas de tabaco (Edwards *et al*, 1990). Con esta estrategia también se ha estudiado la regulación de algunas de las isoformas de GS. Dos trabajos al respecto son: el trabajo de Miao *et al*. (1991), en que se observó que la expresión de una GS1 de soya inducible por amonio externo también ocurre en raíces de otra planta leguminosa como lo es *Lotus*, más no en raíces de plantas transformadas de tabaco; y Cock *et al*,



(1992), observaron que el gene de *gus* bajo el control del promotor del gene *gln- $\delta$*  (GS2) de *Phaseolus* se induce por luz en hoja de plantas de tabaco transformadas.

### 1.3 MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GS EN LAS PLANTAS.

Otra estrategia para conocer más acerca de la regulación de enzimas como la GS en las plantas ha sido alterar sus niveles de expresión. Se ha observado que esta alteración en algunas ocasiones puede darle a las plantas características que pueden ser una ventaja como adquirir resistencia a plagas y herbicidas ó aumentar el rendimiento. De ahí que estas estrategias se comenten a continuación.

#### 1.3.1. La inhibición de la actividad de la GS con TBL.

La alteración de la actividad de la GS con efectos favorables en el crecimiento de las plantas, se ha observado utilizando la tabtoxina- $\beta$ -lactama (TBL) que es un inhibidor específico de la GS producido por algunas cepas de *Pseudomonas syringae*, patógeno natural de varias especies de plantas presente en la rizósfera. Esta pseudomona produce y libera la TBL que es un aminoácido que puede ser tomado por las raíces. Una molécula de TBL se une a cada subunidad de la GS en el mismo sitio activo del glutamato (Knight *et al*, 1988).

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, que ha sido la mas caracterizada, infecta a las hojas de su hospedero natural que es tabaco, donde el blanco de TBL es la GS2. En estas hojas los niveles de amonio se incrementan a concentraciones tóxicas y las plantas no sobreviven (Turner y Debage, 1982).

La TBL es un inhibidor irreversible, pero no de todas las isoenzimas de GS de plantas. En avena, *P. syringae* pv. *tabaci* infesta la raíz y las plantas mueren por la inactivación irreversible de las isoformas de GS de raíz y de hoja. Sin embargo, Knight y coautores (1988) identificaron a un pequeño grupo de plantas de avena que mostraron resistencia natural a la infección. Estas plantas tolerantes tuvieron un desarrollo normal y la actividad de GS en hoja fué similar al de las plantas no infestadas. Estos resultados junto con ensayos *in vitro* de las isoformas de GS de raíz y de hoja y su respuesta ante la TBL, demostraron que la isoforma de GS de raíz se inactiva; en cambio, las isoformas citosólica y cloroplástica de hoja son insensibles parcialmente a la TBL.

En leguminosas la inactivación selectiva de GS por esta pseudomona es un poco diferente, como lo reporta el trabajo de Knight y Langston-Unkefer (1988). La infestación de plantas de alfalfa y de soya sin nodular provocó la disminución de la actividad de la GS y la muerte de las plantas. Plantas noduladas de alfalfa, en cambio, no solo

sobrevivieron, sino que la infestación con *P. syringae* pv. *tabaci* produjo efectos benéficos a su crecimiento y desarrollo. Estas plantas tolerantes mostraron: incremento en el número de nódulos fijadores de nitrógeno; mayor peso seco en nódulo; mayor actividad de la nitrogenasa y el peso fresco y seco del follaje fué casi duplicado con respecto a las plantas no infestadas. En cambio, la actividad de la GS de raíz fué totalmente inhibida por la TBL y la actividad de la GS de nódulo disminuyó al 50%. En estas plantas las pozas de glutamato y de amonio reportaron un aumento y casi no se detectó glutamina. Se sugiere que acaso el glutamato podría haber funcionado como molécula regulatoria positiva e influir aumentando la actividad de la nitrogenasa de los bacteroides y que además pudieron haberse desencadenado rutas alternativas de asimilación del nitrógeno a través de la de GDH y/o de la aspargino sintetasa, lo que colectivamente derivó en beneficiar a estas plantas. Esta interacción benéfica a las plantas entre el patógeno y *Rhizobium* sugiere que el mejoramiento de la fijación de nitrógeno puede ser dependiente de la alteración de la GS (Knight y Langston-Unkefer, 1988), aunque no es claro como ocurrió este mecanismo.

### 1.3.2 Inhibición de la expresión por RNA en "antisense".

Otra estrategia de modulación de la expresión de genes específicos en plantas transformadas es la inhibición por RNA en antisentido ó "antisense mRNA". El RNA en "antisense" es un mecanismo de regulación genética natural en bacterias (Green *et al*, 1986) que controla la replicación de algunos plásmidos, la lisogenia de virus, la transposición del IS10 y la síntesis de las proteínas reguladoras OmpF y Crp de *E. coli* (Eguchi *et al*, 1991). El posible mecanismo de inhibición es que: si la orientación de lectura de un gene se encuentra en sentido contrario o en "antisense" con respecto a su promotor, se sintetiza una cadena de RNA llamada "antisense"-RNA. Este "antisense"-RNA tiene una secuencia complementaria al RNAm del gene nativo con orientación de lectura directa por lo que ambas se pueden aparear formando un "dúplex" o RNA de doble cadena que no puede ser traducido. En general el mecanismo de inhibición de "antisense" en bacterias ocurre a nivel de la traducción (Green *et al* 1986).

Ante la dificultad de seleccionar algunas mutantes en plantas, esta metodología es una alternativa para obtener variantes genéticas que permitan determinar el papel de un producto involucrado en algun proceso fisiológico clave. El hallazgo de que el RNA en "antisense" pueda inhibir la traducción del RNA en sistemas naturales ha llevado al desarrollo de estrategias artificiales para regular genes con construcciones quiméricas del gene blanco en "antisense" bajo el control de promotores inducibles ó de promotores

constitutivos (Green *et al*, 1986). El gene blanco en "antisense" se diseña invirtiendo la secuencia codificadora de la proteína blanco con respecto al promotor para inhibir específicamente la expresión del gene análogo (Izant y Weintraub, 1985).

Los primeros trabajos en que se logró la inhibición por "antisense" fueron utilizando sistemas "artificiales" donde se inhibió la expresión de los genes reporteros de CAT (Ecker y Davis, 1986; Delauney *et al*, 1988), NOS (Rothstein *et al*, 1987) y GUS (Robert *et al*, 1992) en células en cultivo y en plantas transgénicas.

La inhibición genética por "antisense" en sistemas homólogos de plantas se logró inicialmente en plantas de tabaco y de *Petunia* por la introducción en "antisense" del gene de la chalcona sintasa (CHS) (van der Krol *et al*, 1988a, b, 1990). Las plantas transgénicas expresaron el "antisense"-RNA de CHS mostrando patrones alterados en el color de sus flores. Otros ejemplos en sistemas homólogos que pueden dar ventajas aplicativas han sido: la inhibición de poligalacturonasa (PG) en tomate que promueve la maduración del fruto (Sheehy *et al*, 1988; Smith *et al*, 1988) y la obtención de plantas de tabaco resistentes a virus por la expresión de un "antisense"-RNA específico de la proteína de la cápside viral (Powell *et al*, 1989).

El mecanismo molecular preciso de inhibición de genes específicos en plantas se desconoce aún. Se ha postulado que en estos sistemas homologos, el dúplex de RNA no puede salir del núcleo al citoplasma, además de que es muy inestable, es degradado por nucleasas por lo que se interrumpe su procesamiento y traducción (Lichtenstein, 1988; van der Krol *et al*, 1988b; Robert *et al*, 1992).

En sistemas heterólogos se ha reportado en papa la inhibición de la proteína que sintetiza gránulos de almidón de yuca (Salehuzzaman *et al*, 1993) y en tabaco la inhibición de la hidroxipiruvato reductasa de pepino (Oliver *et al*, 1993), pero a diferencia de los sistemas homólogos la inhibición de la enzima blanco es una inhibición parcial.

La inhibición de GS por RNA en "antisense" se ha reportado en dos trabajos. Se utilizó un gene de GS1 citosólica de alfalfa en "antisense" bajo el control del promotor 35S para transformar plantas de alfalfa (sistema homólogo), *Lotus* y tabaco (Temple *et al*, 1993, 1994). En alfalfa y *Lotus* se obtuvieron plantas con follaje clorótico y desarrollo incompleto de la hoja, algunas de las cuales no sobrevivieron. Las plantas que sobrevivieron se logaron cultivar en maceta y fueron indistinguibles de las plantas control. En este material no hubo disminución de la concentración del polipéptido de GS1, ni se detectó transcrito del gene de GS en "antisense"-RNA de GS, ni la disminución del nivel de RNAm de la GS nativa. En cambio, en las plantas transgénicas de tabaco sí disminuyó la actividad de GS en 30%, hubo menor abundancia del polipéptido de GS1

en hoja, se detectó un aumento en el nivel de transcrito de la GS en "antisense", pero no disminuyó el RNAm nativo por lo que se discute que el mecanismo de inhibición en este material pudiera haber sido a nivel post-transcripcional, no se abunda más al respecto.

### **1.3.3 La alteración de la GS y la tolerancia a L-PPT.**

La alteración de la actividad de la GS con herbicidas también ha aportado otros resultados interesantes. Las plantas también son susceptibles al inhibidor L-fosfinotricina (L-PPT) que es el componente activo del antibiótico Bialaphos, producido por varias especies de *Streptomyces*. El L-PPT es un análogo del glutamato y es un potente inhibidor de la actividad de la GS (Leason, 1982, De Block *et al*, 1987). Esta inhibición provoca la acumulación rápida de amonio libre en la célula vegetal con la consecuente ruptura de la estructura de cloroplasto y la consecuente disminución de la tasa fotosintética y la muerte celular. Aplicado a las plantas directamente provoca la muerte por lo que comercialmente se utiliza como un herbicida no selectivo. Utilizando la estrategia de la selección de células cultivadas *in vitro* de alfalfa expuestas a concentraciones elevadas de L-PPT, se logró obtener una línea celular resistente a este inhibidor (Donn *et al*, 1984). Estas células resistentes mostraron niveles de actividad de la GS aumentados de 3 a 7 veces lo cual fué consecuencia de la amplificación en 4 a 11 veces del gene que codifica para una forma citosólica de GS y un incremento en aproximadamente 8 veces en los niveles de RNA (Donn *et al*, 1984). Aún en presencia del inhibidor, la sobreexpresión de la GS en estas células resistentes al parecer permitió suficiente actividad enzimática para reducir los niveles tóxicos de amonio. Sin embargo, de esta línea celular no se obtuvieron plantas. Posteriormente Eckes y coautores (1989) obtuvieron plantas transgénicas que incrementaron su resistencia a L-PPT en 20 veces como consecuencia de la sobreexpresión de la GS inducida en estas plantas.

### **1.3.4 La sobreexpresión de la GS con genes quiméricos.**

La expresión constitutiva de un gene quimérico en plantas se ha logrado al utilizar los llamados "promotores fuertes" que inducen la expresión continua del gene al que están controlando. Algunos promotores fuertes para plantas han sido: el promotor de NOS (nopalino sintetasa) derivado del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Herrera-Estrella *et al*, 1983) y los promotores 19S y 35S derivados del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El genoma del CaMV es una molécula circular de ADN de doble cadena de aproximadamente 8 kilobases de longitud (Gardner *et al*, 1981). En el hospedero infectado se producen dos transcritos: (1) el 35S, que corresponde al transcrito del

genoma viral entero y (2) el 19S, que es una porción del genoma que corresponde a la proteína que ensambla a la partícula viral (Odell *et al*, 1985). El promotor 35SCaMV ó simplemente 35S, ha sido uno de los promotores fuertes más utilizado en las construcciones quiméricas para sobreexpresar genes en plantas transformadas.

La sobreexpresión de genes quiméricos en plantas se ha reportado tanto en sistemas homólogos como en sistemas heterólogos. En sistemas homólogos se ha reportado la sobreexpresión de: chalcona sintasa (CHS) (van der Krol *et al*, 1990; Napoli *et al*, 1990; Jorgensen *et al*, 1996); dihidroflavonol reductasa (DFR) (van der Krol *et al*, 1990); nitrato reductasa (NR) (Dorlhac de Borne *et al*, 1994); nitrito reductasa (NiR) (Vaucheret *et al*, 1995) y de GS (Temple *et al*, 1994). En los sistemas de CHS, DFR, NR y NiR, contrariamente a lo esperado, en el material transgénico disminuyó la síntesis y la actividad de la proteína blanco por un efecto de supresión post-transcripcional en el que los transcritos y/o el RNAm nativo del gene blanco se degradaron (van Blockland *et al*, 1994). Napoli *et al* (1990) acuñaron el término de co-supresión para explicar la reducción de la expresión de un gene nativo como consecuencia de la sobreexpresión de un transgene homólogo. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de este efecto de co-supresión, las posibles explicaciones a este fenómeno son: interacciones entre las hebras de RNA en el proceso de la transcripción ó con la cadena dúplex de DNA dando una posible estructura tríplex ó con la hebra de DNA cuando se separa durante la transcripción (van der Krol *et al*, 1990) ó a un efecto posicional ó a la dosis génica aumentada ó a un incrementado nivel de metilación del DNA (Matzke *et al*, 1994).

También, el efecto de la sobreexpresión es, como se espera, el aumento de la expresión de la proteína blanco. En el sistema homólogo de alfalfa, se logró la sobreexpresión de la GS, sólo que el balance fisiológico de las transformantes se alteró a niveles letales (Temple *et al*, 1994). En los sistemas heterólogos de sobreexpresión de la GS (Eckes *et al*, 1989, Temple *et al*, 1993, 1994, Vincent *et al*, 1997), los niveles de sobreexpresión han sido menos drásticos, con lo que se han logrado obtener plantas. En este material se evaluó la expresión aumentada de la GS en términos de actividad específica, síntesis de polipéptidos y abundancia de RNAm. Estos resultados se discutirán más adelante por ser estrategias similares a las de nuestro trabajo.

De acuerdo a estos trabajos, se puede decir, que la modulación de la expresión de algunas enzimas ha sido una buena estrategia para estudiar su función y conocer su regulación metabólica. Además, la alteración de la actividad de la GS, ha reportado también efectos beneficios a las plantas como se observa en los trabajos con inhibidores.

La ingeniería genética de plantas ofrece la posibilidad de sobreexpresar genes con el uso de promotores fuertes ó de inhibirlos con la tecnología del RNA en “antisense”, lo cual supera la dificultad de obtener plantas mutantes por otros sistemas. Además, con la modulación parcial de la expresión genética utilizando sistemas de transformación heterólogos, se pueden evitar los efectos de los sistemas homólogos en los que las plantas no sobreviven por la alteración significativa de una enzima metabólicamente importante como la GS (Temple *et al* ,1994). Hasta ahora, sólo se conocen algunos aspectos de la regulación de algunas de las isoformas como la regulación positiva por luz o por amonio de algunas de las isoformas pero hace falta abundar más sobre la regulación de otros miembros de la GS. Poco se sabe aún del significado funcional de tener varios miembros de genes de GS1 citosólica que parecen estar controlados por varios factores.

El interés de este proyecto es contribuir al conocimiento de la función y regulación de la GS1 en las plantas para lo cual también se modulará la expresión de la GS por sobreexpresión o por inhibición parcial con RNA en “antisense” en plantas transgénicas. Este proyecto se inició hace algunos años bajo la dirección de la Dra. Georgina Hernández. Durante este tiempo, en nuestro laboratorio, se obtuvieron plantas transformadas de tabaco y de alfalfa con *A. tumefaciens* utilizando dos construcciones quiméricas de la GS en “antisense” y de la GS en sentido directo bajo el promotor 35S (Figura 2). Sin embargo, este material transgénico no se había caracterizado.

Las construcciones quiméricas para transformar alfalfa y tabaco se hicieron a partir del plásmido pGS100 que contiene el cDNA de un gene que codifica para una GS1 de una línea celular de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Das Sarma, *et al.* 1986). Este gene de GS1 citosólica se colocó: (1) en “antisense” con respecto al promotor; (2) ó en sentido directo bajo el control de un promotor fuerte de la transcripción (Figura 2).

Se escogió alfalfa por ser una planta leguminosa en la que es importante conocer mejor la función de las GS1 en la asimilación del amonio y en la fijación del nitrógeno, además de que su microsimbionte *Rhizobium meliloti* es uno de los mejor caracterizados. Sin embargo, los sistemas de transformación de leguminosas suelen ser difíciles, poco eficientes y toma varios meses la obtención de material regenerado. A pesar de ello, se realizó un ciclo de transformación genética de plantas de alfalfa y se obtuvieron algunas plantas. En las plantas que sobreexpusieron la GS se observó que el color del follaje era más oscuro y que al transplantarlas a macetas no sobrevivían, a menos que fueran regadas con L-glutamato como fuente de nitrógeno. Al parecer, esta apariencia fué un efecto de la expresión aumentada de GS. Las plantas con la

construcción de GS en "antisense" no mostraron ningun fenotipo distinto obvio. Desgraciadamente este material no se caracterizó ni se logró conservar.

El sistema de transformación genética de tabaco por el método de disco de hoja, descrito por Horsch *et al.* (1982) es un sistema sencillo, muy eficiente y rápido, por lo que se utilizó para obtener plantas transformadas con las dos construcciones con el gene de GS1 citosólica de alfalfa (Figura 2).

En las plantas de tabaco que se obtuvieron se comprobó la presencia de GUS utilizando el sustrato 4-metilumbeliferilglucurónido (MUG) (Jefferson, 1987). También se hicieron ensayos de actividad específica de la GS en hoja. Se obtuvieron alrededor de 150 plantas que mostraron diferentes niveles de expresión de la GS pero no se caracterizaron molecularmente. Muchas de estas plantas crecieron en invernadero y formaron semillas. En la actualidad se tienen semillas de plantas transformadas con las construcciones: pGH114 para sobreexpresar a la GS; con pGH117 que tiene el gene de GS en "antisense" y con pBI121 como control.

En este trabajo se propone continuar la caracterización del material transgénico de tabaco transformado con el gene de la GS de alfalfa (sistema heterólogo) partiendo de la progenie (R1) derivada de las plantas transgénicas originales. Se cuantificará el nivel de aumento ó disminución de la GS. Además, se espera detectar alguna característica fenotípica distintiva como efecto de la alteración y si esta le representa alguna ventaja a las plantas. Finalmente, se pretende evaluar las consecuencias fisiológicas de la alteración de una de las enzimas más importantes en el metabolismo nitrogenado, de acuerdo a los objetivos que se plantean a continuación.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general.

Caracterizar molecular y fisiológicamente plantas transgénicas de tabaco en las que la expresión de la glutamino sintetasa se alteró: inhibida parcialmente o sobreexpresada constitutivamente.

### 2.2 Objetivos particulares.

2.2.1 Obtener poblaciones R1 de plantas de tabaco (*N. tabacum* cv. Xanthi) transformadas con las construcciones quiméricas de la GS: pGH117 (Figura 2); pGH114 (Figura 2) y con pBI121 (Figura 2) como control.

2.2.2 Demostrar que las plantas R1 de tabaco están establemente transformadas .

2.2.3 Determinar si la expresión de la GS en las plantas transgénicas que portan los genes de la GS en "antisense" y en "sense" está alterada :

2.2.3.1 Cuantificar la concentración del mRNA de la GS.

2.2.3.2 Cuantificar la concentración de la proteína de la GS.

2.2.3.3 Cuantificar la actividad específica de la GS.

2.2.4 Caracterizar fisiológicamente a las plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la GS al mantenerlas en fuentes de nitrógeno inorgánico *versus* orgánico (adicionando glutamato):

2.2.4.1 Cuantificar la actividad específica de la GS.

2.2.4.2 Cuantificar la proteína total soluble.

2.2.4.3 Cuantificar la concentración de clorofila.

2.2.5 Caracterizar fisiológicamente a las plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la GS crecidas con diferentes concentraciones de amonio como fuente de nitrógeno:

2.2.5.1 Cuantificar el crecimiento.

2.2.5.2 Cuantificar la proteína total soluble.

2.2.5.3 Cuantificar la actividad específica de la GS.

2.2.5.4 Cuantificar la concentración de clorofila.



### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. TRANSFORMACION GENÉTICA DE TABACO CON LOS TRANSGENES DE GS DE ALFALFA.

##### 3.1.1. Cepas bacterianas y construcción de los plásmidos.

Las plantas de tabaco R1 provienen de material transformado genéticamente por *Agrobacterium tumefaciens* con los plásmidos cuyo diseño se describe a continuación.

Para transformar las plantas de tabaco con la GS de alfalfa se utilizó un fragmento de 1.56 kilobases (Kb) de *Accl* a *EcoRI* del plásmido pGS100 (DasSarma *et al.*, 1986) que contiene la secuencia codificadora completa de una GS1 citosólica de alfalfa. Este fragmento se clonó entre el promotor p35S y el terminador de la transcripción del gene de nopalino sintetasa NOST utilizando el vector intermediario pVW278.

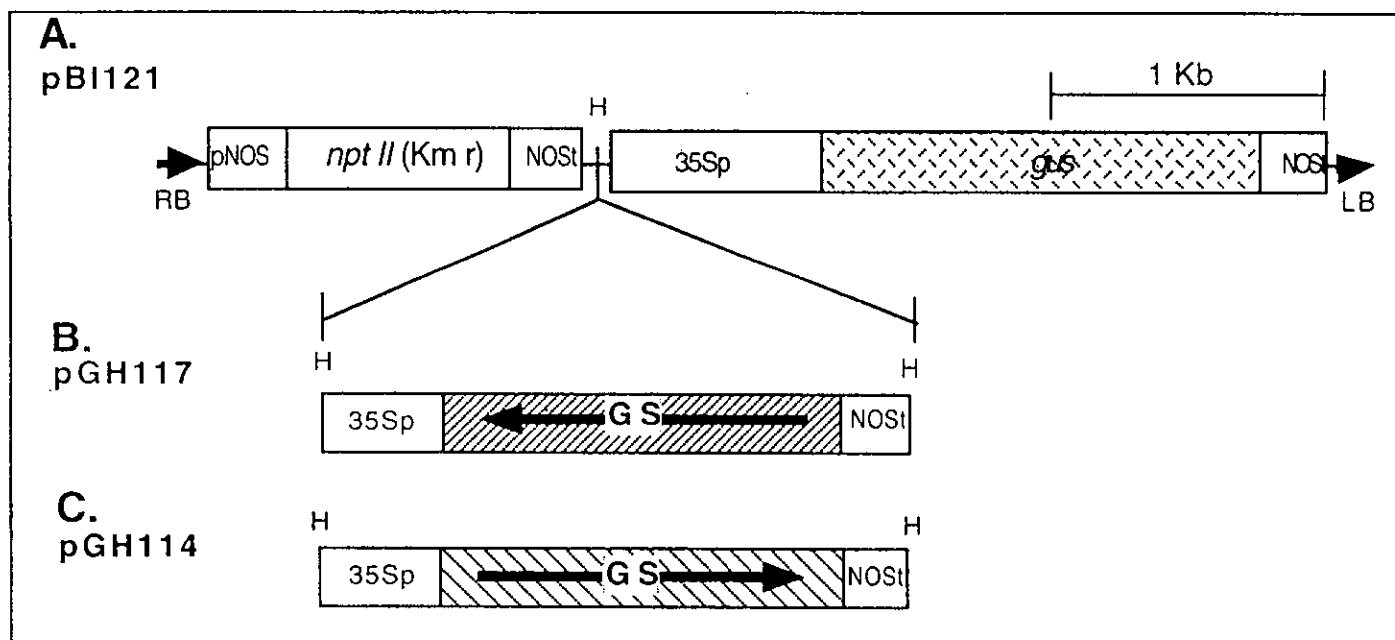


Figura 2. Plásmidos utilizados para transformar genéticamente a las plantas de tabaco. **A. T-DNA del plásmido pBI121:** LB y RB representan a los bordes derecho e izquierdo o secuencias límite del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*; *npt II*: es el gene de neomicino fosfotransferasa colocado entre el promotor pNOS y el terminador de transcripción NOST de nopalino sintetasa; *gus*: gene de  $\beta$ -glucuronidasa colocado entre el promotor 35S (pCaMV) y el terminador NOST. **B. Plásmido pGH117.** GS es el gene de GS1 de alfalfa (Das Sarma *et al.*, 1986) orientado en sentido inverso, entre el p35S y NOST. Esta construcción se clonó en el sitio *HindIII* (H) entre los genes marcadores *npt II* y *gus* del pBI121. **C. Plásmido pGH114.** GS es el gene de GS1 de alfalfa (Das Sarma *et al.*, 1986) orientado en sentido directo, entre el p35S y NOST. Esta construcción se clonó en el sitio *HindIII* (H) entre *npt II* y *gus* del pBI121.

Los plásmidos resultantes pGH220 y pGH219B, que son vectores intermediarios derivados de pBR, contienen respectivamente el gene de la GS de alfalfa en orientación indirecta ó "antisense" y directa ó "sense" con respecto al p35S. Toda la región de p35S-GS-NOST de los plásmidos pGH220 y pGH219B se clonó en el sitio *HindIII* del plásmido pBI121 (Jefferson, 1987) entre los genes reportero de *gus* y el marcador de selección *nptII* (*Kmr*), dando origen a los plásmidos pGH117 con el gene de GS en "antisense" y pGH114 con el gene de la GS en "sense" (Figura 2). El plásmido pBI121 sin el gene de la GS se utilizó para transformar genéticamente a las plantas como control.

A su vez, los plásmidos pGH114, pGH117 y pBI121 (Figura 2) se movilizaron por conjugación de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* a la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Esta es una cepa desarmada tipo octopina LBA4404 que ha sido utilizada para transformar exitosamente tabaco entre otras plantas (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987).

### 3.1.2. Transformación genética de las plantas.

Básicamente se siguió el procedimiento de transformación de disco de hoja descrito por Horsch *et al.* (1985) para obtener plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi. Se hicieron cortes de hoja que se cocultivaron durante 3 días con una suspensión de *Agrobacterium* y 50  $\mu$ M de acetosiringona para inducir a los genes de virulencia de *Agrobacterium* (Chabaud *et al.*, 1988). Las plantas establemente transformadas se obtuvieron por organogénesis en un medio MS4 (Murashige y Skoog, 1962) con 0.3 mg/l de ác. indolacético (AIA) y 10 mg/l de dimetilaminopurina (DMAP). Se seleccionaron transformantes adicionando a este medio 50  $\mu$ g/ml de kanamicina ( $Km^{50}$ ) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987). Los brotes comenzaron a aparecer durante la cuarta semana. Se incubaron en el medio para enraizar MS con 0.2 mg/l de AIA y  $Kn^{100}$ . Las plantas en cultivo de tejidos se incubaron a 22°C  $\pm$  2°C con un fotoperíodo de 16h luz/8h de oscuridad. A las ocho semanas en que desarrollaron raíces se transplantaron a macetas con vermiculita y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero. Estas plantas formaron flores que por autofecundación generaron frutos y semillas.

## 3.2. GERMINACION, CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS PLANTAS DE TABACO.

### 3.2.1. Germinación, cultivo y selección de las plantas R1 de tabaco.

Para este trabajo se escogieron las semillas (R1) de las siguientes plantas de tabaco transformadas: plantas No. 51, No. 154 y No. 156 transformadas con el plásmido pGH117 ó plantas 35S-GS en "antisense"; plantas No. 65 y No. 148 transformadas con

el plásmido pGH114 ó plantas 35S-GS en "sense" y como control se escogieron a las plantas No. 21, No. 41 y No. 44 transformadas con pBI121.

Las semillas de tabaco, se desinfectaron bajo condiciones asépticas de la siguiente manera: se remojaron en etanol al 85% durante 1 minuto; se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% durante 5 minutos seguido de 4 enjuagues con agua destilada estéril. En el último enjuague con agua se dejaron remojando durante 12-16 h. De nuevo se enjuagaron en la solución de hipoclorito de sodio durante 30 segundos y finalmente se lavaron de 4 a 5 veces con agua destilada estéril a fin de eliminar totalmente los residuos del agente desinfectante.

Las semillas se sembraron en cajas de petri con medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% Km<sup>100</sup>. Al igual que en las plantas transformadas obtenidas por el método de disco de hoja, estas plántulas R1 se crecieron en presencia de kanamicina como agente selectivo. Se incubaron durante 24h en obscuridad y luego se expusieron a fotoperíodo de 16h luz/8h obscuridad en una cámara de incubación Lab-Line con temperatura controlada de 22°C ± 2°C. Cada semana se resembró este material a cajas con medio fresco y en la octava semana las plantas se resembraron individualmente en frascos Gerber o en cajas Magenta con MS al 50% Kn<sup>100</sup> en donde permanecieron dos semanas más. Posteriormente las plantas se sembraron en macetas con vermiculita estéril cubiertas con plástico y regadas con las sales inorgánicas de MS al 50%. Se mantuvieron en un cuarto de incubación con fotoperíodo de 16h luz/ 8h obscuridad y con temperatura controlada de 22°C ± 2°C.

### **3.2.2. Crecimiento y mantenimiento de las plantas de tabaco.**

Las plantas de tabaco transformadas que se germinaron asépticamente, de aproximadamente 3 meses de edad se transplantaron a macetas con vermiculita como sustrato y se mantuvieron en un cuarto de incubación con condiciones controladas de iluminación, fotoperíodo de 16h/8 h de luz/obscuridad y temperatura de 22°C ± 2°C, a excepción del experimento de riegos con diferentes concentraciones de amonio que se realizó manteniendo las plantas en condiciones ambientales naturales de luz y temperatura. Las plantas se regaron dos veces por semana con la solución nutritiva de Jensen-MS diluída al 50% (Tabla 1).

El suplemento de nitrógeno a esta solución nutritiva Jensen-MS al 50% para el riego general ó mantenimiento de las plantas de tabaco fué 12.5 mM de nitrato de amonio. Segun se indica en otros experimentos, se empleó L-glutamato 10 mM como fuente orgánica de nitrógeno ó diferentes concentraciones de amonio: 150 mM, 25mM,

12.5 mM, 1.25 mM incluido bajo la forma de sulfato de amonio. Estos dos experimentos de caracterización fisiológica del material transformado se realizaron con plantas de 10 semanas que se habían crecido en almácigos con vermiculita y que se habían regado con la solución de Jensen-MS al 50% más 12.5 mM de nitrato de amonio.

Tabla 1. Solución nutritiva Jensen-MS.

<u>Solución nutritiva Jensen (Vincent, 1970):</u>	
CaHPO <sub>4</sub>	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
FeCl <sub>3</sub>	0.1 g
<u>Microelementos medio MS (Murashige y Skoog, 1962):</u>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6.2 mg, ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 8.5 mg, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0.25 mg, KI 0.88 mg, CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0.025 mg, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 0.25 mg y MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 16.9 mg	
Contiene los macroelementos de la solución Jensen complementada con los micronutrientes del medio MS sin nitrógeno, agregado sólo cuando así se especifica.	

### 3.3 EVIDENCIAS DE LA TRANSFORMACION GENETICA DE LAS PLANTAS DE TABACO R1 SELECCIONADAS.

#### 3.3.1 Actividad histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

Para evaluar la expresión del gen reportero de *gus* en las plántulas, se hizo el ensayo histoquímico de GUS con el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) que precipita un producto incoloro que al dimerizarse por efecto del oxígeno atmosférico se torna color azul índigo. Esta dimerización se estimula por una catálisis oxidativa utilizando una mezcla de ferricianuro/ferrocianuro de potasio. Este ensayo histoquímico se puede realizar directamente en tejidos como en hoja o en raíces y observar la localización de la actividad de GUS.

Los cortes de tejido de cada planta se sumergieron en la solución de X-Gluc que se preparó con un buffer de fosfato de potasio pH 7 100 mM, EDTA 10mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM, ferrocianuro de potasio 0.5 mM, Tritón X-100 0.1% y X-Gluc 2mM disuelto en dimetilformamida. La reacción se incubó a 37°C durante 12-16 horas. Para visualizar mejor el color azul después de la reacción las hojas se lavaron con un buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7. La clorofila se eliminó realizando varios enjuagues con acetona:metanol (1:3) y un enjuague final con el buffer de fosfatos.

### 3.3.2 Amplificación por PCR del gene *gus* integrado al genoma vegetal.

Un ensayo molecular para detectar la presencia de un gene en el genoma vegetal consiste en amplificarlo con la técnica "polymerase chain reaction" (PCR). El principio de esta metodología es sencillo y se trata de aumentar el número de copias de un fragmento de DNA a niveles que puedan ser visualizados en un gel de agarosa/EtBr. Para realizar esta amplificación se requiere: el DNA templado o molde a amplificar, oligonucleótidos o iniciadores, que son secuencias cortas de DNA una por cada hebra de DNA a amplificar; una DNA polimerasa termotolerante que iniciará la polimerización de nuevas cadenas de DNA sobre los iniciadores; dideoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); todo esto en un buffer con algunas sales de  $MgCl_2$  y KCl que permitan llevar a cabo la reacción de amplificación. Este coctel se somete a varios ciclos de amplificación, entre 25 y 30. Cada ciclo consiste de tres etapas: (1) desnaturalizar o abrir las cadenas de DNA del templado y de los iniciadores sometiendo todo a una temperatura de 92°C-94°C; (2) después se lleva a la temperatura de alineamiento (annealing), entre 52°C-65°C, en que se unirán por complementariedad el DNA templado con los iniciadores y finalmente (3) la síntesis de las nuevas cadenas de DNA por parte la DNA polimerasa, esto ocurre a 72°C, temperatura a la que la polimerasa trabaja óptimamente. Cada vez que se repite un ciclo ocurre cada uno de estas etapas y las nuevas cadenas de DNA servirán como molde para el siguiente ciclo amplificándose el número de cadenas de manera exponencial. De acuerdo a la secuencia de DNA que se desee amplificar hay que optimizar algunos aspectos de la reacción, como: la temperatura de alineamiento; el tiempo al que se somete a la temperatura de alineamiento; la concentración de los iniciadores, de las sales de  $MgCl_2$  y del DNA molde y optimizar el número de ciclos.

En este trabajo se utilizó como templado el DNA genómico de plantas de tabaco transgénicas que se aisló con el protocolo que describen Rogers y Bendich (1994) modificado por el Dr. Stephen J Temple (comunicación personal, Plant Genetic Engineering Lab., New Mexico State Univ., Las Cruces, NM). En este protocolo se purifica el DNA en base al reactivo hexadeciltrimetil-bromuro de amonio (CTAB). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 100  $\mu$ l con 400 ng de cada oligonucleótido primer, 300 ng de DNA de planta ó entre 50-75 ng de DNA plasmídico, 200  $\mu$ M de cada nucleótido: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 2.5 U de Taq DNA polimerasa, todo en un buffer Tris-HCl 10mM pH 8.3 con KCl 50mM y 1.5mM de  $MgCl_2$ . Se utilizó el kit para PCR de Perkin Elmer Cetus.

Para amplificar el gene de GUS usamos la secuencia de los oligonucleótidos primers (Tabla 2) y las condiciones para PCR reportadas por Hammil *et al* (1991). Estas condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 92°C durante 1 minuto; alineamiento a 55°C durante 1 minuto y finalmente temperatura de extensión a 72°C por espacio de 1:30 minutos, en 25 ciclos.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar por PCR.		
Oligonucleótidos utilizados como primers	Tamaño esperado del fragmento	Referencia
Para amplificar el gene de GUS (Jefferson ,1987):		
5'GTT-TAC-GCG-TTG-CTT-CCG-CCA 3'GCT-GGG-AAA-GCG-CGT-TAC-AAG	1.2 Kb	Hammil <i>et al</i> ., 1991
Posiciones 400-420 y 1599-1579 en el gene de GUS.		
Para amplificar GS (DasSarma <i>et al</i> ,1986) en "sense":		
5'TCT-GTC-ACT-TCA-TCA-AAA-GGA-CAG 3'TGT-CAA-TCT-ACG-CTC-GTT-GC	1.4 Kb	Temple SJ (1) (comunicación personal)
Posiciones 7149-7134 en p35S y 3842-3861 en el gene de GS.		
Para amplificar GS (DasSarma <i>et al</i> ,1986) en "antisense".		
5'TCT-GTC-ACT-TCA-TCA-AAA-GGA-CAG 3'GAG-AGC-CCA-TTC-CCA-CCA-ACA	1.3 Kb	Temple SJ (1) y Suárez R (2) (comunicación personal)
Posiciones 7149-7134 en p35S y 2452-2432 en el gene de GS.		
1. Plant Genetic Engineering Lab., New Mexico State University, Las Cruces NM. 2. Centro de Inv. sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, Mor, Méx.		

### 3.3.3. Amplificación por PCR del DNA 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense".

Para amplificar el gene quimérico de GS sobreexpresado (35S-GS) la secuencia de oligonucleótidos utilizada (Tabla 2) fué diseñada por el Dr. Stephen Temple del grupo

de la Dra. Champa Sengupta-Gopalan (Plant Genetic Engineering Laboratory, New Mexico State University, Las Cruces, NM). Para amplificar GS en antisense se utilizó la secuencia de uno de los primers también del Dr. Temple y la otra secuencia la diseñó en este Centro el Biól. Ramón Suárez (Tabla 2). Las condiciones de amplificación para ambos fueron: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; alineamiento a 54°C 1:30 minutos y finalmente temperatura de extensión a 72°C 2 minutos, en 30 ciclos. Para las reacciones de PCR se utilizó el aparato Robocycler Gradient 40 de Stratagene.

### 3.4. CARACTERIZACION MOLECULAR Y FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS.

#### 3.4.1. Cuantificación de la abundancia del RNAm de la GS.

Se aisló RNA de hojas de tabaco con el procedimiento que indica Gibco BRL al utilizar el reactivo TRIzol. Este reactivo contiene isotiocianato de guanidina y fenol para desnaturalizar proteínas e inhibir la acción de las RNasas y purificar limpiamente al RNA. El RNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, con 5.4% de formaldehído (solución al 37%) como agente desnaturalizante, en un buffer MOPS pH 7 a corriente constante de 60 mA hasta alcanzar las 2/3 partes del gel.

Se montó un sistema de transferencia vertical (Sambrook *et al.*, 1986) en el que se hizo difundir una solución concentrada de sales (SSC 10X, cloruro de sodio y citrato de amonio) hacia papeles secantes para acarrear el RNA desnaturalizado del gel, a una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham) (Northern blot) en la que el RNA quedó inmobilizado en la misma posición relativa en que estaba en el gel.

La fracción de RNAm complementario de la GS de las plantas se identificó por hibridación homóloga con una sonda o fragmento de DNA del gene de la GS de alfalfa (DasSarma *et al.*, 1986). La sonda de 1Kb se obtuvo al cortar el plásmido pGH219B con *Bam* HI y *Bgl* II, y se marcó radiactivamente con  $\alpha$ -32P-dCTP (3000 Ci, 10mCi/ul) con el protocolo Megaprime DNA Labelling System de Amersham. Para comprobar molecularmente que se utilizó la misma concentración de RNA total (30  $\mu$ g por carril, cada carril corresponde al RNA de cada planta diferente de tabaco) esta misma membrana lavada se hibridó con una sonda de un cDNA de RNAr de maíz, cuya concentración debe ser equivalente en las diferentes plantas. Esta sonda se obtuvo cortando el plásmido pBG35 con *Hind* III y *Eco* RI para obtener un fragmento de 1.35 Kb. La prehibridación e hibridación se hizo con la solución con: SDS 7%; 250 mM de fosfato de sodio, 1% de BSA y 1mM de EDTA a una temperatura de 60°C durante 18 h. Los lavados a la membrana fueron: 2 veces con 2X SSC/0.1% SDS; 1X SSC/0.1% SDS y

0.1X SSC/0.1% SDS, durante 15 minutos a temperatura ambiente en cada lavado. Después de los lavados la membrana se expuso a una placa autoradiográfica y se reveló de acuerdo al protocolo del fabricante con las soluciones reveladora y fijadora marca Kodak. Algunos protocolos y muchas de estas soluciones estándares en biología molecular se encuentran descritas en el manual de protocolos de Sambrook *et al*, (1989).

### 3.4.2. Análisis de los polipéptidos de la GS.

Para disociar las proteínas en unidades polipeptídicas individuales generalmente se hace una electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida utilizando el detergente aniónico SDS (dodecil sulfato de sodio) y un agente reductor (2-mercaptoetanol ó DTT). Este sistema conocido como SDS-PAGE "polyacrilamide gel electrophoresis" en presencia de SDS fué originalmente descrito por Laemmli (1970). Para obtener la resolución de los polipéptidos se utiliza un sistema discontinuo de electroforesis que promueve la separación en bandas del complejo proteico.

Posteriormente por la técnica de Western blot (Towbin, 1979) los polipéptidos en el gel se transfieren a un filtro de nitrocelulosa en donde quedan fijados establemente. La localización específica de la fracción proteica buscada se realiza con anticuerpos que funcionan a manera de sonda. Los anticuerpos reaccionan con sus epítopes antigénicos (Sambrook *et al*, 1989 y Memelnick *et al*, 1994). Para localizar esta primera reacción inmune que no es visible se realiza una segunda reacción inmunológica con un segundo anticuerpo que en su estructura este acoplado a una enzima por cuya actividad sea reconocido todo el complejo.

Se extrajo proteína de hojas de tabaco homogenizando en un buffer que contiene Trizma base 50 mM pH 8.3, acetato de Mg 10mM, EDTA 1 mM, Glicerol 10%, PMSF 1 mM y PVP 10% p/v. El homogenado se clarificó por centrifugación a 12,000 x g/10 minutos. Se reextrajo la fracción proteica en este mismo buffer adicionando 10 mM de PMSF. Se precipitó finalmente con acetona y se resuspendió en un buffer Tris HCl 250 mM a pH 8.3. Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

En un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%/SDS (SDS-PAGE) se corrieron 150 µg de proteína de cada muestra, siguiendo las indicaciones de Memelnick *et al*. (1994). La electroforesis se hizo en una cámara Mini-PROTEAN II de BioRad.

El sistema de transferencia se realizó en una unidad Mighty Small TE 22 de Hoefer en un buffer Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3 (Memelnick *et al*, 1994) a una corriente constante de 200 mA durante 3:30 h aproximadamente. Se comprobó la efectiva transferencia de las proteínas realizando una tinción con el



reactivo Ponceau S (Memelnik *et al*, 1994).

La inmunodetección se realizó utilizando como primer anticuerpo Anti-GS de nódulo de frijol (obtenido de conejo) diluido 1:5000 (proporcionado por el Dr. Miguel Lara, Instituto de Biotecnología, UNAM). Se hizo la segunda inmunoreacción con anticuerpo Anti-conejo (Sigma) diluido 1:25000 que tiene acoplada a la fosfatasa alcalina que con nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) reveló bandas de reacción cruzada correspondientes a GS2 nativa de hoja y a GS1.

### 3.4.3. Actividad Específica de la GS.

Los extractos crudos de hoja se prepararon macerando tejido de hoja en el buffer de extracción Trizma base 50 mM pH 8.3, acetato de Mg 10mM, EDTA 1 mM, Glicerol 10%, PMSF 1 mM y PVP 10% p/v (comunicación personal del Dr. Jose Luis Ortega, Instituto de Biotecnología, UNAM). El homogenado se clarificó por centrifugación a 12,000 *g* durante 10 minutos y 20 minutos. Todas las operaciones se realizaron a 4°C. Con este extracto se realizó el ensayo enzimático de la GS.

La actividad de la GS en el sobrenadante se midió por el ensayo de transferasa (Ferguson y Sims, 1974). En este ensayo la hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) reemplaza al amonio que es el sustrato natural de la enzima. Se preparó el coctel de reacción de transferasa que se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Coctel de reacción de transferasa para determinar la actividad enzimática de glutamino sintetasa.	
ADP	16 mg/ 3.75 ml de buffer TB
Glutamina	255 mg/18.75 ml de agua
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	273 mg/6.25 ml de TB
NH <sub>4</sub> OH	30 mg/6.25 ml de buffer BT
MnCl <sub>2</sub>	22 mg/1.25 ml de agua
Buffer TB	6.25 ml
El buffer TB contiene Trizma acetato 0.4M/EDTA 5mM a pH 6.4.	

La reacción se realizó con 850µl del coctel más 150 µl del extracto soluble de la muestra incubándose a 30°C a diferentes tiempos. La reacción se detuvo con 500 µl de la solución HCl 0.5M/ TCA 4%/ cloruro férrico 3.2%.

La GS cataliza la formación del producto gama-glutamil hidroxamato ( $\gamma$ -GHA) a partir de hidroxilamina y glutamina. La cantidad de  $\gamma$ -GHA formado durante el ensayo se

determinó colorimétricamente a 540 nm luego de acoplar el  $\gamma$ -GHA a  $\text{Fe}^{3+}$ . Una unidad de actividad de GS se define como 1  $\mu\text{mol}$  de  $\gamma$ -GHA formado por minuto.

#### **3.4.4. Determinación de la concentración de la proteína.**

A partir de extractos en crudo de hoja se precipitó la proteína con TCA al 5%. Posteriormente el precipitado se resuspendió en NaOH 0.4N para luego determinar la concentración de proteína por el método de Bradford (1976) cuantificando por espectrofotometría a 595nm, con albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar.

#### **3.4.5. Cuantificación de clorofila total.**

Se aisló clorofila de discos de hoja (7.68  $\text{cm}^2$  de diámetro) con acetona al 80% v/v (Arnon *et al* 1949). Se centrifugó a una velocidad de 2,000 rpm por 4 minutos para separar los restos celulares del extracto. La clorofila se cuantificó por espectrofotometría a 647 nm y 664 nm que corresponden a las clorofilas a y b que sumadas nos darán el contenido total de clorofila de acuerdo a la ecuación de Graan y Ort (1984).

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. SELECCION DE LA POBLACION R1 DE PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.

De acuerdo a los resultados de la actividad específica de GS y al ensayo de GUS de las plantas transgénicas originales de tabaco, se escogieron semillas de plantas con la actividad de GS alterada. Todas las semillas germinaron. Se incluyeron semillas de plantas no transformadas. Estas plántulas murieron en presencia del agente selectivo; en cambio, las plántulas: 51, 154 y 156 transformadas con pGH117; 65 y 148 (pGH114) y 21, 41 y 44 (pBI121), mostraron de 96 al 100% de resistencia a la kanamicina (datos no mostrados), por el gene quimérico *NOSp-npt II* ( $Km^r$ ) (Figura 2). Esto indica que las plantas originales que contenían a los genes quiméricos de manera estable lo heredaron a su progenie (R1).

### 4.2 EVIDENCIAS DE LA TRANSFORMACION GENETICA EN LAS PLANTAS DE TABACO R1 SELECCIONADAS.

#### 4.2.1. Actividad histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

El ensayo histoquímico del gene reportero *35S-gus* fué positivo, lo que confirma la presencia de GUS en las plantas R1 seleccionadas ( $Km^r$ ). Se observó coloración azul en las hojas del material transformado con alguno de los tres plásmidos pGH117, pGH114 ó pBI121. En las hojas de plantas sin transformar (control negativo) no se observó la coloración azul característica dada por este ensayo (Figura 3).

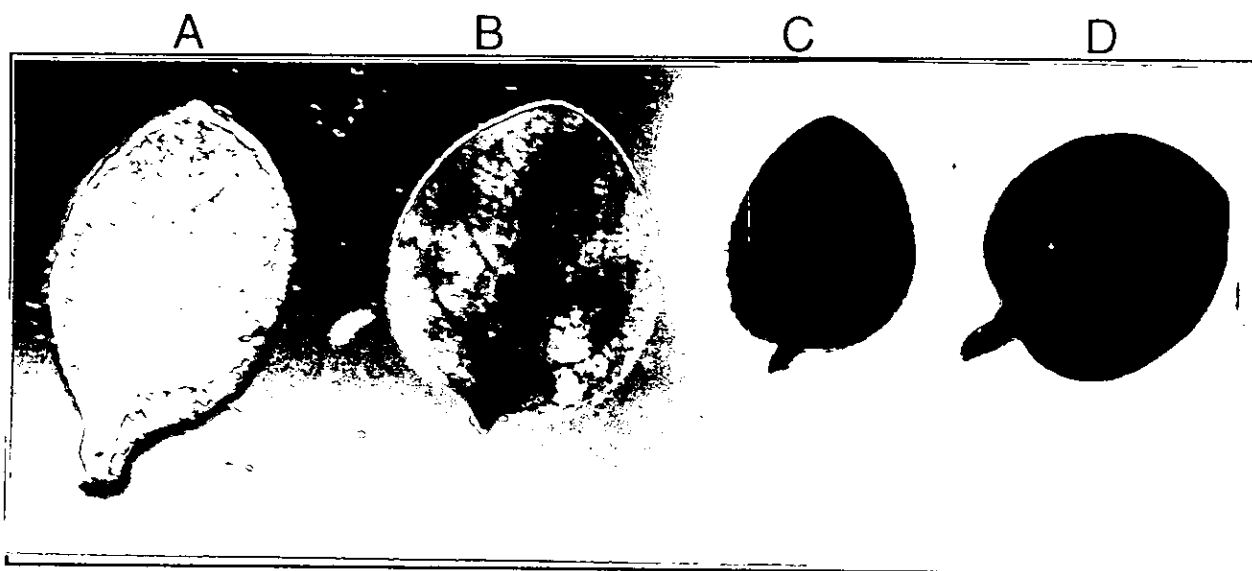


Figura 3. Ensayo histoquímico de GUS en hoja de plántulas de tabaco R1 transformadas B,C y D: hojas de plantas transformadas. A: hoja de planta no transformada.

Los genes marcadores *npt II* y *gus* (Figura 2) flanquean al gene de la GS de alfalfa en "antisense" (pGH117) o en "sense" (pGH114), por lo que los resultados que indicaron la presencia de los dos genes marcadores en las plantas seleccionadas, según los resultados anteriormente comentados, es un fuerte indicio de que también está presente el gene quimérico de la GS de alfalfa en estas plantas de tabaco.

#### 4.2.2. Amplificación por PCR de los transgenes integrados: *gus* y 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense".

El propósito de utilizar esta prueba es para confirmar la presencia de los genes quiméricos en las plantas transformadas. La amplificación de DNA por PCR se realizó con DNA total de las plantas transgénicas a modo de templado o molde, utilizando específicamente oligonucleótidos iniciadores que reconocen a los genes de *gus* o de 35S-GS en "sense" ó en "antisense" (Tabla 2) respectivamente.

El resultado de la reacción de la amplificación de *gus* por PCR se observa en la Figura 4. A partir del DNA de las plantas transformadas No. 51, 154 y 156 (pGH117); 65 y 148 (pGH114); 21, 41 y 44 (pBI121), se amplificó un fragmento de DNA de 1.2 kilobases, como se observa en la Figura 4, que es el tamaño esperado para GUS (Tabla 2). En estas reacciones de PCR también se incluyó como control positivo DNA del plásmido pBI121 del que se amplificó igualmente una banda de 1.2 Kb (Figura 4). No se detectó amplificación del gene de *gus* por PCR a partir de DNA de una planta no transformada.

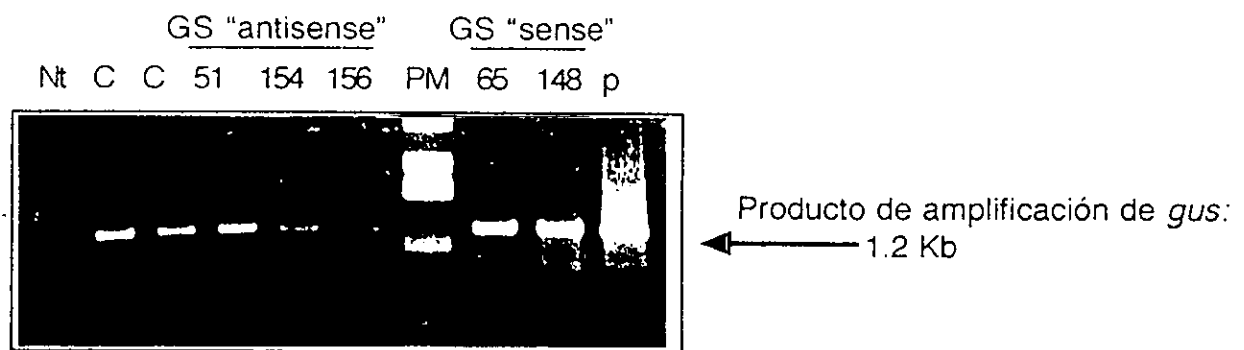


Figura 4. Amplificación por PCR de un fragmento del gene de *gus* a partir de DNA de plantas transgénicas de tabaco. (Nt) planta no transformada; (C) plantas control que contienen *gus* (pBI121); 51, 154 y 156 plantas que contienen 35S-GS en "antisense" y *gus*; 65 y 148 plantas que contienen 35S-GS en "sense" y *gus*; (p) plásmido pBI121 como control positivo; (PM) marcador de peso molecular 1Kb (Gibco BRL).

Para detectar la presencia del gene de GS en "antisense" se utilizó un oligonucleótido que reconoce la secuencia codificadora de la cadena GS en "antisense" y otro oligonucleótido que reconoce la secuencia del p35S. En la figura 5 se observa amplificado un fragmento de 1.3 Kb del gen quimérico de 35S-GS en "antisense" a partir del DNA de las plantas 51, 154 y 156 y del plásmido pGH220 utilizado como control positivo. Del DNA de este plásmido también se amplificó un fragmento más pequeño de alrededor de 900 pb. No se observa DNA amplificado de muestras de las plantas: 41 (control pBI121); 148 (GS en "sense") ó de una planta no transformada (Figura 5).

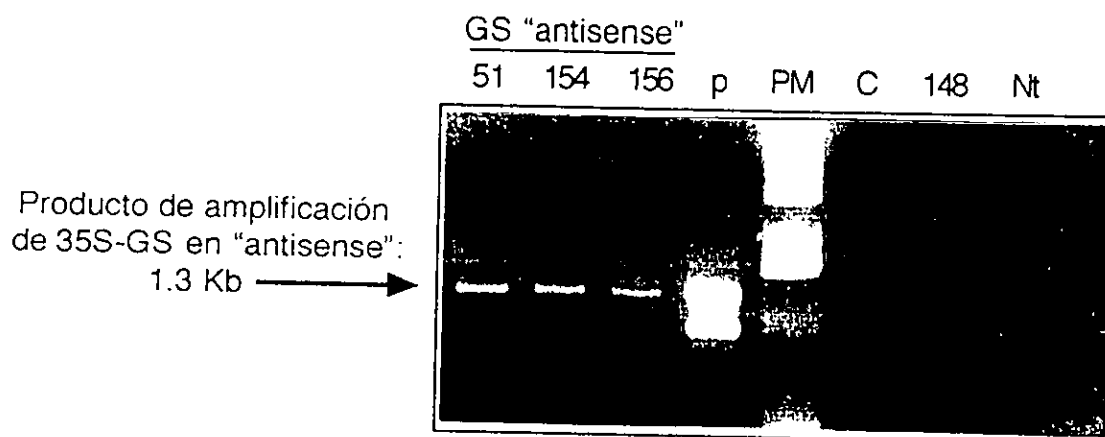


Figura 5. Amplificación por PCR de un fragmento del gene de la GS de alfalfa 35S-GS en "antisense" a partir de DNA de plantas transgénicas de tabaco. 51, 154 y 156 plantas que contienen la fusión 35S-GS de alfalfa en "antisense"; (p) plásmido pGH220 como control positivo; (C) planta control 41 (pBI121); 148 planta que contiene GS en "sense"; (Nt) planta no transformada; (PM) marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco BRL).

Para detectar la presencia de la fusión 35S-GS en "sense" se utilizó un oligonucleótido que reconoce específicamente una secuencia de la cadena de GS de alfalfa en "sense" y otro oligonucleótido que reconoce la secuencia del p35S. En la Figura 6 se observa amplificado un fragmento de 1.4 Kb que corresponde específicamente al gene 35S-GS en "sense", a partir del DNA de las plantas 65, 148 y del plásmido pGH219.B utilizado como control positivo. No se observa amplificación del DNA de las plantas: 156 (35S-GS en "antisense"), 44 ó 41 (control pBI121) (Figura 6).

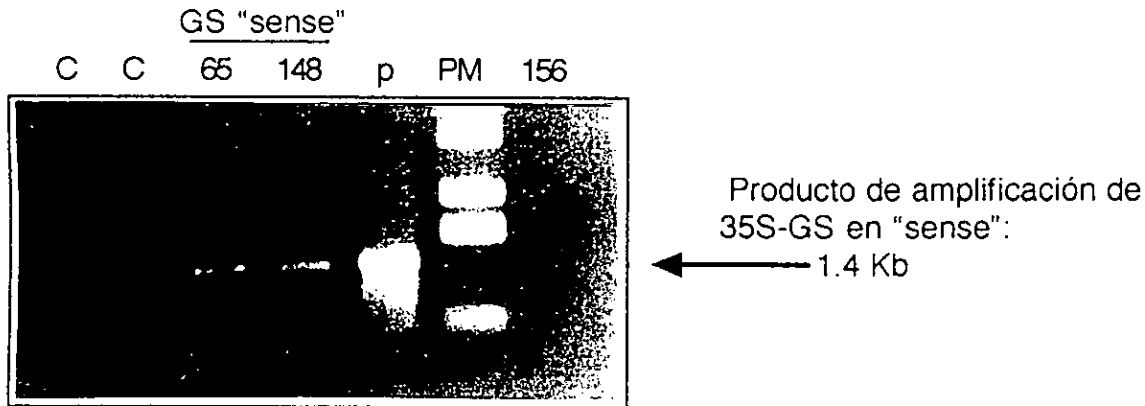


Figura 6. Amplificación por PCR de un fragmento del gene de la GS de alfalfa 35-GS en "sense" a partir de DNA de plantas transgénicas de tabaco. 65 y 148 plantas que contienen la fusión p35S-GS en "sense"; (p) plásmido pGH219.B como control positivo; (C) plantas control 41 y 44 (pBI121); 156 planta que contiene GS en "antisense"; (PM) marcador de peso molecular 1Kb (Gibco BRL).

Con este análisis se detectó la presencia de los genes de *gus*, 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense" en las plantas transformadas.

#### 4.3 CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS.

Las plantas de tabaco establemente transformadas se cultivaron en macetas y se regaron con solución nutritiva de Jensen-MS diluído al 50% (Tabla 1) más 12.5 mM de nitrato de amonio como fuente nitrogenada. Bajo estas condiciones se mantuvo el material utilizado para la caracterización molecular. El análisis molecular consistió en: cuantificar el acúmulo de RNAm de la GS; detectar la presencia de los polipéptidos de GS1 en hoja y evaluar su actividad enzimática.

##### 4.3.1 Cuantificación de la abundancia de RNAm de la GS.

El siguiente paso del análisis de las plantas en que se detectó la presencia de los transgenes 35S-GS es determinar que la expresión de la GS se encuentre alterada. La fusiones 35S-GS con un promotor fuerte y constitutivo predicen que en estas plantas la transcripción continua de la GS quimérica ocurre en toda la planta.

Se cuantificó la abundancia del RNAm de la GS a partir de RNA total de hoja de las plantas transformadas. El RNAm específico de la GS se identificó por su complementariedad con una sonda del DNA de GS de alfalfa de doble cadena marcada radiactivamente.

En el gel de agarosa/EtBr se observan 5 o más bandas que corresponden a las diferentes subunidades de RNAr que es el mas abundante en la célula. De acuerdo a su gradiente de centrifugación las subunidades de RNAr migran diferencialmente y su posición se reporta en unidades Svedger ó S. Las dos bandas mas abundantes y visibles corresponden a la subunidad grande 28S (ó 25S) y a la subunidad pequeña 18S (ó 17S) del ribosoma. El tamaño de las bandas de RNA ribosomal es variable entre especies. En la literatura están reportados los de algunas plantas. El tamaño en kilobases de la subunidad 18S es de: 1.72 Kb en *Pisum sativum*, 1.75 Kb en *Nicotiana sylvatica*, 1.8 Kb en *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicum esculentum* (17S) y en *Sinapis alba*. Para la subunidad 25S se reporta que su tamaño en *S. alba* es de 3.2 Kb y en *L. esculentum* es de 3.38 Kb (Latterich y Croy, 1993). En base a su posición en el gel, al tamaño conocido de estos rRNA y al resultado de las autorradiografías en que la hibridación con la sonda de GS ocurre cercana a la segunda banda 18S de RNAr, se calculó un tamaño aproximado de RNAm de GS de 1.6 Kb (Figuras 7 y 8A).

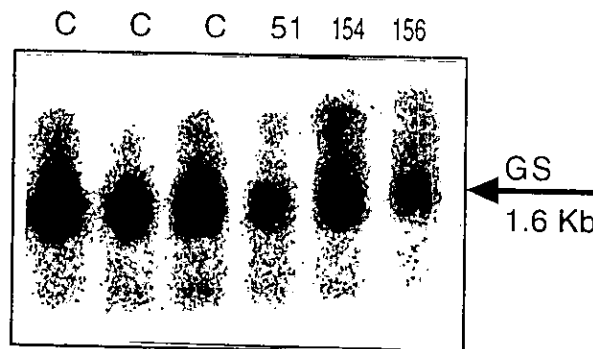


Figura 7. Detección del RNAm de la GS de plantas transformadas con 35S-GS en "antisense". En cada carril se colocaron 30  $\mu$ g de RNA total de hoja y se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa-SDS. Para identificar al RNAm de la GS se utilizó un fragmento de 1 kb de DNA de doble cadena de la GS1 de alfalfa, marcado con  $^{32}$ P. Autoradiograma de las plantas: 51, 154 y 156 que contienen el 35S-GS en "antisense" y de las plantas control (C) 21, 41 y 44.

En la Figura 7 se muestra la detección del RNAm de la GS de las plantas 51, 154, 156 y de tres plantas control. Se observa una concentración similar o ligeramente mayor del RNAm de GS en las plantas con GS en "antisense" con respecto al de los controles. No se hizo la hibridación de esta membrana con una sonda de un RNAr nativo como control molecular de la concentración de RNA de cada muestra. Sólo se puede decir que al parecer los transcritos "antisense"-RNA de GS de alfalfa no influyeron en disminuir el

nivel de RNAm de la GS endógena de las plantas transformadas. Este resultado no se ajustaría al modelo de inhibición propuesto para sistemas homólogos en el que se degrada el complejo "antisense" RNA-RNAm endógeno por lo que se observa una disminución de la abundancia del RNAm endógeno (Lichtenstein, 1988; van der Krol *et al*, 1988b; Robert *et al*, 1992). El resultado de la Figura 7 se apega más a la hipótesis planteada por Oliver *et al* (1993) para algunos sistemas heterólogos, en que el complejo "antisense"RNA-RNAm no se degrada; es mas bien estable por lo que la concentración de RNAm endógeno más el "antisense"-RNA puede ser mayor que los niveles RNAm de la GS endógena de las plantas control. En este ensayo se utilizó como sonda DNA de doble cadena del gene de la GS de alfalfa, ambas cadenas hibridan con las cadenas de RNAm de la GS nativa y con el transcrito en "antisense". Para poder identificar al transcrito de "antisense"-RNA, debería haberse utilizado una sonda de cadena sencilla complementaria al transcrito, preparada con un sistema de transcripción *in vitro*. Dado que no se realizó esto último en la autorradiografía de la Figura 7 no es posible discriminar entre el "antisense"-RNA del RNAm nativo.

En las plantas 35S-GS en sense No. 65 y 148 se obtuvo el resultado esperado: mayor concentración de mRNA de GS con respecto a las plantas control (Figura 8A).

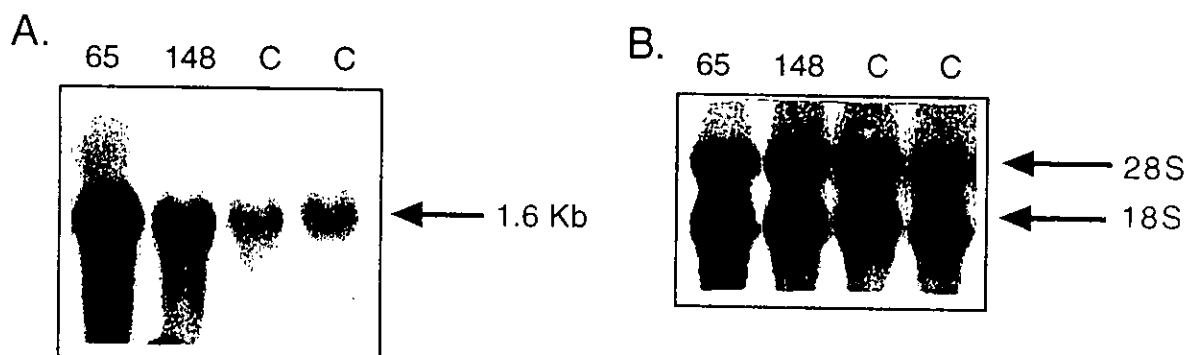


Figura 8. Detección del RNAm de la GS en plantas transformadas con 35S-GS en "sense". En cada carril se colocaron 30  $\mu$ g de RNA total de hoja que se separó por electroforesis en gel de agarosa-SDS. A. Para identificar al RNAm de la GS se utilizó un fragmento de 1 Kb de DNA de doble cadena de GS1 de alfalfa marcado con  $^{32}$ P. B. Las mismas muestras se hibridaron también con un fragmento de 1.35 Kb de DNA de RNAr de maíz. Autorradiogramas de las plantas 65 y 148 que contienen 35S-GS en "sense" y de las plantas control (C) 41 y 44.

Las plantas 65 y 148 mostraron mayor abundancia RNAm de GS que las plantas control, al parecer por efecto de la sobreexpresión de la GS1 de alfalfa. En la figura 8B



se observa la hibridación del RNAr nativo de las plantas de tabaco con una sonda de un cDNA de RNAr de maíz. Esta sonda se utilizó como un control molecular que comprueba que todas las muestras contienen cantidad similar de RNA total en cada carril, por lo que, la observación de mayor acúmulo de RNAm de GS en las plantas 35S-GS "sense" (Figura 8A) supone que es consecuencia del acúmulo del transcrito en "sense".

Con este análisis no se detectó disminución del RNAm de la GS en las plantas de tabaco 35S-GS en "antisense", aunque el mecanismo de inhibición en este sistema heterólogo pudiera ser a otro nivel (post-transcripcional). Hasta ahora, no se puede concluir que estas plantas contengan el transgene 35S-GS en "antisense" porque no se hizo la detección específica del transcrito en "antisense". En cambio, en las plantas que contienen el transgene 35S-GS en "sense" si hubo mayor acúmulo de RNAm de GS.

#### 4.3.2. Análisis de los polipéptidos de la GS.

En las plantas que sí tienen alterada la expresión de la GS se determinó la concentración de los polipéptidos de la GS1 citosólica y GS2 cloroplástica en hoja.

En la hoja de tabaco, se ha reportado que GS2 se encuentra en mayor proporción relativa que GS1 (McNally *et al*, 1983) y es la isoforma que asimila el amonio en hoja junto con Fd-GOGAT. La masa molecular de las subunidades o polipéptidos que componen a estas dos isoformas es ligeramente variable: la enzima citosólica está compuesta de polipéptidos de 38-39 kDa (Tingey y Coruzzi, 1987; Temple *et al*, 1993) y la enzima cloroplástica es ligeramente más pesada, contiene polipéptidos de 43-45 kDa (Tingey y Coruzzi, 1987; Becker *et al*, 1992; Temple *et al*, 1993).

Se aisló proteína de hoja de las plantas 65 y 148 que sobreexpresan la GS, de las plantas control 44 y 41 y de nódulo de frijol o de alfalfa. La proteína de nódulo se utilizó como referencia de la migración del polipéptido GS1 porque en este órgano preferentemente se expresa esta isoforma citosólica. Se utilizó un anticuerpo preparado contra la GS1 de nódulo de frijol que reconoce similarmente a la GS1 y a la GS2.

En la Figura 9 se observa el patrón de migración de los polipéptidos GS1 y GS2 en hoja: de las plantas control 41 y 44; y de las plantas 65 y 148. En las plantas control (C) se detectó sólo la presencia del polipéptido GS2 característico de hoja, GS1 no se detectó en estos ensayos. En contraste, las plantas 65 y 148 contienen ambos polipéptidos: la GS2 nativa y el polipéptido GS1 enriquecido que co-migra con la banda intensa de GS1 de nódulo. Las plantas transgénicas 35S-GS en "sense" están expresando GS1 en hoja en mayor cantidad con respecto a las plantas control, aparentemente como resultado de la sobreexpresión de la GS de alfalfa. En estas

plantas la regulación de la expresión de la GS2 al parecer no se modificó, se observa una concentración de GS2 similar al de las plantas control.

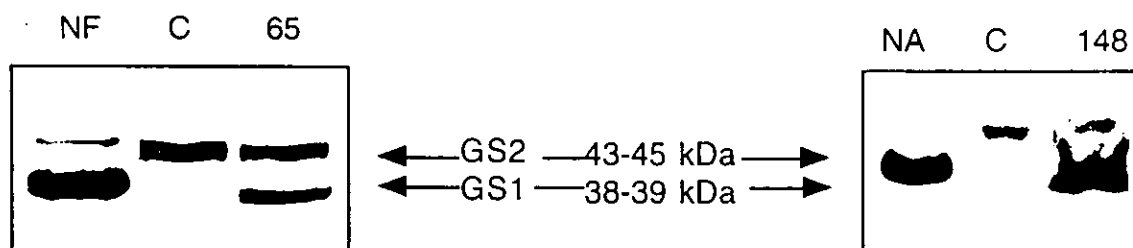


Figura 9. Análisis por Western blot de los polipéptidos de GS en hoja de plantas transgénicas. La proteína soluble total (150 $\mu$ g por carril) de las plantas 65 y 148 con 35S-GS en "sense" y de la planta control 41 (C), se separó en un gel de poliacrilamida al 10%. La inmunodetección de los polipéptidos se hizo con un anticuerpo de GS de frijol y con un segundo anticuerpo anti-conejo, acoplado a la fosfatasa alcalina. Como control positivo se incluyó proteína de nódulo de frijol (NF) o de nódulo de alfalfa (NA). En la figuras se indica la posición correspondiente a GS2 y a GS1 así como su tamaño aproximado.

Las plantas 35S-GS en "antisense" no se incluyeron para en este análisis porque para ese tiempo ya se había evaluado la actividad específica de la enzima que como se comentará más adelante, en estas plantas no resultó ser disminuída.

#### 4.3.3. Actividad Específica de la GS.

Para medir la actividad específica de la GS hay dos ensayos: el biosintético ó de sintetasa y el de transferasa. Este último es más sensible aunque es un ensayo más artificial. En el ensayo de transferasa la GS a partir de glutamina e hidroxilamina cataliza la formación de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato ( $\gamma$ -GHA), el cual puede ser cuantificado a 540 nm. La actividad enzimática de la GS se expresó en Unidades (U) que producen 1 $\mu$ mol de  $\gamma$ -GHA por minuto expresado por peso fresco.

Para detectar el efecto funcional de la sobreexpresión de la GS, se determinó la actividad específica de la GS en las plantas de tabaco por el ensayo de transferasa. Los ensayos se realizaron en hoja. Generalmente se escogió la 5a ó la 6a hoja. Como también es importante el estado fenológico y la edad de la planta, en cada ensayo, se incluyeron plantas 35S-GS junto con plantas control. Se realizaron varios ensayos que se resumen en los siguientes resultados.

Contrariamente a lo esperado, la actividad específica de la GS de las tres plantas "antisense" 51, 154 y 156 no resultó ser menor que la de las plantas control (datos no

mostrados). Inicialmente, este material mostró resistencia a la kanamicina, hubo expresión de GUS y el PCR reveló la banda de DNA esperada. Sin embargo, con estos resultados en los que no se detectó disminución de la actividad específica de GS y la falta de evidencia de que estas plantas expresen el transcrito de GS en "antisense", no demuestran que el nivel de expresión del transcrito haya sido insuficiente para alterar la expresión endógena de la GS a niveles mesurables, ni que estas plantas realmente contengan la GS1 de alfalfa en "antisense" ó que si contienen al transgene no se puede demostrar la posibilidad de que simplemente no lo esten expresando. Como no se observó un efecto de inhibición en estas plantas no se continuó su caracterización.

La actividad específica de la GS de las plantas 65 y 148 con el transgene 35S-GS en "sense", se observa en la Figura 10. Este es un ensayo representativo.

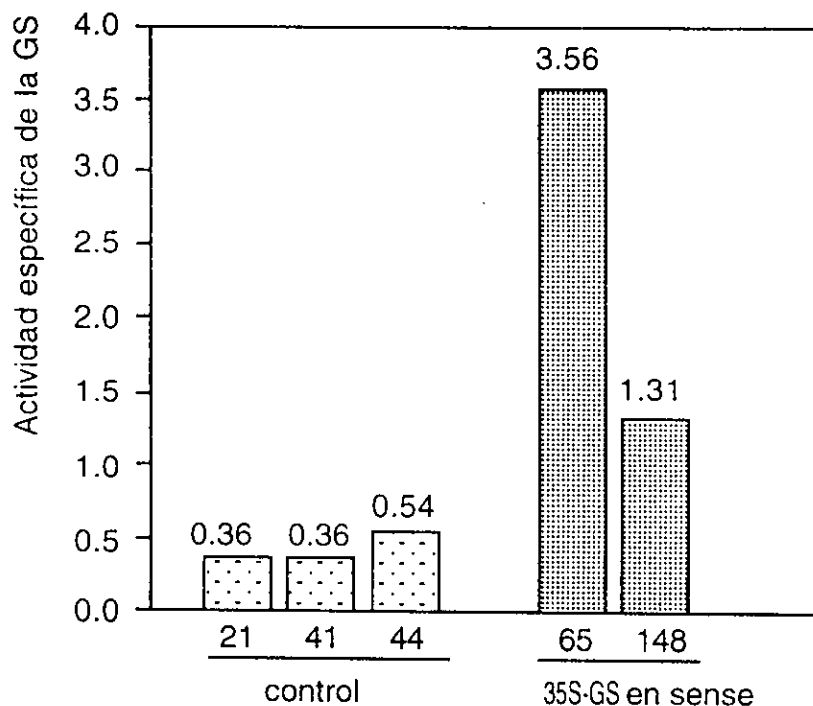


Figura 10. Actividad específica de GS en hoja de plantas de tabaco que sobreexpresan la GS. Se realizó el ensayo de transferasa de la GS en extracto soluble de hoja. Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 21, 41 y 44 son plantas control. Este es un ensayo representativo de esta determinación. La actividad específica se expresa como  $AE = U \gamma\text{-GHA } \mu\text{mol/min/gramo de peso fresco}$ .

En estas plantas sí se observa el patrón de alteración esperado: hay un aumento en la actividad específica de la GS. Este resultado coincide con la sobreexpresión del RNAm de GS observado en la Figura 8A y con el enriquecimiento del polipéptido GS1 en hoja (Figura 9).

Plantas: GENE ▶ por PCR:	GS en "ANTISENSE"		GS en "SENSE"		
	"Ideal"	51,154 y156	"Ideal"	65	148
RNAm total:	+	+	+	+	+
Transcrito: RNAm GS endógena:	↑	•	↑	↑↑↑↑	↑↑
Polipéptidos	↓	nd	↑	↑	↑
Actividad funcional de GS:	↓	No disminuyó	↑ X <sup>n</sup>	↑8 X	↑3 X
Apariencia diferente:	¿?	No	¿?	No	No

Tabla 4. Resumen de los resultados del análisis molecular de las plantas R1 de tabaco transformadas con GS en "antisense" y con GS en "sense". nd: no se hizo esta determinación en este material. • Detección de RNAm. + Si se observa un producto de PCR; ✓ presencia de GS2. ↑ aumento; ↓ disminución.

La conclusión general de las plantas de tabaco hasta ahora es que en las plantas "antisense" no se demostró inhibición en el nivel de expresión de GS. En cambio, las plantas 65 y 148 tienen mayor expresión de RNAm de GS, niveles aumentados de la proteína GS1 y mayor actividad específica por efecto de la fusión 35S-GS de alfalfa en "sense" (Tabla 4). En estas plantas con sobreexpresión de la GS se continuó el análisis fisiológico que en los siguientes párrafos se irá comentando.

#### 4.4. CARACTERIZACION FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO QUE SOBREENPRESAN LA GS.

En las plantas el amonio se asimila bajo la forma de glutamina y glutamato mediante la acción combinada de GS y GOGAT en forma cíclica: la GS emplea glutamato y amonio para sintetizar glutamina y la GOGAT utiliza glutamina y 2-oxoglutarato para formar glutamato (Figura 1). La glutamina y el glutamato participan en la biosíntesis de aspartato y asparagina y junto con estos son transportados al resto de la planta funcionando como donadores de nitrógeno para la síntesis de compuestos nitrogenados importantes para el metabolismo (Lam *et al*, 1995).

Como se mencionó en los últimos párrafos de la introducción, en nuestro laboratorio habíamos obtenido plantas de alfalfa transformadas con construcciones de GS1 de alfalfa en "antisense" y en "sense" (Figura 2) mismas que se utilizaron para obtener plantas transformadas de tabaco. Las plantas de alfalfa obtenidas por cultivo de tejidos se transplantaron a macetas con vermiculita y se regaron con solución nutritiva

Jensen-MS 50% (Tabla 1) mas 12.5 mM de nitrato de amonio como fuente nitrogenada.

Las plantas de alfalfa transformadas con 35S-GS en "sense", desde la fase *in vitro* tenían un fenotipo particular: la coloración de sus hojas era verde oscuro. En la fase de macetas estas plantas no sobrevivieron mucho tiempo al ser regadas con nitrógeno inorgánico. La posible explicación para este fenotipo es que, al sobreexpresar la GS la demanda de glutamato como sustrato para la biosíntesis continua de glutamina es alta. Si la poza interna de glutamato está derivándose en su totalidad para la síntesis de glutamina, entonces hace falta glutamato para la síntesis de otros aminoácidos esenciales y es por ello que las plantas no sobreviven. Si esta hipótesis fuera cierta, entonces, las plantas sobrevivirían al adicionarles glutamato. Por lo anterior se regaron estas plantas con solución nutritiva de Jensen-MS al 50% sustituyendo al nitrato de amonio con 10 mM de L-glutamato y las plantas sobrevivieron (Figura 11).

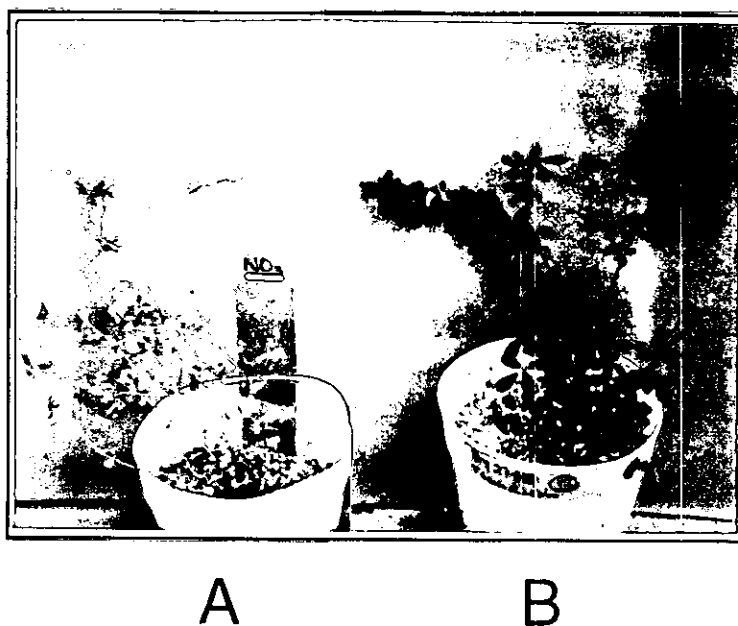


Figura 11. Fenotipo de plantas de alfalfa transformadas con el transgene 35S-GS de alfalfa en "sense" regadas con L-glutamato ó con amonio. A: Plantas regadas con solución nutritiva de Jensen-MS 50% (Tabla 1) mas 12.5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . B: Plantas regadas con solución nutritiva de Jensen-MS 50% mas 10 mM de L-glutamato.

Las plantas de tabaco 35S-GS en "sense" cultivadas con nitrato de amonio no mostraron un fenotipo diferente como las plantas de alfalfa. Las plantas de tabaco 35S-GS "sense" y control parecían iguales en color y talla, pero teniendo en cuenta la hipótesis de la dependencia por el L-glutamato de las plantas de alfalfa 35S-GS en "sense" para su crecimiento normal decidimos observar si en tabaco el L-glutamato les

ofrece alguna ventaja en el crecimiento o si se observa algún fenotipo distintivo. Se diseñó el experimento de regar las plantas de tabaco 35S-GS en "sense" con L-glutamato.

#### 4.4.1. Crecimiento en amonio (inorgánico) vs. en glutamato (orgánico) como fuente de nitrógeno.

Las plantas 65 y 148 de tabaco 35S-GS en "sense" y las plantas control 41 y 44 se regaron durante doce semanas con solución nutritiva de Jensen-MS al 50% (Tabla 1) adicionada con: 10 mM de L-glutamato, como fuente orgánica de nitrógeno; ó con 10 mM de nitrato de amonio, como fuente inorgánica de nitrógeno. El efecto de estos tratamientos se determinó cuantificando: actividad específica de la GS; proteína soluble y contenido total de clorofila.

En la Figura 12 se esquematiza el resultado de la determinación de la actividad específica de las plantas 35S-GS en "sense" y control en ambas condiciones de riego.

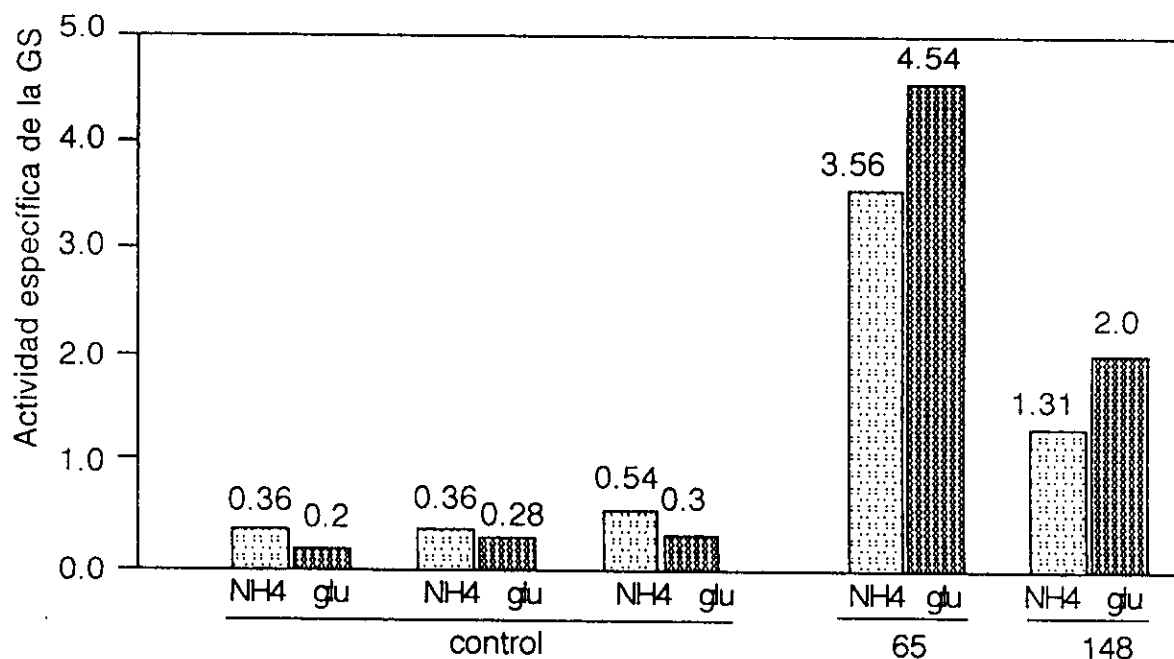


Figura 12. Actividad específica de la GS en hoja de plantas de tabaco que sobreexpresan la GS regadas con L-glutamato o con amonio. La actividad específica de la GS se determinó a las 12 semanas de riego con estos tratamientos. Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 21, 41 y 44 son plantas control. Este es un ensayo representativo de esta determinación. Actividad específica = U  $\gamma$ -GHA  $\mu$ mol/min/ gramo de peso fresco.

Se observa que en las plantas control la actividad de la GS es 50% más alta con nitrato de amonio que con glutamato. En cambio, en las plantas 65 y 148 la actividad de la GS es 27% a 52% mayor (respectivamente) con glutamato que con nitrato de amonio.

En esta gráfica también se aprecia que independientemente de los tratamientos, en las plantas 35S-GS en "sense" la actividad de la GS sigue siendo notablemente más alta: entre 2 y 7 veces más que las plantas control en los riegos con glutamato y entre 6 y 15 veces más en los riegos con amonio.

Para evaluar el efecto de la adición de glutamato en sustitución del nitrato de amonio, en el crecimiento de estas plantas transformadas, se determinó el contenido de proteína soluble en extracto de hoja en las plantas 35S-GS en "sense" y en plantas control en ambas condiciones de riego. Estos resultados se observan en la Figura 13.

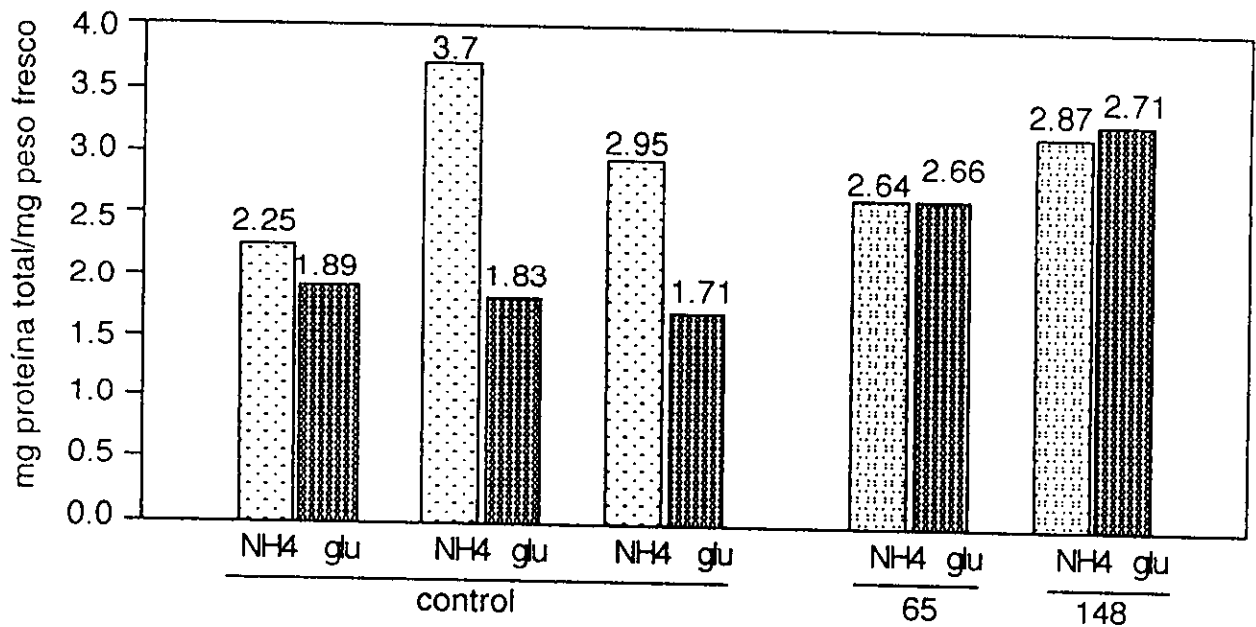


Figura 13. Determinación de proteína soluble en extractos de hoja de plantas de tabaco que sobreexpresan la GS regadas con L-glutamato o con amonio. Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 21, 41 y 44 son plantas control. Este es un ensayo representativo de esta determinación.

En la Figura 13 se observa que las plantas control regadas con nitrato de amonio tienen mayor contenido de proteína soluble que las plantas regadas con L-glutamato. Fenotípicamente se observa mejor desarrollo en las plantas regadas con amonio que en las plantas regadas con glutamato. Al parecer el glutamato es una fuente pobre de nitrógeno.

En las plantas que 65 y 148 no hay diferencia en el contenido de proteína soluble

entre las plantas regadas con amonio o con glutamato (Figura 13). Estas plantas pueden utilizar el glutamato tan bien como el nitrato de amonio. Esto se observó al igualar su contenido de proteína en ambas fuentes nitrogenadas.

El análisis de estas plantas incluyó determinar si la modulación de la GS también alteró algún aspecto del metabolismo del carbono. Aunque estas plantas de tabaco 35S-GS en "sense" con nitrato de amonio o con glutamato no mostraron diferencia visible en el color del follaje como las plantas de alfalfa 35S-GS con hojas de color verde oscuro. Se determinó la concentración de clorofila en hoja en las plantas 35S-GS en "sense" de tabaco regadas con amonio o glutamato. En la Figura 14 se observan estos resultados.

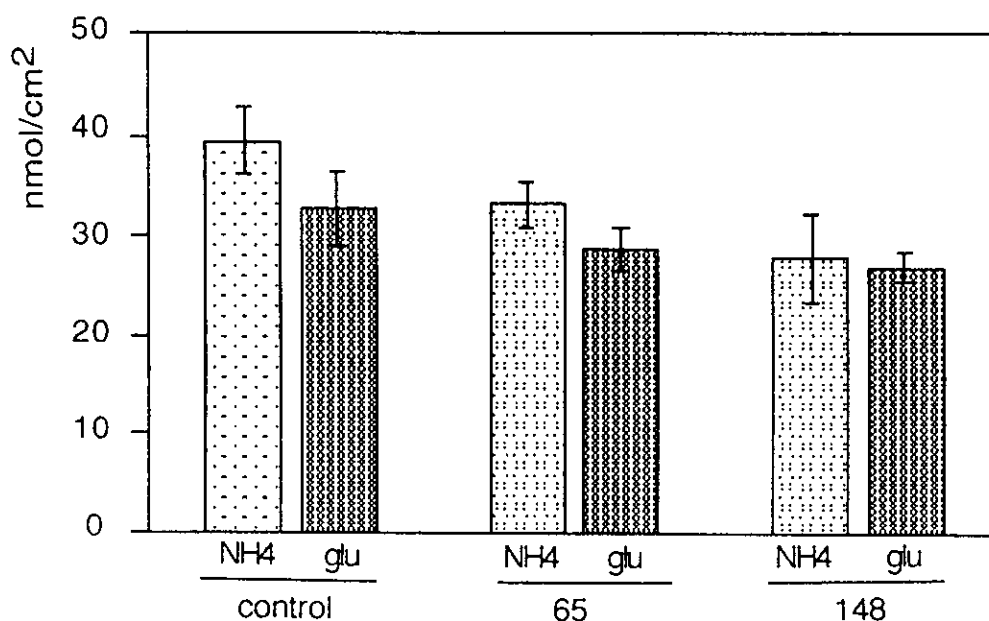


Figura 14. Cuantificación de clorofila total en hoja de plantas de tabaco que sobreexpresan la GS regadas con L-glutamato ó con amonio. Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 41 y 44 son plantas control. El promedio y su error estándar corresponde a la determinación en 3 a 6 plantas. Clorofila total expresada en nmol/cm<sup>2</sup>.

Las plantas control y las plantas 65 y 148 regadas con nitrato de amonio, tienen contenido de clorofila similar al de las plantas regadas con L-glutamato (Figura 14).

Tampoco se observó algún cambio en la apariencia de las plantas de tabaco que sobreexpresaron la GS por efecto del L-glutamato. Si el glutamato exógeno no les significó una ventaja en el crecimiento, tampoco les produjo efectos perjudiciales. En la Tabla 5 se resumen estos resultados.



		Plantas control	Plantas 35S-GS en "SENSE"	
			65	148
<b>AE de GS transferasa:</b>	NH <sub>4</sub> vs.	50 % más	menor	menor
	GLU	menor	27 % más	27 % más
<b>Apariencia:</b>	NH <sub>4</sub> vs.	No hay diferencia en el color del follaje entre plantas ni entre ambas fuentes nitrogenadas		
	GLU			
<b>Proteína soluble:</b>	NH <sub>4</sub> vs.	20-100 % más	≈	≈
	GLU		≈	≈
<b>Clorofila total</b>	NH <sub>4</sub> vs.	≈	≈	≈
	GLU	≈	≈	≈

Tabla 5. Resumen de resultados del efecto del glutamato en sustitución del nitrato de amonio como fuente nitrogenada en las plantas que sobreexpresan la GS. ≈ similar contenido de.

#### 4.4.2 Crecimiento en diferentes concentraciones de amonio como fuente de nitrógeno.

Otra alternativa en la búsqueda de una característica sobresaliente y que resulte favorable en las plantas que sobreexpresan a la GS, fué someterlas a condiciones de deficiencia nutricional en un extremo y por el otro a concentraciones de amonio tóxicas para el desarrollo de una planta normal.

Los efectos de la deficiencia de nitrógeno en las plantas generalmente consisten en: limitación del crecimiento, cambios en la coloración del follaje (clorosis) y si el efecto es por largos períodos las hojas maduras de la planta comienzan a secarse y a morir. En contraste, también se ha documentado que el suplemento exógeno de nitrógeno bajo la forma de amonio a altas concentraciones, produce efectos nocivos en el desarrollo de las plantas como: coloración oscura del follaje, alteración en el número de hojas, hojas deformadas o bien hojas de mayor tamaño y por períodos prolongados también provoca la muerte de la planta (Salisbury and Ross, 1993).

En términos de nutrición mineral existen diversas formulaciones para el cultivo hidropónico de las plantas cuya composición incluyen al nitrógeno bajo forma de nitratos, usualmente combinados con sales de amonio. La concentración de estos compuestos nitrogenados es variable, de manera general se manejan cantidades micromolares de nitratos (2-15 mM) o de nitrato mas amonio en combinación. La elección de la concentración ideal de nitrógeno en la solución de riego es distinto para cada especie de planta, por lo que no hay un esquema general de la cantidad óptima de suplemento de nitrógeno.

Las plantas 65 y 148 se sometieron durante 6 semanas a cinco tratamientos de riego: Tratamiento 1 sin nitrógeno (T1); Tratamiento 2 con 1.25 mM de amonio (T2);

Tratamiento 3 con 12.5 mM de amonio (T3); Tratamiento 4 con 25 mM de amonio (T4) y Tratamiento 5 con 150 mM de amonio (T5), bajo la forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a la solución de riego, tomando a los dos primeros tratamientos como condiciones de limitación de nitrógeno, a los dos últimos como concentraciones de amonio en exceso y a 12.5 mM como concentración "normal" con la que habitualmente se regaban las plantas en maceta. Se determinó la actividad específica de la GS y el contenido de clorofila en hoja.

A las 6 semanas de riego se observó que: en T4 las plantas tuvieron la talla más alta de los cinco tratatamientos; las hojas en T4 y T5 fueron de color verde oscuro intenso, lo que coincide con los valores más altos en contenido de clorofila (datos no mostrados); en T5 las plantas fueron las de menor altura de los cinco tratamientos, sus hojas se deformaron (Figura 15) y se acortaron los entrenudos. Los efectos nocivos de T5 se observaron de igual manera en las plantas 65, 148 y en las plantas control.

En T4 y T5 la actividad específica de la GS de las plantas 65 y 148 fué mayor que en las plantas control: 2.4 veces mayor en T4 y 1.5 veces más en T5 (datos no mostrados). A pesar de que las plantas 65 y 148 mostraron mayor actividad específica de la enzima, no pudieron contrarrestar los efectos tóxicos del amonio en T5.

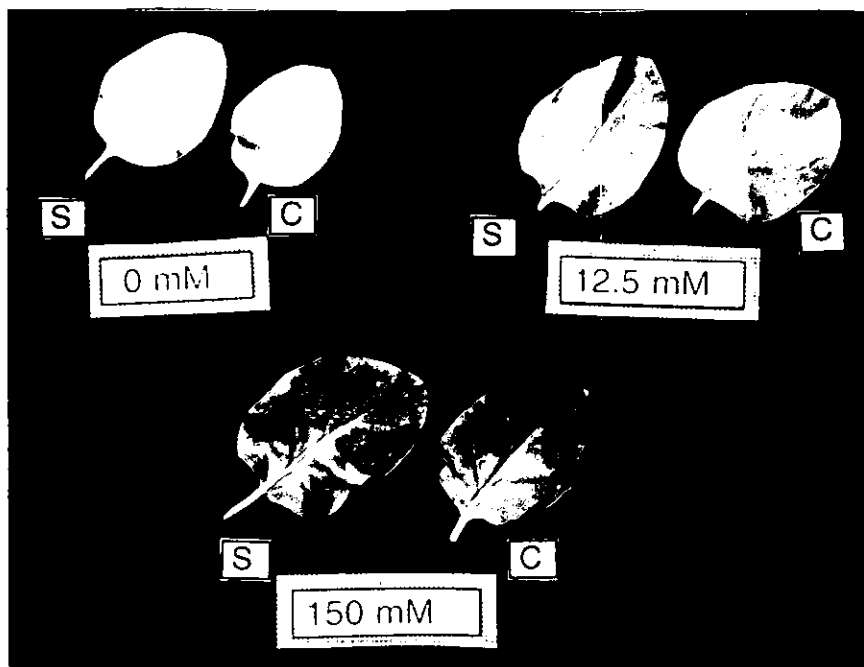


Figura 15. Fenotipo de las plantas de tabaco que sobreexpresan la GS en limitación o en exceso de nitrógeno en la solución de riego. Se compara el efecto de los tratamientos en plantas de tabaco 35S-GS en "sense" (S) y de plantas control (C) en tres tratamientos: T1 sin nitrógeno; T3 con 12.5 mM de amonio y T5 con 150 mM de amonio.

Por otro lado, en T2 ninguna planta mostró efectos deletéreos por deficiencia de nitrógeno: no se observaron hojas amarillas en las plantas entre la 4a y la 8a semana de riegos. La actividad específica de la GS fué similar a la registrada en el tratamiento control T3 (datos no mostrados). El contenido de clorofila en hoja (datos no mostrados) fué menor que al de las plantas en T3 y mayor al de las plantas en T1.

Sin nitrógeno, las plantas muestran clorosis pero las plantas 65 y 148 mostraron mejor apariencia en esta condición: sus hojas son ligeramente más verdes (Figura 15).

En T1 el efecto de la falta de nitrógeno se manifestó más severamente en las hojas de la base de la planta (hojas maduras), que comenzaron a ponerse amarillas para luego secarse. Esto fué más evidente en las plantas control: 47% de hojas amarillas. Las plantas 65 y 148 en T1 mostraron menos hojas amarillas: 31%-40% de hojas amarillas respectivamente. En esta condición de limitación de nitrógeno (T1) las plantas 65 y 148 conservaron el follaje verde, mostraron menos efectos deletéreos por el tratamiento y lograron persistir mejor que las plantas control. Ante esta mejoría en la apariencia de las plantas 65 y 148 en limitación de nitrógeno, decidimos caracterizar más a fondo estas plantas en esta condición.

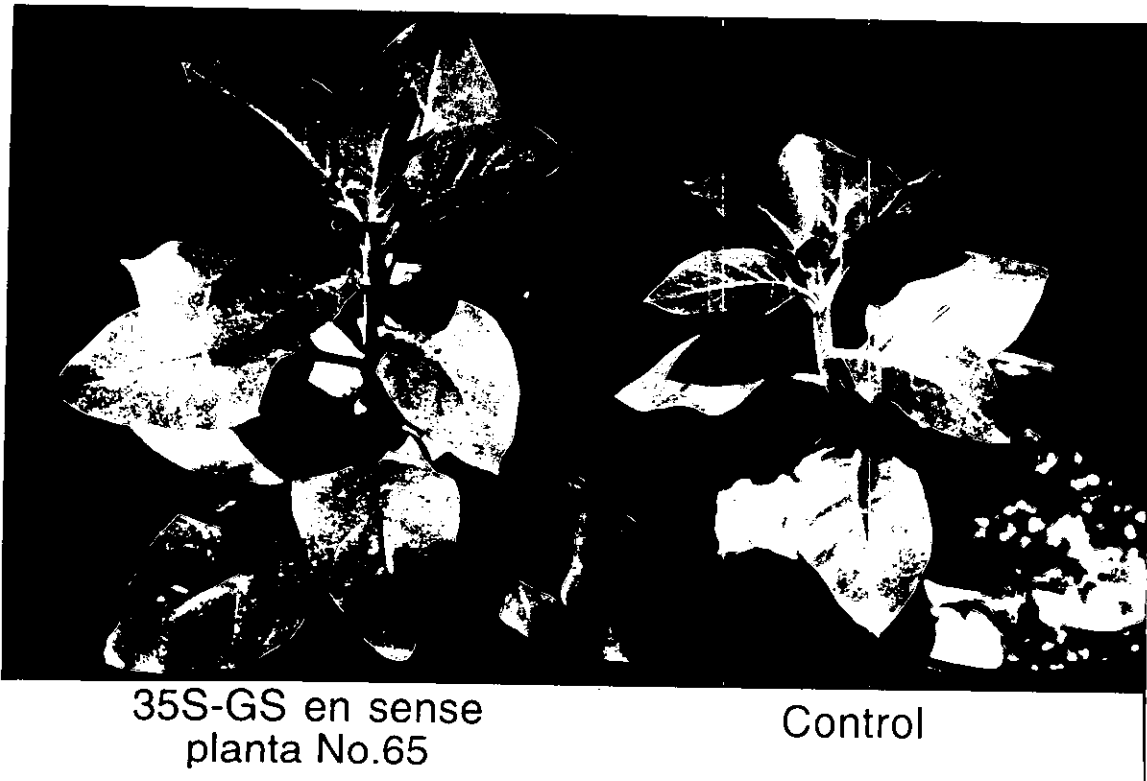


Figura 16. Fenotipo de plantas de tabaco que sobreexpresan la GS en limitación de nitrógeno (T1) en la 6a semana de riego. Planta de tabaco 65 que contiene la fusión 35S-GS en "sense" en comparación con una planta control.

Se realizó la caracterización fisiológica de las plantas 65 y 148 y de plantas control en T1 en comparación con el tratamiento T3. Se comentarán los resultados del fenotipo, actividad específica de la GS, contenido de clorofila y peso fresco del follaje.

En la Figura 16 se compara la apariencia entre una planta control y una planta 35S-GS en sense en T1 como ejemplo de lo observado en varias plantas. Claramente destaca que las hojas de la base de las plantas control tienen más hojas amarillas y las hojas de la base de las plantas 35S-GS en "sense" las conservan verdes.

En la Figura 17 se grafica la actividad específica de la GS en T1 y en T3. Como se esperaba, las plantas 65 y 148 35S-GS en "sense" sobreexpresaron la GS. La actividad de GS en las plantas 65 y 148, con respecto a las plantas control es superior de 7 a 8 veces en T1 y de 5 a 11 veces en T3. En T1 la actividad de GS de 65 y 148 es menor que en T3. Cabría especular al respecto que el amonio influya en la regulación de GS en estas plantas, no sabemos si sobre alguna GS endógena o sobre la GS1 citosólica de alfalfa presente en estas plantas transgénicas.

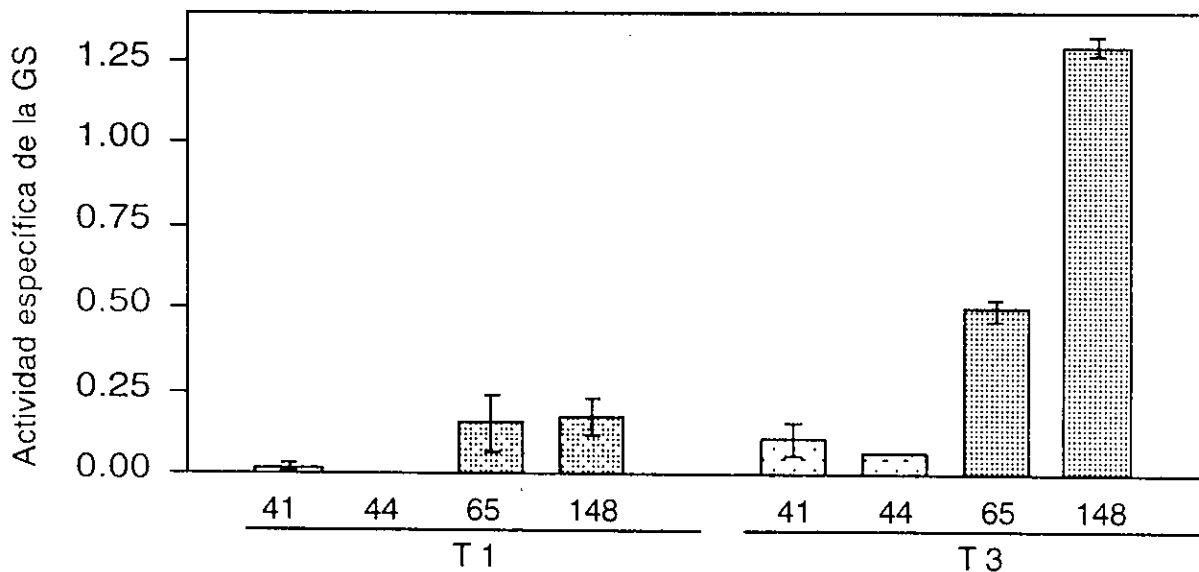


Figura 17. Actividad específica de GS en hoja de plantas de tabaco que sobreexpresan GS en limitación de nitrógeno ó con amonio. Las plantas se regaron con solución Jensen-MS 50% sin nitrógeno (T1) ó con 12.5 mM de amonio (6.25 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) (T3). Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 41 y 44 son plantas control. El promedio es de 2 plantas independientes y su error estándar de un ensayo representativo. Actividad específica U  $\gamma$ -GHA  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de peso fresco.

En la Figura 18 se registra el contenido de clorofila. En el tratamiento T1 las plantas 65 y 148 contienen 50% más clorofila en hoja, datos que coinciden con la apariencia de las plantas 65 (Figura 16) y 148 (no mostradas).

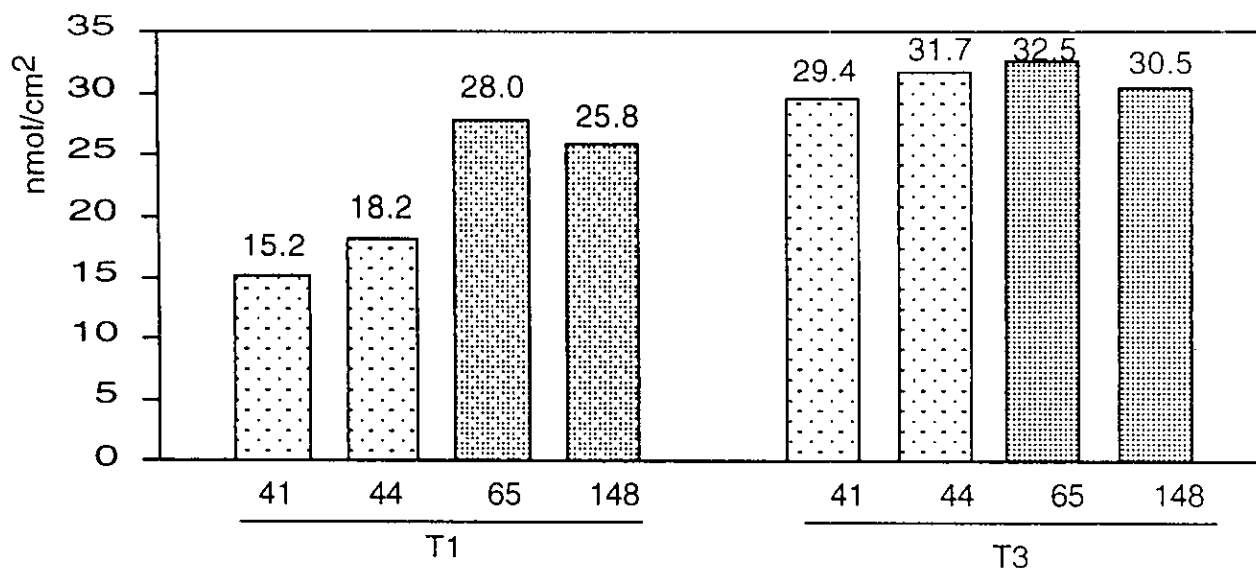


Figura 18. Cuantificación de clorofila total en hoja en plantas de tabaco que sobreexpresan la GS en limitación de nitrógeno (T1) ó con amonio (T3). Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 41 y 44 son plantas control. Se muestran los resultados de un ensayo representativo. Clorofila total expresada en nmol/cm<sup>2</sup>.

Al calcular la actividad específica de la GS con base al contenido de clorofila se observa que las plantas 65 y 148 en T1 tienen una actividad de GS 3.5 veces mayor que las plantas control (Figura 19). Esto indica que el incremento de la actividad de la GS en las plantas 65 y 148 está dado por el aumento de la actividad de la enzima.

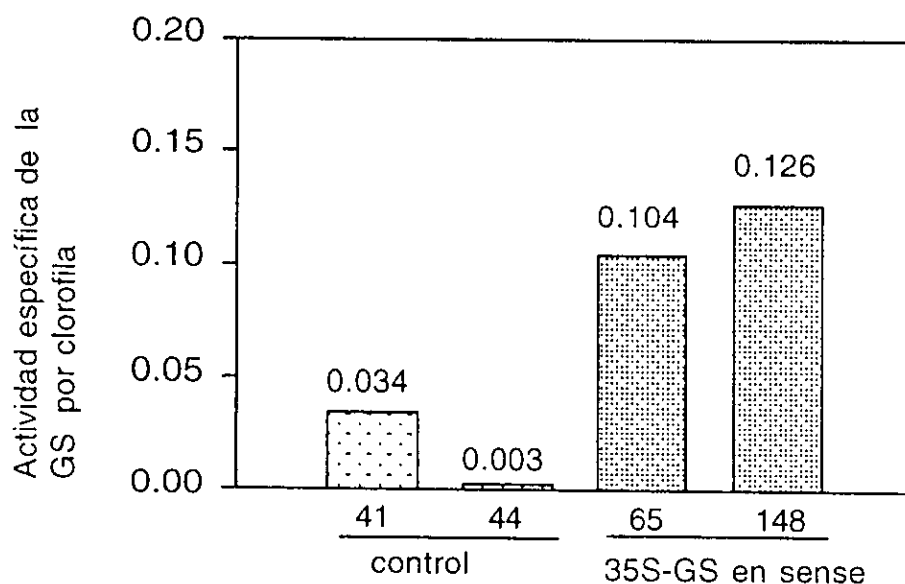


Figura 19. Actividad específica de la GS expresada con base al contenido total de clorofila en plantas de tabaco que sobreexpresan la GS en limitación de nitrógeno (T1). Las plantas 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 21 y 44 son plantas control. Estos son resultados de un ensayo representativo de esta determinación. Actividad específica = U  $\gamma$ -GHA  $\mu$ mol/min/nmol de clorofila total.

Ya que fenotípicamente las plantas 65 y 148 en T1 se aprecian favorecidas con respecto a las plantas control, otro parámetro a determinar fué el crecimiento de estas plantas. En la Figura 20 se grafica el crecimiento con base al peso seco del follaje en T1. En este tratamiento las plantas 65 y 148 tienen de 22 a 72% más peso seco del follaje que las plantas control. Esta ligera diferencia en peso correlaciona con la mejoría observada del fenotipo de estas plantas (Figura 16).

Las plantas 65 y 148 en T3 no mostraron una mejor apariencia con respecto a las plantas control, ni mayor rendimiento en peso seco (datos no mostrados).

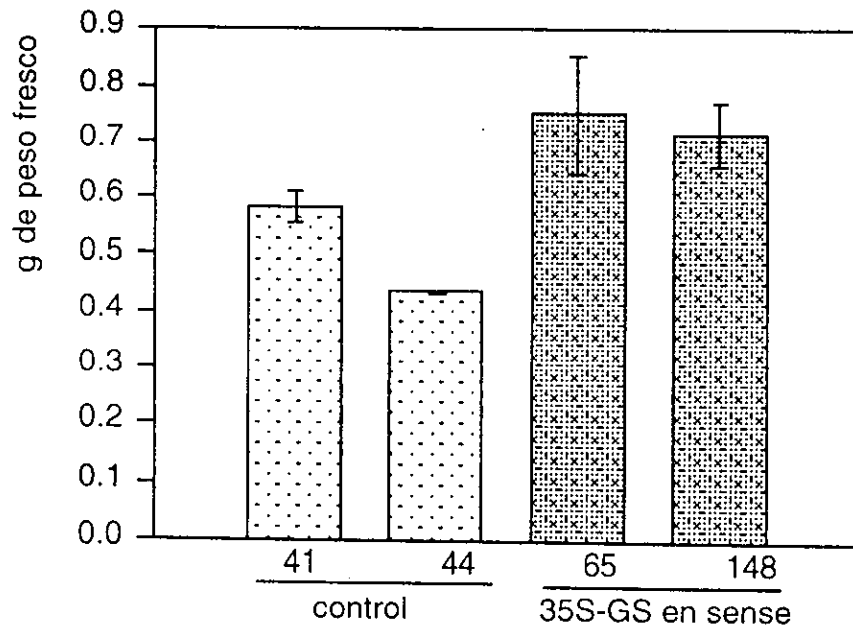


Figura 20. Determinación de peso seco del follaje en plantas de tabaco que sobreexpresan la GS en limitación de nitrógeno (T1). Las plantas de tabaco 65 y 148 contienen la fusión 35S-GS en "sense". Las plantas 41 y 44 son plantas control. El promedio y su error estándar corresponde a tres plantas independientes. El peso está expresado en gramos de peso seco del follaje.

Las plantas 65 y 148 en condiciones de limitación de nitrógeno (T1) mostraron una mejor apariencia. Más adelante se discute que en esta condición quizás la expresión constitutiva de la GS realiza la reasimilación del amonio interno producto de procesos de reciclaje de manera más eficiente en comparación con las plantas control.

En la Tabla 6 se resumen los resultados de la caracterización de las plantas 65 y 148 en limitación de amonio (T1) en comparación con el tratamiento control con 12.5 mM de amonio (T3).

		Plantas 35S-GS en "sense"	
		65	148
AE de GS transferasa:	T1:	↑ 5 X	↑ 6 X
	T3:	↑ 5 X	↑ 11 X
Clorofila total:	T1:	↑ 50 %	↑ 50 %
	T3:	≈	≈
Crecimiento (peso seco):	T1:	↑ 22 %	↑ 72 %
	T3:	≈	≈
Apariencia diferente:	T1:	Ligera mejora	
	T3:	No	No

Tabla 6. Resumen de la caracterización de las plantas que sobreexpresan la GS en limitación de nitrógeno (T1) con amonio (T3). ≈ similar contenido de.

Con estos resultados concluye el análisis efectuado a las plantas 65 y 148 en que la expresión de GS a niveles aumentados les significó una ventaja en condiciones de inanición por nitrógeno.

## 5. DISCUSION

La ingeniería genética de plantas (la construcción de fusiones génicas para transformar genéticamente células vegetales) comprende una serie de metodologías que han resultado ser muy útiles para estudiar la función y la regulación de genes específicos. De acuerdo a su papel en la asimilación de amonio, la glutamino sintetasa es una enzima clave en el metabolismo nitrogenado de las plantas. Para entender más a fondo el papel de la GS, en este trabajo se caracterizó la alteración de la expresión de una GS1 citosólica en plantas transgénicas obtenidas por ingeniería genética.

Se obtuvieron poblaciones R1 de tabaco transformadas. El material se seleccionó de acuerdo a los resultados del ensayo de GUS y de la amplificación de los transgenes de *gus*, 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense" respectivamente (Figuras 3-6).

En las plantas de tabaco transformadas con 35S-GS en "antisense" no se detectó disminución en el nivel de RNAm de GS (Figura 7). Sin embargo, no sabemos si ese acúmulo de RNAm está enriquecido con el transcrito de GS en "antisense" porque no se hizo la detección específica de este transcrito. Dada esta limitación metodológica no podemos ajustarnos del todo a la conclusión de otros trabajos similares en los sistemas heterólogos de tabaco para inhibir a la GS (Temple *et al*, 1993) y a la hidroxipiruvato reductasa (HPR) (Oliver *et al*, 1993), en que se detectaron altos niveles del transcrito del gene en "antisense" en las plantas transgénicas, pero el RNAm endógeno de los genes blanco no se modificó. En estos sistemas el mecanismo por el cual los genes en "antisense" inhiben la expresión de un gene nativo, contrasta con el de los sistemas homólogos que evocan una reducción del nivel de RNAm blanco (Oliver *et al*, 1993).

Aunque el mecanismo exacto en los sistemas heterólogos se desconoce, se ha propuesto también la formación de un dúplex entre las cadenas complementarias del RNA en "antisense" y el RNAm en sentido directo del gene blanco. Este dúplex "antisense"-RNA:RNAm no se degrada como el homodúplex. El heterodúplex es al parecer, estabilizado por la formación de algunas estructuras secundarias internas y por la presencia de bases terminales no apareadas que impiden su degradación por RNAsas (Eguchi *et al*, 1991; Temple *et al*, 1993; Oliver *et al* 1993). En tal caso, se sugiere que los heterodúplex se acumulan y son estables, pero son inaccesibles a la maquinaria traduccional al no poder ser transportados fuera del núcleo ó porque el RNAm endógeno ahora asociado al "antisense"-RNA ya no pueda unirse a los ribosomas e interactuar con los factores de traducción requeridos (van der Krol *et al*, 1988b; Oliver *et al*, 1993; Bourque, 1995). Este modelo en parte explicaría, que no se haya detectado disminución del RNAm del gene blanco de las plantas transformadas de los trabajos de Oliver *et al*



(1993), Temple *et al* (1993) y tal vez de las plantas de tabaco con la GS1 de alfalfa en "antisense" de este trabajo. Al menos así nos explicábamos los resultados de la primera parte de este trabajo con las plantas 35S-GS en "antisense".

Por otro lado, aunque se amplificó por PCR un fragmento del transgene 35S-GS en "antisense" en las plantas de tabaco utilizando oligonucleótidos específicos (Figura 5), no se detectó disminución de la actividad enzimática de la GS en ninguna de las plantas analizadas (datos no mostrados) ni se observó alguna alteración fenotípica asociada a la integración del gene de GS en "antisense". Tampoco se realizó una hibridación del transgene con una sonda de DNA de la GS (Southern blot). Con estos últimos resultados no se puede discriminar cuál de las siguientes posibilidades es la que ocurrió con las plantas 35S-GS en "antisense" aquí analizadas: (1) que las plantas no contengan el transgene, lo cual contrasta con los resultados de la selección de las plantas; (2) que el transgene en las plantas seleccionadas no se haya expresado, por ejemplo, por algún efecto posicional; (3) que estas plantas con GS en "antisense" sean aquellas con un nivel de inhibición de GS parcial pero insignificante. Esta última posibilidad resultaría acorde a la conclusión de Oliver *et al* (1993) y Bourque (1995) en que se discute que plántulas con una fuerte inhibición de la actividad de la proteína blanco pueden ser contraseleccionadas en alguna etapa del cultivo *in vitro*, sólo regenerándose aquellas plantas con niveles bajos de inhibición de la proteína blanco, lo cual no se refleja en un cambio fenotípico.

En otros trabajos, el nivel de inhibición de la actividad de enzimas metabólicamente importantes como la GS y la HPR, en sistemas heterólogos por "antisense", ha sido usualmente parcial y no excede más allá del 50% (Oliver *et al*, 1993; Temple *et al* 1993, 1994). En algunas plantas de *Lotus* la actividad de la GS no disminuyó ó sólo disminuyó en 20%. La apariencia de estas últimas fué moderadamente estresada: follaje amarillo, desarrollo incompleto de las hojas y varias plantas murieron, sobreviviendo solo algunas (Temple *et al*, 1994). En tabaco el porcentaje de inhibición de GS que alcanzó una planta fué del 40%. Esta planta mostró síntomas de deficiencia por nitrógeno. En otras tres plantas con 25% de inhibición de actividad de GS no se observó fenotipo distinto al de las plantas control (Temple *et al*, 1993). Oliver y colaboradores (1993) reportaron una disminución menor al 50% de la actividad de HPR en tabacos transgénicos y observaron patrones variados de alteración fenotípica.

En cambio, en el sistema homólogo de alfalfa y en *Lotus* (Temple *et al*, 1994) la inhibición de la GS reportó efectos no solamente dañinos sino que hasta letales. Al parecer con una actividad de GS1 muy disminuída se acumuló el amonio a niveles

tóxicos y la disponibilidad de nitrógeno bajo la forma de glutamina disminuyó considerablemente alterando la fisiología de la planta a niveles perjudiciales.

Se ha discutido que la inhibición por RNA en "antisense" en sistemas heterólogos no suele ser tan eficiente como en los sistemas homólogos (Oliver *et al* 1993), a excepción de la disminución de la expresión de chalcona sintasa (CHS) de *Petunia* en tabaco (van der Krol, *et al*, 1988a) y de la enzima GBBS (granule-bound starch synthase) de yuca en papa (Salehuzzaman *et al*, 1993). En estas plantas transformantes si hubo inhibición substancial de la actividad de la CHS y de la GBSS. Sin embargo, cabe considerar que ninguna de estas proteínas es clave en el metabolismo de las plantas. En cambio, la HPR es una enzima importante en la fotorrespiración y la GS es un enzima clave en el metabolismo nitrogenado de la planta.

En nuestro caso, no se logró seleccionar plantas de tabaco con actividad de GS disminuída con RNA en "antisentido". En este sistema heterólogo esperábamos inhibir parcialmente la GS, como en el trabajo de Temple *et al* (1993), observar cambios a niveles mesurables y evaluar sus efectos en las plantas. Sin embargo, las limitaciones de esta estrategia fueron que: (1) la inhibición de una enzima importante como la GS provocó más efectos perjudiciales que positivos; (2) el sistema de selección de aquellas plantas con actividad de GS parcialmente disminuída y que sobrevivan no fué el adecuado, en consecuencia se tendría diseñar un sistema de selección a modo de minimizar la presión de selección que sufren estas plantas, por ejemplo crecerlas en presencia de glutamina o de algun otro metabolito limitante, así como analizar un mayor número de transformantes; (3) los niveles de inhibición efectiva que se pudieron haber alcanzado al utilizar el promotor fuerte 35S, no permitieron obtener plantas. Para inhibir parcialmente la expresión de GS a niveles no letales quizás resulte más conveniente utilizar promotores inducibles.

Por otro lado, en este trabajo se obtuvieron plantas R1 establemente transformadas con la GS1 de alfalfa bajo el promotor 35S que sobreexpresaron la GS. Los niveles de sobreexpresión de GS en términos de actividad enzimática fueron de 3 a 11 veces más que en las plantas control (Figuras 10 y 17). Estos niveles son similares o hasta más altos que los reportados en otros trabajos de GS. Eckes *et al* (1989) reportan 5 veces más de actividad de GS en tabaco con la reacción de transferasa; Temple *et al* (1993, 1994) reportan aumento de GS de 10 al 25 % en tabaco y de 42 % en *Lotus* con el ensayo de transferasa y Vincent *et al* (1997) con el ensayo biosintético reportan un incremento de actividad de GS del 50 a 80 % en *Lotus*.

El aumento de la actividad de la GS en las plantas transgénicas de tabaco con la construcción 35S-GS en "sense" coincide con el aumento en la abundancia del RNAm (Figura 8) y con el enriquecimiento de polipéptido GS1 en hoja (Figura 9). Los transcritos de GS sobreexpresada se acumularon a niveles más altos que el nivel endógeno de GS de las plantas control. Esto condujo a la síntesis de las subunidades de GS1 de alfalfa que se ensamblaron en la enzima funcional.

En la hoja de plantas transformadas está presente el polipéptido de GS2 endógeno y además aparece enriquecida la fracción del polipéptido de GS1. En la hoja de tabaco esto es notable, ya que, usualmente el polipéptido GS1 endógeno está presente a niveles mínimos, a veces indetectables como se observó en las muestras de las plantas control (Figura 9). Con esta estrategia se logró aumentar la síntesis de GS1 de alfalfa, aunque no se sabe si hubo inducción de la isoforma de GS1 nativa de tabaco. La expresión constitutiva de GS con aumento de la abundancia de su RNAm y/o de su polipéptido también se ha reportado en tres trabajos de sobreexpresión de GS (Eckes *et al*, 1989, Temple *et al*, 1993, 1994 y Vincent *et al*, 1997).

Por otro lado, no se detectó alteración del nivel de GS2 nativa por efecto de la sobreexpresión en hoja de la GS1 (Figura 9). En otros trabajos se ha observado una aparente inducción de la expresión de isoformas nativas resultado de la sobreexpresión de la GS ajena en plantas transgénicas. Temple *et al* (1993) además de observar el aumento de GS1 de alfalfa en hoja de tabaco transformado reportan el aparente enriquecimiento de la GS2 nativa. Esta aparente inducción de GS2 nativa por efecto de GS1, lo atribuyen a una mejor eficiencia en la traducción de la GS2 nativa ó a una mayor estabilidad de la enzima ya que en realidad no detectaron incremento de transcrito de GS2 en las plantas transformadas. En el trabajo de Hirel *et al*, (1992) en hoja de tabaco, se reporta la expresión inducida de una isoforma nativa de GS1 por una GS1 de soya. El gene ajeno de GS de soya indujo acumulación de RNAm de la GS1 endógena en hoja de tabaco, pero a niveles muy bajos que no reflejaron un aumento en la actividad total de la GS. Este efecto no se observó en otros trabajos de sobreexpresión heteróloga de GS (Temple *et al*, 1994; Vincent *et al*, 1997).

Las plantas de tabaco que sobreexpresaron la GS no mostraron ninguna alteración en su apariencia. Hay varias posibles explicaciones como: que en estas plantas el aumento del nivel de GS no sea suficiente para provocar una alteración importante que se refleje en el fenotipo; que tal vez la planta tenga la capacidad de ajustar el cambio provocado y modere su metabolismo para evitar efectos deletéreos; y/o bien, que en este sistema heterólogo el ensamblaje de los hetero-octámeros y/o su

regulación en las plantas de tabaco no sea tan eficiente como la GS endógena.

El efecto de la sobreexpresión de la GS en el sistema homólogo de alfalfa, en cambio, si reveló cambios fenotípicos pero asociados a efectos deletéreos por la sobreexpresión de la enzima homóloga. Esta sobreexpresión alteró el balance fisiológico de estas plantas a niveles letales. El fenotipo de estas plantas fué que el follaje mostró color verde oscuro y las plantas no sobrevivieron (Figura 11A). Estos resultados se obtuvieron en nuestro laboratorio en un experimento ya descrito anteriormente en este trabajo y también lo reporta el trabajo de Temple *et al*, (1994) con alfalfa y *Lotus*. En otros trabajos con sistemas heterólogos de sobreexpresión de GS en tabaco y en *Lotus* no se observó algún fenotipo distintivo por efecto de la sobreexpresión (Eckes *et al*, 1989, Temple *et al*, 1993, Vincent *et al*, 1997).

En nuestro trabajo, además de la caracterización molecular de la expresión estable del gene de alfalfa de la GS también se caracterizó el impacto fisiológico que ejerce la expresión constitutiva de la GS1 en las plantas de tabaco. También con esta estrategia se buscó una fenotipo distintivo en las transformantes que reflejara una ventaja a estas plantas por sobreexpresar a la GS.

En nuestro trabajo con el sistema homólogo de sobreexpresión de la GS en alfalfa, resultó que las plantas mostraron dependencia por glutamato para sobrevivir. La posible explicación que dimos a este efecto, fué que una alteración metabólica fuerte como la expresión constitutiva de la GS consume todo el glutamato (sustrato de la GS) para la síntesis de glutamina, por lo que las pozas de glutamato se vuelven limitadas para sostener la síntesis de otros aminoácidos esenciales para el crecimiento normal de la planta, por lo que la planta muere. Al regar estas plantas 35S-GS en "sense" de alfalfa con glutamato se restituyó el nivel necesario de este compuesto para sobrevivir.

Creíamos que si el glutamato era limitante para las plantas de alfalfa, tal vez a las plantas de tabaco les favorecería, pero esto no fué así. Las plantas de tabaco que sobreexpresaron la GS al ser regadas con glutamato no tuvieron una clara mejoría en el contenido de proteína total (Figura 13), ni mayor cantidad de clorofila (Figura 14) aunque mostraron un incremento en la actividad de GS en comparación con plantas solo regadas con nitrato de amonio (Figura 12). Las plantas de tabaco no mostraron dependencia por el glutamato, tampoco mostraron alguna mejoría ó deficiencia notable.

Otro ensayo fisiológico fué someter a las plantas de tabaco que expresaron constitutivamente la GS y sin un fenotipo distinto, a condiciones de estrés por exceso de

amonio ó por limitación de nitrógeno. Se observó en todos los tratamientos que las plantas 65 y 148 siempre tuvieron niveles aumentados de actividad de la GS en comparación con las plantas control (datos no mostrados). Se observó que a concentraciones tóxicas de amonio (T5: 150 mM de amonio), las plantas 35S-GS en "sense", mostraron los efectos deletéreos del tratamiento al igual que las plantas control. A las plantas 65 y 148 la sobreexpresión de la GS no les significó una ventaja ante concentraciones muy elevadas de amonio.

En cambio, las plantas 65 y 148 en limitación de nitrógeno (T1), mostraron una moderada mejoría fenotípica (Figura 16). Este fenotipo mejorado se reflejó en que hubo un incremento entre el 22% y el 72% más de peso seco del follaje (Figura 20) y un aumento del 50% de la concentración de clorofila (Figura 18). La actividad específica siguió siendo más alta en estas plantas con respecto a las plantas control, con un aumento de 7 a 8 veces expresada por peso fresco (Figura 17) ó de 3.5 veces más expresada por clorofila (Figura 19). Estas ventajas también se reflejaron en que estas plantas toleraron mejor a la condición estresante de falta de nitrógeno externo, en comparación con las plantas control que mostraron más hojas amarillas, un claro efecto de la falta de nitrógeno.

A pesar de que las plantas 65 y 148 mostraron una moderada mejoría fenotípica, la actividad de la GS en el Tratamiento 1 disminuyó con respecto al Tratamiento 3, al parecer, como consecuencia de la baja disponibilidad de nitrógeno. En la Figura 17 se observa que los niveles de actividad de la planta 65 en T1 disminuyeron en 3 veces y de la planta 148 disminuyeron en 7 veces. Al respecto se podría especular que la actividad de la GS1 de alfalfa, que sería la responsable de los niveles aumentados de GS en estas plantas, podría estar regulada por suplemento externo de amonio. No se exploró más esta posible regulación post-transcripcional, ni se sabe si esta regulación sea solo por amonio, que fué la fuente nitrogenada en estos experimentos, o también por nitrato. Sería interesante en un futuro abundar más al respecto.

La expresión constitutiva de la GS en las plantas transgénicas de tabaco les dió a estas plantas la ventaja de perdurar cuando el nitrógeno en la solución de riego estuvo limitado. Durante períodos de estrés, dentro de la planta se desencadenan cambios internos de redistribución del nitrógeno: de los órganos maduros a los órganos jóvenes. En las hojas maduras también hay ruptura de pigmentos como la clorofila, de ahí su aspecto amarillo por la pérdida del pigmento verde. Un estrés de tipo nutricional como el del Tratamiento 1 pudo haber acelerado esta redistribución del nitrógeno que conlleva a la ruptura de proteínas, a reacciones de transaminación y liberación de amonio que si no

es asimilado rápidamente se puede elevar a niveles tóxicos. Suponemos que la reasimilación constitutiva del amonio liberado por estos procesos de reciclaje, es más eficiente en las plantas 65 y 148 gracias a la actividad constitutiva de GS y esto se reflejó en la persistencia de estas plantas en esta condición.

Las consecuencias fisiológicas de esta alteración de la GS en plantas transgénicas sólo se han evaluado en un trabajo previo al nuestro. Vincent *et al*, (1997) sobreexpresaron la GS1 de soya en *Lotus* y evaluaron el crecimiento de las plantas transgénicas sometidas a dos tratamientos de riegos: con 4 mM de amonio como concentración normal y con 12 mM de amonio como concentración alta, no tóxica. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de estas plantas entre los dos tratamientos, en términos de peso seco o de proteína soluble. Sin embargo, no se observó una mayor asimilación de amonio en estas plantas, a pesar, de sobreexpresar la GS. Se discute que esta alta actividad de GS fué sustentada no por el amonio externo, sino mas bien por el amonio liberado de la degradación de proteínas en hoja. Este efecto y la floración prematura que se observó en estas plantas son características de la senescencia. Se discute que el efecto de sobreexpresión de una GS de soya en *Lotus* adelantó procesos fisiológicos en estas plantas.

Los mecanismos que intervienen en la regulación de la GS1, todavía no han sido muy claros, al parecer son particulares para cada isoforma y son acordes a la fisiología de cada especie vegetal. La regulación de las isoformas de GS1 de leguminosas donde ocurre la asimilación de amonio de manera importante en nódulos y raíces puede ser diferente a la regulación de GS1 de plantas C3 en que el papel de la GS1 es menor que la GS2 en la reasimilación del amonio en hoja.

En este trabajo se destaca que la manipulación genética por ingeniería genética es una alternativa para contribuir al conocimiento de los mecanismos regulatorios que controlan la asimilación de amonio y el uso eficiente del nitrógeno en las plantas. Además se concluye que es recomendable realizar el análisis fisiológico que para nosotros significó un importante complemento a la caracterización de las plantas moduladas obtenidas por ingeniería genética.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se concluye lo siguiente:

- 1) Se obtuvieron poblaciones de plantas transformadas seleccionadas por su resistencia a la kanamicina en la fase de cultivo *in vitro* y al ensayo positivo de GUS.
- 2) En las plantas seleccionadas se detectó la presencia de los transgenes de *gus*, 35S-GS en "antisense" y 35S-GS en "sense" de acuerdo a la amplificación de regiones específicas por PCR.
- 3) Las plantas 51, 154 y 156 analizadas no mostraron niveles disminuídos de actividad específica de GS. En estas plantas se tiene la evidencia de la presencia del transgene 35S-GS en "antisense" por la amplificación de regiones específicas de DNA por PCR, pero no se tienen evidencias de su expresión (detección del transcrito). No se puede concluir claramente si el transgene en estas plantas no se expresó ó bien que su expresión en las plantas seleccionadas haya sido mínima de tal forma que no se logró disminuir la actividad de la GS. Ante esta limitante se sugiere diseñar otra estrategia de selección del material con GS en "antisense" como adicionar glutamina ó algún otro compuesto limitante ó utilizar promotores regulables para inhibir parcialmente a la GS a niveles no letales. La disminución de la expresión de la GS en las plantas provoca más efectos perjudiciales que benéficos a las plantas.
- 4) Las plantas 65 y 148 transformadas con 35S-GS en "sense", si mostraron aumento en la expresión de la GS a nivel de actividad enzimática y de mayor acúmulo de RNAm de GS con respecto a las plantas control.
- 5) En las plantas 65 y 148, la fracción del polipéptido GS1 en hoja se enriqueció, a diferencia de las plantas control en que los niveles endógenos de GS1 fueron indetectables. Se asume que el polipéptido GS1 aumentado corresponde a la GS1 de alfalfa sobreexpresada en estas plantas. Los niveles de GS2 en hoja de las plantas 65 y 148 no se modificaron.
- 6) Las plantas de tabaco 65 y 148 no mostraron ninguna apariencia diferente por efecto de la sobreexpresión de la GS en la condición de maceta regadas con solución Jensen-MS al 50% con 12.5 mM de nitrato de amonio.

7) Las plantas de tabaco 65 y 148 no mostraron una mejoría notable por el suministro exógeno de glutamato como fuente nitrogenada.

8) Con la adición de amonio a concentraciones elevadas (T4 y T5) como fuente nitrogenada a las plantas 65 y 148, no se observó una apariencia diferente a la de las plantas control. En el Tratamiento 5 con 150 mM de amonio, las plantas 65 y 148 mostraron los mismos efectos deletéreos que las plantas control. La sobreexpresión de la GS no les significó una ventaja a estas plantas en estos dos tratamientos.

9) En limitación de nitrógeno (T1) durante 6 semanas, las plantas 65 y 148 de manera similar que las plantas control, mostraron clorosis en el follaje como síntoma de deficiencia de nitrógeno.

10) Las plantas 65 y 148 en esta condición de limitación de nitrógeno (T1) tuvieron una mejor apariencia que las plantas control, lo cual se reflejó en mayor crecimiento y mayor contenido de clorofila. Al parecer en esta condición de inanición, es más eficiente la asimilación del amonio en las plantas que expresan constitutivamente la GS que en las plantas control. En estas plantas la sobreexpresión de la GS resultó ser favorable.

11) Finalmente, es importante también complementar este tipo de trabajos con el análisis fisiológico de las plantas con niveles alterados de una proteína blanco. A fin de obtener una conclusión mas completa del papel de esta GS1 citosólica de alfalfa en las plantas se sugiere complementar la caracterización de las plantas que sobreexpresaron la GS evaluando otros parámetros como: pozas de aminoácidos, contenido de nitrógeno total, cuantificar la actividad de otras enzimas como la GOGAT y analizar la posible regulación por nitrógeno de esta GS1 de alfalfa. También resultaría enriquecedor evaluar la injerencia de la sobreexpresión de la GS en términos del metabolismo del carbono, por ejemplo determinar la tasa de fotosíntesis (de asimilación de carbono) en estas plantas.



## 7. BIBLIOGRAFIA CITADA.

- Arnon DJ (1949). Cooper enzymes in chloroplasts. Polypoxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- Barker RF, Idler KB, Thompson DV and Kemp JD (1983). Nucleotide sequence of the T-DNA region from de *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Mol. Biol. 2:335-350.
- Becker TW, Caboche M, Carrayol E and Hirel B (1992). Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase an light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. Plant Mol. Biol. 19:367-379.
- Bennett MJ and Cullimore JV (1989). Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit and composition in developing root nodules and plumules. Planta 179:433-440.
- Bennett MJ, DA Lightfoot and JV Cullimore (1989). cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase  $\gamma$  polipeptide of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol. Biol. 12:553-565.
- Binns AN and Tomashow MF (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Ann. Rev. Microbiol. 42:575-606.
- van Blockland R, van der Geest L, Mol JNM and Kooter JM (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase results from an increase in RNA turnover. Plant J 6:861-877.
- Bourque JE (1995). Antisense strategies for genetic manipulations in plants. Plant Sci. 105:125-149.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem 72:248-252.
- Buchanan-Wollaston V, Passiatore JE, Cannon F (1987). The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. Nature 328:172-175.
- Carvalho H, Pereira S, Sunkel C and Salema R (1992). Detection of cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods. Plant Physiol. 100: 1591-1594.
- Chabaud M, Passiatore JE, Cannon F and Buchanan-Wollaston V (1988). Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Plant Cell Rep. 7:512-516.
- Chilton M-D, Saiki RK, Yadav N, Gordon MP and Quetier F (1980). T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear fraction of crown gall tumor cells. PNAS 77:4060-4064.
- Cock JM, Brock IW, Watson AT, Swarup R, Morby AP and Cullimore JV (1991). Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Mol. Biol. 17:761-771.
- Cock JM, Hémon P and Cullimore JV (1992). Characterization of the gene encoding the plastid-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris*: regulation of  $\beta$ -glucurodinase gene fusions in transgenic tobacco. Plant Mol. Biol. 18:1141-1149.
- Cock JM, Muold RM, Bennett MJ and Cullimore JV (1990). Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. Plant Mol. Biol. 14:549-560.
- Cullimore JV and Bennett MJ (1988). The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. J. Plant Physiol. 132:387-393.

- Cullimore Jv, Gebhardt C, Saarelainen R, Miflin BJ, Idler RB, Barker RI (1984). Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family. *J. Mol. Appl. Genet.* 2:289-599.
- Cullimore JV, M Lara, J Lea & BJ Miflin (1983). Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* 157: 245-253.
- DasSarma S, Tischer E and HM Goodman (1986). Plant glutamine synthetase complements a *gln A* mutation in *Escherichia coli*. *Science*, 232:1242-11244.
- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Rao Movva N, Thompson C, Van Montagu M and Leemans J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6:2513-2518.
- Delauney AJ, Tabaeizadeh Z and Verma DPS (1988). A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants. *PNAS* 85:4300-4304.
- Donn G, Tischer E, Smith JA and Goodman H (1984). Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. *J. Mol. and Appl. Gen.* 2:621-635.
- Dorlac de Borne F, Vincentz M, Chupeau Y and Vaucheret H (1994). Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 243:613-621.
- Dougall DK (1974). Evidence for the presence of glutamate synthetase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 639-646.
- Dubois F, Brugiere N, Sangwan RS and Hirel B (1996). Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts show organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol. Biol.* 31: 803-817.
- Dunn K, Dickstein R, Feinbaum R, Burnett R, Peyterman K, Thoidis G, Goodman HM and Ausubel FM (1988). Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant Microbe Inter.* 1:66-76.
- Ecker JR and Davis RW (1986). Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *PNAS* 83:5372-5376.
- Eckes P, Schidt P, Daub W and Wengenmayer F (1989). Overproduction of alfalfa glutamine synthetase in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 217: 263-268.
- Edwards JW and Coruzzi GM (1989). Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* 1:241-248.
- Edwards JW, Walker EL y Corruzzi GM (1990). Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *PNAS* 87: 3459-3463.
- Eguchi Y (1991). Antisense RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 60:631-652.
- Ferguson AR and Sims AP (1974). The regulation of glutamine metabolism in *Candida subtilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J. Genet. Microbiol.* 80:159-171.
- Forde BG and Cullimore J (1989). The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *Oxford Surveys in Plant Mol. and Cell Biol.* 6:247-296.
- Forde BG, HM Day, JF Turton, S Wen-jun, JV Cullimore and JE Oliver (1989). Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* 1:491-401.

- Gardner RC, Howarth AJ, Hahn P, Brown-Luedi M, Shepherd RJ and Messing J (1981). The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acids Res.* 9:2871-2888.
- Gebhardt C, Oliver JE, Forde BG, Saaraleinen R and Mifflin BJ (1986). Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *EMBO J.* 5: 1429-1435.
- Graan T and Ort DO (1984). Quantitation of the rapid electron donors to P700 the functional plastoquinone pool and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 250:14003-14010.
- Green PJ, Pines O and Inouye M (1986). The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 55:569-597.
- Groat RG and Schrader LE (1982). Isolation and immunochemical characterization of plant glutamine synthetase in alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules. *Plant Physiol.* 70:1759-1761.
- Hammil JD, Rounsley S, Spencer A, Todd G and Rhodes MJC (1991). The use of polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Rep* 10:221-224.
- Handberg K and Stougaard J (1992). *Lotus japonicus* an autogamous, diploid legume species for classical genetics. *Plant J.* 2: 487-496.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M and Schell J (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using Ti-plasmid derived vector. *Nature* 303:209-213.
- Hirel B, Bouet C, King B, Layzell D, Jacobs F and Verma DPS (1987). Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J* 6:1167-1171.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Hoykaas PJ and Schilperoort RA (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19:15-38.
- Izant J and Weintraub H (1985). Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* 229:345-352.
- Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q and Napoli CA (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single copy vs complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* 31:957-973.
- Kado CI (1991). Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1-32.
- Klee H, Horsch R and Roger S (1987). *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann Rev. Plant Physiol* 38:467-486.
- Knight TJ, Bush DR and Langston-Unkefer PJ (1988). Oats tolerant of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* contain tabtoxin- $\beta$ -lactam-insensitive leaf glutamine synthetases. *Plant Physiol.* 88:333-339.
- Knight TJ and Langston-Unkefer PJ (1988). Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogen. *Science* 241:951-954.

- van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerarts AGM, Mol JNM and Stuitje AR. (1988a). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333:866-869.
- van der Krol AR, Mol JNM and Stuitje AR (1988b). Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Bio Techniques* 6:958-976.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM and Stuitje AR (1990). Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-299.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R and Coruzzi GM (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:569-93.
- Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Mifflin BJ, Johnston AWB and Lamb JW (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254-258.
- Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J and Sánchez F (1984). Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76:1019-1023.
- van Larebeke N, Genetello C, Schell J, Schilperoort RA, Hermans AK, Hernalsteens JP and Van Montagu M (1985). Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255:742-743.
- Latterich M and Croy RRD (1993). Plant Gene Index. Chapter 3. In *Plant Molecular Biology LabFax*. Croy RRD (ed). Bios Sci. Publ. Blackwell Sci. Publ., Oxford, UK. pp82-94.
- Layzell DB (1990). N<sub>2</sub> fixation, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation in plant physiology. *Biochemistry and Molecular Biology*. Dennis D and Turpin DH eds. Longman Sci. and Techn., UK. pp 389-405.
- Lea PJ (1990). Enzymes of ammonia assimilation. In *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 3. *Enzymes of Primary Metabolism*. Dey PM and Harborne JB series eds. Academic Press Limited. USA. pp 257-276.
- Lea PJ (1993). Nitrogen Metabolism. in *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Lea PJ and Leegood RC, eds. John Wiley & Sons. England. pp 159-167.
- Lea PJ and Mifflin BJ (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251:614-616.
- Leason M, Cunliffe D, Parkin D, Lea PJ and Mifflin BJ (1982). Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulphoximine, phosphinotricin and other glutamate analogues. *Phytochem.* 21:855-857.
- Lichtenstein C (1988). Anti-sense RNA as a tool to study plant gene expression. *Nature* 333:801-802.
- Li M, Villemur R, Hussey PJ, Silflow CD, Gantt JS and Snustad DP (1993). Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.* 23:401-407.
- Lightfoot DA, NK Green and JV Cullimore (1988). The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 11: 191-202.

- Lloyd A, Barnasson AR, Rogers SG, Byrne MC, Fraley RT and Horsh RB (1986). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 234:464-466.
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R and Fraley R (1986). Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 5:81-84.
- McNally SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF and Stewart GR (1983). Glutamine synthetase in higher plants. *Plant Physiol.* 72:22-25.
- Memelnik J, Swords KMM, Staehelin LA and Hoge JHC (1994). Southern, Northern and Western blot analysis. In *Plant Mol. Biol. Manual* F1:1-23. Kluwer Academic Publishers, Belgium.
- Mc Parland RH, Guevara JG, Becker RR and Evans HJ (1976). The purification of the glutamine synthetase from the cytosol of soya-bean root nodules. *Biochem. J.* 153:597-606.
- Miao GH, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW and Verma DPS (1991). Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* 3:11-22.
- Mifflin BJ and Lea PJ (1980). Ammonia assimilation. In: *The Biochemistry of Plants*. Vol 5. Mifflin BJ ed. Academic Press NY. pp 169-202.
- Murashige T. and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-462.
- Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R (1990). Introduction of a chimaeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 2:279-289.
- Odell JT, Nagy F and Chua NH (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- Oliver MJ, Ferguson DL, Burke JJ and Velten J (1993). Inhibition of tobacco NADH-hydroxypyruvate reductase by expression of a heterologous antisense RNA derived from a cucumber cDNA: Implications for the mechanism of action of antisense RNAs. *Mol. Gen. Genet.* 239:425-434.
- Ortega JL, Campos F, Sánchez F and Lara M (1986). Expression of two different glutamine synthetase polypeptides during root development in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 80:1051-1054.
- Padilla JE, Campos F, Conde V, Lara M and Sanchez F (1987). Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9:65-74.
- Peterman TK and Goodman HM (1991). The glutamine synthetase gene of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol. Gen. Genet.* 230:145-154.
- Petit A, Stougaard J, Kuble A, Marcker KA and Tempe J (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol Gen. Genet.* 207:204-250.
- Powell PA, Stark DM, Sanders PR and Beachy RN (1989). Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *PNAS* 86:6949-6952.
- Robert LS, Donaldson PA, Ladaique C, Altosaar I, Arnison PG and Fabijanski SF (1992). Antisense RNA inhibition of  $\beta$ -glucuronidase gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 13:399-409.

- Roche D, Temple SJ and Sengupta-Gopalan C (1993). Two classes of differentially regulated glutamine synthetase genes are expressed in the soybean nodule: a nodule-specific class and a constitutively expressed class. *Plant Mol. Biol.* 22:971-983.
- Rogers SO and Bendich AJ (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. *Plant Mol. Biol. Manual*. D1:1-8. Kluwer Academic Publishers, Belgium.
- Rothstein SJ, DiMaio J, Strand M and Rice D (1987). Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *PNAS* 84:8439-8443.
- Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi H, Hase T and Sugiyama T (1992). Molecular cloning of the family of glutamine synthetases genes from maize expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol.* 33:49-59.
- Salehuzzaman SN, Jacobsen E and Viseer RG (1993). Isolation and characterization of a cDNA encodes granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Cranz) and its antisense expression in potato. *Plant Mol. Biol.* 23:947-962.
- Salisbury FB & CW Ross (1993). *Plant Physiology*. Fourth edition, Wadsworth Publishers. USA.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Sakamoto A, Ogawa M, Masumura T, Shibata D and Takeba G (1989). Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oryza sativa*. *Plant Mol. Biol.* 13:611-614.
- Sengupta-Gopalan C and Pitas JW (1986). Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. *Plant Mol. Biol.* 7:189-199.
- Shahin EA, Spielman A, Sukhapinda K, Simpson RB and Yashar M (1986). Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Sci.* 26:1235-1239.
- Sheehy RE, Kramer M and Hiatt WR (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *PNAS* 85:8805-8809.
- Smith CJS, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W and Grierson D (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334:724-725.
- Sukanya R, Li M and Snustad DP (1994). Root- and shoot- specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *P. Mol. Biol.* 26:1935-1946.
- Stanford AC, Larsen K, Barker DG and Cullimore JV (1993). Differential expression within the glutamine synthetase gene family of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 103:73-81.
- Stewart GR, Mann AF and Fentem PA (1980). Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In *The Biochemistry of Plants* Vol. 5. Mifflin BJ ed. Academic Press.
- Swarup R, Bennett MJ and Cullimore JV (1990). Expression of glutamine-synthetase genes in cotyledons of germinating *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 183:51-56.
- Temple SJ, Bagga S and Sengupta-Gopalan C (1994). Can glutamine synthetase activity levels be modulated in transgenic plants by the use of recombinant DNA technology? *Transgenic plants and Biochemistry*. *Biochem. Soc. Trans.* 22:915-920.

- Temple SJ, Heard J, Ganter G, Dunn K and Sengupta-Gopalan C (1995). Characterization of a nodule-enhanced glutamine synthetase from alfalfa: nucleotide sequence, *in situ* localization, and transcript analysis. *Mol. Plant-Microb. Int.* 8:218-227.
- Temple SJ, Knight T, Unkefer P.J and Sengupta-Gopalan C (1993). Modulation of glutamine synthetase gene expression in tobacco by the introduction of an alfalfa glutamine synthetase gene in sense and antisense orientation: molecular and biochemical analysis. *Mol. Gen. Genet.* 236:315-325.
- Tingey SV and Coruzzi GM (1987). Glutamine synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 84:366-373.
- Tingey SV, Walker EL and Coruzzi GM (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J* 6:1-9.
- Tischer E, DasSarma S and Goodman HM (1986). Nucleotide sequence of an alfalfa glutamine synthetase gene. *Mol. Gen. Genet.* 203:221-229.
- Towbin H, Staehlin T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76:4350-4354.
- Turner JG and Debbage J (1982). Tabtoxin-induced symptoms are associated with the accumulation of ammonia formed during photorespiration. *Physiol. Plant Patol.* 20:223-233.
- Walker EL and Coruzzi G (1989). Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 91: 702-708.
- Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC and Bright SWJ (1987). Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol* 83:155-158.
- Woodall J and Forde BG (1996). Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell and Env.* 19:848-858.
- Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM and Chilton M-D (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *PNAS* 79:6322-26.
- Vaucheret H, Palauqui C, Elmayer T and Moffatt B (1995). Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 248:311-317.
- Vézina LP, Hope HJ and Joy KW (1987). Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum* L. cv Little Marvel) and alfalfa (*Medicago media* Pers. cv. Saranac). *Plant Physiol.* 83:58-62.
- Vincent R, Fraasier V, Chaillou S, Limami MA, Deleens E, Phillipson B, Douat C, Boutin J-P and Hirel B (1997). Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plant triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* 201:424-433.
- Vincent JM (1970). A manual for practical study of root-nodule bacteria. In IBP Handbook No. 15. Blackwell Sci. Publ., Oxford, UK.
- Zupan JR and Zambryski (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107:1041-1047.