



03081

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN
DE NITRÓGENO**

**“MODULACIÓN NÓDULO ESPECÍFICA DE GLUTAMINA SINTETASA (GS),
EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *LOTUS JAPONICUS*: ESTUDIO
FISIOLÓGICO DE LA SIMBIOSIS CON *MESORHIZOBIUM LOTI*”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BÁSICA
P R E S E N T A :
RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. GEORGINA HERNÁNDEZ DELGADO

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impresa
el contenido de mi trabajo. ^{cepto}

NOMBRE: Ramón Suárez
Rodríguez

FECHA: 05-JUNIO-2003

FIRMA: [Signature]

Este trabajo fue realizado en el Programa de Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno-UNAM, bajo la dirección de la Dra. Georgina Hernández Delgado.

TESIS CON
FALLA DE REGISTRO

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Georgina Hernández Delgado, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo para el desarrollo de este proyecto. Gracias GINA.

A los integrantes de mi comité tutorial, los Dres. Alba Estela Jofre y Garfias, David Romero Camarena y Jaime Padilla Acero (en su momento), por todas las observaciones, consejos y sugerencias para el desarrollo del proyecto.

A los revisores de tesis, los Dres. Georgina Hernández, Alba Jofre, Miguel Lara, David Romero, Mario Rocha, Omar Pantoja y Gabriel Iturriaga, por sus comentarios y siempre acertadas sugerencias y observaciones.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por sus valiosas aportaciones en la parte histológica de este trabajo y brindarme su amistad.

Al Dr. Federico Sánchez, por permitirme realizar los experimentos iniciales de RT-PCR *in situ* en su laboratorio y por la asesoría de Edgar Dantán.

Al Dr. Jaime Belkind Gerson, por su confianza y amistad y porque ahora compartimos juntos este nuevo camino en la investigación, gracias Jaime.

A mis compañeros y amigos del Programa de Biología Molecular de Plantas que sin orden prioritario menciono: Elia, Sara, Jesús Arellano, Sveta, Mario, Elizabeth, Lourdes, Sonia, Alberto, Odette, Mahesh, Maru, Chivis, Jesús Muñoz, por soportarme durante estos años, compartir sus experiencias y conocimientos.

A mis grandes amigos: Humberto Barrios, Juan Téllez, Ricardo Grande, Brenda Valderrama, Ernesto Pérez, Alejandro Soria, Ismael Hernández, Luis Ernesto Fuentes, Javier Mota, Humberto Valdovinos, por su gran amistad y apoyo.

A ese gran grupo de estudiantes y compañeros del CIFN, que en un momento difícil, me tendieron la mano y ayuda, gracias.

A los jóvenes del servicio social: Lorena, Iván, Heidi, Nancy y Dona.

A mi esposa Gabriela Gutiérrez Barrera, por su paciencia, apoyo y comprensión, así como en la revisión y corrección en la escritura de esta tesis, gracias amor.

A mis hijas Gabriela y Mónica, por todo el tiempo que no estuve con ustedes y por el que compartieron conmigo en el laboratorio y por ser mis grandes amores.

A mis padres y hermanos, por esta larga espera y por apoyarme siempre.

A Mary Romana, Paty y Lety Vázquez, por brindarme su amistad y por ser maravillosas personas con mis hijas.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría y doctorado.

A la UNAM y al CIFN, por mi formación académica.

TESIS CON
FALLA DE CINGEN

A mi esposa y mis hijas

**Gabriela,
Gaby y Moni**

Por ser ustedes la parte central en mi vida, por su gran paciencia en esta larga espera y sobre todo por compartir conmigo sus vidas y que ahora juntos vemos culminar mi gran sueño...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. Ciclo del nitrógeno	3
I.2. Fijación de nitrógeno	5
I.2.1. Fijación simbiótica de nitrógeno	6
I.2.2. Interacción planta-bacteria	7
I.2.3. Bioquímica de la fijación de nitrógeno	9
I.3. NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ como fuentes de nitrógeno para las plantas	10
I.3.1. Nitrato	10
I.3.2. Nitrito	13
I.3.3. Amonio	14
I.4. Asimilación de amonio	16
I.4.1. Ciclo GS/GOGAT	17
I.4.2. Glutamina Sintetasa (GS)	18
I.4.3. GS Citosólica	19
a) Función y localización	19
b) Regulación	21
c) Genes en leguminosas	24
I.4.4. GS cloroplástica	25
a) Función y localización	26
b) Regulación	27
c) Genes en leguminosas	27
I.5. Glutamato Sintetasa (GOGAT)	27
I.5.1. NADH-GOGAT	28
I.5.2. Fd-GOGAT	30
I.5.3. Genes	31
I.5.4. Regulación	31
I.6. Glutamato Deshidrogenasa (GDH)	32
I.7. Aspartato Amino Transferasa (AAT)	33
I.8. Asparagina Sintetasa (AS)	34
I.9. Transformación genética en plantas	35

TESIS
FALLA DE ORIGEN

I.9.1. Estrategia general y consideraciones	36
I.9.2. Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	37
I.9.3. Electroporación y bombardeo de partículas	39
I.10. Enfoque biotecnológico para mejorar la asimilación de amonio en plantas	40
I.11. <i>Lotus japonicus</i> como sistema modelo de las leguminosas	43
II. JUSTIFICACIÓN	45
III. OBJETIVOS	47
IV. RESULTADOS	48
IV.1. Artículo: "Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic <i>Lotus japonicus</i> plants"	48
IV.1.1. Anexo 1. Figura 5 del artículo Suárez <i>et al</i> (2003)	49
IV.2. RESULTADOS NO INCLUIDOS EN LA PUBLICACIÓN	50
IV.2.1 Sobre-expresión de GS ₁ en <i>Lotus japonicus</i>	50
a) Actividad específica de la GS en raíz y hoja	50
b) Determinación de parámetros simbióticos	51
c) RT-PCR en nódulos y flores de plantas transgénicas de <i>Lotus japonicus</i>	53
IV.2.2 Transformación de <i>L. japonicus</i> con la fusión génica <i>Srglb3p- uidA (gus)</i>	55
IV.2.3 Bombardeo de alfalfa	59
a) Bombardeo de hojas de alfalfa	63
b) Bombardeo de callos de alfalfa	65
IV.2.4. Bombardeo de tejidos de frijol (<i>Phaseolus vulagris</i> var. Negro Jamapa)	69
V. DISCUSIÓN	74
VI. CONCLUSIONES	84
VII. PERSPECTIVAS	85
VIII. BIBLIOGRAFÍA	86

TESIS CON
FALLA DE CUBRIMIENTOS

RESUMEN

Las plantas leguminosas pueden obtener nitrógeno de la fijación simbiótica de nitrógeno que llevan a cabo bacterias del género *Rhizobium* en los nódulos radiculares. La planta asimila el N fijado a través del ciclo de la Glutamina Sintetasa/Glutamato Sintasa (Ciclo **GS/GOGAT**). La genética reversa de plantas es una herramienta muy útil para estudiar la expresión génica de enzimas importantes en diferentes procesos metabólicos. En el presente trabajo presentamos los datos de la transformación de alfalfa, mediada por el bombardeo con partículas. Se bombardearon callos obtenidos a partir de hojas de alfalfa y se lograron regenerar plantas. En dichas plantas se evidenció la presencia de los transgenes por PCR. La segunda parte incluye el análisis de plantas transgénicas de *Lotus japonicus*, que contienen un gen quimérico con el gen de la glutamina sintetasa citosólica de alfalfa (GS₁), fusionado al promotor del gen de la leghemoglobina de *Sesbania rostrata* (*Srglb3p*). Todas las plantas transgénicas control, transformadas con el vector pBI121, fueron fértiles. Sorprendentemente todas las transformantes primarias que portan el gen quimérico de GS analizadas fueron estériles. Las dos transformantes primarias denominadas GS39 y GS44, pertenecientes a eventos distintos de transformación, fueron analizadas exhaustivamente. Las plantas GS39 y GS44, poseen dos veces más actividad de GS en los nódulos, mientras que la actividad de esta enzima en la raíz, permanece igual comparada con las plantas control. La sobreexpresión de la GS en los nódulos, se demostró tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína. Las plantas estériles GS39 y GS44, muestran alteraciones morfológicas en los granos de polen y los óvulos. La abundancia del transcrito y la actividad de la enzima fue medida durante las etapas iniciales y tardías del desarrollo de la flor de las líneas transformadas con el gen de la GS. El transcrito y la proteína de la GS fueron detectados en los óvulos. Además las flores de las plantas GS39 y GS44, mostraron mayor contenido de glutamina, resultando en un incremento en la relación glutamina/glutamato. Estos datos indican que la sobreexpresión de la GS1 en órganos reproductores, afecta críticamente su desarrollo y esta puede ser la causa de la esterilidad en las plantas de *L. japonicus*.

TESIS
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Legume plants can obtain nitrogen from the symbiotic nitrogen fixation by the *Rhizobium* bacteria living in the root nodules. Plants assimilate the fixed N through the Glutamine Synthetase/Glutamate Synthase cycle (GS/GOGAT cycle). Reverse genetics of plants (overexpression and inhibition of specific gene expression in transgenic plants), is a very useful tool to study the gene expression from important metabolic. In the present work we show the results of alfalfa genetic transformation through particle bombardment transformation. Callus from leaves were bombarded and regenerated plants were obtained. In these plants the presence of the transgenes was confirmed by PCR. The second part of this work presents the analysis of *Lotus japonicus* transgenic plants, carrying the chimeric gene that contains the alfalfa cytosolic glutamine synthetase gene (GS₁) fused to the leghemoglobin gene promoter from *Sesbania rostrata* (*Srg1b3p*). All the transgenic control plants, transformed with the pBI121 plasmid, were fertile. Surprisingly, the primary transformants bearing the chimeric GS gene were sterile. Two primary transformants designated GS39 and GS44 belonging to different transformation events, were further analyzed. GS39 and GS44 had 2-fold higher nodule GS activity and similar root GS activity compared with the control plants. Overexpression of GS in the nodules was confirmed at the level of GS transcript and protein. Sterile GS39 and GS44 plants, showed morphological alterations in pollen grains and in ovules. GS transcript abundance was measured during early and late stages of flower development of GS overexpression plants. The GS transcript and protein were detected in the ovules. In addition, flowers of GS39 and GS44 plants showed higher glutamine content, resulting in an increased glutamine/glutamate ratio. These data indicate that overexpression of GS₁ in reproductive organs critically affects their development and might be a reason for sterility of *L. japonicus* plants.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno se encuentra en varias formas en nuestro ambiente. La continua interconversión de estas formas por procesos físicos y biológicos, constituyen el *Ciclo del nitrógeno* (Fig. 1). En la atmósfera se encuentran grandes cantidades de nitrógeno, pero desde el punto de vista energético es difícil para los organismos obtener el nitrógeno atmosférico en una forma útil. El nitrógeno se mueve hacia dentro de las células de la hoja junto con el CO_2 , a través de las estomas, pero una vez dentro, sólo hay enzimas disponibles para reducir el CO_2 , por lo tanto el N_2 , sale tan rápido como entró. La mayor parte del nitrógeno de los organismos vivos proviene, ya sea de la fijación (reducción) por organismos procariontes, algunos de los cuales se encuentran en las raíces de algunas plantas, o por la fijación industrial en forma de fertilizantes. Pequeñas cantidades de nitrógeno se mueven también de la atmósfera hacia el suelo como iones de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) arrastrados por la lluvia y posteriormente éstos son absorbidos por las raíces. Dicho amonio proviene de la combustión, la actividad volcánica y los incendios forestales; mientras que el nitrato proviene de la oxidación del N_2 , por el O_2 o el ozono en presencia de luz o radiación ultravioleta. Otra fuente de NO_3^- son los océanos. La brisa del mar está formada por pequeñas gotas de agua llamadas aerosoles, de las cuales al evaporarse el agua quedan suspendidas en la atmósfera sales oceánicas. En las costas, estas sales (llamadas sales ciclicas) son arrastradas hacia el suelo por las lluvias y por el proceso natural de evaporación regresan nuevamente al océano. El abono y las plantas muertas, los microorganismos y animales son fuente importante de nitrógeno que regresa al suelo, pero la mayor parte de este nitrógeno es insoluble y no está disponible inmediatamente para ser utilizado por las plantas. La mayoría de los suelos poseen pequeñas cantidades de aminoácidos, provenientes principalmente de la descomposición microbiana de la materia orgánica y por la excreción de las raíces de las plantas vivas. Tales aminoácidos pueden ser absorbidos y metabolizados por las plantas; éstos y otros compuestos nitrogenados, contribuyen en una pequeña parte a la nutrición de nitrógeno en una forma directa. Además son reservorios de nitrógeno de gran importancia de donde provienen el NH_4^+ y el NO_3^- .

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

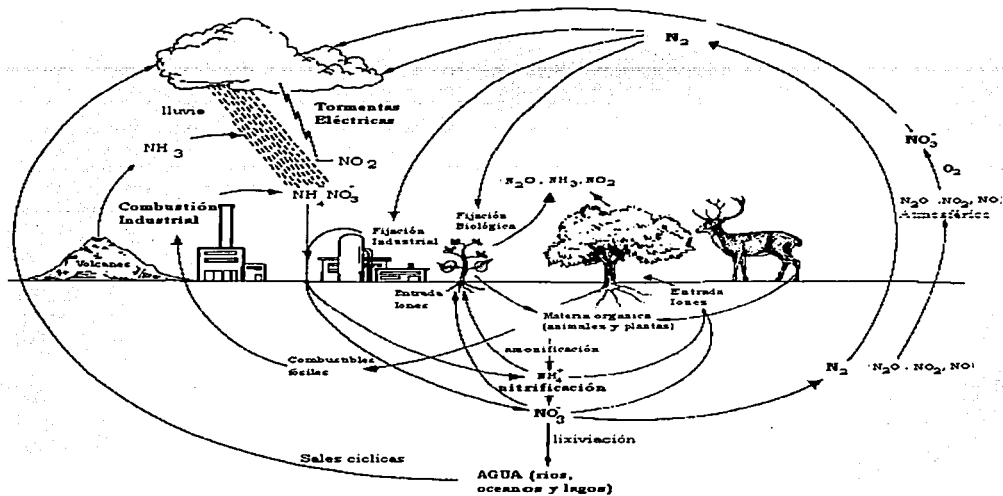


Fig. 1. Ciclo del Nitrógeno. Los compuestos orgánicos nitrogenados, que son constituyentes de los organismos vivos, son liberados al ambiente por la muerte y descomposición y son excretados como desechos por algunos animales. Los microorganismos desaminan el nitrógeno orgánico, utilizando el carbono como única fuente de energía y liberando amoníaco en el proceso. Las plantas y microorganismos, pueden tomar el nitrato y reducirlo hasta amoníaco. Varios procesos biológicos, que cambian el estado de oxidación del nitrógeno son catalizados exclusivamente por organismos procariontes. Estos incluyen la **nitrificación** (en el cual el amoníaco o nitrito son oxidados y la energía liberada es utilizada para fijar carbono inorgánico), la **desnitrificación** (en el cual el nitrógeno sirve como una terminal aceptora de electrones y es reducido durante la respiración anaeróbica) y la **fijación de nitrógeno** (en el cual el gas nitrógeno es reducido a amoníaco) (Tomado de Salisbury and Ross, 1992).

Aproximadamente el 90% del nitrógeno total en los suelos, se encuentra en forma de materia orgánica, y en algunos casos existen cantidades considerables de NH_4^+ unidos a los coloides de arcilla.

La conversión del nitrógeno orgánico a NH_4^+ por las bacterias y hongos del suelo es llamada **amonificación**. Este proceso puede ocurrir en varios tipos de microorganismos en climas templados y en varios rangos de pH. En suelos de clima cálido con pH cercano al neutro, el NH_4^+ es oxidado por las bacterias a

nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) a los pocos días de haber sido adicionado como fertilizante. Esta oxidación llamada **nitrificación**, proporciona energía a los microorganismos para sobrevivir y crecer. Las bacterias del género *Nitrosomonas*, son de las más importantes en el proceso de oxidación del amonio a nitrito; mientras que las bacterias del género *Nitrobacter*, reducen comúnmente gran cantidad del nitrito a nitrato (Salisbury and Ross, 1992).

El nitrato, se pierde también de los suelos por **desnitrificación**, proceso por el cual N_2 , NO , N_2O y NO_2 , son formados a partir del nitrato por bacterias anaeróbicas. Estas bacterias usan NO_3^- como aceptor de electrones en lugar de O_2 , durante la respiración. La desnitrificación, se da generalmente en suelos profundos, en donde la penetración de O_2 es limitada, en suelos inundados, en suelos compactados o en regiones cercanas a la superficie, en donde la concentración de oxígeno es baja, dado que se utiliza rápidamente en la oxidación de la materia orgánica. Además, las plantas pierden pequeñas cantidades de nitrógeno a la atmósfera, en forma de NH_3 , N_2O , NO_2 y NO , especialmente cuando están bien fertilizadas con nitrógeno (Wetselaar and Farquhar, 1980; Duxbury *et al.*, 1982). Las formas oxidadas de nitrógeno en la atmósfera, son importantes ecológicamente, dado que cuando éstas son convertidas a NO_3^- , contribuyen como HNO_3 para formar la **lluvia ácida**.

I.2. Fijación de nitrógeno

El proceso por el cual el N_2 , es reducido a NH_4^+ , es llamado **fijación de nitrógeno** (Dixon and Wheeler, 1986), y como es bien sabido es llevada a cabo sólo por organismos procariontes. Los principales organismos fijadores de nitrógeno, incluyen a ciertas bacterias presentes en el suelo o en lagos y océanos conocidas como **cianobacterias** (algas verde-azules): en vida libre o en asociaciones simbióticas, con ciertos hongos, líquenes, helechos, musgos y hepáticas (Peters, 1978; Peters and Meeks, 1989); así como bacterias y otros microorganismos asociados simbióticamente con raíces, especialmente aquellas de plantas de la familia de las leguminosas. El papel de la fijación de nitrógeno, es de gran importancia en las cadenas alimenticias de los bosques, lagos y ambientes marinos y aún de las regiones árticas. Además, la actividad de las raíces fijadoras de nitrógeno, beneficia a las raíces de las plantas que las rodean, ya sea a través de excreción de nitrógeno de los nódulos, la descomposición de los mismos y más

TESIS CON
FALLA DE COMPROBACIÓN

aún la descomposición de la planta completa (Ta and Faris, 1987). Dicha contribución es de gran importancia en la agricultura, sobre todo en donde se mezclan leguminosas y gramíneas, que con frecuencia se utilizan como forraje.

I.2.1. Fijación simbiótica de nitrógeno

El ejemplo clásico de fijación simbiótica de nitrógeno, son los nódulos de las raíces de las leguminosas (soya, frijol, chícharo, trébol, alfalfa, lotus, etc.) que albergan en su interior bacterias de la familia Rhizobiaceae. Aproximadamente el 15% de las 20,000 especies en la Familia Fabaceae (Leguminosae), han sido examinadas para determinar si fijan nitrógeno, y aproximadamente el 90% de éstas poseen nódulos, en los cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Allen and Allen, 1981).

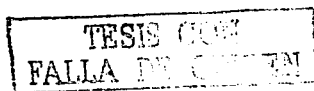
Las especies bacterianas de géneros cercanamente relacionados, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, son las responsables de la formación de los nódulos en donde se fija el nitrógeno atmosférico durante la simbiosis (Downie and Johnston, 1988; Djordjevic *et al.*, 1987; Quispel, 1988; Kaneko *et al.*, 2000). Es bien sabido que la interacción *Rhizobium*-leguminosa puede clasificarse por medio de los llamados grupos de inoculación cruzada, en donde ciertas cepas, nodulan sólo a ciertas leguminosas. Por ejemplo, *Sinorhizobium meliloti*, nodula eficientemente especies de *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*; *Mesorhizobium loti*, nodula varias especies de *Lotus*, *Anthyllis* y *Lupinus*; mientras que *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, induce nódulos en *Pisum*, *Vicia*, *Lens* y *Lathyrus* spp. Cercanamente relacionada a la cepa que nodula al chícharo (*Pisum sativum*) se encuentra *R. leguminosarum* bv *trifolii*, la cual induce nódulos sólo en especies de trébol (*Trifolium*). Sin embargo, no todas las asociaciones *Rhizobium*-leguminosa, son tan específicas. Por ejemplo *Rhizobium* cepa NGR234, nodula 232 especies de leguminosas de 112 géneros evaluados, además de nodular a una no leguminosa *Parasponia andersonii*, miembro de la familia del olmo (Pueppke and Broughton, 1999). Aunque tanto *rhizobia* como las leguminosas pueden sobrevivir en ausencia de su pareja simbiótica, la estrecha asociación entre la planta y *Rhizobium* en la etapa simbiótica y la especificidad de las interacciones, sugiere que el hospedero y el simbiote pudieron haber evolucionado paralelamente.

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

I.2.2. Interacción planta-bacteria

En presencia de una especie rizobiana específica, la leguminosa hospedera, forma estructuras únicas llamadas **nódulos**, en los cuales ocurre la fijación de nitrógeno. Las diversas actividades de la planta y la bacteria, crean un ambiente propio para la fijación de nitrógeno y la síntesis microaeróbica de ATP por la bacteria. El metabolismo vegetal en el nódulo, genera ácidos orgánicos, que sirven de alimento a la bacteria y le proveen de esqueletos de carbono. A cambio de los esqueletos de carbono, el simbionte bacteriano fija nitrógeno y libera el amonio resultante a la planta.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, tiene lugar en el nódulo formado por la planta en respuesta a señales bacterianas. El reconocimiento simbiote-hospedero, ocurre inicialmente en la **rizosfera**. En diferentes especies, la planta es comúnmente infectada a través de los **pelos radiculares**, los cuales responden a señales bacterianas, alterando su patrón normal de crecimiento para atrapar simbiontes potenciales. La estructura de invasión llamada **hilo de infección**, parece ser formado por la planta y está compuesta de material de la pared celular. La estructura del nódulo es elaborada por divisiones celulares de la planta, el cual se origina entre la capa interna y la externa del córtex radicular, dependiendo de la especie hospedera. La planta y la bacteria contribuyen a la matriz que rodea a las células bacterianas en el lúmen de los hilos de infección. Existen dos planes principales de desarrollo de los nódulos: **determinados** (o esféricos) e **indeterminados** (o meristemáticos). En los nódulos indeterminados, como aquellos generados por la alfalfa, el chícharo y el trébol, el meristemo del nódulo persiste y nuevas células en división (no infectadas) son continuamente formadas en la punta del nódulo en elongación. Una sección longitudinal del nódulo, revela células en diferentes etapas de desarrollo. La base contiene células senescentes, el ápice está compuesto de pequeñas células no infectadas y entre ambas las células maduras (infectadas y no infectadas). En los nódulos determinados, como aquellos producidos por la soya, el frijol y lotus, los tejidos maduran sincrónicamente, estando todas las células infectadas aproximadamente en la misma etapa de diferenciación. Los nódulos determinados maduros, carecen de tejido meristemático.



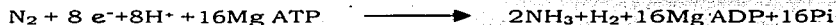
Después de la penetración a través de los hilos de infección, las bacterias son liberadas de la pared del hilo en vacuolas y entran a la célula vegetal. Estas vacuolas denominadas **simbiosomas**, pueden contener una o más bacterias. En los simbiosomas, las bacterias se diferencian en **bacteroides**, los cuales generalmente son morfológicamente distintos de las formas bacterianas de vida libre. En algunas especies como la soya, las bacterias y sus simbiosomas se dividen extensivamente; en otros casos como en la alfalfa, esta división está limitada a algunas rondas. La síntesis extensiva y la diferenciación de la membrana del simbiosoma (también llamada **membrana peribacteroidal**), se da en esta etapa. Entre la membrana peribacteroidal y el grupo de bacteroides, existe una región llamada el espacio peribacteroidal. Fuera del espacio peribacteroidal, en el citosol de la planta, se encuentra una proteína llamada **leghemoglobina (lb)** (Appleby, 1984; Appleby *et al.*, 1988; Haaker, 1988; Powell and Gannon, 1988). Esta molécula es roja, debido a un grupo HEMO (como el de la hemoglobina de la sangre), pegado como un grupo prostético a la proteína GLOBINA incolora. La leghemoglobina, da a los nódulos de las leguminosas un color rosado, el cual es mucho más tenue en los nódulos de las no leguminosas. La lb, ayuda al transporte de O₂ hacia los bacteroides en cantidades cuidadosamente controladas. El O₂ en exceso, inactiva la enzima que cataliza la fijación de nitrógeno, pero también el O₂ es esencial para la respiración del bacteroide. La membrana del simbiosoma es probablemente el principal determinante del flujo de nutrientes y energía entre la planta y la bacteria. La membrana del simbiosoma es el blanco de varias proteínas que se expresan *de novo*, como el canal de amonio específico de la simbiosis, GmSAT1, involucrado en la transferencia del nitrógeno fijado del bacteroide al simbiote (Kaiser *et al.*, 1998). Aunque pareciera que los nódulos son órganos relativamente simples, poseen desde docenas hasta algunos cientos de proteínas nódulo-específicas sintetizadas por la planta llamadas, **nodulinas**. Varias de estas nodulinas están involucradas en metabolizar el carbono y el nitrógeno, transportar compuestos a través de la membrana del simbiosoma o establecer un ambiente bajo en oxígeno. Otras proteínas, tales como las propias de la pared celular, pueden participar en la estructura, infección o defensa; algunas otras nodulinas pueden ser

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mediadoras de señales de transducción en rutas de respuesta celular requeridas para el desarrollo del nódulo (Crawford *et al.*, 2000).

1.2.3. Bioquímica de la fijación de nitrógeno

La reacción general de la fijación de nitrógeno (reducción), se resume de la siguiente manera:



El proceso requiere de una fuente de electrones, protones y de numerosas moléculas de ATP. Además, la producción de H_2 formado por N_2 reducido, es obligatoria (Haaker, 1988; Haaker and Klugkist, 1987). También es requerido un complejo enzimático llamado **nitrogenasa**, que cataliza la reducción de diferentes sustratos, incluyendo el acetileno, cianuro, azida, óxido nitroso e hidracina. La reducción de acetileno a etileno es una forma común de estimar parcialmente los índices de fijación de nitrógeno en suelos, lagos y ríos, debido a que es fácil de medir el etileno producido mediante un cromatógrafo de gases.

La nitrogenasa acepta electrones de la flavodoxina reducida, la ferredoxina o de otros agentes reductores efectivos, y es así como cataliza la fijación de nitrógeno. La nitrogenasa consiste de 2 proteínas distintas, comúnmente llamadas proteína Fe y proteína Fe-Mo. La proteína Fe-Mo, posee 2 átomos de Molibdeno y 28 átomos de Hierro. La proteína Fe, contiene 4 átomos de fierro en un agrupamiento Fe_4S_4 . Tanto el molibdeno como el fierro, llegan a ser reducidos y después oxidados conforme la nitrogenasa acepta electrones de la ferredoxina y transfiere estos al N_2 para formar NH_4^+ . El ATP, es esencial para la fijación, debido a que éste se une a la proteína Fe y ocasiona que ésta actúe como un agente reductor fuerte. La proteína Fe, transfiere los electrones a la proteína Fe-Mo, acompañado por la hidrólisis de ATP a ADP. Finalmente, la proteína Fe-Mo después completa la transferencia de electrones al N_2 y a los protones para producir 2NH_3 y H_2 (Fig. 2).

La fijación de nitrógeno es, como se mencionó antes, sensible a altas concentraciones de O_2 debido a que las proteínas Fe y Fe-Mo de la nitrogenasa, son desnaturalizadas oxidativamente por O_2 . La lb controla parcialmente la disponibilidad de O_2 en el bacteroide, pero las complejas características anatómicas del nódulo mismo (la corteza y la endodermis que rodean los haces vasculares y las células que contienen los bacteroides), se ha visto que son

mucho más importantes para mantener un nivel bajo de O_2 alrededor de la nitrogenasa, actuando como una barrera de difusión hacia el aire del suelo (Dakora and Atkins, 1989).

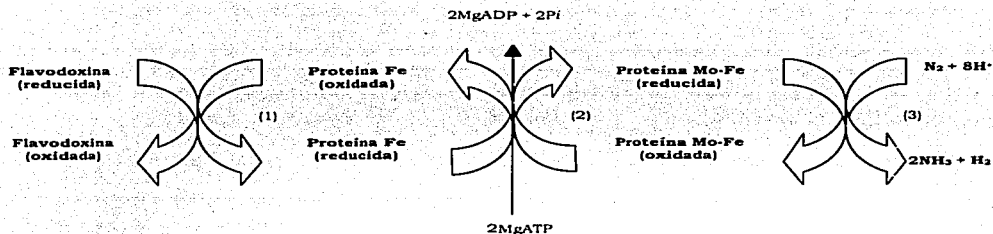


Fig. 2. Las tres etapas principales del transporte de electrones de la flavodoxina reducida al N_2 y H^+ .

I.3. NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ como fuentes de nitrógeno para las plantas

Las plantas son organismos con una alta demanda de nitrógeno, por lo cual han desarrollado diversas vías para la obtención y utilización de la mayoría de las formas disponibles de nitrógeno en la naturaleza: directamente del suelo o estableciendo simbiosis con organismos fijadores de nitrógeno.

I.3.1. Nitrato

El nitrato es la fuente más importante de nitrógeno para las plantas; de hecho, la mayoría de las plantas dedican una porción significativa de su carbono y energía de reserva para la toma y asimilación de este compuesto. Las plantas han desarrollado mecanismos complejos para detectar nitrato y para integrar su asimilación con la fotosíntesis y el metabolismo del nitrógeno y carbono en general. Estos mecanismos permiten a las plantas controlar sus índices de crecimiento, arquitectura radicular, relación C/N, concentraciones de agentes reductores, balance iónico y de pH, bajo diversas condiciones ambientales.

La asimilación de nitrato inicia con su entrada a la célula (Fig. 3). Generalmente el nitrato es tomado del suelo por las células epidérmicas y corticales de la raíz. Una entrada primaria puede ocurrir también en las hojas, la cual es una ruta importante para las epífitas y para la incorporación de fertilizantes aplicados

foliarmente. Una vez dentro del simplasto, el nitrato puede ser transportado hacia la vacuola, donde se almacena en altas concentraciones (hasta de 20 mM). Los principales órganos de almacenamiento de nitrato, incluyen las raíces, tallos y venas de las hojas. El nitrato puede ser descargado también al xilema, para su transporte a larga distancia hacia los brotes. Diversos factores fisiológicos, genéticos y ambientales, determinan cómo el nitrato es captado y almacenado en la planta (Crawford *et al.*, 2000).

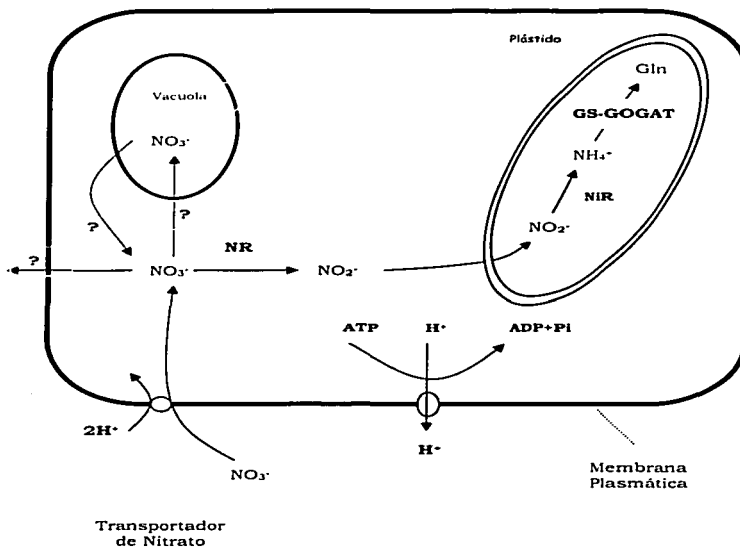


Figura 3. La asimilación de nitrato por la célula vegetal, comprende el transporte de nitrato a través de la membrana y su posterior reducción a amonio en un proceso de 2 etapas. Una ATPasa que bombea protones, mantiene el gradiente electroquímico que maneja la entrada celular de nitrato.

En el paso del NO_3^- a través de la membrana plasmática, se ha visto que coexisten 3 sistemas dentro de la célula (Forde and Clarkson, 1999), cada uno

mostrando diferentes características con respecto a la inducibilidad por NO_3^- o al rango de concentración de nitrato en el medio externo ($\text{NO}_3^-_{\text{ext}}$) en que operan. El primer sistema opera en un rango bajo de $\text{NO}_3^-_{\text{ext}}$, en el rango de 0.2 mM, aunque las plantas nunca hayan sido abastecidas con nitrato. Este sistema de transporte constitutivo de alta afinidad (cHATS), es complementado por otro sistema de transporte de alta afinidad, el cual es inducible por muy bajo $\text{NO}_3^-_{\text{ext}}$ (iHATS) (Behl *et al.*, 1988; Aslam *et al.*, 1992). Cuando el $\text{NO}_3^-_{\text{ext}}$ alcanza valores superiores a 1.0 mM, participa un sistema de transporte de baja afinidad (LATS) (Siddiqi *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1992). En algunos casos el NO_3^- actúa como regulador de su propia entrada, una propiedad específica, la cual no se ve en otros sistemas de transporte de otros iones, por ejemplo sulfato o fosfato (Smith *et al.*, 2000).

En la última década han sido propuestos los componentes moleculares involucrados en el sistema de transporte LATS e iHTAS. Los estudios realizados revelan la existencia de 2 clases de proteínas (Forde, 2000). Los genes *NRT2* y *NRT1*, que codifican para las familias NNP (nitrate-nitrite-porter) y el PTR (Peptide transporter). Las proteínas *NRT1* y *NRT2*, muestran la misma topología estructural con 12 dominios transmembranales, distribuidos en 2 grupos de 6 hélices conectados por un "loop" citosólico. A pesar de su estructura común no se ha encontrado similitud a nivel de secuencia primaria entre las clases *NRT1* y *NRT2*.

La regulación de la NR, juega un papel clave en la asimilación de nitrato. Los tejidos verdes, poseen mucho más actividad de Nitrito Reductasa, que de NR, asegurando con esto que el nitrito no se acumule en cantidades tóxicas. Por esto se cree que la NR, cataliza la etapa limitante en la conversión de nitrato a amonio. Las plantas utilizan diversos mecanismos para ajustar la concentración y la actividad de NR, en respuesta a diversas señales, tales como, abundancia de nitrato, metabolitos nitrogenados (especialmente glutamina), CO_2 , metabolitos carbonados (especialmente sacarosa), citocininas y luz. El control de la expresión de los genes NR, facilita la respuesta a largo plazo a estas señales (horas y hasta días), mientras que una regulación postraducciona, permite cambios rápidos en la actividad de la NR (desde minutos hasta horas) (Crawford *et al.*, 2000).

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

Los genes de la NR son inducibles por sustrato en muchas plantas, aunque en algunas excepciones tales como la soya, muestran formas tanto constitutivas como inducibles.

Además de la señal primaria (nitrato), las cantidades de mRNA de la NR, responden a otras señales que ligan la reducción de nitrato a la fotosíntesis, metabolismo del carbono y ciclos diurnos.

Mecanismos postranscripcionales, controlan la concentración de la proteína NR y la actividad en respuesta a ciertas condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la NR disminuye cuando las plantas son privadas de nitrógeno o de luz por varios días, aunque las cantidades de su mRNA permanezcan altas (Crawford *et al.*, 2000).

El nitrato por sí mismo no es incorporado en compuestos orgánicos, sino que es primeramente reducido a amonio en un proceso de 2 etapas (Fig. 3). El nitrato es reducido a **nitrito** por la **nitrato reductasa (NR)**, y el **nitrito**, es reducido a **amonio**, por la **nitrito reductasa (NiR)**. Las plantas reducen nitrato y nitrito en raíces y tejidos aéreos (Faure *et al.*, 2001). Cantidades significativas de nitrógeno son asimiladas a través de esta ruta, la cual consume grandes cantidades de energía, carbono y protones (Crawford *et al.*, 2000).

1.3.2. Nitrito

Posterior a la reducción de nitrato, la siguiente etapa en la vía de asimilación de nitrato es la reducción de nitrito a amonio, la cual es catalizada por la Nitrito Reductasa (**NiR**):



Seis electrones son transferidos en esta etapa, en contraste con los 2 necesarios para reducir nitrato. La fuente de electrones es la ferredoxina reducida ($\text{Fd}_{\text{x,red}}$), producida en el cloroplasto por la transferencia fotosintética no cíclica de electrones. La reducción de nitrito utiliza $\text{Fd}_{\text{x,red}}$ en los plástidos de tejidos no fotosintéticos, tales como la raíz. En tales plástidos (carentes de pigmento), el NADPH del ciclo oxidativo de las pentosas, reduce a la ferredoxina, en la reacción catalizada por la ferredoxina-NADP⁺ reductasa:



La NiR, es una proteína codificada nuclearmente, con un péptido tránsito N-terminal, que es eliminado de la enzima madura. La enzima es un monómero de

60-70 kDa, posee 2 dominios y cofactores que transportan electrones de la Fdx_{red} al nitrito (Fig. 4).

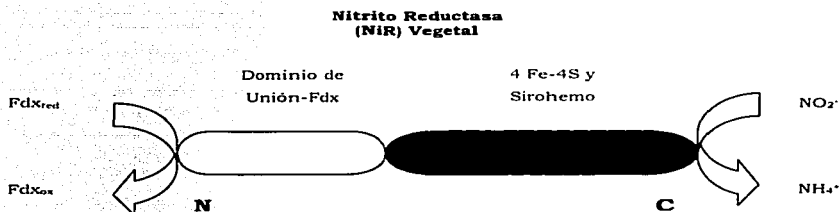


Fig. 4. Estructura de la Nitrito reductasa de plantas (NiR). La región N-terminal oxida la ferredoxina. La región C-terminal que une el centro 4Fe-4S y el grupo sirohemo, reduce el nitrito a amonio.

La NiR, está regulada transcripcionalmente, y normalmente en coordinación con la NR. Dado que el nitrito es tóxico, las células deben contener suficiente NiR, para reducir todo el nitrito producido por la NR. Con esto las plantas mantienen un exceso de actividad de NiR siempre que la NR esté presente por la inducción de la expresión génica de la NiR, en respuesta a luz o nitrato. Si las concentraciones de NiR, son disminuidas por una mutación o expresión de un gen "antisentido", las plantas acumulan nitrito y muestran clorosis. En plantas silvestres, los mecanismos regulatorios que controlan la actividad de NR, se ha pensado que asisten en prevenir la acumulación de nitrito (Crawford *et al.*, 2000).

1.3.3. Amonio

Las células vegetales, tienen la capacidad de transportar activamente el ión NH_4^+ . Las plantas pueden encontrar concentraciones substanciales de amonio en suelos ácidos, en donde el índice de nitrificación y por consiguiente la disponibilidad de nitrato es baja.

En los bosques y pastizales, el amonio (NH_4^+), es normalmente la fuente predominante de nitrógeno inorgánico disponible a las raíces. También los suelos agrícolas contienen algo de NH_4^+ , aunque la concentración actual en la superficie de la raíz como debe de esperarse es baja, dado las limitaciones de difusión. En las plantas, el NH_4^+ , es el intermediario central, generado en procesos tales como

la reducción de nitrato, la fotorrespiración, el metabolismo fenilpropanoide, la degradación del transporte de amidas y el catabolismo de proteínas (Joy, 1988).

A pesar de la importancia del NH_4^+ en el metabolismo del nitrógeno en las plantas, se cree generalmente que la concentración de NH_4^+ en plantas sanas es baja (Howitt and Udvardi, 2000), aunque existen evidencias recientes en contra de esto (Britto *et al.*, 2001). Otro dogma concerniente al NH_4^+ , es que el NH_4^+ absorbido o generado en las raíces, es asimilado aquí y no es translocado hacia la parte aérea de la planta (Tobin and Yamaya, 2001).

El primer reporte publicado sobre transporte de amonio, fue utilizando metilamonio, un análogo del amonio para estudiar su entrada. Los resultados obtenidos mostraron que el transporte de metilamonio en hojas no puede darse por una difusión pasiva a través de la membrana plasmática, sino que está mediado por un sistema de transporte (Raven and Farquhar, 1981).

Estudios de la entrada con $^{15}\text{N-NH}_4^+$, en protoplastos aislados de hojas de *Brassica napus*, sobre un rango de concentraciones hasta de 5 mM, revelan dos componentes cinéticos distintos (Pearson *et al.*, 2002). En concentraciones superiores a 100 μM , se observó una cinética lineal, representando una baja afinidad, y un sistema de transporte de alta capacidad, mientras que el transportador dominante a concentraciones por debajo de 100 μM , siguió una cinética Michaelis-Menten. Nielsen y Schjoerring (1998), observaron que la entrada neta de NH_4^+ en las células de la semilla de col, se incrementa linealmente, conforme la concentración de NH_4^+ apoplástico se eleva hasta 10 mM. Incrementando la temperatura, se incrementa el índice de entrada neta de NH_4^+ y se reduce la concentración basal de amonio. Estos hallazgos, sugieren fuertemente la existencia de un transportador de NH_4^+ de baja afinidad, con propiedades parecidas a las de un canal en la membrana de la hoja, así como también las observadas en las células de la raíz (Wang *et al.*, 1993). Varios reportes sugieren que un transportador de NH_4^+ de alta afinidad puede encontrarse a través de un canal de K^+ , dada la similitud de las características químicas de ambos iones. Además, una amplia selección de canales de K^+ , han mostrado ser permeables a NH_4^+ (Forde and Clarkson, 1999). Sin embargo, Nielsen y Schjoerring (1998), encontraron que el K^+ adicionado en 10% en exceso

al del amonio en solución apoplástica, solo inhibe la entrada neta de NH_4^+ por 3 min al 50%. Además, dado que se ha visto que la concentración de K^+ apoplástica, es 10 veces superior al de la concentración de amonio, debe ser requerida una afinidad relativamente alta por NH_4^+ para una eficiente recuperación de amonio.

El transporte de alta afinidad de NH_4^+ , como los observados en el amonio extracelular, por debajo de 100 μM , están mediados por la familia génica *AMT* (Gazzarrini *et al.*, 1999).

Los genes vegetales de *Arabidopsis* (Ninnemann *et al.*, 1994; Gazzarini *et al.*, 1999) y *Lycopersicon* (Lauter *et al.*, 1996) que codifican para el transportador de amonio (transportadores *AMT1*), han sido caracterizados con base en su habilidad para restaurar el crecimiento de mutantes de levaduras, con deficiencias en la toma de NH_4^+ y por los resultados de pruebas funcionales "in vivo".

I.4. Asimilación de amonio

Las plantas asimilan nitrógeno inorgánico en los siguientes aminoácidos transportadores de nitrógeno: glutamato, glutamina, aspartato y asparagina. Estos compuestos son usados para transferir el nitrógeno de los órganos productores hacia los órganos de consumo o reserva y para la acumulación de reservas, durante los periodos de disponibilidad de nitrógeno, para su uso subsecuente en procesos de crecimiento, defensa y reproductivos. El nitrógeno asimilado en glutamato y glutamina es rápidamente distribuido en el metabolismo vegetal, debido a que estos aminoácidos donan su nitrógeno, para la biosíntesis de otros aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos que contienen nitrógeno. Alternativamente, el nitrógeno asimilado en glutamato y glutamina, puede ser incorporado en aspartato y asparagina. El aspartato es un aminoácido metabólicamente reactivo que sirve como donador de nitrógeno en numerosas reacciones aminotransferasa; la asparagina es relativamente inerte y sirve principalmente como transportador de nitrógeno y compuesto de reserva. Los aminoácidos glutamato, glutamina, aspartato y asparagina, son los aminoácidos mayormente translocados en el floema de la mayoría de las especies, incluyendo maíz, chicharo y *Arabidopsis*. Las concentraciones de estos aminoácidos no son estáticas, están reguladas por factores tales como la luz.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Enzimas tales como la glutamina sintetasa (GS), Glutamato Sintasa (GOGAT), Glutamato Deshidrogenasa (GDH), Aspartato Aminotransferasa (AAT) y Asparagina Sintetasa (AS), son las responsables de sintetizar los aminoácidos transportadores de nitrógeno. Dichas enzimas están involucradas en la asimilación primaria de nitrógeno inorgánico del suelo, así como también en la reasimilación (asimilación secundaria) de amonio libre en la planta. En las plantas, el amonio es liberado de compuestos orgánicos por medio de varios procesos metabólicos, que incluyen la desaminación de los aminoácidos durante la germinación de la semilla, la síntesis de aminoácidos específicos o lignina y la fotorrespiración. A diferencia de los animales, las plantas no excretan desechos nitrogenados. En su lugar, el amonio liberado, debe ser reasimilado para sostener el crecimiento vegetal. Por ejemplo, el amonio liberado por fotorrespiración, puede exceder la asimilación primaria de nitrógeno en un 10%, por lo tanto una planta incapaz de reciclar este amonio, rápidamente podría acabar con su nitrógeno almacenado (Crawford *et al.*, 2000).

La asimilación de amonio se da principalmente a través del ciclo de la glutamato sintasa, en el cual la GS (EC 6.3.1.2) actúa en conjunto con la GOGAT, para convertir los iones de amonio y el 2-oxoglutarato hacia glutamato, via la glutamina, a expensas de ATP y poder reductor (Mifflin and Lea, 1980). La glutamina y el glutamato producidos por el ciclo, son posteriormente utilizados para sintetizar todos los compuestos nitrogenados en la planta. El amonio puede provenir de fuentes tales como las primarias (iones de nitrato o amonio del suelo o nódulos de las bacterias fijadoras de nitrógeno) y secundarias (como la fotorrespiración en las hojas, el metabolismo fenilpropanoide, o la desaminación de aminoácidos de las semillas en germinación) (Forde and Cullimore, 1989).

1.4.1. Ciclo GS/GOGAT

El ciclo GS/GOGAT, es probablemente la principal ruta de asimilación de amonio en plantas (Fig. 5). La GS posee una alta afinidad por amonio (K_m 3-5 μM) y puede operar a las bajas concentraciones de amonio presentes en las células vivas. Estudios de marcaje con $^{15}NH_4^+$, confirman que la marca es incorporada principalmente en el grupo amido de la glutamina, apareciendo posteriormente en los grupos amino del glutamato y otros compuestos amino, incluyendo glutamina.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

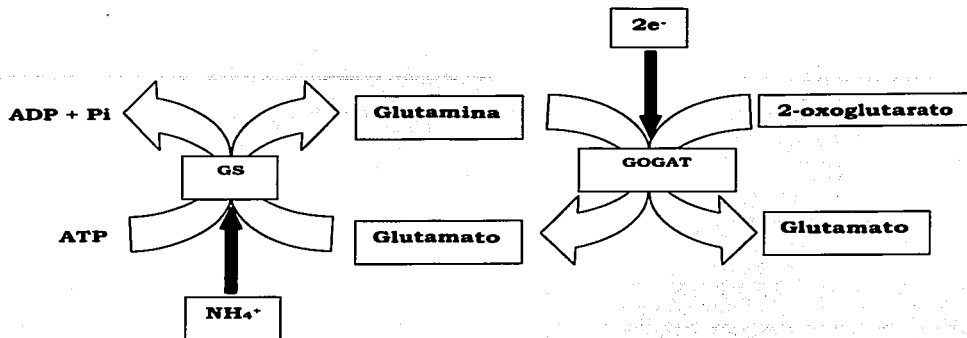


Fig 5. El ciclo GS-GOGAT, en plantas es considerada la principal ruta de asimilación primaria y secundaria de amonio.

La adición de inhibidores de la GS, p.ej., los análogos del glutamato, la metionina sulfoximina (MSO) o la L-fosfinotricina (L-PPT), inhiben, pero no bloquean completamente el marcaje del grupo amido de la glutamina y el amino del glutamato. El inhibidor de la GOGAT, la azaserina (análogo de glutamina), bloquea la incorporación del radioisótopo en el glutamato. Estos resultados entre otros, apoyan la hipótesis que la mayoría del nitrógeno inorgánico en plantas es asimilado a través de la vía GS/GOGAT.

1.4.2. Glutamina Sintetasa (GS)

La Glutamina Sintetasa (GS), como la primera enzima en la principal vía de asimilación de amonio en plantas superiores (Fig. 6), ocupa la misma posición clave en el metabolismo del nitrógeno, como la ribulosa bifsosfato carboxilasa (Rubisco) en el metabolismo del carbono.

La biología molecular de la GS vegetal, inicia en 1983 con la clonación y el análisis completo de la secuencia del gen estructural de la GS de *Anabaena (glnA)* (Tumer *et al.*, 1983), seguido de la clonación de secuencias de GS de plantas y animales (Cullimore *et al.*, 1984; Donn *et al.*, 1984; Sanders and Wilson 1984).

La GS de plantas tiene un peso molecular estimado entre 35-40 kD y está ensamblada de 8 subunidades idénticas (o cercanamente idénticas) (Stewart *et*

al., 1980). Su tamaño y estructura secundaria es semejante a la GS de mamíferos, pero diferente a la bacteriana, la cual posee 12 subunidades de aproximadamente 50 kD (Meister, 1974; Stadtman and Ginsburg, 1974).

Una característica distintiva de la GS de plantas superiores, es la existencia dentro de un solo organismo de diferentes isoformas enzimáticas, siendo los dos principales tipos localizados en diferentes compartimentos celulares. Las hojas generalmente contienen dos isoenzimas, designadas GS₁ y GS₂, las cuales están localizadas en el citosol y el cloroplasto respectivamente (Stewart *et al.*, 1980; Mifflin y Lea, 1980; McNally and Hirel, 1983).

La GS₂ puede ser separada de la GS₁ por cromatografía de intercambio iónico, y un análisis comparativo de las dos isoenzimas en cebada y maíz han demostrado que poseen diferente estabilidad térmica, pH óptimo y afinidad por glutamato y ATP (Mann *et al.*, 1979; Acaster and Weitzman, 1985). Además estudios inmunológicos han demostrado que las dos isoenzimas de una amplia variedad de especies difieren en sus determinantes antigénicos (Mann *et al.*, 1980; Hirel *et al.*, 1984a). La estimación de los pesos moleculares de las subunidades de la GS₁ y GS₂ basados en SDS-PAGE, indican que la subunidad cloroplástica es ligeramente más grande (43-45 kD) que la subunidad citosólica (37-43 kD). (Hirel *et al.*, 1984b; Lara *et al.*, 1984; Nato *et al.*, 1984; Ericson, 1985; Hirel *et al.*, 1987; Tingey and Coruzzi, 1987; Tingey *et al.*, 1987).

Evidencias genéticas muestran que la GS₁ y la GS₂ son codificadas por genes nucleares independientes; esto proviene del aislamiento de una serie de mutantes alélicas semidominantes de cebada que son deficientes en la isoenzima cloroplástica y que poseen niveles normales de GS₁ (Wallsgrave *et al.*, 1987; Blackwell *et al.*, 1987).

1.4.3. GS Citosólica

a) Función y localización

Nódulos: Los nódulos de las leguminosas, son uno de los órganos con mayor abundancia de GS en las plantas superiores y por lo tanto es la enzima estudiada en mejor detalle. La GS en nódulos llega a comprender del 1-2% de la proteína soluble y cerca del 95% de la actividad corresponde a la citosólica y el restante (5%) a la plastídica y los bacteroides (Mifflin and Cullimore, 1984; Bennett and Cullimore, 1989). La actividad de GS en los bacteroides es muy baja, por lo que el

amonio generado por la actividad de nitrogenasa en éstos es excretado hacia el citosol de la planta y asimilado por la GS vegetal.

Lara y cols. (1983), reportaron que la GS citosólica de nódulos de *P. vulgaris*, puede ser separada por cromatografía de intercambio iónico en 2 isoenzimas, las cuales son designadas como GS_{n1} y GS_{n2} . La GS_{n2} , es indistinguible de la enzima citosólica de raíz (GS_r) con base en su reactividad antigénica (Cullimore and Miflin, 1984). Con base en base el mismo criterio, las diferencias entre la GS_{n1} y la GS_{n2} estuvieron limitadas a algunas diferencias en los determinantes antigénicos y en la relación de actividad de sintetasa/transferasa, la cual fue mucho más baja para la GS_{n1} , que para la GS_{n2} o la GS_r . La actividad de GS en nódulos de alfalfa, también puede ser separada en 2 picos isoenzimáticos, uno de los cuales es **nódulo-específico** y difiere del de la isoforma de raíz, en su sensibilidad al inhibidor tabtoxinina- β -lactama *in vivo* (Knight and Langston-Unkefer, 1988). Solo una isoenzima fue detectada durante la purificación de la GS de soya (McParland *et al.*, 1976) y lupino (McCormack *et al.*, 1982).

El análisis de las subunidades de la GS en raíz, hojas y nódulos de *P. vulgaris* identificó polipéptidos citosólicos (denominados α , β y γ), con pesos moleculares similares (aproximadamente 43 kD), pero con diferente punto isoeléctrico (Lara *et al.*, 1984).

Se han observado polipéptidos citosólicos múltiples de GS (hasta 10), en nódulos de alfalfa (Groat and Schrader, 1982), soya (Sengupta-Goapalan and Pitas, 1986; Hirel *et al.*, 1987) y chicharo (Tingey *et al.*, 1987). En chicharo existen 5 polipéptidos distintos de la GS, que pueden ser separados por tamaño y carga, y los 5 están presentes a diferentes niveles en el nódulo (Tingey *et al.*, 1987).

Raíces y hojas: La mayoría de las evidencias disponibles indican que existe muy poca o ninguna diferencia entre las enzimas citosólicas de raíz y hoja. Las propiedades cinéticas y regulatorias de las enzimas de raíz y hoja, fueron idénticas en cebada (Mann *et al.*, 1980) y en arroz (Hirel and Gadal, 1980). En *P. vulgaris* las isoenzimas citosólicas de raíz y hoja están compuestas de los mismos 2 polipéptidos citosólicos (α y β) (Lara *et al.*, 1984). En chícharo, los polipéptidos GS_1 y GS_n , están presentes tanto en hojas como en raíz, pero el polipéptido GS_1 , es la forma predominante en raíz (Tingey *et al.*, 1987). En soya cada una las

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

enzimas de raíz y hoja, consiste de 2 polipéptidos de 38 y 40 kD (Hirel *et al.*, 1987).

Trabajos posteriores han demostrado que el patrón de distribución es altamente sofisticado. Edwards y cols. (1990), hicieron un análisis del promotor del gen GS3A de chícharo, y sugieren que la GS citosólica es preferencialmente expresada en el tejido vascular de las hojas. Estudios posteriores han confirmado la importancia de la localización de la GS₁ en el floema y tejidos vasculares relacionados (Tobin and Yamaya, 2001). Sin embargo, la expresión de la GS₁ en el resto de la hoja puede depender de la etapa de desarrollo de la hoja y la especie. Brugière y cols., sugieren que la GS citosólica se expresa en el mesófilo de manera ascendente durante la madurez de las hojas de tabaco (Brugière *et al.*, 2000). La GS₁, se encuentra también en las células del mesófilo de cebada (Tobin and Yamaya, 2001) y ha sido aislada de protoplastos de mesófilo de chícharo (Wallsgrave *et al.*, 1979).

b) Regulación

La regulación de la GS, inicia con los genes de la GS, de los cuales actualmente existe una buena descripción en varias especies (Forde and Cullimore, 1989; Tingey *et al.*, 1988). Las reacciones y las formas de las GS involucradas pueden diferir de acuerdo al órgano vegetal en consideración. Dentro de un órgano, el papel de la GS y el metabolismo en progreso, pueden variar de acuerdo al tejido, célula o compartimento subcelular (Miflin and Habash, 2002). La GS₁ está codificada por una familia multigénica pequeña, que varía en número desde tres en *A. thaliana* (Peterman and Goodman, 1991) hasta cinco en maíz (Li *et al.*, 1993). Algunos de los miembros de la familia génica, son expresados en una manera órgano específica, otros parecen ser menos específicos. La GS₂ está codificada por un número reducido de genes, comúnmente solo uno. Se han realizado un gran número de estudios de los promotores de estos genes. Esto ha ayudado a identificar los órganos y tejidos, en los cuales son expresados los genes específicos. Marsolier y cols. (1993), demostraron que un fragmento de 3.5 kb del promotor del gen GS15 en *Lotus*, dirige la expresión de un gen quimérico reportero de GUS en el nódulo y en respuesta a la adición de NH₄⁺. Cuando el fragmento del promotor fue reducido a porciones de 1.3, 0.7 y 0.24 kb, pudieron ser identificados otros elementos que confieren expresión en los pulvini, la raíz y

TESIS
FALLA DE CULMIN

las anteras, respectivamente. La conclusión es que la complejidad de los genes y sus promotores pueden combinarse y dar una expresión en múltiples y variadas células, tejidos u órganos, en los cuales la GS es requerida para el metabolismo de nitrógeno.

La transcripción es claramente una condición necesaria para la presencia de la GS dentro de una célula, pero puede no ser determinante en el nivel de la proteína y la actividad de la enzima en la célula. Cock y cols. (1991), encontraron que los niveles de la isoenzima GS- δ , no correlacionaban con el nivel de expresión del gen *gln- δ* , en hojas. Ortega y cols. (2001), han demostrado con plantas transgénicas de alfalfa transformadas con un gen de GS bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, que los transcritos se acumulan sin un incremento correspondiente en el nivel de actividad de la enzima. Habash y cols. (2001), encontraron que una GS₁ nativa es expresada en una etapa tardía en el desarrollo de las hojas de trigo y que una GS transgénica, parece seguir el mismo patrón de expresión a nivel de actividad de la enzima, cuando se encuentra bajo el control del promotor *rbcS*. Esto no era de esperarse si el promotor fuera el determinante principal de la expresión, dado que la alta expresión de este promotor, es en las etapas tempranas de desarrollo de la hoja. Estos resultados sugieren que los controles postraduccionales son importantes para controlar el nivel de GS en las células, pudiendo estar regulados por retroalimentación (feedback) de la GS.

Los mecanismos que pueden controlar la estabilidad y actividad de la GS₁, han sido recientemente descritos. Moorehead y cols. (1999), demostraron que la GS interactúa con las proteínas 14-3-3, que son una familia de moléculas regulatorias ubicuas, encontradas virtualmente en cada tejido y organismo eucarionte, regulan procesos fundamentales de asimilación de carbono y nitrógeno, juegan un papel auxiliar en la síntesis de almidón, producción de ATP, detoxificación de peróxido y participan en la modulación de muchas otras rutas bioquímicas importantes. Finemann y Schjoerring (2000), recientemente presentaron un modelo tentativo de control reversible de la GS por fosforilación y desfosforilación incorporando los papeles del ATP, Mg⁺² y el pegado a la proteína 14-3-3. El modelo está basado en el papel central que juega la relación ATP/AMP, en el control de la actividad y estabilidad de la GS₁. Se propone que en la

TESIS CON
FALLA DE OSMEM

obscuridad, los niveles ATP/AMP son altos y la GS₁ está fosforilada y unida a la proteína 14-3-3, lo cual le confiere protección contra la degradación. Contrario a esto, en la luz, la GS₁ no está fosforilada y puede ser susceptible de daño. Recientemente han emergido evidencias que demuestran que la GS₂ en tabaco se encuentra también fosforilada (Riedel *et al.*, 2001).

La búsqueda de homólogos de genes conocidos que son importantes en la regulación del metabolismo del nitrógeno en otros organismos ha llevado a la identificación de proteínas semejantes a PII de *A. thaliana* y *Ricinus communis* (Hsieh *et al.*, 1998). En *E. coli* y otras bacterias, PII es un efector alostérico que regula indirectamente a la glutamina sintetasa a nivel transcripcional y postraduccional, en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. La vía exacta en la cual estos homólogos trabajan en plantas está siendo descrita.

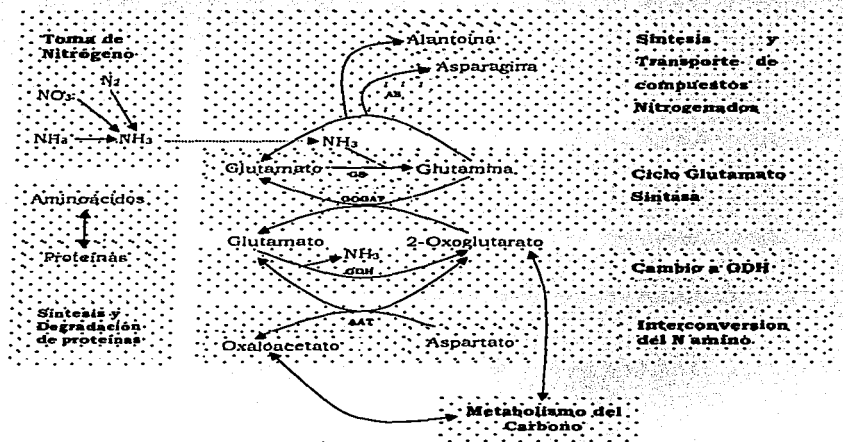


Fig. 6. Principales rutas enzimáticas en el balance del metabolismo del carbono y nitrógeno. **AAT**, aspartato aminotransferasa; **AS**, asparagina sintetasa; **GS**, glutamina sintetasa; **GOGAT**, glutamato sintasa.

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

c) Genes en leguminosas

Está bien establecido en al menos 2 especies de leguminosas (*P. vulgaris* y *P. sativum*), que la GS está codificada por una pequeña familia multigénica.

Phaseolus vulgaris

El análisis y la clonación de cDNAs ha establecido que existen al menos 4 distintas especies mRNAs de la GS en *P. vulgaris*; 3 codifican para subunidades citosólicas y uno para la subunidad cloroplástica (Cullimore *et al.*, 1984; Gebhardt *et al.*, 1986; Lightfoot *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 1989). Por los estudios de transcripción y traducción *in vitro* de las 3 clonas de cDNAs completas, Bennett y cols. (1989), fueron capaces de demostrar que los polipéptidos codificados por estos cDNAs, comigran en geles de doble dimensión con las 3 subunidades citosólicas nativas (γ , α y β).

Comparaciones entre las secuencias nucleotídicas de las 4 clonas de cDNA, indican que éstas son el producto de los 4 genes homólogos, pero estructuralmente distintos (Gebhardt *et al.*, 1986; Lightfoot *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 1989), ésto ha sido apoyado por los patrones de hibridación de "Southern blot" (Cullimore *et al.*, 1984; Gebhardt *et al.*, 1986; Lightfoot *et al.*, 1988).

La familia multigénica de la GS en *P. vulgaris*, está compuesta por 4 genes: *gln- α* , *gln- β* , *gln- γ* y *gln- δ* . Los tres primeros codifican la GS₁ (Fig. 7), presentando una homología de entre el 76 y 86% entre sus secuencias nucleotídicas. Las formas abundantes en el nódulo son las subunidades codificadas por los genes *gln- β* y *gln- γ* (Fig. 7), aunque ésta última se encuentra en mucho mayor proporción que la primera. Una parte minoritaria la compone el producto del gen *gln- α* (Bennett y Cullimore, 1989). El gen *gln- δ* codifica la isoforma plastídica, se expresa principalmente en tejidos fotosintéticos, encontrándose en los cloroplastos de las hojas. Para ser consistente con la nomenclatura bacteriana de los genes estructurales de la GS (*glnA*), los nombres de *gln- α* , *gln- β* , *gln- γ* y *gln- δ* fueron adoptados, para los genes que codifican para las subunidades α , β , γ y pre- δ (cloroplasto). La existencia de un quinto gene de GS (*gln- ϵ*) fue al principio propuesta con base en el análisis de los Southern blots (Gebhardt *et al.*, 1986), y posteriormente confirmada por la clonación del gen propio (Forde *et al.*, 1989).

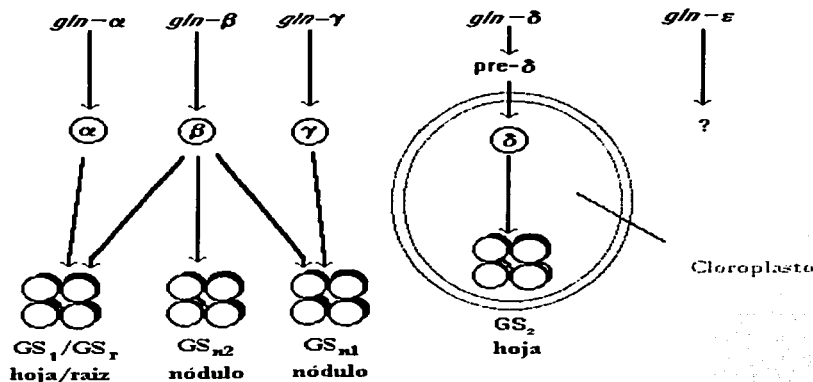


Fig. 7. Genes que codifican para las isoenzimas octaméricas de la GS de *P. vulgaris* en raíz, hoja y nódulo

Pisum sativum

En chícharo han sido aisladas las clonas de cDNA correspondientes a los polipéptidos de la GS_1 , GS_n y GS cloroplástica (GS_2), así como también han sido establecidas sus propiedades codificantes por estudios de transcripción y traducción *in vitro* (Tingey *et al.*, 1988). No se sabe con certeza si los 3 polipéptidos GS_n , son producto de genes separados o resultado de modificaciones post-traduccionales a partir del producto primario de traducción. Sin embargo, Walker y Coruzzi (1988) han reportado que existen 2 genes no alélicos casi idénticos de GS_n en chícharo y ambos se expresan. Por esto la GS en chícharo, como en *P. vulgaris*, está codificada por una familia multigénica pequeña, que consiste de al menos cuatro genes estructurales, tres para las subunidades citosólicas y uno para la subunidad cloroplástica.

1.4.4. GS cloroplástica

Las isoenzimas citosólica y cloroplástica han sido identificadas en hojas, siendo la subunidad cloroplástica ligeramente más grande (43-45 kDa) que la citosólica (37-43 kDa). La proporción de ambas isoenzimas puede variar entre las distintas especies, etapas de desarrollo y factores ambientales, tales como la luz y la

concentración de CO₂ atmosférico (McNally and Hirel, 1983; McNally *et al.*, 1983; Tobin *et al.*, 1985; Edwards and Coruzzi, 1989; Yamaya *et al.*, 1992).

a) Función y localización

La holoenzima GS₂ del cloroplasto, es la isoenzima predominante en hojas, en donde se cree, funciona en la asimilación primaria de amonio y en la reasimilación de amonio producto de la fotorrespiración.

En raíces, sólo se detecta la isoforma citosólica, aunque la presencia de la isoforma plastídica, también ha sido reportada en especies de leguminosas templadas, crecidas en presencia de nitrato. Todas las especies de leguminosas analizadas hasta la fecha poseen la enzima citosólica presente en los nódulos, aunque la GS plastídica ha sido también detectada en este tejido en chicharo (Woodall and Forde, 1996).

La GS₂ cloroplástica es expresada abundantemente en las células del mesófilo de las hojas, mientras que la expresión de la GS₂ citosólica es detectada en bajos niveles en este órgano y está normalmente restringida al floema (Edwards *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1992; Kamachi *et al.*, 1992).

El alto nivel de expresión de la GS₂ cloroplástica en las células del mesófilo de la hoja confirmó su papel en la reasimilación del amonio fotorespirado, lo cual es apoyado por evidencias bioquímicas, genéticas y moleculares (Keys *et al.*, 1978; Wallsgrove *et al.*, 1987; Edwards y Coruzzi, 1989; Lea and Forde, 1994; Kozaki y Takeba, 1996; Migge *et al.*, 2000).

Las subunidades de la GS₂ en *Phaseolus vulgaris* (Lara *et al.*, 1984) y tabaco (Hirel *et al.*, 1984b; Nato *et al.*, 1984), pueden ser resueltas como 4 variantes por isoelectroenfoque. Nato *et al.* (1984) encontraron evidencias de que la GS₂ de tabaco es glucosilada, abriendo la posibilidad de que las diferencias en la glucosilación permitieran la existencia de variantes en la carga, pero análisis posteriores han fallado para confirmar la presencia de azúcares unidos a la GS₂ de espinaca, chicharo y *N. plumbaginifolia* (Erickson, 1985; Tingey y Coruzzi, 1987; Tingey *et al.*, 1987). Sin embargo, otras modificaciones post-traduccionales (fosforilación o proteólisis limitada), o artefactos generados en la purificación de la enzima, pueden ser también los causante de la heterogeneidad de la enzima de cloroplasto.

Ha sido obtenido un gran número de mutantes vegetales deficientes en enzimas claves de los ciclos fotorespiratorio, del carbono y nitrógeno (Keys *et al.*, 1978; Givan *et al.*, 1988). Tales mutantes, han sido seleccionadas con base en su crecimiento más o menos satisfactorio bajo condiciones no-fotorespiratorias (0.7% v/v de CO₂), pero muestran síntomas severos de estrés y lesiones cloróticas en su exposición al aire atmosférico. Este tipo de mutantes han sido descritas en *A. thaliana*, cebada, chícharo y *L. japonicus* (Somerville, 1986; Blackwell *et al.*, 1988; Lea and Forde, 1994; Orea *et al.*, 2002).

La obtención de este tipo de mutantes fotorespiratorias deficientes en enzimas de asimilación de amonio ha sido un avance muy importante, dado que con esto se ha demostrado que la GS cloroplástica y Fd-GOGAT son las isoformas específicas involucradas en la reasimilación del amonio liberado durante la fotorrespiración.

b) Regulación

La regulación de la expresión de la GS, no es un proceso plenamente entendido. Los genes de la GS₁ y la GS₂, son diferencialmente expresados durante el desarrollo y crecimiento vegetal (Forde and Woodall, 1995; Edwards *et al.*, 1990; Kamachi *et al.*, 1991), reflejando con esto los diferentes papeles y la compartimentalización celular de las dos isoenzimas (Tingey *et al.*, 1988; Mann *et al.*, 1980; Edwards y Coruzzi, 1989). Además, se ha demostrado que el promotor de la GS₂ de chícharo es inducido por luz (Tingey *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1990) y la acumulación de su mensajero puede ser en parte debida a una respuesta mediada por fitocromos (Migge *et al.*, 1998). El amonio producido por la fotorrespiración, también regula la expresión de la GS₂ en chícharo (Edwards and Coruzzi, 1989).

c) Genes en leguminosas

Dos variantes en tamaño de la subunidad GS₂ de *P. vulgaris*, fueron inicialmente reportadas (Lightfoot *et al.*, 1988), pero los análisis por "Southern blot" indican que existe un solo gen para la subunidad cloroplástica en esta especie.

1.5. Glutamato Sintasa (GOGAT)

La asimilación primaria de amonio (NH₄⁺) en aminoácidos ocurre vía la acción conjunta de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa, también llamada glutamato 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) (Fig. 5). La reacción catalizada por la GS involucra la aminación dependiente de ATP del glutamato

para producir glutamina. La GOGAT, posteriormente cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al α -cetoglutarato, para producir dos moléculas de glutamato. El glutamato sintetizado puede ser utilizado para reponer las reservas de glutamato en la catálisis subsecuente de la GS, o para donar su grupo amino para formar compuestos nitrogenados. La función principal de la glutamina y el glutamato, es la síntesis de aspartato y asparagina, producidos en las reacciones catalizadas por la aspartato aminotransferasa y la asparagina sintetasa (Fig. 6). Estos aminoácidos son los principales compuestos transportadores de nitrógeno en muchas plantas. Los esqueletos de carbono requeridos para estas reacciones iniciales de asimilación de NH_4^+ son proporcionados por el α -cetoglutarato y el oxaloacetato. Los requerimientos para el metabolismo de estos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos ligan estrechamente la asimilación de nitrógeno y el metabolismo del carbono (Temple *et al.*, 1998a)

En plantas superiores, la GOGAT se encuentra como 2 isoformas distintas, NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) y una GOGAT dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT)(EC 1.2.7.1); éstas difieren en su masa molecular, composición de subunidades, cinética enzimática, especificidad antigénica y reductora, y función metabólica (Gregerson *et al.*, 1993; Sakakibara *et al.*, 1991).

1.5.1. NADH-GOGAT

Es una flavoproteína metal-azufre, que se encuentra principalmente en tejidos no verdes. Ha sido purificada y caracterizada de nódulos de leguminosas y de cultivos celulares de arroz (Gregerson *et al.*, 1993; Yamaya *et al.*, 1992; Vance *et al.*, 1995). En los nódulos de las leguminosas, la actividad de la NADH-GOGAT, se ha visto que se incrementa marcadamente durante el desarrollo del nódulo y su actividad está asociada con una forma única de la enzima (Gregerson *et al.*, 1993). En plantas superiores, la NADH-GOGAT se encuentra como monómeros con una masa de la subunidad nativa de aproximadamente entre 225-230 kDa, posee un pH óptimo de entre 7.5-8.5 y valores de la K_m aparente para NADH, glutamina y α -cetoglutarato de 4-13, 400-1000 y 39-960 μM , respectivamente (Lea *et al.*, 1990). En los nódulos, el NH_4^+ es exportado de los bacteroides hacia el citoplasma de la célula hospedera, en donde éste es rápidamente asimilado vía la NADH-GOGAT y la GS citosólica hacia aminoácidos (Fig 8).

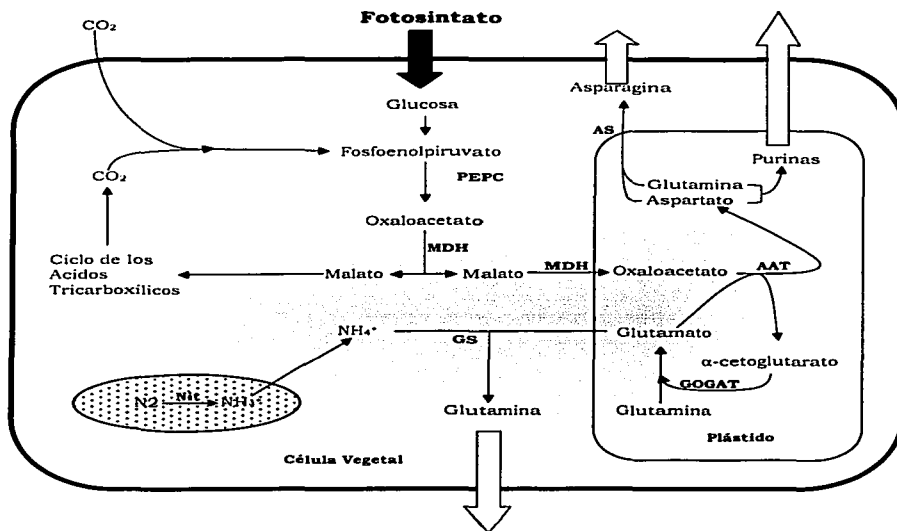


Fig. 8. La figura muestra la asimilación de nitrógeno en los nódulos de leguminosas, las enzimas que intervienen, así como su localización celular. La glutamina, asparagina y los urecidos derivados de las purinas, son los compuestos nitrogenados primarios que se excretan y proporcionan para su transporte a través de la planta. El fotosintato, proporciona los esqueletos de carbono para la biosíntesis de aminoácidos, vía la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El carbono adicional, también puede ser proporcionado por una fijación no-fotosintética de CO_2 vía fosfoenolpiruvato. Las enzimas enlistadas son: **AAT**, aspartato aminotransferasa; **AS**, asparagina sintetasa; **GOGAT**, glutamato sintasa; **GS**, glutamina sintetasa; **MDH**, malato dehidrogenasa; **Nit**, nitrogenasa; **PEPC**, fosfoenolpiruvato carboxilasa

En nódulos de frijol, la NADH-GOGAT parece encontrarse como 2 isoformas (I y II), ambas se incrementan en los nódulos fijadores de nitrógeno, cuando la actividad de la nitrogenasa alcanza su máximo nivel de actividad. En este tejido, la NADH-GOGAT, presenta un nivel de actividad específica que es 27 veces mayor que el detectado en raíces (Chen and Cullimore, 1988).

Los patrones de expresión de los genes que codifican para la GS citosólica y la NADH-GOGAT, parecen estar coordinados en no leguminosas, en donde las proteínas funcionan juntas en los procesos tales como la asimilación primaria de NH_4^+ derivado del NO_3^- del suelo, la reasimilación del NH_4^+ liberado durante el catabolismo de aminoácidos y/o la reasimilación del NH_4^+ liberado durante la germinación de la semilla (Lea *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1996).

En estudios con arroz, la proteína y la actividad de la NADH-GOGAT, se incrementan de 4 a 6 veces respectivamente en las espigas apicales, durante los primeros 15 días posteriores a la floración; los niveles alcanzan su máximo cuando se inicia la acumulación de las proteínas de reserva en la semilla. Gran parte de la proteína de la NADH-GOGAT encontrada está asociada con tejido joven del grano. Estos resultados sugieren que en arroz la NADH-GOGAT es responsable de la síntesis de glutamato a partir de la glutamina que es transportada del tejido senescente hacia las espigas (Hayakawa *et al.*, 1993).

I.5.2. Fd-GOGAT

La Fd-GOGAT, es una flavoproteína metal-azufre, con una masa molecular por subunidad de 130-180 kDa y que se considera que funciona como monómero. Posee un pH óptimo de entre 6.9-7.5 y valores de K_m aparente para ferredoxina, glutamina y α -cetoglutarato de 2-6, 100-1000 y 7-70 μM , respectivamente (Lea *et al.*, 1990). En combinación con la isoforma plastídica de la GS, la Fd-GOGAT, cataliza la asimilación de NH_4^+ derivado de la reducción de nitrato mediante una reacción dependiente de luz y el NH_4^+ generado durante la fotorrespiración (Sakakibara *et al.*, 1991).

Las raíces de maíz poseen una isoforma Fd-GOGAT que es inmunológicamente distinta de la enzima encontrada en hojas, lo cual sugiere que las 2 formas son codificadas por genes distintos. La isoforma de la raíz está implicada en la asimilación del NH_4^+ derivado del NO_3^- del suelo (Redinbaugh and Campbell, 1993).

Estudios posteriores, indican, que *Arabidopsis* posee 2 genes distintos de Fd-GOGAT, aparentemente funcionales (*GLU1* y *GLU2*). El gen *GLU1* predominantemente expresado en hojas y el gen *GLU2* expresado más abundantemente en raíces (Lam *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1997)

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

I.5.3. Genes

Para determinar las relaciones evolutivas entre las diferentes proteínas GOGAT eubacterianas y eucarióticas, se construyeron árboles filogenéticos basados en secuencias de aminoácidos de las regiones comunes de todas estas proteínas. Este análisis demostró que todas las Fd-GOGAT eucarióticas están estrechamente relacionadas a las Fd-GOGAT de eubacterias, lo cual sugiere, que los genes que codifican para estas enzimas son derivados de los precursores de cloroplasto eubacterianos (Temple *et al.*, 1998a; Inokuchi *et al.*, 2002). Estos datos son consistentes con el origen endosimbiótico de los plástidos. Datos adicionales que apoyan esta propuesta, provienen de los hallazgos de que el gen Fd-GOGAT, fue encontrado también en el genoma plastídico de algas rojas (Valentin *et al.*, 1993). Los genes de la GOGAT de plantas superiores, están localizados en el genoma nuclear, hacia donde presumiblemente éstos fueron transferidos del genoma endosimbionte (Gant *et al.*, 1991). El análisis filogenético también sugiere que el gen *gltB*, encontrado en todas las cianobacterias examinadas, es en general, más similar a los genes NAD(P)H-GOGAT eucarióticos y eubacterianos, que a los genes Fd-GOGAT; los cuales no reemplazan funcionalmente a los genes NADH-GOGAT encontrados en plantas superiores (Temple *et al.*, 1998a; Inokuchi *et al.*, 2002).

I.5.4. Regulación

Se ha demostrado que la luz y una gran variedad de metabolitos ejercen el mayor control regulatorio sobre diversas rutas metabólicas. La luz, por la vía de los fitocromos, tiene un efecto positivo sobre la expresión de la GS₂ (Peterman and Goodman, 1991). Evidencias recientes indican que la luz también ejerce un efecto regulatorio positivo sobre la expresión de la Fd-GOGAT (*GLU1*) (Suzuki and Rothstein, 1997). La expresión de *GLU2*, es también inducida por la luz, aunque la inducción de este gen por sacarosa en la obscuridad, indica que la expresión inducida por la luz puede ser en parte causada por un incremento en la concentración de metabolitos de carbono (Oliveira *et al.*, 1997). Un modelo propuesto sugiere que la regulación de las enzimas asimiladoras de nitrógeno en *Arabidopsis* está relacionada a estímulos interconectados luz-obscuridad, a niveles de carbono orgánico y a nitrógeno (Lam *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1997).

TESIS CON
FALLA DE DEFENSA

Además de la regulación por luz y suplemento de nitrógeno, se reportan como posibles agentes reguladores diversos factores ambientales y vegetales, tales como variaciones estacionales, reguladores de crecimiento, salinidad, estrés hídrico, contaminantes y edad de la planta (Srivastava *et al.*, 2002).

1.6. Glutamato Deshidrogenasa (GDH)

La glutamato deshidrogenasa (GDH), es una enzima presente en prácticamente todos los organismos vivos y puede catalizar tanto la síntesis de glutamato como su catabolismo. En dirección hacia adelante, la GDH cataliza la aminación del α -cetoglutarato; y en la reacción reversa, cataliza la desaminación del glutamato para producir α -cetoglutarato y amonio (Fig. 9). Las plantas poseen 2 clases de enzimas GDH: una GDH dependiente de NADH, encontrada en mitocondria, y una GDH dependiente de NAD(P)H, localizada en el cloroplasto. Históricamente se creía que la GDH era la ruta primaria de asimilación de amonio en plantas, por su presencia en microorganismos que crecían en medios ricos en amonio. Sin embargo, el papel de la GDH en la asimilación fue posteriormente cuestionado por el descubrimiento del ciclo GS/GOGAT en plantas.

Varios investigadores han propuesto que el papel primario de la GDH *in vivo* es el catabolismo de glutamato, dado que la actividad de esta enzima es inducida bajo condiciones limitantes de carbono (oscuridad), para desaminar el glutamato y proveer de esqueletos de carbono para alimentar el ciclo del ácido cítrico. La actividad de GDH, también es inducida durante la germinación y senescencia, dos etapas de desarrollo en donde los índices de catabolismo de aminoácidos son altos.

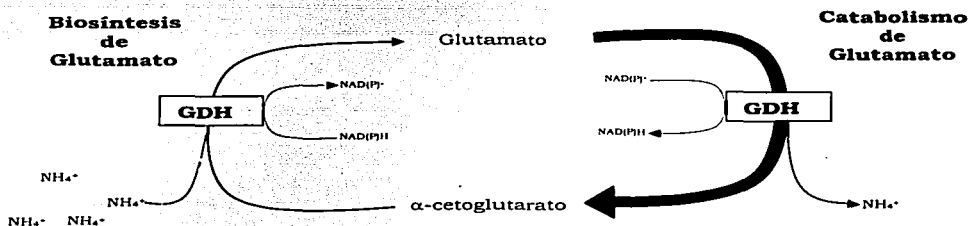


Fig. 9. Se cree que la GDH, funciona principalmente en el catabolismo del glutamato (desaminación), pero también puede asimilar nitrógeno inorgánico hacia glutamato, cuando las concentraciones de amonio son altas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estudios moleculares han proporcionado algunos indicios en la regulación de la síntesis de GDH en plantas. Los genes de *GDH*, han sido caracterizados de *Arabidopsis* y maíz, y sus secuencias proteicas sugieren que codifican para una enzima dependiente de NADH con una secuencia de señalización mitocondrial. El mRNA de la GDH se acumula durante un tratamiento de obscuridad o limitación de carbono, apoyando los estudios bioquímicos que muestran incrementos en la actividad de GDH en respuesta a limitación de carbono. Tanto la expresión génica, como la actividad enzimática, apoyan la participación de la GDH en el catabolismo del glutamato en plantas. También puede jugar un papel anabólico bajo ciertas condiciones. La actividad de GDH, es inducida en plantas expuestas a altas concentraciones de amonio, indicando un papel asimilatorio de la GDH, bajo ciertas condiciones de toxicidad de amonio (Coruzzi and Last, 2000) (Fig. 9).

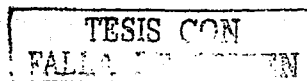
1.7. Aspartato Amino Transferasa (AAT)

Después de su asimilación inicial hacia glutamina y glutamato, el nitrógeno puede ser distribuido a muchos otros compuestos por acción de las enzimas llamadas **transaminasas**. La síntesis de aspartato regenera los esqueletos de carbono, requeridos por la asimilación de nitrógeno, por la transferencia de un grupo amino de glutamato al oxaloacetato. Por esto, la AAT juega un papel clave en la asimilación primaria de nitrógeno en plantas (Fig. 6).

La AAT, la aminotransferasa mejor caracterizada en plantas, juega un papel central en la síntesis y catabolismo de aspartato. La AAT, también conocida como glutamato: oxaloacetato aminotransferasa (GOT), es una enzima dependiente de piridoxal-fosfato.

La habilidad de la AAT para interconvertir estos importantes compuestos de carbono y nitrógeno, la colocan en una posición clave para regular el metabolismo vegetal. Ligado al hecho de que el aspartato es utilizado para transferir carbono, nitrógeno y equivalentes reductores entre los compartimentos intracelulares, isoenzimas de AAT, han sido localizadas en el citosol, mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas.

En *Arabidopsis*, ha sido caracterizada la familia génica completa de isoenzimas de AAT. Cinco diferentes clonas de cDNA de AAT, han sido identificadas, incluyendo aquellas que codifican para las formas plastídicas, mitocondrial, peroxisomal y



citoplasmática. Estudios *in vitro* de isoenzimas parcialmente purificadas de AAT, muestran un amplio rango de valores de K_m y especificidades de sustratos.

Arabidopsis, posee 2 isoenzimas principales de AAT: AAT2 (citoplasmática) y AAT3 (cloroplasto), detectadas por tinción de actividad en geles nativos de almidón (Coruzzi and Last, 2000).

1.8. Asparagina Sintetasa (AS)

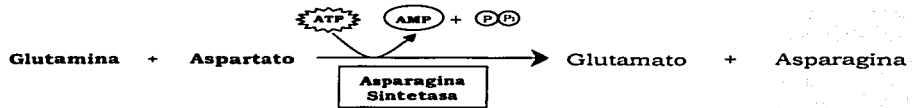
La amidación del aspartato por la glutamina o el amonio, produce asparagina, un aminoácido inerte utilizado para almacenar nitrógeno y transportar éste de los lugares de producción o síntesis, a los de consumo. La asparagina es el principal compuesto nitrogenado detectado en el floema de varias leguminosas, con concentraciones tan altas como 30mM. La enzimología de la biosíntesis de asparagina en plantas ha estado plagada por problemas de inestabilidad enzimática y permanece enigmática. Tres rutas posibles de la síntesis de asparagina han sido propuestas, una de las cuales utiliza la enzima dependiente de glutamina la asparagina sintetasa (AS) y es ahora aceptada como la principal ruta de biosíntesis de asparagina en plantas. En una reacción dependiente de ATP, la AS cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al aspartato, generando glutamato y asparagina (Fig. 10A). Se sabe que la glutamina es el sustrato preferido de casi todas las AS estudiadas en plantas superiores; algunas evidencias indican que la síntesis de asparagina dependiente de amonio, puede darse en plantas, tal y como sucede en *E. coli* (Fig. 10B).

Estudios de marcaje con $^{15}NH_4^+$ han demostrado que la asparagina incorpora el isótopo inmediatamente después de la glutamina; por tanto, la aminación directa del aspartato no parece ocurrir a índices significativos *in vivo*. Sin embargo, se ha propuesto también la producción de asparagina por asimilación directa, cuando las plantas se encuentran en concentraciones tóxicas de amonio (Coruzzi and Last, 2000).

La clonación de AS vegetales ha proporcionado datos relevantes sobre las propiedades de esta enzima en plantas. Las primeras clonas de cDNA de AS, fueron obtenidas de chícharo, con el uso de sondas heterólogas de AS de humano. Posteriormente, muchos genes de AS han sido aislados de una gran variedad de plantas, incluyendo leguminosas, no leguminosas y monocotiledóneas. Los polipéptidos codificados en cada uno de estos cDNA's

poseen un dominio de unión a glutamina tipo **purF**, que fue previamente descrito para glutamina amidotransferasas, involucradas en la biosíntesis de purinas en *E. coli*; otra característica más es que la glutamina es el sustrato de la AS vegetal (Crawford *et al.*, 2000).

A) Síntesis de asparagina dependiente de glutamina



B) Síntesis de asparagina dependiente de amonio

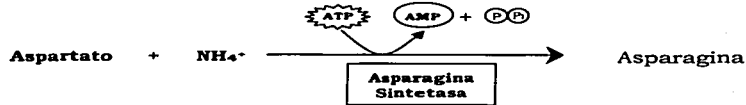


Fig. 10. Las asparagina sintetasas de plantas utilizan preferentemente glutamina como donador de nitrógeno (A), pero pueden catalizar la asimilación de nitrógeno inorgánico cuando el amonio es abundante (B).

I.9. Transformación genética en plantas

La tecnología del DNA recombinante la cual ha sido ampliamente empleada en sistemas bacterianos, es también una herramienta muy importante para manipular la expresión genética en plantas. Existe un gran número de sistemas eficientes para introducir DNA y vectores de expresión que trabajan en un gran número de células vegetales. Además, la mayoría de las células vegetales son totipotentes, lo que significa que una planta completa puede ser regenerada a partir de una célula vegetal. Por lo tanto, pueden generarse plantas transgénicas fértiles a partir de una célula genéticamente modificada. Si las plantas transgénicas posteriormente florecen y producen semillas viables, la característica de interés introducida o modificada es transferida a las siguientes generaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La ingeniería genética comprende una serie de herramientas moleculares que permiten manipular el material hereditario de un organismo. Esta manipulación ha sido posible gracias al conocimiento, cada vez más amplio, de los principios que rigen la herencia en los seres vivos.

I.9.1. Estrategia general y consideraciones

El avance científico de los últimos años ha resultado en el desarrollo de metodologías de transformación genética de plantas, que funcionan con varias especies agronómicamente importantes (Tabla 1). Sin embargo, mientras la obtención de una expresión génica transitoria elevada ha sido relativamente simple, la obtención de plantas transformadas establemente, se vuelve un proceso más complicado. La expresión transitoria puede ser fácilmente obtenida a muy altos niveles, utilizando electroporación de tejidos y bombardeo con micropartículas (biolística), con la mayoría de las especies vegetales. La expresión transitoria de construcciones génicas, puede ser deseable en algunos casos, en donde la expresión génica a largo plazo no es requerida. Este aprovechamiento ha sido utilizado para evaluar la efectividad de diferentes construcciones génicas previas a la transformación estable. Mientras que la expresión transitoria en células en cultivo es una herramienta muy útil para estudiar redes metabólicas o de expresión génica en células vegetales y más aún para los problemas relacionados con los problemas de diseño de los transgenes, es muy importante reconocer que genes idénticos pueden comportarse de manera distinta en células transformadas transitoriamente *versus* las transformadas establemente (Ingelbrecht *et al.*, 1989). Esto ha sido también de gran utilidad para estudiar los efectos de la expresión de una manera tejido-específica de construcciones génicas en tejidos blanco maduros, tales como flores o frutos. De esta manera puede realizarse un ensayo rápido sobre la factibilidad de la estrategia de expresión de los transgenes. La producción de flores y frutos maduros mediante una estrategia de transformación estable, consumiría más tiempo y en el caso de árboles perennes transgénicos, puede tomar varios años.

TESIS CON
FALLA DE CONTENIDO

Tabla 1. Estrategias más comunes para introducir genes en células vegetales

Procedimiento de transformación	Ventajas	Desventajas
<i>Agrobacterium</i>	Muy efectivo, barato y fácil de usarse. Puede ser utilizado en transformación de líneas germinales. El número de copias insertadas es en general bajo	Requiere el uso de procedimientos de regeneración por cultivo de tejidos. El rango de hospedero puede ser limitado por la respuesta de hipersensibilidad de la planta
Bombardeo con microparticulas	Muy efectivo, sobre todo para expresión transitoria. No hay problemas de rango de hospedero	No necesariamente requiere el uso de procedimientos de regeneración por cultivo de tejidos. El número de copias de DNA insertadas puede ser alto y ocasionar silenciamiento/co-supresión
Electroporación	Muy efectivo para expresión transitoria. No hay problemas de rango de hospedero. Altos niveles de transferencia de DNA	La regeneración a partir de protoplastos es un proceso complicado. El número de copias de DNA insertadas puede ser alto y ocasionar silenciamiento/co-supresión

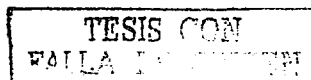
I.9.2. Transformación mediada por *Agrobacterium*

La transformación estable es dependiente de varios factores, siendo el más importante la especie vegetal a ser transformada y el protocolo de transformación utilizado. El patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens*, es el vector más comúnmente utilizado para transformar numerosas plantas dicotiledóneas, tales como el jitomate, el tabaco y el frijol (Zupan *et al.*, 2000). Este método tiene la ventaja del sistema natural de transformación genética desarrollado en *Agrobacterium*. El *Agrobacterium* silvestre transfiere un segmento de DNA (llamado **T-DNA**), de su gran plásmido inductor del tumor (**Ti**), a través de la membrana plasmática e incorpora éste en el DNA genómico de la célula adyacente al sitio de la herida. El T-DNA, está flanqueado por 2 secuencias directas repetidas de 25 pb, llamadas **bordes**, y contiene genes que codifican para enzimas que producen aminoácidos particulares llamados **opinas**, que no pueden ser catabolizados por las plantas mismas, pero que pueden ser utilizados como fuentes primarias de carbono y nitrógeno por la bacteria co-habitante. El T-DNA, incluye también genes que obligan a las células vegetales a producir hormonas

vegetales, como las citocininas, que promueven la división celular y la formación del tumor. Para permitir la utilidad tecnológica de la transformación genética, los genes oncogénicos y biosintéticos de hormonas del *Agrobacterium*, fueron removidos de la bacteria y reemplazados por sitios de clonación, en donde pueden ser integrados genes de interés, así como genes marcadores o reporteros. Los *Agrobacterium* portadores de tales plásmidos Ti recombinantes, puede ser utilizado para la infección de tejidos heridos (p.ej. tejidos de hojas en cultivo) o aún directamente en órganos vegetales maduros, y la bacteria puede transferir el T-DNA modificado en algunas de las células de la planta hospedera.

El plásmido Ti silvestre es muy grande (200 kb) y difícil de manipular. Su utilidad ha sido mejorada por el desarrollo de los vectores binarios (Bevan, 1984). En tales sistemas, el plásmido Ti de *Agrobacterium*, ha sido desarmado, por ejemplo, el T-DNA ha sido removido, pero la región *vir*, se mantiene intacta. Un plásmido por separado, que puede replicarse en *E. coli* y *Agrobacterium*, es utilizado. El vector binario, porta un origen de replicación que es compatible con el plásmido Ti de *Agrobacterium*. Este plásmido también porta un T-DNA artificial, en el cual pueden introducirse diferentes transgenes. De esta manera, cuando el vector binario es introducido en *Agrobacterium*, los genes *vir* del plásmido Ti desarmado, pueden actuar en *trans* para transferir el T-DNA recombinante del vector binario a la célula vegetal. Como los vectores binarios son mucho más pequeños y mucho más fáciles de manipular que los plásmidos Ti intactos, esta herramienta hace al sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* mucho más sencillo (Lessard *et al.*, 2002).

En general, con la transformación mediada por *Agrobacterium*, es necesario seleccionar y propagar las células transformadas que contengan el T-DNA integrado de *Agrobacterium*, de aquellas pocas células inicialmente transformadas (Zupan *et al.*, 2000). Si el experimento requiere cultivos celulares, este proceso es relativamente sencillo con muchas plantas dicotiledóneas. Sin embargo, si se requieren plantas completas regeneradas, entonces el proceso es complicado por la necesidad de regenerar plantas mediante cultivo de tejidos. A pesar del considerable esfuerzo, la regeneración vegetal sigue siendo difícil, problemática y tardada. En algunos casos la variación somaclonal no deseada, ha sido introducida a través de los sistemas de regeneración por cultivo de tejidos.



Hasta hace 5-8 años atrás se creía que *Agrobacterium* era incapaz de infectar plantas monocotiledóneas (lirios, palmas y gramíneas). Esto llevó al desarrollo de otros sistemas de transformación, tales como el **bombardeo de partículas** (Klein *et al.*, 1987) y la **electroporación** (Newell, 2000), como un mecanismo para transformar dichas plantas. Sin embargo, en los últimos años, se han obtenido varios éxitos en la transformación de plantas monocotiledóneas, utilizando *Agrobacterium* (Hansen, 2000; Hernalsteens *et al.*, 1984; Schafer *et al.*, 1987). Cepas que poseen plásmidos supervirulentos, han facilitado la transformación de algunas plantas monocotiledóneas recalcitrantes. Aunque, también existen varios reportes de transformación en leguminosas como alfalfa (Austin *et al.*, 1995; D'Halluin *et al.*, 1990), *Lotus japonicus* (Handberg and Stougaard, 1992) y frijol Azuki (El-Shemy *et al.*, 2002), por mencionar algunos. Es bien sabido que el factor que limita el éxito de la transformación en plantas monocotiledóneas, no es la transferencia e integración del T-DNA en el genoma vegetal, sino la regeneración. Con frecuencia, los índices de regeneración son pobres en plantas monocotiledóneas y éstos posteriormente reducidos bajo la selección, durante la transformación. Como el T-DNA es integrado en el genoma en sitios al azar, las regiones que flanquean el T-DNA ejercen una fuerte influencia en los niveles de expresión, necesitando la recuperación de varias líneas transgénicas independientes, debido a su variabilidad. El uso de material vegetal con elevada capacidad de regeneración, ha permitido el éxito en varias especies de monocotiledóneas, tales como arroz, maíz y sorgo; aunque la pobre capacidad de regeneración en otras especies ha llevado al desarrollo de estrategias alternativas de transformación, tales como las que se describen en seguida.

1.9.3. Electroporación y bombardeo con micropartículas

La electroporación de tejidos es otro método de transformación que ha sido utilizado para la transformación de plantas monocotiledóneas (Newell, 2000; Sorokin *et al.*, 2000; Terzaghi and Cashmore, 1997), aunque existen pocos reportes del uso de este procedimiento en la literatura comparados a la transformación mediada por *Agrobacterium*. Otras consideraciones cuando se utiliza este método incluye problemas relacionados con la regeneración y la tendencia de la técnica a insertar copias múltiples del transgen(es) en el genoma vegetal. La transformación mediada por **biolística**, comúnmente llamada pistola

TESIS CON
FALLA DE CENSURA

de partículas, es un procedimiento utilizado frecuentemente que posee varias ventajas (Klein *et al.*, 1987; Maliga, 2001; Ye *et al.*, 1990). Este es el procedimiento más frecuentemente empleado para la transformación transitoria de tejidos y está basado en el bombardeo de tejidos con partículas microscópicas de tungsteno u oro, recubiertas de DNA. Como en la electroporación, una de las desventajas de este método, es que pueden darse inserciones múltiples del transgen que pueden resultar en el silenciamiento del transgene o de sus homólogos en la planta (Hansen and Chilton, 1996). Sin embargo, este método no está limitado por la especie o tipo de tejido bombardeado, y es utilizado frecuentemente para la transformación de especies monocotiledóneas. Además, existen reportes en especies de leguminosas importantes tales como frijol (Russell *et al.*, 1993), alfalfa (Pereira and Erickson, 1995), soya (Christou *et al.*, 1989; Hadi *et al.*, 1996, El-Shemy *et al.*, 2002), cacahuete (Yang *et al.*, 2001) entre otras. Otra ventaja de este procedimiento es que ha permitido la exitosa transformación de cloroplastos y otros organelos (Maliga, 2001).

Sin embargo, todos los métodos descritos anteriormente requieren el uso de procedimientos de cultivo de tejidos, que permita regenerar las plantas transgénicas de interés. La transformación de la línea germinal ha sido vista como el medio para superar estas limitaciones (Tague, 2001). Resultados exitosos han sido reportados en *Arabidopsis thaliana*, cuando flores de esta especie, fueron sumergidas en una solución con *Agrobacterium* (Tague, 2001). Semillas transgénicas fueron producidas directamente, pero en baja frecuencia en estas flores sumergidas, sin la necesidad de cultivo de tejidos.

I.10. Enfoque biotecnológico para mejorar la asimilación de amonio en plantas

Los avances recientes en la biotecnología vegetal, combinados con estudios bioquímicos y fisiológicos más tradicionales, han llevado a nuevas áreas de investigación en las etapas primarias de la asimilación de nitrógeno inorgánico y las rutas bioquímicas subsecuentes involucradas en el suplemento y reciclaje de nitrógeno. Desde el descubrimiento del papel principal del par de enzimas glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT) en la asimilación de amonio en plantas superiores (Mifflin y Lea, 1976), se han realizado un gran número de

estudios sobre los mecanismos que controlan la expresión de los genes que codifican para estas proteínas.

Durante los últimos 15 años, se han llevado a cabo varias estrategias para modificar la asimilación de amonio utilizando plantas transgénicas con modificaciones en la GS (Lea y Forde, 1993; Temple *et al.*, 1994). La expresión de la GS acoplada a promotores específicos o construcciones de genes reporteros, fusionados a los promotores de la GS, han sido objeto de una considerable investigación en diferentes especies vegetales (Eckes *et al.*, 1989; Miao *et al.*, 1991; Temple *et al.*, 1993; Ortega *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2001).

Las plantas transgénicas de tabaco, transformadas con un gen de la GS, fusionado al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), muestran un incremento de 10 veces en el mensajero, cinco veces más en la actividad de esta enzima en hojas y un incremento de 20 veces en la resistencia a L-Fosfinotricina, (un inhibidor de la GS) "in vitro". El tejido de las plantas sobreproductoras de GS, muestran 7 veces menos cantidad amonio libre. La composición de aminoácidos en los tejidos no se afectó significativamente, por la sobreexpresión de la enzima y las plantas sobreproductoras de GS, fueron fértiles y crecieron de manera normal (Eckes *et al.*, 1989). En otro experimento al transformar plantas de *L. corniculatus*, con el gen citosólico de GS de soya (GS15), fusionado al promotor 35S, se observó que el gen de soya es altamente transcrito en las raíces y la parte aérea, pero que la actividad de la GS se incrementa sólo en la parte aérea (50-80%). Las plantas transgénicas mostraron un desarrollo floral temprano, característico de plantas senescentes, estos hallazgos sugieren que la expresión de la GS citosólica en la parte aérea puede acelerar el desarrollo vegetal, lo que ocasiona una senescencia temprana y una floración prematura, cuando las plantas son crecidas en un medio rico en amonio (Vincent *et al.*, 1997).

La sobreexpresión de la enzima GS, ha dado como resultado un metabolismo alterado del nitrógeno, lo que ha repercutido en la acumulación de una mayor biomasa en algunas plantas transgénicas: en hojas de tabaco, un incremento del 25% en la actividad de la GS, debido a la expresión constitutiva del gen GS; de alfalfa, dio como resultado 40% más proteína en las plantas transgénicas, comparadas con las plantas control (Temple *et al.*, 1993). La sobreexpresión del

gen GS₁ de alfalfa fusionado al promotor 35S, incrementó la fotosíntesis y el crecimiento de tabaco, crecido en bajas concentraciones de nitrógeno (Fuentes *et al.*, 2001). La expresión constitutiva de un gen GS₁ de chícharo en plantas transgénicas de tabaco, proporciona una ventaja considerable de crecimiento a las plantas transgénicas comparadas con las silvestres (Lam *et al.*, 1995). Además, la sobreexpresión de la GS₂, incrementa el crecimiento entre un 20 y 30% con base en el peso fresco en plantas transgénicas de tabaco (Migge *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros estudios con tabaco (Eckes *et al.*, 1989; Hirel *et al.*, 1992) y *L. corniculatus* (Vincent *et al.*, 1997), la sobreexpresión constitutiva de un gen heterólogo de GS₁, resultó en un incremento entre 30-80% en la actividad de la GS₁ en la hoja, pero no estuvo asociado con un incremento en la proteína o en la producción de biomasa. En *L. japonicus*, transformada con una fusión *roID-GS15*, existió una relación negativa entre la actividad de GS de la raíz y la producción de biomasa en la planta (Limami *et al.*, 1999).

Uno de los trabajos más recientes (Fei *et al.*, 2003), reportan la transformación de *Pisum sativum* L. cv. *Greenfeast* con el gen GS15 de soya que codifica para una GS citosólica, fusionada a 3 promotores distintos: uno constitutivo (35S), uno nódulo-específico (LBC₃) y un promotor específico de la raíz (*roID*). Cuatro líneas con copias únicas del gen GS15: una del *35S-GS15*, una del *LBC₃-GS15* y dos del *roID-GS15*, fueron evaluadas para la expresión del gen GS15, niveles de GS₁, actividad de GS, acumulación de nitrógeno, fijación de nitrógeno y el crecimiento vegetal a diferentes niveles de nitrato. Se detectaron niveles elevados de GS₁ en hojas de las líneas transformadas con las construcciones *35S-GS15* y *roID-GS15*, en nódulos de las líneas transformadas con las fusiones *LBC₃-GS15* y *roID-GS15*, y en las raíces de las líneas transformadas con las 3 construcciones. A pesar del incremento en los niveles de GS₁ en hojas y nódulos, no existen diferencias en la actividad de GS en estos tejidos, o en el contenido total de nitrógeno, fijación de nitrógeno, o en la acumulación de biomasa entre todas las líneas transgénicas y las plantas control. Sin embargo, las transformantes de la construcción *roID-GS15*, las cuales mostraron los niveles más altos de GS₁ en raíces, poseen significativamente mayor actividad de GS en las raíces que las plantas control. En una de las transformantes *roID-GS15*, el incremento en la actividad de GS, resultó en una disminución en el contenido de nitrógeno y acumulación de biomasa,

apoyando los hallazgos de los primeros estudios con *L. japonicus* (Limami *et al.*, 1999). Sin embargo, el contenido de nitrógeno y la acumulación de biomasa, no fueron negativamente afectados en las otras transformantes de esta construcción, y de hecho, estos parámetros fueron afectados positivamente en el tratamiento con nitrato (NO_3^-) 0.1 mM. Estos resultados indican que la sobreexpresión de GS15 en varios tejidos de chicharo, no resulta necesariamente en un incremento en la actividad de GS. Además que el incremento en la actividad de GS en la raíz no siempre resulta en un decremento en el nitrógeno vegetal y la acumulación de biomasa; por lo que serán importantes futuras investigaciones de la relación entre la actividad de la GS en raíz y las respuestas en el crecimiento.

Todos estos resultados tan disímiles, hacen pensar que los efectos de la sobreexpresión del gen GS₁ en el metabolismo nitrogenado y en el crecimiento vegetal, son de amplio rango y parecen ser especie y tejido específicos (Fei *et al.*, 2003).

1.11. *Lotus japonicus* como sistema modelo de las leguminosas

Como la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, la leguminosa *Lotus japonicus* posee muchas ventajas genéticas y biológicas (Handberg and Stougaard, 1992; Jiang and Gresshoff, 1997). Por ejemplo, posee un genoma pequeño (400 Mb por genoma haploide), es una planta diploide, con un tiempo de generación corto, con flores grandes autofecundables, produce gran número de semillas por planta, y por el tamaño grande de sus flores y la ausencia de incompatibilidad, es fácil realizar cruza. Algunas de sus líneas como "Gifu", poseen una alta capacidad de regeneración por cultivo de tejidos a partir de secciones de raíz, hipocotilos y hojas. Además, es fácilmente transformable por *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*, facilitando la mutagénesis insercional y el marcaje génico (Thykjaer *et al.*, 1995; Schauser *et al.*, 1998). *L. japonicus* posee un número cromosómico bajo ($n=6$), sugiriendo con esto la presencia de pequeños grupos genéticos y moleculares ligados. En contraste con *A. thaliana*, *L. japonicus* es capaz de proporcionar información relacionada a los procesos vegetales que dirigen las interacciones simbióticas durante la nodulación y la fijación de nitrógeno (Kolchinsky *et al.*, 1994) y simbiosis micorrízicas (Bonfante *et al.*, 2000). Los nódulos de tipo determinado se desarrollan rápidamente (entre los 7 y 10 días) posterior a la inoculación con *Mesorhizobium loti*, cuya secuencia genómica ya ha

sido publicada (Kaneko *et al.*, 2000). Las plantas desarrollan un buen tamaño, permitiendo los análisis químicos y bioquímicos necesarios para pasar de los estudios biológicos moleculares a los aspectos funcionales (Jiang y Gresshoff, 1993). Además, la estructura completa del genoma del cloroplasto, el análisis de porciones de secuencias expresadas (ESTs) en yemas florales y el mapa cromosómico de *Lotus japonicus*, ya han sido reportados (Endo *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ENTREGA

II. JUSTIFICACIÓN

Los recientes avances en la biotecnología molecular vegetal, combinados con los estudios tradicionales bioquímicos y moleculares han permitido un gran avance en los estudios de la regulación y expresión de enzimas clave en diversas rutas metabólicas. La ingeniería genética vegetal ha jugado un papel crucial, en estos logros, sin embargo, al momento de extrapolar estos conocimientos a plantas de interés agronómico, la dificultad se eleva considerablemente. A la fecha, existen algunos sistemas eficientes de transformación genética en alfalfa mediados por *Agrobacterium* y basados en la regeneración por embriogénesis somática (Schroeder *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1991) que han aportado resultados positivos. Sin embargo, las eficiencias de transformación con este método varían considerablemente entre los diferentes genotipos (Du *et al.*, 1994). La transformación mediada por bombardeo de partículas o bombardeo de DNA, puede ser una alternativa para especies o genotipos recalcitrantes, debido a que la transferencia de genes por este método, es considerada ser menos dependiente del genotipo (Christou, 1992). Varios factores importantes pueden afectar la transformación estable por la vía del bombardeo con micropartículas, incluyendo entre otros, la construcción de DNA (plásmido o vector empleado), el tejido blanco o explante, el sistema de cultivo de tejidos y el método de selección (Birch and Franks, 1991; Christou, 1992). Por lo tanto, es necesario considerar siempre estos factores al tratar de implementar o establecer un sistema de transformación mediante esta técnica.

Los sistemas modelo de leguminosas, tales como la leguminosa forrajera *Lotus japonicus* (Handberg and Stougaard, 1992) brindan la posibilidad de generar plantas transgénicas alteradas en enzimas importantes que participen en diferentes rutas metabólicas, para conocer más sobre la función y regulación de dichas enzimas. En nuestro caso particular nos interesa caracterizar plantas modificadas en la expresión de enzimas importantes en la asimilación de amonio como las enzimas del ciclo GS/GOGAT. Particularmente en este trabajo se planteó obtener plantas transgénicas con modificaciones nódulo específicas de la glutamina sintetasa (GS).

El uso de secuencias promotoras específicas de tejido, como es el caso del promotor del gen de leghemoglobina (de *Sesbania rostrata*), permitirá restringir el

efecto del transgene únicamente al nódulo en condiciones de simbiosis (Szczglowski *et al.*, 1996). De esta forma, utilizando la ingeniería genética de plantas y la estrategia de la sobreexpresión utilizando un gen de GS₁ de alfalfa fusionado al promotor nódulo específico de leghemoglobina de *S. rostrata*, se permitirá aumentar la cantidad de esta enzima específicamente en el nódulo y evaluar su efecto en la simbiosis con *Mesorhizobium loti*.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERN

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivos Generales

III.1.1. Generar y caracterizar molecular y fisiológicamente, plantas transgénicas de *Lotus japonicus* con sobreexpresión nódulo-específica de la glutamina sintetasa (GS).

III.2. Objetivos Particulares

III.2.1. Transformar genéticamente por el método de *A. tumefaciens*, *Lotus japonicus* usando vectores que portan un gen quimérico con un promotor específico de nódulo (*SrLbc3p*), fusionado al gen GS₁ de alfalfa.

III.2.2. Demostrar que las plantas de *L. japonicus*, regeneradas después de la transformación poseen integrados en su genoma los transgenes usados.

III.2.3. Determinar si la expresión de la GS en las plantas transgénicas se encuentra alterada (sobre-expresada) en los nódulos durante la simbiosis con *M. loti*, a través de:

- * Cuantificar la concentración del mRNA de la GS ("Northern blot")
- * Cuantificar la concentración de la proteína GS ("Western blot")
- * Cuantificar la actividad específica de la GS
- * Evaluar el fenotipo simbiótico

III.2.4. Determinar si existe un desbalance de aminoácidos, como producto de esta sobreexpresión.

III.2.5. Localizar el mRNA de la GS en diferentes tejidos por RT-PCR *in situ*.

III.2.6. Inmunolocalizar la proteína de GS en cortes de diferentes tejidos de plantas transgénicas.

III.2.7. Transformar plantas de *L. japonicus*, con la fusión génica *Srglb3p-GUS* y evaluar el patrón de expresión del promotor por ensayo histoquímico del gen reportero en diferentes tejidos de las plantas transformadas.

TESIS CON
FALLA DE CENGEN

IV. RESULTADOS

IV.1. Artículo:

“Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicus* plants”

TESIS CON
FALLA DE MENGEN

Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicus* plants

Ramón Suárez^a, Judith Márquez^b, Svetlana Shishkova^{a,1} and Georgina Hernández^{a,*}

^aCentro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno – UNAM, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Mor. Mexico

^bFacultad de Ciencias – UNAM, México D.F. 04510, Mexico

¹Present address: Instituto de Biotecnología – UNAM, Ap. Postal 520-3, Cuernavaca, Mor. Mexico

*Corresponding author, e-mail: gina@ejfn.unam.mx

Received 18 July 2002; revised 16 October 2002

Legumes can obtain nitrogen from symbiotic nitrogen fixation in root nodules. The glutamine synthetase/glutamate synthase cycle is responsible for the initial nitrogen assimilation. This work reports the analysis of transgenic *Lotus japonicus* plants with the chimeric gene containing the alfalfa cytosolic glutamine synthetase (GS₁) (EC 6.3.1.2) gene controlled by the *Sesbania rostrata* leghemoglobin gene promoter (Srg1b3p). Surprisingly, all of the transgenic primary transformants analysed were sterile. Two transformants designated GS39 and GS44 were further analysed. GS in nodules of GS39 and GS44 plants was upregulated, at the level of transcript and protein. The transgenic plants had 2-fold

higher nodule GS activity and similar root GS activity compared to control plants. The GS39 and GS44 sterile plants showed morphological alterations in pollen grains and in ovules. An increase in GS transcript abundance and enzyme activity was measured during early and late stages of flower development of GS plants. Flowers of GS plants showed higher glutamine content, resulting in an increased glutamine/glutamate ratio. The GS transcript and protein were detected in ovules. These data indicate that overexpression of GS₁ in reproductive organs critically affects their development and might be a reason for sterility of *L. japonicus* plants.

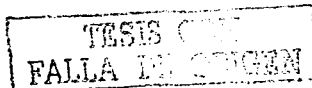
Introduction

Irrespective of nitrogen source, the reduced form of nitrogen ultimately available to higher plants for direct assimilation is ammonium. In most plants ammonium is assimilated into amino acids through the co-operative activity of two enzymes: glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) (Lea and Mifflin 1974). GS catalyses the incorporation of ammonia into glutamate to produce glutamine, while GOGAT catalyses the transfer of the amide group of glutamine to 2-oxoglutarate, resulting in the formation of two molecules of glutamate. Legumes can assimilate ammonia in their root nodules when this is provided by their microsymbiont (*Rhizobium* and related species) from fixed atmospheric nitrogen. The nitrogen reduced by the bacteroid is released to the cytosol of nodule host cells and it is assimilated through the GS-GOGAT pathway.

In plants, GS (EC 6.3.1.2) is an octameric protein with a native molecular weight of 350–400 kDa (Lea 1997). Plants possess two types of GS isozymes, coded by a gene family, located in the cytosol (GS₁) or in the chloroplast (GS₂). GS₂ is coded by a single nuclear gene that is expressed primarily in leaf mesophyll cells and is tightly regulated by light (Lam et al. 1996). GS₁ is coded by multiple genes. Several members of the GS₁ gene family are expressed differently in various plant organs such as roots, nodules, cotyledons, phloem, and senescing leaves (Lam et al. 1996).

Less is known about the regulation of GS₁ gene expression in plants or the significance of multiple GS₁ family members. With the aim of improving the understanding of GS₁ gene regulation, several research groups have attempted to manipulate GS₁ levels by either

Abbreviations – dpi, days post-inoculation; GS₁, cytosolic glutamine synthetase; GS₂, chloroplastic glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; GUS, β-glucuronidase; lb, leghemoglobin.



overexpressing or downregulating their expression (Temple and Sengupta-Gopalan 1997). This approach has been used to increase our knowledge on the role and regulation of GS₁ in the assimilation of reduced nitrogen provided by the bacteroid to the nodule plant cells during the legume-*Rhizobium* symbiosis. Studies on the modulation of GS₁ expression have been performed in the *Lotus* (sp.) that establishes symbiosis with *Mesorhizobium loti*.

Overexpression of the soybean GS₁ gene fused to the cauliflower mosaic virus 35S promoter in leaves of *Lotus corniculatus* resulted in changes in ammonium assimilation and accelerated plant development, leading to early senescence and premature flowering when plants were grown on ammonia rich medium (Vincent et al. 1997). During the symbiosis with *M. loti* these transgenic plants showed decreased GS activity in the nodules, formed more nodules, and showed an increase in root and shoot biomass, which may be due to more efficient assimilation in the transgenic nodules, as indicated by an increase in amino acids and a decrease in carbohydrate content (Harrison et al. 2000).

Limami et al. (1999) reported the characterization of transgenic *L. japonicus* plants that overexpressed GS₁ in roots, directed by the *Ro1D* promoter. These plants showed a significantly decreased biomass, when grown in nitrate, and a different partitioning of nitrate between the roots and shoots was observed. The authors (Limami et al. 1999) proposed that the higher GS activity resulted in an increase of the flux of amino acids derived from glutamine and/or glutamate, leading to a decreased nitrate uptake and assimilation by feedback inhibition. Limami et al. (1999) also found a significant negative correlation among non-transformed *L. japonicus* ecotypes between root GS activity and biomass production.

In their report Harrison et al. (2000) gave a summary of their findings on the characterization of transgenic *L. japonicus* plants harbouring a chimeric soybean GS₁ gene fused to the nodule-specific soybean leghemoglobin (*lb*) gene (*lb3*) promoter (*Srg1b3p*). *Lb* is a nodulin that plays a crucial role in symbiosis by facilitating oxygen diffusion to actively respiring bacteroids (Appleby 1984), the *Srg1b3p* was used with the aim of directing GS₁ overexpression to the nodule. The transgenic plants obtained had elevated (around 2-fold) GS activity in nodules. It was found that these plants were sterile and had morphological alterations in ovules and

pollen grains. Moreover, enhanced levels of GS₁ mRNA and protein were detected in ovules.

Materials and methods

Vector construction

Plasmid pRS6 (Fig. 1A), derived from the pBI121 binary vector (Jefferson et al. 1987), was constructed in two steps. In the first step, the *Hind*III-*Asp*718 fragment (1.9 kb) from pLK83E (Szabados et al. 1990, kindly provided by Dr Frans de Bruijn, INRA-CNRS, Castanet-Tolosan, France) containing *Srg1b3p* was excised and cloned into the same sites of pSP73 (Promega, Madison, WI, USA), thus generating the intermediate vector

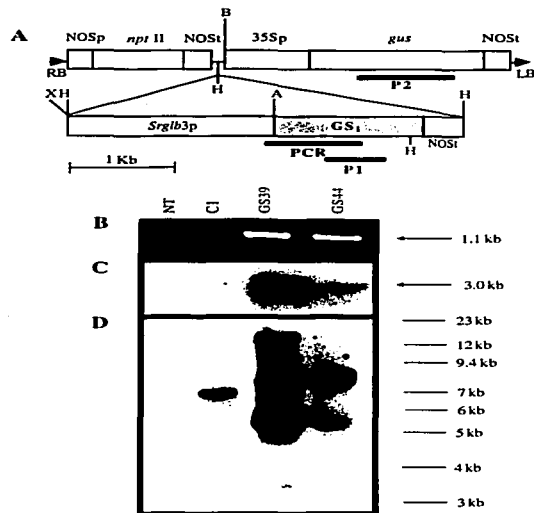


Fig. 1. Schematic representation of plasmid pRS6, PCR and Southern-blot analysis. (A) Plasmid pRS6 harbours the chimeric gene containing alfalfa GS₁ cDNA fused to the *S. rostrata* *g1b3* promoter (*Srg1b3p*) and the nopaline synthase transcription terminator (NOSI) flanked by the *npt II* and *gus* markers from pBI121 plasmid (Jefferson et al. 1987). The region is flanked by the right (RB) and left (LB) borders of the *A. tumefaciens* T-DNA. PCR: fragment amplified by PCR. P1 and P2: fragments used as probes. (B) *Bam*HI, X: *Xho*I, H: *Hind*III, A: *Asp*718. B: PCR amplification of the 1.1 kb fragment containing the *Srg1b3p*-GS₁ gene fusion. (C and D) Southern-blot analysis of genomic DNA. DNA (10 µg) from GS, CI or non-transformed (NT) plants was digested with *Hind*III and probed with the P1 fragment (C), or digested with *Bam*HI and probed with P2 fragment (D). The numbers on the right refer to the positions of molecular length markers in kilobases.

pRS1. In the second step the previously reported pGH114 plasmid (Fuentes et al. 2001) that harbours a chimeric alfalfa GS₁ gene was used. The *Xho*I-*Asp*718 fragment (0.4 kb) from pGH114 containing the 35S cauliflower mosaic virus promoter was excised and replaced by the *Xho*I-*Asp*718 fragment from pRS1 containing *Srglb3p*, thus generating plasmid pRS6. As shown in Fig. 1A pRS6 bears a chimeric GS₁ gene, containing the *Srglb3p* fused to the complete cDNA coding region of alfalfa (*Medicago sativa*) GS₁ (DasSarma et al. 1986) and the nopaline synthetase transcription terminator, flanked by the *nptII* and *gus* marker genes.

Plant transformation and growth

Agrobacterium tumefaciens EHA105 strain with the binary vectors pRS6 or pBI121 were used to transform *L. japonicus* ecotype Giftu B-129 hypocotyls as reported (Handberg and Stougaard 1992). *L. japonicus* seeds were kindly provided by Dr Jens Stougaard (University of Aarhus, Denmark). Kanamycin 100 mg l⁻¹ was used for selection of putative transformed shoots. Transgenic plants were transferred to pods with vermiculite for maintenance in growth chambers at 24°C with a 16/8 h photoperiod provided by cold fluorescent lights or in the greenhouse. The plants were watered with B & D nutrient solution (Broughton and Dilworth 1971) supplemented with 10 mM KNO₃ as the nitrogen source. Sterile transgenic plants that did not produce seeds were propagated clonally through stem cuttings and rooted in vermiculite-agrolite mix (1:1). Fertile control transgenic plants were allowed to self-fertilize and seeds from the T₁ generation were used for further experiments. For analysis of the symbiotic phenotype stem cuttings from sterile plants were allowed to root in vermiculite-agrolite mix and were watered with B & D nutrient solution (Broughton and Dilworth 1971) without nitrogen for 4 weeks. Then they were inoculated with *M. loti* NZP2235 and were analysed at 21 days post-inoculation (dpi).

DNA isolation, PCR and Southern blot analysis

Isolation of *L. japonicus* DNA was carried out using the PUREGENE (Genra Systems, Minneapolis, MN, USA) plant tissue DNA isolation kit. PCR was performed using 100 ng total DNA and AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primer pair used for the amplification of a 1.1-kb fragment from the *Srglb3p*-GS₁ gene fusion (Fig. 1A) was: forward primer (*Srglb3p*) 5'-CAATCACAAGGAAT- AACTC-3', reverse primer (GS) 5'-CGCCCTGTC- AATCTACGCTCG-3'. For Southern blot analysis 10 µg of plant DNA was digested with *Bam*HI, separated by electrophoresis and transferred to Hybond N⁺ membrane (Amersham Life Sciences, UK). Hybridization was performed at 65°C using ³²P-labelled PCR amplified 1.2 kb internal *gus* gene fragment (P2) as probe (Fig. 1A).

RNA isolation and Northern blot hybridization

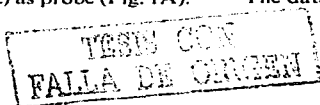
Total RNA was isolated from nodules, using TRIzolTM reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA). Total RNA from flowers, was isolated using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany). RNA samples (10 µg per lane) were separated by electrophoresis on formaldehyde gels and transferred to positively charged nylon membranes by capillary action. Membranes were pre-hybridized for 2 h at 50°C in DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hybridization was performed overnight at 50°C with PCR amplified 0.6 kb internal fragment from the GS₁ gene (P1) (Fig. 1A) as probe. The probe was labelled using the PCR DIG labelling mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and the filters were washed according to the manufacturer instructions.

Protein extraction and Western immunoblotting

Preparation of protein extracts from nodules and flowers was carried out at 4°C. Plant material was homogenized in a mortar and pestle with 2 vols (w/v) of extraction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM magnesium acetate, 1 mM Na₂-EDTA, 10% (v/v) glycerol, and 1 mM PMSF), and 10% (w/v) polyvinylpyrrolidone. The homogenates were centrifuged at 10000 g for 15 min. Supernatants were fractionated with ammonium sulphate, the 30%-75% fraction was recovered, desalted and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7). Protein content was determined with a microassay based on the Bradford procedures (Bradford 1976). Protein samples (10 µg) were separated by discontinuous SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli 1970) (10% resolving gel and 5% stacking gel), blotted onto nitrocellulose and incubated at room temperature with the primary antibody directed against bean nodule GS₁ (kindly provided by Dr Miguel Lara, CIFN-UNAM, Mexico). An alkaline phosphatase conjugated secondary antibody was used and developed with 5-bromo-4-chloro-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium salt as substrates (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Determination of enzyme activities

Histochemical β-glucuronidase (GUS) activity assay was performed as described (Jefferson et al. 1987). GS activity was determined by the transferase and the synthetase assays (Ferguson and Sims 1971) from 21 dpi nodules, nodule-detached roots, or flowers at different developmental stages. Freshly cut tissues were homogenized, at 4°C, with 2 vol. (w/v) extraction buffer mentioned before with the addition of 10% of polyvinylpyrrolidone, centrifuged twice at 12000 g for 15 min and the clear supernatants were recovered to determine the GS activity. Nitrogenase activity was determined in detached 21 dpi nodulated roots by acetylene reduction assay. The data were analysed by an unpaired *t*-test.



Light microscopic analysis

Flowers in anthesis were fixed at the site of collection. The material fixed in glutaraldehyde was dehydrated in alcohols and embedded in LR white. Sections (1–2 µm) were cut with an ultramicrotome and were stained with toluidine blue. Photomicrographs were taken on a Zeiss photomicroscope.

In situ RT-PCR analysis

Sections (3 µM) of flower tissues mounted on silanized slides (DAKO Corporation, Via Real Carpinteria, CA, USA) were covered with EZ rTth kit reaction mix (25 µl) (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) containing 206 µM Alexa-Fluor 594-5-d-UTP. Before adding the reaction mix to the tissue, 25 µl Sealing Starter Kit (MJ Research, Waltham, MA, USA) were added to avoid the reaction evaporation. Tissue sections with the reaction mix were covered with a coverslip and incubated for the RT step at 65°C for 20 min. The internal GS₁ gene primers used were: reverse primer: 5'-CGCCCTGTCAATCTACGCTCG-3'; forward primer: 5'-GAGAGCCCATTCACCAACA-3'. The PCR conditions were: denature at 94°C for 30 s, annealing 60°C 30 s and extension 72°C 1 min, during 10 cycles in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, MA, USA). The slides were washed with absolute ethanol for 1 min, then with sterile 1 mM EDTA five times, and were incubated overnight at 4°C in a humid container protected against the light. Samples were mounted in Fluoromount G Water Base (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA) and observed in a Bio-Rad MRC-600 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) fitted to a Zeiss Axioskop. The sections fluorescence associated with the Alexa-Fluor 594-5-dUTP was visualized using filter settings at 590 nm of excitation and 615 nm of emission.

GS immunolocalization

Harvested flowers were immediately fixed overnight in FAA solution (5% formalin, 5% glacial acetic acid, 50% ethanol, 27% water, v/v) at room temperature. Then tissues were dehydrated gradually in 50%, 70%, 80%, 95% and 100% ethanol solutions and transferred to a histomatic tissue processor (Jung Histokinette 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) for infiltration and paraffin embedding. Thick sections (3 µm) were then obtained and directly mounted onto silanized slides (DAKO Corporation, Via real Carpinteria, CA, USA), with the paraffin being removed by immersion of the slides in xylene solution. The sections were subsequently rehydrated in 100%, 95%, 80%, 50% and 30% ethanol and distilled water and finally air-dried. Sections were first incubated for 5 min in 6% H₂O₂, rinsed in PBS buffer (pH 7.4) and incubated with primary antibody directed against bean nodule GS₁ diluted 1:100 in PBS buffer for 1 h at room temperature. Sections were then

washed 3 times with PBS buffer and incubated for 30 min with DAKO link-antibody. Then slides were washed 3 times for 5 min with PBS buffer and then incubated 30 min with DAKO Streptavidin-Peroxidase antibody. Slides were again washed 3 times with PBS buffer and then incubated for 15–30 min, in the dark, with DAKO-DAB (diamino benzidine) solution. The reaction was stopped with distilled water. Tissue sections were dehydrated in alcohol and finally equilibrated in xylene before mounting. Sections were viewed through a light microscope. GS signals were visualized as ochre precipitate. The sections were counter stained with haematoxylin to resolve the regions without GS signals as blue stain.

Determination of amino acids content

Amino acids were extracted with 80% ethanol from 50 mg fresh harvested open flowers. The extracts were incubated at 37°C for 2 h and centrifuged (12 000 r.p.m), then the pellets were lyophilized. Amino acids were determined by HPLC reverse phase analysis using a pre-column derivation technique with 9-fluoromethyl chloroformate and a Nova-Pack C18 column (Waters International, Hertfordshire, UK).

Results

Obtaining transgenic *L. japonicus* plants with the alfalfa GS₁ chimeric gene

Transgenic *L. japonicus* plants containing the *np11* and *gus* marker genes, plus the chimeric gene containing the alfalfa GS₁ cDNA fused to the *Srg1b3p* and the nopaline synthetase transcription terminator were obtained after transformation of plantlets hypocotyls with *Agrobacterium tumefaciens* harbouring pRS6 plasmid (Fig. 1A). The *Srg1b3p* was previously demonstrated to direct the expression of reporter genes to the nodules of legumes such as *L. corniculatus* (Szabados et al. 1990) and *L. japonicus* (Szczygłowski et al. 1994). The presence of the transgenes in kanamycin-resistant, primary transformants (T₀), was initially confirmed by histological GUS activity and by PCR analysis. These were designated as GS plants. Also, transgenic *L. japonicus* plants containing only the marker genes from pBI121 were obtained and used as control. The control transgenic line further analysed was designated as C1 plant.

All the control primary transformants obtained developed normally and were allowed to self-fertilize. All the T₀ control plants obtained were fertile and developed normal seeds. Seeds from the T₁ generation of the C1 line were used for further experiments. However, while all the GS plants obtained grew normally in non-symbiotic conditions watered with nutrient solution containing nitrate as nitrogen source, they never produced seeds. Forty two GS primary transformants analysed developed flowers but did not form pods, indicating that

fertilization was not occurring in these plants. Cross fertilization of the GS plants was tried using the pollen from non-transformed plants, but no pods were developed. One of the GS plants designated GS44 formed some pods after self-fertilization, but these pods were abnormal; they were very small and very few seeds were formed inside each pod. Few seeds from the T₁ generation of GS44 were obtained but only one seed germinated and developed into a plant. However, the only T₁ GS44 plant also formed only few abnormal pods with few seeds in each one. The seeds from the T₂ generation of GS44 showed a low percentage of germination (24%) as compared to the average germination in control seeds (85%). The few T₂ GS44 plants that could be obtained from the seeds that germinated had an affected development, they grew much smaller than control plants, showing a dwarf phenotype, and they could not be nodulated by *M. loti*.

The only way found to analyse the symbiotic phenotype of the sterile GS T₀ plants was to propagate them clonally as stem cuttings, which when rooted were inoculated with *M. loti* NZP2235. Small clonal populations of each GS line were assayed for nodule GS activity and compared to that of control plants. One third of the 42 GS lines analysed had slightly increased GS specific activity, which was approximately 2-fold of the activity in nodules of C1 plants. Northern blot hybridization analysis revealed a moderate increase in GS transcript levels that correlated with the increase in GS activity observed in the nodules of 14 GS plants. The GS specific activity detected in the roots of these transgenic plants was not altered, it was similar to the activity in roots of C1 plants. Two lines designated GS39 and GS44, that had similar nodule GS overexpression phenotypes to the other GS plants analysed, were selected for further study. For maintenance, these lines were grown in non-symbiotic conditions.

The presence of the *SrgI*b3p-GS₁ chimeric gene in the transgenic plants was confirmed by PCR analysis. Transgenic plants from GS39 and GS44 lines showed the expected PCR fragment (1.1 kb) corresponding to the *SrgI*b3p-GS₁ junction, while the control plant did not show this fragment (Fig. 1B). Stable integration of the GS₁ transgene in two GS lines was confirmed by Southern blot analysis. Using the P1 GS₁ gene fragment as a probe (Fig. 1A), the expected hybridization band (3 kb) was observed in the *Hind*III digested total DNA of GS39 and GS44 plants (Fig. 1C). No hybridization band was revealed for DNA from non-transformed and C1 plants (Fig. 1C) indicating that under the stringent hybridization conditions used, the host *L. japonicus* GS₁ gene did not hybridize with the alfalfa GS₁ gene fragment used as a probe. To assess copy number of inserted T-DNA, DNA digested with *Bam*HI was hybridized with the P2 *gus* gene fragment (Fig. 1A). A non-transformed *L. japonicus* plant lacked a hybridization band, while a plant from the C1 line showed only one copy of the T-DNA (Fig. 1D). The hybridization patterns indicated that the GS39 line had at least five T-DNA insertions and

the GS44 line had at least two T-DNA insertions (Fig. 1D). However, these data may not reflect the presence of the entire *SrgI*b3p-GS₁ transgene. The different hybridization patterns observed confirmed that each GS plants arose from independent transformation events.

Overexpression of GS₁ in nodules of GS lines

GS39 and GS44 lines were propagated clonally and when rooted were inoculated with *M. loti*. Molecular analysis was performed to determine the overexpression of the GS₁ transgene in the nodules of GS39 and GS44 compared with C1 plants at 21 dpi, when mature nodules of control plants show the highest activity of ammonium assimilating enzymes (data not shown). Northern blot analysis revealed a band with a molecular weight corresponding to that reported for GS₁ RNA, with stronger intensity for GS lines (Fig. 2A). The faint hybridization signal in the control plant was due to the cross-hybridization of the alfalfa GS₁ probe with the native *L. japonicus* nodule GS₁ RNA. The hybridization signal in the GS39 and GS44 lines, however, was substantially higher because the alfalfa GS₁ probe hybridized more effectively with homologous alfalfa GS₁ RNA than with native *L. japonicus* nodule GS₁ RNA (Fig. 2A).

The expression of alfalfa GS₁ polypeptide in *L. japonicus* nodules was analysed by Western immunoblot using bean GS₁ polyclonal antibodies. A significant increase in the amount of GS₁ protein in extracts of the nodules of GS39 and GS44 was observed (Fig. 2B). Quantification of several immunoblots by image densitometry demonstrated a consistent increase in GS protein of approximately 173% of the control in the GS39 line and of 137% in the GS44 line.

The overexpression of GS observed at the RNA and protein levels (Fig. 2A,B) correlated with elevated GS activity (Fig. 2C). The GS activity from nodules of GS39, GS44 and C1 lines was determined by the rapid and commonly used transferase assay (Ferguson and Sims 1971), which allows detection of high rates of 'apparent' activity (Lea et al. 1990). However, the synthetase assay (Ferguson and Sims 1971), which measures GS in a biosynthetic direction, was also used to confirm the increase in GS activity in the transgenic lines (Fig. 2C). Both enzyme assays gave identical results: the GS specific activity from nodules (21 dpi) of GS39 and GS44 lines was approximately 2-fold higher than the activity present in nodules from control plants (Fig. 2C).

GS activity was also determined in roots and leaves of transgenic GS39 and GS44 plants, compared to C1 plants (data not shown). The GS specific activity in roots of the transgenic plants was much lower than in nodules and it was similar to activity in the roots of control plants. The leaves GS specific activity was similar in the GS and in the control plants. These results were in agreement with the expected nodule-specific GS overexpression.



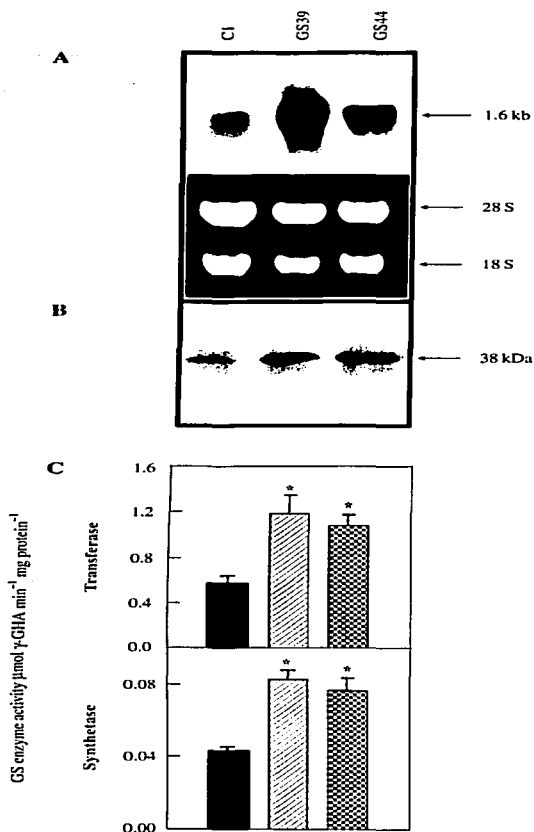


Fig. 2. Analysis of alfalfa GS₁ gene expression in nodules of transgenic GS lines at 21 dpi. (A) Northern-blot analysis of GS₁ mRNA. Total nodule RNA (10 μg) from transgenic and control plants was hybridized with P1 (shown in Fig. 1A) and EtBr-stained 28S and 18S rRNA was used as loading control. (B) Western-blot analysis. Protein extracts (10 μg) were probed with bean GS₁ antibody. Shown is a representative immunoblot of a total of three experiments. (C) Nodule specific activity of GS₁. Enzyme activity from extracts of nodules was determined using the transferase and the synthetase assays. Values are mean ± standard deviation of 18 measurements from 3 independent experiments. *Significant difference ($P = 0.05$)

Nitrogenase specific activity determined in nodulated GS39 and GS44 plants was similar to the activity present in nodulated CI plants (data not shown). Nodulated GS39 and GS44 plants showed similar growth rate, on foliage DW basis, than the nodulated CI plant.

Nodule GS₁ overexpression, that was evidenced at the level of transcript, protein, and enzyme activity, did not show an effect on growth of GS39 and GS44 plants in symbiosis with *M. lotii*. These transgenic plants had a similar symbiotic phenotype to wild-type *L. japonicus* plants.

Microscopic examination of reproductive structures of GS lines

Since all of the transgenic plants obtained with the *Srg/b3p*-GS₁ chimeric gene were sterile, we investigated whether the GS39 and GS44 plants had alterations in their reproductive structures. The morphology of pollen grains and ovules, from mature flowers of transgenic plants, was examined by light microscopy and compared to that observed in the CI plant. The average size of the pollen grains was estimated to be similar in control and GS lines (Fig. 3A-C). Beside normal pollen grains that were plump and round (Fig. 3A), the GS39 and GS44 lines showed a great proportion of aborted pollen grains (Fig. 3B,C). Some of the aborted pollen grains were severely collapsed resulting in a shrunken phenotype, while others were empty with the cytoplasm spilled (Fig. 3B,C). Aborted pollen grains were absent in the CI plant (Fig. 3A).

The microscopic analyses of the ovules revealed that, as opposed to the CI line (Fig. 3D), the GS lines showed a necrotic zone in the chalaza, the region where the nucellus, the integuments and the funiculus merge; accumulation of dense compounds, that could be tannins, was observed (Fig. 3E,F).

The sterility of the *L. japonicus* GS transgenic plants correlates with drastic alterations in their reproductive structures, both aborted pollen grains and dense compounds accumulation in the ovules.

GS₁ expression and amino acids content in flowers of GS lines

To determine if the alterations in the reproductive structures observed in the GS39 and GS44 lines (Fig. 3) might be due to a direct biochemical effect of the transgene during flower development and pollen and ovules formation, flower buds were assayed for GS₁ overexpression. The GS transcript abundance and enzyme activity were determined at three different stages of flower development. The flowers were categorized by gross morphological features: early buds, buds less than 5 mm in length; mid buds, petals exposed but unopened; and open flower, flower in anthesis. Total RNA was isolated from flowers of GS39, GS44 and CI plants at three

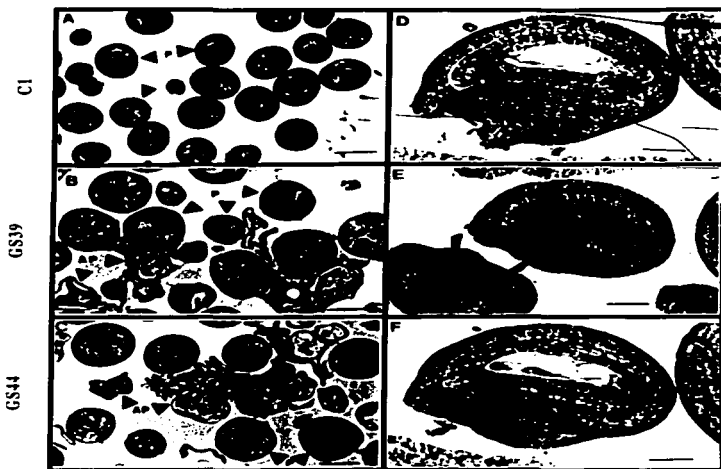


Fig. 3. Light microscopy examination of pollen grains and ovules. (A, B and C) Pollen grains in control and GS lines. Bar = 15.3 μm (A); 11.6 μm (B and C). P: normal pollen grain; AP: aborted pollen grain. (D, E and F) Ovules in control and GS lines. Bar = 44 μm (D); 90 μm (E); and 62 μm (F). Arrows indicate necrotic zones.

different stages of development and hybridized with alfalfa GS₁ cDNA probe. The endogenous GS₁ transcript in flowers from the control plant was more abundant in the early buds and it decreased in the mid buds

and open flowers (Fig. 4A). Flowers of GS39 and GS44 lines also showed more GS₁ transcript in the early buds than in the later stages of development. However, in all three developmental stages tested, the GS₁ transcript was

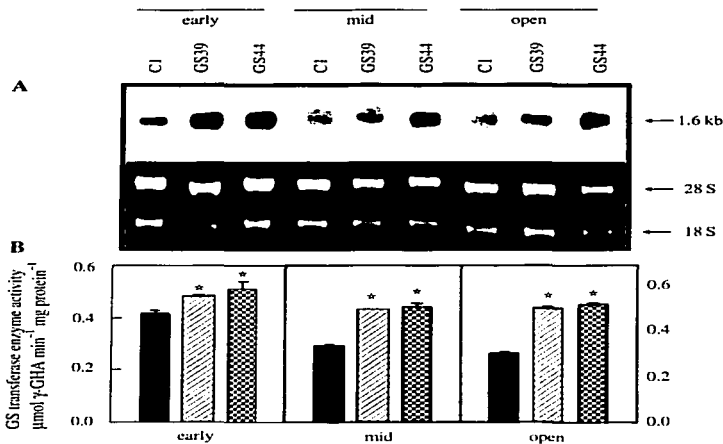


Fig. 4. Analysis of alfalfa GS₁ gene expression in flowers. (A) Northern-blot analysis of GS₁ mRNA. Total flower RNA (10 μg) from flowers at three different developmental stages (mid, early and open) from GS and control lines was hybridized with P1 (shown in Fig. 1A) and EtBr-stained 28S and 18S rRNA was used as loading control. (B) Flower specific activity of GS. Enzyme activity from flowers at three different developmental stages was determined using the transferase assay. Values are the mean \pm standard deviation from 10 measurements from three independent experiments. *Significant difference ($P = 0.05$).

Table 1. Glutamine and glutamate content in flowers.

Line	Glutamine $\mu\text{mol mg protein}^{-1}$	Glutamate	gln/glu
C1	0.041 (± 0.001)	0.0056 (± 0.0002)	7.22 (± 0.30)
GS39	0.039 (± 0.004)	0.0060 (± 0.0005)	9.95 (± 0.35)
GS44	0.048 (± 0.001)	0.0063 (± 0.0006)	7.42 (± 0.61)

Mean (\pm SD). Three to six measurements from flowers of three different plants from each line.

more abundant in flowers of the GS39 and GS44 lines compared to the C1 line (Fig. 4A). The overexpression of GS_1 during flower development correlated with the significantly higher enzyme activity detected in flowers of GS39 and GS44 plants compared to C1 (Fig. 4B). At the early stage of development flowers of GS₁ plants showed 113% to 141% GS specific activity, while at the late stage of development the activity was 121% in GS39 flowers and 156% in GS44 flowers, compared to control flowers (Fig. 4B). These results suggest that the alfalfa GS_1 transgene was expressed in the GS39 and GS44 flowers in addition to the endogenous *L. japonicus* GS_1 gene.

The glutamine and glutamate content was measured in open flowers of transgenic and control lines in order to determine if the GS overexpression resulted in increased glutamine synthesis and disturbed glutamine/glutamate ratio. Glutamine content was 20% to 40% higher in flowers of transgenic plants than in flowers of C1 plant, while glutamate content were not significantly different (Table 1). Consequently, a significantly higher gluta-

mine/glutamate ratio was observed in flowers of the GS39 and GS44 transgenic plants (Table 1).

In situ RT-PCR and immunolocalization experimental approaches were performed for further analysis of the GS_1 expression in the affected reproductive organs of flowers from the GS39 and GS44 lines (Figs 3 and 4). To analyse the expression of the transgene at the RNA level, RNA detection was performed by in situ RT-PCR using specific GS_1 gene internal primers and Alexa-Fluor 594-5-d-UTP. The experiment was carried out in anthesis flowers deprived of petals from GS39, GS44 and C1 plants. The yellow fluorescence of the ovule tissue sections revealed the presence of the GS_1 transcripts around the integument that delimit the embryonic sac and in the chalaza (Fig. 5A,B). The fluorescence signal observed was much more intense in the sections from the GS39 and GS44 flowers than in the C1 flowers (Fig. 5A,B).

GS_1 immunolocalization was also performed on sections of anthesis flowers deprived of petals. The signal that indicated the presence of GS_1 protein was visualized as an ochre precipitate in Fig. 5C, that shows sections from the ovules of the transgenic and control plants similar, though not identical, to those shown in Fig. 5B for RT-PCR. These observations indicated that GS_1 protein was primarily localized in the same ovule tissues where the RNA was detected: the integument that delimits the embryonic sac and in the chalaza, but also intense ochre precipitate can be observed in the central part of the ovule (Fig. 5C). The signals were much more intense in GS lines than in the control line (Fig. 5C).

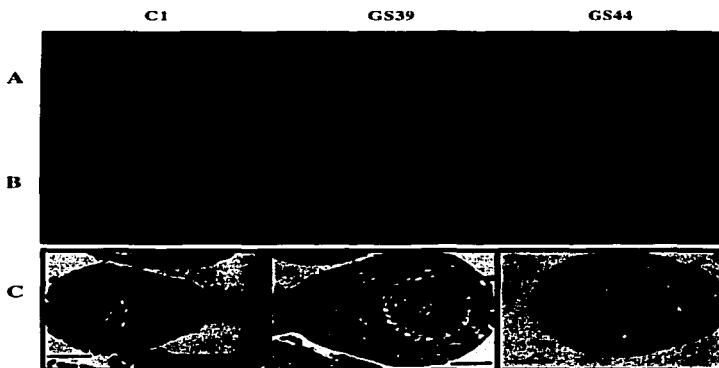


Fig. 5. In situ RT-PCR detection of GS_1 mRNA and GS_1 immunolocalization in flower tissues. (A and B) Confocal laser scanning microscope images taken after in situ RT-PCR from ovary sections with GS_1 specific primers. The square in A panels indicate the field shown in B panels, respectively. Bar = 250 μm (A) and 50 μm (B). Arrowheads indicate the highest yellow fluorescence signals of Alexa 594-dUTP (Molecular Probes) in GS lines. (C) Immunolocalization of GS_1 protein in ovules of control and GS lines. Sections were viewed through a light microscope and signals were visualized as ochre precipitate. Bars = 50 μm .

Immunofluorescent analysis using similar tissue sections from flowers of the GS and control plants gave similar results as those obtained using the above-mentioned immunolocalization approach (data not shown). The different control levels (transcriptional, translational and post-translational) that regulate plant GS₁ expression (Temple et al. 1993, 1998) may explain the difference in the strength of the RT-PCR versus immunolocalization signals that were observed in the ovules of the transgenic plants (Fig. 5B,C).

These results indicate that GS₁ was overexpressed in the female reproductive structures (ovules) of the GS transgenic lines. The GS₁ expression and disturbed glutamine/glutamate ratio correlates with the morphological alterations of these structures and with plant infertility.

Discussion

Due to the central role of GS in plant nitrogen metabolism, several groups have attempted GS₁ overexpression in transgenic plants to improve nitrogen use efficiency, and consequently to improve plant growth or crop production (Mifflin and Habash 2002). However, mixed results showing either positive or negative effects in plant growth, have been obtained. Recent reports revealed that the ectopic overexpression of GS₁ in transgenic tobacco resulted in improved plant growth (Fuentes et al. 2001, Oliveira et al. 2002). Fuentes et al. (2001) demonstrated that tobacco plants overexpressing the alfalfa GS₁ gene displayed a growth advantage when compared to control plants, and proposed that this was due to the ability of the transgenic plants to maintain normal photosynthetic rates under nitrogen limiting conditions. Oliveira et al. (2002) reported the positive effect of pea GS₁ overexpression in growth of transgenic tobacco that correlated with enhanced photorespiratory rates and increased reassimilation of photorespiratory ammonium. Research performed on cereals, such as wheat, and on trees, such as poplar, has also revealed positive effects on plants growth resulting from the overexpression of GS₁ (Gallardo et al. 1999, Habash et al. 2001). A transgenic wheat plant that overexpressed bean GS₁ from the *rbcS* promoter, showed increased root and grain dry matter as well as higher nitrogen content in the grains (Habash et al. 2001). Increased levels of soluble protein and chlorophyll content and of plant growth in height have been described for poplar transformed with GS₁ (Gallardo et al. 1999). *Lotus corniculatus* transgenic plants that constitutively overexpressed soybean GS₁ showed increases in biomass of shoots and roots (Vincent et al. 1997). By contrast, expression of the same gene behind a *Rold* promoter, which led to more GS₁ in roots of *L. japonicus*, decreased biomass production (Limami et al. 1999). The effect observed for *L. japonicus* is similar to that reported recently by Fei et al. (2002) for a transgenic pea plant with the same *Rold* promoter fused to soybean GS₁ gene that overexpressed GS₁ in

roots and showed lower biomass accumulation and total nitrogen content. However, the authors reported that another transgenic pea plant with similar GS₁ overexpression in roots did not have lower nitrogen or biomass (Fei et al. 2002). They suggested that the correlation between increased root GS activity and decreased biomass production requires further investigation (Fei et al. 2002). Studies have been performed using nodule-specific promoters to direct GS₁ overexpression to this organ. The work of Harrison et al. (2000) and this work, using *lb* promoters to overexpress GS₁ in *Lotus japonicus* nodules, showed deleterious plant phenotypes. *L. japonicus* plants that overexpressed GS₁ in the nodules had a severe decrease in biomass production and decreased concentration of amino acids (such as asparagine) in the nodules and roots but not in shoots (Harrison et al. 2000). The authors suggested that although nitrogen fixation was not affected, the upregulation of nodule GS activity had a detrimental effect on the overall nitrogen metabolism of the nodule, probably related to an inefficient competition between root and nodule GS's. Fei et al. (2002) reported the characterization of one transgenic pea plant with a *lb* promoter-GS₁ chimeric gene that showed only a minor increase in nodule GS₁ protein, but similar enzyme activity to control pea plants. Therefore, varying results were observed in *L. japonicus* and pea plants bearing a similar *lb* promoter-GS₁ chimeric gene (Harrison et al. 2000, Fei et al. 2002, this work).

The mixed results obtained do not allow general conclusions to be drawn on the effect of GS₁ overexpression in plants. The varying results from the different studies indicate that the expression of a GS₁ transgene may vary with the promoter or coding region used and/or with plant species. However, some of the results obtained are sufficiently encouraging to suggest that the manipulation of nitrogen via transformation is worthwhile (Mifflin and Habash 2002).

The experimental approach followed in this work, similar to the one summarized by Harrison et al. (2000), included the use of a *lb* promoter-GS₁ chimeric gene for the transformation of *L. japonicus* for directing GS₁ overexpression specifically to the nodules of transgenic plants. An alfalfa GS₁ gene (DasSarma et al. 1986) fused to the *g/b3* promoter from *S. rostrata* (Szabados et al. 1990), a stem-nodulated tropical legume, were used in this work. Similar to what Harrison et al. (2000) reported, various transgenic plants harbouring the *Srg/b3*-GS₁ transgene analysed showed approximately 2-fold increase of GS activity in the nodule. However, the most striking phenotype found was that all the transgenic GS primary transformants were sterile. All, but one, primary transformants did not form seeds and the only plant GS44 formed few abnormal seeds that did not develop into normal plants. Harrison et al. (2000) did not report about sterility in their transgenic plants. However, soybean *lb* promoter is naturally expressed in root nodules while *S. rostrata* *lb* promoter is naturally expressed in aerial shoot nodules. This could be a reason for a difference in their expression in flowers. Dasharath

et al. (2001) reported that when kanamycin or hygromycin were used as selective agent, up to 10–20% of the *L. japonicus* primary transformants obtained were sterile, probably due to somaclonally induced abnormalities. However, in the present work, all (100%) of the transgenic *Srglb3*-GS₁ plants analysed were sterile but neither of the control plants transformed with pBI121. Therefore, possible correlation of this phenotype with the overexpression of GS₁ in reproductive organs was hypothesized. Indeed, experimental evidence of the GS₁ overexpression in ovules, and the morphological alterations in pollen grains and ovules, was obtained and support this hypothesis.

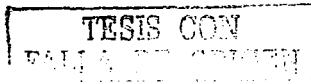
Both soybean *lbc3* and *S. rostrata glb3* promoters, have been extensively analysed through detailed deletion/substitution and site-specific mutagenesis. Similar to the soybean *lbc3* promoter (Stougaard et al. 1987, Ramlov et al. 1993), *Srglb3p* harbours an enhancer-like positive element, a positive element and the nodule/infected cell expression (NICE) element (Szabados et al. 1990, Szczyglowski et al. 1994, 1996). Although *Srglb3p* is considered a nodule-specific promoter, it can direct the expression of reporter genes in other plant organs both in legumes and non-legumes heterologous systems. In *L. corniculatus Srglb3p* was expressed in roots (Szczyglowski et al. 1994). In tobacco it was also expressed in roots, specifically in root meristems, its expression was also detected in stems and a background level of expression was detected in leaf tissue (Szabados et al. 1990, Szczyglowski et al. 1996). However, no information could be found on whether the expression of *Srglb3p* in flowers or in reproductive structures has been assayed and/or detected. The results shown in the present work indicate that although GS₁ was not overexpressed in roots or leaves, the *Srglb3p* can direct the expression of the alfalfa GS₁ transgene in *L. japonicus* flowers, a significant increase in GS activity was observed in flowers at early and late developmental stages. The enhanced level of GS₁ transcript and protein was observed in the ovules. The in situ RT-PCR approach could not be used to localize GS₁ in pollen grains due to the intense background fluorescence observed in control preparations. However, the analysis of the *Srglb3p* DNA sequence using the plant *cis*-acting element database: PLACE (www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/) revealed the presence of the AGAAA element previously characterized as required for pollen-specific gene transcription (Bate and Twell 1998). This element was found in 12 different sites, three times in the +DNA strand and nine times in the -DNA strand of *Srglb3p*. This computer analysis indicated that *Srglb3p* could be expressed in pollen grains. We propose that the overexpression of GS₁ in reproductive organs of *L. japonicus* leads to altered glutamine/glutamate ratios that may result in a negative metabolic effect for the development of pollen grains and ovules.

The analysis of alfalfa NADH-dependent GOGAT antisense plants (Schoenbeck et al. 2000) evidenced that the nodule-enhanced aspartate amino transferase

(AAT-2) gene promoter fused to the antisense GOGAT coding sequence was expressed in flowers. This work reports similar effect for the *lb* promoter naturally expressed in nodules. The antisense alfalfa plant analysed, with a decreased NADH-GOGAT activity in nodules and flowers, showed altered pollen grains and was male sterile, suggesting a critical role of this enzyme in reproductive development of alfalfa (Schoenbeck et al. 2000). It is conceivable that a decrease in NADH-GOGAT activity may result in a similar metabolic effect as that resulted from an increase in GS₁ activity: an increase in the glutamine/glutamate ratio, by reducing glutamate or increasing glutamine, respectively. The results obtained in this work supported this assumption; the transgenic plants that overexpressed GS₁ in the flowers showed higher glutamine content and increased glutamine/glutamate ratio.

The altered reproductive organs phenotype observed in the sterile transgenic plants that overexpressed GS₁ in the nodules and in the flowers, may be due to a similar metabolic effect to that reported previously for NADH-GOGAT antisense plants (Schoenbeck et al. 2000). In alfalfa the highest NADH-GOGAT gene expression and enzyme activity in flowers occurred at the early developmental stages, perhaps at a critical time in pollen formation (Schoenbeck et al. 2000). In rice, NADH-GOGAT activity increased in the apical spikelets during the first 15 days after flowering, subsequently the levels decline rapidly at the grain filling stage (Hayakawa et al. 1993). The authors suggest that in rice, NADH-GOGAT is responsible for the synthesis for glutamate from the glutamine that is transported from senescing tissues to the spikes. In *Arabidopsis*, flowers have high proline content that correlates with high expression of proline metabolic genes (Hua et al. 1997). In particular, pollen grains and ovules are known to be proline rich in *Arabidopsis* and other plant species. The authors suggest that flowers have higher proline turnover than other plant organs, which is consistent with the function of proline in providing energy and/or carbon and nitrogen sources for flower development. In plants, proline is synthesized from glutamine via two different metabolic routes (Hua et al. 1997). High concentrations of glutamate and of amino acids derived from it such as proline, may be required for adequate development of floral tissue, and metabolic lesions that reduce glutamate content in flowers, such as that reported in this work and by Schoenbeck et al. (2000), might affect flower development and consequently ovules or pollen formation.

Acknowledgements – This work was partially supported by grants 4822-N9406 and G31751-B from CONACYT and IN205595 from DGAPA-UNAM. R. Suárez was supported by a PhD scholarship from DGAPA-UNAM. We acknowledge the technical assistance of Elizabeth Córdoba, Sara I. Fuentes, Armando Contreras and Jesus Arellano, of Sandra Contreras and Yolanda Mora for determinations of amino acids content and of Xochitl Alvarado (Instituto de Biotecnología-UNAM) for providing the service of confocal microscopy. We are grateful to Jens Stougaard, Frans de Bruijn, Howard Goodman and Miguel Lara for providing biological materials used in this work and to Michael Dunn and Miguel Lara for critically reviewing the manuscript.



References

- Appleby CA (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann Rev Plant Physiol* 35: 443-478
- Bate N, Twell D (1998) Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* 37: 859-869
- 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: 248-254
- Broughton WJ, Dilworth M (1971) Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125: 1075-1080
- Dashurath LP, Schuller K, Buzas DM, Gresshoff PM, Stiller J (2001) Transformation of *Lotus japonicus* using herbicide resistance bar gene as selectable marker. *J Exp Bot* 52: 1697-1702
- DasSarma S, Tischer E, Goodman HM (1986) Plant glutamine synthetase complements a *glnA* mutation in *Escherichia coli*. *Science* 232: 1242-1244
- Fei H, Chailou S, Hirel B, Mahon JD, Vessey JK (2002) Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate. *Planta* in press. (Published online: 25. September 2002. <http://link.springer.de/link/service/Journals/00425/contents/first.htm>)
- Ferguson AR, Sims AP (1971) Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. *J Gen Microbiol* 69: 423-427
- Fuentes SI, Allen DJ, Ortiz-López A, Hernández G (2001) Overexpression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J Exp Bot* 52: 1071-1081
- Gallardo F, Fu J, Canton FR, García-Gutiérrez A, Canovas FM, Kirby EG (1999) Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* 210: 19-26
- Habash DZ, Massiah AJ, Rong HL, Wallsgrave RM, Leigh RA (2001) The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Ann Appl Biol* 138: 83-89
- Handberg K, Stougaard J (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J* 2: 487-496
- Harrison J, Brugiere N, Phillipson B, Ferrario-Mery S, Becker T, Limami A, Hirel B (2000) Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding: consequences to plant physiology and plant development. *Plant Soil* 221: 81-93
- Hayakawa T, Yamaya T, Mae T, Ojima K (1993) Changes in the content of two glutamate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening. *Plant Physiol* 101: 1257-1262
- Hua X-J, van de Coote B, Van Montagu M, Verbruggen N (1997) Developmental regulation of pyruvate-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 114: 1215-1224
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Luemmlé 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, Coruzzi GM (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 569-593
- Lea PJ (1997) Primary nitrogen metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (eds) *Plant Biochemistry*. Academic Press, UK, pp 273-306
- Lea PJ, Blackwell RD, Chen FL, Hecht U (1990) Enzymes of ammonia assimilation. In: Lea PJ (ed) *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 3. Academic Press, UK, pp 257-306
- Lea P, Mifflin BJ (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251: 614-616
- Limami A, Phillipson B, Ameziene R, Fernellet N, Jiang O, Roy R, Delcens E, Chaumont-Bonnet M, Gresshoff PM, Hirel B (1999) Does root glutamine synthetase control plant biomass production in *Lotus japonicus* L.? *Planta* 209: 495-502
- Mifflin BJ, Habash DZ (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot* 53: 979-987
- Oliveira IC, Brears T, Knight TJ, Clark A, Coruzzi GM (2002) Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light and photorespiration. *Plant Phys* 129: 1170-1180
- Ramlov KB, Laursen NB, Stougaard J, Marcker KA (1993) Site-directed mutagenesis of the organ-specific element in the soybean leghemoglobin *lbc3* gene promoter. *Plant J* 4: 577-580
- Schoenbeck MA, Temple SJ, Trepp GB, Blumenthal JM, Samac DA, Gantt JS, Hernández G, Vance CP (2000) Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa*) transformed with an antisense glutamate synthase transgene. *J Exp Bot* 51: 29-39
- Stougaard J, Sandal NN, Gron A, Kuhle A, Marcker KA (1987) 5' — Analysis of the soybean leghemoglobin *lbc3* gene: regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J* 6: 3565-3569
- Szabados L, Rattet P, Grunenberg B, de Bruijn F (1990) Functional analysis of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene 5'-upstream region in transgenic *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell* 2: 973-986
- Szczylowski K, Potter T, Stoltzfus J, Fujimoto SY, de Bruijn F (1996) Differential expression of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene promoter in transgenic legume and non-legume plants. *Plant Mol Biol* 31: 931-935
- Szczylowski K, Szabados L, Fujimoto SY, Silver D, de Bruijn F (1994) Site-specific mutagenesis of the nodule-infected cell expression (NICE) element and the AT-rich element ATRE-B52* of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* promoter. *Plant Cell* 6: 317-332
- Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C (1998) Downregulation of specific members of glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol Biol* 37: 535-547
- Temple SJ, Knight TJ, Unkefer PJ, 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
- Temple SJ, Sengupta-Gopalan C (1997) Manipulating amino acid biosynthesis. In: Foyer CH, Quick WP (eds) *A Molecular Approach to Primary Metabolism in Higher Plants*. Taylor & Francis, UK, pp 155-177
- Vincent B, Fraissier V, Chailou S, Limami MA, Delcens E, Phillipson B, Douat C, Boutin JP, Hirel B (1997) Overexpression of a soybean gene encoding glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* 201: 424-433



IV.1.1. Anexo 1. Figura 5 del artículo Suárez *et al* (2003)

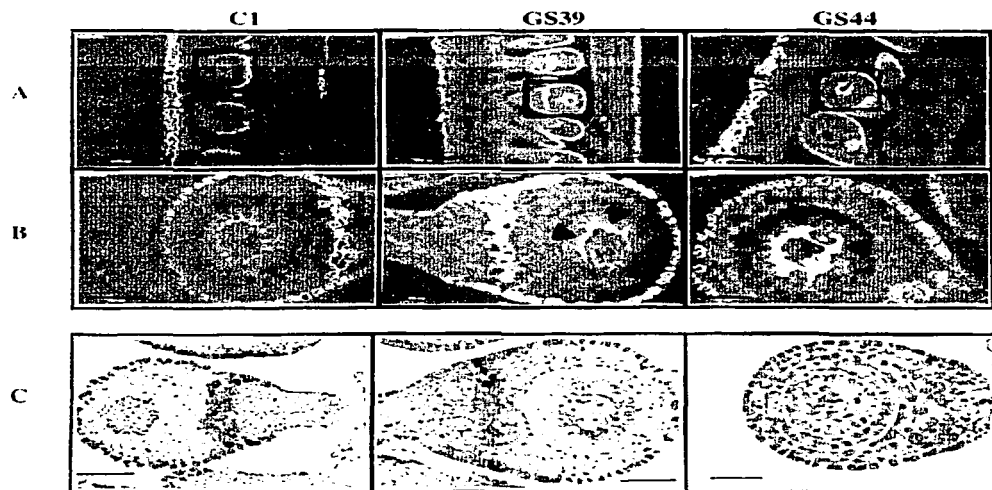


Fig. 5. Detección del mRNA de la GS₁ por RT-PCR *in situ* e inmunolocalización en tejidos florales. (**A** y **B**) Imágenes tomadas en microscopio confocal, después de la reacción de RT-PCR *in situ* en secciones de ovario, utilizando oligonucleótidos específicos de la GS₁. Los cuadros en el panel **A**, indican los campos mostrados en el panel **B**. El tamaño de las barras 250μm (**A**) y 50 μm (**B**). Las puntas de flecha indican las señales intensas de la fluorescencia del fluoróforo Alexa 594-dUTP (Molecular Probes) en las líneas GS. (**C**) Inmunolocalización de la proteína GS₁ en óvulos de las plantas control y GS, utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra ésta proteína. Las secciones fueron analizadas en un microscopio óptico con luz directa y las señales visualizadas como precipitados ocre, con un sistema de inmunodetección a base de estreptavidina-HRP y diaminobenzidina como sustrato (Suárez *et al.*, 2003).

IV.2. RESULTADOS NO INCLUIDOS EN LA PUBLICACIÓN

IV.2.1 Sobreexpresión de GS₁ en *Lotus japonicus*

Con el fin de demostrar que la expresión conferida por el promotor de leghemoglobina de *S. rostrata*, es una expresión específica de nódulo, se procedió a cuantificar la actividad de la GS por ensayo de transferasa en raíces y hojas de las plantas transgénicas de *L. japonicus*, obtenidas con el plásmido pRS6 para sobreexpresión, así como de las plantas control, obtenidas por la transformación con el plásmido pBI121 (Fig. 11). Además se determinó el fenotipo simbiótico de las plantas transgénicas, evaluando parámetros como: actividad de nitrogenasa, número de nódulos formados, proteína total de nódulos, peso seco de follaje (biomasa) y contenido de nitrógeno total en el follaje (Fig. 12 A, B, C, D, E y F).

a) Actividad específica de la GS en raíz y hoja

La actividad de la GS, también fue determinada en las raíces y las hojas de las plantas transgénicas GS39 y GS44 y comparadas con la planta control C1. La actividad de GS en la raíz de las plantas transgénicas, fue mucho menor que la actividad detectada en los nódulos y ésta fue similar a la actividad en las raíces de la planta control (C1). En las hojas tampoco existe diferencia en la actividad específica de la GS entre las plantas que sobreexpresan esta enzima y las control (Fig. 11).

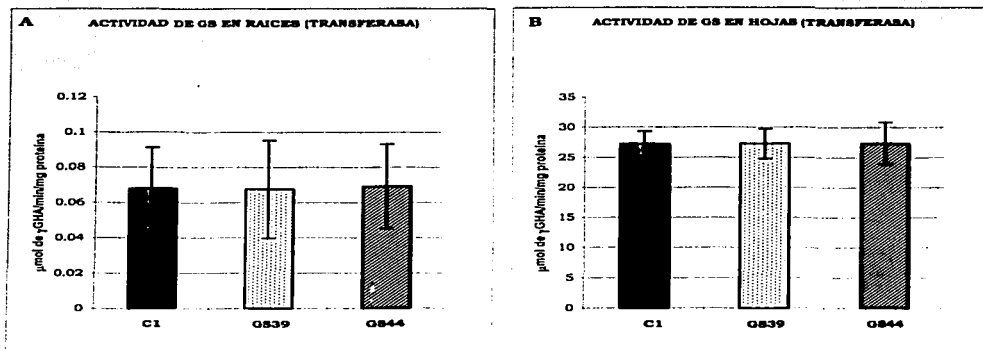


Fig.11. Actividad de GS, por ensayo de transferasa, en raíces (A) y hojas (B), de plantas transgénicas de *L. japonicus* GS39 y GS44 transformadas con el plásmido pRS6 y planta control (C1), transformada con el plásmido pBI121. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 mediciones de al menos 3 experimentos diferentes.

b) Determinación de parámetros simbióticos

Con el fin de determinar el fenotipo simbiótico de las líneas GS39 y GS44 que sobre-expresan la GS₁, estas fueron propagadas clonalmente y enraizadas para su nodulación con *M. loti*. Se determinaron parámetros tales como la actividad de nitrogenasa (Fig. 12A y 12B), el número de nódulos (Fig. 12C), la proteína total del nódulo (Fig. 12D), el peso fresco de follaje (Fig. 12E) y el contenido de nitrógeno en follaje (Fig. 12F). Los resultados obtenidos siempre fueron similares entre las plantas transgénicas y el control, es decir no existe diferencia significativa entre las plantas GS y el control. La única diferencia significativa se dió en el número de nódulos formados por planta (Fig. 12C), en donde la línea GS44 muestra el mayor número de nódulos formados, aunque este factor parecece no ser determinante para causar algún efecto fisiológico en la simbiosis.

TESIS CON
FALLA EN ENTREN

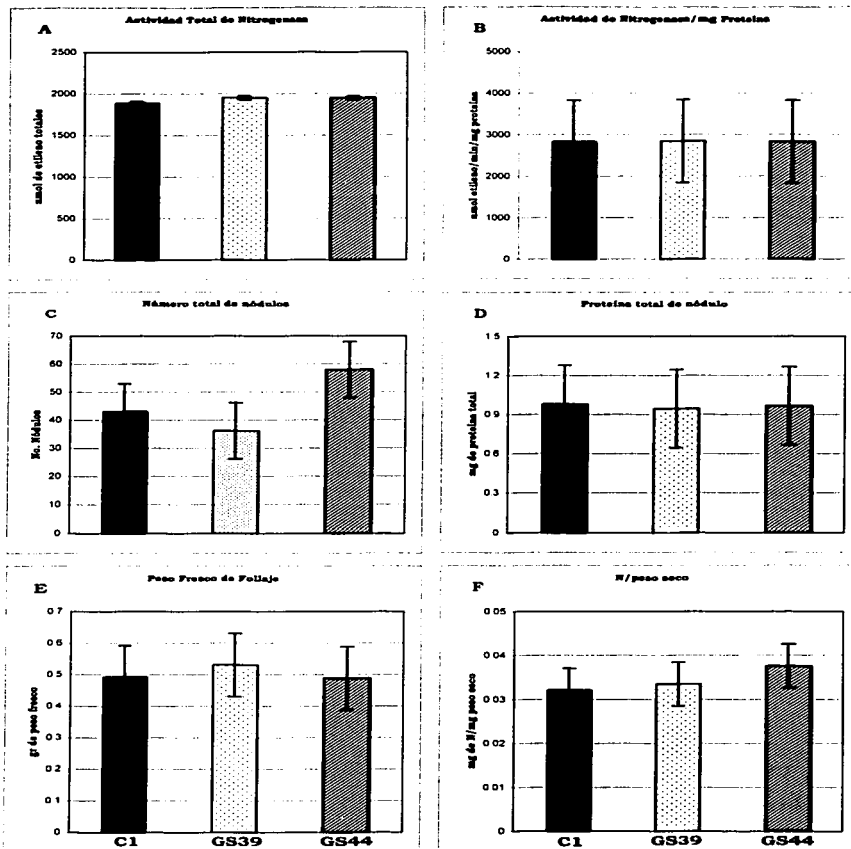


Fig. 12. Parámetros simbióticos evaluados en plantas transgénicas noduladas con *M. loti* a 21 dpi. **A.** actividad total de nitrogenasa, **B.** Actividad de nitrogenasa/mg de proteína, **C.** Número total de nódulos formados, **D.** Proteína total de nódulo, **E.** Peso fresco de follaje y **F.** Contenido de nitrógeno por mg de peso seco. Los valores representan la media y la desviación estándar de 10 mediciones de al menos 3 experimentos distintos.

c) RT-PCR en nódulos y flores de plantas transgénicas de *Lotus japonicus*

La expresión de un gen individual miembro de una familia multigénica, es en general difícil de estimar, dadas las similitudes en sus secuencias codificadoras. Los análisis tipo "Western", ensayos de protección contra la RNasa, así como el uso de fusiones entre genes reporteros a promotores específicos, son algunas de las herramientas utilizadas, para obtener información sobre la expresión de algún gen específico. El análisis por ensayos tipo "Northern blot", ha sido también ampliamente utilizado con este propósito, pero requiere relativamente de grandes cantidades de RNA, y no es la técnica más apropiada cuando se trata de transcritos de baja abundancia, además de que no se puede distinguir entre genes muy relacionados dentro de una familia multigénica. La técnica de la RT-PCR (transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa), nos permite estudiar la expresión tejido-específica y los patrones de expresión de isogenes, así como una semi-cuantificación (abundancia).

Utilizando la técnica de RT-PCR, se evaluó la expresión del gen de alfalfa GS1, introducido en plantas transgénicas de *L. japonicus*, y nos permitió además comparar entre las plantas GS y la control, si efectivamente se estaba sobreexpresando el transgene en flores y nódulos, como se propone en el reporte de Suárez *et al.* (2003).

A partir de 1 µg de RNA total purificado de flores en 3 etapas diferentes de desarrollo y de nódulos de 21 dpi, se llevaron a cabo los RT-PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados de la región codificadora de la GS₁ de alfalfa. Previo a la síntesis de cDNA, los RNAs fueron tratados con DNasa para eliminar el DNA contaminante de la muestra de RNA y obtener amplificación a partir de mRNA específicamente en la reacción del PCR. Las condiciones de PCR para la amplificación del producto de GS₁, fueron como sigue 20 ciclos: 94°C por 20 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 90 seg. Posteriormente los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%. La diferencia en la abundancia en el transcrito de la GS es clara, tanto en flores como en nódulos,, siempre mayor en las plantas GS, comparadas con las plantas control (C1). Para verificar que la cantidad de RNA era igual en todas las muestras, se utilizó un control de un gen endógeno de ubiquitina, la amplificación del cual fue igual en todas las muestras tanto transgénicas como las control en flores y nódulos (Fig. 13).

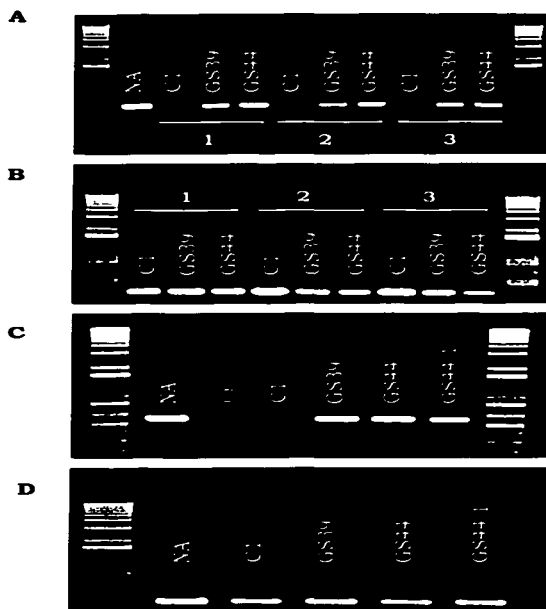


Fig. 13. RT-PCR en plantas transgénicas de *L. japonicus*: de flores (**A** y **B**) y nódulo (**C** y **D**) amplificando los mensajeros de GS (**A** y **C**) y Ubiquitina (**B** y **D**) en plantas transgénicas (**GS**) y control (**C1**). En **A** y **B**: **1**, **2** y **3** representan las 3 etapas de desarrollo en las que fueron realizados los experimentos. **1**, etapa de botón floral; **2**, etapa intermedia anterior a la antesis y **3** flor en antesis. **NA**, en **A**, **C** y **D**: nódulo de alfalfa.

TESTS CON
FALLA DE CROWN

IV.2.2. Transformación de *L. japonicus* con la fusión génica *Srg1b3p-uidA* (*gus*)

Los genes regulables en plantas, pueden ser inducibles, tejido específicos o ambos. Estos pueden responder a una gran variedad de estímulos ambientales, tales como la luz, el calor, estrés anaeróbico, heridas, estimuladores fungales, ritmos circadianos, hormonas, o señales de bacterias patógenas o simbióticas. Alternativamente, estos pueden ser activados en tejidos verdes, tubérculos, semillas, flores, granos de polen o en nódulos fijadores de nitrógeno inducidos por rhizobia. Los miembros de ambas categorías pueden estar sujetos a un proceso de control con base en el desarrollo (Schell *et al.*, 1988; Weising *et al.*, 1988; Benfey and Chua, 1989).

En nuestro intento por sobreexpresar una GS de una manera nódulo específica empleamos un promotor específico de este tejido, previamente caracterizado en el sistema heterólogo de *L. corniculatus* (Szabados *et al.*, 1990). Para nuestra sorpresa, encontramos que este promotor no solamente se expresa en nódulo, sino que también tiene preferencia por expresarse en tejidos florales (Suárez *et al.*, 2003).

El trabajo de Szabados *et al.* (1990), reporta que al fusionar el promotor nódulo-específico de leghemoglobina al gen reportero *uidA* (*gus*) e introducirlo por transformación genética en *L. corniculatus*, no se detectó actividad en tallos ni hojas y un bajo nivel de expresión en las raíces de las plantas transgénicas analizadas, pero no se hace mención sobre la expresión de este promotor en tejidos florales.

Por tal motivo y con el fin de validar los resultados reportados en nuestro trabajo de sobreexpresión de la GS, en *L. japonicus* (Suárez *et al.*, 2003), se llevó a cabo la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* (EHA105) con el plásmido pLK83E (Fig. 14) en este sistema modelo. El vector pLK83E, posee la región promotora del gen de leghemoglobina de *S. rostrata* de 1.9 Kb, fusionada al gen reportero de GUS (Fig. 14).

Plantas regeneradas a partir de hipocotilos infectados con *A. tumefaciens* EHA105, portando el plásmido pLK83E fueron obtenidas y analizadas para comprobar la presencia de los genes introducidos. Un total de 34 plantas, regeneradas de 5 callos distintos fueron analizadas por PCR, para lo cual se

extrajo DNA y la fusión génica *Srglb3p-GUS* fue amplificada por PCR, utilizando oligos específicos de estas dos regiones (Fig. 15).



Fig 14. Plásmido **pLK83E**, que porta la fusión génica del promotor de leghemoglobina de *S. rostrata* (**Srglb3p**) con el gen *uidA* (**β-GUS**) en el vector pLP17 derivado del pROK2275 que está basado en el vector binario pBIN19 (Bevan, 1984). **LB**, borde izquierdo; **RB**, borde derecho; **NOSp**, promotor de la Nopalino Sintasa; **NPT II**, Neomicina Fosfotransferasa II; **3'nos**, señal de poliadenilación de la Nopalino Sintasa;

De las 34 plantas analizadas por PCR, únicamente 4 plantas (pertenecientes a un mismo evento de transformación), no mostraron amplificación de la fusión génica. Las plantas positivas a la amplificación por PCR, fueron transferidas a macetas mantenidas en condiciones controladas de crecimiento (temperatura y luminosidad), hasta la floración. Flores en distintas etapas de desarrollo (al menos una planta de cada evento de transformación), así como algunas vainas, fueron incubadas en presencia de X-Gluc, para determinar histoquímicamente la actividad de GUS (Jefferson *et al.*, 1987).

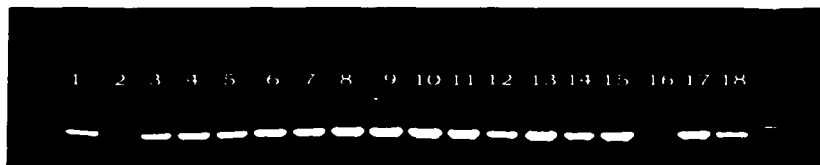


Fig. 15. Productos de PCR en donde se amplifica la fusión génica del promotor de leghemoglobina de *S. rostrata*-GUS de aproximadamente 1.3 Kb. **1** y **18** control positivo del plásmido pLK83E (100 ng), **2** planta transgénica transformada con el plásmido pBI121 (control negativo), **3** a **17** plantas transgénicas transformadas con el plásmido pLK83E, de los diferentes eventos de transformación. **M.** marcador de peso molecular 1 Kb

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El ensayo de GUS, realizado en flores de plantas de *L. japonicus*, transformadas con el plásmido pLK83E, confirman nuestra aseveración, de que el promotor de leghemoglobina de *S. rostrata*, tiene la capacidad de expresarse en flores de *L. japonicus*, lo que apoya definitivamente los datos previamente reportados de sobreexpresión de una GS; bajo la acción de este promotor de leghemoglobina en plantas transgénicas de esta misma especie (Fig. 16).

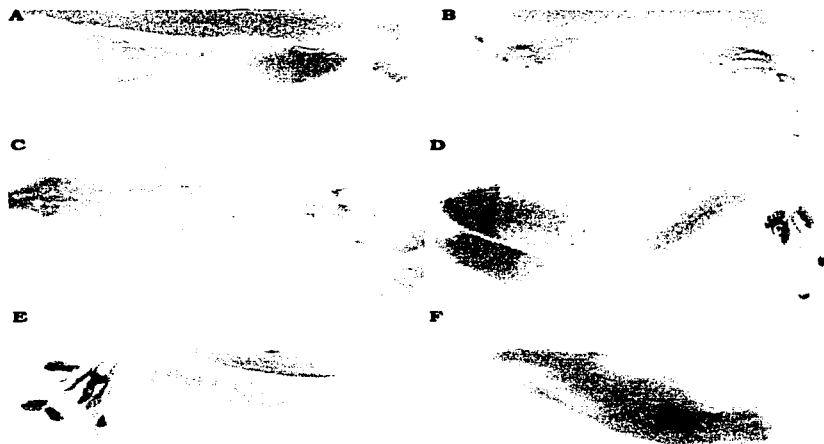


Fig. 16. Actividad de β -glucoronidasa (GUS) en estructuras florales de plantas transgénicas de *L. japonicus*, transformadas con la fusión génica *Srglb3p-gus*. **A, B y C** flores con pétalos en diferentes etapas de desarrollo; **D y E** flores en antesis sin pétalos y **F**, antera de una flor en antesis.

En la Fig. 16, se muestran los datos de la actividad de GUS en flores completas en diferentes etapas de desarrollo; es notoria la alta expresión del gen reportero en las anteras y también en la región basal y apical de los sépalos. Algunas vainas fueron ensayadas y también es clara la expresión de GUS en estas estructuras (datos no mostrados). De la misma manera se determinó la actividad de GUS en otros tejidos de raíz, hojas y tallos, confirmando y los resultados similares a los ya previamente reportados por Szabados *et al.* (1990).

Estos datos apoyan claramente que el promotor de leghemoglobina de *S. rostrata*, tiene la capacidad de expresarse en un órgano diferente al nódulo, tal como la flore, por lo que no debe ser considerado un promotor nódulo específico en el sentido estricto de la palabra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.2.3 Bombardeo de alfalfa

La transformación genética de plantas se ha convertido en una plataforma común de mejoramiento vegetal, así como también para el estudio de la función génica y la regulación de procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas. Se han desarrollado diferentes tecnologías para la transformación de la mayoría de los cultivos y se han tenido que vencer varios obstáculos antes de su aplicación. Las leguminosas de grano tales como la soya (*Glycine max*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*), *Vigna unguiculata* y *Vigna radiata*, así como las forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa*), son cultivos básicos en diferentes países, pero su proceso de transformación es todavía laborioso, el tiempo de obtención de plantas transgénicas es muy lento y poco eficiente.

Uno de los intereses del programa de investigación de Biología Molecular de Plantas del CIFN-UNAM es el de implementar y optimizar métodos de transformación en algunas especies de leguminosas, de interés agrícola como la alfalfa y el frijol. Una de las metodologías que se propuso probar para este propósito es la de bombardeo de DNA (Klein *et al.*, 1987), que se ha planteado como una alternativa para la transformación de especies "recalcitrantes" o no susceptibles de ser transformadas por el sistema tradicional de *Agrobacterium*. Esta etapa del trabajo consistió en evaluar sistemas de bombardeo en propulsión de partículas a base de gas helio en alfalfa y en frijol. Enseguida se muestran los resultados obtenidos de esta fase experimental.

Una etapa de este trabajo, consistió en establecer un sistema de transformación de diferentes variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L), de interés agrícola en México, para las cuales habíamos establecido sistemas de regeneración por cultivo de tejidos (Fuentes *et al.*, 1993).

Las variedades consideradas fueron Rangeland, Moapa 143 e Iroquois. El uso de la variedad Rangeland como un sistema ya fue descrito y es ampliamente utilizado por grupos de investigación en Estados Unidos (Bagga *et al.*, 1992); para los otros dos sistemas (Iroquois y Moapa), nuestro grupo estableció los sistemas de regeneración por embriogénesis somática (Fuentes *et al.*, 1993). Una ventaja adicional es que estas variedades mostraron las mejores frecuencias de regeneración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los experimentos iniciales de bombardeo, consistieron en la evaluación de dos sistemas: PDS 1000He= Particle Delivery System y PIG= Particle Inflow Gun; el primero es un sistema comercial de Du Pont y el segundo un aparato diseñado y construido en la Universidad de Tennessee (Fig.17A y B) (Bond *et al.*, 1992). En cada uno de ellos se evaluaron los diferentes tamaños de partículas (M-5 y M-10) con condiciones constantes de distancia de recorrido de las partículas hacia la zona de impacto (PDS= 5 cm, PIG= 15 cm) y presión (PDS= 800 psi, PIG= 80 psi). Esta fase del experimento se realizó en el CINVESTAV-Irapuato en el Laboratorio del Dr. Luis Herrera Estrella, en donde contaban con ambos sistemas de bombardeo y la infraestructura necesaria para los estudios preliminares.



Fig 17. Sistemas de bombardeo. **A.** sistema de alta presión (**PDS**= Particle Delivery System). **B.** Sistema de baja presión (**PIG**= Particle Inflow Gun)

Se utilizaron hojas de alfalfa (trifoliadas), provenientes de plantas cultivadas en invernadero, que antes del bombardeo fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% por 5 min y se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril e incubadas en medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962). Todos los DNAs de plásmido que se utilizaron en los experimentos de

bombardeo fueron purificados por gradiente en Cloruro de Cesio (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA fue precipitado sobre las partículas de tungsteno utilizando CaCl_2 2.5M y espermidina 0.1M de acuerdo a Klein y cols. (1988). Después del bombardeo, los tejidos fueron cultivados en una cámara de crecimiento a 25°C (fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad). Este período posbombardeo permite la expresión del DNA transferido.

Dos días después del bombardeo, los tejidos fueron ensayados para determinar la actividad de β -glucuronidasa (GUS), mediante la incubación de los tejidos en X-Gluc (ácido 5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D glucorónico) por 12 h a 37°C (Jefferson, 1987). Los tejidos fueron clarificados con una solución de acetona-metanol (1:3) y conservados en glicerol 50%. La expresión génica transitoria, visualizada como puntos o zonas azules, fue examinada y cuantificada bajo microscopio estereoscópico (Fig.18).

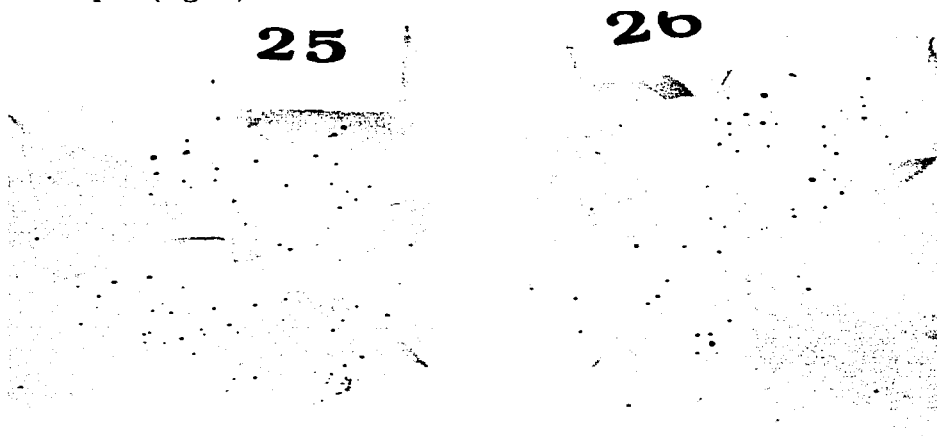


Fig 18. Visualización de la actividad transitoria de GUS en hojas de alfalfa bombardeados con el sistema de alta presión PDS 1000He, utilizando partículas M-5 acopladas al plásmido pBI426.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

El plásmido utilizado en este experimento fue el pBI426 (Fig. 19), cuya característica principal es que posee el gene de GUS, fusionado a un promotor doble 35S lo que le confiere una capacidad mayor de expresión de este gen, en comparación a los vectores que posee un promotor sencillo.

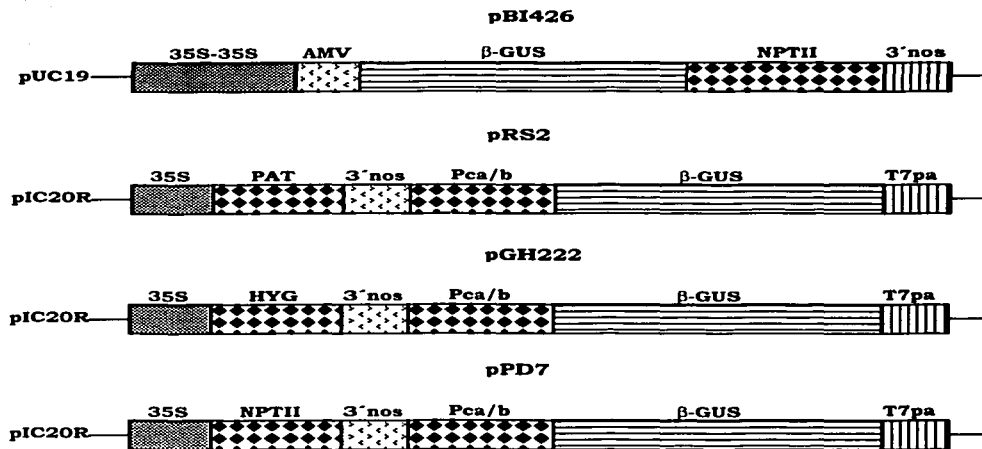


Fig 19. Plásmidos utilizados en los experimentos de bombardeo. **35S-35S**, promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor; **AMV**, aumentador transcripcional del virus del mosaico de la alfalfa; **β-GUS**, β-glucuronidasa; **NPTII**, Nemocina Fosfotransferasa; **3'nos**, terminador de la Nopalina Sintetasa; **35S**, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; **PAT**, Fosfinotricina Acetiltransferasa; **Pca/b**, promotor de clorofila a/b; **T7pa**, señal de poliadenilación (terminador) del virus T7; **HYG**, gene que confiere resistencia a higromicina.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación entre los sistemas PDS 1000He y PIG, utilizando 2 tamaños de partícula			
PIG		PDS	
M-5	M-10	M-5	M-10
1.9	2.5	135	79

Los números indican puntos de expresión de GUS/foliolo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De estos resultados, se concluye que de los dos sistemas de transformación por bombardeo empleados, el de alta presión resultó ser el mejor sistema basándose en los análisis de expresión transitoria del gen reportero de GUS. De los dos tamaños de partícula empleados: M-5 y M-10, M-5 es mejor en combinación con el sistema de alta presión (Tabla 2).

Debido a que en el laboratorio, se contaba con el sistema de transformación de baja presión (PIG), se procedió a optimizar las condiciones de bombardeo de hojas. Para esto se tuvieron que evaluar diferentes parámetros y condiciones, mismos que se describen enseguida:

a) Bombardeo de hojas de alfalfa

La primera etapa consistió en bombardear hojas de alfalfa de la variedad Ranglander, previamente reportada como una variedad con capacidad altamente regenerativa (Bagga *et al.*, 1992). Se utilizó el plásmido pBI426 (Fig. 13), dos presiones distintas (80 y 120 psi) y diferentes distancias de recorrido de las partículas a la zona de impacto (3.0, 10.5 y 20.5 cm). Se colocaron 6 folíolos de alfalfa en el centro de una caja petri, con el medio basal MS y se efectuaron 2 repeticiones en cada condición de bombardeo. Los folíolos fueron incubados en una solución del sustrato X-Gluc durante 12 h a 37°C, después de 48 h de haber sido bombardeados. Posteriormente, los folíolos fueron incubados en una mezcla de acetona-metanol (1:3), para eliminar la clorofila y visualizar los puntos de expresión transitoria del gen de GUS.

Los resultados obtenidos de este experimento son mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación entre la presión y diferentes distancias de bombardeo con la pistola de Baja Presión (PIG), el plásmido pBI426 y partícula M-5.

Distancia	80 psi	Distancia	120 psi
3.0 cm	5.0	3.0 cm	20.6
10.5 cm	2.0	10.5 cm	32.0
20.5 cm	1.0	20.5 cm	2.8

Los resultados están expresados en puntos de expresión transitoria/folíolo bombardeado

De los resultados obtenidos, se concluye que la presión de 120 psi y la distancia de 10.5 cm de recorrido de las micropartículas, son las mejores condiciones en cuanto a expresión de GUS (Tabla 3).

TESIS CON
FALLA DE COTEN

Una vez establecidas las condiciones para el bombardeo, se procedió a bombardear hojas para someterlas al proceso de regeneración y tratar de obtener plantas transformadas de manera estable. Las condiciones de bombardeo fueron: 120 psi de presión, 10.5 cm de distancia, partícula M-5, plásmidos pGH222, pPD7 y pRS2 (Fig. 19). Uno de nuestros objetivos era determinar como afectaría la selección el proceso de regeneración por lo que se decidió emplear 3 plásmidos con genes para resistencia a diferentes agentes selectivos (Fig. 19): pGH222 para selección con higromicina, pPD7 para selección con kanamicina y pRS2 para regenerar en ausencia de selección y una vez las plantas regeneradas, seleccionar las transgénicas, mediante la aplicación vía foliar del herbicida Basta o Bialaphos, al cual confiere resistencia el gen *pat*, clonado en este plásmido. Se bombardearon 10 cajas con 6 foliolos cada una por cada plásmido empleado. Se utilizaron 2 cajas (12 foliolos) para determinar actividad transitoria de GUS (48 h posteriores al bombardeo) y el resto se mantuvieron en medio de cultivo TM1 para el proceso de regeneración (Bagga *et al.*, 1992). Los resultados fueron: una clara expresión transitoria de GUS a las 24 h, pero una escasa respuesta callogénica de los tejidos bombardeados aún en ausencia de selección (Fig. 20).



Fig. 20. Respuesta a la callogénesis en foliolos de alfalfa bombardeados con los diferentes plásmidos, 120 psi de presión, 10.5 cm de recorrido de las partículas y tamaño de partícula M-5. Se observa una pobre respuesta callogénica, así como una necrosis celular en algunos sitios en donde iniciaba la respuesta a la callogénesis

Con estos resultados, concluimos que el tejido de hoja como explante para bombardeo, no resultó ser el idóneo, ya que no hay callogénesis y no es posible regenerar plantas vía embriogénesis somática.

b) Bombardeo de callos de alfalfa

Con base en los datos negativos obtenidos al bombardear hojas de alfalfa, se procedió a establecer las condiciones óptimas de bombardeo, utilizando callos como tejido blanco. Para ésto se utilizaron callos de 2 semanas en medio para inducir callogénesis (TM1) (Bagga *et al.*, 1992), los cuales fueron sometidos a bombardeo, evaluando 4 distancias (10.5, 15.5 y 20.5 cm), 2 presiones (80 y 120 psi), utilizando el plásmido pBI426 y 2 tamaños de partícula (M-5 y M-10). Se efectuaron 2 repeticiones por cada condición. En el desarrollo del experimento se observó que los callos explotaban en la distancia de 10.5 cm, por esto se optó únicamente por evaluar las otras 2 distancias (15.5 y 20.5 cm). Se determinó la actividad histoquímica de GUS 48 hrs posteriores al bombardeo. La evaluación de este experimento únicamente estuvo basado en la visualización directa de zonas con actividad de GUS en los callos bombardeados (Fig. 21). Los datos indican que la mejor distancia para bombardear fue de 15.5 cm, utilizando M-10 como tamaño de partícula, a una presión de 120 psi.

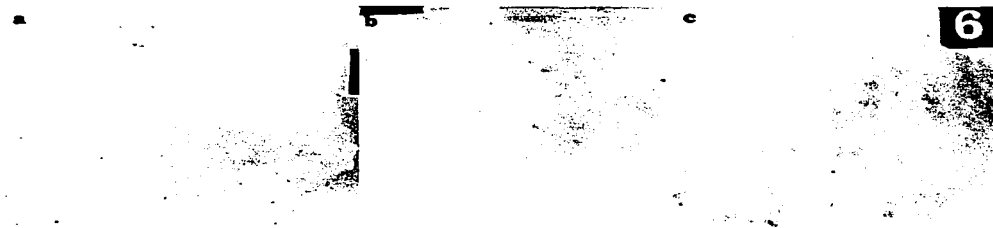


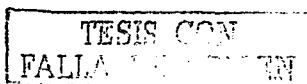
Fig 21. Expresión de β -GUS en callos de alfalfa. **a.** Callo bombardeado con partículas sin DNA (control negativo); **b.** callo de alfalfa bombardeado con el plásmido pBI426 y tamaño de partícula M-5; **c.** callo de alfalfa bombardeado con el plásmido pBI426 y tamaño de partícula M-10.

Con el fin de obtener plantas transgénicas de alfalfa mediante bombardeo, se procedió a bombardear mediante esta técnica callos de diferentes variedades de

alfalfa (Tabla 4), con las condiciones previamente establecidas (120 psi de presión, 15.5 cm de distancia y tamaño de partícula M-10) y utilizando diferentes plásmidos (pRS2, pGH222 y pPD7) (Fig. 19).

Tabla 4. Callos de alfalfa bombardeados para cada variedad con diferentes plásmidos		
Variedad	Plásmido	Callos Bombardeados
Moapa 143	pGH222	29
	pRS2	26
	pPD7	27
Iroquois 56	pGH222	10
	pRS2	11
	pPD7	10
Iroquois 54	pGH222	6
	pRS2	6
	pPD7	5
Rangelander	pGH222	6
	pRS2	5
	pPD7	4
Una semana posterior al bombardeo, los callos bombardeados con los plásmidos pGH222 y pPD7, fueron sometidos a proceso de selección, utilizando higromicina (20 mg/l) y kanamicina (50 mg/l) respectivamente. Los callos bombardeados con el plásmido pRS2, fueron cultivados en ausencia de selección.		

Todos los callos bombardeados fueron sometidos a los protocolos propios de cultivo de tejidos para la regeneración de las posibles plantas transgénicas. El protocolo general de regeneración de plantas de alfalfa, consiste en inducir un callo a partir de un tejido vegetal (embrionario o adulto), que puede ser raíz, hojas, peciolo, hipocotilo o cotiledones y de los callos originados de estos tejidos, inducir mediante reguladores de crecimiento vegetales (auxinas/citocininas) la formación de embriones somáticos (semejantes a un embrión cigótico, pero que no son producto de la fecundación); dichos embriones son separados del callo, y en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento inducir la germinación y la obtención de plantas regeneradas (Bagga *et al.*, 1992; Fuentes *et al.*, 1993).



En la tabla 5, se muestran el número de plantas regeneradas a partir de los callos bombardeados con los diferentes plásmidos.

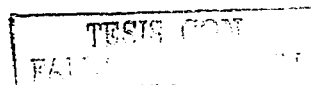
Tabla 5. Plantas regeneradas a partir de los callos bombardeados con los diferentes plásmidos

Variedad	pGH222	PRS2	PPD7
Moapa 143	0	74	4
Iroquois 56	0	70	19
Iroquois 54	0	2	0
Rangelander	0	18	15

A partir de los callos bombardeados con el plásmido pGH222, cuyo proceso de regeneración se llevó a cabo en presencia del agente de selección higromicina, no regeneraron planta alguna. Este agente selectivo es demasiado agresivo para los callos de alfalfa, además de que es muy probable que no se haya dado una inserción y expresión eficiente de los transgenes. Con los plásmidos restantes, se regeneraron un total de 163 plantas con el plásmido pRS2 (ausencia de selección) y 38 plantas con el plásmido pPD7 (en presencia de kanamicina). Las plantas regeneradas aparecieron en un tiempo de entre 6 y 8 semanas posteriores al bombardeo y se mantuvieron en cajas magenta con medios de cultivo específicos (Bagga *et al.*, 1992; Fuentes *et al.*, 1993) hasta adquirir una tamaño considerable (1 a 2 semanas), para posteriormente ser transferidas a macetas, primero manteniéndolas en cámaras de cultivo y finalmente fueron transferidas a condiciones de invernadero.

De estos resultados concluimos que fue posible la obtención de plantas de alfalfa, regeneradas a partir de callos bombardeados con los plásmidos pRS2 (sin selección) y pPD7 (con selección).

Para corroborar la integración de los genes introducidos por bombardeo, se extrajo DNA genómico con un kit comercial (Gentra Puregene System) de plantas adultas, mantenidas en macetas en condiciones de invernadero, de cada una de las líneas obtenidas con los distintos plásmidos. Se amplificaron los genes de GUS y NPTII, por PCR (Fig. 22 A y B) y se hibridaron los productos de PCR contra sondas específicas marcadas radiactivamente (Fig. 22 C y D). Dichas sondas



fueron obtenidas a partir de productos de PCR utilizando como DNA templado, el plásmido pBI426 (Fig. 19).

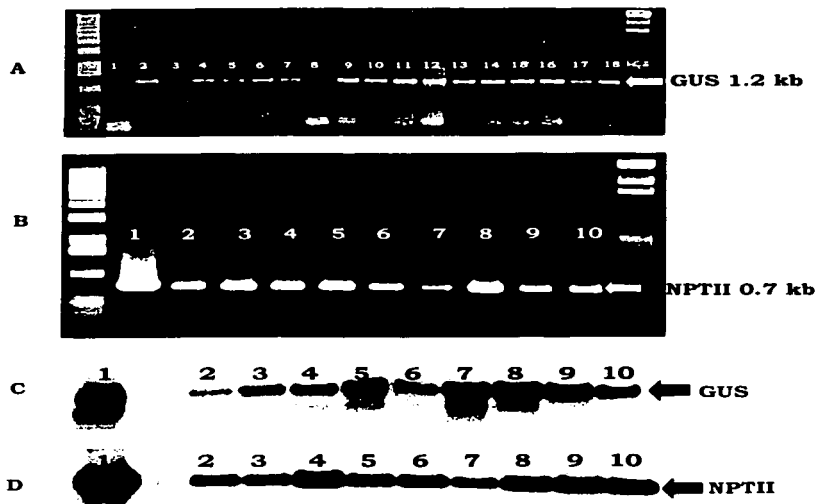


Fig. 22. Análisis molecular de las plantas de alfalfa regeneradas a partir de callos bombardeados con el plásmido pPD7. **A** y **B** productos de PCR, **C** y **D**, productos de PCR hibridados con sondas específicas de GUS (**C**) y NPTII (**D**) marcadas radiactivamente. **A:** 1, planta no transformada; 2, control positivo plásmido pPD7 (GUS); 3 al 18 plantas regeneradas después del bombardeo con el plásmido pPD7. **B:** 1 control positivo pPD7 (NPTII); 2 al 10 plantas regeneradas a partir de callos bombardeados con el plásmido pPD7. **C:** 1, control positivo del plásmido pPD7; 2 al 10 plantas regeneradas después del bombardeo. **D:** 1, control positivo del plásmido pPD7; 2 al 10 plantas regeneradas después del bombardeo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El número de plantas transformadas obtenidas con los diferentes plásmidos, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Plantas transgénicas obtenidas mediante bombardeo de DNA		
Variedad	Plásmido	
	ppD7 (<i>gus-npt II</i> positivas)	pRS2 (<i>gus</i> positivas)
Moapa 143	2 (50 %)	8 (11 %)
Iroquois 56	1 (5 %)	6 (9 %)
Rangelander	6 (40 %)	6 (33 %)
La presencia de los transgenes fue confirmada por PCR y ensayos tipos southern y slot blot.		

A partir de los datos obtenidos del bombardeo de callos de alfalfa con diferentes plásmidos, podemos concluir que en ausencia de agente selectivo, los porcentajes de regeneración se elevan considerablemente, pero los de transformación disminuyen; contrariamente a lo que sucede si se utiliza antibiótico en el proceso de regeneración, como la kanamicina en este caso. Se corroboró la presencia de los genes introducidos mediante amplificación de los mismos por PCR.

IV.2.4. Bombardeo de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa)

Uno de los principales intereses de nuestro grupo, es montar sistemas eficientes de transformación en frijol dada la importancia de este cultivo desde el punto de vista alimenticio a nivel mundial. En un intento por tratar de implementar un sistema de transformación basado en la técnica de bombardeo, se procedió a montar las condiciones físicas para esta especie y tipo de tejido. Los reportes sobre regeneración de frijol, basados en sistemas de brotación múltiple a partir de meristemas apicales de embriones cigóticos eran los únicos conocidos. Por esto, obteniendo estos tejidos de semillas de frijol variedad Negro Jamapa, se evaluaron diferentes distancias de recorrido de partículas, utilizando 120 psi de presión, partículas M-10 y el plásmido pRS8 (Fig. 23B), un derivado del pBI426.

TESIS CON
FALLA EN EL PROCESO



B



Fig 23. A: Actividad transitoria de β -GUS en meristemos apicales de frijol bombardeados con el plásmido pRS8 (**B**). **B:** plásmido pRS8 empleado en el bombardeo de meristemos apicales de frijol, **pSrLbc3**, promotor de leghemoglobina de *Sesbania rostrata*; **GSr**, cDNA de la GS de alfalfa; **35S-35S**, promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor; **β -GUS**, β -glucuronidasa; **NPTII**, Neomicina Fosfotransferasa

Los ensayos de estandarización fueron satisfactorios y muy alentadores para trabajos posteriores. En meristemos apicales bombardeados, se llegaron a contabilizar hasta 296 puntos de actividad transitoria de GUS a los 8 días posteriores al bombardeo a 5.5 cm de distancia en un grupo de 10 meristemos bombardeados (Fig. 23A). En los diferentes experimentos se promediaron datos de 25 puntos por meristemo, aunque también había tejidos con 50 y hasta 70 puntos, pero sin una relación directa entre el número de puntos y la distancia del bombardeo. Varios de estos embriones bombardeados del mismo experimento en donde se evaluó la actividad de GUS fueron llevados hasta la regeneración obteniendo algunas plantas completas, en las que se determinó nuevamente la actividad de GUS, pero con resultados negativos. Esto se debió posiblemente a que los meristemos de los cuales se regeneraron las plantas, pudieron no haber recibido partículas con DNA o que este DNA no se integró al genoma.

TESIS CON
FALLA EN EL
EXAMEN

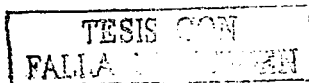
Con los experimentos de transformación mediante el bombardeo de micropartículas, el objetivo principal era el de establecer un sistema eficiente de transformación de alfalfa.

Con base en el reporte de Bond *et al.* (1992), se logró establecer las condiciones que resultaron en la transformación de mayor número de células de hojas de alfalfa, determinado por la expresión transitoria de GUS, que es el gen reportero presente en el plásmido pBI426 usado para transformación (Fig. 19).

Los datos obtenidos en esta fase experimental, no fueron similares a los reportados por Bond *et al.* (1992) en donde obtienen entre 500 y 2000 puntos de expresión transitoria de GUS en hojas de tabaco y *Vigna*, respectivamente, utilizando el sistema de bombardeo de baja presión (PIG). Nosotros obtuvimos resultados comparables, pero utilizando el sistema de alta presión (PDS 1000He) (Fig 17A). Finalmente, se descartó el bombardeo de explantes de hojas para regenerar plantas transgénicas, pues al someter estos tejidos bombardeados al proceso de regeneración, la respuesta callogénica de este tejido fue nula, es decir no hubo formación de callo por la necrosis del tejido en la semana posterior al bombardeo.

Se optimizaron las condiciones para bombardear callos de alfalfa, ya que el proceso de regeneración por embriogénesis somática de esta especie, previamente descrito para algunas variedades en nuestro grupo (Fuentes *et al.*, 1993), consiste en inducir un callo a partir de diferentes tejidos embrionarios o adultos en donde posteriormente se llevará a cabo la formación de embriones somáticos que al germinar darán origen a una planta regenerada. Solo existe un reporte de transformación estable de alfalfa por bombardeo de partículas en callos originados de peciolo y secciones de tallo, pero con una baja frecuencia de plantas transformadas: de un total de 2035 explantes bombardeados solo 7 plantas fueron regeneradas y las 7 pertenecientes al mismo evento de transformación (Pereira and Erickson, 1995).

En este trabajo, se presentan las evidencias que indican que es posible la regeneración de plantas después de bombardear callos con las distintas construcciones empleadas en el estudio. Se regeneraron más plantas en ausencia de selección (164 plantas), en comparación con las sólo 38 plantas regeneradas en presencia de kanamicina.



Se determinó la presencia de los genes introducidos (transgenes) por PCR, *uidA* y *npt II*, presentes en 9 (23.6 %) de 38 plantas regeneradas en kanamicina y en 20 (12%) de 164 plantas regeneradas sin agente de selección.

Al realizar un análisis tipo "Southern blot" a partir de DNA genómico digerido con al menos 2 enzimas diferentes, no fue posible determinar el número de copias insertadas de los transgenes, debido a que nunca se pudo detectar señal alguna de hibridación entre la sonda marcada y el DNA de la membrana. Una de las posibles causas de esto puede ser que las plantas transgénicas regeneradas sean plantas quimeras, es decir, plantas que poseen células transformadas y no transformadas, pero además que el porcentaje de células transformadas sea muy bajo en estas plantas, por lo que los genes insertados solo pueden ser detectados por métodos más sensibles como PCR.

En conclusión hemos demostrado que es posible obtener plantas transgénicas mediante el bombardeo de DNA, pero es necesario una considerable optimización en el proceso de selección de las células transformadas con el fin de evitar la generación de plantas transgénicas quiméricas. Los sistemas de regeneración empleados en los diferentes reportes de transformación estable de leguminosas por bombardeo, involucran la utilización de medios líquidos de cultivo para disgregar y seleccionar las células individuales transformadas. A partir de estas células pueden generarse los embriones somáticos, lo que asegura que las plantas regeneradas provengan de una célula única transformada (Pereira y Erickson, 1995; Hadi *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001; El-Shemy *et al.*, 2002).

La aplicación de medios líquidos con el fin de disgregar los callos y facilitar con esto el trabajo del agente de selección, coloca a estas variedades de alfalfa como excelentes candidatos para la transformación por bombardeo, ya que esta técnica está considerada ser menos dependiente del genotipo (Christou, 1992). Esto hace de éste método una alternativa de transformación genética para especies vegetales recalcitrantes a la infección y transformación por *A. tumefaciens*.

Una de las especies de mayor interés por su importancia agrícola y alimenticia, es el frijol común (*P. vulgaris*), por lo que en la actualidad diferentes grupos de investigación en el mundo (incluyendo el CIFN-UNAM), están interesados en el establecimiento de un sistema de regeneración y transformación genética para esta especie. Basados en los reportes de Aragao *et al.* (1993) y Russell *et al.*

(1993), de estudios de expresión transitoria y transformación genética de *P. vulgaris*, mediada por bombardeo de DNA respectivamente, se establecieron las condiciones óptimas de bombardeo basadas en la expresión transitoria del gen de *uidA*, del plásmido pRS8 (Fig. 23A y B). La visualización de cerca de 300 puntos de expresión transitoria de GUS en embriones cigóticos de frijol (Fig. 23A), abre la posibilidad de proponer este sistema como una alternativa de transformación genética, dados los problemas existentes con el sistema mediado por *Agrobacterium*.

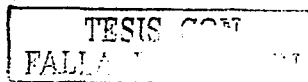
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. DISCUSIÓN

La fase experimental y central de este trabajo, consistió en transformar la leguminosa modelo *L. japonicus* (sistema heterólogo), con un gen GS₁ de alfalfa, con el fin de sobreexpresar esta enzima específicamente en el nódulo, mediante un promotor nódulo específico correspondiente al promotor de la leghemoglobina de *S. rostrata* (*Srglb3*), como una contribución para tratar de determinar el papel de esta enzima en la asimilación de amonio durante la simbiosis.

Mediante el uso de un promotor tejido-específico de nódulo y la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, se obtuvieron 189 plantas regeneradas en un medio con selección a base de kanamicina, la caracterización inicial consistió en realizar el ensayo histiquímico de GUS y el análisis por PCR, para determinar la presencia de los transgenes (*npt II*, *Srglb3p-GS*, *gus*). Este análisis inicial arrojó un total de 42 plantas transgénicas que portaban completo el T-DNA insertado en su genoma. Estas 42 plantas crecieron de manera normal en condiciones no simbióticas, desarrollaron flores normalmente, pero nunca generaron semillas. En un intento por corregir este fenotipo de infertilidad se intentó realizar polinización manual, utilizando polen de plantas control transformadas con el plásmido pBI121 y que sí producen semillas de manera normal, así como de plantas tipo silvestre (no transformadas), pero nunca se pudo revertir este defecto.

El análisis posterior consistió en cuantificar la actividad de GS en nódulo por el ensayo de transferasa, para determinar que líneas transgénicas mostraban un fenotipo de sobreexpresión. Catorce plantas mostraron un incremento de hasta dos veces en la actividad de GS, comparadas con las plantas control (C1) (Suárez *et al.*, 2003). El análisis por "Southern-blot", para estimar el número de copias insertadas del T-DNA, demostró que estas 14 plantas pertenecen a dos eventos de transformación, por lo que se decidió estudiar una línea correspondiente a cada evento, mismas que fueron denominadas líneas GS (GS39 y GS44), y que fueron comparadas con una planta control (C1), transformada con el plásmido pBI121. Los datos de sobreexpresión, son acordes a los reportados por Harrison *et al.* (2000) en donde utilizando una estrategia similar de sobreexpresión, pero utilizando el promotor nódulo específico de leghemoglobina de soja (*LBC3*) fusionado a una GS citosólica de soja (*GS15*) e introducidas en este mismo



sistema vegetal. Los autores reportan un incremento de 2-3 veces la actividad de GS en el nódulo, lo que resulta en una considerable disminución de la biomasa vegetal, el contenido de aminoácidos en los nódulos disminuyó un 50%, y al analizar por separado los aminoácidos se detectó una disminución en el contenido de asparagina, uno de los principales compuestos nitrogenados que se transportan a distancia, especialmente en las leguminosas fijadoras de nitrógeno. Este no fue el caso del sistema estudiado, en donde las plantas transgénicas de GS fenotípicamente no poseen ninguna diferencia en cuanto a crecimiento, biomasa o fijación de nitrógeno (actividad de nitrogenasa) en simbiosis (Fig. 12); contrario a lo propuesto por Harrison *et al.* (2000) que una elevada expresión de la GS en el nódulo tiene efectos perjudiciales en el metabolismo del nitrógeno en el nódulo.

Dado que en simbiosis no se detectó ningún fenotipo significativo y con base en que la única diferencia entre las plantas transgénicas de GS y las control era el fenotipo de infertilidad, se procedió al análisis molecular y fisiológico de los órganos reproductores de ambas líneas para tratar de determinar si este efecto era debido a la sobreexpresión del transgén o a un efecto de variación somaclonal, producido en el proceso de regeneración.

Descartamos la posibilidad de que este efecto de infertilidad sea debido a un efecto de mutación somática (variación somaclonal) o resultado del efecto del agente selectivo (kanamicina), ya que las plantas transgénicas de *L. japonicus* obtenidas con los plásmidos pBI121 y pBIN19, no dieron plantas transgénicas infértiles y dichas plantas producen flores y desarrollan vainas y semillas normales, similares a la línea silvestre (datos no mostrados). De acuerdo con los resultados de Lohar *et al.* (2001), el uso de agentes selectivos, tales como, la kanamicina o la higromicina, resultan entre un 10-20% de plantas de *L. japonicus* regeneradas que son estériles, debido probablemente a anomalías inducidas somaclonalmente por el uso de estos antibióticos en el proceso de regeneración, pero éste no fue el caso.

Flores deprovistas de los pétalos de las líneas GS y control, fueron fijadas y procesadas, con el fin de realizar un análisis histológico comparativo de las estructuras reproductoras masculina y femenina (granos de polen y óvulos). Los análisis microscópicos revelaron que las líneas transgénicas GS, tenían

alteraciones tanto en la parte masculina (granos de polen), como en la femenina (óvulos). Hasta ahora, ningún reporte ha descrito la presencia de fenotipos similares al del presente estudio manipulando este tipo de genes en plantas transgénicas. Pero sí existe un reporte de esterilidad masculina, como resultado de la inhibición de la NADH-GOGAT en flores de alfalfa, al introducir en estas plantas una construcción de NADH-GOGAT bajo el control del promotor de la aspartato aminotransferasa (AAT-2), una isoforma aumentada de nódulo, y que dio como resultado una esterilidad masculina como producto de la formación de granos de polen inviables (Schoenbeck *et al.*, 2000). Al realizar los estudios de actividad y expresión de la NADH-GOGAT, a lo largo del desarrollo de la flor, Schoenbeck *et al.* (2000), demostraron que este gen es principalmente expresado en las etapas tempranas de la formación del grano de polen y que quizás ésta es una etapa crítica en la formación de éste gameto, pero los autores no discuten que es lo que puede estar causando la infertilidad masculina desde un punto de vista metabólico.

Existen trabajos que apuntan a que la GS es una enzima clave que juega un papel central durante el desarrollo de la flor, proporcionando glutamina para el metabolismo de los órganos reproductores, así como en la detoxificación del amonio generado en el nódulo (Marsolier *et al.*, 1993; Dubois *et al.*, 1996; Temple *et al.*, 1998b).

En el trabajo de Marsolier *et al.* (1993), se reporta la caracterización del promotor del gen *GS15*, un gen de soya que codifica para una GS citosólica de raíz y nódulo. Utilizando el ensayo de protección contra la RNasa, permitió la detección de grandes cantidades del transcrito de este gen (*GS15*) en flores y pulvini de plantas de soya, mientras que en otras partes vegetativas de la planta, los mRNAs correspondientes se expresaron a bajos niveles. Un patrón comparable de expresión de GUS, se obtuvo en plantas transgénicas de *L. corniculatus*, transformadas con la fusión génica *GS15-GUS*. La localización histoquímica de la actividad de GUS, reveló que este gen de GS citosólica, se expresa en las tecas de la antera y en los granos de polen en las etapas tardías del desarrollo de la flor (Marsolier *et al.*, 1993).

Posterior a este trabajo, Dubois *et al.* (1996), reportaron la localización subcelular y la expresión diferencial de dos genes que codifican para las GS citosólicas (*Gln*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1-3 y *Gln 1-5*), aislados de plántulas de tabaco. Las regiones codificadoras de ambos genes eran muy similares, pero las secuencias 5' y 3' no traducidas, eran distintas. Para determinar los niveles de transcripción de éstos dos genes, se realizaron ensayos de protección contra la RNasa y los resultados demostraron claramente que el gen *Gln 1-3*, se expresa en raíz y flores, mientras que el gen *Gln 1-5*, se transcribe a altos niveles en tallos y a un nivel bajo en raíz y flor. Además en este trabajo se realizaron ensayos de inmunolocalización de la proteína GS e hibridación *in situ* de los transcritos y estos experimentos demostraron que tanto los transcritos, como la proteína de la GS, son expresados en diferentes órganos que incluyen a la raíz, el tallo y la flor. De esta forma, los autores observaron que la GS, no sólo se localiza en órganos no reproductores de la flor, sino que también se encuentra en el citosol de los óvulos y los granos de polen (Dubois *et al.*, 1996).

En el trabajo de Temple *et al.* (1998b), utilizando un gen de la GS₁ (pGS100), que es el mismo que usamos en nuestro grupo para éste trabajo; al determinar la expresión endógena de los genes de la clase GS₁ en diferentes órganos de alfalfa, mediante ensayos tipo "Northern blot", encontró que existe una gran abundancia del mRNA de esta enzima en las flores y en los nódulos.

Estos resultados muestran que efectivamente la GS, es una enzima metabólica importante en la flor, pero lo que resultaba difícil de explicar y entender, era como un promotor previamente reportado como específico de nódulo estaba dirigiendo la expresión de este gen (GS₁) hacia un tejido en donde normalmente no se expresaba o no había sido reportado como un sitio preferencial de expresión (Szabados *et al.*, 1990). Los análisis iniciales para caracterizar la expresión del promotor de leghemoglobina de *S. rostrata* (*Srg1b3p*), consistieron en fusionarlo al gen reportero de GUS e introducirlo tanto en plantas leguminosas (*L. corniculatus*), como no leguminosas (*N. tabacum*) mediante transformación genética por la vía de *A. tumefaciens*. Los resultados obtenidos, no muestran actividad del gen reportero en raíz, tallos, ni hojas, mientras que la expresión estuvo altamente confinada hacia el nódulo en la especie leguminosa. Pero en el trabajo Szabados y cols. (1990), nunca se menciona que se hayan analizado las estructuras florales de las plantas transgénicas de ambas especies en cuanto a la expresión del gen reportero. Por lo que optamos por transformar *L.*

japonicus, con el gen quimérico *Srglb3p-GUS* y evaluar la expresión de GUS bajo el control de éste promotor. Los resultados mostrados en la Fig. 16, fueron claros y contundentes: el promotor de leghemoglobina de *S. rostrata*, tiene la capacidad de expresarse en diferentes tejidos de la flor (pétalos, sépalos y anteras), algo no reportado anteriormente.

En el presente trabajo, los estudios de expresión basados en actividad de la GS, "Northern blot", RT-PCR *in situ* e inmunolocalización, mostraron siempre que el gen de la GS₁ introducido en plantas transgénicas de *L. japonicus* tendía a estar incrementado o aumentado en el tejido floral de las plantas transgénicas GS, comparadas con las plantas control (C1), lo cual era indicio de que el transgen estaba siendo expresado altamente en este tejido, y que éste pudiera tener una relación directa con el fenotipo de infertilidad obtenido (Suárez *et al.*, 2003).

Los datos del contenido de aminoácidos cuantificados en las flores durante la antesis de plantas transgénicas que sobreexpresan GS₁ y plantas control, mostraron un incremento en la síntesis de glutamina en las plantas GS39 y GS44, producto de la sobreexpresión del transgen introducido, lo que ocasiona un elevado contenido de glutamina y una relación elevada glutamina/glutamato en las plantas transgénicas. Estos datos del desbalance de la relación glutamina/glutamato, producto del aumento en la actividad de la GS, apoyan fuertemente nuestra propuesta de que la infertilidad en las líneas transgénicas de *L. japonicus*, se debe a la sobreexpresión del transgén GS₁ de alfalfa en esta leguminosa y que el promotor de leghemoglobina de *S. rostrata*, es el responsable de dirigir la expresión de este gen hacia la flor. La sobreexpresión de la GS₁ en los órganos reproductores de *L. japonicus*, ocasionó una alteración en la relación glutamina/glutamato, lo que pudo resultar en un efecto metabólico negativo para el desarrollo de los granos y los óvulos (Suárez *et al.*, 2003). Las flores en general, poseen un alto contenido de prolina, en particular los granos de polen y los óvulos, son ricos en este aminoácido, tanto en *Arabidopsis*, como en otras especies vegetales (Hua *et al.*, 1997). Se propone, que en las flores más que en otros órganos, ocurren altos niveles de recambio y movilización de prolina, lo cual ha sido relacionado con la función del aminoácido en proporcionar energía y una fuente de carbono y/o nitrógeno para el desarrollo de la flor.

En las plantas, la prolina es sintetizada a partir de dos rutas metabólicas diferentes, ambas rutas involucran al semialdehído γ -glutámico, el cual es sintetizado de glutamato por la pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CS), o de ornitina por la ornitina- δ -amino transferasa (Hua *et al.*, 1997). Altas concentraciones de glutamato y de aminoácidos derivados de éste, como es el caso de la prolina, pueden ser requeridos para un adecuado desarrollo del tejido floral y las lesiones metabólicas que reducen el contenido de glutamato en las flores, pueden afectar el desarrollo de la flor y consecuentemente la formación de los óvulos y/o los granos de polen (Schoenbeck *et al.*, 2000; Suárez *et al.*, 2003).

Por otro lado, proponemos además, que la esterilidad o no viabilidad de los granos de polen, se puede deber a una disminución en la concentración de ATP, consumido por la GS al tener una actividad incrementada en esta estructura reproductiva. Una de las principales causas de esterilidad masculina en plantas, se atribuye principalmente al metabolismo de carbohidratos. El metabolismo de carbohidratos, juega un papel muy importante en el desarrollo del grano de polen, y la acumulación de almidón es una característica de esta estructura en las angiospermas (Baker and Baker, 1979). Una deficiencia en el metabolismo de carbohidratos en la antera, ocasiona una producción de granos de polen anormales (Sawhney and Bhadula, 1988). En las etapas tempranas del desarrollo del grano de polen, el contenido de almidón en las anteras se acumula mayormente y se consume conforme el grano de polen madura (Clément *et al.*, 1996). Por lo tanto el almidón, es probablemente la principal fuente de carbohidratos durante el desarrollo del grano de polen (Bae *et al.*, 2001). Por esto las flores de *L. japonicus* al estar sobreexpresando la GS en la antera pudieran estar consumiendo ATP en mayor cantidad, lo que conllevaría a que las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos como la glucosa pirofosforilasa (AGPasa), no contara con la cantidad suficiente de ATP, para llevar a cabo la síntesis de ADP-glucosa, que es el sustrato principal para la síntesis de almidón. Considerando que el almidón es la principal fuente de energía en el grano de polen y que la AGPasa, regula la biosíntesis de este compuesto, cualquier modificación en la expresión y funcionamiento de ésta enzima, puede afectar el desarrollo y viabilidad del grano de polen (Bae *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTEC

El fenotipo de los granos de polen entre una planta con esterilidad masculina por una alteración en el metabolismo de carbohidratos y una planta con sobreexpresión de GS, son muy similares: granos de polen colapsados, citoplasma reducido y algunos granos de polen con el citoplasma derramado (Bae *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2003).

La esterilidad femenina en las plantas de *L. japonicus*, puede interpretarse tomando en cuenta 2 aspectos del metabolismo vegetal: la biosíntesis de etileno y la biosíntesis de poliaminas. En el trabajo de De Martinis *et al.* (1999), se reporta la esterilidad femenina en flores de plantas transgénicas de tabaco, que tienen disminuida la síntesis de etileno (por efecto de un RNA antisentido y por efecto de cosupresión), debido a la introducción del gen que codifica para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACC-oxidasa o ACO), enzima involucrada en la última etapa de la biosíntesis de etileno. Esta manipulación, resultó en una disminución de la enzima ACO, que afectó el desarrollo del óvulo y el proceso de fertilización. Este fenotipo fue revertido por la adición de una fuente externa de etileno a la flor, lo que demostró la función y el papel de esta hormona en el desarrollo del óvulo. Por el contrario al adicionar etileno y un inhibidor de la acción de esta hormona, los óvulos permanecían en una etapa inmadura (De Martinis *et al.*, 1999).

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), forman una clase de aminas alifáticas que son ubicuas en plantas y que se encuentran en todos los organismos vivos. A nivel celular las poliaminas están involucradas en diferentes procesos, tales como: la síntesis de DNA y proteínas, estabilización de membranas, pegado a radicales libres y modulación de actividades enzimáticas (Minocha and Minocha, 1995; Watson and Malmberg, 1996; Walden *et al.*, 1997; Kumar and Minocha, 1998). Además se sugiere que su biosíntesis, puede competir con la biosíntesis de etileno (Kushad and Dumbroff, 1991; Minocha and Minocha, 1995; Turano *et al.*, 1997), una de las hormonas que posee un papel fundamental en el desarrollo vegetal. Las poliaminas pueden también jugar un papel en la modulación del nitrógeno reducido y en el secuestro del amonio libre en la célula (Lovatt, 1990; Slocum and Weinstein, 1990). En plantas, la biosíntesis de putrescina, ocurre a partir de la ornitina y/o arginina y está regulada por las enzimas ornitina decarboxilasa (ODC) y arginina decarboxilasa

TESIS CON
FALLA EN LA CALIFICACIÓN

(ADC) (Slocum, 1991; Cohen, 1998). La espermidina y la espermina, son sintetizadas a partir de la putrescina por adiciones secuenciales de grupos aminopropil, derivados de la metionina S-adenosil decarboxilada (dcSAM), en una reacción catalizada por la espermidina y espermina sintetas, respectivamente. La metionina S-adenosil decarboxilada, es producida a partir de metionina S-adenosil, por la enzima SAM decarboxilasa (SAMDC).

La biosíntesis de ornitina en plantas ocurre principalmente a partir de glutamina y glutamato, utilizando varias enzimas y se argumenta que una gran parte de la ornitina en células vegetales, proviene directamente de la glutamina y no de la arginina. La estimulación de la biosíntesis de glutamina/glutamato, de ornitina y el consumo de éstos aminoácidos para la producción de putrescina y la biosíntesis de prolina, deben ser parte de una respuesta coordinada con el estrés en plantas. Un aumento de ésta ruta, debe ser importante para la regulación del amonio libre en la célula, así como también para la inhibición de la síntesis de etileno, dado que este último utiliza el mismo sustrato (SAM) que las poliaminas y ambas rutas compiten una con la otra (Bhatnagar *et al.*, 2001).

Con estas referencias proponemos que un aumento en la relación glutamina/glutamato en las flores de *L. japonicus*, favorece la síntesis de poliaminas, mismas que al competir con la ruta de biosíntesis de etileno, disminuyen su producción, lo que ocasiona que las plantas transgénicas con sobreexpresión de GS, produzcan óvulos inmaduros y no aptos para la fertilización.

En resumen la sobreexpresión de la GS en flores de plantas transgénicas de *L. japonicus*, ocasiona un fenotipo de esterilidad doble, afectando tanto la parte masculina, por una disminución en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de prolina, así como en el metabolismo de carbohidratos, principalmente almidón, y por la parte femenina por una inhibición en la biosíntesis de etileno, al competir por sustrato con la ruta de biosíntesis de poliaminas.

Las enzimas clave del metabolismo primario, fueron primeramente consideradas, como enzimas blanco en las estrategias para incrementar la producción de la biomasa en las especies herbáceas (Foyer and Ferrario, 1994). Sin embargo, el incremento de un enzima en particular utilizando las herramientas de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ingeniería genética es compleja. La introducción de genes homólogos en el genoma vegetal, puede dar como resultado una inhibición de la expresión de los genes endógenos (Napoli *et al.*, 1990). Por esto, la introducción de secuencias heterólogas como fue el caso de este trabajo, es preferida para sobreproducir una proteína de interés. Además, diversas enzimas clave en distintas rutas metabólicas, son proteínas oligoméricas y el ensamblaje de sus subunidades en los sistemas heterólogos es requerida para la obtención de la enzima funcional. Por otro lado el incremento en la actividad de una enzima de interés puede dificultarse, si los niveles endógenos de esta enzima son altos en los tejidos vegetales blanco, o si la enzima está sujeta a regulación post-traducciona, como comúnmente es el caso en las enzimas claves de rutas metabólicas primarias (Fu *et al.*, 2003).

Los resultados con el uso de promotores nódulo-específicos, nos hacen pensar que la GS de nódulo, es una enzima finamente regulada que no permite ser fácilmente modulada o modificada (sobrexpresada o inhibida), dado el papel central que juega en el metabolismo del nitrógeno. Los resultados o reportes de sobreexpresión no van más allá de las 2-3 veces de incremento adicional (Harrison *et al.*, 2000; Suárez *et al.*, 2003). Algunos de estos estudios con efectos deletéreos en el metabolismo del nódulo (Harrison *et al.*, 2000) y otros sin efectos simbióticos aparentes (Suárez *et al.*, 2003). Una posibilidad para el mejor entendimiento de esta enzima en la simbiosis, sería la utilización de un sistema homólogo, como alfalfa, para la introducción de este transgén mediante ingeniería genética con las estrategias experimentales que permitan la sobreexpresión y la inhibición mediante la tecnología del RNA antisentido. Si bien ya existen trabajos utilizando esta tecnología (Temple *et al.*, 1993; Harrison *et al.*, 2000) en tabaco (sistema heterólogo), en donde han logrado reducir considerablemente el mensajero de la GS₁, estas plantas no presentan cambios a nivel de proteína ni actividad enzimática, aunque se demostró una reducción en el peso fresco (Temple *et al.*, 1993). En nuestro grupo, también se ha tratado de reducir la expresión de esta enzima mediante RNA antisentido, pero los resultados tampoco han sido favorables, e indican que no existe una correlación directa entre la disminución del mensajero y la cantidad de proteína de la GS₁, lo que apoya un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mecanismo de regulación traduccional y postraduccional a la que se encuentra sujeta esta enzima (Temple *et al.*, 1993; Temple *et al.*, 1998b).

Oaks (1992), sugiere que la asimilación de amonio en las raíces es más bien ineficiente, debido a que la reducción de nitrato ocurre principalmente en las hojas y que la mayor parte de la glutamina sintetizada en las raíces, es exportada hacia la parte aérea. Por lo tanto, si la asimilación de amonio es desviada hacia la parte aérea, utilizando RNA antisentido de la GS de la raíz puede esperarse un incremento en la producción de la biomasa. Los estudios futuros, mediante el uso de esta metodología en plantas con una reducción o ausencia de la GS citosólica, pueden darnos un mejor entendimiento del control molecular de esta ruta metabólica.

Toda esta variedad de resultados no permiten emitir una conclusión general sobre el efecto de la sobreexpresión de la GS₁ en plantas. Los resultados de los diferentes estudios indican que la expresión del transgen de la GS₁, puede variar con el promotor o región codificadora utilizada y/o con la especie vegetal transformada. Sin embargo, algunos de los resultados obtenidos son lo suficientemente interesantes, para sugerir que la manipulación de la asimilación del nitrógeno vía la transformación genética es muy útil (Mifflin y Habash, 2002), así como la interrelación que guarda éste proceso con el del metabolismo del carbono.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. CONCLUSIONES

- Mediante la transformación genética, fue posible aumentar la expresión de la GS₁ en el sistema heterólogo de *L. japonicus*.
- La sobreexpresión de la GS₁, en el nódulo, fue de dos veces en las plantas transgénicas con respecto a la planta control, sin cambios en la expresión de esta enzima en raíz y hojas y sin fenotipo simbiótico aparente.
- Las plantas que sobreexpresan la GS, son plantas infértiles. Tanto la parte masculina (granos de polen), como la femenina (óvulos), resultaron afectadas por la sobreexpresión. La fecundación cruzada en las plantas GS, con polen de plantas control (C1) y silvestre, no revierte el fenotipo de infertilidad.
- La expresión del promotor *Srglb3p* en flores, fue evidenciada por actividad de GUS. Se demostró la sobreexpresión de la GS bajo el mando de éste promotor en flores (órganos florales), por medio de la actividad de la enzima, RT-PCR in situ, RT-PCR e inmunolocalización.
- La esterilidad de las plantas transgénicas de *L. japonicus* se debe a la sobreexpresión de la GS₁ en estructuras reproductivas (granos de polen y óvulos).
- Un incremento en la síntesis de glutamina en las flores de las plantas GS fue claramente evidente (20-40%), mientras que el glutamato permanece sin cambio. Como consecuencia de esto una relación glutamina/glutamato, significativamente superior fue observado en las flores de las plantas transgénicas GS39 y GS44.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

VII. PERSPECTIVAS

- Analizar y determinar si la alteración en la relación glutamina/glutamato, repercute en la síntesis de prolina y ésto a su vez en el buen desarrollo y funcionamiento de los órganos reproductores (granos de polen y óvulos)
- Determinar la presencia de almidón en los granos de polen de las líneas transgénicas GS39 y GS44, así como la expresión de las enzimas involucradas en su síntesis comparándolas con las plantas control (C1) y relacionar el fenotipo de inviabilidad de los granos de polen con la síntesis de este carbohidrato.
- Evaluar la síntesis de poliaminas en las flores y su relación con la síntesis de etileno en la embriología de esta especie, comparando plantas transgénicas, control con el tipo silvestre.
- Aplicar una fuente externa de etileno, con el fin de determinar si esto revierte el fenotipo de inmadurez en los óvulos y que mediante polinización cruzada sea posible generar semillas en las líneas transgénicas que sobreexpresan GS.
- Mediante el uso de inhibidores específicos de la GS (MSX, L-PPT o Tabtoxina β -lactama), disminuir parcialmente la expresión de la GS en las plantas transgénicas y determinar si esta inhibición revierte el fenotipo de esterilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acaster MA and Weitzman PDJ (1985) Kinetic analysis of glutamine synthetase from various plants. *FEBS Lett.* 189:241-244.
- Allen ON and Allen EK (1981) The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. University of Wisconsin Press Madison, WI. pp 812
- Appleby CA (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:443-478.
- Appleby CA, Bogusz D, Dennis ES and Peacock WJ (1988). A role for haemoglobin in all plant roots? *Plant Cell & Environ.* 11:359-367.
- Aragao FJL, Grossi de Sa MF, Davey MR, Brasileiro ACM, Faria JC and Rech EL (1993) Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Rep.* 12:483-490.
- Aslam M, Travis R and Huffaker R (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 99:1124-1133.
- Austin S, Bingham ET, Matthews DE, Shahan MN, Will J and Burgess RR (1995) Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica* 85:381-393.
- Bae JM, Harn CH, Tae KH, Suh MC, Shin JS and Liu JR (2001) Partial male sterility induced in tobacco by overproduction of mRNA of sweet potato small subunit ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Plant Physiol.* 158:1273-1279.
- Bagga S, Sutton D, Kemp JD and Sengupta-Gopalan C (1992) Constitutive expression of b-phaseolin gene in different tissues of transgenic alfalfa does not ensure phaseolin accumulation in non-seed tissue. *Plant Mol. Biol.* 19:951-958.
- Baker HG and Baker I (1979) Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *Am. J. Bot.* 66:591-600.
- Behl R, Tischner R and Raschke K (1988) Induction of a high capacity nitrate uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low capacity mechanism. *Planta* 176:235-240.
- Benfey PN and Chua NH (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174-181.
- Bennett MJ and Cullimore JV (1989) Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. *Planta* 179:433-440
- Bennett MJ, Lightfoot DA and Cullimore JV (1989) cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 12:553-565.
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721.
- Bhatnagar P, Glasheen BM, Bains SK, Long SL, Minocha R, Walter C and Minocha SC (2001) Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. *Plant Physiol.* 125:2139-2153.
- Birch RG and Franks T (1991) Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-469.
- Blackwell RD, Murray AJS and Lea PJ (1987) Inhibition of photosynthesis in

barley with decreased levels of chloroplastic glutamine synthetase activity. *J. Exp. Bot.* 38:1799-1809.

Blackwell RD, Murray AJS, Lea PJ, Kendall AC, Hall NP, Turner JC and Wallsgrove RM (1988) The value of mutants unable to carry out photorespiration. *Photosynth. Res.* 16:155-176.

Bond JE, McDonnell RE, Finer JJ and Gresshoff PM (1992) Construction and use of a low cost micro-projectile "gene gun" for gene transfer in plants. *Tennessee Farm and Home Science* 162:3-14.

Bonfante P, Genre A, Faccio A, Martini I, Schauser L, Stougaard J, Webb J and Parniske M (2000) The *Lotus japonicus* *LjSym4* gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Mol Plant-Microbe Interact.* 13:1109-1120.

Britto DT, Glass ADM, Kronzucker HJ and Siddiqi MY (2001) Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. An evaluation of recent proposals. *Plant Physiol.* 125:523-526.

Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS and Hirel B (2000) Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* 211:519-527.

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.

Chen F-L and Cullimore JV (1988) Two isozymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 88:1411-1417.

Christou P, Swain WF, Yang NS and McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:7500-7504.

Christou P (1992) Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:275-281.

Clément C, Burrus M and Audran JC (1996) Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium*. *Am. J. Bot.* 83:459-469.

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.* 17:761-772.

Cohen SS (1998) A Guide to the Polyamines. Oxford University Press, Nueve York, pp 1-595.

Coruzzi G and Last R (2000) Amino Acids. En "*Biochemistry & Molecular Biology of Plants*", (Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL, eds). American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD. p. 358-410.

Crawford NM, Kahn ML, Lesutek T and Long SR (2000) Nitrogen and Sulfur. En "*Biochemistry & Molecular Biology of Plants*", (Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL eds). American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD. p. 786-849.

Cullimore JV, Gebhardt C, Saarelainen R, Mifflin BJ, Idler KB and Barker RF (1984) Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family. *J. Mol. Appl. Genet.* 2:589-599.

Cullimore JV and Mifflin BJ (1984) Immunological studies on glutamine synthetase using antisera raised to the two plant forms of the enzyme from *Phaseolus* root nodules. *J. Exp. Bot.* 35:581-587.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dakora FD and Atkins CA (1989) Diffusion of oxygen in relation to structure and function in legume root nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 16:131-140.

D'Halluin K, Botterman J and De Greef W (1990) Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Sci.* 30:866-871.

De Martinis D and Mariani C (1999) Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 11:1061-1071.

Dixon ROD and Wheeler CT (1986) Nitrogen Fixation in Plants. Chapman and Hall, Nueva York, NY.

Djordjevic MA, Gabriel DW and Rolfe BG (1987) Rhizobium-the refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopat.* 145-168.

Donn G, Tischer E, Smith JA and Goodman HM (1984) Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. *J. Mol. Appl. Genet.* 2:621-635.

Downie JA and Johnston AWB (1988) Nodulation of legumes by *Rhizobium*. *Plant, Cell & Environ.* 11:403-412.

Du S, Erickson L and Bowley S (1994) Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 13:330-334.

Dubois F, Brugière N, Sangwan RS and Hirel B (1996) Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol. Biol.* 31:803-817.

Duxbury JM, Bouldin DR, Terry RE and Tate III RL (1982) Emissions of nitrous oxide from soils. *Nature* 298:462-464.

Eckes P, Schmitt P, Daub W and Wengenmayer F (1989) Over-production 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 chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Cell* 1:241-248.

Edwards JW, Walker EL and Coruzzi GM (1990) Cell-specific expression in transgenic plants reveals non-overlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3459-3463.

El-Shemy HA, Khalafalla M, Wakasa K and Ishimoto M (2002) Reproducible transformation in two grain legumes-soybean and azuki bean-using different systems. *Cell & Mol. Biol. Lett.* 7:709-719.

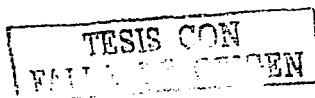
Endo M, Kokubun T, Takahata Y, Higashitani A, Tabata S and Watanabe M (2000) Analysis of expressed sequence tags of flower buds in *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7:213-216.

Ericson MC (1985) Purification and properties of glutamine synthetase from spinach leaves. *Plant physiol.* 79:923-927.

Faure JD, Meyer C and Caboche M (2001) Nitrate assimilation: nitrate and nitrite reductase. En: "Nitrogen assimilation by plants". (Morot-Gaudry JF ed). Enfield: Science Publishers Inc. p 33-52.

Fei H, Chaillou S, Hirel B, Mahon JD and Vessey JK (2003) Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate. *Planta* 216:467-474.

Finnemann J and Schjoerring JK (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible



- phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J.* 24:171-181.
- Forde BG, Day HM, Turton JF, Shen WJ, Cullimore JV and Oliver JE (1989) Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* 1:391-401.
- Forde BG and Cullimore JV (1989) The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. En: "Oxford surveys of plant molecular and cell biology" (Miflin BJ, ed), Vol. 6. Oxford University Press. Oxford. p 247-296.
- Forde BG and Woodall J (1995) Glutamine synthetase in higher plants. En: "Amino acids and their derivatives in higher plants" (Wallsgrave RM, ed). Cambridge University Press, Cambridge. p. 1-18.
- Forde BG, Clarkson DT (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Adv. Bot. Res.* 30:1-90.
- Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:219-235.
- Foyer CH and Ferrairo S (1994) Modulation of carbon and nitrogen metabolism in transgenic plants with a view to improved biomass production. *Biochem. Soc. Transac.* 22:909-915.
- Fu J, Sampalo R, Gallardo F, Canovas FM and Kirby EG (2003) Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. *Plant Cell & Environ.* 26:411-418.
- Fuentes SI, Suárez RR, Villegas T, Castro AL and Hernández DG (1993) Embryogenic response of Mexican alfalfa (*Medicago sativa* L) varieties. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* 34:299-302.
- Fuentes SI, Allen DJ, Ortiz-López A, and Hernández G (2001) Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J. Exp. Bot.* 52:1071-1081.
- Gant JS, Baldauf SL, Calie PJ, Weeden NF, and Palmer JD (1991) Transfer of rpl22 to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO J* 10:3073-3078.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O and Frommer WB (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated and starvation induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 11:937-947.
- Gebhardt C, Oliver JE, Forde BG, Saarelainen R and Miflin BJ (1986) Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *EMBO J.* 5:1429-1435.
- Givan CV, Joy KW and Kleczkowski LA (1988) A decade of photorespiratory nitrogen cycling. *Trends Biochem. Sci.* 13:433-437.
- Glass ADM, Shaff JE and Kochian LV (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.* 99:456-463.
- Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Gant SS and Vance CP (1993) Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell* 5:215-226.
- 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.
- Haaker H (1988) Biochemistry and physiology of nitrogen fixation. *BioEssays* 9:112-117.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

Haaker H and Klugkist J (1987) The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:57-71.

Habash DZ, Massiah AJ, Rong HL, Wallsgrove RM and Leigh RA (2001) The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 138:83-89.

Hadi MZ, McMullen MD and Finer JJ (1996) Transformation of 12 plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 15:500-505.

Handberg K and Stougaard J (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2:487-496.

Hansen G (2000) Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol. Plant Microbe Interac.* 13:649-657.

Hansen G and Chilton MD (1996) "Agrolistic" transformation of plants cells: Integration of T-strands generated in planta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14978-14983.

Harrison J, Brugiere N, Phillipson B, Ferrairo-Mery S, Becker T, Limami A and Hirel B (2000) Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding: consequences to plant physiology and plant development. *Plant and Soil* 221:81-93.

Hayakawa T, Yamaya T, Mae T and Ojima K (1993) Changes in the content of two glutamate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening. *Plant Physiol.* 101:1257-1262.

Hernalsteens JP, Thiatoong L, Schell J and Van Montagu M (1984) An *Agrobacterium* transformed cell-culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J.* 3:3039-3041.

Hill KK, Jarvis-Eagan N, Halk EL, Krahn KJ, Liao LW, Mathewson RS, Merlo DJ, Nelson SE, Rashka KE, Loesch-Fries LS

(1991) The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Bio/technology* 9:373-627.

Hirel B and Gadal P (1980) Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol.* 66:619-623.

Hirel B, McNally SF, Gadal P, Sumar N and Stewart GR (1984a) Cytosolic glutamine synthetase in higher plants: A comparative immunological study. *Eur. J. Biochem.* 138:63-66.

Hirel B, Weatherley C, Cretin C, Bergounioux C and Gadal P (1984b) Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* 74:448-450.

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.

Hirel B, Marsolier MC, Hoarau A, Hoarau J, Brangeon J, Schafer R and Verma DPS (1992) Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase in tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. *Plant Mol. Biol.* 20:207-218.

Howitt SM and Udvardi MK (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:152-170.

Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ and Coruzzi G (1998) A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13965-13970.

Hua X-J, van de Cotte B, Van Montagu M and Verbruggen N (1997) Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114:1215-1224.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ingelbrecht IL, Herman LM, Dekeyser RA, Van Montagu MC and Depicker AG (1989) Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell*.

Inokuchi R, Kuma K, Miyata T and Okada M (2002) Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenetic and physiological perspectives. *Physiol. Plant*. 116:1-11.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusions marker in higher plants. *EMBO J*. 6:3901-3907.

Jiang Q and Gresshoff PM (1993) *Lotus japonicus*: model plant for structure-function analysis in nodulation and nitrogen fixation. En "Current Topics of Plant Molecular Biology II" (Gresshoff PM ed). CRC Press, Boca Raton FL. p 97-110.

Jiang Q and Gresshoff PM (1997) Classical and molecular genetics of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interac*. 10:59-68.

Joy KM (1988) Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. *Can. J. Bot*. 66:2103-2109.

Kaiser BN, Finnegan PM, Tyerman SD, Whitehead LF, Bergersen FJ, Day DA and Udvardi MK (1998) Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science* 281:1202-1206.

Kamachi K, Yamaya T, Mae T and Ojima K (1991) A role of glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol*. 96:411-486.

Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T and Ojima K (1992) Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol*. 99:1481-1486.

Kato T, Kaneko T, Sato S, Nakamura Y and Tabata S (2000) Complete structure of the chloroplast genome of a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res*. 7: 323-330.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M and Tabata S (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res*. 7:331-338.

Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrove RM and Milfin BJ (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275:741-743.

Klein TM, Wolf ED, Wu R and Sanford JC (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature* 327:70-73.

Klein TM, Gratzel T, Fromm ME and Sanford JC (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology* 6:559-563.

Knight TJ and Langston-Unkefer PJ (1988) Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogen. *Science* 241:951-954.

Kolchinsky A, Funke RP and Gresshoff PM (1994) Dissecting molecular mechanisms of nodulation: taking a leaf from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol*. 26:549-552.

Kozaki A and Takeba G (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384:557-560.

Kumar A and Minocha SC (1998) Transgenic manipulation of polyamine metabolism. En "Transgenic Research in Plants" Lindsey K ed. Harwood Academic Publishing, Londres, pp 189-199.

- Kushad MM and Dumbroff EB (1991) Metabolic and physiological relationship between the polyamine and ethylene biosynthetic pathways. En *"Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants"*. Slocum RD and Flores HE eds. CRC Press, Boca Raton FL, pp 77-92.
- Lam H-M, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh M-H and Coruzzi G (1995) Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7:887-898.
- Lam H-M, 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.* 47:569-593.
- Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Miflin 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 Sanchez F (1984) Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76:1019-1023.
- Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeir JW and Frommer WB (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and two putative transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8139-8244.
- Lea PJ, Blackwell RD, Chen F-L and Hecht U (1990) Enzymes of ammonia assimilation. *Meth. Plant Biochem.* 3:257-276.
- Lea PJ and Forde BG (1993) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant Cell and Environ.* 17:541-556.
- Lea PJ and Forde BG (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant Cell Environ.* 17:541-556.
- Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A and Sinskey AJ (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabol. Engin.* 4:67-79.
- Li MG, 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.
- Lighfoot DA, Green NK and Cullimore JV (1988) The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 11:191-202.
- Limami A, Phillipson B, Ameziene R, Perrollet N, Jiang Q, Rpy R, Deleens E, Chaumont-Bonnet M, Gresshoff PM and Hirel B (1999) Does root glutamine synthetase control plant biomass production in *Lotus japonicus* L. *Planta* 209:495-502.
- Lohar DP, Schuller K, Buzas DM, Gresshoff PM and Stiller J (2001) Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker. *J. Exp. Bot.* 52:1697-1702.
- Lovatt CJ (1990) Stress alters ammonia and arginine metabolism. En *"Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interaction"*. En Flores HE, Arteca RN, Shannon JC eds. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 166-179.
- Maliga P (2001) Plastid engineering bears fruit. *Nat. Biotech.* 19:826-827.
- Mann AF, Fentem PA and Stewart GR (1979) Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare* L). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88:515-521.
- Mann AF, Fentem PA and Stewart GR (1980) Tissue localization of barley

(*Hordeum vulgare* L) glutamine synthetase isoenzymes. *FEBS Lett.* 110:265-267.

Marsolier MC, Carrayole E and Hirel B (1993) Multiple functions of promoter sequences involved in organ-specific expression and ammonia regulation of a cytosolic soybean Glutamine synthetase gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant J.* 3:405-414.

McCormack DK, Farnen KJF and Boland MJ (1982) Purification and properties of glutamine synthetase from the plant cytosol fraction of lupin nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* 218:561-571.

McNally SF and Hirel B (1983) Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol Vég* 21:761-774.

McNally SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF and Stewart GR (1983) Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* 72:22-25.

McParland 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.

Meister A (1974) Glutamine synthetase in mammals. En "*The enzymes*" (Boyer PD ed) Vol. 10. Academic Press, Nueva York, NY. p. 699-754.

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.

Miflin BJ and Lea PJ (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15:873-885.

Miflin BJ and Lea PJ (1980) Ammonia assimilation. En "*The Biochemistry of*

Plants" (Miflin BJ ed) . Vol.5. Academic Press, Nueva York, NY. p. 169-202.

Miflin BJ and Cullimore JV (1984) Nitrogen assimilation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: a joint endeavour. En: *Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*. Verma DPS and Hohn T eds. Springer-Verlag, Vienna pp.129-196.

Miflin BJ and Habash DZ (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exper. Bot.*53:979-987.

Migge A, Carrayol E, Hirel B, Lohmann M, Meya G and Becker TW (1998) Regulation of the subunit composition of plastidic glutamine synthetase of the wild-type and of the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato by blue/UV-A or by UV-B-light. *Plant Mol. Biol.* 37:689-700.

Migge A, Carrayol E, Hirel B and Becker TW (2000) Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210:252-260.

Minocha SC and Minocha R (1995) Role of polyamines in somatic embryogenesis. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed*. Bajaj YPS ed. Springer-Verlag, Berlin, pp 53-70.

Moorehead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A y MacKintosh C (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* 18:1-12.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497.

Napoli C, Lemiex C and Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- results in reversible co-suppression of homologous genes. *Plant Cell* 2:279-289.
- Nato F, Hirel B, Nato A and Gadal P (1984) Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosylated protein. *FEBS Lett.* 175:443-446.
- Newell CA (2000) Plant Transformation technology. Developments and applications. *Mol. Biotech.* 16:53-65.
- Nielsen K and Schjoerring JK (1998) Regulation of apoplastic NH_4^+ concentration in leaves of oilseed rape. *Plant Physiol.* 118:1361-1368.
- Ninnemann O, Jauniaux JC and Frommer WB (1994) Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J.* 13:3464-3471.
- Oaks A (1992) A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *Bioscience* 42:103-111.
- Oliveira IC, Lam HH, Coschigano K, Melo-Oliveira R and Coruzzi G (1997) Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Bioch.* 35:185-198.
- Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero JM and Márquez AJ (2002) Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiol. Plant.* 115:352-361.
- Ortega JL, Temple SJ and Sengupta-Gopalan C (2001) Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS_1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS_1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. *Plant Physiol.* 126:109-121.
- Pearson JN, Finnemann J and Schjoerring JK (2002) Regulation of the high-affinity ammonium transporter *BnAMT1* in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant Mol. Biol.* 49(5): 483-490.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D and Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672.
- Pereira LF and Erickson L (1995) Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 14:290-293.
- Peterman TK and Goodman HM (1991) The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol. Gen. Genet.* 230:145-154.
- Peters GA (1978) Blue-green algae and algal associations. *BioScience* 28:580-585.
- Peters GA and Meeks JC (1989) The azolla-anabaena symbiosis: Basic biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 40:193-210.
- Powell R and Gannon F (1988) The leghaemoglobins. *BioEssays* 9:117-118.
- Pueppke SG and Broughton WJ (1999) *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12:293-318.
- Quispel A (1988) Bacteria-plant interactios in symbiotic nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* 74:783-790.
- Raven JA and Farquhar GD (1981) Methylammonium transport in *Phaseolus vulgaris* leaf slices. *Plant Physiol.* 67:859-863.
- Redinbaugh MG and Campbell WH (1993) Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.* 101:1249-1255.

Riedel J, Tischner R and Mack G (2001). The chloroplastic glutamine synthetase (GS2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta* 213:396-401.

Russell DR, Wallace KM, Bathe JH, Martinell BJ, McCabe DE (1993) Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep.* 12:165-169.

Sakakibara H, Matanabe M, Hase T and Sugiyama T (1991) Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding ferredoxin dependent glutamate synthase in maize leaf. *J. Biol. Chem.* 266:2028-2035.

Salisbury FB and Ross CW (1992) Assimilation of nitrogen and sulfur. En "*Plant Physiology*". Wdasworht Publishing Company, Belmont California. p 289-307.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: Laboratory manual 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanders PG and Wilson RH (1984) Amplification and cloning of the Chinese hamster glutamine synthetase gene. *EMBO J* 3:65-71.

Sawhney VK and Bhadula SK (1988) Histological analyses of microsporogenesis in the normal and male sterile, stamenless-2 mutant of tomato. En "*Sexual reproduction in higher plants*". Cresti M, Gori P and Picini E eds. Springer Verlag, Berlin, p. 187-192.

Schafer W, Gorz A and Kahl G (1987) T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature* 327:529-532.

Schauser L, Handberg K, Sandal N, Stiller J, Thykjaer T, Pajuelo E, Nielsen A and Stougaard J (1998) Symbiotic mutants deficient in nodule establishment identified after T-DNA

transformation of *Lotus japonicus*. *Mol. Gen. Genet.* 259:414-423

Schell J, John M, Schmidt J, Wingender-Drissen R, Simons A, Metz B, Jensen EO, Hoffmann HJ, Welters P and de Bruijn FJ (1988) Regulation of gene expression in plants with special emphasis on the nodulation process. En: *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Bothe H, de Bruijn FJ and Newton WE (eds). New York, Gustav Fischer. pp 591-598.

Schoenbeck MA, Temple SJ, Trepp GB, Blumenthal JM, Samac DA, Gantt JS, Hernández G and Vance CP (2000) Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa*) transformed with an antisense glutamate synthase transgene. *J. Exp. Bot.* 51:29-39.

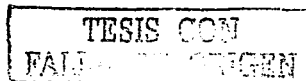
Schroeder HE, Khan RI, Knibb WR, Spencer D and Higgins TJV (1991) Expression of chicken ovalbumin gene in three Lucerne cultivars. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:495-505.

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.

Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ and Rufty TW (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of ¹³NO₃⁻ influx. *Plant Physiol.* 90:806-813.

Slocum RD (1990) Stress-induced putrescin accumulation as a mechanism of ammonia detoxification in cereal leaves. En "*Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interaction*". En Flores HE, Arteca RN, Shannon JC eds. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 157-165.

Slocum RD and Weinstein LH (1991) Polyamine biosynthesis in plants. En "*The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*" Slocum RD, Flores HE eds. CRC Press, Boca Raton FL. pp 23-40.



Smith FW, Rae AL, Hawkesford MJ (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:236-245.

Somerville CR (1986) Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:467-507.

Sorokin AP, Ke XY, Chen DF and Elliott MC (2000) Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci.* 156:227-233.

Srivastava HS, Shankar N and Yamaya T (2002) Role and regulation of glutamate synthase in higher plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 8:39-60.

Stadtman ER and Ginsburg A (1974) En "The enzymes" (Boyer PD ed) Vol 10. Academic Press, New York, NY. p. 755-808.

Stewart GR, Mann AF and Fenten PA (1980) Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En "The Biochemistry of Plants" (Mifflin BJ ed) Vol.5. Academic Press, Nueva York, NY. p. 271-327.

Suárez R, Márquez J, Shishkova S and Hernández G (2003) Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicus* plants. *Physiol. Plant.* 117:326-336.

Suzuki A and Rothstein S (1997) Structure and regulation of ferredoxin dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 243:708-718.

Szabados L, Ratet P, Grunenber B and de Bruijn F (1990) Functional analysis of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene 5'-upstream region in transgenic *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell* 2:973-986.

Szczglowski K, Potter T, Stoltzfus J, Fujimoto SY and de Bruijn F (1996) Differential expression of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene promoter in transgenic legume and non-legume plants. *Plant Mol. Biol.* 31:931-935.

Ta TC and Faris MA (1987) Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant & Soil* 98:265-274.

Tague BW (2001) Germ-line transformation of *Arabidopsis lasiocarpa*. *Trans. Res.* 10:259-267.

Temple SJ, Knight TJ, Unkefer PJ 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.

Temple SJ, Bagga S and Sengupta-Gopalan C (1994) Can glutamine synthetase activity be modulated in transgenic plants by the use of recombinant DNA technology? Transgenic plants and Biochemistry. *Biochem. Soc. Trans.* 22:915-920.

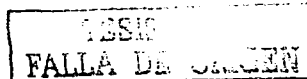
Temple SJ, Vance CP and Gantt JS (1998a) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* 3:51-56.

Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C (1998b) Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol. Biol.* 37:535-547.

Terzaghi WB and Cashmore AR (1997) Plant cell transfection by electroporation. *Meth. Mol. Biol.* 62:453-462.

Thykjaer T, Stiller J, Handberg K, Jones JDG and Stougaard J (1995) The maize transposable element *Ac* is mobile in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 27:981-993.

- Tingey SV and Coruzzi GM (1987) Glutamine synthetase of *Nicotiana glumbaginifolia*. Cloning and *in vivo* expression. *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.
- Tingey SV, Tsai F-Y, Edwards JW, Walker EL and Coruzzi GM (1988) Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 263:9651-9657.
- Tobin AK, Ridley SM and Stewart GR (1985) Changes in the activities of chloroplast and cytosolic iso-enzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. *Planta* 163:544-548.
- Tobin AK and Yamaya T (2001) Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *J. Exp. Bot.* 52:591-604.
- Tumer NE, Robinson SJ and Haselkorn R (1983) Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* 306:337-342.
- Turano FJ, Kramer GF and Wang CY (1997) The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. *Physiol. Plant.* 101:510-518.
- Valentin K, Kostrzewa M and Zetsche K (1993) Glutamate synthase is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of glutamate synthase. *Plant Mol. Biol.* 23:77-85.
- Vance CP, Miller SS, Gregerson RG, Samac DA, Robinson DL and Gantt JS (1995) Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. *Plant J.* 8:345-358.
- Vincent R, Fraissier V, Chaillou S, Limami MA, Deleens E, Philippon B, Douat C, Boutin J-P and Hirel B (1997) Over-expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium and plant development. *Planta* 201:424-433.
- Walden R, Cordeiro A and Tiburcio AF (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* 113:1009-1013.
- Walker EL and Coruzzi G (1988) Expression of "twin" genes for glutamine synthetase in nodules pea. *J. Cell. Biochem.* 12C:206.
- Wallsgrave RM, Lea PJ and Miflin BJ (1979) The distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea cell leaf. *Plant Physiol.* 63:232-236.
- 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.
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ and Glass ADM (1993) Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and subcellular distribution of ¹³NH₄⁺. *Plant Physiol.* 103:1249-1258.
- Watson MB and Malmberg RL (1996) Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynt arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol.* 111:1077-1083.
- Weising K, Kahl G and Schell J (1988) Transfer, structure and expression of foreign genes in plants. En: *Architecture of Eukaryotic Genes*. Kahl G (ed). New York, VCH Publishers. pp 57-87.



Wetselaar R and Farquhar GD (1980)
Nitrogen losses from tops of plants. *Adv. Agron.* 33:263-302.

Woodall J and Forde BG (1996)
Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legumes species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ* 19:848-858.

Yamaya T, Hayakawa T, Tanasawa K, Kamachi K, Mae T and Ojima K (1992)
Tissue distribution of glutamine synthetase and glutamate synthase in rice leaves. *Plant Physiol.* 100:1427-1432.

Yang DX, Wei ZM and An HL (2001)
Transgenic peanut plants obtained by particle bombardment via somatic

embryogenesis regeneration system. *Cell Res.* 11:156-160.

Ye GN, Daniell H and Sanford JC (1990)
Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 15:809-819.

Zhang Y, Shewry PR, Jones H, Barcelo P, Lazzeri PA and Halford NG (2001)
Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J.* 28:431-441.

Zupan J, Muth TR, Draper O and Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant J.* 23:11-28.

TESIS
FALLA DE ORIGEN