

LA SOBREEXPRESIÓN DE GLUTAMINA SINTETASA AFECTA AL CRECIMIENTO VEGETATIVO DEL CHOPO

Fernando Gallardo¹, Jianming Fu², Zhong Ping Jing¹, Rafael Sampalo¹, Edward G. Kirby² y Francisco M. Cánovas¹.

1. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. 29071 Málaga. Fax 952132000. fgallardo@uma.es

2. Department of Biological Sciences. Rutgers University, Newark, New Jersey, EE. UU.

RESUMEN

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima clave de la asimilación de nitrógeno y síntesis de compuestos nitrogenados en plantas superiores. Hemos desarrollado una estrategia molecular para aumentar la expresión de esta enzima en árboles transgénicos mediante la construcción de un gen quimérico que permite la síntesis de la GS de pino bajo la dirección del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La construcción se transfirió al genoma de un clon híbrido de chopo (*Populus tremula X P. alba*, clon INRA 7171-B4) via *Agrobacterium tumefaciens*. La presencia del transgén se ha detectado en todas las líneas seleccionadas. Como resultado de su expresión se produce un aumento en los niveles de actividad GS y en el contenido de proteínas y clorofilas. Estos cambios están asociados a un aumento en el crecimiento vegetativo de los árboles modificados respecto a la línea control no transformada. Nuestros resultados sugieren que la eficiencia de utilización del nitrógeno puede ser mejorada en árboles mediante manipulación genética de la biosíntesis de glutamina.

PALABRAS CLAVE: desarrollo del chopo, asimilación de nitrógeno, transformación, cultivo *in vitro*.

SUMMARY

Glutamine synthetase (GS) is a key enzyme in the assimilation of inorganic nitrogen and biosynthesis of nitrogenous-compounds in higher plants. We have developed a molecular strategy to increase the expression of the enzyme in transgenic leaves by the construction of a chimeric gene which encodes pine GS under the direction of 35S cauliflower mosaic virus promoter. The chimeric gene was transferred to the genome of an hybrid poplar line (*Populus tremula X P. alba*, clon INRA 7171-B4) via *Agrobacterium tumefaciens*. The presence of the transgene was confirmed in the selected poplar lines. An increase in GS activity, chlorophyll and protein content was observed as results of the transgene expression. These changes were associated to a higher vegetative growth in the transgenic trees respect to the control line. Our results suggest that the efficiency of nitrogen utilization may be engineered in trees by genetic manipulation of glutamine biosynthesis.

KEY WORDS: poplar development, nitrogen assimilation, transformation, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

En plantas superiores, la glutamina sintetasa (GS) es la principal enzima implicada en la asimilación de amonio. La GS cataliza la incorporación de amonio a glutamato produciendo glutamina. Esta reacción es de una gran relevancia metabólica dado que el nitrógeno presente en la mayor parte de

las biomoléculas, incluidas proteínas, ácidos nucleicos, poliaminas y clorofila, procede en último término de la glutamina sintetizada por la GS.

En angiospermas, la GS existe como diferentes isoenzimas que se localizan en el citosol y en el cloroplasto de las células; no obstante, en células fotosintéticas, la isoenzima cloroplastídica (GS2) es la única isoforma GS presente y es responsable de la asimilación del amonio procedente de la reducción de nitrato y del liberado durante la fotosíntesis. Por el contrario, en tejidos no fotosintéticos y en los elementos vasculares de la hoja, la isoenzima presente es de localización citosólica (GS1), y es responsable de la asimilación de amonio procedente de otros procesos secundarios y de la síntesis de glutamina para el transporte a otros tejidos de la planta. En el chopo, el patrón de expresión de la GS en la hoja es similar a cualquier otra angiosperma herbácea, siendo la GS2 la isoforma principal en tejido fotosintético, mientras que la GS1 es mayoritaria en tejido vascular (Gallardo et al. 1999; figura 1).

Aunque existe una gran cantidad de datos sobre la relevancia de la GS cloroplastídica en el desarrollo de las plantas, una serie de evidencias experimentales también indican un papel importante de la isoenzima citosólica (GS1) en el desarrollo del tejido fotosintético durante la diferenciación del plasto (Gallardo y col. 1998; Gálvez y col. 1990), la senescencia de la hoja (Kawakami y Watanabe, 1988), o en respuesta a estrés de origen biótico como la infección por bacterias (Pérez-García y col. 1995) o abiótico (Bauer y col. 1997). Además, se ha demostrado que la isoforma citosólica de la GS tiene una función fisiológica importante en el desarrollo de las coníferas, grupo en el que no se ha detectado la isoforma cloroplastídica y en el que el desarrollo del cloroplasto está asociado a la expresión de la GS citosólica (Cánovas y col. 1998; figura 1).

Los estudios indicados sugieren que la expresión ectópica de la GS1 en células fotosintéticas podría afectar la eficiencia de utilización del nitrógeno por la planta, y por tanto, afectar a los diferentes procesos asociados al desarrollo de la misma, que son dependientes de la síntesis de compuestos nitrogenados (figura 1, panel inferior).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de un gen quimérico y transformación de un clon híbrido de chopo.

Para obtener la expresión de la GS en el citosol de células fotosintéticas de chopo, se realizó la construcción de un gen quimérico para la producción de la GS de pino bajo la dirección del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S, figura 2). El CaMV 35S es un promotor fuerte y constitutivo que se ha empleado en una gran cantidad de estudios de transformación de plantas. El gen quimérico, denominado 35SGSp, se transfirió al plásmido pBin19 (Bevan, 1984) para la transformación de un clon híbrido de chopo (*Populus tremula X P. alba*, clon INRA 7174-B4; Leplé et al.,

1992) mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens* (figura 2). Tras la transformación, y selección de las células recombinantes, se obtuvieron callos y se regeneraron plántulas *in vitro* que se sometieron a diferentes estudios moleculares y de crecimiento.

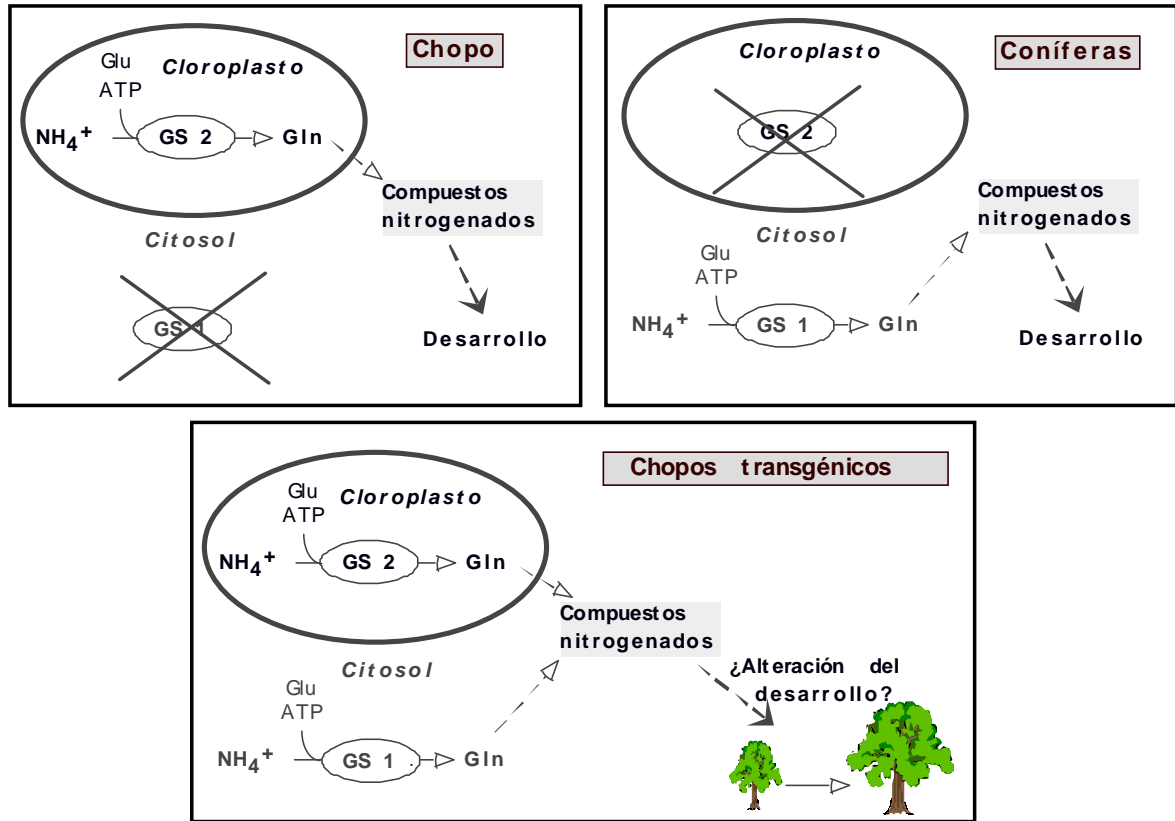


Figura 1. Papel de la glutamina sintetasa en la síntesis de compuestos nitrogenados.

En células típicamente fotosintéticas de angiospermas, incluido el chopo, la asimilación de amonio tiene lugar en el cloroplasto puesto que la isoenzima GS1 (citosólica) no se expresa en ellas. En coníferas, la isoenzima GS responsable de la síntesis de compuestos nitrogenados es la citosólica, ya que la GS2 no se expresa en este grupo de plantas. La expresión de la GS de pino en el citosol de células fotosintéticas de chopo añade a éstas un nuevo compartimento subcelular para la asimilación de amonio, y puede proporcionarle una mayor capacidad de síntesis de glutamina (panel chopos transgénicos). Las nuevas características de la célula podrían afectar a la síntesis de compuestos nitrogenados y al desarrollo del árbol.

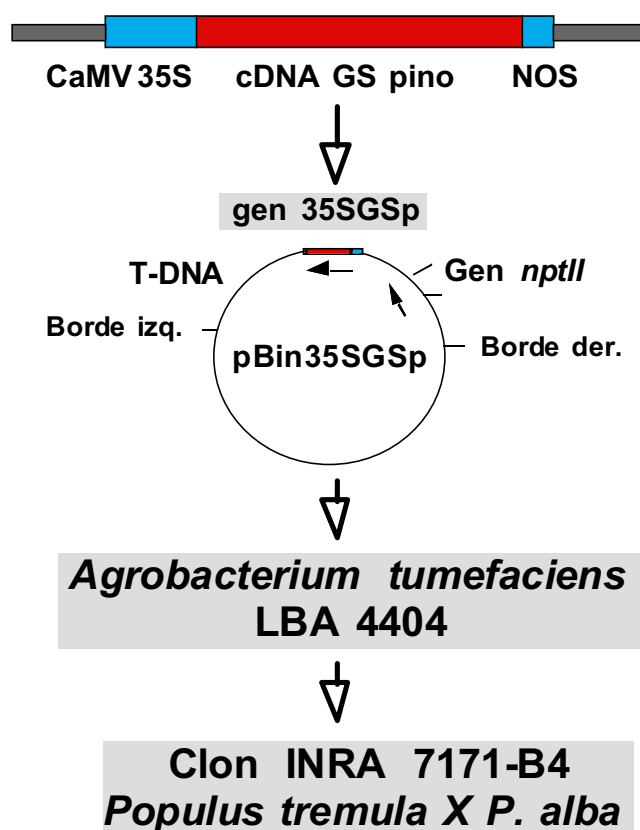


Figura 2. Esquema de la construcción génica empleada para la sobreexpresión de glutaminasintetasa.

El gen 35SGSp se transfirió al vector pBin19 para la transformación de un clon híbrido de chopo mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens*. CaMV 35S, promotor del gen 35S del virus de mosaico de la coliflor. NOS, región de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*.

Caracterización de los árboles transgénicos.

La presencia del transgén en las plántulas regeneradas se comprobó mediante southern blot y PCR empleando cebadores específicos del cDNA de la GS de pino (Cantón et al. 1993). La funcionalidad del transgén se determinó mediante la detección del mRNA y del polipéptido GS de pino (Gallardo et al., 1999). Como resultado de la expresión se ha observado un aumento en el contenido total de actividad GS en la hojas de las plantas transgénicas, y la formación de una nueva holoenzima GS que presenta características cinéticas y moleculares similares a la GS de pino (Sampalo, 2000).

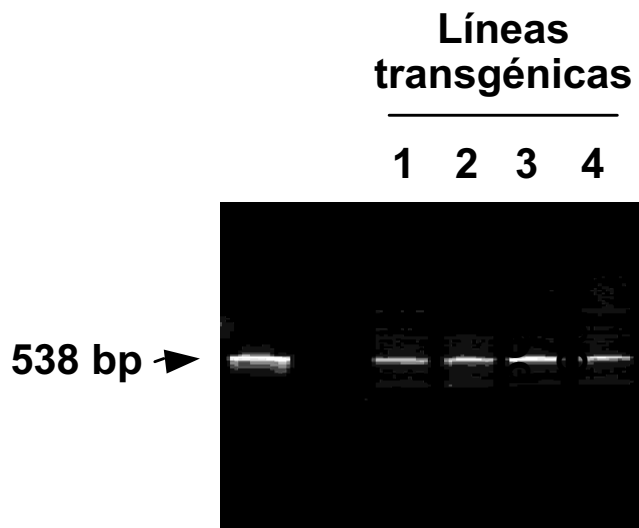


Figura 3. Detección de la presencia del transgén de GS de pino en el genoma de los árboles transgénicos.

Se preparó DNA genómico de la línea control y de diferentes líneas transgénicas y se realizó la amplificación por PCR empleando cebadores específicos del cDNA de GS de pino. Como control, se incluyó en el gel la amplificación realizada con el plásmido pGS114, que contiene el cDNA de GS de pino.

Además de los cambios descritos, los árboles transgénicos se caracterizan por presentar un mayor contenido en clorofila y proteína que las líneas controles (Gallardo et al. 1999). También se han descrito aumentos en el contenido de proteína total, clorofila o biomasa en plantas herbáceas que sobreexpresan GS (Hirel et al. 1997). En nuestro sistema experimental también se han observado cambios en el fenotipo de las plantas debido a la presencia de la isoenzima de pino. Se estudiaron varios indicadores básicos de crecimiento como el desarrollo de las plantas *in vitro*, el número de hojas o el porte de los árboles, estos últimos en experimentos realizados en invernadero. Los datos obtenidos indican que los chopo transgénicos se desarrollan más rápidamente en cultivo *in vitro*, presentando una mayor capacidad de enraizamiento que las plantas controles cultivadas en las mismas condiciones (figura 3). Igualmente, estudios en invernadero, realizados sobre 22 líneas de chopos transgénicos independientes, indicaron que los árboles modificados presentaron una altura superior en un 76% a la registrada en los árboles controles tras dos meses de cultivo (Gallardo et al. 1999) y un incremento del 40% en el número de hojas (nodos) (figura 4).



Transgénico Control Transgénico Control

Figura 4. Fenotipo de los chopostransgénicos que expresan la GS de pino. Las plantas son representativas de líneas de chopostransgénico y control cultivados *in vitro* y en invernadero durante 3 meses de edad.

Aunque existen pocos datos sobre los cambios fenotípicos producidos por la variación de la actividad GS, en un trabajo realizado en leguminosas se ha descrito que el aumento de la expresión de isoenzima citosólica puede acelerar el desarrollo de la planta, provocando su floración y senescencia prematura (Vincent et al., 1997). Nuestros resultados, obtenidos en un sistema forestal, también apoyan la hipótesis de que el aumento en la expresión de GS citosólica puede afectar a la eficiencia de utilización de nitrógeno y provocar un efecto global sobre el desarrollo de las plantas superiores. Se están realizando estudios de campo en una parcela experimental con los objetivos de conocer los cambios estacionales en el metabolismo nitrogenado conferidos por la expresión del transgén de pino, y para comprobar si el mayor crecimiento vegetativo de los árboles modificados pueden mantenerse en las condiciones propias de una explotación forestal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido financiación de la OTAN (CRG940748), Ministerio de Educación (1FD97-0746) y Rutgers University Research Council.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, D; BIEHLER, K; FOCK, H; CARRAYOL, E; HIREL, B; MIGGE, A; BECKER, TW (1997) A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol Plant* 99: 241-248.

BEVAN, M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Res* 12: 8711-8721

CÁNOVAS, FM; CANTÓN, FR; GARCÍA-GUTIÉRREZ, A; GALLARDO, F; CRESPILO, R (1988) Molecular physiology of glutamine biosynthesis in developing seedlings of conifers. *Physiol Plant* 103:287-294

CANTÓN, FR; GARCÍA-GUTIÉRREZ, A; CRESPILO, R; CÁNOVAS, FM (1996) High-level expression of *Pinus sylvestris* glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Production of polyclonal antibodies against the recombinant protein and expression in pine seedlings. *FEBS Lett* 393: 205-210

CANTÓN, FR; GARCÍA-GUTIÉRREZ, A; GALLARDO, F; DE VICENTE, A; CÁNOVAS, FM (1993) Molecular characterization of a cDNA clone encoding glutamine synthetase from a gymnosperm, *Pinus sylvestris*. *Plant Mol. Biol.* 22:819-828.

GALLARDO, F; FU, J; CANTÓN, FR; GARCÍA-GUTIÉRREZ, A; CÁNOVAS, FM; KIRBY, EG (1999) Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* 210:19-26

GALLARDO, F; GALVEZ, S; QUESADA, MA; CÁNOVAS, FM; NÚÑEZ DE CASTRO, I (1988) Glutamine synthetase activity during the ripening of tomato fruit. *Plant Physiol Biochem* 26: 747-752

GÁLVEZ, S; GALLARDO, F; CÁNOVAS, F (1990) The occurrence of glutamine synthetase isoenzymes in tomato plants is correlated to plastid differentiation. *J Plant Physiol* 137: 1-4

HIREL, B; PHILIPSON, 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 Bodenk* 160: 283-290.

KAWAKAMI, N; WATANABE, A (1988) Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNA in radish cotyledons. *Plant Physiol* 88:1430-1434

LEPLÉ, JC; BRASILEIRO, ACM; MICHEL, MF; DELMOTTE, F; JOUANINE, L (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* 11: 137-141

PÉREZ-GARCÍA, A; CÁNOVAS, FM; GALLARDO, F; HIREL, B; DE VICENTE, A (1995) Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol Plant-Microb Interac* 8:96-103

SAMPALO, R; (2000) Caracterización enzimática de chopostransgénicos que expresan un gen de glutamina sintetasa de pino. Tesis de Licenciatura, Universidad de Málaga.

VINCENT, R; FRAISIER, V; CHAILLOU, S; LINAMI, MA; DELEENS, E; PHILLIPSON, B; DOUAT, C; BOUTIN, J-P; HIREL, B; (1997) Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* 201: 424-433