

11281
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN
DE NITRÓGENO

**"Inhibición nódulo-específica de la NADH-GOGAT
en plantas transgénicas de alfalfa durante la
simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

ELIZABETH CORDOBA MARTINEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GEORGINA HERNÁNDEZ DELGADO

CUERNAVACA, MORELOS

Marzo 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

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

Durante el desarrollo de este proyecto, se recibió apoyo a través de una beca para estudios de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como de un complemento de la misma concedida por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Georgina Hernández Delgado por concederme la oportunidad de colaborar con ella en este proyecto de investigación. Muchas gracias Gina.

A mi Comité Tutorial, a los Dres. Patricia León Mejía, Miguel Lara Flores y Guillermo Dávila Ramos, por hacer siempre importantes observaciones al trabajo de investigación y convertirse en colaboradores para que éste culminara lo mejor posible.

A los revisores de esta Tesis, gracias a los Dres. Georgina Hernández, Svetlana Shishkova, Isabel López, Miguel Lara, Federico Sánchez, Javier Plasencia y Mario Soberón, por sus comentarios y acertadas sugerencias a la misma.

A mis compañeros y amigos del laboratorio del Programa de Biología Molecular de Plantas del CIFN, a TODOS muchas gracias: Elia, Sara, Sonia, Lulú, Silvia, Maru, Araceli, Jesús, Ramón, Mario, Don Chuy y Mahesh. Y a los amigos que alguna vez anduvieron por aquí trabajando con plantas y que compartieron conmigo este espacio y muchas experiencias: Sveta, Kate, Helena, Miriam, Juan, Lupita, Alex, Odette, Marcela, Paty, Alberto, Iris, Mariana, Yadira y Alejandra.

A los muchos que colaboraron conmigo en el arduo trabajo de mantener siempre a las plantas en óptimas condiciones y en la colecta de material para este trabajo, especialmente gracias a Lore, Yanette, Dona, Debby y Eduardo. A Waldo, Miguel e Ignacio por el apoyo técnico brindado. A Lola y Alma por facilitarme muchos de los trámites académicos durante el transcurso de mis estudios.

A muchos amigos y compañeros de este Centro de Investigación que de alguna manera hicieron que estos años sean muy gratos para recordar: Mary Romana, Nora, Sandra, Paulina, Rocío, Juan, Chucho, Miguel, Javier, Julio e Ismael. A los viejos y siempre amigos Yolanda y Louis. gracias por compartir conmigo muchos momentos durante este trayecto.

A mis hermanas y a mi madre, por contar siempre con ellas en todo momento, gracias por su apoyo y fortaleza.

A Alex, por sus observaciones y correcciones en la escritura de esta Tesis, gracias por brindarme la oportunidad de compartir contigo esta parte de nuestras vidas.

A la UNAM y al CIFN por brindarme todo el apoyo para mi formación académica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Alex,
por estar juntos, forjando nuevos y viendo culminar viejos sueños ...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. El nitrógeno (N), elemento limitante para las plantas	3
I.2. Estrategias de las plantas para la obtención de N	4
I.2.1. Transporte de NO_3^-	4
I.2.2. Transporte de NH_4^+	6
I.2.3. Simbiosis con bacterias fijadoras de N_2	8
I.3. La asimilación de amonio: el ciclo GS-GOGAT	14
I.3.1. La Glutamino Sintetasa (GS)	15
I.3.2. La Glutamato Sintasa (GOGAT)	17
I.3.3. La Glutamato Deshidrogenasa (GDH)	20
I.4. Metabolismo del carbono en el nódulo	22
I.4.1. La Sacarosa Sintasa (SS)	24
I.4.2. La Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPC)	26
I.4.3. La Malato Deshidrogenasa (MDH)	29
I.5. Las moléculas transportadoras de N	32
I.5.1. La Aspartato Amino Transferasa (AAT)	33
I.5.2. La Asparagino Sintetasa (AS)	35
I.6. La transformación genética de sistemas vegetales	38
I.6.1. Métodos de transformación directa	38
I.6.2. Métodos naturales de transformación: la transformación genética vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
I.6.3. Aplicaciones de la transformación genética	42
I.7. Modulación de la asimilación de amonio en plantas transgénicas....	44
I.7.1. Modulación de la GS.....	44
I.7.2. Modulación de la GOGAT	47
II. JUSTIFICACIÓN	49
III. OBJETIVOS	51
IV. RESULTADOS	52

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.1. Artículo: "Antisense inhibition of NADH-glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)"	52
IV.2. Resultados no incluidos en el artículo	66
IV.2.1. Obtención de plantas transgénicas de alfalfa	66
IV.2.2. Caracterización de las plantas transgénicas con el transgené de NADH-GOGAT en sentido inverso	69
IV.2.2.1. Análisis por Southern-blot	69
IV.2.2.2. Selección de líneas transgénicas GA con reducción en la expresión de NADH-GOGAT en nódulos	71
IV.2.3. Caracterización de la progeñie (T1)	74
IV.2.4. Caracterización de cuatro líneas transgénicas GA de alfalfa (T0)	76
IV.2.4.1. Análisis del contenido de aminoácidos por cromatografía en capa fina (TLC)	76
IV.2.4.2. Capacidad fotosintética	77
IV.2.4.3. Contenido de clorofila	77
IV.2.5. Nodulación de la línea GAS9 vs. control	79
IV.2.5.1. Patrón de distribución de los nódulos en las raíces	79
IV.2.5.2. Resistencia a la inhibición de la nodulación por nitrato	81
V. DISCUSIÓN	88
VI. CONCLUSIONES	99
VII. BIBLIOGRAFÍA	100

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Abreviaturas

asn	Asparagina
asp	Aspartato
AAT	Aspartato amino transferasa
AS	Asparagino sintetasa
C	Carbono
CaMV35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor
Fd	Ferredoxina
gln	Glutamina
glu	Glutamato
GA	Líneas "GOGAT Antisense"
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa o Glutamato oxoglutarato amino transferasa
GS	Glutamino sintetasa
kDa	Kilodaltones
Lb	Leghemoglobina
N	Nitrógeno
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma reducida)
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma oxidada)
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
SS	Sacarosa sintasa

ABSTRACT

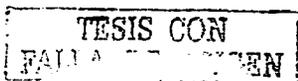
Legume plants may establish symbiosis with the nitrogen-fixing soil bacteria *Rhizobium* and related genera. This interaction induces the formation of a new plant organ, the nodule, where bacteria are housed in the form of bacteroids. The plant provides carbon skeletons to the bacteroids and in turn, the nitrogen fixed by the bacteroids is provided to the plant in the form of ammonium, which is incorporated in organic molecules through the action of the GS (glutamine synthetase)- GOGAT (glutamate synthase) cycle. GS produces glutamine (gln) from glutamate (glu), ATP and ammonium, and GOGAT catalyzes the transamination of 2-oxoglutarate to produce glu. Gln and glu serve as organic nitrogen donors for the biosynthesis of other nitrogen compounds such as asparagine (asn). In alfalfa both, gln and asn, are the principal compounds that are transported to nitrogen sink organs. The carbon metabolism is in close link with ammonium assimilation during symbiosis. For this process carbon skeletons are provided by the activity of SS (sucrose synthase) and PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase). In this study we describe the impact of nodule-specific decrease in NADH-GOGAT expression during the alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. The characterization of four independent stable alfalfa transgenic lines (designated as GA lines) with an antisense NADH-GOGAT fragment driven by the nodule-specific soybean leghemoglobine (*Lbc₃*) promoter is presented. The lines that showed diminished NADH-GOGAT enzyme activity in nodules presented lower levels of mRNA, protein and specific activity of enzymes involved in C and N metabolism. The alterations in N and C metabolism were more drastic in the GA89 line that presented the least NADH-GOGAT remaining activity (33%) with respect to control plants. The GA89 plants showed important alterations in the overall metabolism, nodule amino acids and N content in the shoot were decreased, accompanied by a reduction in the chlorophyll content and in photosynthetic capacity. The nodule-specific inhibition of NADH-GOGAT during symbiosis resulted in an impaired metabolic flux of carbon and nitrogen between photosynthetic and nodule tissue.

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Las plantas leguminosas establecen simbiosis con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno, pertenecientes a las Rhizobiaceas. Esta interacción induce la formación de un nuevo órgano vegetal: el nódulo, donde se albergan las bacterias en la forma diferenciada de bacteroide. Durante la simbiosis, la planta proporciona esqueletos carbonados a los bacteroides, a cambio los bacteroides suministran a la planta el nitrógeno fijado, en forma de amonio, el cual es incorporado en moléculas orgánicas a través del ciclo GS (glutamina sintetasa)- GOGAT (glutamato sintasa). La GS produce glutamina (gln) a partir de glutamato (glu), ATP y amonio, mientras que la GOGAT utiliza gln para catalizar la transaminación del 2-oxoglutarato produciendo glu. La gln y el glu son donadores de nitrógeno orgánico para la biosíntesis de otros compuestos nitrogenados como la asparagina (asn). En la alfalfa, la gln y la asn son los compuestos que principalmente se utilizan para transportar el N hacia los tejidos demandantes. El metabolismo del C se encuentra en estrecha relación a la asimilación de amonio durante la simbiosis, las actividades de las enzimas SS (sacarosa sintasa) y PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa), suministran la mayor parte del carbono necesario para este proceso. En este trabajo se presenta el impacto de la reducción de la expresión de la NADH-GOGAT en la simbiosis de alfalfa con *Sinorhizobium meliloti*. Se caracterizaron cuatro líneas transgénicas de alfalfa transformadas con un fragmento del cDNA que codifica para la NADH-GOGAT en sentido inverso regulado por el promotor nódulo-específico de la leghemoglobina de soya (*Lbc₃*). Las líneas con disminución en la actividad de la NADH-GOGAT en nódulos, presentaron una reducción en los niveles de mRNA, proteína y actividad de enzimas que participan en el metabolismo de C y N en simbiosis. Las alteraciones en el metabolismo de N y C fueron más drásticas en la línea GA89, la cual presentó la menor actividad remanente de la NADH-GOGAT (33%), con respecto a la línea control. Las plantas derivadas de la línea GA89 mostraron alteraciones en el metabolismo general, el contenido de aminoácidos en los nódulos y N total en el follaje disminuyeron, presentando una reducción en el contenido de clorofila y en la capacidad fotosintética. La inhibición nódulo-específica de la NADH-GOGAT durante la simbiosis dio como resultado la alteración del flujo metabólico de C y N entre el tejido fotosintético y el nódulo.



I. INTRODUCCIÓN

I.1. El nitrógeno (N), elemento limitante para las plantas.

El crecimiento y desarrollo de las plantas depende de diversos factores, entre éstos del suplemento de nutrientes, de la disponibilidad de agua, intensidad de luz y temperatura.

Entre los nutrientes, el nitrógeno (N) es un elemento esencial requerido en grandes cantidades por las plantas, ya que comprende alrededor del 1.5% al 2% de su peso seco y es uno de los constituyentes principales de las proteínas (16%), ácidos nucleicos y otras moléculas de la célula (Frink et al., 1999). Además las diferentes formas en las que el N puede ser utilizado por las plantas, actúan como señales que disparan procesos metabólicos que regulan diversas respuestas morfológicas y de desarrollo. Sin embargo, la disponibilidad del N en el suelo lo hace un nutriente limitante.

Las formas de N disponibles para las plantas que se encuentran en el suelo son formas inorgánicas tales como NO_3^- y NH_4^+ , y orgánicas como la urea y los aminoácidos, principalmente. De éstas, las primeras son las formas relativamente más abundantes.

La utilización de las diversas fuentes nitrogenadas se encuentra limitada por su disponibilidad y accesibilidad, ambas en estrecha relación a las condiciones ambientales, particularmente a las características de los suelos (von Wirén, et al., 1997). Es así como en los suelos de agricultura altamente aireados, el NO_3^- es la forma de N más disponible, mientras que en suelos inundados o de climas fríos la forma abundante y disponible es el NH_4^+ . En suelos donde existe una baja mineralización de materia orgánica debido a pH ácidos, bajas temperaturas y actividad microbiana reducida, los aminoácidos son la fuente mayoritaria de N. Sin embargo, los nitratos son altamente móviles en los suelos, mientras que el amonio tiende a ser secuestrado por partículas con carga negativa presentes en el suelo, limitando, por lo tanto, su disponibilidad.

En suelos utilizados para la agricultura se han estimado concentraciones de 6 mM de NO_3^- y de 0.77 mM de amonio, aunque esta alta concentración de NO_3^- no puede ser mantenida por largos períodos debido a su alta movilidad, por lo que las concentraciones de NO_3^- pueden variar rápidamente (Crawford y Glass, 1998). Se

han reportado concentraciones que van de 10 mM de NO_3^- (en una media de 7), a 70 mM, ésta última en 0.4% de los suelos analizados y de 0 hasta 1.8 mM de NO_3^- en el 5% de los suelos.

La mayoría de las plantas son capaces de absorber y asimilar NO_3^- , NH_4^+ , urea y aminoácidos como fuentes de nitrógeno, pero la respuesta a una fuente en particular puede variar entre las especies. Entre estas fuentes, el NO_3^- es considerado como la fuente preferencial de N en varios tipos de suelo, aunque la absorción de NH_4^+ y NO_3^- mantiene un balance catiónico-aniónico entre la rizósfera y las plantas, por lo que una mezcla de ambos en la nutrición favorece el crecimiento y desarrollo de la mayoría de las plantas (Kronzucker et al., 1999).

I.2. Estrategias de las plantas para la obtención de N.

Debido a su alta demanda por nitrógeno, las plantas han generado diversas estrategias para utilizar a la mayoría de las formas disponibles de N, con excepción de la forma diatómica (N_2), que se encuentra restringida a especies de plantas que pueden establecer simbiosis con bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico.

I.2.1. Transporte de NO_3^- .

Siendo el NO_3^- la fuente más abundante de N en los suelos, las plantas han desarrollado mecanismos particulares para su absorción del suelo. Las plantas adquieren el NO_3^- del suelo por absorción a través de un sistema de transportadores que se encuentran en la membrana plasmática de las células epidérmicas o corticales de la raíz. Este sistema de transportadores se encuentra acoplado a un bombeo de H^+ , por lo que se trata de un sistema activo, aún en altas concentraciones de NO_3^- .

En las plantas se han evidenciado al menos tres sistemas de transporte de NO_3^- , que se han clasificado de acuerdo a sus propiedades cinéticas, de los cuales dos son de alta afinidad y el tercero de baja afinidad. Los sistemas de alta afinidad (NTR2), corresponden a transportadores constitutivos (con una afinidad por NO_3^- de 6-20 μM), e inducibles por NO_3^- externo ($K_m = 13-79 \mu\text{M}$). Los sistemas de transportadores de baja afinidad (NTR1), parecen ser constitutivos y su actividad se presenta a concentraciones mayores de 1 mM de NO_3^- .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los genes que codifican los transportadores de NO_3^- de alta afinidad, *NTR2*, han sido clonados de varias especies de plantas como cebada (*Hordeum vulgare*) (Trueman et al., 1996), soya (*Glycine max*) (Amarasinghe et al., 1998), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Quesada et al., 1997) y *Arabidopsis thaliana* (Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Zhuo et al., 1999). Los genes de los transportadores de baja afinidad (*NTR1*), se han aislado de *A. thaliana* (Huang et al., 1996), *Brassica napus* (Muldin e Ingemarsson, 1995) y *Lycopersicon esculentum* (Lauter et al., 1996).

Los genes *NTR2* y *NTR1* se expresan principalmente en la raíz, mientras que en tejidos aéreos (hojas, peciolo y flores) y en semillas su expresión es muy reducida. En la raíz, *NTR2* y *NTR1* se expresan diferencialmente dependiendo del tipo celular y estado de desarrollo de la raíz. *NTR2* se expresa en más altos niveles en las células epidérmicas y de la endodermis de la punta de la raíz, en las partes maduras de la raíz se expresa en las células de la epidermis y en los primordios de raíces laterales (Krapp et al., 1998). En la punta de la raíz, *NTR1* se expresa principalmente en la capa de células epidérmicas, mientras que en las partes maduras de la raíz se expresa en el cortex y en la endodermis (Huang et al., 1996).

La expresión de los dos sistemas de transportadores se encuentra regulada por NO_3^- externo. La expresión de los sistemas de alta afinidad inducibles aumenta rápidamente en presencia de NO_3^- , mientras que los niveles basales de expresión de los sistemas constitutivos de alta y baja afinidad se incrementan. Los niveles de transcrito y proteína de *NTR2* se incrementan rápidamente cuando las raíces son tratadas con concentraciones de 10-50 μM de NO_3^- , previa incubación en un medio libre de fuentes nitrogenadas.

La expresión de los genes *NTR2* está regulada además, por los productos de la asimilación del NO_3^- mediante un proceso de retroalimentación; ante la presencia de amonio o glutamina, se observa una disminución en los niveles de mRNA de *NTR2*, que es mayor cuando se aplican externamente arginina y asparagina (Zhuo et al., 1999). Aunque se desconoce exactamente qué producto de la asimilación del NO_3^- ocasiona este efecto se propone, como en otros sistemas, se trate de glutamina o de una relación glutamina:2-oxoglutarato, u otros aminoácidos como arginina o asparagina (Zhuo et al., 1999).

En *A. thaliana* la expresión de transcritos de *NTR2* se eleva cuando las raíces son transferidas a un medio libre de N, con un máximo de expresión dentro de 24 a

48 horas del tratamiento. Se postula que este efecto puede deberse a que al retirarse el suplemento de NO_3^- , existe una activación de los genes que se encontraban reprimidos por el efecto de retroalimentación, posteriormente se inhibe la expresión de *NTR2*, debido al agotamiento total de NO_3^- . De esta manera los genes *NTR2* están siendo activados tanto por el agotamiento paulatino como por suplemento de NO_3^- (Filleur y Daniel-Vedele, 1999).

Los genes *NTR1* parecen no estar siendo regulados por los productos de la asimilación del NO_3^- y a diferencia de los genes *NTR2*, presentan un decremento en los niveles de transcrito ante la falta de NO_3^- .

Se ha demostrado una fuerte relación entre la toma de NO_3^- con el fotoperíodo. La expresión de los genes *NTR1* y *NTR2* tiene un pico de máxima inducción durante el período de iluminación que coincide con la mayor toma de NO_3^- , la cual disminuye en la oscuridad, aún en presencia de nitrato (Lejay et al., 1999).

Debido a que la única forma de N que es asimilable por las plantas es el amonio, el NO_3^- tomado del suelo debe ser reducido hacia esta forma. Es así como la mayor proporción del NO_3^- que adquieren las plantas es traslocado hacia los tejidos fotosintéticos, principalmente a las hojas, aunque cierta proporción del NO_3^- se asimila en la raíz. En las hojas, el nitrato es reducido a nitrito en el citosol, por medio de la actividad de la nitrato reductasa (NR). Posteriormente el nitrito es reducido a NH_4^+ , a través de la actividad de la nitrito reductasa (NiR), en el cloroplasto (Inokuchi et al., 2002). El amonio producido por estas reacciones se encuentra disponible para las enzimas que participan en su asimilación en moléculas orgánicas como los aminoácidos.

1.2.2. Transporte de NH_4^+ .

Las plantas obtienen el NH_4^+ a través de dos sistemas de transporte de amonio, uno que actúa en concentraciones por debajo de 1 mM de NH_4^+ , tratándose de un sistema de alta afinidad saturable, y un segundo sistema no saturable, que actúa en concentraciones por encima del 1 mM de NH_4^+ externo (von Wirén et al., 1997).

A través de la complementación funcional de mutantes de levadura, deficientes en la toma de NH_4^+ , se han aislado los genes que codifican para los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

transportadores de NH_4^+ en *A. thaliana* (Ninnemann et al., 1994; Gazzarrini et al., 1999) y *L. esculentum* (Lauter et al., 1996). En *A. thaliana* se han encontrado al menos tres transportadores de amonio de alta afinidad (AMT1), que se encuentran codificados por una familia multigénica (*AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3*) (Gazzarrini et al., 1999). En tomate se han descrito dos genes para estos transportadores, *LeAMT1-1* y *LeAMT1-2* (Lauter et al., 1996). Estos genes codifican proteínas integrales de membrana que poseen una alta afinidad por NH_4^+ y que utilizan una fuerza protónica para transportar el NH_4^+ al interior de la célula.

La localización de estos transportadores de NH_4^+ se restringe casi exclusivamente a la raíz, indicando su importancia en la adquisición del NH_4^+ que se encuentra en el suelo. Los genes *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3* se expresan únicamente en la raíz, mientras que *AtAMT1.1* se expresa en todos los órganos examinados (tallo, hojas jóvenes y maduras y en primordios) (Gazzarrini et al., 1999). Las propiedades bioquímicas y cinéticas de los transportadores podrían explicar esta expresión diferencial en los diversos tejidos, *AtAMT1.1* muestra la mayor afinidad por NH_4^+ ($K_m = 8 \mu\text{M}$), *AtAMT1.3* y *AtAMT1.2* tienen un valor de K_m por NH_4^+ de $11 \mu\text{M}$ y $24 \mu\text{M}$, respectivamente.

Los genes *LeAMT1-2* y *LeAMT1-1* se expresan también preferencialmente en la raíz, aunque *LeAMT1-1* se expresa principalmente en los pelos radiculares y *LeAMT1-2* se expresa además en el resto de la raíz (von Wirén et al., 1997; Lauter et al., 1996).

Los genes *AMT1* se encuentran regulados diferencialmente por NH_4^+ , por el período de iluminación así como por NO_3^- . Se evidenció que *AtAMT1.1* se expresa en condiciones de deficiencia de N; plantas sujetas a tratamientos de precultivos en KNO_3 o NH_4NO_3 y transferidas a un medio sin fuente nitrogenada, presentaron un incremento en los niveles de mRNA de *AtAMT1.1* y en menor nivel de *AtAMT1.2*. El gen *AtAMT1.3* se encuentra regulado por la luz, se induce en el período de iluminación que coincide con una alta demanda de carbohidratos por la raíz para la asimilación de NH_4^+ sugiriendo además, que se encuentra regulado por la disponibilidad de carbono en las raíces. Los tres genes *AtAMT* se reprimen en la oscuridad (Cardenas-Navarro et al., 1998).

Los genes *LeAMT1* tienen una expresión constitutiva; se expresaron en todos los tratamientos con diversas fuentes nitrogenadas, incluyendo NH_4^+ , aunque su acumulación fue menor en presencia de NO_3^- .

Debido a que los genes *AMT* son expresados en bajos niveles en otras partes de la planta, se postula que tienen un papel importante en el transporte de NH_4^+ en estos tejidos. Se ha evidenciado un transporte de NH_4^+ a través del sistema vascular, probablemente estos transportadores participen en el proceso de distribución del NH_4^+ tomado del suelo, así como en la reasimilación del NH_4^+ proveniente de la fotorrespiración.

1.2.3. Simbiosis con bacterias fijadoras de N_2 .

Otra estrategia que ha generado cierto grupo de plantas es la adquisición del N a través del establecimiento de una asociación mutualista con bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico.

Existen al menos 2 tipos de asociaciones: 1) asociaciones con bacterias ectosimbióticas como *Azospirillum*, *Azotobacter*, que viven en la rizósfera de las plantas hospederas, *Herbaspirillum* y *Azoarcus*, que viven en los espacios intercelulares de las raíces o de las partes aéreas de las plantas. 2) Asociaciones endosimbióticas con bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (que pertenecen a la familia Rhizobiaceae) y *Actinomyces*, que viven la mayoría de ellas en la raíz, albergadas en estructuras especializadas.

En particular, las plantas de la familia Leguminosae, cuando crecen en condiciones limitantes de N, pueden establecer simbiosis con bacterias de la familia Rhizobiaceae. Esta asociación da por resultado la formación de estructuras especializadas, los nódulos, donde las bacterias diferenciadas en bacteroides, comienzan a fijar el nitrógeno atmosférico, reduciéndolo a la forma de NH_4^+ . Este amonio es exportado hacia el citosol de las células de la planta hospedera y finalmente asimilado en moléculas orgánicas. A cambio del N aportado por la bacteria, la planta provee de esqueletos carbonados a su simbiote.

Los rhizobia son bacterias Gram- que en vida libre se encuentran en el suelo, donde llegan a percibir los exudados de las raíces de su hospedero específico. La primera fase de la interacción entre estas bacterias y las leguminosas se establece

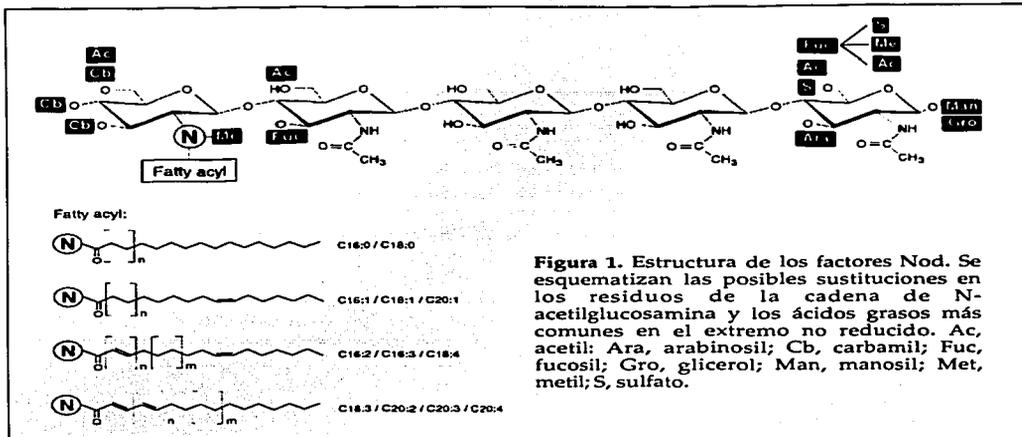
cuando la bacteria percibe y es atraída por estos exudados de la raíz, generalmente compuestos fenólicos, dando como resultado una atracción quimiotáctica positiva hacia las raíces de la planta (Caetano-Anollés et al., 1988). Es así como la interacción entre los rhizobia y su hospedero depende del reconocimiento específico de estas moléculas señalizadoras (Bladergroen et al., 1998).

Durante las etapas tempranas de esta asociación, los flavonoides secretados por la planta inducen en la bacteria la síntesis de los denominados factores Nod. Éstos son lipoquitooligosacáridos (LCOs) (Figura 1), que a su vez actúan como moléculas señal, permitiendo el reconocimiento de la bacteria por su hospedero específico.

En la síntesis de los factores Nod participan los denominados genes *nod*. Estos genes codifican las proteínas NodA, NodB y NodC, que sintetizan el esqueleto principal de los factores Nod, constituido por una cadena de N-acetilglucosaminas, de 3 a 5 residuos, unidos por enlaces β -1,4, que tiene en su extremo no reducido un ácido graso (Figura 1). Los factores Nod presentan diversas sustituciones o decoraciones tanto en el extremo reducido como el no reducido, que son sintetizadas por diferentes proteínas Nod en las diversas especies de rhizobia. En el caso particular de *Sinorhizobium meliloti*, las proteínas NodH y NodPQ participan en la sulfatación del esqueleto básico del factor Nod (Fisher y Long, 1992; Cullimore et al., 2001). Esta sustitución tiene un papel importante en el reconocimiento del simbiote por parte de su hospedero, ya que determinan la infección de esta bacteria sólo a especies de *Medicago*.

Una vez sintetizados, los factores Nod son excretados a la rizósfera donde interactúan de manera específica con el hospedero. En este proceso se ha propuesto, participan receptores que se encuentran en la superficie de la raíz (Geurts et al., 1997; Niebel et al., 1997). Recientemente se han identificado receptores tipo cinasa que participan en la percepción y transducción de la señal de los factores Nod (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Estos factores además inducen varias respuestas relacionadas con la iniciación de la formación de los nódulos en las raíces, como lo son la deformación de los pelos radiculares, la formación de los hilos de infección, así como de la inducción de la división de las células corticales de la raíz (Figura 2) (Schultze y Kondorosí, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



En la superficie de la raíz, los rhizobia, degradan las paredes celulares y penetran a través de una estructura denominada hilo infectivo. Estos hilos infectivos que se ramifican, conducen a las bacterias en división activa hacia las células del cortex de la raíz donde finalmente penetran. Durante esta etapa las bacterias inician un proceso de diferenciación hacia la forma de bacteroide. Finalmente las bacterias son endocitadas por las células del hospedero, lo que las hace estar rodeadas por una membrana de origen vegetal, llamada membrana peribacteroidal.

Este proceso está acompañado de cambios morfológicos significativos de la bacteria, dando por resultado la generación de bacteroides diferenciados con importantes adaptaciones fisiológicas con respecto a sus capacidades enzimáticas, entre ellas, la producción de la nitrogenasa para la fijación del N_2 atmosférico y de una oxidasa terminal altamente eficiente, requerida para la respiración aeróbica en un ambiente microaeróbico.

En esta etapa también la planta presenta cambios en la expresión de genes que participan en la formación y funcionalidad del nódulo, denominadas nodulinas tempranas y tardías (Pawlowski, 1997).

En las leguminosas se distinguen 2 tipos de nódulos: los nódulos determinados y los indeterminados, que se diferencian por su desarrollo y morfología (Figura 2). El primordio de los nódulos determinados deriva de la división de las células del cortex externo, mientras que el de los indeterminados deriva de la división de las capas internas. Los nódulos determinados presentan un desarrollo temporal, es decir, sus etapas de diferenciación se presentan consecutivamente a través del tiempo. La actividad meristemática del primordio desaparece en etapas tempranas de la formación del nódulo, a partir de este momento el crecimiento del nódulo se genera por expansión celular (Figura 2). Posteriormente los nódulos alcanzan su madurez, convirtiéndose en nódulos funcionales para finalmente entrar en la etapa de senescencia, donde el nódulo comienza a degenerar y deja de ser funcional (Crespi y Gálvez, 2000).

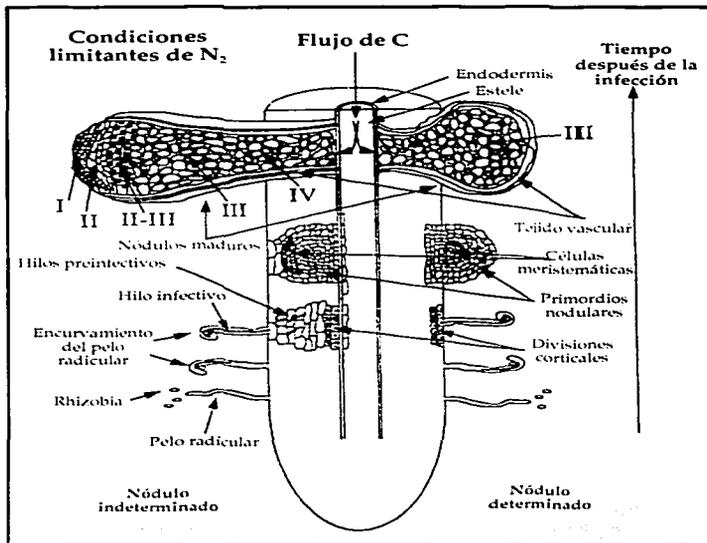


Figura 2. Esquema del desarrollo de los nódulos indeterminados y determinados. Bajo condiciones de limitación de fuentes nitrogenadas inorgánicas, los rizobios interactúan con los pelos radiculares de la raíz, induciendo su deformación. Las bacterias penetran por medio de los hilos de infección, al mismo tiempo que se activa la división celular en el periciclo y en el cortex interno (nódulo indeterminado) o externo (nódulo determinado), para la formación de los primordios nodulares. En los nódulos indeterminados se distingue la zona meristemática de crecimiento continuo (I), mientras que en los nódulos determinados esta zona es transitoria. I, zona meristemática; II, zona de invasión; II-III interzona; III, zona de fijación y IV, zona de senescencia de los nódulos indeterminados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A diferencia de los nódulos determinados, en los indeterminados, las etapas de desarrollo se encuentran representadas a lo largo del nódulo. Se caracterizan por presentar un meristemo apical persistente a partir del cual se genera el crecimiento del nódulo. Se distinguen principalmente 5 regiones (Vasse et al., 1990): zona I, que comprende el meristemo; zona II, la zona de invasión; la interzona (II-III), que se caracteriza por ser una zona con alto contenido de amiloplastos y donde las bacterias se diferencian hacia bacteroides; la zona III, que contiene a las células infectadas, donde se lleva a cabo la fijación de N_2 y la zona IV o zona de senescencia; donde las células degeneran. Ambos tipos de nódulos se encuentran rodeados por un cortex interno y externo, así como de tejido vascular (Figura 2).

Las leguminosas de climas tropicales como el frijol y la soya, forman nódulos determinados exportadores de ureidos, mientras que las leguminosas de climas templados como la alfalfa, el chícharo y el haba, forman nódulos indeterminados, exportadores de amidas.

Es conocida la paradoja que existe entre la demanda de energía para la fijación de N_2 y la limitación de oxígeno en el nódulo para el funcionamiento de la nitrogenasa. Debido a que la nitrogenasa es inactivada por oxidación irreversible de sus centros metálicos, así como su expresión y síntesis inhibidas por O_2 , es en el nódulo donde se encuentra un ambiente microaeróbico idóneo para su expresión y funcionamiento. Sin embargo, a su vez, la fijación de N_2 es un proceso que demanda energía y poder reductor, por lo que los bacteroides deben mantener una respiración altamente activa para proveer a la nitrogenasa de suficiente ATP.

Las plantas mantienen este microambiente ($pO_2 < 25 \text{ nM}$), por medio de "barreras" físicas y biológicas que controlan el flujo de oxígeno al interior del nódulo. En este proceso intervienen cambios en el potencial osmótico de las células del cortex interno del nódulo, que generan una barrera cambiante para la difusión de oxígeno (Purcell y Sinclair, 1994). Además de esta barrera mecánica, las plantas sintetizan una proteína acarreadora de oxígeno, que facilita el transporte de éste hacia los bacteroides, la leghemoglobina (Lb) (Appleby, 1984). La Lb es una proteína citosólica que comprende alrededor del 35% del total de proteínas del nódulo que se induce previamente a la actividad de la nitrogenasa en nódulos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

efectivos (Marcker et al., 1984), mientras que su expresión y concentración disminuye en nódulos inefectivos.

Una vez establecido el microambiente en el nódulo, el bacteroide inicia la fijación de N_2 por medio de la nitrogenasa a través de la siguiente reacción de reducción: $N_2 + 16 ATP + 8 H^+ + 8 e^- \longrightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P_i$

El NH_3 , producto de esta reacción es transportado hacia la membrana peribacteroidal (que rodea al bacteroide), donde se protona para producir finalmente NH_4^+ , el cual es transportado hacia el citoplasma de la célula vegetal. En el movimiento de NH_4^+ a través de la membrana peribacteroidal participan canales de cationes monovalentes que han sido identificados por medio de la técnica de "patch-clamp", a partir de soya y *Lotus japonicus* (Tyerman et al., 1995).

Se han identificado proteínas del nódulo que participan en el transporte de amonio. A partir de una librería de nódulo de soya, se ha logrado aislar un cDNA (*GmSAT1*), que podría codificar para un canal de amonio de la membrana peribacteroidal. *GmSAT1* codifica para una proteína membranal de 39 kDa que no presenta homología con otras proteínas que funcionan como transportadores, por lo que se postula que más bien que ser el propio canal se trata de una proteína que interactúa con él, promoviendo su actividad y cambios en sus propiedades. Debido a que *GmSAT1* tiene dominios de unión a DNA del tipo hélice-vuelta-hélice, que presentan ciertos factores de transcripción, se cree funcione adicionalmente como un factor transcripcional (Day et al., 2001).

Estudios con $^{15}N_2$ en nódulos, indican que el primer producto de la fijación de N_2 es el $^{15}NH_3$, que posteriormente es excretado en forma de NH_4^+ hacia el citoplasma de las células del hospedero. Conjuntamente con la evidencia de que los bacteroides poseen bajas actividades de las enzimas requeridas para la asimilación de NH_4^+ , y que las células de la planta hospedera presentan altas actividades de estas enzimas (GS y GOGAT), durante la simbiosis en los nódulos, se ha aceptado que el N_2 fijado por los bacteroides es excretado como NH_4^+ y que es ésta la forma de N asimilada en aminoácidos en el citosol de las células de la planta. Sin embargo, datos recientes indican que los aminoácidos podrían ser también el producto nitrogenado excretado por los bacteroides hacia el hospedero. En soya se ha evidenciado que la alanina es el principal compuesto nitrogenado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

excretado por los bacteroides (Waters et al., 1998), mientras que en chícharo los bacteroides excretan una combinación de alanina y amonio (Allaway et al., 2000).

Una vez que el amonio ha sido liberado en el citoplasma de las células del hospedero, éste es rápidamente asimilado por medio de un ciclo metabólico en el que participan 2 enzimas: la GS (glutamino sintetasa) y la GOGAT (glutamato 2-oxoglutarato amino transferasa o glutamato sintasa).

I.3. La asimilación de amonio: el ciclo GS-GOGAT.

Independientemente del origen del NH_4^+ , ya sea tomado directamente del suelo, producto de la reducción del NO_3^- , proveniente del proceso de la fotorrespiración o de la fijación de N_2 , las plantas lo asimilan a través de la acción conjunta de las enzimas GS (glutamino sintetasa) y GOGAT (glutamato 2-oxoglutarato amino transferasa o glutamato sintasa), que conforman el ciclo GS - GOGAT (Figura 3).

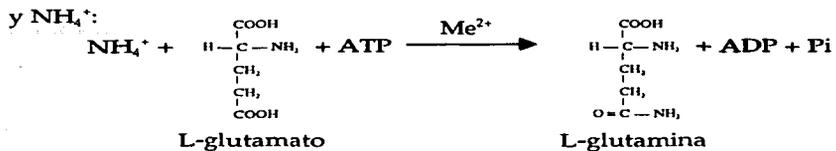
Los estudios bioquímicos y moleculares han revelado la existencia de múltiples isoformas de estas enzimas que son reguladas diferencialmente por estímulos ambientales, control metabólico y el desarrollo, además de presentar una especificidad celular. Dependiendo de la procedencia del amonio, las diversas isoformas de estas enzimas cumplen diferentes papeles en su asimilación. La localización de estas formas en los distintos tejidos, así como su patrón diferencial de expresión en éstos, han evidenciado el posible funcionamiento de estas enzimas en la asimilación de amonio.

Las plantas pueden asimilar el amonio al menos de dos maneras: algunas plantas pueden asimilarlo en las raíces (o en los nódulos de leguminosas), donde participan principalmente las formas de GS y de GOGAT que se encuentran en este tejido, la isoforma GS1 (Lam et al., 1996; Temple y Sengupta-Gopalan, 1997) y la dependiente de NADH, respectivamente (Hayakawa et al., 1999). Otras plantas, en cambio, toman el nitrato del suelo transportándolo hacia las hojas donde es reducido a amonio en el cloroplasto y asimilado por la acción de las isoformas GS2 y Fd-GOGAT, que participan en la asimilación primaria de amonio, derivado de la reducción del nitrato o de la fotorrespiración, así como en la reasimilación del amonio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.1. La Glutamino Sintetasa (GS).

La GS cataliza la síntesis de glutamina (gln) a partir de glutamato (glu), ATP



La GS es una proteína octamérica, con un peso molecular que va de 320 a 380 kDa, donde cada subunidad tiene un peso de alrededor de 38 a 45 kDa. La GS presenta una afinidad muy alta por amonio ($K_m = 3-5 \mu\text{M}$). Cada una de las subunidades que componen a la GS se encuentra codificada por distintos genes que son miembros de una familia multigénica. Las distintas isoformas de GS que se encuentran en las plantas derivan de la múltiple combinación de cada una de las subunidades para formar octámeros, ya sean homo- o heterooctámeros.

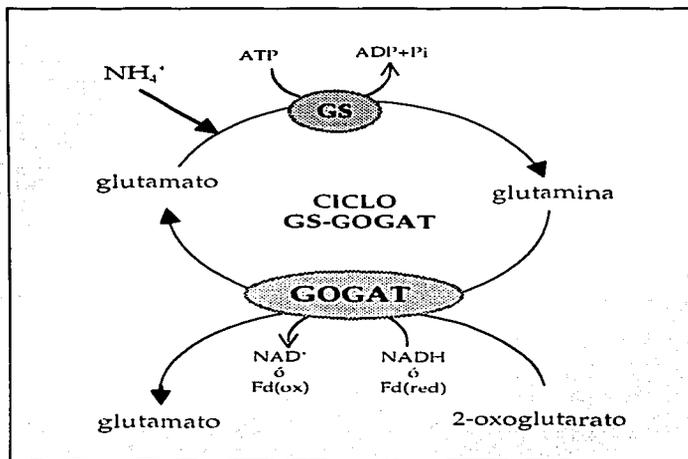


Figura 3. Ciclo GS - GOGAT en plantas para la asimilación de amonio.

En las plantas existen 2 isoformas principales de GS, una de ellas citosólica (GS1) y la otra cloroplástica/plastídica (GS2), que se han identificado por sus propiedades inmunológicas e isoeléctricas.

El papel fisiológico de la GS1 y la GS2 se ha atribuido de acuerdo a su distribución órgano-específica. La GS2 es una isoenzima que predominantemente se encuentra en las hojas, participando en la asimilación primaria de amonio, derivado de la reducción del nitrato y en la reasimilación del amonio, producto de la fotorrespiración. La GS1 se encuentra principalmente en la raíz donde asimila el amonio absorbido del suelo (Lam et al., 1996), o producido por otros procesos fisiológicos, incluyendo el catabolismo de aminoácidos, metabolismo de fenilpropanoides y la fijación biológica de N₂ (Temple y Sengupta-Gopalan, 1997).

En el nódulo la forma abundante (que puede llegar a representar hasta el 2% de la proteína soluble total), es la GS1. Su actividad se incrementa durante el desarrollo del nódulo alcanzando un nivel máximo cuando se detecta el inicio de la actividad de la nitrogenasa y con la aparición de la leghemoglobina (Cullimore et al., 1984). La GS1 de nódulo se ha caracterizado ampliamente en diversas especies de leguminosas, a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Bennett y Cullimore, 1989), *Medicago sativa* (Temple et al., 1995), *Medicago truncatula* (Stanford et al., 1993), soya (Morey et al., 2002) y *Pisum sativum* (Tingey et al., 1987).

La familia multigénica de la GS de *P. vulgaris* está compuesta por 4 genes: *gln-α*, *gln-β*, *gln-γ* y *gln-δ*. Los tres primeros codifican la GS1, presentando una homología que va del 76% al 86% entre sus secuencias nucleotídicas. Las formas abundantes en el nódulo son las subunidades codificadas por los genes *gln-β* y *gln-γ*, aunque ésta última se encuentra en mucho mayor proporción que la primera. Es así como el producto de *gln-γ* es la forma que se expresa en altos niveles en las células de los nódulos fijadores. 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.

En alfalfa se han identificado dos genes que codifican para dos formas distintas de GS1, las cuales comparten una identidad del 90% a nivel de secuencia de aminoácidos y que muestran diferentes patrones de expresión en los nódulos (Temple et al., 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GOGAT de nódulo de alfalfa tiene 7.2 kb y la genómica mide alrededor de 12 kb, con 22 exones y 21 intrones. La NADH-GOGAT de alfalfa guarda una alta identidad con la subunidad grande (46%) y pequeña (38%), de la NADPH-GOGAT de *E. coli* y con la secuencia de la Fd-GOGAT de maíz (48%), a nivel de secuencia de aminoácidos. En alfalfa las secuencias de las subunidades correspondientes a la grande y pequeña de *E. coli*, se encuentran unidas por una secuencia de 57 aminoácidos. El gen que codifica la NADH-GOGAT de arroz mide 17.1 kb, con una región traducible de 11.7 kb, que contiene 23 exones separados por 22 intrones, en un arreglo similar al de la secuencia de alfalfa. La secuencia de aminoácidos de la NADH-GOGAT de arroz tiene un 75% de identidad con la NADH-GOGAT de alfalfa y un 45 % de identidad con la Fd-GOGAT de maíz.

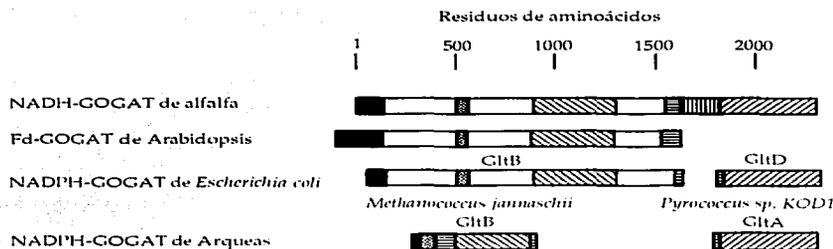


Figura 4. Similitud entre las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas de arqueas, bacterias y plantas. ■, representa regiones de poca similitud, que no se encuentran en la proteína madura. □, corresponde a regiones que guardan similitud entre las glutamato sintasas de plantas y *E. coli*. ▨ y ▩, representan secuencias con similitud en todas las proteínas, que corresponden a los sitios catalíticos y de unión a cofactores. ▧, son regiones que no tienen similitud y ▨, indica la secuencia "conectora" de las subunidades correspondientes a la grande y pequeña de *E. coli* en la NADH-GOGAT de alfalfa. Tomado de Temple et al., 1998b.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la NADH-GOGAT de alfalfa y arroz, Fd-GOGAT de *Arabidopsis* y NADPH-GOGAT de *E. coli*, permite evidenciar que las NADH-GOGAT (de plantas), contienen secuencias que corresponden a las subunidades grande y pequeña de *E. coli*. Como la secuencia de alfalfa, la de arroz muestra una región de aminoácidos "conectora", que une a lo que corresponde a las subunidades grande y pequeña de la NADPH-GOGAT de *E.*

coli. Esto indica que en las plantas ambos genes están fusionados y dan lugar a una proteína de 204 kDa (Figura 4). Las regiones conectoras en la NADH-GOGAT de alfalfa y arroz están conformadas por 57 y 36 aminoácidos, respectivamente, conservando una homología del 31% (Goto et al., 1998).

Las GOGAT de plantas tienen una localización plastídica. Las secuencias de los genes que las codifican revelan una presecuencia de 99 y de 101 aminoácidos en arroz (Goto et al., 1998) y alfalfa (Gregerson et al., 1993), respectivamente. Estas presecuencias tienen características de péptidos líder que guían la internalización de las proteínas hacia los plástidos (donde se encuentran sus cofactores), poseen una carga neta positiva y una alta proporción de residuos de treonina y/o serina (Gregerson et al., 1993, Goto et al., 1998). Estas presecuencias son una evidencia que apoya la suposición de que los genes fueron transferidos al núcleo en las plantas (después del establecimiento de la endosimbiosis con los ancestros de los cloroplastos de eucariotes), y que guardaron su funcionalidad en los plástidos, mientras que las algas representan el paso intermedio de este proceso de transferencia, debido a que aún en algunas de ellas los genes de GOGAT tienen una localización plastídica (Temple et al., 1998b).

Las glutamato sintasa han sido purificadas de diversas especies de plantas. Ambas formas de GOGAT se encuentran confinadas a los plástidos (Sakakibara et al., 1991; Gregerson et al., 1993). La Fd-GOGAT se ha purificado y caracterizado a partir de tejidos fotosintéticos de espinaca (Hirasawa y Knaff, 1991), maíz (Sakakibara et al., 1991), arroz (Suzuki y Gadal, 1982) y tomate (Avila et al., 1987). La Fd-GOGAT es la forma predominante en cloroplastos de tejidos fotosintéticos (Suzuki y Gadal, 1982; Botella et al., 1988), participando en la asimilación de amonio derivado de la reducción del nitrato y de la fotorrespiración (Lam et al., 1996), aunque también se han localizado isoformas de Fd-GOGAT en raíces de maíz, *Arabidopsis* y arroz (Redinbaugh y Campbell, 1993; Coschigano et al., 1998).

La NADH-GOGAT ha sido localizada principalmente en los plástidos de tejidos no fotosintéticos, tales como raíces (Hayakawa et al., 1999) y nódulos de leguminosas (Chen y Cullimore, 1988; Anderson et al., 1989; Gregerson et al. 1993; Trepp et al., 1999b; Ishiyama et al., 1998), donde tiene un papel importante en la asimilación del amonio derivado de la reducción del NO_3^- , del tomado del suelo o del que proviene de la fijación biológica de N_2 . Esta isoforma de GOGAT se ha

logrado purificar a partir de nódulos de leguminosas (Matoh et al., 1980; Anderson et al., 1989) y cultivos de células de arroz (Hayakawa et al., 1992).

En los nódulos de frijol se han identificado dos isoenzimas, la NADH-GOGAT I y la NADH-GOGAT II, ambas se incrementan en los nódulos fijadores de N_2 , 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 y Cullimore, 1988). En alfalfa se ha reconocido una única isoforma, que sigue un patrón similar de expresión en la simbiosis, se detecta únicamente en los nódulos funcionales y no en otros tejidos como raíces y hojas (Anderson et al., 1989) o nódulos inefectivos (Egli et al., 1989).

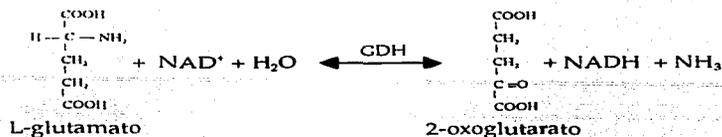
La abundancia de los transcritos y proteína de la isoforma NADH-GOGAT de nódulo, se incrementa durante la simbiosis (Gregerson et al., 1993; Egli et al., 1989). Se ha detectado en diversas leguminosas un incremento en los niveles de transcrito de NADH-GOGAT durante el desarrollo del nódulo. En alfalfa se ha determinado, por medio de hibridación *in situ*, una elevación en los niveles de transcrito de la NADH-GOGAT en los nódulos maduros funcionales, principalmente en la zona de fijación y en la interzona, mientras que en simbiosis no efectivas no fueron detectados transcritos de NADH-GOGAT (Trepp et al., 1999a).

La disección y estudio de las secuencias regulatorias en el promotor del gen de la NADH-GOGAT, han permitido establecer las posibles secuencias o motivos que participan en su expresión tejido-específica (Trepp et al., 1999a). Estos datos correlacionan con la ubicación de la proteína dentro del tejido del nódulo. Por medio de inmunocitlocalización se ha determinado que la NADH-GOGAT se encuentra principalmente en la zona de fijación, ubicándose en la periferia de las células infectadas y no infectadas (aunque en éstas últimas la señal obtenida es más débil), por lo que se le ha atribuido la función como la enzima, que en conjunción con la GS, participa en la asimilación de amonio derivado de la fijación de N_2 (Trepp et al., 1999b).

1.3.3. La Glutamato Deshidrogenasa (GDH).

La GDH cataliza la reacción reversible de producción de glutamato a partir de 2-oxoglutarato y amonio (Oaks, 1994):

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esta vía fue considerada como la ruta principal de la asimilación de amonio inorgánico en las plantas hasta el descubrimiento del ciclo GS - GOGAT (Lea y Miflin, 1974).

Se conocen dos isoformas hexaméricas de GDH, una de ellas dependiente de NAD(H) que se localiza en las mitocondrias y la segunda dependiente de NADP(H), que se encuentra en los cloroplastos (Lam et al., 1996).

Debido al descubrimiento de la vía alternativa de asimilación de amonio, por el ciclo GS-GOGAT, el papel de la GDH quedó a discusión. A pesar de que la actividad de GDH se presenta en niveles relativamente altos en las plantas, su papel fisiológico ha permanecido en debate, debido a entre otras cosas, a sus propiedades cinéticas. El nivel de actividad de la GDH en plantas es baja en comparación con la GS y GOGAT, presenta una Km alta por el amonio (>1 mM) con respecto a la GS (Km= 3-5 µM), por lo que su afinidad por el amonio es baja. Estos datos sugieren que la actividad de GDH se presenta en altas concentraciones de amonio, que serían perjudiciales para las células vegetales. En nódulos de alfalfa se determinó una Km= 80 mM por el amonio y para otras leguminosas un valor que va de 40 a 100 mM para la GDH que se encuentra en los nódulos (Groat y Vance, 1981; Temple et al., 1998b).

Se ha planteado que la GDH tiene principalmente un papel catabólico, más que biosintético, participando en la removilización del amonio del glutamato, al mismo tiempo produciendo además, cuerpos carbonados para el ciclo de los ácidos tricarbónicos en condiciones donde el carbono es limitante, como en períodos de oscuridad o en ausencia de sacarosa (Melo-Oliveira et al., 1996). El papel catabólico de la GDH también se ha asociado con la removilización del amonio del glutamato durante los procesos de senescencia y maduración de frutos, puesto que se ha observado una inducción en la expresión de la GDH bajo estas condiciones (Harrison et al., 2000; Lancien et al., 2000).

Se ha reportado una alta actividad de la NADH-GDH en nódulos fijadores de N_2 , sin embargo su papel en la simbiosis permanece sin elucidarse. Los datos de Groat y Vance (1981) y Egli et al. (1989), sugieren que no existe una relación entre la fijación del nitrógeno atmosférico y la actividad de la GDH en nódulos de alfalfa. Los autores asocian la actividad de la NADH-GDH con la asimilación de amonio durante el proceso de senescencia, debido a que se presenta una actividad relativamente alta en nódulos senescentes que es más consistente con un papel en el reciclamiento del N y C en los nódulos (Egli et al. , 1989).

Otra función que se le atribuye a la GDH es el de participar en la destoxificación de los tejidos sujetos a condiciones que inducen altas concentraciones de amonio. Algunos estudios han demostrado que la actividad enzimática de la GDH se induce en plantas expuestas a altas concentraciones de amonio. Mediante el uso de plantas mutantes de *Arabidopsis* en la GDH, se han observado cambios en los niveles de sus transcritos dependiendo de los niveles de C/N suplementados, sugiriendo que la GDH no tiene un papel redundante en la asimilación de amonio en condiciones de exceso de nitrógeno inorgánico (Melo-Oliveira et al., 1996).

1.4. Metabolismo del carbono en el nódulo.

El funcionamiento del nódulo depende del importe y metabolismo de la sacarosa, así como de la fijación de CO_2 , como fuente de energía y esqueletos carbonados para la fijación del N_2 atmosférico y asimilación del amonio, así como para la exportación de compuestos nitrogenados.

El costo de carbono (C) para la asimilación de amonio en el nódulo es muy elevado, se ha estimado se requieren de 5 a 10 g de C por 1 g de N reducido, por lo que existe una estrecha dependencia por el aporte de C para este proceso.

La fuente principal de C para el metabolismo del nódulo es la sacarosa que proviene de las hojas como producto de su actividad fotosintética, la cual es metabolizada en el nódulo hacia ácidos orgánicos (Figura 5). Estudios con $^{14}CO_2$ han demostrado que la sacarosa formada en las partes aéreas fotosintéticas es transportada hacia los nódulos (en 15 minutos), donde alcanza concentraciones de 3 a 6 mg/ peso fresco (Reibach y Streeter, 1983).

En el nódulo, la sacarosa es rápidamente metabolizada hacia ácidos orgánicos (Rosendahl et al., 1990), principalmente malato (el cual se cree es la fuente carbonada principal utilizada por la bacteria endosimbiótica), a través de la actividad de 3 enzimas, la sacarosa sintasa (SS), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la malato deshidrogenasa (MDH). La sacarosa es metabolizada, produciendo hexosas que son fosforiladas por hexoquinasas, entrando a la vía glucolítica y oxidativa de las pentosas fosfato donde son metabolizadas a fosfoenolpiruvato. El fosfoenolpiruvato sirve como sustrato para la fijación de CO_2 , por la actividad de la PEPC, proporcionando una importante cantidad de carbono en forma de oxaloacetato, necesario para la formación de malato y aspartato. El malato se forma por la actividad enzimática de la MDH (Figura 5).

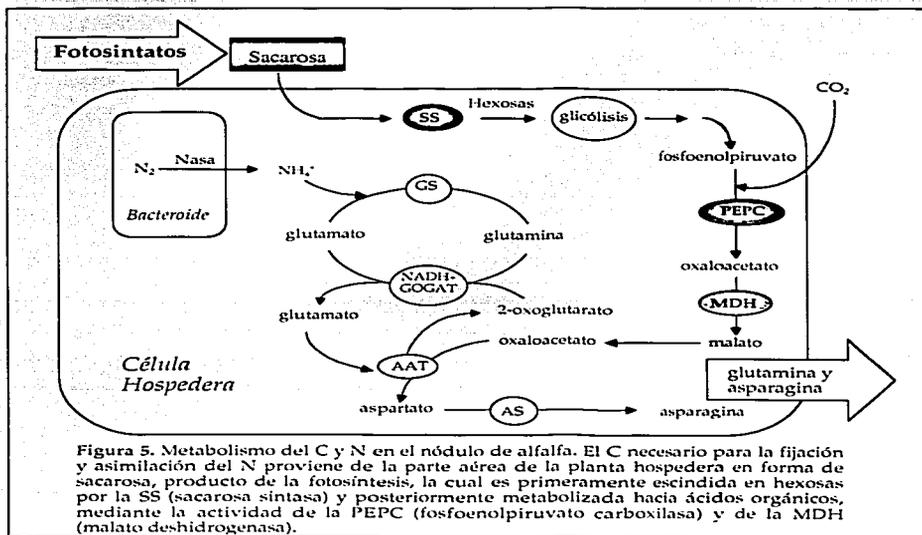


Figura 5. Metabolismo del C y N en el nódulo de alfalfa. El C necesario para la fijación y asimilación del N proviene de la parte aérea de la planta hospedera en forma de sacarosa, producto de la fotosíntesis, la cual es primeramente escindida en hexosas por la SS (sacarosa sintasa) y posteriormente metabolizada hacia ácidos orgánicos, mediante la actividad de la PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa) y de la MDH (malato deshidrogenasa).

Se ha evidenciado una actividad importante y expresión elevada de estas enzimas en nódulos efectivos de varias especies de leguminosas, que demuestran la presencia de isoformas nódulo-específicas, que han sido reportadas como parte

de las llamadas nodulinas tardías (Gordon y James, 1997; Pathirana et al., 1997; Miller et al., 1998; Fedorova et al., 1999; Hohnjec et al., 1999).

1.4.1. La Sacarosa Sintasa (SS).

La sacarosa como producto de la fotosíntesis, es la forma principal de C translocada y el primer sustrato para los tejidos demandantes de carbono, como el nódulo. La SS es la enzima encargada de iniciar el metabolismo de la sacarosa mediante su hidrólisis, en las células del nódulo:



Esta proteína es una enzima homotetramérica, compuesta por subunidades de 92 a 93 kDa, que presenta una alta actividad en los nódulos, representando cerca del 1% del total de las proteínas solubles en este tejido (Robinson et al., 1999; Anthon y Emerich, 1990).

A partir de diversas leguminosas se ha logrado aislar el cDNA que codifica para la SS nódulo-específica, entre éstas *Vicia faba* (Küster et al., 1993), *M. truncatula* (Hohnjec et al., 1999), *P. sativum* (Fedorova et al., 1999), *M. sativa* (Robinson et al., 1999), *P. vulgaris* (Silvente et al., 2003) y de *L. japonicus* (Skot et al., 1996).

La longitud del cDNA de la SS va de 2.5 a 2.7 kb entre las diversas especies de leguminosas cuyas secuencias guardan entre sí una alta homología. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas revelan una alta identidad que va del 80 al 90%, que es menor cuando se les compara con otras SS provenientes de plantas no leguminosas como *A. thaliana* o maíz con las que guardan una identidad del 75%, o con otras isoenzimas de SS de leguminosas que no son nódulo-específicas como la SS de chícharo, que se encuentra en la testa de la semilla, con la que guardan una identidad del 70% (Buchner et al., 1998).

Otra característica que comparten las SS de plantas es que presentan una secuencia consenso para la fosforilación por proteínas cinasas dependientes de calcio. Este motivo se encuentra en el extremo amino terminal y posee un residuo de serina factible para la fosforilación (Hohnjec et al., 1999), que se encuentra muy conservado en todos los genes de SS caracterizados hasta ahora. Zhang y Chollet, (1997a), evidenciaron por experimentos *in vitro*, que la SS de nódulos de soya es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

susceptible a ser fosforilada por una proteína cinasa dependiente de calcio en ese residuo de serina. Se ha postulado que la fosforilación de la SS es un mecanismo de regulación post-traducciona1 de esta enzima.

La expresión a nivel de transcritos de la isoforma de SS de nódulos se detecta en bajos niveles (alrededor de 10 veces menor), en otros tejidos como raíces no infectadas, tallos y hojas (Küster et al., 1993; Hohnjec et al., 1999; Fedorova et al., 1999). Por medio de hibridización *in situ* en chícharo, se ha evidenciado que los transcritos de SS se encuentran distribuidos a lo largo del nódulo de forma constante, excepto en la zona meristemática y en la de senescencia (Fedorova et al., 1999), mientras que en alfalfa también se presenta en el meristemo y de la misma manera que en chícharo se presenta en la zona de fijación, tanto en células infectadas como no infectadas (Robinson et al., 1999). La proteína ha sido detectada en altos niveles únicamente en nódulos efectivos en varias especies de leguminosas (Hohnjec et al., 1999).

Se ha evidenciado que existe una estrecha relación entre la expresión de la SS con la fijación de N₂ en *P. sativum* y soya (Gordon et al., 1999; Gordon et al., 1997). Cuando los nódulos se someten a un estrés ambiental que induce un cambio en el flujo de O₂ al interior del nódulo, se observa una reducción en la actividad de la nitrogenasa y una alteración en los niveles de expresión de la SS que correlacionan con el efecto de disminución de la actividad de la nitrogenasa (Gordon y James, 1997). Este efecto correlativo no se observa en ninguna de las otras proteínas analizadas, GS y GOGAT, entre otras.

Utilizando una mutante *rug4* de chícharo (Craig et al., 1999), que muestra una severa reducción en la actividad de SS en nódulos (~90% menos que la actividad presente en la planta silvestre), observaron que existe una reducción en la actividad de otras enzimas que participan en el metabolismo de carbono y nitrógeno en el nódulo como GS, GOGAT, AAT, PEPC y en la fosfofructocinasa, además evidenciaron una reducción en la fijación de N₂ con una consecuente disminución en el contenido de N y un efecto clorótico en el follaje de las plantas. Estos datos indican que la SS parece ser esencial para el metabolismo del bacteroide y la asimilación de amonio en la simbiosis (Craig et al., 1999; Gordon et al., 1999). Por lo tanto la funcionalidad del nódulo está estrechamente relacionada con su potencial de metabolizar la sacarosa a través de la SS.

Sin embargo, estudios recientes del mismo grupo (Gordon et al., 2002), indican que la regulación de la SS no está mediando la regulación del funcionamiento del nódulo. Esto a partir de las observaciones en la expresión del gen de la SS en plantas tratadas con NO_3^- , que se conoce altera la funcionalidad del nódulo, reduciendo la actividad de nitrogenasa y por lo tanto, la fijación de N_2 atmosférico. Tratando plantas noduladas de soya mediante riegos con NO_3^- , observaron una disminución en la actividad de la nitrogenasa, paralelamente a una disminución en el nivel de mensajeros de SS, pero que no correlacionaba con el nivel de actividad de SS (Gordon et al., 2002).

Todo apunta a que la SS es la vía principal por la que el carbono necesario para tales procesos es aportado al nódulo, aunque aún falta por entender mejor acerca de la correlación entre la expresión de la SS y la regulación de la fijación y asimilación de amonio en el nódulo.

1.4.2. La Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPC).

Además de su papel en plantas de metabolismo CAM como fijadora de CO_2 atmosférico, la PEPC participa en varios procesos no fotosintéticos, como en el metabolismo de los nódulos fijadores de N_2 (Anderson et al., 1987). Se ha estimado que alrededor del 25% del carbono requerido para la actividad de la nitrogenasa proviene de la actividad de PEPC. La fijación de CO_2 , vía la actividad de PEPC, tiene un papel importante en el aporte de carbono para los diversos procesos metabólicos que mantienen la funcionalidad del nódulo pues proporciona el C necesario en forma de oxaloacetato para la síntesis de malato y aspartato. La PEPC es una proteína abundante en el citosol de las células vegetales (comprendiendo más del 2% del total de las proteínas solubles), donde se presenta en diversas isoformas, una de ellas ha sido caracterizada como una forma específica de nódulo.

La reacción que lleva a cabo la PEPC es la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato, proveniente del proceso glucolítico, para producir oxaloacetato y Pi:



En los nódulos, la PEPC, se presenta como una enzima homotetramérica compuesta por subunidades de alrededor de 100 kDa. Su actividad es elevada en nódulos activos fijadores de N_2 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se han caracterizado diversas isoformas de PEPC tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos. Aunque se conoce mucho menos acerca de las PEPC no fotosintéticas, las isoformas nódulo-específicas son de las más estudiadas. Se han aislado los genes y cDNA que codifican la PEPC, a partir de diversas especies de leguminosas: *M. sativa* (Pathirana et al., 1992; Pathirana et al., 1997), *G. max* (Sugimoto et al., 1992; Vázquez-Tello et al., 1993), *P. vulgaris* (Lara et al., CIFN-UNAM, datos no publicados) y *P. sativum* (Suganuma et al., 1997). En estas plantas, las PEPC se encuentran codificadas por pequeñas familias multigénicas, que en algunos casos podrían estar representando genes de reciente duplicación, debido a su alta homología.

En general, con muy pocas excepciones, los genes de PEPC conservan un orden similar. El gen de alfalfa (PEPC-7), conserva los 9 intrones presentes en todos los genes de PEPC estudiados, que además tienen una localización idéntica con respecto a las regiones codificantes, aunque pueden variar en longitud (Pathirana et al., 1992).

Por medio de alineamientos de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas, se observan residuos y motivos altamente conservados, que son parte de los dominios funcionales y regulatorios de la enzima (Chollet et al., 1996). En el extremo amino terminal se localizan los motivos de naturaleza regulatoria, mientras que en el extremo carboxilo terminal se encuentran los dominios catalíticos.

Como en el caso de la SS, todas las PEPC estudiadas hasta ahora contienen un motivo de fosforilación en el extremo amino terminal que incluye un residuo de serina y 5 residuos de cisteína, éstos últimos se han propuesto participan en la regulación y estabilización de la estructura tetramérica de la holoenzima (Chollet et al., 1996).

La isoforma de PEPC de nódulo de las leguminosas se clasifica dentro de las PEPC tipo C3, agrupándose, con base en análisis de secuencias parciales de cDNA, con las PEPC de plantas de metabolismo C3 (Gehrig et al., 1998).

Aunque su expresión no se restringe exclusivamente al nódulo, ya que se expresa en raíces y hojas, la PEPC se encuentra muy elevada en los nódulos, alrededor de 10 veces más en comparación con los otros tejidos. Los transcritos se detectan en el momento en que la nitrogenasa comienza a ser activa (Pathirana et

al., 1992). La expresión de los transcritos y actividad de la PEPC se incrementan rápidamente en nódulos funcionales, que correlaciona con el nivel de proteína de PEPC detectado, mientras que en simbiosis inefectivas se reduce severamente (Suganuma et al., 1997; Pathirana et al., 1997).

Mediante hibridización *in situ*, se detectó que los transcritos de la PEPC se localizan a lo largo de los nódulos indeterminados de alfalfa y chícharo, principalmente en las zonas de invasión, incrementándose hacia la zona de fijación, así como en el parénquima del nódulo y en el tejido vascular, con muy poca expresión en el meristemo (Pathirana et al., 1997; Fedorova et al., 1999). Los transcritos fueron detectados tanto en células infectadas como no infectadas, que correlaciona con los estudios de inmunolocalización, donde se ha detectado a la proteína en ambos tipos de células (Robinson et al., 1996).

Se han identificado algunos elementos que están regulando la transcripción elevada de la PEPC de nódulo, encontrando ciertos motivos en el promotor que participan en la expresión nódulo-específica del gen *PEPC7*, a través de fusiones con el gen reportero de β -glucoronidasa (Pathirana et al., 1997).

Además de ser regulada a nivel transcripcional se ha evidenciado que la PEPC está sujeta a una regulación post-traducciona que implica su fosforilación en el residuo de serina antes mencionado. Esta fosforilación altera su sensibilidad al malato, haciéndola menos sensible a la inhibición alostérica por malato e incrementando su actividad específica (Zhang y Chollet, 1997a). Estos cambios en sus parámetros cinéticos se deben además, a la estabilización de la holoenzima por fosfoenolpiruvato en la forma tetramérica (Vance y Gantt, 1992; Schuller y Werner, 1993).

La PEPC cinasa se ha purificado a partir de nódulos de soya, y por medio de ensayos "*in vitro*" se ha demostrado su actividad de cinasa mediante la fosforilación de PEPC de otras especies de plantas, así como su incapacidad para fosforilar mutantes de PEPC en el sitio de fosforilación (Zhang y Chollet, 1997b).

La fosforilación de la PEPC ha sido ampliamente estudiada. Zhang et al. (1995), observaron que en nódulos de soya, la condición fosforilada de la PEPC se encuentra modulada por los fotosintatos recientemente transportados hacia los nódulos, debido a que en plantas decapitadas la PEPC se encontraba desfosforilada, siendo más sensible a la inhibición por malato. Mediante

tratamientos de oscuridad de plantas noduladas de soya se observó un aumento en la sensibilidad de PEPC por malato, que era abatida cuando las plantas se transferían a la luz, acompañada de un cambio en la condición de desfosforilación a fosforilación en cada uno de los tratamientos, respectivamente, evidenciado por un marcaje "in situ" con ^{32}P i (Zhang et al., 1995).

Se ha determinado que la luz activa a la PEPC cinasa, mientras que su actividad es menor en condiciones de oscuridad prolongada, sugiriendo que el aporte de fotosintatos de los tejidos fotosintéticos participan como señales que inducen los cambios en la condición de activación por fosforilación de la PEPC (Zhang y Chollet, 1997b). A partir de estos resultados se postuló que los esqueletos carbonados están regulando directamente a la PEPC cinasa, o bien alterando los niveles de ATP en el citosol, sustrato de la PEPC cinasa (Zhang et al., 1995).

El papel de la PEPC en el metabolismo del nódulo ha sido estudiado utilizando la estrategia "antisense", reduciendo la expresión de la PEPC en el tejido del nódulo mediante el uso de un promotor nódulo-específico en alfalfa. Se obtuvieron plantas transgénicas que presentaron una reducción en la expresión de la PEPC tanto a nivel de mensajero como de proteína y actividad específica con una concomitante reducción en la fijación de CO_2 . Además, estas plantas "antisense" de PEPC presentaron una reducción en la actividad de nitrogenasa y acumularon menor biomasa (medida como peso seco de follaje) y nitrógeno (Schulze et al., 1998). Estos resultados confirman una fuerte interdependencia entre la PEPC del nódulo y la actividad de nitrogenasa, siendo la PEPC la enzima encargada de aportar la mayor cantidad del C utilizado para la asimilación de NH_4^+ de la simbiosis por medio de la fijación no fotosintética de CO_2 .

1.4.3. La Malato Deshidrogenasa (MDH).

En las plantas se han encontrado múltiples formas de MDH: fomas citosólicas, cloroplásticas, mitocondriales así como las que se ubican en microcuerpos como los glioxisomas y peroxisomas (Ocheretina y Scheibe, 1997), donde su papel principal es la producción y distribución de malato y equivalentes reductores entre los diferentes compartimentos celulares. Tanto el malato como los equivalentes reductores participan en diversas funciones, son fuentes de carbono y energía necesarias para el metabolismo de las plantas C_3 , tienen un papel

importante para mantener el balance del pH, movimiento estomático, respiración, β -oxidación de ácidos grasos, entre otras. Debido a que la MDH participa en diversas funciones, sus isoformas presentan una expresión diferencial entre los tejidos de las plantas.

La MDH cataliza la reducción reversible del oxaloacetato a malato, utilizando NADH ó NADPH como agentes reductores:



La MDH se presenta como un homodímero con un peso molecular que va de 32 a 43 kDa.

En los nódulos de las leguminosas, la MDH participa en la síntesis de la fuente principal de los productos carbonados para sostener los requerimientos energéticos de los bacteroides, el malato. El incremento de la concentración del malato en el nódulo está acompañado por un aumento en la actividad de la MDH. Los estudios en nódulos de alfalfa indican que las altas concentraciones de malato en el nódulo son producto de la actividad de la MDH puesto que esta enzima presenta una K_m menor por sus sustratos oxaloacetato y NADH ($K_m = 0.076$ mM y 0.078 mM, respectivamente) que por los productos malato y NAD^+ ($K_m = 2.22$ mM y 0.328 mM, respectivamente).

Aunque en el nódulo se expresan las distintas isoformas de MDH, sólo una de ellas se ha caracterizado como una forma abundante en el nódulo cuya actividad representa el 50% de la actividad de la MDH detectada en este órgano, mientras que la isoforma citosólica representa sólo el 20%. Se ha determinado que la forma de MDH que se incrementa en los nódulos (nMDH), se expresa entre 5 a 15 veces más que en otros tejidos de las plantas leguminosas (Miller et al., 1998). La nMDH es la responsable de la producción del malato que se exporta a los bacteroides para sostener su metabolismo por lo que se requiere en altos niveles.

El cDNA que codifica para la nMDH se ha aislado y secuenciado a partir de alfalfa (Miller et al., 1998), chícharo (Fedorova et al., 1999) y soya (Ismande et al.,

2001). Las secuencias de aminoácidos derivadas de estas secuencias de cDNA, guardan entre ellas de 91 a 93% de identidad.

Las isoformas nMDH están más relacionadas con las MDH mitocondriales y glioxisomales, todas ellas dependientes del cofactor NADH. Sin embargo a partir de la comparación de secuencias de aminoácidos, se confirma que las nMDHs son una clase independiente, separada de las otras MDHs, debido a que su identidad interespecífica es mayor que la intraespecífica. Es así como la MDH cloroplástica de chícharo muestra una identidad de menos del 28% con la nMDH del mismo chícharo (Fedorova et al., 1999) y entre las mismas formas de MDH de alfalfa se presenta una similitud del 23%, mientras que con las formas mitocondrial y del glioxisoma, la nMDH, guarda una similitud del 62% y 65%, respectivamente (Miller et al., 1998).

Las nMDHs presentan una presecuencia que difiere del resto de los genes de las MDH. Esta presecuencia comprende a los 82 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal, que tiene una identidad baja con otras MDH (de ~31%) y una mayor con otras nMDH (de ~ 76%) y que parece ser una secuencia que dirige a la MDH hacia el plástido.

Los transcritos de la nMDH son muy abundantes en nódulos efectivos, mientras que disminuyen en simbiosis no efectivas (Miller et al., 1998). En alfalfa, la abundancia de transcritos de nMDH, alcanza su mayor nivel alrededor del día 19 después de la inoculación con *S. meliloti*, cuando se ha alcanzado la máxima actividad de nitrogenasa (Miller et al., 1998).

Por medio de hibridación *in situ* se determinó que la mayor expresión de la nMDH se encuentra en la zona de fijación de los nódulos efectivos, tanto en células infectadas como no infectadas, aunque también se detectó señal a lo largo de todo el nódulo (Fedorova et al., 1999). El patrón de expresión que se observó es un reflejo de la estrecha relación que existe entre el metabolismo de C y producción de ácidos orgánicos con el proceso de fijación de nitrógeno.

Se sabe menos de su regulación, sin embargo se ha hipotetizado que así como otras enzimas del metabolismo de C en el nódulo (como la SS y la PEPC), la nMDH, se encuentra regulada por las concentraciones internas de O₂ (Vance y Gantt, 1992).

I.5. Las moléculas transportadoras de N.

Una vez que el amonio se ha asimilado en forma de aminoácidos como glutamato y glutamina, estas formas de N orgánico funcionan como donadores de nitrógeno para diversas vías metabólicas. Los aminoácidos, además de funcionar como unidades estructurales de las proteínas, precursores en la síntesis de la clorofila, fuente de C y N para la producción de metabolitos secundarios, etc., tienen un papel como moléculas transportadoras y/o distribuidoras del N orgánico. Una de las formas para el transporte de este nitrógeno orgánico lo constituyen las amidas como la asparagina (asn) y la glutamina (gln), que son unas de las principales moléculas que funcionan como donadoras de nitrógeno, junto con el aspartato (asp) y el glutamato (glu), distribuyéndolo entre los tejidos de la planta (Parsons et al., 1993).

El flujo de estos compuestos nitrogenados depende del tejido y de la especie de planta. Por ejemplo, las hojas de algunas plantas reciben el NO_3^- directamente del que se ha tomado del suelo, asimilándolo en glu y gln. En estas plantas el N orgánico se distribuye a partir de las hojas hacia los tejidos demandantes de N. En otros casos, como en las leguminosas, el NO_3^- es reducido y asimilado en las raíces y transportado hacia las hojas en forma de asn y gln, principalmente (Parsons et al., 1993).

En el caso particular de las leguminosas en condiciones de simbiosis, existen dos tipos de moléculas que se utilizan como distribuidoras del nitrógeno asimilado: las amidas y los ureidos.

La síntesis de amidas es de particular importancia en los nódulos de las leguminosas templadas (alfalfa, chícharo, etc.), donde la mayoría del N_2 fijado es rápidamente incorporado en asparagina (Figura 5), que es la forma en la que el N es distribuido en el xilema hacia el resto de los tejidos de la planta. Otras leguminosas utilizan preferentemente a la gln para la distribución del N, producto de la fijación, en lugar de la asn.

En las leguminosas tropicales (frijol, soya, etc.), los ureidos como la citrulina, alantofina y ácido alantoico, productos de la oxidación de las purinas, son los compuestos utilizados como transportadores de N. Cuando estas leguminosas se encuentran en condiciones no simbióticas son productoras de amidas, que utilizan para distribuir el N. Sin embargo, al establecer simbiosis estos compuestos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

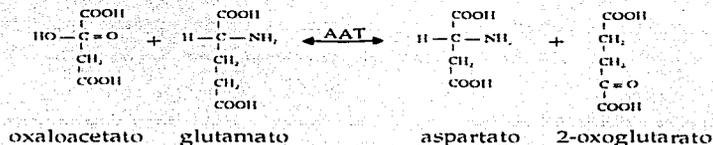
cambian por ureidos. En soya alrededor del 90% del nitrógeno fijado se distribuye en forma de ureidos (Parsons et al., 1993).

Se sabe que el costo energético para la producción de las amidas es mayor en comparación con los ureidos, debido a que en la síntesis de ureidos se utiliza menos C para transportar la misma cantidad de N que en las amidas.

En los nódulos de ambos tipos de leguminosas, se han detectado altos niveles de las enzimas encargadas de la síntesis de los respectivos compuestos nitrogenados que utilizan para la distribución del N fijado (Reynolds et al., 1982). En el caso de las leguminosas templadas la síntesis de amidas se lleva a cabo por la acción concertada de la aspartato amino transferasa y la asparagino sintetasa, produciendo aspartato y asparagina, respectivamente, así como por el ciclo GS - GOGAT, por el que se produce la glutamina.

1.5.1. La Aspartato Amino Transferasa (AAT).

La síntesis de aspartato es llevada a cabo por la AAT, bajo la siguiente reacción reversible:



La actividad de la AAT permite una rápida transferencia de los grupos amino del glutamato hacia la asparagina, permitiendo el reciclamiento del 2-oxoglutarato que entra de nuevo al ciclo GS-GOGAT para colectar nuevos grupos amino, participando de esta manera en la regeneración de esqueletos carbonados (2-oxoglutarato), para la asimilación primaria de nitrógeno. El aspartato es utilizado para sintetizar varios aminoácidos esenciales como la asparagina, metionina, treonina e isoleucina. Además, contribuye en gran parte al funcionamiento de los mecanismos de distribución del malato y de equivalentes reductores entre los diversos organelos celulares y el citoplasma (Lam et al., 1996).

La AAT de las plantas es un homodímero que va de 80-84 kDa, conformada por subunidades que van de 40 a 42 kDa. Por medio de estudios bioquímicos se

han identificado diversas isoenzimas de AAT que se localizan en diferentes tejidos y compartimentos subcelulares, lo cual indica que éstas tienen diversos papeles en el metabolismo de las plantas. Se han distinguido isoformas que se encuentran en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, glioxisomas, así como citoplásmicas (Schultz y Coruzzi, 1995).

En *Arabidopsis* se han identificado 5 isoformas que se distinguen por sus propiedades inmunológicas y ubicación dentro de la célula. Las isoformas AAT2 y AAT4 son citosólicas, la AAT3 es cloroplástica, la AAT1 se ubica en las mitocondrias, mientras que una quinta isoforma podría localizarse en el peroxisoma (Schultz y Coruzzi, 1995). Las funciones de las AAT citosólicas y cloroplásticas se han esclarecido mediante el uso de mutantes en cada una de ellas (Miesak y Coruzzi, 2002).

En leguminosas se han evidenciado también diversas isoformas, en el caso de soya existen 5 isoformas de AAT que se localizan en el glioxisoma (AAT1), citosol (AAT2), mitocondrias (AAT4) y cloroplastos (AAT5). Aún no se ha determinado la localización subcelular de la isoforma AAT3, aunque se encuentra abundantemente en tejidos fotosintéticos (Wadsworth et al., 1993; Wadsworth et al., 1994). En chícharo, se han detectado al menos 3 isoformas plastídicas (Weeden y Gottlieb, 1980), mientras que en alfalfa 2 isoenzimas de AAT han sido identificadas: la AAT1 es una isoforma citosólica, que se expresa en hojas, tallos, raíces y nódulos y la AAT2, isoforma plastídica abundante en nódulos (Vance et al., 1994; Gregerson et al., 1994).

Se han aislado y secuenciado las clonas de cDNA que codifican las 5 isoformas de AAT de *Arabidopsis* (Schultz y Coruzzi, 1995). A partir de soya se han aislado diversas clonas de cDNA que codifican para las isoformas de AAT (Wadsworth et al., 1993; Wadsworth et al., 1994), la caracterización de una de ellas ha permitido identificar que las formas citosólica y glioxisomal se encuentran codificadas por un único gen (Gebhardt et al., 1998). En alfalfa se han secuenciado el cDNA y los genes que codifican para las dos isoformas identificadas hasta ahora (Gregerson et al., 1994).

Las secuencias de las AAT que se ubican dentro de compartimentos subcelulares se caracterizan por tener una presecuencia que codifica para el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

péptido líder que participa en la internalización hacia éstos (Schultz y Coruzzi, 1995; Gebhardt et al., 1998; Gregerson et al., 1994).

En las leguminosas se ha determinado que una de las isoformas de AAT es la predominante en los nódulos, encargada de la síntesis de aspartato en la simbiosis. En los nódulos de alfalfa se expresan dos isoformas de AAT, que se distinguen por sus propiedades inmunológicas (Griffith y Vance., 1989; Farnham et al., 1990). Una de ellas, la AAT2, es una forma abundante en nódulos. La expresión de transcritos de AAT2 es de 15 a 20 veces mayor en nódulos efectivos que en otros tejidos (Vance et al., 1994; Gregerson et al., 1994). Paralelamente, los niveles de proteína de AAT2 y su actividad aumentan durante el desarrollo del nódulo (Egli et al., 1989). En nódulos inefectivos se observó una disminución en el contenido y actividad específica de la AAT2 (Egli et al., 1989; Gantt et al., 1992).

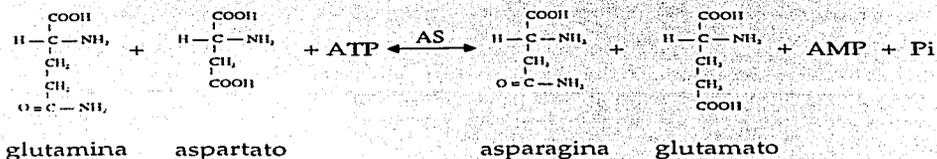
Los estudios de inmunolocalización, utilizando anticuerpos monoespecíficos contra AAT2, evidenciaron su ubicación dentro de los amiloplastos de la zona infectada de los nódulos de alfalfa (Vance et al., 1994). Estos datos confirman que la AAT2 es la forma abundante en los nódulos.

La otra isoforma en alfalfa, la AAT1, también se expresa en los nódulos, sin embargo su expresión no se modifica durante el desarrollo de este órgano. Esta isoforma se localiza en el citosol de las células de la raíz y nódulos, principalmente. Sin embargo se ha observado que la AAT1 en los nódulos, se ubica alrededor de la membrana peribacteroidal, donde podría estar participando en la distribución del malato hacia el bacteroide (Vance et al., 1994).

1.5.2. La Asparagino Sintetasa (AS).

En ciertas especies, la asparagina, puede llegar a comprender alrededor del 80% del nitrógeno transportado, como en condiciones de exceso de amonio (Parsons et al., 1993; Waterhouse et al., 1996; Pate et al., 1981). La asparagina constituye una manera más económica de transportar y distribuir el N, debido a que tiene una relación N:C (2:4), más baja que otros compuestos, como la glutamina (2:5). Además la asparagina es una molécula más soluble y menos reactiva que la glutamina, lo que hace una molécula importante como transportadora de N.

El sitio principal de síntesis de asparagina es la raíz, mientras que en las leguminosas éste se ubica en los nódulos (Shelp y Atkins, 1984), de aquí es transportada hacia las hojas u otros tejidos demandantes, donde constituye la fuente más importante de N para la síntesis de proteínas y aminoácidos. Es así como esta amida tiene importantes papeles *per se* como aminoácido y como la molécula de transporte y almacén de nitrógeno en las plantas. La síntesis de asparagina es llevada a cabo por la AS que cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina hacia una molécula de aspartato (Lam et al., 1996):



Aunque existen AS dependientes de NH_4^+ en otros organismos como las bacterias, en plantas, sólo se han detectado las que son dependientes de glutamina (Sivasankar y Oaks, 1996).

La AS dependiente de glutamina está conformada por subunidades de 160 kDa, que se asocian en dímeros de 320 kDa en presencia de ATP. Su actividad se ha detectado en distintos tejidos de las plantas, incluyendo el nódulo de las leguminosas (Egli et al., 1989).

Se han aislado y secuenciado clonas de cDNA que codifican para la AS, a partir de *Asparagus officinalis* (Davies y King, 1993), *P. sativum* (Tsai y Coruzzi, 1990), *L. japonicus* (Waterhouse et al., 1996) y *V. faba* (Küster et al., 1997), entre otras especies. En *L. japonicus* y chícharo se han identificado dos clonas de cDNA que codifican para isoformas de AS, mientras que de *V. faba* se ha aislado sólo una clona de cDNA para la AS.

La caracterización de estas clonas ha revelado que codifican enzimas homólogas a AS dependientes de glutamina. Entre éstas guardan una identidad de ~85% y una similitud del 93% en secuencia de aminoácidos (Küster et al., 1997; Waterhouse et al., 1996). Todas las secuencias de AS presentan en el extremo amino terminal el dominio de unión a glutamina, altamente conservado y en el

extremo carboxilo el posible sitio de unión al aspartato. El extremo carboxilo de las AS de las leguminosas guardan una alta identidad, que disminuye al compararse con AS provenientes de plantas no leguminosas como espárrago y *Arabidopsis* (Waterhouse et al., 1996; Davies y King, 1993).

Los transcritos de AS en leguminosas se elevan considerablemente, en comparación con otros tejidos, en los nódulos funcionales. Se ha identificado a una de ellas como una forma de alta expresión en nódulos. La inducción de transcrito de AS1 en nódulos de chícharo, es 20 veces mayor que la detectada en raíces, mientras que la AS2 se expresa sólo 5 veces más en los nódulos (Tsai y Coruzzi, 1990). En *L. japonicus*, la AS1 tiene una alta expresión en raíces, aunque sus transcritos también se detectaron en tejido fostosintético. La AS2 de *L. japonicus* se expresa específicamente en la raíz y en los nódulos (Waterhouse et al., 1996). Por medio de hibridación en "printing", los transcritos de AS1 de *V. faba*, se detectaron principalmente en los nódulos, en la zona de fijación.

Se ha determinado que la AS se induce en condiciones de deficiencia de carbono, donde la relación N/C es alta, observándose una acumulación de los transcritos de AS en condiciones de oscuridad con una subsecuente disminución en presencia de luz, tanto en plantas leguminosas (chícharo y haba), como en no leguminosas (tabaco y *Arabidopsis*), en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Tsai y Coruzzi, 1991; Küster et al., 1997). La expresión de los genes de AS en la oscuridad correlaciona con el hecho de que la asparagina sea un compuesto transportador de nitrógeno, que es utilizado cuando las condiciones de carbono son limitantes, debido a que posee una baja relación C/N. Sin embargo este patrón de expresión no se presenta en leguminosas con nódulos determinados, donde la síntesis de asparagina es constante a lo largo del día, como *L. japonicus*. Los cambios de condiciones de iluminación a oscuridad no mostraron aumento en los niveles de transcritos de la AS en esta leguminosa (Waterhouse et al., 1996).

1.6. La transformación genética de sistemas vegetales.

La transformación genética podría definirse como la introducción de material genético en las células, resultando en su posible integración cromosomal (en el núcleo u organelos), estable y heredable a través del proceso de meiosis.

Se han desarrollado diversos métodos para introducir el material genético a las células vegetales, que se clasifican en dos tipos: 1) los que se valen de una transferencia directa o por métodos físicos del DNA y 2) los que utilizan sistemas "naturales" de transformación, haciendo uso de patógenos naturales de las plantas.

La transformación genética acoplada a un protocolo de regeneración *in vitro*, permite la generación de plantas transgénicas para genes específicos.

1.6.1. Métodos de transformación directa.

Dentro de este grupo se encuentran los métodos que permiten depositar el DNA directamente en la célula, donde algunas moléculas se incorporaran eventualmente en el genoma vegetal. La biolística, la microinyección y la electroporación son, entre otros, métodos que permiten la introducción directa del material genético. La biolística se vale de la aceleración de micropartículas recubiertas de DNA, que son lanzadas hacia los tejidos vegetales, permitiendo la introducción del DNA en la célula vegetal y su posible integración en el genoma. La electroporación hace uso de protoplastos que son sometidos a descargas eléctricas, produciendo poros en la membrana plasmática, permitiendo el libre paso del DNA hasta alcanzar el núcleo. La microinyección utiliza microcapilares que son introducidos en la célula para depositar el DNA directamente en el núcleo.

1.6.2. Métodos naturales de transformación: la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Entre los métodos naturales de transformación, el mediado por las especies de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, es de los más utilizados (Miki et al., 1993). Estas bacterias poseen un mecanismo natural para la transferencia de un fragmento de su genoma, denominado T-DNA, hacia el interior de las células vegetales. Esta bacteria del suelo es un patógeno que transforma a las células vegetales genéticamente, produciendo un crecimiento anormal de éstas, dando lugar a la formación de un tumor o raíces "velludas".

Los genes implicados en este proceso patogénico se encuentran codificados en plásmidos, denominados pTi (de las iniciales en inglés de "tumor inducing") y pRi ("root inducing"), para *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente. En el mecanismo de transferencia del T-DNA, que en las cepas naturales contiene genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de hormonas y opinas, participan proteínas codificadas por los genes que se encuentran en la región *vir* del plásmido. El T-DNA se encuentra flanqueado por secuencias repetidas directas de 25 pb, el borde izquierdo y borde derecho del T-DNA, los cuales son reconocidos por las proteínas Vir.

La interacción entre *Agrobacterium* y su hospedero comienza cuando la bacteria detecta señales específicas producidas por la planta que actúan como quimioatrayentes, principalmente compuestos fenólicos. Estas señales son percibidas por la proteína receptora VirA que junto con la proteína VirG forman parte de un sistema de dos componentes. La percepción de dicha señal por la proteína VirA, produce su autofosforilación y la posterior fosforilación y activación de VirG que a su vez induce la expresión de los genes de la región *vir*. Después de la inducción de la maquinaria de síntesis y transferencia del T-DNA, las proteínas VirD1 y VirD2 actúan como "nickasas", produciendo un corte en los bordes de la cadena complementaria del T-DNA (3'-5'), produciendo una molécula de DNA de cadena sencilla, la cadena T. La proteína VirD2 permanece anclada al extremo 5' de la cadena T, mientras que la proteína VirE2 recubre el resto de la cadena para formar al complejo T maduro (Zupan y Zambryski, 1995) (Figura 6). Este complejo de moléculas, junto con otras proteínas Vir, es exportado hacia la célula del hospedero a través de un canal formado por las proteínas VirD4 y VirB.

La integración de la cadena T en el cromosoma de la célula hospedera es un evento al azar que se encuentra mediado por diversas proteínas, entre las que pudieran participar las mismas proteínas VirD2 y VirE2 de *Agrobacterium*, así como proteínas de la planta (Tzfira y Citovsky, 2002) (Figura 6).

Aprovechando esta maquinaria natural de transferencia de DNA, se han desarrollado vectores a partir de *A. tumefaciens* que poseen al plásmido Ti desarmado, que ha perdido su capacidad oncogénica al eliminar el fragmento de T-DNA y sustituirlo por un gen de interés más un gen selectivo (Hooykaas y Schilperoort, 1992). La nueva característica que ha adquirido la célula infectada

puede ser, por lo tanto, transmitida durante la división celular a todo el organismo y consecuentemente a su descendencia. De esta manera se han desarrollado vectores cointegrados y binarios. Los vectores cointegrados poseen en el mismo plásmido Ti (desarmado o nativo), la secuencia de DNA deseado, insertado en éste mediante un mecanismo de recombinación homóloga entre los bordes del plásmido Ti y el sistema *vir* de transferencia. Los vectores binarios, más utilizados en la actualidad, consisten de dos elementos: un vector que lleva el material genético a transferir entre los bordes que flanquean al T-DNA y un segundo elemento que corresponde al plásmido Ti desarmado, que posee la región *vir* necesaria para la transferencia del T-DNA.

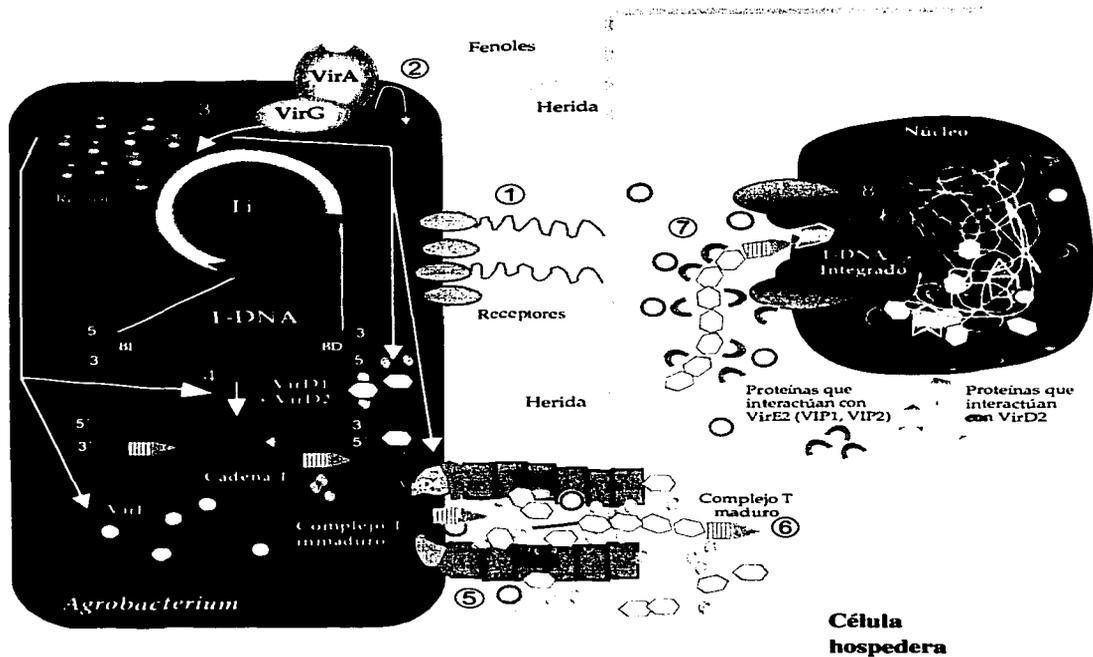


Figura 6. Eventos de la interacción de *Agrobacterium* con una célula hospedera durante la transformación genética. 1, existe un reconocimiento y unión de *Agrobacterium* hacia la célula hospedera a través de receptores específicos. 2, el sistema de dos componentes de *Agrobacterium* (VirA-VirG), percibe señales específicas. 3, VirG es activada e induce la transcripción de la región *vir* del plásmido Ti. 4, generación de una copia móvil del T-DNA, la cadena T. 5, formación del complejo transportador VirB-VirD4 y transferencia de la cadena T hacia la célula hospedera. 6, formación de la cadena T madura. 7, el complejo T es importado hacia el núcleo, facilitado por proteínas del mismo hospedero. 8, transporte intranuclear del complejo T e integración en el genoma de la célula hospedera, mediada por VirD2 y/o VirE2 y otros factores de la célula hospedera. (Tomado de Tzfira y Citovsky, 2002).

1.6.3. Aplicaciones de la transformación genética.

La transformación genética ha permitido manipular el genotipo de las plantas y con esto obtener variedades, entre otras cosas, con ciertas ventajas selectivas. Se han generado plantas con ciertos caracteres que les ayudan a contender con condiciones desfavorables del medio ambiente, que pueden ser adversas para su desarrollo y crecimiento. De esta manera se han obtenido plantas resistentes a bajas temperaturas (Jaglo-Ottosen et al., 1998), o con la capacidad para defenderse de ciertos patógenos como los insectos (Dixon et al., 1996; Kota et al., 1999).

La ingeniería genética a través de la transformación genética ha permitido modificar una amplia variedad de características de las plantas para desarrollar nuevos cultivos transgénicos que producen específicamente compuestos naturales así como nuevos productos, de una manera más eficiente. Entre éstos se incluyen vacunas y otros fármacos, plásticos, aceites y ciertas proteínas que permitirían utilizar a las plantas transgénicas como herramientas efectivas para la fitorremediación (Töpfer, et al., 1995; John y Keller, 1996; Raskin, 1996; Arntzen, 1997).

Utilizando la genética reversa por medio de la transformación genética ha sido posible modular los niveles de expresión de genes endógenos, permitiendo entender su contribución y papel en un proceso en particular, ya sea en una vía metabólica o de señalización. La modulación de los genes implica una alteración en sus niveles de expresión, ya sea elevándolos o reduciéndolos.

Para incrementar el nivel de expresión de un gen, se ha desarrollado la estrategia de sobre-expresión, que implica la expresión ectópica de genes cuya transcripción se encuentra regulada, generalmente, por promotores de fuerte expresión y/o constitutivos (Stitt y Sonnewald, 1995). Con esta herramienta es posible dilucidar el mecanismo de regulación a la cual se encuentra sujeto algún gen en particular, por ejemplo, cuando la sobre-expresión de ciertas enzimas no resulta en un incremento de la actividad enzimática podría sugerir que la enzima esta sujeta a una regulación post-transcripcional.

Con la finalidad de reducir los niveles de expresión, se ha generado la tecnología "antisense" o RNA en sentido inverso. El "antisense" ha resultado ser una herramienta alternativa en casos donde la generación de mutantes en genes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

específicos por los métodos clásicos resulta difícil, debido a que el gen de interés forma parte de una familia multigénica o el fenotipo no se puede predecir y por lo tanto resulta difícil seleccionarlo, o bien la mutación sería letal. Esta estrategia se basa en la inserción de un fragmento de DNA (3'-5'), con respecto al promotor que lo regula, que corresponde al mRNA en sentido inverso. A partir de este fragmento "antisense" se transcribe una cadena de RNA complementaria (anti-RNA) al RNA derivado de la secuencia endógena, hibridizando con ésta y formando una cadena doble de RNA, impidiendo su expresión (Bourque, 1995).

Aunque el mecanismo de inhibición de la expresión por medio del "antisense" ha permanecido sin entenderse claramente, se ha postulado que este tipo de silenciamiento utiliza mecanismos similares a los que se han evidenciado en sistemas de silenciamiento por RNA de doble cadena, que producen el denominado RNAi (RNA de interferencia). El RNAi utiliza un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional, en el que la transcripción del gen blanco no se encuentra afectada, sin embargo la expresión a nivel de la transcripción se encuentra reducida debido a la inestabilidad del híbrido de doble cadena de RNA (Hammond et al., 2001). Debido a que en una planta con "antisense", se detecta una reducción en el nivel de mensajeros del gen blanco hasta ser difícilmente detectable, se postula que el híbrido de RNA sufre una degradación por nucleasas en el citoplasma o que de forma directa, la cadena en sentido inverso interfiere con la transcripción del gen endógeno. Otras hipótesis han planteando que el "antisense" interfiere en los eventos de procesamiento del RNA mensajero hacia la forma madura ("splicing"), en su exportación hacia el citoplasma y en la traducción del RNA endógeno, por medio del bloqueo del sitio de unión al ribosoma (van der Krol et al., 1988; Rodermeil et al., 1988; Temple et al, 1993; Bourque, 1995) (Figura 7).

Por otra parte el mecanismo que se ha estudiado ampliamente en el RNAi es el silenciamiento a nivel transcripcional, donde la expresión de los genes se encuentra reducida por un bloqueo a nivel de la transcripción debido a un posible rearrreglo de la conformación de la cromatina o a la metilación del DNA (Wassenegger y Pelissier, 1998; Hannon, 2002). Se ha evidenciado que el estado de metilación de los transgenes puede presentarse en diferentes grados, donde una

estado hipermetilación induce un silenciamiento a nivel transcripcional (van Blokland et al., 1997; Hannon, 2002).

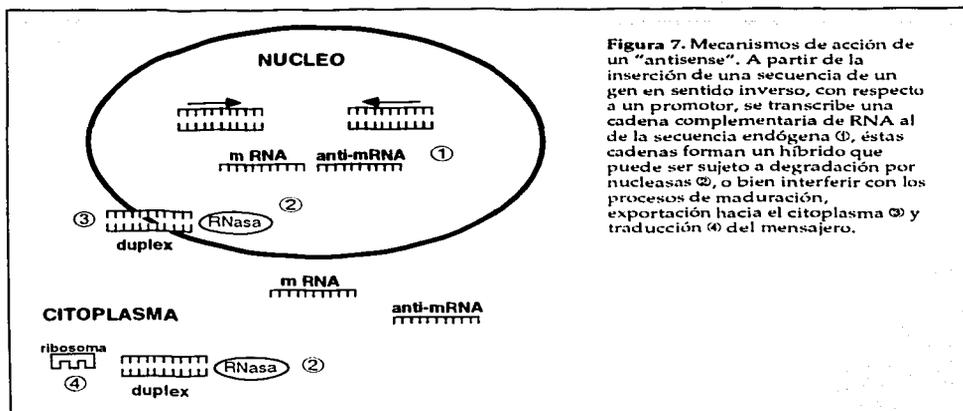


Figura 7. Mecanismos de acción de un "antisense". A partir de la inserción de una secuencia de un gen en sentido inverso, con respecto a un promotor, se transcribe una cadena complementaria de RNA al de la secuencia endógena (1), éstas cadenas forman un híbrido que puede ser sujeto a degradación por nucleasas (2), o bien interferir con los procesos de maduración, exportación hacia el citoplasma (3) y traducción (4) del mensajero.

1.7. Modulación de la asimilación de amonio en plantas transgénicas.

Con la finalidad de entender la regulación, identificar y cuantificar la importancia de las enzimas que participan en el metabolismo de C y N en el nódulo, se ha manipulado su expresión a través de la generación de plantas transgénicas por medio de la sobre-expresión o inhibición específica.

Por lo que respecta al ciclo GS-GOGAT, se han generado plantas transgénicas leguminosas y no leguminosas con el objetivo de sobre-expresar o inhibir la expresión génica de estas enzimas (Hirel et al., 1997; Temple y Sengupta-Gopalan, 1997; Harrison et al., 2000) y entender más acerca de su papel en la asimilación de amonio en los distintos órganos de las plantas.

1.7.1. Modulación de la GS.

La sobre-expresión de la isoforma citosólica de la GS (GS1), se ha efectuado en los sistemas de tabaco, alfalfa y *L. japonicus*. Distintos grupos han tratado de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incrementar los niveles de la GS1 a través de un promotor constitutivo de fuerte expresión, como lo es el el CaMV35S. Se generaron líneas de tabaco que presentaron un incremento de entre un 10 y 25% en la actividad pero con sólo un relativo aumento en la cantidad de la proteína GS, a pesar de presentar un aumento mayor en los niveles de transcritos (Temple et al., 1993). Utilizando la misma estrategia, se generaron líneas de alfalfa que mostraron un ligero aumento en el nivel de transcritos, pero no presentaron ningún cambio en la cantidad de la proteína (Temple et al., 1993; Temple et al., 1996; Temple y Sengupta-Gopalan, 1997).

El estudio de otras líneas transgénicas de tabaco, sobre-expresoras de GS1, reveló un incremento en la expresión a nivel de transcritos que correlacionó con un aumento de la proteína y en la actividad enzimática (de hasta 6 veces en una de las líneas). Aunque esta sobre-expresión no causó efecto alguno en el fenotipo de las plantas bajo condiciones normales de crecimiento, éstas obtuvieron ventajas en condiciones de privación de N (previo tratamiento con un exceso de fuentes nitrogenadas), presentando un mayor crecimiento tanto del follaje como de las raíces, así como un incremento del área foliar, debido a su mayor capacidad fotosintética en estas condiciones (Fuentes et al., 2001).

Plantas de *L. japonicus* que sobre-expresan la GS1, mostraron un incremento del 50% al 80% en la actividad total de GS en las hojas, pero no en raíces, a pesar de utilizar un promotor constitutivo. El contenido de aminoácidos y amonio en las raíces aumentó en presencia de 12 mM de NH_4^+ , mientras que el contenido de carbohidratos disminuyó. Las plantas presentaron un crecimiento más rápido, adelantando su tiempo de floración (Harrison et al., 2000), sugiriendo que la sobre-expresión de la GS, induce un desarrollo acelerado, con una senescencia y floración prematura, cuando las plantas crecen en presencia de altas concentraciones de amonio (Harrison et al., 2000). En condiciones simbióticas estas plantas mostraron una reducción de la actividad de GS (~40%), presentando un incremento en la biomasa del follaje, raíces y nódulos, que se explica como una manera más eficiente de asimilar el amonio en los nódulos, además se detectó un aumento en la concentración de asparagina, así como una disminución de amonio en las raíces (Harrison et al., 2000).

La expresión de la GS1 se elevó de 2 a 3 veces, bajo el promotor nódulo-específico del gen de leghemoglobina de soya en *L. japonicus*, pero las plantas no presentaron cambios fenotípicos en condiciones simbióticas (Harrison et al., 2000). Esta misma enzima bajo el promotor de la leghemoglobina de *Sesbania rostrata* (*Srglb₃*), produjo un fenotipo estéril en las plantas con sobre-expresión, causando alteraciones en los granos de polen y óvulos, por lo tanto el incremento de la actividad de GS en el tejido de las flores afectó el desarrollo de los órganos reproductores (Suárez et al., en prensa).

La reducción de la expresión de la GS por medio de "antisense" no ha generado cambios fenotípicos evidentes en diversos sistemas vegetales. Plantas de tabaco que presentaron una reducción de aproximadamente 20-30% en la actividad de GS, no mostraron cambios con respecto a las plantas control, a pesar de acumular de 2 a 5 veces más amonio (Harrison et al., 2000). Resultados similares se obtuvieron tratando de inhibir la expresión de la GS1 en tabaco y alfalfa utilizando un promotor constitutivo; las plantas que mostraron reducción en el nivel de mensajeros no presentaron cambios a nivel de proteína y actividad enzimática, aunque se evidenció una reducción en el peso fresco de aproximadamente 30% en el sistema de tabaco (Temple et al., 1993). Estos resultados indican que no existe una correlación directa entre la reducción de mensajeros y la cantidad de proteína de la GS1, evidenciando un mecanismo de regulación traduccional y post-traduccional a la que se encuentra sujeta la GS1 (Temple et al., 1993; Temple et al., 1998a).

A partir de estos estudios, encaminados a modular la expresión de la GS1, se ha evidenciado que la alteración de los niveles de esta enzima ha resultado en una variación de efectos, que no han inducido cambios correlativos en los diversos sistemas de plantas. La sobre-expresión de la GS1 no ha resultado en la mayoría de los casos, en un aumento de la capacidad de asimilar amonio, bajo condiciones normales de crecimiento, mientras que la reducción de expresión de la GS1 ha sido sólo limitada a ciertos niveles donde no se han observado efectos claros de su inhibición.

Tratando de dilucidar el papel de la isoforma cloroplástica de GS, se han generado plantas transgénicas de tabaco que sobre-expresan o tienen niveles reducidos de GS2. El análisis de las plantas demostró que la GS2 tiene un papel

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

importante en la asimilación de amonio proveniente de la fotorrespiración ya que las plantas sobre-expresoras presentaron una mejor capacidad para asimilar el amonio en estas condiciones, mientras que las que presentaron niveles reducidos de esta enzima mostraron una fuerte fotoinhibición en condiciones de alta intensidad luminosa (Kozaki y Takeba, 1996). Este estudio apoya que la principal función de la GS2 es la de asimilar el amonio que proviene de la fotorrespiración.

I.7.2. Modulación de la GOGAT.

Se ha tratado de dilucidar la función de cada una de las diversas isoformas de la GOGAT. Para el caso particular de la isoforma de GOGAT dependiente de ferredoxina, se han aislado mutantes en *Arabidopsis*, cebada y chícharo. A partir de estas mutantes, se demostró que la Fd-GOGAT participa en la reasimilación del amonio, producto de la fotorrespiración, principalmente (Somerville y Ogren, 1980; Kendall et al., 1986; Coschigano et al., 1998). Estas mutantes que presentaron menos del 5% de actividad de la Fd-GOGAT, mostraron severos síntomas de estrés por acumulación de NH_4^+ , producto de la fotorrespiración, así como clorosis, que fueron revertidos en condiciones atmosféricas ricas en CO_2 (0.7% v/v), que minimizan la fotorrespiración (Somerville y Ogren, 1980; Kendall et al., 1986).

El mismo fenotipo se observó en plantas transgénicas de tabaco con una reducción en la expresión de la Fd-GOGAT, por medio de un "antisense". Estas plantas presentaron síntomas de toxicidad por amonio en ambientes que permiten una alta fotorrespiración (Harrison et al., 2000), creciendo favorablemente en atmósferas ricas en CO_2 (1%). En condiciones de fotorrespiración, estas plantas acumularon altas concentraciones de amonio, glutamina y 2-oxoglutarato principalmente, que correlacionaron con los niveles de inhibición de la Fd-GOGAT, mientras que el contenido de glutamato disminuyó en proporción a la actividad remanente de la Fd-GOGAT (Ferrario-Mery et al., 2002). La acumulación de estos compuestos atiende a la elevación de la actividad enzimática de la NADH-GDH, PEPC e ICDH (isocitrato deshidrogenasa) (Ferrario-Mery et al., 2002). Es así como estas plantas aumentan la expresión de algunos genes que regulan el flujo metabólico bajo condiciones de fotorrespiración. Estos estudios apoyan que la Fd-GOGAT es la isoforma encargada de asimilar el amonio producido en la fotorrespiración.

A diferencia de las múltiples mutantes y líneas transgénicas de la Fd-GOGAT en diversas especies, para la isoforma NADH-GOGAT se ha reportado únicamente la generación de plantas transgénicas de tabaco con sobre-expresión (Chichkova et al., 2001) e inhibición en plantas de alfalfa (Schoenbeck et al., 2000) de esta enzima. Se generaron plantas de tabaco sobre-expresoras de la NADH-GOGAT. Cuando es regulada por un promotor 35S, la expresión de la NADH-GOGAT se incrementa a nivel de transcritos, que se refleja en un aumento en la cantidad de proteína, así como una actividad enzimática elevada en un 15 a 40% con respecto a la línea control. Este porcentaje de incremento en la actividad de GOGAT fue suficiente para permitir que las plantas acumularan un mayor contenido total de carbono y nitrógeno en el follaje, en condiciones de suplemento de fuentes inorgánicas de N (Chichkova et al., 2001).

Utilizando parte del cDNA de la NADH-GOGAT, fusionado en sentido inverso al promotor del gen de la AAT2, se obtuvo una línea transgénica de alfalfa que presentó una disminución en la expresión de mensajeros, proteína y actividad específica de NADH-GOGAT en nódulos, de alrededor del 50%. El efecto de esta disminución no fue muy severo, pues sólo se evidenció un ligero efecto clorótico en el follaje de las plantas noduladas, como consecuencia de la reducción en el contenido de N total en la parte aérea de la planta. Aunque no se observó una clara reducción en la actividad de nitrogenasa, las plantas presentaron una disminución en el peso fresco total de nódulos (Schoenbeck et al., 2000). Sin embargo, aunque inesperado, la expresión del antisentido no se restringió al tejido del nódulo, sino que se presentó en las flores, produciendo un efecto deletéreo en la viabilidad del polen, provocando la infertilidad masculina de las líneas transgénicas. Estos resultados sugieren que la NADH-GOGAT tiene un papel importante en el metabolismo del N durante el desarrollo del polen y que es necesaria para el establecimiento de una simbiosis eficiente (Schoenbeck et al., 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

La NADH-GOGAT se encuentra de manera abundante en los nódulos de las leguminosas y éstos han mostrado ser un sistema en el que se pueden estudiar las relaciones entre los metabolismos de C y N durante la asimilación del amonio. La generación de plantas alteradas en la expresión de la NADH-GOGAT nos permitirá entender cómo participa esta enzima en la asimilación de amonio y la compleja matriz de regulación que existe entre los diversos genes involucrados en este proceso, así como su implicación en el establecimiento de una simbiosis efectiva y más eficiente.

Con base en estudios de expresión, actividad enzimática y localización, se ha propuesto que la NADH-GOGAT cataliza el paso limitante en la asimilación de amonio en los nódulos de las leguminosas (Temple et al., 1998b; Trepp et al., 1999a, b). La falta de mutantes o plantas transgénicas con alteración en la expresión de esta enzima no ha permitido comprobar esta hipótesis, es así como la modulación de la NADH-GOGAT, nos permitirá entender su función crucial en la asimilación de amonio en simbiosis.

La alfalfa es una leguminosa que posee una importancia económica, situándose entre los cultivos forrajeros de mayor extensión en el mundo, cuyo simbiote *Sinorhizobium meliloti*, ha sido extensamente estudiado, permitiendo tener más información acerca de esta relación simbiótica. El establecimiento de un protocolo de regeneración y transformación eficiente por medio de *A. tumefaciens*, en esta especie de leguminosa (Austin et al., 1995), ha permitido utilizar esta estrategia como una alternativa para la modulación y estudio de enzimas importantes en vías metabólicas en alfalfa. Sin embargo, su naturaleza tetraploide la hace ser un sistema desventajoso para el estudio genético y para la obtención de mutantes.

Como se mencionó anteriormente Schoenbeck et al. (2000), intentaron inhibir la expresión de la NADH-GOGAT en los nódulos, sin embargo, la expresión y efecto del transgene no se limitó a este tejido, debido a que el promotor de AAT2 se expresó en el tejido de las flores, presentando consecuencias de esta expresión en condiciones no simbióticas (Schoenbeck et al., 2000). El uso de un promotor con expresión restringida al tejido del nódulo, como lo es el promotor

del gen *Lbc*₃, de leghemoglobina de soya, permitirá limitar el efecto del transgene únicamente en condiciones de simbiosis. Se ha demostrado que este promotor posee una fuerte expresión en simbiosis, que se restringe al tejido del nódulo (Stougaard et al., 1986; Stougaard et al., 1990). Es así como la transformación genética en combinación con la estrategia "antisense", utilizando un fragmento del cDNA de la NADH-GOGAT fusionado en sentido inverso a este promotor, permitirá inhibir la expresión de la NADH-GOGAT en el nódulo y evaluar los efectos de esta inhibición en la simbiosis. La alfalfa resulta ser un sistema idóneo, pues se trata de un sistema homólogo, debido a que a partir de ésta se aisló la secuencia de cDNA utilizada para construir el transgene.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Conocer el papel, regulación e importancia de la NADH-GOGAT en la asimilación de amonio en la simbiosis de alfalfa-*Sinorhizobium meliloti*, a través de generar y caracterizar plantas transgénicas con niveles alterados en la expresión de esta enzima en los nódulos.

Objetivos particulares:

- Generar y caracterizar plantas transgénicas de alfalfa con alteración en el nivel de expresión de la NADH-GOGAT mediante sobre-expresión o inhibición por "antisense".
- Evaluar el efecto de la reducción de la expresión de la NADH-GOGAT en condiciones simbióticas en las líneas "antisense" de alfalfa a través de:
 - Cuantificar el nivel de mRNA, proteína y actividad de enzimas que participan en el metabolismo de C y N en el nódulo.
 - Cuantificar el número y determinar la distribución de los nódulos en las raíces.
 - Evaluar la morfología de los nódulos a nivel histológico.
 - Determinar el contenido de aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos en los nódulos.
 - Cuantificar el contenido de N y clorofila en el follaje, así como la capacidad fotosintética de las plantas.
- Determinar la transferencia del transgene "antisense" de NADH-GOGAT a la descendencia y evaluar su efecto en la T1.

IV. RESULTADOS

IV.1. Artículo:

"Antisense inhibition of NADH glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.)"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antisense inhibition of NADH glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Elizabeth Cordoba¹, Svetlana Chichkova¹, Carroll P. Vance² and Georgina Hernández^{1*}

¹Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Mor. Mexico, Mexico,

²Department of Agronomy and Plant Genetics, 411 Borlaug Hall, 1991 Upper Buford Circle, University of Minnesota and US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Plant Science Research Unit, St Paul, MN 55108, USA

Received 27 September 2002; revised 12 December 2002; accepted 20 December 2002.

*For correspondence (fax +52 7 3 11 67 10; e-mail gina@cifn.unam.mx).

Summary

Legumes acquire significant amounts of nitrogen for growth from symbiotic nitrogen fixation. The glutamine synthetase (GS)/NADH-dependent glutamate synthase (NADH-GOGAT) cycle catalyzes initial nitrogen assimilation. This report describes the impact of specifically reducing nodule NADH-GOGAT activity on symbiotic performance of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Four independent transgenic alfalfa lines, designated GA89, GA87, GA88, and GA82 (for GOGAT antisense), containing an antisense NADH-GOGAT cDNA fragment under the control of the soybean leghemoglobin (*lbc3*) promoter were evaluated. The GA plants were fertile and showed normal growth in non-symbiotic conditions. The NADH-GOGAT antisense transgene was heritable and the T₁ plants showed phenotypic alterations – similar to primary transformants. Clonally propagated plants were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* after rooting and the symbiotic phenotype was analyzed 21 days post-inoculation. Nodules of each GA line had reduced NADH-GOGAT activity, ranging from 33 to 87% of control plants, that was accompanied by comparable decreases in RNA and protein. Plants from the GA89 line, with the lowest NADH-GOGAT activity (c. 30%), presented a strikingly altered symbiotic phenotype: concomitantly activities of key enzyme for carbon and nitrogen assimilation decreased; nodule amino acids and amides were reduced while sucrose accumulated. Antisense GOGAT plants were chlorotic, reduced in fresh weight, and had a lower N content than control plants. Photosynthesis was also impaired in antisense plants. Specifically, reducing NADH-GOGAT in nodules resulted in plants having impaired nitrogen assimilation and altered carbon/nitrogen metabolic flux.

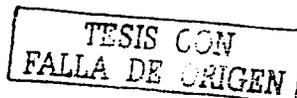
Keywords: NADH-glutamate synthase, antisense transgenic alfalfa, *S. meliloti*–alfalfa symbiosis, C/N metabolism in nodules, symbiotic N fixation.

Introduction

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) can acquire nitrogen for growth from the atmosphere, through symbiotic nitrogen fixation with the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. In this association, bacteroids in root nodules reduce nitrogen to ammonia which is released into the cytosol of the host cell. Ammonia is assimilated to organic nitrogen by the cooperative activities of glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) and NADH-dependent glutamate synthase (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) (Temple *et al.*, 1998b). GS catalyzes the incorporation of ammonia into glutamate, producing glutamine while NADH-GOGAT catalyzes the transfer of the amide group of glutamine to 2-oxogluta-

rate, resulting in the formation of two molecules of glutamate.

In plants, GOGAT occurs in two distinct forms that use NADH (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) or ferredoxin-dependent (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1) as electron carriers. These enzymes differ in their location within the plant and are the products of distinct genes (Lam *et al.*, 1996; Temple *et al.*, 1998b). While Fd-GOGAT is more abundant in photosynthetic tissue, NADH-GOGAT is found primarily in non-green tissue such as roots and legume root nodules and is located in plastids (Lam *et al.*, 1996; Trepp *et al.*, 1999a). In nitrogen-fixing alfalfa nodules NADH-GOGAT activity has



been found to increase markedly during nodule development, and this activity is associated with a single form of the enzyme (Gregerson *et al.*, 1993; Temple *et al.*, 1998b). Trepp *et al.* (1999a) and Gregerson *et al.* (1993) demonstrated that NADH-GOGAT is encoded by a single gene in alfalfa. NADH-GOGAT activity is maintained at low or undetectable levels in other tissues of alfalfa (Vance *et al.*, 1995), but is detectable in flowers (Schoenbeck *et al.*, 2000).

Glutamate and glutamine serve as nitrogen donors for the biosynthesis of other nitrogen compounds that are transported from the nodule to other plant organs. The principal compounds transported from alfalfa nodules are amides such as asparagine and glutamine (Temple *et al.*, 1998b). Asparagine and aspartate are synthesized through the action of aspartate amino transferase (AAT, EC 2.6.1.1) and asparagine synthetase (AS, EC 6.3.5.4).

Ammonium assimilation in the nodule depends on carbon skeletons and energy. Sucrose derived from photosynthesis is the main carbon compound transported from shoots to nodules. In mature nodules, sucrose is primarily cleaved by sucrose synthase (SS, EC 2.4.1.13) to UDP-glucose and fructose. Gordon *et al.* (1997, 1999) have described the critical role of SS in the development and function of soybean nodules. Free hexoses produced in the nodule via SS are phosphorylated by hexokinases and are metabolized to phosphoenolpyruvate. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) catalyzes the irreversible carboxylation of phosphoenolpyruvate to oxaloacetate. CO₂ fixation via PEPC provides a substantial amount of carbon skeletons for ammonium assimilation in the nodule; in alfalfa it provides up to 25% of the supplied carbon (Vance *et al.*, 1994).

The development of mutants or transgenic plants, low in a single enzyme activity, is useful in determining which enzyme(s) might catalyze the rate-limiting step in the overall process of nitrogen fixation and ammonium assimilation. *Arabidopsis*, barley, and pea mutants lacking Fd (Avila *et al.*, 1993; Lea and Forde, 1994; Oliveira *et al.*, 1997; Somerville and Ogren, 1980) as well as antisense Fd-GOGAT transgenic tobacco plants (Ferrairo-Méry *et al.*, 2000) have been well characterized. These studies demonstrated the major role of Fd-GOGAT in the re-assimilation of ammonia from photorespiration, in photosynthetic tissues.

Owing to the tetraploid nature of alfalfa, it has not been possible to obtain mutants lacking ammonia assimilating enzymes. Nevertheless, antisense transgenic alfalfa plants impaired in a nodule enzyme activity, such as GS1 (Harrison *et al.*, 2000), PEPC (Schulze *et al.*, 1998), and AAT-2 (Mett *et al.*, 1996) have been reported. Antisense strategy has also been used to reduce uricase activity in *Vigna* Lee *et al.*, 1993). Recently Schoenbeck *et al.* (2000) reported the characterization of a single transgenic alfalfa plant containing an antisense NADH-GOGAT under the control of the nodule-enhanced AAT-2 promoter. NADH-GOGAT activity

was reduced by some 40–50% in nodules, but there was a modest impact on the symbiotic phenotype. Moreover, antisense NADH-GOGAT expression was driven by the AAT-2 promoter which is not specific for root nodules. Because the AAT-2 promoter also resulted in antisense GOGAT expression in flowers pleiotrophic effects on pollen development were observed.

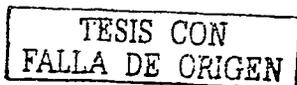
In this work, we report the physiological characterization of four transgenic alfalfa (*M. sativa* L.) plants with the chimeric gene composed by the soybean nodule-specific leghemoglobin (Lb) gene promoter (Christensen *et al.*, 1993) fused in the antisense orientation of a cDNA fragment from alfalfa NADH-GOGAT (Gregerson *et al.*, 1993). Plants from each line showed a different percentage of remaining NADH-GOGAT activity in the nodules, ranging from 35 to 85%. The most deleterious symbiotic phenotype was observed in the plants with the lowest nodule NADH-GOGAT activity. These plants were drastically affected in the carbon/nitrogen assimilation in the nodule and in nodule anatomy, indicating the crucial role of this enzyme in symbiotic metabolism.

Results

Selection of transgenic alfalfa plants

Plasmid pMRGA (Figure 1a) contained the antisense construct of a cDNA fragment (5.3 kb) from nodule-enhanced alfalfa NADH-GOGAT (Gregerson *et al.*, 1993) fused to the 2-kb promoter region from the soybean *lbc3* gene (Christensen *et al.*, 1989). This promoter directs nodule-specific expression of reporter genes in different heterologous legume systems such as *Lotus corniculatus* (Stougaard *et al.*, 1986) and alfalfa (de Bruijn *et al.*, 1989). Alfalfa was genetically transformed by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* harboring pMRGA. Thirty-seven alfalfa plants were regenerated on selective media from 60 co-cultivated explants. The presence of the transgenes in re-generated plants was initially confirmed by PCR of both, the *nptII* marker gene and the junction of *lbc3* promoter and NADH-GOGAT gene. This analysis showed that 11 independent transformants contained both transgenes, and were designated as GA (GOGAT antisense) plants. Also, transgenic alfalfa plants containing only the marker gene from pBin19 were obtained, and used as control designated as control (C) plants.

The 11 GA plants obtained and one C plant were propagated clonally as stem cuttings which when rooted were inoculated with *S. meliloti* strain 2011. Small clonal populations of each GA and C line were assayed for nodule NADH-GOGAT activity. Four of the 11 transgenic lines had consistently reduced nodule NADH-GOGAT activity, as compared to the control. These four primary transformants,



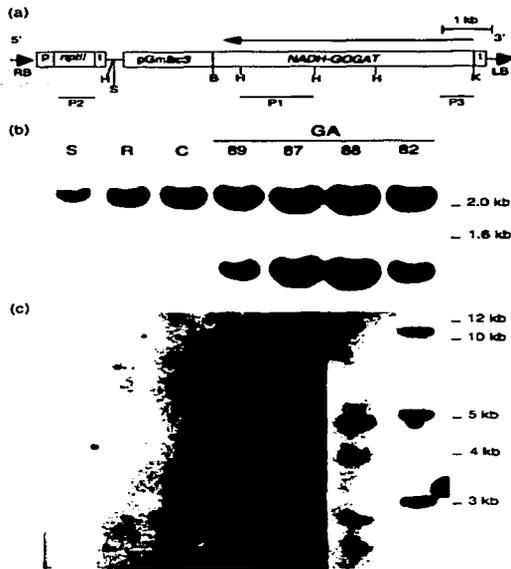


Figure 1. Schematic representation of the T-DNA region of plasmid pMRGA and DNA blot analysis.

(a) Plasmid pMRGA harbors the marker gene *nptII* fused to the nopaline synthase promoter (p) and nopaline synthase terminator (t). A partial DNA fragment of 5.3 kb from the alfalfa *NADH-GOGAT* cDNA is fused in antisense direction with respect to the *GmIbc3* promoter and t. Both genes are flanked by the right (RB) and left (LB) borders of the *A. tumefaciens* T-DNA. P1–P3 indicated fragments used as probes for DNA- (P1 and P2) and RNA-blot (P3) analyses. B: BamHI; H: HindIII; K: KpnI; and S: SacI. (b and c) Southern blot analyses of transgenic GA and control plants. DNA (10 µg) was digested with HindIII and probed with P1 (b) or with a PCR-amplified fragment from *nptII* gene (c). Molecular weight markers are shown. S: Saranac; R: RegenSY27x; C: control line; and GA: *NADH-GOGAT* antisense lines.

designated GA89, GA87, GA88, and GA82 were selected for further study. For maintenance, these lines were grown in non-symbiotic conditions, watered with nutrient solution containing nitrate as nitrogen source. Under non-symbiotic conditions the growth of GA plants was similar to wild-type plants.

The stable integration of the *NADH-GOGAT* transgene in the four GA primary transformants, was confirmed by DNA blot analysis (Figure 1b,c). Using the P1 fragment (Figure 1a) as probe, the expected hybridization bands corresponding

to internal fragments from the antisense transgene and from the genomic *NADH-GOGAT* sequence were observed in the HindIII-digested total DNA (Figure 1b). The hybridization pattern of the four GA plants showed a band of approximately 1.5 kb that corresponded to the internal fragment of cDNA used as probe, and a band of approximately 2 kb that corresponded to the genomic *NADH-GOGAT* sequence, nucleotide 8380–10443 which includes exons 14 and 15 plus introns 13–15 flanked by part of exons 13 and 16 (Vance *et al.*, 1995) (Figure 1b). The hybridization pattern of the alfalfa negative control plants analyzed: one non-transformed plant from the Saranac cultivar used for sequencing the *NADH-GOGAT* gene (Gregerson *et al.*, 1993; Vance *et al.*, 1995); one non-transformed plant from the RegenS cultivar used for transformation; and one C plant, showed only the expected larger band corresponding to the alfalfa *NADH-GOGAT* genomic fragment (Figure 1b).

To assess copy number of inserted transgenes, total DNA digested with HindIII was probed with the P2 *nptII* gene fragment (Figure 1a). The two non-transformed alfalfa plants lacked a hybridization band, while the C plant showed only one copy of the transgene (Figure 1c). Data from Figure 1(c) indicated that multiple copies of the transgenes were present in each transgenic line: GA89 line showed at least two copies, GA87 and GA88 showed at least four copies each, and GA82 showed at least three copies (Figure 1c). However, these data (Figure 1c) may not reflect the presence of the entire *NADH-GOGAT* antisense transgene. The different hybridization patterns observed indicate that each GA plant arose from independent transformation events.

Antisense inhibition of *NADH-GOGAT* gene expression in alfalfa transgenic GA lines

The effect of the antisense *NADH-GOGAT* construct on homologous *NADH-GOGAT* gene in alfalfa nodules was determined at the level of transcripts, protein, and enzyme-specific activity. Molecular analysis was performed 21 days post-inoculation (dpi) with *S. meliloti*, when mature alfalfa nodules showed the highest activity of ammonium assimilating enzymes (Egli *et al.*, 1989).

Steady-state levels of *NADH-GOGAT* transcripts in nodules of GA alfalfa lines were determined by RNA blot analysis using total RNA extracted from nodules of GA and C lines (Figure 2a) probed with P3 internal fragment of *NADH-GOGAT* cDNA (Figure 1a). All the GA lines analyzed showed a significant reduction in the abundance of *NADH-GOGAT* transcript as compared to the C line (Figure 2a). Densitometric quantification of at least three blots indicated that the reduction was higher in the GA89 line (62% ± 14) than in the GA87 (35% ± 5), GA88 (50% ± 11), and GA82 (48% ± 12) lines.

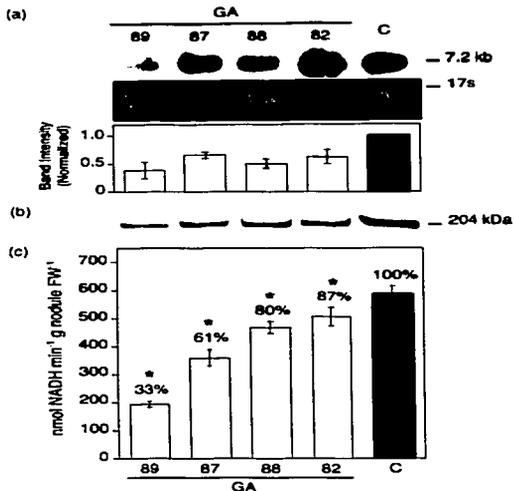


Figure 2. Analysis of *NADH-GOGAT* gene expression in transgenic antisense lines nodules at 21 dpi.

(a) RNA gel blot analysis of *NADH-GOGAT* mRNA. Total nodule RNA (20 µg) from transgenic and control lines was hybridized with P3 (shown in Figure 1a) and E1B-stained 17S rRNA functioned as loading control. The relative intensity of the bands hybridizing with P3 was quantified using the NIH IMAGE version 1.61 program. Values are mean ± SE of at least three measurements.

(b) Western blot analysis. Protein extracts (50 µg) were probed with *NADH-GOGAT* antibody. Shown is a representative immunoblot out of a total of three experiments.

(c) Nodule-specific activity of *NADH-GOGAT*. Values are mean ± SE of at least 10 measurements. *Significant difference ($P < 0.05$).

The expression of alfalfa *NADH-GOGAT* polypeptide was determined by immunoblot analysis using specific alfalfa *NADH-GOGAT* polyclonal antibodies (Anderson *et al.*, 1989). The data from Figure 2(b), showed that in all GA lines *NADH-GOGAT* protein is reduced as compared to the C line. Quantification of at least three protein blots by image densitometry, demonstrated a consistent reduction in *NADH-GOGAT* protein in the GA89, GA87, GA88, and GA82 of 69% (-6), 32% (-14), 22% (-11), and 11% (+4), respectively, from the control.

The data of nodule *NADH-GOGAT*-specific activity, averaged from different experiments and the percentage of remaining activity with respect to C are shown in Figure 2(c). The greatest reduction in *NADH-GOGAT*-specific activity

was observed in GA89 line, in agreement with the reduction in its RNA and protein levels.

Our data on the activity of *NADH-GOGAT* at different stages of alfalfa nodule development were in agreement with those reported by Egli *et al.* (1989); it was maximal at around 19 dpi, and then decreased to very low levels at later stages of the symbiosis with *S. meliloti*. At 35 dpi, the percentage of remaining *NADH-GOGAT*-specific activity in the nodules of each of the four GA lines (data not shown) was similar to the remaining activity described for 21 dpi (Figure 2c). Whereas a drastic drop of the activity was observed at 84 dpi in the four GA lines compared to the control, the remaining activity ranged between 40 and 50% (data not shown).

Analysis of the progeny (T_1) from GA primary transformants

Seeds from each GA line were obtained after crossing two different individuals from the same line (essentially self-crosses but harboring the transgenes); these were germinated, grown and inoculated with *S. meliloti*. The progeny T_1 plants analyzed by DNA-blot: eight plants from GA89; eight plants from GA87; and four plants from GA88 inherited the transgene (data not shown). Only one T_1 plant from GA87 did not inherit the transgene and had a normal phenotype.

A physiological characterization of T_1 plants derived from the primary transformants of lines GA89, GA87, and GA88 was undertaken in order to assess whether the *NADH-GOGAT* antisense phenotype correlated with the presence of the inherited transgene. Nodule *NADH-GOGAT*-specific activity from eight GA89 progeny plants showed a reduction ranging from 88 to 60% that of the control line. Three GA89 T_1 plants were further characterized as shown in Figure 3. These genotypes had reduced *NADH-GOGAT* transcript levels of 90–50% (Figure 3a) accompanied by reduced protein levels of 85–70% (Figure 3b) and a reduction in enzyme activity of c. 85% (Figure 3c). Of the five GA87 T_1 plants analyzed, one did not show an antisense phenotype, while the rest showed a reduction of *NADH-GOGAT* activity ranging from 60 to 50%. Further characterization of the T_1 GA87 plant showed a reduction of *NADH-GOGAT* RNA of 57% (Figure 3a) and protein levels of 30% (Figure 3b) that correlated with a 50% reduction in enzyme activity. Eight T_1 GA88 plants showed a reduction in nodule *NADH-GOGAT* activity of 50–20%. The T_1 GA88 plant also had reductions of 58% in *NADH-GOGAT* RNA level (Figure 3a), 24% in the protein level (Figure 3b), and 54% in enzyme activity (Figure 3c).

Nitrogen and carbon assimilation in nodules of GA antisense lines

Previous studies have demonstrated that key symbiotic enzymes for primary nitrogen assimilation, such as GS,

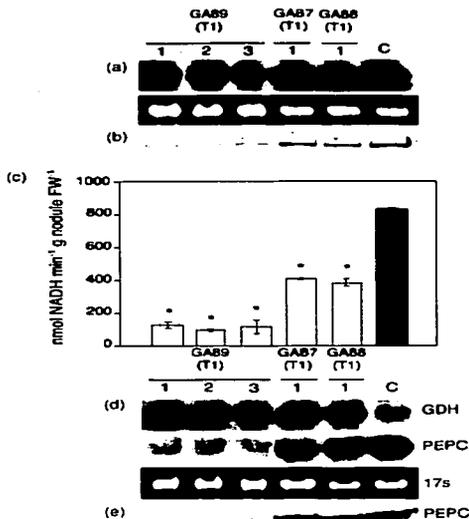


Figure 3. Analysis of NADH-GOGAT and related root nodule enzyme activity in progeny (T₁) plants from GA primary transformants. Data from three T₁ plants from GA89, one from GA87 and one from GA88 as compared to a T₁ control plant are shown. (a-c) NADH-GOGAT expression, performed as described in Figure 2. (a) RNA gel blot analysis and EtBr-stained 17S rRNA as loading control. (b) Western blot analysis. (c) Specific enzyme activity. *Significant difference ($P < 0.05$). (d, e) Symbiotic enzyme expression. (d) RNA gel blot analysis performed as in Figure 3, probed for NADH-GDH and PEPC, and EtBr-stained 17S rRNA. (e) Western blot analysis for PEPC performed as in Figure 5.

NADH-GOGAT, AAT, PEPC, and SS are induced in nodules during effective symbioses (Fedorova *et al.*, 1999; Vance *et al.*, 1994). These enzymes are postulated to have a common regulatory mechanism, and so an alteration in nodule NADH-GOGAT gene expression could potentially affect the expression of the other linked genes. To test this hypothesis, nodule RNA and protein levels as well as the enzyme activities of GS, AAT, PEPC, and SS were determined at 21 dpi in the four GA and the control lines (Figures 4 and 5). The RNA, protein levels, and enzyme activities of nodules from the GA82 line were not significantly different from the control (Figures 4 and 5). The transcript abundance of GS was significantly reduced in the GA89, GA87, and GA88 lines by 35% (-7), 56% (-13), and 30% (-4), respectively

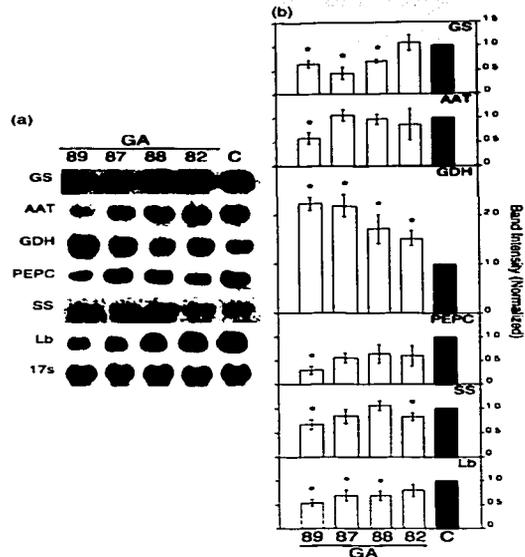


Figure 4. RNA gel blot analysis of key symbiotic enzymes.

(a) Total RNA (20 µg) isolated from 21-dpi nodules of GA and C lines was probed for the presence of transcripts encoding for: glutamine synthetase (GS), aspartate aminotransferase (AAT), NADH-glutamate dehydrogenase (GDH), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), sucrose synthase (SS), and leghemoglobin (Lb). Probed 17S rRNA as loading control. (b) Quantification of intensity of the bands hybridizing with each probe using the NIH IMAGE version 1.61 program. Values are mean \pm SE of at least three measurements. *Significant difference ($P < 0.05$).

(Figure 4). However, the specific activity and protein level of nodule GS did not vary among any of the plants studied (data not shown). The amount of AAT RNA (42% + 12) (Figure 4), protein (23% + 2) and activity (28% + 8) were significantly reduced in nodules of GA89 plants (Figure 5a). The transcript abundance of PEPC was significantly reduced by 70% (-8) in nodules of GA89 (Figure 4) and correlated with low levels of protein and enzyme activity (Figure 5b). By comparison, the protein level of PEPC in GA89 showed a greater reduction of 84% (-1), than of enzyme activity (69% + 2) (Figure 5b). This is consistent with previous studies showing selective degradation of PEPC in ineffective alfalfa nodules (Pladys and Vance, 1993). PEPC activity was also significantly reduced in

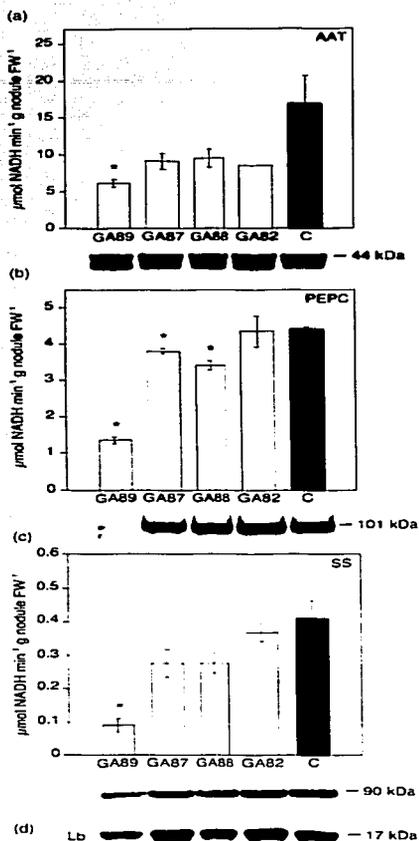


Figure 5. Specific activities and protein levels of key symbiotic enzymes in alfalfa nodules at 21 dpi. Enzyme activities and immunoblot analysis for AAT (a), PEPC (b) and SS (c), and immunoblot analysis for Lb (d) were performed in 21-dpi nodule extracts from GA (white bars) and C lines (dark bars). For immunoblot analysis, variable amounts of total soluble protein were separated in polyacrylamide gels containing SDS at different concentrations (as indicated in Experimental procedures). The molecular mass (kDa) corresponding to each polypeptide is indicated. * Significant difference ($P < 0.05$).

nodules of GA87 and GA88 (Figure 5b). The transcript abundance of SS showed a significant reduction of 33% (+10) (Figure 4) that correlated with the reduction in protein level (31% + 5) in GA89 nodules (Figure 5c). However, a greater reduction of 78% (+5) in enzyme activity was observed (Figure 5c).

Although the role of NADH-dependent glutamate dehydrogenase (NADH-GDH) in plants has not been precisely defined as yet, it has been described as a catabolic rather than a biosynthetic enzyme (Lam *et al.*, 1996). The transcripts for NADH-GDH were increased, c. twofold, in the nodules of the four GA lines analyzed as compared to C nodules (Figure 4). The transcripts for Fd-GOGAT were not detected in nodules of any of the alfalfa plants analyzed (data not shown).

Leghemoglobin (Lb) has a crucial role in symbiosis by facilitating oxygen diffusion to actively respiring bacteroids (Appleby, 1984). Leghemoglobin RNA showed a reduction in nodules of GA89 (46% + 7), GA87 (31% + 12) and GA88 (32% + 10) plants (Figure 4) and Lb protein abundance showed a reduction in nodules of GA89 (18% + 7) (Figure 5d).

The T₁ plants analyzed showed the expected alterations in the expression of genes coding for C/N assimilation enzymes (Figure 3). NADH-GDH transcript abundance appeared to increase in all the T₁ plants analyzed, as compared to the control (Figure 3d). The three GA89 T₁ plants showed a reduction in PEPC transcript level that corresponded to a reduction in protein level (Figure 3d,e).

Amino acids synthesized in alfalfa nodules from carbon and nitrogen assimilation favors the synthesis of amides, such as asparagine and glutamine, which are preferentially transported via xylem to other plant organs (Temple *et al.*, 1998b; Vance *et al.*, 1994). The HPLC analysis of amino acids content showed that glutamate, glutamine, and alanine were the most abundant amino acids detected in all the nodules analyzed. No significant difference was observed among the amino acid content in nodules from C versus GA88 and GA82 plants (data not shown). In contrast, in nodules of GA89 plants, the concentration of the most abundant amino acids was decreased by some 70%, while the concentration of other amino acids present in smaller amounts was reduced by 50% (Table 1). In nodules of GA87 plants, the concentration of glutamate (30%), glutamine (20%) and alanine (50%) were significantly reduced with respect to nodules of C plants (Table 1). A TLC analysis of amino acids content in the nodules of GA and C plants showed that asparagine was one of the most abundant amino acids. This analysis showed that asparagine was reduced around 67 and 41% in nodules of GA89 and GA87 plants, respectively (data not shown). However, the HPLC method that we used (Table 1) did not allow us to quantify the asparagine concentration in nodules because it is hydrolyzed in the acidic environment used to prepare the samples. These data are in agreement with the

Table 1 Metabolite content in transgenic GA lines nodules at 21 dpi

LINE	Amino acids ($\mu\text{mol g}^{-1}$ nodule FW $^{-1}$)				Carbohydrates (mg g^{-1} nodule FW $^{-1}$)		
	Glu	Gln	Ala	Σ ^a	Glc	Fru	Sac
GA89	0.87 (± 0.14) [*]	1.37 (± 0.32) [*]	0.28 (± 0.06) [*]	0.85 (± 0.08) [*]	0.96 (± 0.05) [*]	0.68 (± 0.05)	1.92 (± 0.14) [*]
GA87	1.75 (± 0.13) [*]	3.73 (± 0.28) [*]	0.66 (± 0.11) [*]	1.15 (± 0.07)	0.97 (± 0.06) [*]	0.97 (± 0.07)	2.50 (± 0.15) [*]
C	2.53 (± 0.26)	4.73 (± 0.33)	1.26 (± 0.23)	1.55 (± 0.18)	0.76 (± 0.06)	0.73 (± 0.12)	1.43 (± 0.16)

Values are the mean (\pm SE) from at least three measurements.

Σ , sum of the concentration of arg, asp, gly, ile, iso, lys, met, phe, ser, thr, and val.

^{*}Significant difference versus control ($P = 0.05$).

diminished enzyme activities observed in nodules from GA89 and GA87 plants (Figure 5).

The inhibition of carbon metabolic enzymes such as PEPC and SS (Figure 5) and the impairment in ammonium assimilation and amino acids synthesis (Table 1) in the nodules of GA plants could potentially affect the concentration of carbon compounds which are the substrates or products of those enzymes. To test this hypothesis, we measured the concentration of sugar and organic acids in the nodules of the antisense and control plants (Table 1). The concentrations of all carbon metabolites determined showed no significant differences in nodules of GA88 and GA82 plants as compared to the controls. However, carbohydrate determinations revealed that sucrose content was increased some 35 and 75% in the nodules of the GA89 and GA87 plants, respectively. Fructose concentration did not vary significantly, while glucose concentration increased about 25% in both GA plants. This is consistent with the observed inhibition of nodule SS activity (Figure 5c). The concentration of nodule organic acids citrate, malate and succinate did not vary in the GA plants with respect to C. However, oxalate content was increased some twofold in the nodules of the GA89, GA87, and GA88 plants with respect to control plants (data not shown). The accumulation of oxalate may be related to an adaptive response to detoxify ammonia through the formate pathway.

Characterization of the symbiotic phenotype of GA antisense lines

Plants from GA89 and GA87 antisense lines formed more nodules than C plants (Figure 6a). We interpreted this as a compensatory response of the plant to the diminution of ammonium assimilation. However, the total nodule dry weight of plants from GA89 and GA87 antisense lines was significantly reduced by 35% (+4) and 29% (+6), respectively, from control plants (Figure 6b). Accordingly, nodules from the GA89 and GA87 lines showed morphological alterations. Not only was the average dry weight of individual nodules reduced (data not shown) but nodules were also smaller and yellowish as compared to wild-type nodules. The morphology of nodules from the GA89

(Figure 6c) was severely altered in comparison to wild-type nodules (Figure 6d). The smaller size and a yellowish color were evident in longitudinal sections of nodules from GA89 plants (Figure 6e). Nodule sections from at least three different nodules from each plant (20 observations in total) were evaluated. The histological analysis of control and GA89 nodules (Figure 6f,g) showed the typical developmental zones reported by Vasse *et al.* (1990): the meristematic zone (I), infection zone (II), the amyloplastic-rich interzone between II and III zones (*), the nitrogen-fixing zone (III) and the senescent zone (IV). As compared to control nodules, in nodules from GA89 plants the zones I-III were smaller while the senescent zone (IV) was increased in size (Figure 6f,g). Broad differences were observed in the nitrogen fixation zone (zone III), there were fewer infected cells in GA89 nodules versus control nodules (Figure 6h,i). Moreover, infected cells of GA89 nodules were smaller than those seen in nodules of the control (Figure 6h,i). In addition, early senescence can be observed in GA89 nodules, as indicated by agglutination of the bacteroids in infected cells (Figure 6i).

The altered morphology of the nodules from the GA89 (Figure 6) and GA87 (data not shown) plants, represented by a reduced nitrogen fixation zone accompanied by an increased senescent zone, reflects the reduction in symbiotic nitrogen fixation. A significant decrease (67% + 3 and 58% + 7) in nitrogenase-specific activity was detected in nodulated GA89 and GA87 plants, respectively, with respect to control plants (Figure 7a). Lower symbiotic nitrogen fixation in GA89 and GA87 plants was accompanied by the significant decrease in the foliage fresh weight (41% + 4 and 29% + 6) (Figure 7b). In addition, the total nitrogen content of the foliage of GA89 plants was decreased (38% + 6) at 21 dpi (Figure 7c), and a diminution of foliage nitrogen content (37% + 2) in GA87 plants was evident at later stages of the symbiosis.

The inoculated GA89 and GA87 plants showed the chlorotic symptoms resulting from the lack of sufficient nitrogen in aerial organs. While the chlorophyll content of the leaves of C plants was 37 (+1) nmol cm $^{-2}$, the leaves from GA89 line showed 28 (+2) nmol cm $^{-2}$ and those from GA87 line showed 32 (+1) nmol cm $^{-2}$. The leaf area of

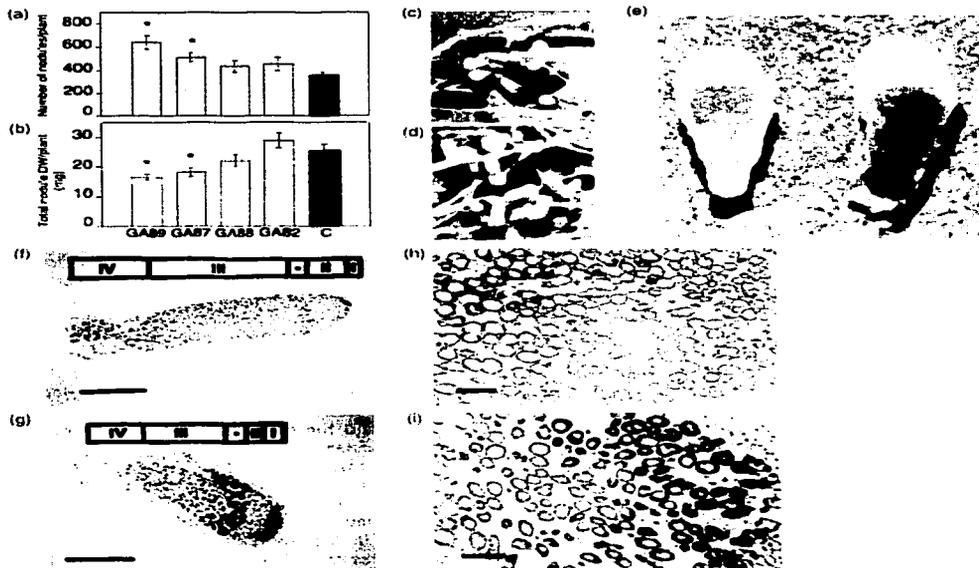


Figure 6. Nodulation phenotype of GA lines.

Number of nodules (a) and nodule dry weight (b) of GA (white bars) and C (dark bar) lines at 21 dpi. *Significant difference ($P = 0.05$). Nodules from control (c) and GA89 (d) lines. (e) Longitudinal sections of a representative nodule from GA89 (left) and C (right) lines. (f–i) Bright-field photographs of longitudinal sections of control (f) and GA89 (g) lines. Nodule zones as designated by Vasse *et al.* (1990) are indicated. Bar = 500 μm (h, i). Magnification of the nitrogen fixation zone (ii) from f and g, respectively. Bar = 100 μm .

Inoculated GA89 and GA87 plants was reduced by 30% (+3) and 15% (+5), respectively, as compared to C plants. The GA89 and GA87 plants had reduced light-saturated photosynthesis by around 40–30%, respectively, from control plants. Figure 7(d) shows representative 21-dpi alfalfa plants from the GA89 and control lines, the reduced growth of the antisense plant was evident.

Discussion

Here, we extend the understanding of root nodule NADH-GOGAT by showing that specific reduction of nodule NADH-GOGAT activity results in impaired nitrogen assimilation, reduced plant N and growth, early senescence of nodules, and reduced symbiotic nitrogen fixation. The reduction in nitrogen assimilation and fixation was accompanied by significantly increased nodule carbon in the form

of sucrose, implying that carbon metabolism/flux was also modified by reductions in NADH-GOGAT activity. A previous study by Schoenbeck *et al.* (2000) on the characterization of a NADH-GOGAT antisense alfalfa plant reported that a reduction of nodule NADH-GOGAT enzyme activity by 40–50% resulted in only minor symbiotic alterations. In our study, a similar antisense technology approach was used, but the expression of antisense NADH-GOGAT cDNA fragment used was under the control of the nodule-specific *Gm/bc3* soybean gene promoter (Christensen *et al.*, 1989). Several *cis*-acting elements have been identified in the *Gm/bc3* promoter that are involved in nodule-specific expression (Ramlov *et al.*, 1993). We achieved a 70% reduction of nodule NADH-GOGAT using the *Gm/bc3* promoter and a concomitant alteration in symbiotic phenotype.

Although the expected 5.3-kb anti-RNA molecule was not detected in nodules of GA plants, using double-stranded

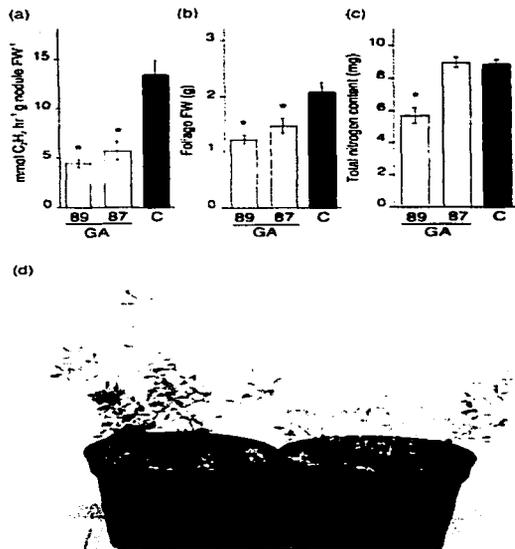


Figure 7. Symbiotic phenotype of GA89 and GA87 lines. Nitrogenase activity (a), foliage fresh weight (b) and nitrogen content in foliage (c) in GA89, GA87 (white bars), and control (dark bars) lines at 21 dpi. Values are mean \pm SE of at least five measurements. *Significant difference ($P < 0.05$). (d) Foliage aspect of control (left) and GA89 (right) inoculated plants at 21 dpi.

DNA probes, the mRNA concentration of NADH-GOGAT was decreased. These results suggest that the inhibitory effect of anti-RNA was exerted through the rapid degradation of double-stranded RNA species formed by complementary base pairing between NADH-GOGAT mRNA and anti-RNA (Sijen and Kooter, 2000).

The inhibition of NADH-GOGAT gene expression in alfalfa nodules resulted in a negative symbiotic effect, with the severity of the effect increasing in proportion to the inhibition of NADH-GOGAT enzyme activity in each of the four antisense transformants analyzed. The negative symbiotic effects occurred with concomitant reductions in the level of NADH-GOGAT transcript in the progeny of the GA lines obtained. All the T₁ plants analyzed had either similar or increased inhibition of NADH-GOGAT gene expression as compared to their parental line and showed similar negative pleiotropic effects.

The affected symbiotic phenotype of GA89 and GA87 plants, which had greatest NADH-GOGAT inhibition c. 70 and 40%, respectively, strongly supports the concept that NADH-GOGAT activity limits the assimilation of ammonia from fixed nitrogen in alfalfa nodules. This work provides direct evidence for the role of NADH-GOGAT playing a critical role in nodule ammonia assimilation as proposed by Temple *et al.* (1998b) and Trepp *et al.* (1999a). Interestingly, antisense GS has little effect on symbiotic parameters (Temple *et al.*, 1998a).

In agreement with previous studies on the expression of key symbiotic enzymes during effective alfalfa symbiosis (Fedorova *et al.*, 1999; Vance *et al.*, 1994), most of the antisense NADH-GOGAT plants analyzed showed an accompanying inhibition in gene expression of other genes coding for C/N assimilation enzymes such as GS, AAT, PEPC and SS, and increased transcript abundance of NADH-GDH. It has been proposed that the signaling networks for C:N sensing enables plants to regulate metabolism and development in response to their internal C:N ratio and that the sensing and signaling systems are subjected to a 'matrix effect' in which certain functions and interactions occur depending upon species, cell types and developmental stages (Coruzzi and Zhou, 2001). Initial post-genomic studies in *Arabidopsis* are revealing the complexity of such network responses. The *Arabidopsis* microarray and RNA gel blot analyses reported by Wang *et al.* (2000) show diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. The impaired assimilation of fixed nitrogen of the GA89 and GA87 plants led to the accumulation of carbon compounds such as sucrose, glucose, and oxalate and to the decrease in N compounds such as amino acids and amides that translated into decreased shoot nitrogen. Thus, the sensing/signaling of the altered C:N ratios in the nodules of the antisense plants may trigger a complex response of the regulatory network that results in the altered transcription of several genes as we observed. Future post-genomic studies in model legumes such as *Medicago truncatula*, using mutant plants such as one lacking NADH-GOGAT, will enable us to more fully understand the complete regulatory networks or 'matrix effects' resulting from the C:N sensing or signaling in the nodules.

In addition to the concerted reduction in transcript levels of C/N assimilation genes, our results suggest that some of the symbiotic enzymes are also regulated at the post-transcriptional/transcriptional level. Although lower RNA level of GS was detected, the GA plants studied did not show reduction in protein concentration or enzyme activity. This is in agreement with previous reports that indicate that GS is controlled at the translational and post-translational/translational levels in GS antisense alfalfa plants (Temple *et al.*, 1998a). We found that nodule PEPC activity is reduced in the GA87 and GA88 lines that did not show a

reduction in transcript levels of this enzyme. It is known that nodule PEPC is regulated by phosphorylation/dephosphorylation cycle possibly mediated by changes in PEPC kinase activity and/or perturbation of substrate ATP levels in the cytosol and modulated by shoot photosynthate (Zhang and Chollet, 1997). The accumulation of sugars in nodules of the antisense plants having reduced ammonium assimilation may contribute a feedback inhibition of carbon metabolic enzymes such as SS.

The role of NADH-GDH in plant metabolism is still unresolved (Lam *et al.*, 1996). In alfalfa, NADH-GDH is expressed at low levels in the different zones of the nodules (Trepp *et al.*, 1999b). The presence of NADH-GDH enzyme activity in alfalfa nodules, did not correlate with nitrogen fixation since it was detected in ineffective nodules as well as in senescent nodules (Egli *et al.*, 1989). Our results on the increase in NADH-GDH transcript levels found in the early senescent nodules of GA plants, together with the results reported previously (Egli *et al.*, 1989; Trepp *et al.*, 1999b), indicate that the expression of NADH-GDH may be related to the recycling of ammonia during nodule senescence.

It has been reported that soybean bacteroids (Waters *et al.*, 1998) as well as pea bacteroids (Allaway *et al.*, 2000) may excrete some fixed nitrogen as alanine instead of or in addition to ammonia, to the plant nodule cells. To our knowledge, this phenomenon has not been reported for alfalfa bacteroids. We found that nodules from GA89 and GA87 lines had a reduction of alanine content of 80 and 50%, respectively, with respect to control nodules, and this does not seem to compensate the lack of glutamate and other derived nitrogen compounds needed for optimal plant growth.

Although nitrogenase data as measured by ARA must be interpreted with caution, we detected a decrease in nitrogenase activity on both nodule dry weight basis and the total activity per plant (data not shown) in the nodules of GA89 (70%) and GA87 (60%) than in the control. Nitrogenase activity in legume nodules is downregulated when nodulated plants are subjected to different treatments that affect plant C:N metabolism such as defoliation, addition of nitrate or drought (Arrese-Igor *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 1997). Neo and Layzell (1997) proposed that the inhibition of nitrogenase operates via an increase in oxygen-diffusion resistance that affects the flux of oxygen into the bacteroids. In alfalfa nodules, oxygen concentration decreases abruptly from the apical region (zone I) to the interzone II-III, that precedes the nitrogen fixation zone III (Soupene *et al.*, 1995). We have shown that the nodules of the GA89 plants have an altered structure, with smaller zones II and III and increased senescent zone IV. Also, a reduction in Lb was observed in the nodules of GA plants that had yellowish color and less Lb transcript and protein. These alterations could affect the oxygen flux in the nodules of GA89 plants, and consequently the nitrogenase activity. We observed

that the plant nitrogen deprivation, in symbiotic conditions, was accompanied by leaf chlorosis and impaired photosynthesis. The reduction in photosynthate supply may also affect nitrogen fixation in the nodules of GA89 plants.

In conclusion, the impaired symbiotic nitrogen fixation observed in GA89 and GA87 plants expressing antisense NADH-GOGAT appears to alter the metabolic flux of carbon and nitrogen compounds between photosynthetic and nodule tissues.

Experimental procedures

Vector construction

Plasmid pMRGA was constructed in three steps. In a first step, a 2-kb *SalI-BamHI* fragment (nucleotides -1956 to +46) containing the full-length promoter region of the soybean leghemoglobin *lbc3* gene (Christensen *et al.*, 1989) was introduced into *SalI-BamHI*-restricted pBl101 (Jefferson *et al.*, 1987) giving rise to plasmid pMR1. In the second step, a *BamHI-SacI* polylinker fragment derived from pSL1190 (Brosius, 1989) was introduced into *BamHI-SacI*-restricted pMR1, thereby replacing the *gus* gene and leading to pMR90. In the third step, the *KpnI-BamHI* fragment from pG7.2 (Gregerson *et al.*, 1993) containing 5.3 kb from the cDNA sequence of NADH-GOGAT from alfalfa nodules was cloned into the *KpnI-BamHI* sites of polylinker of pMR90 in antisense orientation with respect to the *lbc3* promoter generating plasmids pMRGA (Figure 1a).

Plant transformation and growth

Transgenic alfalfa (*M. sativa* L. cv. Regen SY27x) were generated essentially as described by Austin *et al.* (1995), using *A. tumefaciens* LBA4404 strain with the binary vector pMRGA or pBin19 (Bevan, 1984) as control. Well-developed embryos were recovered from callus cultured on media containing 50–100 µg ml⁻¹ kanamycin. Rooted plantlets were transferred to pots with vermiculite and watered with B&D (Broughton and Diwirth, 1971) nutritive solution supplemented with 7.5 mM KNO₃ for maintenance in a glasshouse. The presence of the transgenes in regenerated plants was determined by PCR, using a pair of primers reported by Blake *et al.* (1991) for the amplification of a 785-bp fragment from the *nptII* gene and another pair of primers (5'-TCA CCC TCC TCC AAC CCA-3' and 5'-AAG ACG ATG AAG CCC AAG CAG-3') for the amplification of a 430-bp fragment from the *lbc3* promoter-NADH-GOGAT gene junction. Plants testing positive for the transgenes were propagated clonally through stem cuttings that were rooted for around 5 weeks in pots with vermiculite and watered with nutrient solution. The propagated clones were then deprived of nitrogen for 2 weeks prior to inoculation with *S. meliloti* 2011 strain.

DNA isolation and gel blot analysis

Alfalfa genomic DNA was isolated from leaf tissue using the PUREGENE kit (GENTRA Systems, Minneapolis, MN). For Southern blot analysis, 20 µg of total DNA was digested with *HindIII*, separated by electrophoresis and transferred to Hybond-N⁺ membranes (Amersham Life Sciences, UK). Hybridization was performed at 65°C using ³²P-labeled internal fragments from NADH-GOGAT cDNA (P1) or *nptII* (P2) gene (Figure 1a) as probes.

RNA isolation and gel blot analysis

Total RNA was isolated from 21-dpi nodules of transgenic alfalfa plants using TRIzol reagent (GibcoBRL Life Technologies Inc., Grand Island, NY) as described by the manufacturer. For Northern blot analysis, 20 µg of total RNA was separated in an agarose gel containing 1.5% formaldehyde and transferred by capillary blotting to Hybond N⁺ membranes (Amersham Life Sciences, UK). Membranes were hybridized with ³²P-labeled probes at 65°C overnight. The P3 fragment from the *NADH-GOGAT* cDNA clone (Figure 1a), internal fragments from cDNA clones from bean nodule-induced AAT, PEPC, and SS transcripts (kindly provided by the group of Dr M. Lara, Nitrogen Fixation Research Center, UNAM, Mexico), as well as fragments from cDNA clones from alfalfa cytosolic GS1, *NADH-GDH*, *Fd-GOGAT*, and *Lb* were used as probes. The relative intensity of the bands hybridizing to the different probes, from at least three developed blots for each probe, was quantified using NIH IMAGE version 1.61 program. The data were analyzed by ANOVA.

Protein immunoblot analysis

Nodules were ground at 4°C in a mortar with the particular extraction buffer reported for each enzymatic assay (see below). Protein samples were separated by electrophoresis in SDS-PAGE gels. The total amount of protein and the percentage of acrylamide in the gel used for each enzyme was as follows: for NADH-GOGAT and PEPC, 50 µg protein and 7% gels; for GS, 40 µg protein and 10% gels; for AAT, 20 µg protein and 12.5% gels; for SS, 20 µg protein and 10% gels; and for Lb, 2 µg protein and 15% gels. After separation by electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The respective proteins were detected by incubating the blots first with specific anti-sera directed against alfalfa NADH-GOGAT (Anderson *et al.*, 1989), AAT (Griffith and Vance, 1989) PEPC (Miller *et al.*, 1987), Lb (Egli *et al.*, 1989), bean nodule GS1 (kindly provided by Dr M. Lara) or soybean SS (Gordon, 1992) (kindly provided by Dr A.J. Gordon, Institute of Grassland and Environmental Research, UK) and subsequently with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody. For quantification the blots were developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium salt (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA), as described by manufacturer. The relative density of the developed blots, from at least three blots for each enzyme, was quantified using NIH IMAGE version 1.61 program. The data were analyzed by ANOVA.

Determination of enzyme activities

Proteins were extracted from excised nodules and the activities of nodule enzymes were measured as previously described for NADH-GOGAT (Groat and Vance, 1981), GS (Ferguson and Sims, 1971), AAT (Gordon and Kessler, 1990), PEPC (Deroche *et al.*, 1983), and SS (Morrell and Copeland, 1985). Protein was measured by the Bradford (1976) method. Nitrogenase activity was determined in detached, 21-dpi nodulated roots by the acetylene-reduction assay (ARA). After the assay, nodule dry weight was determined. The data were analyzed by ANOVA.

Metabolite determinations

Amino acids were extracted with 80% ethanol from 100 mg fresh harvested nodules (21 dpi). 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 derivatization technique with 9-fluoromethyl-

chloroformate and a Nova-Pack C18 column (Waters International, Hertfordshire, UK). For carbohydrates determinations, harvested nodules were ground in cold 1 M HClO₄ (100 mg nodule FW ml⁻¹). The extracts were processed as described by Ferrario-Méry *et al.* (1997). Glucose, fructose and sucrose were determined by enzymatic reactions (1 ml final volume) coupled to NADH production as described by Gordon *et al.* (1999), with the following modifications. For glucose determinations, the reaction mixture contained 1 mM ATP, 1.5 mM NAD, 0.18 U ml⁻¹ glucose-6-P dehydrogenase and 0.2 U ml⁻¹ hexokinase. For fructose and sucrose determinations, 2 U ml⁻¹ phospho-glucose-isomerase and 20 U ml⁻¹ acid invertase were added, respectively. Organic acids were determined as described by Tafayé *et al.* (2001). Total N content of dry shoot samples from 21-dpi plants was determined with an Antek 7000 (Antek Instruments Inc., Houston, TX), as reported by Cevallos *et al.* (1996).

Microscopy

Harvested nodules were rapidly fixed and processed as reported by Trepp *et al.* (1999a). The embedded tissues were sectioned (5 µm) and affixed to poly-L-Lys-coated slides. After xylene deparaffinization, the sections were stained with a double-stained (safranin-fastgreen), dehydrated and mounted with Permount (Fisher Scientific). Sections were viewed with Axioskop 2 (Zeiss) and photographed with a MC80 DX camera (Zeiss).

Chlorophyll content and photosynthesis

Chlorophyll was extracted from freshly harvested fully expanded leaves using 80% ethanol, and quantified as reported (Graan and Ort, 1984). Leaf gas exchange (Li-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE) was used to measure light-saturated net CO₂ assimilation rate (Nogués *et al.*, 1998).

Acknowledgements

This work was partially supported by grants 4822-N9406 from CONACYT and IN205595 from DGAPA-UNAM. E.C. was supported by a PhD scholarship from DGEUP-UNAM and CONACYT. We acknowledge the technical assistance of Sara I. Fuentes, Jesús Arellano, Yolanda Mora and Sandra Contreras. We are grateful to Drs Jens Stougaard (University of Aarhus, Denmark), Miguel Lara (CIFN-UNAM, México), Anthony J. Gordon, and Caron James (Institute of Grassland and Environmental Research, UK) for kindly providing plasmids or anti-sera used in this work, Dr P.M. Reddy for academic advice, and Dr Otto Geiger (CIFN-UNAM) for critically reviewing the manuscript.

References

- Allaway, D., Lodwig, E.M., Crompton, L.A., Wood, M., Parsons, R., Wheeler, T.R. and Poole, P.S. (2000) Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* **36**, 508–515.
- Anderson, M.P., Vance, C.P., Heichel, G.H. and Miller, S.S. (1989) Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* **90**, 351–358.
- Appleby, C.A. (1984) Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 443–478.
- Arrese-Igor, C., Minchin, F.R., Gordon, A.J. and Nath, A.K. (1997) Possible causes of the decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. *J. Exp. Bot.* **48**, 905–914.

- Austin, S., Bingham, E.T., Matthews, D.E., Shahan, M.N., Will, J. and Burgess, R.R. (1995) Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica*, **85**, 381-393.
- Avila, C., Marquez, A.J., Pajuelo, P., Cannell, M.E., Wallsgrove, R.M. and Forde, B.G. (1993) Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. *Planta*, **189**, 475-483.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711-8721.
- Blake, N.R., Ditterline, R.L. and Stout, R.G. (1991) Polymerase chain reaction used for monitoring multiple gene integration in *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci.* **31**, 1686-1688.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brosius, J. (1989) Laboratory methods. Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA*, **8**, 759-777.
- Broughton, W.J. and Dilworth, M. (1971) Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* **125**, 1075-1080.
- de Bruijn, F.J., Felix, G., Grunenberg, B., Hoffmann, H.J., Mets, B., Ratet, P., Simons-Schreier, A., Szabados, L., Weiters, P. and Schell, J. (1989) Regulation of plant genes specifically induced in nitrogen-fixing nodules: role of cis-acting elements and trans-acting factors in leghemoglobin gene expression. *Plant Mol. Biol.* **13**, 319-325.
- Cevallos, M.A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y. and Mora, J. (1996) Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium elii* mutant strain unable to synthesize poly- γ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **178**, 1646-1654.
- Christensen, T., Sandal, N.N., Stougaard, J. and Marcker, K.A. (1989) 5' Flanking sequence of the soybean leghemoglobin *lbc3* gene. *Nucl. Acids Res.* **17**, 4383.
- Coruzzi, G.M. and Zhou, L. (2001) Carbon and nitrogen sensing and signalling in plants: emerging 'matrix effects'. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 247-253.
- Deroche, M.E., Carrayol, E. and Jolivert, E. (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase in legume nodules. *Physiol. Veg.* **21**, 1075-1081.
- Egü, M.A., Griffith, S.M., Miller, S.S., Anderson, M.P. and Vance, C.P. (1989) Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plants gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* **91**, 898-904.
- Fedorova, M., Tikhonovich, I.A. and Vance, C.P. (1999) Expression of Cassimilating enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) root nodules. *In situ* localization in effective nodules. *Plant Cell Environ.* **22**, 1249-1262.
- Ferguson, A.R. and Sims, A.P. (1971) Inactivation *in vivo* of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. *J. General Microbiol.* **69**, 423-427.
- Ferrairo-Méry, S., Suzuki, A., Kunz, C., Valadier, M.H., Roux, V., Hirel, B. and Foyer, C.H. (2000) Modulation of amino acid metabolism in transformed tobacco plants deficient in Fd-GOGAT. *Plant Soil*, **221**, 67-75.
- Ferrairo-Méry, S., Thibaud, M.-C., Betsche, T., Valdiér, M.-H. and Foyer, C.H. (1997) Modulation of carbon and nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in untransformed and transformed *Nicotiana glauca* during CO₂ enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. *Planta*, **202**, 510-521.
- Gordon, A.J. (1992) Carbon metabolism in the legume nodule. In *Carbon Partitioning within and between Organisms*. (Pollock, C.J., Farrar, J.F., Gordon, A.J., eds), Oxford: Bios Scientific Publishers, pp. 133-162.
- Gordon, A.J. and Kessler, W. (1990) Defoliation-induced stress in nodules of white clover. Part 2. Immunological and enzymatic measurements of key proteins. *J. Exp. Bot.* **41**, 1255-1262.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L. and Komina, O. (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* **120**, 867-877.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., Skot, L. and James, C.L. (1997) Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* **114**, 937-946.
- Graen, T. and Ort, D.O. (1984) Quantitation of the rapid electron donors to P700 the functional plastiquinone pool and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **250**, 1403-1410.
- Gregerson, R.G., Miller, S.S., Twary, S.N., Gantt, J.S. and Vance, C.P. (1993) Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell*, **5**, 215-226.
- Griffith, S.M. and Vance, C.P. (1989) Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. Part I. Purification and partial characterization. *Plant Physiol.* **90**, 1622-1629.
- Groat, G.R. and Vance, C.P. (1981) Root and nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **67**, 1193-1205.
- Harrison, J., Brugiare, N., Phillipson, B., Ferrario-Méry, 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 Soil*, **221**, 81-93.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Lam, H.-M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R. and Coruzzi, G.M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 569-593.
- Lee, P.J. and Forde, B.G. (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant Cell Environ.* **17**, 541-556.
- Lee, N.G., Stein, B., Suzuki, H. and Verma, D.P.S. (1993) Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic roots nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. *Plant J.* **3**, 599-606.
- Mett, V.L., Podivinsky, E., Tennant, A.M., Lochhead, L.P., Jones, W.T. and Reynolds, P.H.S. (1996) A system for tissue-specific copper-controllable gene expression in transgenic plants: nodule-specific antisense of aspartate aminotransferase-P₂. *Transgenic Res.* **5**, 105-113.
- Miller, S., Boylan, K.L.M. and Vance, C.P. (1987) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. Part III. Immunological studies of nodule phosphoenol pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **84**, 501-508.
- Morrall, M. and Copeland, L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* **78**, 149-164.
- Neo, H.H. and Layzell, D.B. (1997) Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* **113**, 259-267.
- Nogues, S., Allen, D.J., Morrison, J.L. and Baker, N.R. (1998) Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf develop-

- ment and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiol.* 117, 173-181.
- Oliveira, I.C., Lam, H.M., Coschigano, K., Melo-Oliveira, R. and Coruzzi, G. (1997) Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 185-198.
- Pladys, D. and Vance, C.P. (1993) Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 103, 379-384.
- Hamlov, K.B., Laursen, N.B., Stougaard, J. and Marcker, K.A. (1993) Site-directed mutagenesis of the organ-specific element in the soybean leghemoglobin *lbc3* gene promoter. *Plant J.* 4, 577-580.
- Schoenbeck, M.A., Temple, S.J., Trepp, G.B., Blumenthal, J.M., Samac, D.A., Gantt, J.S., Hernández, G. and Vance, C.P. (2000) Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transformed with antisense glutamate synthase transgene. *J. Exp. Bot.* 51, 29-39.
- Schulze, J., Shi, L., Blumenthal, J., Samac, D.A., Gantt, J.S. and Vance, C.P. (1998) Inhibition of alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase through an antisense strategy impacts nitrogen fixation and plant growth. *Phytochemistry*, 49, 341-346.
- Sijen, T. and Kooter, J.M. (2000) Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays*, 22, 520-531.
- Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1980) Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature*, 286, 257-259.
- Soupe, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G. and Batut, J. (1995) Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3759-3763.
- Stougaard, J., Marcker, K.A., Otten, L. and Schell, J. (1986) Nodule-specific expression of a chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature*, 321, 669-674.
- Temple, S.J., Bagga, S. and Sengupta-Gopalan, C. (1998a) Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense technology. *Plant Mol. Biol.* 37, 535-547.
- Temple, S.J., Vance, C.P. and Gantt, J.S. (1998b) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* 3, 51-56.
- Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P. and Samac, D.A. (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhanced organic acid synthesis and confers resistance to aluminium. *Plant Physiol.* 127, 1836-1844.
- Trepp, G.B., Plank, D.W., Gantt, J.S. and Vance, C.P. (1999a) NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* 119, 829-837.
- Trepp, G.B., Temple, S.J., Bucciarelli, B., Shi, L.F. and Vance, C.P. (1999b) Expression map for genes involved in nitrogen and carbon metabolism in alfalfa root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 526-535.
- Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S. and Gantt, J.S. (1994) Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* 101, 51-64.
- Vance, C.P., Miller, S.S., Gregerson, R.G., Samac, D.A., Robinson, D.L. and Gantt, J.S. (1995) Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. *Plant J.* 8, 345-358.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. and Truchet, G. (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172, 4295-4306.
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S.T. and Crawford, N.M. (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*. 12, 1491-1509.
- Waters, J.K., Hughes, B.L., II, Purcell, L.C., Gerhardt, K.O., Mawhinney, T.P. and Emerich, D.W. (1998) Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12038-12042.
- Zhang, X.-Q. and Chollet, R. (1997) Phosphoenolpyruvate carboxylase protein kinase from soybean root nodules: partial purification, characterization, and up/down-regulation by photosynthate supply from the shoots. *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 260-268.

IV.2. Resultados no incluidos en el artículo.

IV.2.1. Obtención de plantas transgénicas de alfalfa.

Para la transformación genética de alfalfa, mediada por *A. tumefaciens*, se utilizó el protocolo desarrollado por Austin et al. (1995), basado en la regeneración de plantas de alfalfa a partir de embriones somáticos. Este protocolo permitió obtener plantas transgénicas de alfalfa en un período de 3-4 meses.

Se efectuaron 4 experimentos de transformación de alfalfa utilizando la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, portadora de los vectores pBIN19, pMRGA y pMRGOS (Figura 8). El pBIN19 es un vector comercial que posee el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina, entre los bordes del T-DNA. El pMRGA y pMRGOS derivan del pBIN19 y portan, además del gen *nptII*, el cDNA de la NADH-GOGAT de alfalfa fusionado al promotor del gen de leghemoglobina (*Lbc₃*) de soya, en sentido inverso y directo, respectivamente. El pMRGA porta únicamente un fragmento de 5.3 Kb del cDNA de la NADH-GOGAT.

Como una primera aproximación en la determinación del posible estado transgénico de las plantas regeneradas, éstas se sometieron a un análisis por PCR (Polymerase chain reaction). La presencia de los transgenes fue detectada mediante la amplificación de fragmentos internos del T-DNA. Primeramente se amplificó un fragmento de 785 pb que corresponde al gen marcador de resistencia a kanamicina *nptII*, utilizando los siguientes oligonucleótidos: (Oligo *nptII* 5') 5' GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC 3' y (Oligo *nptII* 3') 5' GAA GAA CTC GTC AAG AAG GC 3'. Las plantas positivas a la amplificación del gen *nptII* fueron sujetas a la amplificación del fragmento de 470 pb, correspondiente a la unión (fusión) entre la región terminal 3' del promotor de *Lbc₃* y la región 5' del cDNA de la NADH-GOGAT en sentido inverso, con los siguientes oligonucleótidos: (Oligo 5', Gm*Lbc₃*) 5' TCA CCC TCC TCC AAC AAG CCA 3' y (Oligo 3', α GOGAT) 5' AAG ACG ATG AAG CCC AAG CAG 3'. Para plantas transformadas con el pMRGOS, que corresponde al cDNA de la NADH-GOGAT en el sentido directo, se utilizó el oligo GOGAT.SE (3'): 5' ACG CTG AGG GTC CAT GTT CTT 3'.

Con la finalidad de determinar si el transgen de *NADH-GOGAT* (en sentido inverso o directo), se encontraba completo o si la transferencia de éste fue parcial, se amplificó en su totalidad, con el par de oligonucleótidos Gm*Lbc₃* y 3'*tnos*, que se

sitúa en el terminador de nopalino sintetasa con la secuencia: 5' GAA CAA GAT GGA TTG CAC GCA 3'. El tamaño del fragmento esperado se encontraba entre los 5.6 Kb y 7.5 Kb, para las construcciones pMRGA y pMRGOS, respectivamente.

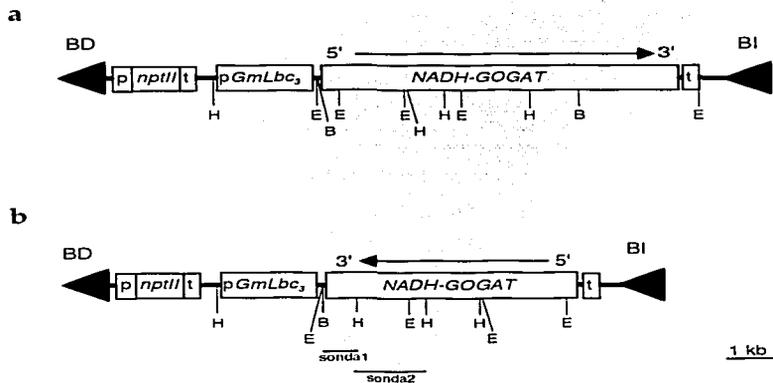


Figura 8. Construcciones químicas de NADH-GOGAT. a. pMRGOS; portador del cDNA de la NADH-GOGAT (7.2 kb), fusionado en sentido directo al promotor del gen de leghemoglobina de soja (*GmLbc₃*), así como del gen *npIII* que se encuentra entre las secuencias regulatorias que corresponden al promotor y región terminadora del gen de la nopalino sintetasa de *A. tumefaciens*. Ambos genes se encuentran insertados entre los bordes del T-DNA. b. pMRGA; como en a pero un fragmento *SacI-BamHI* de 5.3 kb del cDNA de la NADH-GOGAT, se encuentra fusionado en sentido inverso con respecto al promotor *GmLbc₃*. Se indican los sitios de restricción: H, *HindIII*; E, *EcoRI*; B, *BamHI* y las sondas utilizadas para el análisis por southern blot: sonda1 y sonda2.

De los tres primeros experimentos se obtuvo un alto porcentaje de escapes (plantas que resultaron ser negativas a la amplificación por PCR del gen marcador *nptII*), en presencia de concentraciones de kanamicina de 25 µg/ml en el medio de selección. Con la finalidad de evitar la regeneración de escapes, la concentración de kanamicina se elevó a 100 µg/ml, en el último experimento.

Para la construcción pMRGA, a partir de los 3 primeros experimentos, se recuperó una sola línea que presentó la amplificación de los transgenes por PCR, mientras que del cuarto (utilizando 100 µg/ml de kanamicina), se obtuvieron 11 plantas que resultaron positivas a la amplificación de los transgenes de *nptII* y la fusión del gen de *NADH-GOGAT* en sentido inverso al promotor de *Lbc₃*, así como del transgen de *NADH-GOGAT* en su totalidad, por el análisis de PCR (Tabla 1 y Figura 9).

En total se obtuvieron 12 plantas posibles transgénicas a los genes *nptII* y *NADH-GOGAT* en sentido inverso, confirmadas por PCR, que fueron sometidas a un análisis por southern-blot. Estas plantas se multiplicaron por medio de la clonación por esquejes estableciendo, de esta manera, líneas que se denominaron GA (de las iniciales en inglés: "GOGAT Antisense").

Tabla 1. Experimentos de transformación de alfalfa con la construcción pMRGA (*NADH-GOGAT* en sentido inverso).

Experimento	No. de explantes	No. de plantas regeneradas	Amplificación de <i>nptII</i>	Amplificación de la fusión <i>Lbc₃-NADH-GOGAT</i>	Amplificación del fragmento <i>Lbc₃-trns</i>
1	60	71	5 plantas	1 planta	0
2	75				
3	58				
4	60	37	11 plantas	11 plantas	11 plantas

Para la construcción pMRGOS (*NADH-GOGAT* en sentido directo), se lograron obtener 14 plantas que resultaron positivas a la amplificación del gen de resistencia a kanamicina (*nptII*), pero no mostraron amplificación positiva para la fusión del promotor de *Lbc₃* con el transgen de *GOGAT* en sentido directo. La caracterización de estas líneas no se continuó, debido a que la integración del transgen de *NADH-GOGAT* no fue evidenciada por ninguno de los métodos moleculares, PCR y southern-blot, además de que no presentaron incremento en la actividad de la *NADH-GOGAT* en simbiosis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

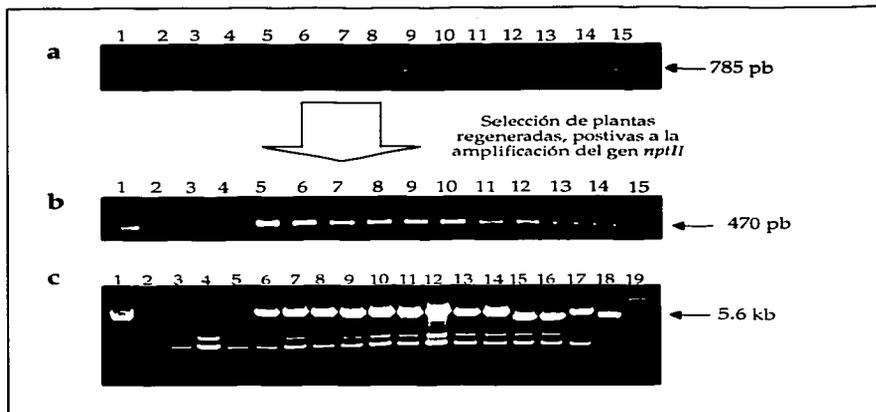


Figura 9. Análisis por PCR de las líneas regeneradas de alfalfa transformadas con el pMRGA. **a**, producto de la amplificación del fragmento de 785 pb del gen *nptII*. Carril 1, marcador 1 kb; carril 2, pMRGA; carril 3, control negativo; carriles 4-15, plantas regeneradas de alfalfa. **b**, amplificación de la fusión entre el promotor *Lbc*, y el cDNA de *NADH-GOGAT* en sentido inverso, producto de 470 pb. Carril 1, pMRGA; carril 2, marcador 1 kb; carriles 3 y 4, controles negativos; carriles 5-15, plantas regeneradas de alfalfa (*nptII* positivas). **c**, amplificación de la región *Lbc*-*tnos* de 5.6kb. Carriles 1 y 18, pMRGA; carril 2 y 19, 1 kb; carril 3, control negativo; carril 4, línea control (BIN19); carriles 5-17, plantas regeneradas de alfalfa (*nptII* y *Lbc*-*GOGAT* positivas). Geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

IV.2.2. Caracterización de las plantas transgénicas con el transgen de *NADH-GOGAT* en sentido inverso.

IV.2.2.1. Análisis por Southern-blot.

Una de las pruebas que confirman la inserción estable de los transgenes en las plantas regeneradas es el análisis por Southern-blot. Para verificar la integración del transgene de *GOGAT* en sentido inverso en las plantas regeneradas (positivas a la amplificación de los transgenes por PCR), el DNA total se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* y se hibridó con las sondas correspondientes a fragmentos internos del cDNA de la *NADH-GOGAT* (clonado en el pG7.2). La sonda 1, correspondiente a un fragmento interno *HindIII*-*Bam*HI de 816 pb, se utilizó para hibridar contra el DNA digerido con *EcoRI*, y la sonda 2,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

correspondiente a un fragmento *Hind*III de ~1.5 kb, contra el digerido con *Hind*III (Figura 8b).

El patrón de hibridación permitió distinguir entre el fragmento correspondiente al gen endógeno y el transgen de *NADH-GOGAT*. Debido a que la secuencia genómica posee intrones en estas regiones, la sonda hibridó en bandas de más alto peso que correspondían al gen endógeno, distinguiéndolo del transgen de la *NADH-GOGAT* que se evidenció por la hibridación en bandas de más bajo peso molecular (Figura 10).

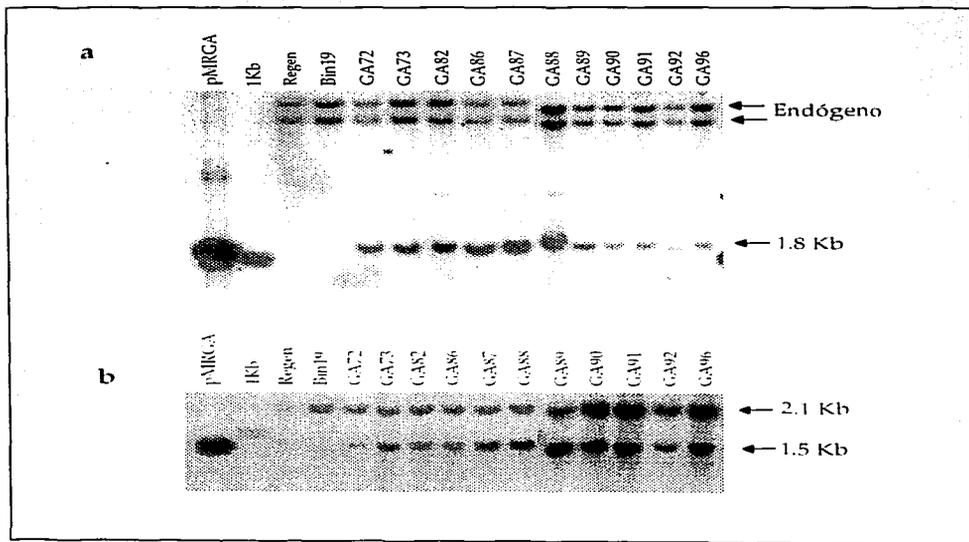


Figura 10 Southern-blot de las plantas transgénicas GA. 10 µg por carril de DNA total, digeridos con *Eco*RI en a y con *Hind*III en b. En a la hibridación fue con el fragmento *Hind*III-*Bam*HI de 816 pb (sonda1) y en b con un fragmento interno *Hind* III de ~1.5 kb (sonda2), del pC7.2 (clona de cDNA de la *NADH-GOGAT* de alfalfa). En a y b se muestran: marcador de peso molecular (1 Kb); controles negativos, *M. sativa* var. RegenSY27x (Regen) y planta transgénica con el gen *apHII* (Bin19); plantas transgénicas de alfalfa (GA).

El patrón esperado de hibridación se observó claramente en ambos análisis. Utilizando la sonda1 en digestiones con *Eco*RI, se distinguió entre el transgen,

como un fragmento de ~ 1.8 kb y el gen endógeno, fragmentos de alto peso molecular (Figura 10a). Con la sonda2 se evidenció una banda de ~ 1.5 kb que corresponde al transgen de GOGAT y una de ~ 2.1 kb del gen endógeno (Figura 10b). Las 12 líneas transgénicas presentaron el patrón esperado, confirmando la integración estable del transgen de *NADH-GOGAT* en sentido inverso.

IV.2.2.2. Selección de líneas transgénicas GA con reducción en la expresión de la *NADH-GOGAT* en los nódulos.

Como un análisis previo a la caracterización de las líneas transgénicas GA, se determinó la cinética de la actividad enzimática de la *NADH-GOGAT* y la nitrogenasa (Nasa) en nódulos de plantas silvestres de alfalfa a diferentes etapas de la simbiosis. La actividad de *NADH-GOGAT* se detectó a partir de los 7 dpi (días post-inoculación), tanto en las raíces como en nódulos, incrementándose en éstos a los 14 dpi. La actividad por mg de proteína y por peso fresco de tejido de la *NADH-GOGAT* en los nódulos, registró su máximo nivel a los 21 días post-inoculación, la cual disminuyó en días posteriores de la simbiosis, 28, 35 y 42 dpi (Figura 11a). Este pico de máxima actividad de GOGAT coincidió con la máxima actividad detectada para la nitrogenasa (Figura 11b). En las raíces se presentó una actividad de *NADH-GOGAT* ocho veces menor que en los nódulos a los 21 dpi y permaneció baja durante la simbiosis (Figura 11a).

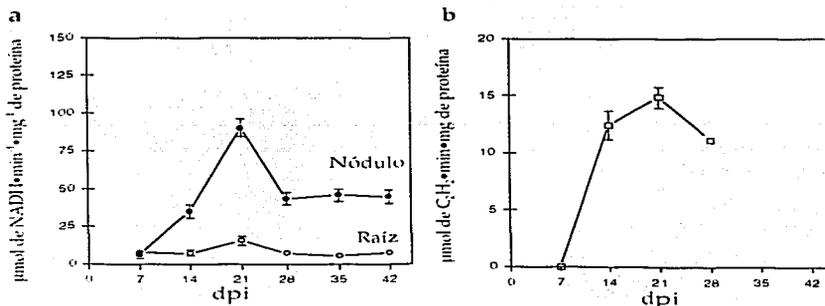


Figura 11. Cinética de actividad de la *NADH-GOGAT*, a y nitrogenasa, b, en plantas silvestres de alfalfa var. Rogensy27x.

La actividad enzimática de la NADH-GOGAT se cuantificó en clones de 10 de las 12 líneas transgénicas GA, en nódulos y raíces de 21 dpi, cuando la NADH-GOGAT presenta su máxima actividad enzimática. Cinco de las líneas presentaron una reducción significativa en la actividad enzimática (calculada por actividad específica así como por peso fresco, como se presenta en el artículo Cordoba et al.), con respecto al control, únicamente en los nódulos y no así en las raíces (Figura 12a y b). Lo anterior está de acuerdo con la expresión nódulo-específica del transgen y su posible efecto en la expresión de la NADH-GOGAT. A partir de este análisis se seleccionaron las líneas GA89, GA87, GA88 y GA82, que presentaron, respectivamente, una reducción del 55%, 40%, 25% y 11%, en la actividad específica de la NADH-GOGAT en nódulos con respecto a la línea control (Figura 12a). La caracterización molecular y fisiológica de estas líneas se presenta en el artículo incluido en esta tesis (Cordoba et al.).

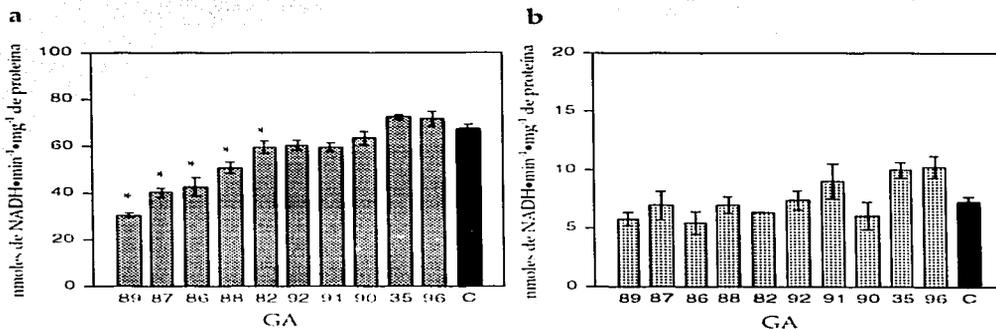


Figura 12. Actividad específica de NADH-GOGAT en nódulos, a y raíces, b, de las líneas GA de alfalfa (21 dpi). *Diferencia significativa vs. control (C), $P = 0.05$.

Se efectuó una cinética para determinar si la reducción en la actividad de NADH-GOGAT se mantenía en estadios posteriores de la simbiosis en las 4 líneas GA seleccionadas. La actividad de NADH-GOGAT se cuantificó a los 35 y 84 dpi,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

observándose una consistente reducción de la actividad específica de esta enzima en estas etapas posteriores de la simbiosis (Figura 13).

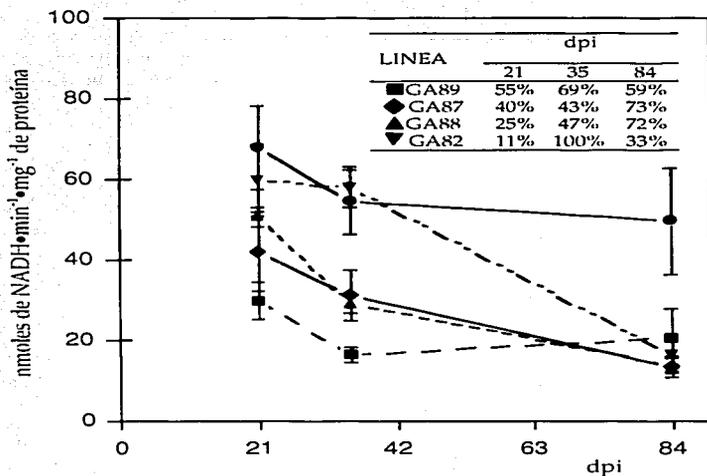
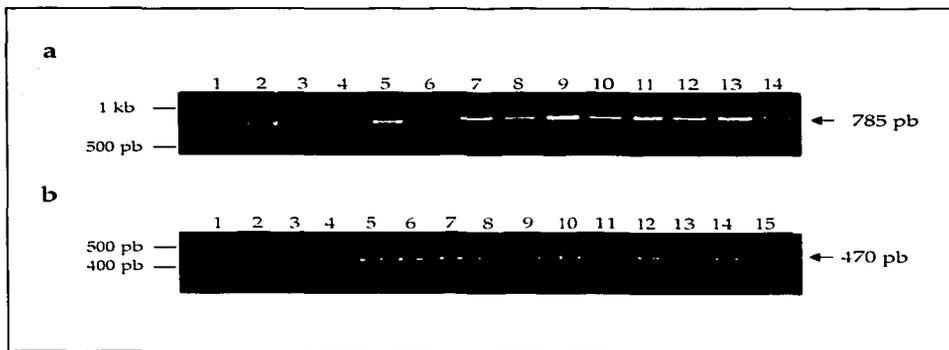


Figura 13. Cinética de la actividad de NADH-GOGAT en los nodulos de las líneas transgénicas GA de alfalfa. En el recuadro se presentan la disminución de la actividad específica de NADH-GOGAT en porcentaje para cada una de las líneas, con respecto al 100% del control ●, en cada uno de los puntos de medición.

IV.2.3. Caracterización de la progenie (T1).

Un requisito para confirmar el estado transgénico estable de las plantas o líneas T0, es que el transgen sea transferido a su descendencia (que involucre un proceso meiótico). La alfalfa es una planta de polinización cruzada, por lo tanto la obtención de semillas por autopolinización resulta difícil. A partir de la polinización forzada de flores de plantas clonadas que provenían de una misma línea, se obtuvo un número variable de semillas de las diferentes líneas GA. Estas semillas se germinaron y cuando las plantas alcanzaron una talla adecuada, se nodularon con *S. meliloti* 2011, para continuar con la caracterización molecular de la T1 (que se presenta en el artículo Córdoba et al.).

Como una prueba preliminar de la transferencia de los transgenes a la descendencia, tanto del gen marcador de selección *nptII* y de *NADH-GOGAT*, se efectuaron análisis por PCR. Se amplificaron los fragmentos de 785 pb y 470 pb que corresponden al gen *nptII* y a la fusión del promotor *Lbc₃* con el gen de *NADH-GOGAT* en sentido inverso, respectivamente (Figura 14a y b).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las líneas fueron sometidas posteriormente a un análisis del tipo Southern-blot, confirmando los resultados obtenidos por PCR. El DNA total, obtenido de la progenie, se digirió con la enzima *Hind*III y se hibridó con el fragmento interno del cDNA de la NADH-GOGAT *Hind*III de ~1.5 kb. Con excepción de una planta derivada de la línea GA87 (Figura 15, carril 4 de la GA87 T1), el resto de la T1 presentó hibridación en la banda que correspondía al transgen de NADH-GOGAT (fragmento de 1.5 kb), diferenciándose de la banda correspondiente al gen endógeno (~2.1 kb), evidenciando de esta manera la transferencia del transgene de NADH-GOGAT a la progenie y por lo tanto, el estado transgénico de la T0 (Figura 15).

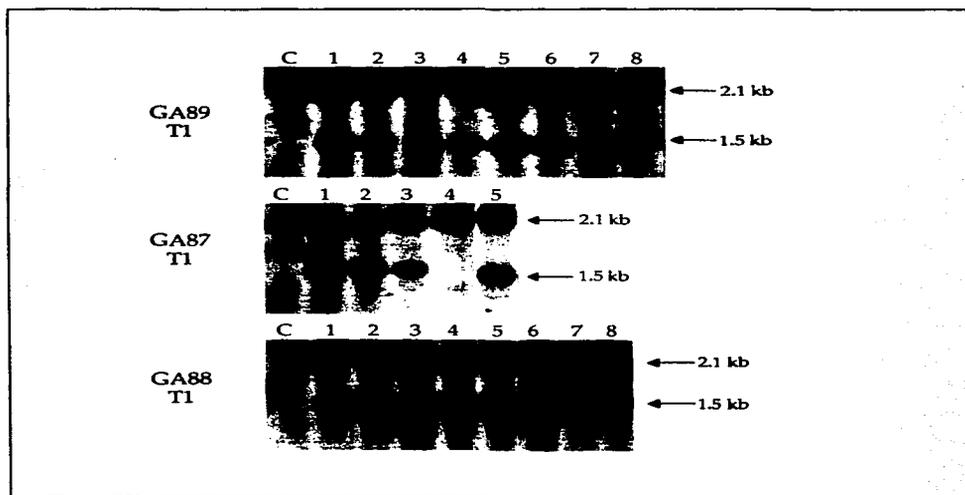


Figura 15. Análisis por Southern-blot de la progenie (T1). Hibridación con el fragmento interno *Hind*III de 1.5 kb del pG7.2, digestiones de DNA total con *Hind*III. C, línea control; 1-8 plantas T1. Los fragmento de 1.5 kb y 2.1 kb corresponden al transgen y gen endógeno de NADH-GOGAT, respectivamente.

IV.2.4. Caracterización de cuatro líneas transgénicas GA de alfalfa (T0).

IV.2.4.1. Análisis del contenido de aminoácidos por cromatografía en capa fina (TLC).

Como efecto de la inhibición de la expresión y actividad de la NADH-GOGAT y de las otras enzimas que participan en la asimilación del amonio y metabolismo del N proveniente de la simbiosis, se presentó una reducción en el contenido de asparagina (asn), principal compuesto nitrogenado que se produce en los nódulos de alfalfa, que se evidenció por medio de una cromatografía en capa fina (Figura 16). A partir de este análisis se determinó que la asn es el aminoácido más abundante en los nódulos de alfalfa y que en menor proporción, aunque de manera abundante, se encuentran el glu y la gln. Se observó una disminución en el contenido de asn en las líneas GA89 y GA87, con respecto a la línea control, de alrededor del 67% y 41%, respectivamente. Sin embargo con esta técnica no se evidenció una diferencia entre el contenido de glu y gln en las diversas líneas debido a que estos aminoácidos migraron en una sola banda (Figura 16). El análisis por HPLC evidenció una reducción significativa en el contenido de éstos y otros aminoácidos en las líneas GA89 y GA87 (ver tabla 1 en Cordoba et al.).

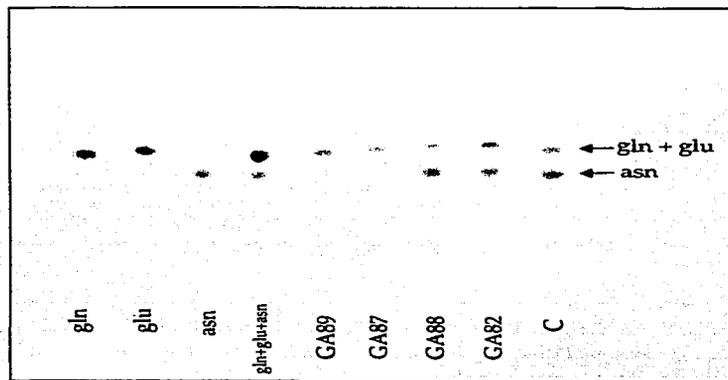


Figura 9. Cromatografía en capa fina de extractos de aminoácidos a partir de nódulos de 21 dpi de las distintas líneas GA y control (C). Los aminoácidos fueron revelados con ninhidrina. gln, glutamina; glu, glutamato; asn, asparagina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.2.4.2. Capacidad fotosintética.

La capacidad fotosintética de las líneas transgénicas fue evaluada mediante un sistema (ver "Experimental procedures" en Cordoba et al.), que permite medir la tasa fotosintética en condiciones donde las plantas son sometidas a diferentes concentraciones atmosféricas de CO_2 . A partir de estos datos se evidenció que las líneas GA89 y GA87 poseen una reducción de la fotosíntesis de alrededor del 80% y 50%, con respecto a la línea control (Figura 17)

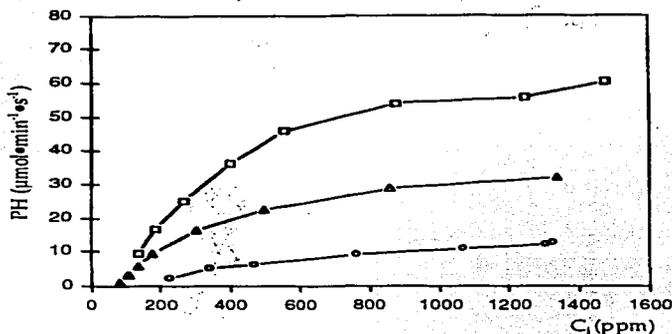


Figura 17. Capacidad fotosintética de las líneas GA89 (O), GA87 (Δ) y control (□), a los 21 dpi. C_i , concentración intracelular de CO_2 ; PH, tasa fotosintética.

IV.2.4.3. Contenido de clorofila.

Como efecto de la reducción en el contenido de compuestos nitrogenados en el nódulo, se observó un efecto clorótico en el follaje de las líneas GA89 y GA87, tal vez como consecuencia de la reducción en el aporte de N, en forma de aminoácidos hacia estos tejidos demandantes (Figura 18a).

El follaje de las plantas de las líneas GA89 y GA87, presentó una reducción del 25% y 13% en el contenido de clorofila, con respecto a la línea control, respectivamente (Figura 18b).

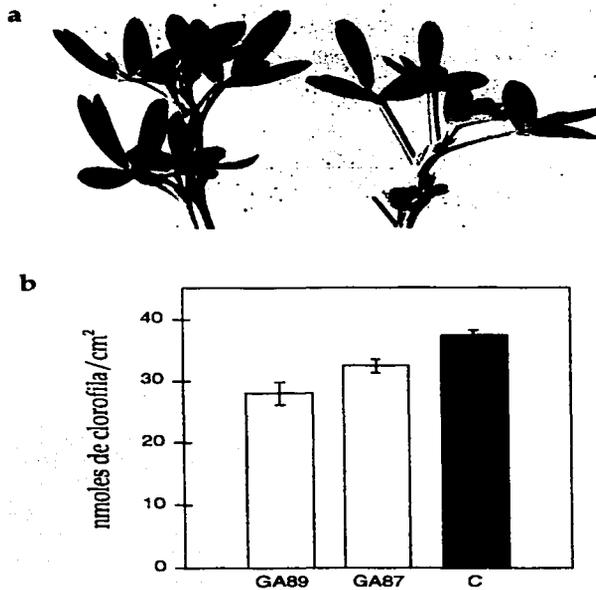


Figura 18. Contenido de clorofila en las plantas GA. a, aspecto de las hojas en la línea control (C) vs. GA89; b, contenido de clorofila en el follaje de las líneas GA89, GA87 y control (C).

IV.2.5. Nodulación de la línea GA89 vs. control.

IV.2.5.1. Patrón de distribución de los nódulos en las raíces.

Se ha documentado ampliamente el mecanismo de autorregulación que posee la planta para controlar el número de infecciones de rhizobia que se pueden establecer en las raíces de las leguminosas (van Brussel et al., 2002; Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991a y b; Takats, 1990). En esta interacción es la planta la que determina la cantidad de nódulos que se formarán en la raíz. A partir del estudio de este mecanismo se ha establecido que la formación de los primeros nódulos inhibe la nodulación y nuevas infecciones en las regiones más jóvenes de la raíz. Debido a que la línea GA89 presentó un aumento de hasta 6 veces más en el número total de nódulos, aunque de menor tamaño con respecto a las plantas control (ver Figura 6 en Cordoba et al.), se determinó el patrón de distribución de los nódulos para evidenciar alguna modificación en este mecanismo de autorregulación.

Las raíces noduladas se midieron y dividieron en tres zonas: zona I (ZI), región de unión de la raíz con el tallo hasta la porción media de la raíz; zona II (ZII), parte media de la raíz y la zona III (ZIII), región que comprende las raíces más jóvenes de la parte media hasta la punta de la raíz (Figura 19a). Los nódulos de cada una de las zonas fueron colectados, contados y pesados. El peso se consideró como una medida del tamaño y madurez del nódulo. La caracterización se efectuó a los 14 y 21 dpi.

A los 14 dpi la línea control presentó en la ZI, el 70% del número de nódulos, mientras que en la zona II se localizó el 30% restante. En la ZIII no se observó la formación de nódulos. Por lo que respecta a la línea GA89, fue en la ZII donde se estableció la mayor cantidad de nódulos, correspondiendo al 60% del número total de nódulos, en la ZI se estableció el 40% de los nódulos y de la misma manera que en la línea control, la ZIII no presentó formación de nódulos (Figura 19b).

En las plantas control de 21 dpi, se observó una distribución de los nódulos más maduros (con un peso promedio de 1.8 mg/nódulo) en la ZI, conformando cerca del 70% del total de nódulos, mientras que nódulos más jóvenes y pequeños (0.95 mg/nódulo), se distribuyeron en la ZII, que comprendieron aproximadamente 27% de los nódulos. La ZIII presentó muy pocas infecciones,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

representando menos del 5%. Los nódulos en ésta última fueron los de menor tamaño (0.55 mg), debido a que se trataban de infecciones más recientes (Figura 19c). Estas observaciones coinciden con las reportadas para diversas leguminosas, donde se establece que la región de mayor número de nódulos se presenta en las regiones cercanas a la corona (en raíces maduras) y que zonas más jóvenes de la raíz presentan escasas infecciones (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991a y b).

El patrón de distribución de los nódulos en las raíces de las plantas GA89 a los 21 dpi, mostró claras diferencias con el anterior. El 25 % del total de nódulos se concentró en la ZI, mientras que las zonas II y III presentaron porcentajes promedio de 59 % y 16 %, respectivamente. Es así como la mayor cantidad de nódulos se distribuyeron en la ZII, mientras que la ZIII presentó un claro aumento en el número de nódulos respecto a la línea control en la misma zona (Figura 19c). Los nódulos de la ZI (0.84 mg) no fueron mucho más grandes que los de la ZII (0.7 mg), mientras que los de la ZIII fueron los de menor talla (0.54 mg), tratándose éstos de recientes infecciones. El menor tamaño de los nódulos de la línea GA89 fue evidente en todas las zonas, comparándose con las zonas correspondientes de las plantas control. Debido a que en las plantas GA89 el mayor porcentaje de infecciones se presentó en la ZII y que la ZIII tiene un número considerable de nódulos, respecto a la línea control, se puede concluir que la planta GA89 presenta una alteración en el mecanismo de autorregulación en el patrón de nodulación, que da como resultado un fenotipo hipernodulante.

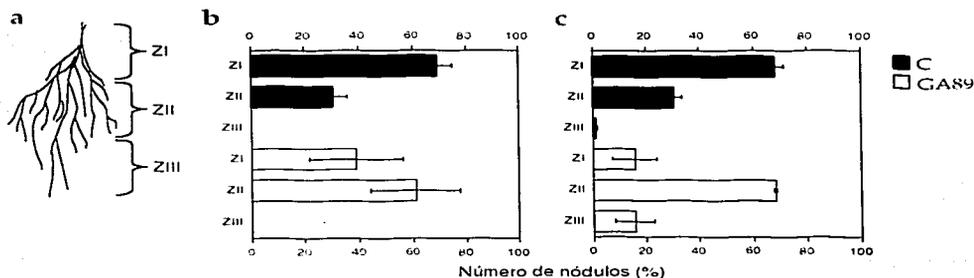


Figura 19. Distribución de los nódulos en las distintas zonas de las raíces (a), de las plantas control y GA89 de altura a los 14 (b) y 21 dpi (c).

IV.2.5.2. Resistencia a la inhibición de la nodulación por nitrato.

El efecto inhibitorio de las fuentes inorgánicas de nitrógeno sobre el establecimiento de la simbiosis se ha descrito para varias especies de leguminosas (Malik et al., 1987; Streeter, 1988). Plantas mutantes en el mecanismo de regulación en el número de nódulos, con fenotipos de hipernodulación, muestran una resistencia al efecto inhibitorio de la nodulación en presencia de fuentes de nitrógeno inorgánico (Streeter, 1988; Heidstra et al., 1997). Con la finalidad de determinar si la línea GA89 presenta un fenotipo de resistencia a la nodulación bajo condiciones de suministro de NO_3^- , plantas de esta línea se sometieron a tratamientos de riegos con diferentes concentraciones de KNO_3 . A los 21 dpi los nódulos se colectaron, contaron y pesaron.

Los riegos con 2.5 mM de KNO_3 no inhibieron el establecimiento de nódulos en las raíces de las plantas control y GA89 (Figura 13a). El efecto inhibitorio del NO_3^- se presentó en concentraciones a partir de 5.0 mM en adelante (7.5, 10 y 12.5 mM), que se evidenció con una reducción en el número total de nódulos (Figura 13a). En promedio, la línea GA89, en condiciones de ausencia de fuente nitrogenada, presentó alrededor de 211 nódulos totales/planta, mientras que la línea control sólo 66. En condiciones de suplemento de 2.5 mM de KNO_3 , el promedio de la cantidad de nódulos varió, aunque no de manera significativa, en ambas líneas. A concentraciones de 5 y 7.5 mM de KNO_3 , se observó una reducción en el número de nódulos con respecto a los tratamientos anteriores en ambas líneas. La línea GA89 presentó alrededor de un 50% (104 nódulos totales/planta) y 75% (51 nódulos totales/planta), de disminución en la cantidad de nódulos, en las concentraciones de 5 y 7.5 mM de KNO_3 , respectivamente. Mientras que en la línea control esta reducción fue del 68% a un 86% (de 21 a 9 nódulos totales/planta), en las condiciones respectivas anteriores (Figura 12a). En riegos con 10 y 12.5 mM de KNO_3 , la línea GA89 presentó formación de nódulos (en promedio 35 y 26 nódulos/planta), mientras que estas concentraciones resultaron inhibitorias para la nodulación en la línea control. La línea GA89 presentó un número mayor y peso fresco de nódulos en todos los tratamientos, sin embargo en las dos líneas se observó una reducción en el tamaño de los nódulos conforme se incrementó la concentración de KNO_3 (Figura 13b).

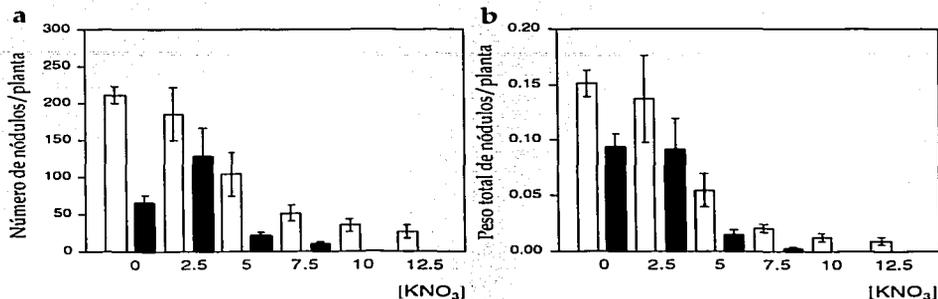


Figura 20. Efecto del NO_3^- en la nodulación en la línea GA89 y control (21 dpi). Número, (a) y peso fresco (b), de nódulos en diferentes concentraciones de KNO_3 en plantas de las líneas control ■ y GA89, □.

La distribución de los nódulos en ausencia de nitrato conservó el patrón anteriormente mencionado para las plantas controles y GA89 a los 21 dpi (Figuras 19c y 21a). En presencia de la fuente nitrogenada, tanto las plantas control como GA89, presentaron el mayor porcentaje de infecciones en la ZI, que fue disminuyendo paulatinamente en las ZII y ZIII. Los nódulos de la ZI fueron los de mayor tamaño, indicando que correspondían a infecciones más tempranas, mientras que los nódulos más pequeños se presentaron en las zonas II y III, tratándose de nódulos de reciente formación (Figuras 21a-f y 22a-f). A partir de estos datos se observa que la línea GA89 tiende a presentar un patrón de distribución parecido al de las plantas control (en ausencia de fuentes nitrogenadas inorgánicas), es decir, el mayor número de nódulos se ubica en la ZI, mientras que las zonas más jóvenes de la raíz tienden a tener menor número de nódulos, en condiciones de suplemento de nitrógeno inorgánico. Sin embargo, la inhibición de la nodulación por la presencia de N inorgánico, en la línea GA89, no se presenta en concentraciones de 10 y 12.5 mM de KNO_3 , donde la línea C presenta una total ausencia de infecciones (Figuras 20 y 21e-f).

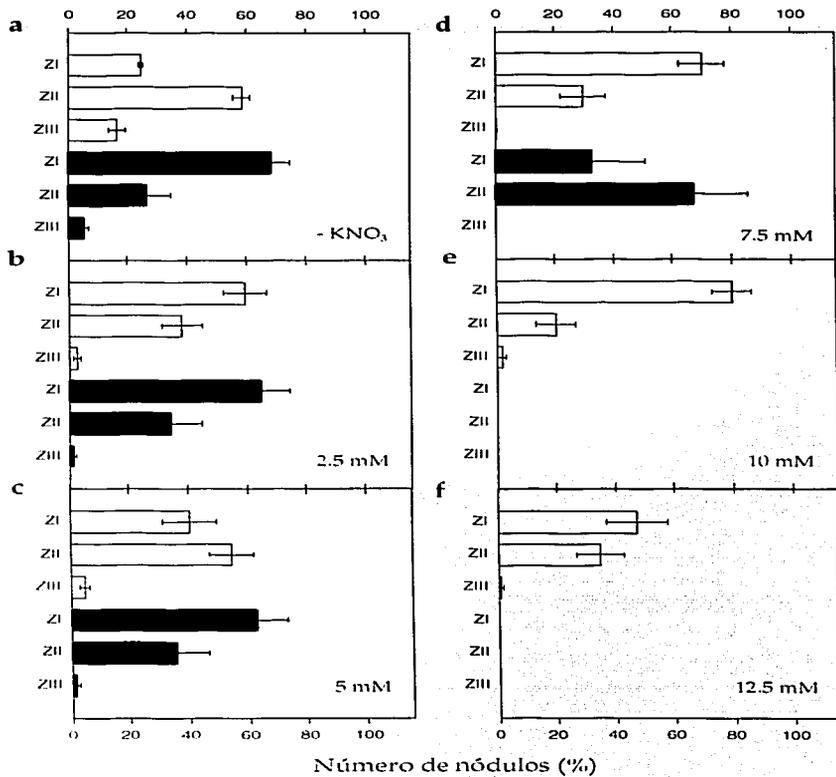


Figura 21. Distribución de los nodulos de 21 dpi en la raíz de las líneas transgénicas GA89, □ y control ■, en concentraciones crecientes de KNO₃: a, sin fuente nitrogenada; b, c, d, e y f, condiciones de riego con medio B&D (Broughton y Dilworth, 1971), suplementado con 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 mM de KNO₃, respectivamente.

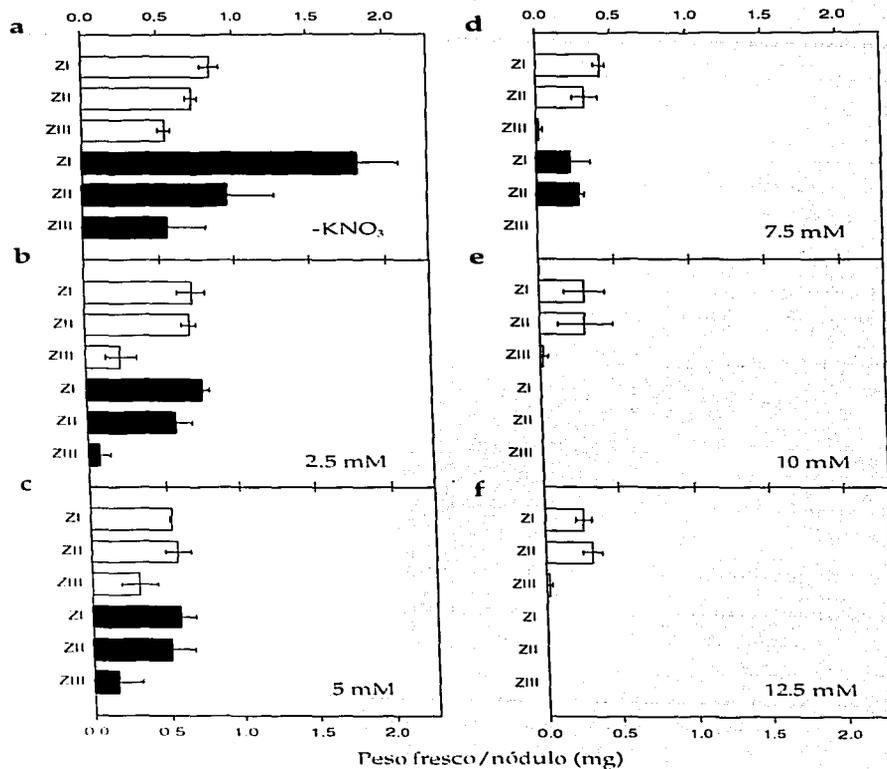


Figura 22. Tamaño de los nodulos (21 dpi), en las distintas zonas de la raíz, reportada como peso de los nodulos que se distribuyen en las tres zonas de la raíz, en concentraciones crecientes de KNO_3 . a, en ausencia de KNO_3 ; b-f, 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 mM de KNO_3 . GA89, □ y C ■.

TESIS CON
FALLA DE CONTEN

Aunque la morfología general de los nódulos formados en presencia de diferentes concentraciones de KNO_3 no se modificó, éstos presentaron algunas alteraciones. En cortes longitudinales se puede evidenciar la distribución de las distintas zonas del nódulo (según Vasse et al., 1990): la región más distal corresponde a la zona meristemática (I), seguida de la zona de infección (II) y la interzona (IZ), la zona donde se establecen los bacteroides es conocida como la de fijación de nitrógeno (III), con la característica coloración rojiza y finalmente la zona proximal, unida a la raíz, la zona de senescencia (IV) (Figura 23). En los tratamientos sin KNO_3 y 2.5 mM de KNO_3 , se distinguieron estas regiones, en los nódulos de las líneas GA89 y C, reconociendo el fenotipo de los nódulos en líneas GA89, que presentan una alteración en la zona de fijación que se evidenció con una disminución en la coloración rojiza (ver figura 6e en Cordoba et al.). A concentraciones a partir de 5 mM de KNO_3 , los nódulos presentaron una disminución en su tamaño (Figura 22c-f) y una mayor reducción en la intensidad de la coloración rojiza característica de los nódulos funcionales en la zona activa de fijación (Figuras 23 y 24).

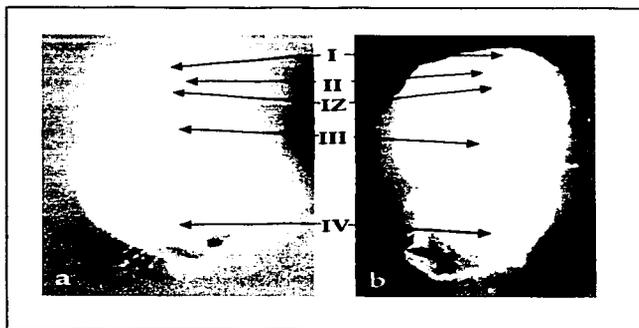


Figura 23. Nódulos formados en las raíces en condiciones de riegos con 5 mM de KNO_3 (21 dpi). Cortes longitudinales de a, nódulo de plantas GA 89; b, nódulo de la línea control. Se distinguen las diversas zonas de los nódulos: I, zona meristemática; II, zona de infección; IZ, interzona; III, zona de fijación; IV, zona de senescencia.

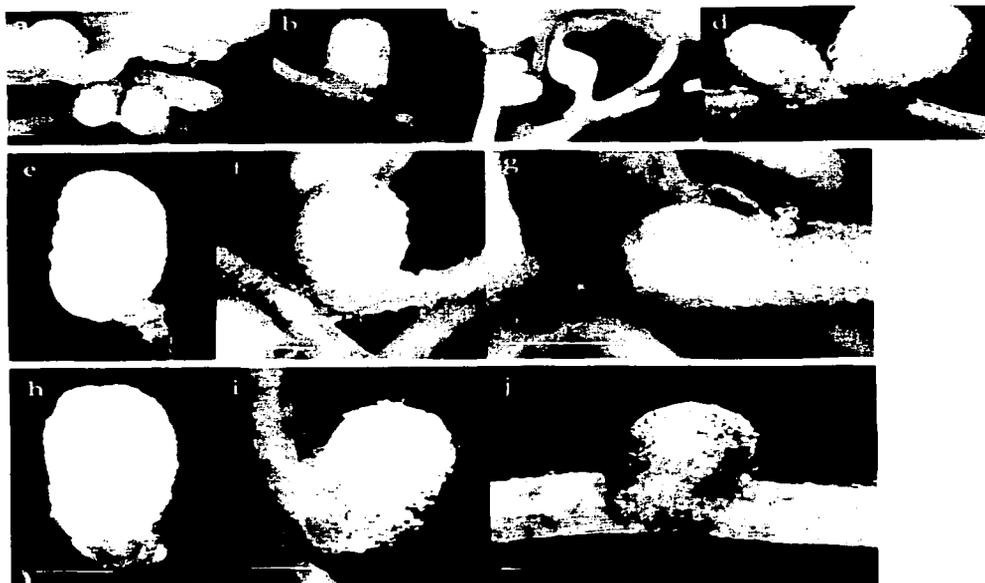


Figura 24. Aspecto de los nódulos a distintas concentraciones de KNO_3 , a-d, nódulos de plantas sometidas a riegos con medio B&D suplementado con 5 mM de KNO_3 ; e-j, nódulos desarrollados en plantas regadas con 7.5 mM de KNO_3 , a-c y e-g, nódulos de la línea GAB9; d y h-j, nódulos de la línea control. a, b, d, e, f, h e i, corresponden a nódulos desarrollados en la ZI de la raíz (nódulos maduros); c, g y j, corresponden a nódulos desarrollados en la zona II de la raíz (nódulos jóvenes). Barra en a-f, h, i= 500 μ m; en g y j= 1 mm.

Las plantas GA89 y control, sometidas a los riegos con KNO_3 , formaron pelos radiculares más largos en todas las regiones de la raíz, algunos de éstos presentaron el encurvamiento característico como respuesta ante la presencia de los factores de nodulación. De acuerdo a estas observaciones se puede decir que las respuestas iniciales de la simbiosis no se vieron inhibidas en ambas líneas, ante la presencia de N inorgánico, en este caso NO_3^- (Figura 25).

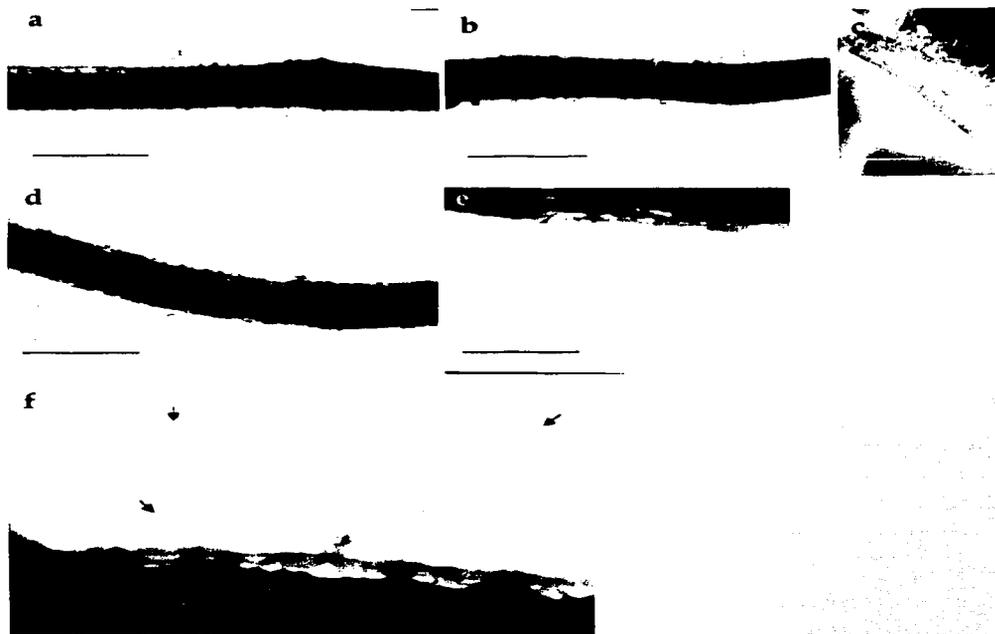


Figura 25. Respuesta de las raíces en presencia de KNO_3 , a-c, pelos radiculares en las raíces de la línea GA89 en 5 mM, (a) y 7.5 mM (b y c), de KNO_3 , d-f, pelos radiculares de la línea control en 7.5 mM de KNO_3 . Las flechas indican pelos radiculares que presentan la respuesta de encurvamiento ante la presencia de *S. meliloti*. Barra en a, b y d= 500 μm ; en c, e y f= 250 μm .

V. DISCUSIÓN

Desde que el ciclo GS - GOGAT fue reconocido como la vía por la que las plantas asimilan el amonio (Lea y Mifflin, 1974), se ha determinado por diversos estudios bioquímicos y moleculares la importancia y función de las diferentes isoformas de ambas enzimas en la asimilación del amonio derivado de distintas fuentes (Harrison et al., 2000). De la misma manera la generación de plantas mutantes y transgénicas en estas enzimas ha permitido dilucidar el papel crucial de las distintas isoformas.

En algunas plantas como la alfalfa, resulta difícil obtener mutantes (genética directa) debido, entre otras cosas, a su condición poliploide. En estos casos el enfoque de genética reversa que permite la generación de plantas transgénicas moduladas en la expresión de un gen específico, puede hacer posible determinar el papel de las enzimas de GS y GOGAT en algunas de sus isoformas, al modificar su expresión y alterar su actividad en el proceso de asimilación de amonio en diversos tejidos. Los nódulos de las leguminosas muestran ser un tejido idóneo para el estudio de la NADH-GOGAT ya que presentan niveles muy altos de expresión y actividad de esta enzima, en condiciones de simbiosis efectiva.

Este trabajo presenta la generación y caracterización de plantas transgénicas de alfalfa que muestran una reducción (en distintos niveles), en la expresión de la NADH-GOGAT en los nódulos, durante la simbiosis con la bacteria *S. meliloti*, como una contribución más para tratar de determinar el papel de la NADH-GOGAT en la asimilación de amonio durante la simbiosis. A través del estudio de estas líneas transgénicas se determinó que la reducción de la expresión de la NADH-GOGAT resulta en una alteración en el establecimiento de una simbiosis efectiva, presentando cambios en la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo de N y C en los nódulos, produciendo una reducción en el contenido de los productos de la asimilación de amonio, que son exportados hacia los tejidos fotosintéticos, demandantes de N.

Por medio de la tecnología "antisense" y la transformación genética vía *A. tumefaciens*, fue posible reducir la expresión de la NADH-GOGAT en algunas de las plantas transgénicas. Durante este proceso también regeneraron plantas en el medio selectivo, que no portaban los transgenes, sin embargo una condición más

severa de selección (100 µg de kanamicina/ml), permitió reducir la producción de estos escapes. Se obtuvieron además plantas portadoras del transgen de la NADH-GOGAT en sentido inverso, que no mostraron reducción en la expresión y actividad de la NADH-GOGAT. Debido a que en todas las líneas (con excepción de la GA35, carril 5 de la Figura 9c), se evidenció por medio de PCR (Figura 9c), que el transgen se integró en su totalidad (incluyendo las regiones regulatorias), la ausencia de inhibición de la expresión de la NADH-GOGAT en algunas de las líneas transgénicas (Figuras 10 y 12) se debe posiblemente, al efecto posicional al que están sujetas las inserciones al azar del transgen, integrándose en sitios de baja actividad transcripcional.

Las líneas seleccionadas mostraron la integración de varias copias del transgen de NADH-GOGAT, siendo dos en la línea GA89, tres en la GA82 y cuatro en las líneas GA87 y GA88 (Figura 1c en Cordoba et al.). A pesar de tener el menor número de copias la línea GA89 mostró tener la mayor reducción de la expresión de la NADH-GOGAT, mientras la línea GA82 con la menor reducción muestra tres copias; una vez más el efecto posicional debe tener un papel determinante en el nivel de expresión del "antisense" en la línea GA89, debido a su probable inserción en un sitio de transcripción altamente activo.

La cadena de RNA en sentido inverso no fue detectada en ninguna de las líneas transgénicas GA, sin embargo las plantas mostraron una reducción en los transcritos de *NADH-GOGAT*, sugiriendo que la acción del "antisense" se está ejerciendo posiblemente a nivel de degradación del mensajero del gen endógeno de la *NADH-GOGAT*, por medio del apareamiento de las cadenas complementarias de RNA y reconocimiento de este híbrido por nucleasas. La reducción en el nivel de mensajeros de la *NADH-GOGAT* en las diversas líneas estuvo acompañada de una disminución en el nivel de proteína y actividad de la enzima, indicando que la regulación de la *NADH-GOGAT* se ejerce en mayor grado a nivel transcripcional y en menor grado en otros niveles.

La inhibición de la expresión de la *NADH-GOGAT* se conservó a lo largo del desarrollo de los nódulos, presentándose tanto en estados cortos (21 dpi), así como en tardíos (84 dpi), de la simbiosis. Este promotor mostró ser un elemento regulatorio funcional en el sistema de alfalfa, además de presentar una expresión nódulo-específica, pues el efecto del transgene sólo se detectó en condiciones

simbióticas y no así cuando la fuente de N fue suministrada en forma de NO_3^- . En las raíces de las plantas transgénicas no se observaron cambios en el nivel de transcritos de NADH-GOGAT, que mostraron siempre bajos niveles en comparación con los detectados en los nódulos, correlacionando con el reducido nivel de actividad específica detectado en este tejido (Figura 12b). De esta manera se evidenció que el efecto de la inhibición se ejerce a nivel del tejido del nódulo durante la simbiosis.

La reducción de la expresión de la NADH-GOGAT dio por resultado el establecimiento de una simbiosis con serias alteraciones en la funcionalidad de los nódulos, que fue incrementándose en proporción a la inhibición de la expresión de la NADH-GOGAT en las distintas líneas analizadas. El efecto del transgen de NADH-GOGAT fue evidenciado en la progenie (T1), las plantas T1 que heredaron el transgen (confirmado por análisis por PCR y Southern-blot), mostraron la inhibición de la NADH-GOGAT a niveles en los que se detectaron en sus progenitores, que correlacionó igualmente con el establecimiento de una simbiosis inefectiva.

Se han documentado los cambios de expresión de las diversas enzimas del metabolismo de C y N del nódulo. Estudios de Egli et al. (1989) y Vance et al. (1995), demostraron que existe una reducción de la expresión y actividad de la NADH-GOGAT, GS, AAT y PEPC, en condiciones donde la planta o el simbionte bacteriano son incapaces de establecer una simbiosis efectiva (en un fenotipo de alfalfa *in15a*, o con cepas Fix⁻ de *S. meliloti*), revelando un efecto pleiotrópico y la estrecha relación que existe en la regulación de estas enzimas, aunque de manera diferencial. A través de éstos y otros estudios, se ha podido establecer que existe un factor que participa en el establecimiento de una simbiosis efectiva y que actúa como un regulador de la expresión de estas enzimas. La naturaleza de este factor se desconoce, pero debe tratarse de un producto que proviene de la fijación del N_2 en la simbiosis. A pesar de que la expresión de estas enzimas disminuyó en condiciones de simbiosis inefectiva, se evidenció que la NADH-GOGAT se encuentra regulada de una manera particular (Trepp et al., 1999a y b). En comparación al resto de las enzimas, los niveles de transcritos así como de proteína y actividad de la NADH-GOGAT, presentaron una mayor reducción bajo estas condiciones, limitando su alta expresión únicamente en simbiosis efectivas. Estos

estudios remarcan la importancia de la NADH-GOGAT en la asimilación de amonio en la simbiosis y su posible papel como el paso limitante en el ciclo GS-GOGAT (Egli et al., 1989; Vance et al., 1995; Trepp et al., 1999a, b; Temple et al., 1998b).

En las líneas GA se observó la alteración en la expresión de los genes de GS, AAT, NADH-GDH, SS, PEPC y Lb, como resultado de la disminución de la expresión de la NADH-GOGAT y a la interconexión que existe entre la regulación de la expresión de estas enzimas, respondiendo seguramente, a los cambios en los niveles de C/N disponibles en el nódulo y en el resto de la planta. Esta alteración se observó claramente en las líneas GA89 y GA87, que mostraron la mayor reducción de expresión de la NADH-GOGAT. La línea GA89 presentó la mayor reducción en los transcritos de las enzimas GS, AAT, PEPC, SS y de la proteína Lb, así como un aumento en el nivel de mensajeros de la NADH-GDH. Sin embargo la reducción en el nivel de mensajeros, en algunos casos, no estuvo acompañada de una reducción en la actividad enzimática, lo que está de acuerdo a la regulación postranscripcional, traduccional y/o post-traduccional, a la cual están sujetas algunas de estas enzimas.

En el caso de la GS, a través del uso de plantas transgénicas con reducción en el nivel de transcritos de la GS por medio de antisense, se ha documentado la regulación post-transcripcional a la que se encuentra sujeta, principalmente a nivel de ensamblaje de la holoenzima, donde la cantidad de transcritos no fue una limitante para obtener los mismos niveles de proteína y actividad de GS (Temple et al., 1998a; Ortega et al., 1999). Los estudios en plantas de soya han demostrado que en condiciones simbióticas, la actividad de GS se encuentra regulada a nivel de estabilidad de la holoproteína (Temple et al., 1996). En las líneas GA se detectó una disminución en los transcritos de la GS, sin embargo no se observó una alteración en el nivel de la proteína y actividad de la GS, atendiendo a algún tipo de regulación post-transcripcional. Se observó una reducción a nivel de mensajeros, proteína y actividad de la AAT en la línea GA89, mientras el resto de las líneas mostró sólo una reducción en la actividad que no fue significativa con respecto al control. Se ha establecido que en simbiosis inefectivas existe una reducción en la cantidad de transcritos y actividad de AAT (Egli et al., 1989; Gantt et al., 1992); su máxima expresión requiere de una señal asociada con la efectividad de los

nódulos, involucrando además una regulación post-traducciona (Gantt et al., 1992).

La PEPC también presentó una reducción en su expresión, la cantidad de transcritos disminuyó, acompañada de una reducción en el contenido de proteína PEPC. Sin embargo, los niveles de actividad de PEPC, detectados en la línea GA89, no mostraron niveles tan bajos en proporción a la cantidad de la proteína. Se ha estudiado ampliamente el mecanismo de regulación post-traducciona por activación a través de la fosforilación de la PEPC y desactivación por desfosforilación, mostrando además una fuerte correlación en su actividad máxima con el suministro de productos carbonados de la fotosíntesis, por la parte aérea, principalmente de las hojas (Zhang y Chollet, 1997a, b). La línea GA89 muestra síntomas de clorosis y una reducción en su capacidad fotosintética, seguramente esto limita el aporte de carbono hacia el nódulo y una posible desactivación de la PEPC. Adicionalmente se ha evidenciado que en condiciones de simbiosis no efectivas (como en los nódulos de la línea GA 89), esta enzima es degradada (Pladys y Vance, 1993), este mecanismo puede estar actuando y relacionarse con la baja cantidad de proteína detectada en la línea GA89. En los ensayos por western-blot se detectó junto con la banda principal de la PEPC, bandas adicionales de menor peso molecular, que se incrementaron en concentración conforme disminuyó la cantidad de PEPC y la actividad de NADH-GOGAT, éstas podrían corresponder a productos de degradación de la PEPC (Pladys y Vance, 1993).

En algunas de las líneas GA, se observó una reducción en los niveles de mensajeros de la SS, que fue mayor en la línea GA89, mostrando también una disminución a nivel de actividad. Los cambios detectados en la expresión y actividad de la SS podrían atender a la estrecha relación entre la asimilación de amonio en la simbiosis y el aporte de carbono, a través de esta enzima (Gordon et al., 1997). La disminución de la fijación y asimilación de N, como consecuencia de la reducción de la actividad de NADH-GOGAT, está limitando la entrada de amonio provocando una acumulación de productos carbonados en forma de hexosas, debido a que éstos no están siendo requeridos, pues la asimilación del N en cuerpos carbonados se encuentra reducida. El cambio de la relación C/N podría estar regulando la actividad de la SS, posiblemente a un nivel post-traducciona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

debido a que los niveles de actividad son menores en comparación al de transcritos.

Por el contrario al resto de las enzimas, se detectó un incremento en el nivel de los transcritos de la NADH-GDH en todas las líneas GA, que tuvo un comportamiento directo a la reducción de la expresión de la NADH-GOGAT. La expresión y actividad de la GDH en los nódulos no se le ha relacionado con la asimilación del amonio derivado de la simbiosis, puesto que su expresión se ha detectado en muy bajos niveles (Trepp et al., 1999c), observándose un aumento de transcritos y actividad únicamente en condiciones de simbiosis inefectivas (Egli et al., 1989). Debido a lo anterior, más que interpretarse como un intento por compensar el efecto de la falta de actividad de la GOGAT (para asimilar el amonio producido en la simbiosis), la elevación de mensajeros de NADH-GDH puede atender a un reciclamiento del amonio, proveniente del proceso de senescencia temprana que presentan los nódulos de estas líneas.

Aunque este trabajo se restringió únicamente al estudio de la expresión de algunas de las enzimas que participan en el metabolismo de C y N en el nódulo, el efecto de la disminución de la NADH-GOGAT puede afectar la expresión de otros genes que codifican para proteínas con funciones metabólicas o regulatorias (Wang et al., 2001; Wang et al., 2000). Debido a que existe una estrecha interacción entre las respuestas a las señales derivadas del metabolismo del C y N (Coruzzi y Zhou, 2001; Stitt, 1999), los cambios observados en los niveles de los diversos metabolitos en las plantas GA, sugieren que las plantas deben estar percibiendo estos cambios y responder a su vez, con cambios en la expresión génica. A través del uso de la tecnología de los microarreglos, se ha evidenciado una variedad de genes que responden a la presencia de nitrato (Wang et al., 2001; Wang et al., 2000), que muestran un panorama general de la intrincada relación que existe entre los circuitos regulatorios del metabolismo de C y N. Un estudio más amplio, utilizando la herramienta del transcriptoma aunado a un estudio de proteoma, a través de los cuales se revela el patrón de expresión de transcritos y de proteínas en distintas condiciones, permitiría detectar los cambios de expresión de diversas proteínas y determinar el efecto general de la reducción de la expresión de la NADH-GOGAT en la simbiosis en las líneas GA.

La alteración de la expresión de las enzimas que participan en el proceso de asimilación y metabolismo del N resulta en un efecto pleiotrópico debido a la reducción en la expresión de la NADH-GOGAT. Una de las consecuencias de esta disminución fue la reducción del contenido de glutamato, glutamina y asparagina, los cuales tienen la función, entre otras, de distribuir el N asimilado al resto de la planta, participando como donadores de N en diversos procesos metabólicos esenciales en la planta.

El nódulo se reconoce como un órgano productor de N y demandador de C, mientras que la parte aérea de la planta se comporta en condiciones de simbiosis, como un órgano demandador de N y fuente de C. Al disminuir la actividad de NADH-GOGAT se observó una reducción en el contenido de los aminoácidos más abundantes, productos de la asimilación del amonio en el nódulo, que tratándose de la fuente principal de N en la simbiosis, resultó en una disminución de N en el follaje, evidenciada como clorosis, síntoma que indica deficiencia de N. El tejido fotosintético por lo tanto, dejó de recibir el N necesario para la biosíntesis de diversos compuestos como la clorofila, observándose una reducción en el contenido de este pigmento y en la capacidad fotosintética de las plantas. Siendo el glutamato el donador del N para la producción de aspartato y éste a su vez sustrato para la formación de asparagina en el nódulo, la cantidad de estos últimos disminuyeron como consecuencia del bloqueo en la producción de aquel compuesto. De esta manera se evidenció que la actividad de la NADH-GOGAT está limitando la entrada de amonio y la asimilación de éste en aminoácidos.

Las plantas que presentaron una disminución en la actividad de NADH-GOGAT mostraron una reducción en la actividad de la nitrógenasa, indicando que una reducción de la asimilación de amonio causa un bloqueo en la entrada de N. Se sabe que una disminución en la actividad de la nitrógenasa tiene un efecto sobre el flujo de los compuestos carbonados en el nódulo, se acumulan ciertos sustratos que indican la inhibición del flujo en pasos específicos de la vía de la glucólisis y en la actividad de PEPC (Curioni et al., 1999). Las pozas de hexosas mostraron una alteración, el contenido de glucosa y fructosa se incrementó en los nódulos de las líneas con mayor disminución de NADH-GOGAT. Las plantas de las líneas GA89 y GA87 presentaron una acumulación mayor de glucosa y fructosa, como resultado posiblemente, de la disminución en el flujo de C para la asimilación de

amiento y reducción en la actividad de PEPC, sin embargo no se detectaron incrementos significativos en las pozas de ácidos orgánicos.

Una de las respuestas de las plantas GA ante el reducido aporte de N a través de las infecciones establecidas, fue inducir la formación de nuevos nódulos, que como los primeros, no resultaron eficientes en la producción de N orgánico. De esta manera las plantas GA mostraron un fenotipo hipernodulante, que se acentuó en la línea con la mayor disminución en la actividad de la NADH-GOGAT (línea GA89).

Se ha evidenciado que las plantas leguminosas poseen un mecanismo, denominado autorregulación (de la nodulación), por el que controlan el número de infecciones de rizobia y de nódulos a lo largo de las raíces. Aunque se desconocen los factores que participan en este mecanismo, que disparan las señales que regulan el número de nódulos, se ha observado que el establecimiento de los primeros nódulos induce la inhibición de la formación de nuevos nódulos en las regiones más jóvenes de la raíz (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991b). A partir del estudio de leguminosas mutantes en el sistema de autorregulación de chícharo (Duc y Messenger, 1989; Sagan y Duc, 1996), soya (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991a), y *L. japonicus* (Wopereis et al., 2000; Nishimura et al., 2002a), se ha postulado que la planta produce señales que regulan y determinan el número de infecciones en las raíces. Experimentos basados en injertos entre plantas mutantes hipernodulantes y silvestres, han evidenciado que existen señales producidas tempranamente en los nódulos y/o raíces que son transferidas hacia el tallo, donde inducen la producción de cierto(s) compuesto(s) que actúa(n) como señal (la señal de autorregulación), que inhibe a las nodulaciones posteriores (Sheng y Harper, 1997). La caracterización de mutantes de *L. japonicus* que muestran un fenotipo hipernodulante permitió el aislamiento del gen *HART* que codifica para un receptor tipo cinasa de serina/treonina (Krusell et al., 2002; Nishimura et al., 2002b), identificándose los genes ortólogos en chícharo, *SYM29* (Krusell et al., 2002) y en soya, *GmNARK* (Searle et al., 2003). Estos genes codifican para una proteína que presenta similitud en la secuencia de aminoácidos de alrededor del 50% en el extremo amino terminal (que comprende un dominio extracelular rico en leucinas) y de 80% en el extremo carboxilo terminal (dominio de cinasa), con la proteína CLAVATA1 (CLV1) de *Arabidopsis*. CLV1 es un receptor que participa en

el control de la proliferación celular en los meristemos. Se postula que en las leguminosas, este receptor participa en la percepción y transducción de la señal de la autorregulación de la nodulación (Krusell et al., 2002).

En la línea GA89 se evidenció una formación considerable de nódulos en las zonas jóvenes de la raíz, donde las plantas control no muestran más que un número muy reducido (por respuesta a la inhibición por las infecciones más tempranas en las zonas maduras de la raíz). Esta respuesta hipernodulante de la línea GA89, parece ser el resultado de diversos intentos de la planta por obtener el N necesario para su metabolismo, ya que en ausencia de fuentes inorgánicas de N, la simbiosis es el único mecanismo por el cual puede obtener este nutrimento. Es evidente que las plantas control y GA89 forman el mismo número de nódulos en la zona donde se establecen las primeras infecciones (ZI), sin embargo en etapas posteriores, las plantas de la línea GA89 continúan estableciendo nuevas infecciones y nódulos en las zonas más jóvenes (ZII y ZIII), de la raíz (Figura 20a, en ausencia de KNO_3 y Figura 21a).

Algunas de las leguminosas hipernodulantes que se han caracterizado presentaron resistencia a la inhibición de la nodulación por fuentes inorgánicas de N como nitrato y/o amonio (Streeter, 1988; Heidstra et al., 1997). Las plantas de la línea GA89 mostraron este fenotipo en presencia de concentraciones de 10 y 12.5 mM de KNO_3 que resultaron inhibitorias para la nodulación de la planta control.

Por las observaciones anteriores, parece que esta línea posee una alteración en el sistema de autorregulación de la nodulación debido posiblemente, a la falta de la producción de compuestos nitrogenados (aminoácidos) y/o a la ausencia de una molécula "señalizadora", que podría tratarse de un compuesto derivado de la asimilación de amonio y/o metabolismo del N, proveniente de la simbiosis. Esta respuesta hipernodulante atiende a un cambio metabólico por deficiencia de N, siendo hasta ahora la única línea transgénica de leguminosa con inhibición en un gen metabólico, que presenta un fenotipo hipernodulante.

La disminución en la expresión de la NADH-GOGAT tuvo un efecto pleiotrópico que dio por resultado el establecimiento de una simbiosis inefectiva y un fenotipo hipernodulante en las plantas con la mayor reducción de NADH-GOGAT, causando una deficiencia de N en la parte aérea de las plantas, indicando

que la NADH-GOGAT podría ser el paso limitante de la asimilación de amonio durante la simbiosis.

Para tratar de establecer la contribución de una enzima específica como el posible paso limitante en determinada vía metabólica, se debe atender al efecto de la reducción y aumento gradual de dicha enzima y cuantificar el impacto de esta reducción en los productos finales de la vía (Furbank y Taylor, 1995), como se ilustra en la Figura 26.

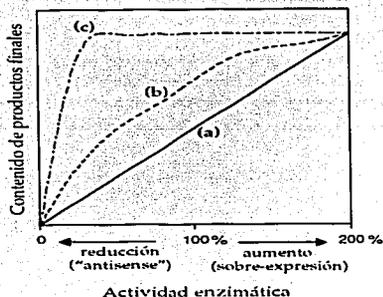


Figura 26. Representación gráfica de los cambios en el flujo metabólico (contenido de productos finales), como respuesta a la alteración de los niveles de una enzima. Se grafica el comportamiento de una enzima limitante (a), co-limitante (b) y no limitante (c), en una vía metabólica, considerando al 100% como los niveles endógenos normales de una enzima.

Una enzima se reconoce como limitante cuando ante una pequeña reducción en los niveles de dicha enzima se produce una reducción proporcional en el flujo de la vía. Cuando estos cambios en el flujo no son proporcionales a la reducción de la enzima (pero si son significativos), se le atribuye un papel co-limitante a la enzima, es decir, se trata de una enzima que contribuye al control pero no es el único punto de regulación de la vía. Cuando no se observa ningún cambio en los productos finales aun ante grandes decrementos de la enzima, ésta no ejerce control sobre la vía, tratándose de una enzima no limitante (Stitt y Sonnewald, 1995).

Este estudio ha permitido identificar la importancia de la NADH-GOGAT como una enzima crucial en el control del flujo metabólico entre el tejido del nódulo y el fotosintético. La disminución progresiva de la NADH-GOGAT tuvo un impacto en la vía de asimilación de amonio, que se acentuó en la línea con mayor reducción de la NADH-GOGAT.

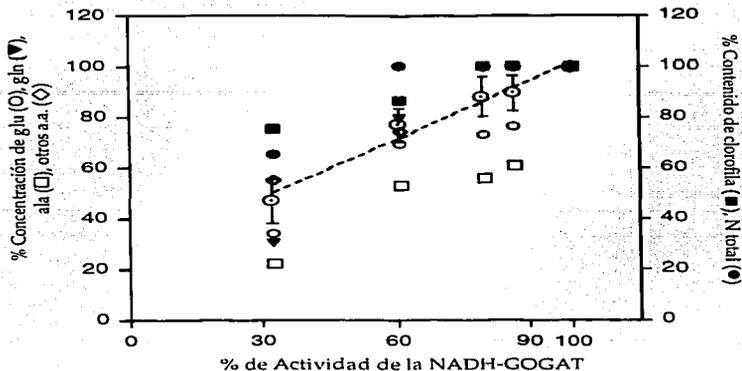


Figura 27. La disminución de la actividad de la NADH-GOGAT en simbiosis versus parámetros que indican el flujo metabólico. Se grafican porcentajes del contenido de aminoácidos, actividad de nitrogenasa, contenido de clorofila y N total de las distintas líneas GA, con respecto al porcentaje de actividad remanente de la NADH-GOGAT, 33% (GA89); 61% (GA87); 80% (GA82); 87% (GA88) y 100% (control). Otros aminoácidos indica la suma de la concentración de arg, asp, gly, ile, iso, lys, met, phe, ser, thr y val. ⊙ y la línea punteada representan la curva que se ajusta a los puntos.

Atendiendo a algunos parámetros como el contenido de aminoácidos, N total y clorofila, que reflejan la adquisición y asimilación de N, se observa que ante la reducción en la actividad de la NADH-GOGAT se presenta una disminución en algunos de estos parámetros (Figura 27). La recta que se ajusta a estos datos indica un comportamiento lineal de estos parámetros respecto a la actividad de NADH-GOGAT en el nódulo. Por estas observaciones la NADH-GOGAT, se puede considerar como el paso limitante de la vía de asimilación de amonio en los nódulos. Estos resultados apoyan el papel limitante de la NADH-GOGAT, propuesto por Trepp et al. (1999a, b).

Sin embargo, por su estrecha relación con el metabolismo de C, entre estas vías metabólicas, pueden existir otros sitios de control. Por otra parte, la generación de plantas que posean una expresión elevada de la NADH-GOGAT respecto a la de plantas silvestres, podrían reforzar los resultados obtenidos en este trabajo, logrando posiblemente, obtener cambios favorables en el flujo hacia una mayor adquisición de N.

VI. CONCLUSIONES

- Utilizando la transformación genética de plantas de alfalfa y la metodología genética reversa a través de la tecnología del RNA en "antisense", fue posible disminuir la expresión de la NADH-GOGAT en el sistema homólogo de alfalfa (*M. sativa* L. var. REGENSY27x).
- La expresión de la NADH-GOGAT presentó una reducción nódulo-específica en diferentes porcentajes (de 13% a 67%), con respecto a la planta control, en las distintas líneas analizadas.
- Una reducción de la actividad de la NADH-GOGAT resultó en el establecimiento de una simbiosis inefectiva que se acentuó en la línea GA89, con la mayor inhibición.
- La expresión de los genes y actividad de diversas enzimas involucradas en la asimilación y metabolismo del N y C en el nódulo, mostraron cambios como respuesta a la inhibición de la expresión de la NADH-GOGAT, resultando además en un cambio en el contenido de los productos de estas enzimas (aminoácidos y azúcares).
- En general, el flujo metabólico entre los tejidos del nódulo y fotosintéticos fue alterado en las líneas GA.
- La línea GA89 mostró un fenotipo hipernodulante y resistencia a la inhibición por fuentes nitrogenadas inorgánicas, como resultado de la alteración metabólica de la disminución en la asimilación de amonio.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la NADH-GOGAT puede considerarse como el paso limitante en la asimilación de amonio.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Allaway, D., Lodwig, E.N., Crompton, L.A., Wood, M., Parsons, R., Wheeler, T.R., Poole, P.S. (2000). Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* 36: 508-515.
- Amarasinghe, B.H., de Bruxelles, G.L., Braddon, M., Onyeocha, I., Forde, B.G., Udvardi, M.K. (1998). Regulation of GmNRT2 expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta.* 206: 44-52.
- Anderson, M.P., Heichel, G.H., Vance, C.P. (1987). Nonphotosynthetic CO₂ fixation by alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots and nodules. *Plant Physiol.* 85: 283-289.
- Anderson, M.P., Vance, C.P., Heichel, G.H., Miller, S.S. (1989). Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90: 351-358.
- Anthon, G.E., Emerich, D.W. (1990). Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. *Plant Physiol.* 92: 346-351.
- Appleby, C.A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 443-478.
- Arntzen, C.J. (1997). High-tech herbal medicine: plant-based vaccines. *Nat. Biotechnol.* 15: 221-222.
- Austin, S., Bingham, E.T., Matthews, D.E., Shahan, M.N., Will, J., Burgess, R.R. (1995). Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica.* 85: 381-393.
- Avila, C., Botella, J. R., Cánovas, F. M., Núñez de Castro I., Valpuesta, V. (1987). Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 85: 1036-1039.
- Avila, C., Márquez, A. J., Pajuelo, P., Cannelli, M. E., Wallsgrave, R. M., Forde, B.G. (1993). Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. *Planta.* 189: 475-483.
- Bennett, M.J., Cullimore, J.V. (1989). Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. *Plant. Mol. Biol.* 179: 433-440.
- Bladergroen, M.R., Spaink, H.P. (1998). Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 353-359.

- Botella, J. R., Verbelen, J. P., Valpuesta, V. (1988). Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 87: 255-257.
- Bourque, J.E. (1995). Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci.* 105: 125-149.
- Broughton, W.J., Dilworth, M. (1971). Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 125: 1075-1080.
- Buchner, P., Poret, M., Rochat, C. (1998). Cloning and characterization of a cDNA (Accession No. AJ001071) encoding a second sucrose synthase gene in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 117: 719.
- Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D.R., Bauer, W.D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170: 3164-3169.
- Caetano-Anollés G., Gresshoff, P. M. (1991a). Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 345-382.
- Caetano-Anollés G., Gresshoff, P.M. (1991b). Alfalfa controls nodulation during the onset of *Rhizobium*-induced cortical cell division. *Plant. Physiol.* 95: 366-373.
- Cardenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P. (1998). Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. *J. Exp. Bot.* 49: 721-730.
- Coruzzi, G.M., Zhou, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 247-253.
- Coschigano, K. T., Melo-Oliveira, R., Lim J., Coruzzi, G. M. (1998). Arabidopsis *gls* mutants and distinct Fd-GOGAT genes: implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell.* 10: 741-752.
- Craig, J., Barratt, P., Tatge, H., Déjardin, A., Handley, L., Gardner, C.D., Barber, L., Wang, T., Hedley, C., Martin, C., Smith, A.M. (1999). Mutations at the *rig4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* 17: 353-362.
- Crawford, N.M., Glass, A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 389-395.
- Crespi, M., Gálvez, S. (2000). Molecular mechanism in root nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 19: 155-166.
- Cullimore, J.V., Gebhardt, C., Saarelainen, R., Miflin, B.J., Idler, K.B., Barker, R.F. (1984). Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 589-99.

- Cullimore, J.V., Ranjeva, R., Bono, J.J. (2001). Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6: 24-30.
- Curioni, P.M.G., Hartwig, U. A., Nösberger, J., Schuller, K.A. (1999). Glycolytic flux is adjusted to nitrogenase activity in nodules of detopped and argon-treated alfalfa plants. *Plant Physiol.* 119: 445-453.
- Chen, F.L., Cullimore, J.V. (1988). Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Purification, properties and activity changes during nodule development. *Plant Physiol.* 88: 1411-1417.
- Chichkova, S., Arellano, J., Vance, C.P., Hernández, G. (2001). Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. *J. Exp. Bot.* 364: 2079-2087.
- Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H. (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 273-298.
- Davies, K.M., King, G.A. (1993). Isolation and characterization of a cDNA clone for a harvest-induced asparagine synthetase from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol.* 102: 1337-1340.
- Day, D.A., Poole, P.S., Tyerman, S.D., Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 61-71.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J.H., Paive, N.L. (1996). Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of polypropanoid biosynthesis and defense responses. *Gene.* 179: 61-71.
- Duc, G., Messenger, A. (1989). Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Sci.* 60: 207-213.
- Egli, M.A., Griffith, S.M., Miller, S.S., Anderson, M.P., Vance, C.P. (1989). Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 91: 898-904.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Science.* 417: 962-966.
- Farnham, M.W., Miller, S.S., Griffith, S.M., Vance, C.P. (1990). Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. II. Immunological distinction between two forms of the enzyme. *Plant Physiol.* 93: 603-610.

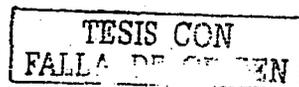
- Fedorova, M., Tikhonovich, I.A., Vance, C.P. (1999). Expression of C-assimilating enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) root nodules. *In situ* localization in effective nodules. *Plant Cell Environ.* 22: 1249-1262.
- Ferrario-Mery, S., Hodges, M., Hirel, B., Foyer, C.H. (2002). Photorespiration-dependent increases in phosphoenolpyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Planta*. 214: 877-886.
- Filleur, S., Daniel-Vedele, F. (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*. 207: 461-469.
- Fisher, R.F., Long, S.R. (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. 357: 655-660.
- Frink, C.R., Waggoner, P.E., Ausubel, J.H. (1999). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 1175-80.
- Fuentes, S.I., Allen, D.J., Ortiz-Lopez, A., Hernández, G. (2001). Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J. Exp. Bot.* 52: 1071-1081.
- Furbank, T.R., Taylor, W.C. (1995). Regulation of photosynthesis in C₃ and C₄ plants: a molecular approach. *Plant Cell*. 7: 797-807.
- Gantt, J.S., Larson, R.J., Farnham, M.W., Pathirana, S.M., Miller, S.S. (1992). Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 98: 868-878.
- García-Gutiérrez, A., Cantón, F. R., Gallardo F., Sánchez-Jiménez, F., Caenovas, F.M. (1995). Expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase in darkgrown pine seedlings. *Plant. Mol. Biol.* 27: 115-128.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., von Wirén, N. (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*. 11: 937-947.
- Gebhardt, J.S., Wadsworth, G.J., Matthews, B.F. (1998). Characterization of a single soybean cDNA encoding cytosolic and glyoxysomal isoenzymes of aspartate aminotransferase. *Plant Mol. Biol.* 37: 99-108.
- Gehrig, H.H., Heute, V., Kluge, M. (1998). Toward a better knowledge of the molecular evolution of Phosphoenolpyruvate carboxylase by comparison of partial cDNA sequences. *J. Mol. Evol.* 46: 107-114.
- Geurts, R., Heidstra, R., Hadzi, A.E., Downie, J.A., Franssen, H., van Kammen, A., Bisseling, T. (1997). Sym2 of pea is involved in a nodulation factor-perception

- mechanism that controls the infection process in the epidermis. *Plant Physiol.* 115: 351-359.
- Gordon, A.J., James, C.L. (1997). Enzymes of carbohydrate and amino acid metabolism in developing and mature nodules of white clover. *J. Exp. Bot.* 48: 895-903.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., Skot, L., James, C.L. (1997). Stress-induced declines in soybean N_2 fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* 114: 937-946.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L., Komina, O. (1999). Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 120: 867-877.
- Gordon, A.J., Skot, L., James, C.L., Minchin, F.R. (2002). Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *J. Exp. Bot.* 53: 423-428.
- Goto, S., Akagawa, T., Kojima, S., Hayakawa T., Yamaya, T. (1998). Organization and structure of NADH-dependent glutamate synthase gene from rice plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1387: 298-308.
- Gregerson, R.G., Miller S. S., Twary, S. N., Gantt, J. S., Vance, C. P. (1993). Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodule. *Plant Cell.* 5: 215-226.
- Gregerson, R.G., Miller, S.S., Petrowski, M., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1994). Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotransferase genes. *Plant Mol. Biol.* 25: 387-399.
- Griffith, S.M., Vance, C.P. (1989). Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. I. Purification and partial characterization. *Plant Physiol.* 90: 1622-1629.
- Groat, R.G., Vance, C.P. (1981). Root nodule enzymes for ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 67: 1198-1203.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2: 110-118.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature.* 418: 244-251.
- Harrison, J., Brugière, N., Phillipson, B., Ferrario-Mery, S., Becker, T., Limani, A, 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., Kamachi K., Ojima, K. (1992). Purification, characterization, and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. *Plant Physiol.* 98: 1317-1322.

- Hayakawa, T., L. Hopkins, L.J. Peat, T. Yamaya y A. K. Tobin. (1999). Quantitative intercellular localization of NADH-dependent glutamate synthase protein in different types of root cells in rice plants. *Plant Physiol.* 119: 409-416.
- Heidstra, R., Nilsen, G., Martínez-Abarca, F., van Kammen, Ab., Bisseling, T. (1997). Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. *Mol. Plant Microbe Interac.* 10: 215-220.
- Hirasawa, M., Knaff, D. B. (1991). Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1056: 93-125.
- Hirel, B., Phillipson, B., Murchie, E., Suzuki, A., Kunz, C., Ferrario, S., Limami, A., Chaillou, S., Deleens, E., Brugière, N., Chaumont-Bonnet, M., Foyer, C., Morot-Gaudry, J.F. (1997). Manipulating the pathway of ammonia assimilation in transgenic non-legumes and legumes. *Z. Pflanzenernähr. Bondek.* 160: 283-290.
- Hohnjec, N., Becker, J.D., Pühler, A., Perlick, A.M., Küster, H. (1999). Genomic organization and expression properties of the *MtSuc1* gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 514-552.
- Hooykaas, P.J., Schilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 15: 15-38.
- Huang, N.C., Chiang, C.S., Crawford, N.M., Tsay, Y.F. (1996). CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell.* 8: 2183-2191.
- Inokuchi, R., Kuma, K., Miyata, T., Okada, M. (2002). Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenetic and physiological perspectives. *Physiol. Plant.* 116: 1-11.
- Ishiyama, K., Hayakawa T., Yamaya, T. (1998). Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions. *Planta.* 204: 288-294.
- Ismande, J., Berkemeyer, M., Scheibe, R., Schuman, U., Gietl, C., Palmer, R.G. (2001) A soybean plastid-targeted NADH-malate dehydrogenase cloning and expression analyses. *Am. J. Bot.* 88: 2136-2142.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F. (1998). Arabidopsis *CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science.* 280: 104-106.
- John, M.E., Keller, G. (1996). Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1268-1277.

- Kendall, A.C., Wallsgrove, R.M., Hall, N.P., Turner, J.C., Lea, P.J. (1986). Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta*. 168: 316-323.
- Kota, M.; Daniell, H.; Varma, S; Garczynski, S.F; Gould, F; Moar, W.J. (1999). Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 1840-1845.
- Kozaki, A., Takeba, G. (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature*. 384: 554-560.
- Krapp, A., Fraiser, V., Scheible, W.R., Quesada, A., Gojon, A., Stitt, M., Caboche, M., Daniel-Vedele, F. (1998). Expression studies of *Nrt2:1Np*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *Plant J*. 14: 723-731.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kirk, G.J.D. (1999). Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiol*. 119: 1041-1045.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., Stougaard, J. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*. 420: 422-426.
- Küster, H., Frühling, M., Perlick, A.M., Pühler, A. (1993). The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodules tissue of *Vicia faba*. *Mol. Plant Microbe Inter*. 6: 507-514.
- Küster, H., Albus, U., Frühling, M., Tchekova, S.A., Tikonovitch, I.A., Pühler, A., Perlick, A.M. (1997). The asparagine synthetase gene *VfAS1* is strongly expressed in the nitrogen-fixing zone of broad bean (*Vicia faba* L.) root nodules. *Plant Sci*. 124: 89-95.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 47: 569-593.
- Lancien, M., Gadal, P., Hodges, M. (2000). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol*. 123: 817-824.
- Lauter, F.R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J.W., Frommer, W.B. (1996). Preferential expression of an ammonium transporter and two putative transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 8139-8144.
- Lea, P.J., Milfin, B.J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*. 251: 614-616.

- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F.D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A. (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃-uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J.* 18: 509-519.
- Malik, N.S.A., Calvert, H.E., Bauer, W.D. (1987). Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. *Plant Physiol.* 84: 266-271.
- Marcker, A., Marianne, L., Jensen, E.Ø., Marcker, K.A. (1984). Transcription of the soybean leghemoglobin genes during nodule development. *EMBO J.* 3: 1691-1695.
- Matoh, T., Ida S., Takahashi, E. (1980). Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.* 21: 1461-1474.
- Melo-Oliveira, R., Oliveira, I.C., Coruzzi, G.M. (1996). *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a non redundant role of glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4718-4723.
- Miesak, B.H., Coruzzi, G.M. (2002). Molecular and physiological analysis of Arabidopsis mutants defective in cytosolic or chloroplastic aspartate aminotransferase. *Plant Physiol.* 129: 650-660.
- Miki, B.L., Fobert, P.F., Charestm P.J., Iyer, V.N. (1993). Procedures for introducing foreign DNA into plants. In: *Methods in plants molecular biology and biotechnology*. Eds. Glick, B.R., Thompson, J.E. U.S.A. pp: 67-88.
- Miller, S.S., Driscoll, B.T., Gregerson, R.G., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J.* 15: 173-184.
- Morey, K.J., Ortega, J.L., Sengupta-Gopalan, C. (2002). Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by multigene family, and the members are regulated in an organ-specific and developmental manner. *Plant Physiol.* 128: 182-193.
- Muldin, I., Ingemarsson, B. (1995). A cDNA from *Brassica napus* L. encoding a putative nitrate transporter. *Plant Physiol.* 108: 1341.
- Nalbantoglu, B., Hirasawa, M., Moomaw, C., Nguyen, H., Knaff, D. B., Allen, R. (1994). Cloning and sequencing of the gene encoding spinach ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1183: 557-561.
- Niebel, A., Bono, J.J., Ranjeva, R., Cullimore, J.V. (1997). Identification of a high affinity binding site for lipo-oligosaccharidic NodRm factors in the microsomal fraction of *Medicago* cell suspension cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 132-134.
- Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., Frommer, W.B. (1994). Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *EMBO J.* 13: 3464-3471.



- Nishimura, R., Ohmori, M., Kawaguchi, M. (2002a). The novel symbiotic phenotype of enhanced-nodulating mutant of *Lotus japonicus*: astray mutant is an early nodulating mutant with wider nodulation zone. *Plant Cell Physiol.* 43: 853-859.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., Kawaguchi, M. (2002b). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature.* 420: 426-429.
- Oaks, A. (1994). Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-749.
- Ortega, J.L., Roche, D., Sengupta-Gopalan. (1999). Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase in vitro and in vivo studies. *Plant Physiol.* 119: 1483-1495.
- Ocheretina, O., Scheibe, R. (1997). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding plant cytosolic malate dehydrogenase. *Gene.* 199: 145-148.
- Parsons, R., Stanforth, A., Raven, J.A., Sprent, J.I. (1993). Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell Environ.* 16: 125-136.
- Pate, J.S., Atkins, C.A., Herridge, D.F., Layzell, D.B. (1981). Synthesis, storage, and utilization of amino compounds in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiol.* 67: 37-42.
- Pathirana, S.M., Vance, C.P., Miller, S.S., Gantt, J.S. (1992). Alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: characterization of the cDNA and expression in effective and plant-controlled ineffective nodules. *Plant. Mol. Biol.* 20: 437-450.
- Pathirana, M.S., Samac, D.A., Roeven, R., Yoshioka, H., Vance, C.P., Gantt, J.S. (1997). Analyses of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expression in alfalfa nodules. *Plant J.* 12: 293-304.
- Pawlowski, K. (1997). Nodule-specific gene expression. *Physiol. Plant.* 99: 617-631.
- Purcell, L.C., Sinclair, T.R. (1994). An osmotic hypothesis for the regulation of oxygen permeability in soybean nodules. *Plant Cell Environ.* 17: 837-843.
- Pladys, D., Vance, C.P. (1993). Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 103: 379-384.
- Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L.J., Daniel-Vedele, F., Fernández, E., Forde, B.G., Caboche, M. (1997). PCR-identification of a *Nicotiana glauca* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the CrnA family. *Plant Mol. Biol.* 34: 265-274.
- Raskin, I. (1996). Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3164-3166.

- Redinbaugh, M. G., Campbell, W. H. (1993). Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.* 101: 1249-1255.
- Reibach, P.H., Streeter, J.G. (1983). Metabolism of ¹⁴C-labelled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* 72: 634-640.
- Reynolds, P.H.S., Blevins, D.G., Boland, M.J., Schubert, K.R., Randall, D.D. (1982). Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: A comparison between ureid- and amide-transporting plants. *Physiol. Plant.* 55: 255-260.
- Robinson, D.L., Pathirana, S.M., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1996). Immunogold localization of nodule-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase in alfalfa. *Plant Cell Environ.* 19: 602-608.
- Robinson, D.L., Trepp, G., Gregerson, R.G., Twary, S.N., Roeven, R., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1999). Cloning and developmental expression of a nodule-enhanced sucrose synthase cDNA from alfalfa. In: **Highlights of Nitrogen Fixation Research**. Eds. Martínez, E. y Hernández, G. Luver Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 23-31.
- Rodermel, S.R., Abbott, M.S., Bogorad, L. (1988). Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits Ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell.* 55: 673-681.
- Rosendahl, L., Vance, C.P., Pederson, W.B. (1990). Products of dark CO₂ fixation support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* 93: 12-19.
- Sagan, M., Duc, G. (1996). *Sym28* and *Sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Symbiosis.* 20: 229-245.
- Sakakibara, H., Watanabe, M., Hase, T., Jugiyama, T. (1991). Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *J. Biol. Chem.* 266: 2028-2035.
- Schuller, K.A., Werner, D. (1993). Phosphorylation of soybean (*Glycine max* L.) nodule phosphoenol pyruvate carboxylase *in vitro* decreases sensitivity to inhibition by L-malate. *Plant Physiol.* 101: 1267-1273.
- Schultz, C.J., Coruzzi, G.M. (1995). The aspartate aminotransferase gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. *Plant J.* 7: 61-75.
- Schoenbeck, M.A., Temple, S.J., Trepp, G.B., Blumenthal, J.M., Samac, D.A., Gantt, J.S., Hernandez, G., Vance, C.P. (2000). Decreased NADH glutamate synthase activity

- in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transformed with an antisense glutamate synthase transgene. *J. Exp. Bot.* 51: 29-39.
- Schultze, M., Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33-57.
- Schulze, J., Shi, L., Blumenthal, J., Samac, D.A., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1998). Inhibition of alfalfa root nodule phosphoenol pyruvate carboxylase through an antisense strategy impacts nitrogen fixation and plant growth. *Phytochem.* 49: 341-346.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., Gresshoff, P.M. (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science.* 299: 109-112.
- Shelp, B.J., Atkins, C.A. (1984). Subcellular location of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. *Plant Sci. Lett.* 36: 225-230.
- Sheng, C., Harper, J.E. (1997). Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulating soybean genotypes. *Plant Physiol.* 113: 825-831.
- Silvente, S., Camas, A., Lara, M. (2003). Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. *J. Exp. Bot.* 54: 749-755.
- Sivasankar, S., Oaks, A. (1996). Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 609-620.
- Skøt, L., Minchin, F.R., Timms, E., Fortune, M.T., Webb, K.J., Gordon, A.J. (1996). Analysis of the two nodulins, sucrose synthase and ENOD2, in transgenic *Lotus* plants. *Plant and Soil.* 186: 99-106.
- Somerville, C.R., Ogren, W.L. (1980). Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature.* 286: 257-259.
- Stanford, A.C., Larsen, K., Barker, D.G., Cullimore, J.V. (1993). Differential expression within the glutamine synthetase gene family of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 103: 73-81.
- Stitt, M., Sonnewald, U. (1995). Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46: 341-368.
- Stitt, M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 178-186.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 417: 959-962.

- Streeter, J. (1988). Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* 7:1-22.
- Stougaard, J., Marcker, K.A., Otten, L., Schell, J. (1986). Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature*. 321: 669-674.
- Stougaard, J., Jorgensen, J.E., Christensen, T., Kühle, A., Marcker, K.A. (1990). Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc*₃ and N₂₃ gene promoters. *Mol. Gen. Genet.* 220: 353-360.
- Suárez, R., Márquez, J., Chichkova, S., Hernández, G. (2003). Over-expression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicus* plants. *Physiol. Plant.* En prensa.
- Suganuma, N., Okada, Y., Kanayama, Y. (1997). Isolation of a cDNA for nodule-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase from pea and its expression in effective and plant-determined ineffective pea nodules. *J. Exp. Bot.* 48: 1165-1173.
- Sugimoto, T., Kawasaki, T., Kato, T., Whittier, R.F., Shibata, D., Kawamura, Y. (1992). cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase gene from soybean. *Plant Mol. Biol.* 20: 743-747.
- Suzuki, A., Gadal, P. (1982). Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.* 69: 848-852.
- Takats, S.T. (1990). Early autoregulation of symbiotic root nodulation in soybeans. *Plant Physiol.* 94: 865-869.
- Takats, S.T. (1990). Early autoregulation of symbiotic root nodulation in soybeans. *Plant Physiol.* 94: 865-869.
- Temple, S.J., Knight, T.J., Unkefer, P.T., 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, S.J., Heard, J., Ganter, G., Dunn, K., Sengupta-Gopalan, C. (1995). Characterization of nodule-enhanced glutamine synthetase from alfalfa: nucleotide, *in situ* localization, and transcript analysis. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 8: 218-227.
- Temple, S.J., Kunjibettu, S., Roche, D., Sengupta-Gopalan, C. (1996). Total glutamine synthetase activity during soybean nodule development is controlled at the level of transcription and holoprotein turnover. *Plant. Physiol.* 112: 1723-1733.

- Temple, S.J., Sengupta-Gopalan, C. (1997). Manipulating amino acid biosynthesis. En: A molecular approach to primary metabolism in higher plants. Eds. Foyer, H.F. y Quick, W.P. U.S.A. pp. 155-177.
- Temple, S.J., Bagga, S., Sengupta-Gopalan, C. (1998a). Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol. Biol.* 37: 535-547.
- Temple, S.J., Vance, C.P., Gantt, J.S. (1998b). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* 3: 51-56.
- Tingey, S.V., Walker, E.L., Coruzzi, G.M. (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* 6: 1-9.
- Töpfer, R., Martini, N., Schell, J. (1995). Modification of plant lipid synthesis. *Science.* 268: 681-685.
- Trepp, G.B., van de Mortel, M., Yoshioka, H., Miller, S.S., Samac, D.A., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1999a). NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Genetic regulation and cellular expression. *Plant Physiol.* 119: 817-828.
- Trepp, G.B., Plank, D.W., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1999b). NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* 119: 829-837.
- Trepp, G.B., Temple, S.J., Bucciarelli, B., Shi, L.F., Vance, C.P. (1999c). Expression map for genes involved in nitrogen and carbon metabolism in alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 12: 526-535.
- Trueman, L.J., Richardson, A., Forde, B.G. (1996). Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 175: 223-231.
- Tsai, F.Y., Coruzzi, G.M. (1990). Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. *EMBO J.* 9: 323-332.
- Tsai, F.Y., Coruzzi, G.M. (1991). Light represses transcription of asparagine synthetase genes in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of plants. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4966-4972.
- Iyerman, S.D., Whitehead, L.F., Day, D.A. (1995). A channel-like transporter for NH_4^+ on the symbiotic interface of N_2 -fixing plants. *Nature.* 378: 629-632.
- Tzfira, T., Citovsky, V. (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.* 12: 121-129.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- van Blokland, R., ten Lohuis, M., (1997). Condensation of chromatin in transcriptional regions of an inactivated plant transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing. *Mol. Gen. Genet.* 257: 1-13.
- van Brussel, A.A.N., Tak, T., Boot, K.J.M., Kijne, J.W. (2002). Autoregulation of root nodule formation: signals of both symbiotic partners studied in a split-root system of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 15: 341-349.
- van der Krol, A.R., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R. (1988). Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *BioTechniques.* 6 (10): 958-976.
- Vance, C.P., Gant, J.S. (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant.* 85: 266-274.
- Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S., Gantt, J.S. (1994). Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* 101: 51-64.
- Vance, C. P., Miller, S. S., Gregerson, R. G., Samac, D. A., Robinson, D. L., Gantt, J. S. (1995). Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. *Plant J.* 8: 345-358.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172: 4295-4306.
- Vázquez-Tello, A., Whittier, R.F., Kawasaki, T., Sugimoto, T., Kawamura, Y., Shibata, D. (1993). Sequence of a soybean (*Glycine max* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA. *Plant Physiol.* 103: 1025-1026.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Frommer, W.B. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil.* 196: 191-199.
- Wadsworth, G.J., Marmaras, S.M., Matthews, B.F. (1993). Isolation and characterization of a soybean cDNA clone encoding the plastid form of aspartate aminotransferase. *Plant Mol. Biol.* 21: 993-1009.
- Wadsworth, G.J., Gebhardt, J.S., Matthews, B.F. (1994). Characterization of a soybean cDNA clone encoding the mitochondrial isoenzyme of aspartate aminotransferase, AAT4. *Plant Mol. Biol.* 27: 1085-1095.
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S.T., Crawford, N.M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell.* 12: 1491-1509.

- Wang, Y.H., Garvin, D.F., Kochian, L.V. (2001). Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* 127: 345-359.
- Wassenegger, M., Pelissier, T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 37: 349-362.
- Waterhouse, R.S., Smyth, A.J., Massonneau, A., Prosser, I.M., Clarkson, D.T. (1996). Molecular cloning and characterisation of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant Mol. Biol.* 30: 883-897.
- Waters, J.K., Hughes II, B.L., Purcell, L.C., Gerhardt, K.O., Mawhinney, T.P., Emerich, D.W. (1998). Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12038-12042.
- Weeden, N.F., Gottlieb, L.D. (1980). The genetics of chloroplast enzymes. *J. Hered.* 71: 392-396.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., de Bruijn, F.J., Stougaard, J., Szczyglowski. (2000). Short mutant of *Lotus japonicus* with dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* 23: 97-114.
- Zehnacker, C., Becker, T. W., Suzuki, A., Carrayol, E., Caboche, M., Hirel, B. (1992). Purification and properties of tobacco ferredoxin-dependent glutamate synthase, and isolation of corresponding cDNA clones. Light-inducibility and organ-specificity of gene transcription and protein expression. *Planta.* 187: 266-276.
- Zhang, X.Q., Li, B., Chollet, R. (1995). *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 108: 1561-1568.
- Zhang, X.Q., Chollet, R. (1997a). Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by Ca²⁺-dependent protein kinase. *FEBS Let.* 410: 126-130.
- Zhang, X.Q., Chollet, R. (1997b). Phosphoenolpyruvate carboxylase protein kinase from soybean root nodules: partial purification, characterization, and up/down-regulation by photosynthate supply from the shoots. *Arch. Biochem. Biophys.* 343: 260-268.
- Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J.J., Glass, A.D.M. (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17: 563-568.
- Zupan, J.R., Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.