

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL CCH

03081

5

2ej.

**GENERACION DE UN SISTEMA PARA ESTUDIAR LA
REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN
Phaseolus vulgaris**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

PATRICIA LEON MEJIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARZO 1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

	Paginas
Introducción	
1.- Generalidades	1
2.- Transformación vegetal	2
3.- Generalidades de cultivos vegetales	14
4.- Cultivo en suspensión y producción de protoplastos.	17
5.- Expresión genética en plantas superiores.	18
- Modificación del la unidad transcripcional	19
- Generalidades de glutamina sintetasa	20
Objetivo	23
Resultados	
<u>Establecimiento del cultivo en suspensión y expresión transitoria en <i>P. vulgaris</i></u>	
Artículo	
1.- Optimización de la osmolaridad	24
2.-Transformación con polietilenglicol	
<u>Estudios transitorios de la regulación de regulación de la expresión genética</u>	
Modificación de la unidad transcripcional	27
3.- Importancia del líder no traducido en la expresión de un gen en <i>P. vulgaris</i> .	
4.-Caracterización del cultivo de Negro Jamapa	28
Glutamino sintetasa como un modelo para el estudio de la expresión genética en cultivos de frijol.	
5.-Caracterización de la actividad de GS	28
6.-Detección de la proteína por anticuerpos	
7.-Regulación de la expresión de <i>glnβ</i> por nitrógeno	
8.-Fusiones traduccionales de GS	
Discusión	37
Referencias	44

El trabajo que se presenta en esta tesis fué realizado bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, en el departamento de Biología molecular de plantas del Centro de Fijación del Nitrógeno. Parte del trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Virginia Walbot en la Universidad de Stanford. Algunos experimentos se realizaron con la ayuda de Frederique Planckaert.

El artículo que se incluye en la tesis ha sido aceptado para su publicación en *Journal of Plant Physiology*.

Patricia León Mejía

Tesis:

"GENERACION DE UN SISTEMA PARA ESTUDIAR LA REGULACION DE LA EXPRESION
GENETICA EN *P. vulgaris*"

RESUMEN

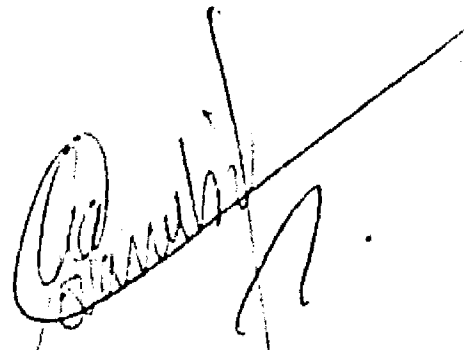
A pesar de que en muchas especies vegetales es posible introducir DNA y generar plantas completas (plantas transgénicas), éste no es el caso de frijol, que al igual que muchas otras leguminosas presenta serios problemas para su transformación. En este trabajo se desarrolló un método alternativo para el estudio de algunos aspectos regulatorios en *P. vulgaris*. Con este propósito se estableció una línea de cultivo, capaz de ser transformada en alta eficiencia para monitoriar en tiempos cortos la expresión del gen introducido. Fueron optimizadas las condiciones para la transformación de protoplastos por dos métodos, electroporación y transformación con polietilenglicol.

Una vez optimizadas las condiciones para su transformación y expresión, este sistema se utilizó para el estudio de la expresión genética en dos diferentes modelos; el estudio de la región no traducida de un gen y de la enzima glutamina sintetasa de *P. vulgaris*. Ambos modelos muestran el tipo de estudios que es posible llevar a cabo utilizando sistemas transitorios.

En el primer caso nos concentramos en el efecto de la modificación del líder no traducido como modelo de estudio, utilizado el gen de luciferasa (proveniente de luciérnaga) como marcador. Se estudiaron dos modificaciones dentro del líder no traducido; la introducción del aumentador traduccional omega (Ω) y la de un intrón de monocotiledóneas y de dicotiledóneas. Los resultados obtenidos para ambas modificaciones tienen una repercusión en el nivel de expresión del gen de luciferasa. En el caso de la introducción de Ω en el líder, este es capaz de promover un aumento de alrededor de 4 veces en la expresión del mismo gen. En el caso del intrón se obtiene un aumento de 2.5 veces. La introducción de ambas modificaciones dan como resultado un aumento en los niveles de expresión genética de 10 veces. Creemos que un vector de esta naturaleza será útil para el estudio de genes homologos en frijol.

El segundo aspecto de regulación que fué estudiado en este trabajo es la regulación de la expresión de los genes para la enzima glutamina sintetasa. En específico nos concretamos a analizar el efecto que tiene los niveles de nitrógeno en el medio en la expresión del gen *gln- β* de esta enzima. Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren que existe una diferencia en la cantidad del RNA específico para el gen *gln- β* proveniente de células en contacto con diferentes condiciones nitrogenadas. El análisis de los niveles de mensajero en

las diferentes condiciones, muestran una inducción de alrededor de 2 a 5 veces. Finalmente hemos hecho fusiones traduccionales de la región 5' de los genes *gln-β* y *gln-γ* con el gen reportero de luciferasa. Hasta el momento se han utilizado estas construcciones para analizar los niveles de expresión de ambos genes en su sistema homólogo y los resultados hasta el momento muestran que los niveles de luciferasa tanto para la fusión con la región de *gln-β* como para la de *gln-γ*, son muy semejantes. La actividad de ambos promotores es alrededor de 3 a 5 veces menor que la del promotor 35S del CAMV que es un promotor fuerte en plantas superiores. Estas construcciones nos permitirán caracterizar posibles regiones regulatorias en condiciones en las que endógenamente exista una modulación por nitrógeno.



Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Asesor

Patricia León Mejía

ABSTRACT

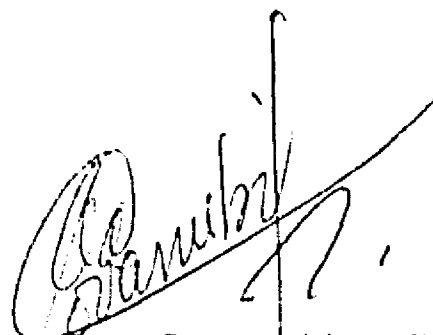
The general objective on this work was to obtain a system which allows gene expression studies in *Phaseolus vulgaris*. During the past years the advances in introducing DNA into plants has open the possibility to study important aspects of the gene expression in several plant systems. Although gene transfer and regeneration has been successfully carried out in different plant, members of the legume family as is the case of *P. vulgaris*, have been difficult to work with. Due to this problems we decide to try to establish an alternative method with allows transient gene expression expression using direct transformation methods.

A cell suspension culture from immature cotyledons of *P. vulgaris* cv Negro Jamapa was established. Protoplasts isolated from this culture were use to optimized transformation conditions. Two direct transformation methods were optimized. A relative simple transfer technique which consist in incubating the protoplasts with the plasmid DNA in the presence of polyethylene glycol (PEG). And a second technique electroporation, where a high intensity electric field is apply to reversibly permeabilize the cell membrane, allowing the DNA penetration inside of the cell.

Transient gene expression has been successfully used in this work to study two different gene expression aspects. One of them is changing some features of the 5' untranslated leader. Because one of our objectives was to obtain a high level of expression in beans, we have tested the effect of including sequences reported to affect gene expression in other species, the RNA leader sequence derived from the TMV (omega) and a dicot intron. By introducing this sequences in the untranslated leader of the luciferase reporter gene, we have generated a vector which gives 10-fold higher transient gene expression in beans. We think that this vector will be a helpful tool for the study of the gene expression of homologous genes in *P. vulgaris*.

Another aspect we have studied, is the regulation on the RNA levels of one of the glutamine synthetase genes by nitrogen. The results obtained indicate that the RNA level of the *glnB* of GS respond to the nitrogen level of the medium. Finally we have constructed translational fusions with the regulatory region of the *gln-B* and *gln-γ* genes that will be used to study transient gene expression under different nitrogen conditions.

In summary by using the *P. vulgaris* cultured and the conditions established for transient gene expression we have been able to start the study on gene regulation in this plant species.



Dra Alejandra Covarrubias Robles
Asesor

INTRODUCCION

Generalidades

El estudio de las plantas por mucho tiempo se concretó casi exclusivamente a aspectos fisiológicos y genéticos tradicionales, con el fin de mejorar estos organismos. Este mejoramiento ha sido a través de técnicas de tradicionales, seleccionando características importantes y posteriormente dispersandolas dentro de la población por métodos de entrecruzamiento convencional. En las dos últimas décadas el rápido avance de la biología molecular ha mostrado que el entendimiento de los aspectos básicos de la regulación y la expresión genética en plantas es esencial para manipular de forma más conciente estos organismos. Por ejemplo, estos estudios han puesto de manifiesto diferencias importantes de algunos procesos regulatorios de plantas superiores en comparación con otros eucariotes; este es el caso de algunas de las características de los intrones en plantas.

Entre las principales especies vegetales de importancia en México se encuentran tanto el maíz como el frijol, no sólo porque son alimentos básicos de la población mexicana, sino también porque al ser este país su principal centro de dispersión contamos con una gran cantidad de variedades genéticas. En el caso particular de frijol, gran cantidad de los proyectos de mejora tecnológica estan condicionados a la posibilidad de manipular esta planta. A diferencia del maíz, casi la totalidad de la producción de frijol que se consume internamente es producido en el país, por lo tanto la mejora de esta planta depende de estudios que se realizen en México. Como se mencionó, la posibilidad de manipular un sistema biológico depende de contar con un conocimiento previo, por lo que el propósito de este trabajo es la generación de un sistema que permita llevar a cabo estudios de regulación en frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Uno de los desarrollos más importantes tanto para la modificación de organismos vegetales a través de métodos no convencionales como para poder realizar estudios de regulación ha sido la introducción de genes externos a las plantas. Esta tecnología tiene aplicaciones obvias desde el punto de vista tecnológico, ya que durante los últimos años se ha hecho un enorme progreso para la generación de plantas transgénicas acortando el tiempo requerido para la generación de nuevas variedades vegetales. Actualmente,

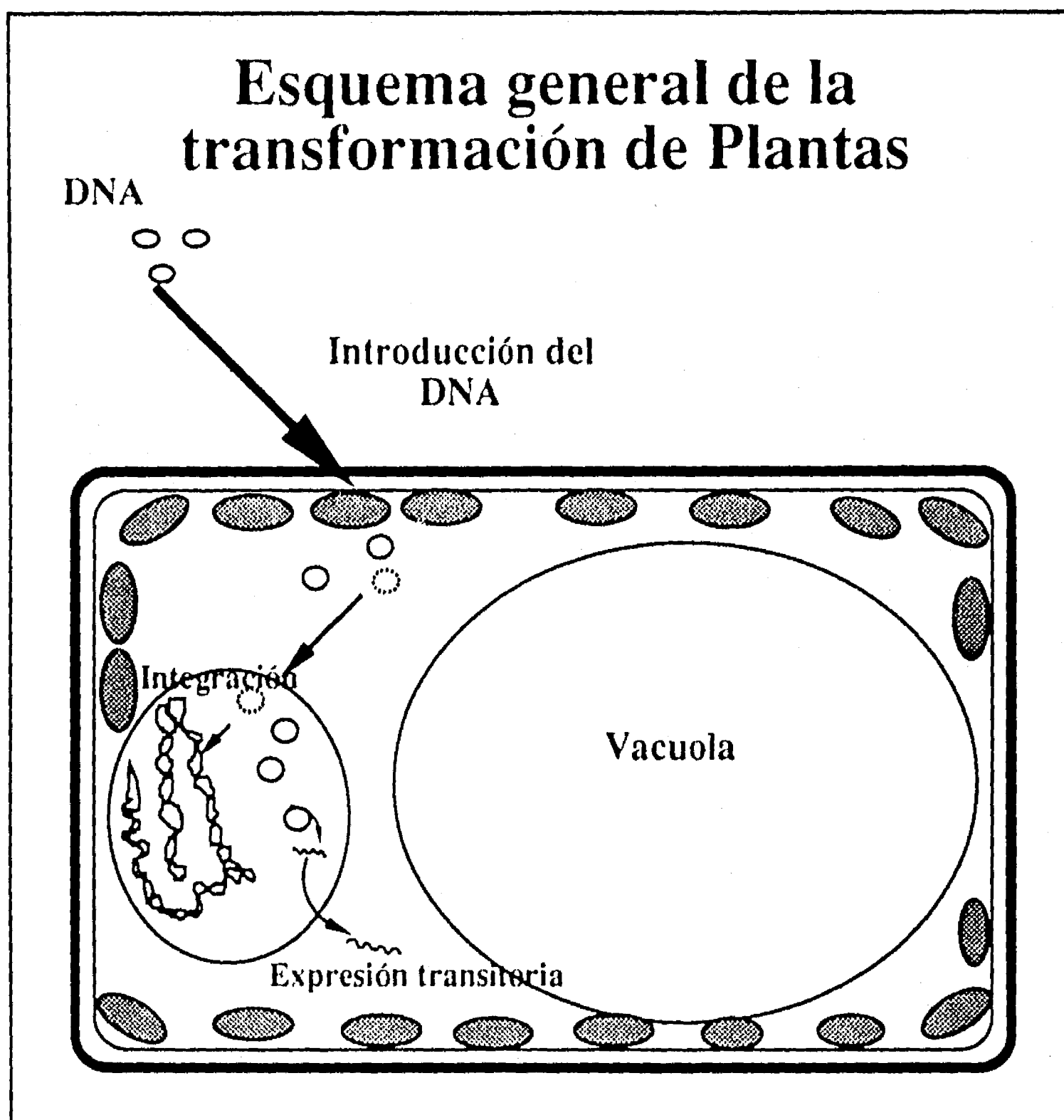
En aquellas células en las que el DNA introducido se integre establemente en el genoma, este será heredado en forma estable durante la división celular. Para reconocer y seleccionar aquellas células establemente transformadas, se cuenta con "marcadores" que son introducidos en la misma molécula de DNA que lleva el gen de interés. Los marcadores más usados son genes de resistencia a antibióticos sin embargo, en la actualidad se están utilizando nuevos tipos de marcadores entre los que se encuentran resistencias a herbicidas o la alteración del fenotipo de la célula receptora (color). La demostración definitiva de la integración estable de un DNA al genoma de la planta requiere de estudios de hibridización de DNA.

Una propiedad importante de las células vegetales es su totipotencialidad, de tal manera que en teoría es posible transformar cualquier célula vegetal y obtener un organismo completo. A pesar de esto, la producción de plantas transgénicas está limitada a la eficiencia de transformación aunado a la capacidad de regenerar cada especie vegetal. Hasta el momento la aplicación de éstos métodos en forma rutinaria, se restringe a unas cuantas familias como la de las solanáceas, en la cual tanto la transformación como la regeneración están estandarizadas. Es así que algunas solanáceas como petunia y tabaco han sido adoptados como sistemas modelo para estudios de regulación. Sin embargo, día con día éstos métodos se aplican con éxito a un mayor número de especies vegetales, por lo que es posible que en poco tiempo sea factible hacer estudios de regulación en sistemas homólogos al transformar plantas o células en cultivo. A continuación se describen los métodos más usados para la transformación en plantas.

La primera etapa para transformar, es introducir el DNA a la célula vegetal y puede lograrse por dos medios diferentes. 1) El uso de un patógeno natural de la planta, capaz de introducir su material genético, como son las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rizogenes* y los virus, 2) a través de una transferencia física del DNA dentro de células vegetales.

1) *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias gram negativas *A. tumefaciens* y *A. rizogenes* pertenecen al género *Agrobacterium*. Ambas especies son patógenos naturales de plantas, causando las enfermedades conocidas como la enfermedad de la agalla (crown gall) y la enfermedad de raíces peludas (hairy root), respectivamente. Estas bacterias son capaces de infectar a casi todas las plantas dicotiledóneas pero sólo algunas monocotiledóneas. En 1974, Zaenen *et al.*, (83) reportaron que las cepas patogénicas de

la especie, pero que generalmente se encuentra entre 24 horas hasta una semana después de su transformación. En el caso de que el producto protéico sea una enzima, esta puede ser detectada fácilmente ya que existe una amplificación en cada uno de los pasos de transcripción y traducción. Esta expresión inicial del DNA no integrado se la denomina expresión transitoria (25) y además de ser un método para determinar la efectividad de la transformación, permite estudiar algunos aspectos de la regulación de la expresión genética en plantas sin necesidad de generar un organismo completo (Fig. 1). Los experimentos de expresión transitoria han sido cada vez más usados y la mayor aplicación de muchos de los métodos de transformación es la generación de sistemas adecuados para obtener expresión transitoria.



ha sido posible la introducción de nuevas características importantes para la agricultura como genes de resistencia a insectos, parásitos (32) y herbicidas (6, 68). Por el otro lado, esta técnica permite realizar experimentos de regulación al introducir genes vegetales y/o secuencias regulatorias, tanto dentro de sistemas homólogos como en sistemas heterólogos. Estas unidades transcripcionales pueden a su vez ser modificadas para estudiar su expresión.

A pesar de que en muchas especies vegetales es posible introducir DNA y generar plantas completas (plantas transgénicas), éste no es el caso de frijol, que al igual que muchas otras leguminosas presenta serios problemas para su transformación. En este trabajo se desarrolló un método alternativo para el estudio de algunos aspectos regulatorios en *P. vulgaris*. Con este propósito se estableció una línea de cultivo, capaz de ser transformada en alta eficiencia para monitoriar en tiempos cortos la expresión del gen introducido. Una vez optimizadas las condiciones para su transformación y expresión, este sistema se utilizó para el estudio de la expresión genética en dos diferentes modelos; el estudio de la región no traducida de un gen y de la enzima glutamina sintetasa de *P. vulgaris*. Ambos modelos muestran el tipo de estudios que es posible llevar a cabo utilizando sistemas transitorios.

A continuación describiré brevemente algunos aspectos introductorios de los métodos de transformación, de algunas generalidades de cultivos celulares y de los métodos para la obtención de protoplastos en plantas superiores. Al final de esta introducción, se incluirán en forma muy general algunos aspectos sobre los dos modelos en que se realizaron estudios de expresión genética; la modificación de la región no traducida del gen de luciferasa (LUC) y de la enzima glutamina sintetasa (GS)

Transformación Vegetal

El método de transformación requiere que el material genético sea introducido a la célula vegetal. Una vez dentro de ella, el DNA debe atravesar el citoplasma para entrar al núcleo e integrarse al genoma de la célula, de tal manera que la nueva característica pueda ser transmitida durante la división celular y eventualmente a toda una planta (Fig. 1).

No todo el DNA que llega al núcleo será integrado al genoma, de hecho probablemente sólo unas cuantas moléculas logran integrarse, al parecer en forma azarosa. Sin embargo, la mayor parte del DNA que llega al núcleo aunque no se integre es capaz de ser transcrito por un corto periodo de tiempo que depende de

A. tumefaciens contenían un plásmido el cual era responsable de la inducción del tumor (Ti). Posteriormente, Chilton *et al.* (12), demostraron que las bases moleculares para la inducción de la enfermedad de la agalla se debían a la transferencia e integración de un segmento del plásmido Ti al genoma de la planta. Estudios genéticos y moleculares mostraron que el plásmido Ti contiene dos conjuntos de genes necesarios para la inducción de la enfermedad; que son el segmento de DNA transferido a la planta llamado T-DNA y un grupo de genes denominados genes de virulencia (*vir*), los cuales no son transferidos a la planta pero sin embargo son estrictamente necesarios para la transferencia (5). El llamado T-DNA es un fragmento de DNA en el cual están codificados genes para enzimas involucradas en la síntesis de citoquininas y auxinas. Estas dos fitohormonas, al ser producidas en forma no controlada provocan la división masiva de las células que las producen causando las características tumorigénicas de las plantas infectadas, por lo que se les conoce como genes *onc*. El T-DNA también contiene genes involucrados en la producción de metabolitos derivados de azúcares y de aminoácidos, llamados opinas. Estas opinas son secretadas por la planta y metabolizadas por la bacteria (51). La secuencia del T-DNA ha mostrado que este fragmento se encuentra flanqueado por 25 pares de bases repetidas en forma directa en cada extremo. Estudios recientes, han mostrado que estas secuencias son necesarias para la transferencia del T-DNA a la planta y su modificación altera o impide la transferencia de DNA. El estudio sistemático de cada uno de los genes dentro del T-DNA mostró que ninguno de ellos son necesarios para la transferencia y que los síntomas de tumoricidad desaparecen cuando se les deleta (47). De esta manera se llegó a concluir que la única parte indispensable del T-DNA eran los bordes. Cualquier fragmento de DNA insertado entre ellos es introducido al genoma de la planta y expresado, siempre y cuando lleve las señales necesarias para la expresión de un gen vegetal. En 1983, Luis Herrera Estrella *et al.* (36), reportaron por primera vez el uso de un patógeno natural como vector para la introducción de genes quiméricos en plantas superiores.

A partir de esa fecha se han construido varios vectores moleculares a los cuales se les ha deletado los genes *onc* introduciendo en su lugar genes marcadores que permiten reconocer y seleccionar aquellas plantas que han sido transformadas, como es el caso de genes de resistencia a antibióticos. En la actualidad los vectores que se utilizan pueden ser divididos en dos tipos:

a) Los sistemas "cis" o cointegrativos en los cuales los genes de interés se introducen a través de recombinación homóloga en un T-DNA modificado, dentro de la misma molécula que contiene los genes de virulencia (84).

b) Los sistemas binarios, en donde el T-DNA dentro del cual será insertado el gene de interés, se encuentra en un plásmido y las funciones *vir* son suministradas en *trans* por un plásmido diferente. Estos vectores usualmente son capaces de ser replicados tanto en *Agrobacterium* como en *Escherichia coli*.

En contraste con lo descrito para *A. tumefaciens*, las bacterias del género *rhizogenes* al insertar el T-DNA (Ri T-DNA) a la planta induce la formación de raíces adventicias con casi nula desdiferenciación y proliferación celular (54). Estas raíces transformadas son capaces de regenerar la planta completa trasmitiendo el Ri T-DNA a su progenie (76). La producción *in vitro* de raíces transformadas con el Ri T-DNA en cultivo y su posterior regeneración, son un método relativamente fácil. Actualmente el estudio del plásmido Ri ha permitido que se use como vector con mayor frecuencia para la obtención de organismos transgenicos (73).

A. tumefaciens y *rhizogenes* son un excelente sistema para la transformación de plantas, pues además de no requerir de células aisladas, el método de infección es sumamente sencillo ya que se lleva a cabo *in vitro* co-cultivando la bacteria en presencia de fragmentos de la planta (usualmente segmentos de hoja). Estos discos de hojas son capaces de regenerar una planta completa en una gran variedad de especies y en un tiempo relativamente corto. La transformación con *Agrobacterium* ha sido pues ampliamente adoptada y, de hecho la mayoría de las plantas transgénicas obtenidas hasta ahora provienen de este método como se muestra en la Tabla 1.

2) **Virus.** Ya que el resultado de una infección viral es la introducción de su DNA dentro de una célula, los virus son un vehículo natural de transformación. Por otro lado, el hecho de que los virus tienen la capacidad de multiplicarse y propagar su infección hacia otras células, promovería una mayor eficiencia de transformación al multiplicar las células transformadas. Sin embargo, existen problemas que han impedido que los virus sean aplicados para transformación en plantas, entre ellos los más importantes son: Primero, hasta el momento ningún virus que infecta plantas es capaz de integrar su genoma total o parcialmente al de

la planta. Segundo, usualmente cualquier virus es excluído en las células germinales, de tal manera que a pesar de que sea posible obtener una planta infectada sistémicamente por un virus transgénico, produciendo o expresando el gen de interés, esta planta es incapaz de transmitirlo a la siguiente generación. Aunque no debemos de olvidar que muchas de las plantas comestibles como papa o fresa son propagadas vegetativamente, por lo que en estos casos sería útil una "transformación" de este tipo. Probablemente el mayor problema para usar virus como vectores para transformación, se debe a que hasta el momento solo dos de los virus identificados de plantas contienen un genoma de DNA que pueda ser usado como un vector para transformación. Estos son los caulimovirus, con un genoma de DNA de doble cadena y los geminivirus, con un genoma de DNA de cadena sencilla. Debido a que las técnicas de biología molecular no son fácilmente aplicables a un DNA de cadena sencilla, la mayoría de los esfuerzos se han centrado en los caulimovirus. A pesar de ésto, los caulimovirus están muy lejos de ser un buen vector para transformación ya que tienen un genoma muy complejo y la mayoría de los genes son totalmente indispensables para su replicación dentro de la célula, lo que limita la cantidad de DNA exógeno que puede ser introducido a fragmentos entre 0.8 a 1 Kb. Aunque es necesario continuar los estudios de virus como un posible sistema de transformación, por el momento su aplicación es lejana pues es estrictamente necesario una caracterización básica de ellos antes de poder usarlos como vectores de transformación. Tal vez el aislamiento e identificación de nuevos virus abra una nueva etapa para este método de transformación (63).

La transformación mediada por *Agrobacterium* es un método con una mayor potencialidad en la actualidad para la transformación de plantas superiores que la transformación mediada por virus. A pesar de ésto, existen algunas limitaciones que han promovido la exploración de nuevos métodos de transformación. Probablemente, su mayor limitante es que esta bacteria es incapaz de infectar a la mayoría de las monocotiledóneas dentro de las cuales se encuentran especies como maíz, arroz y trigo, que son agrónomicamente muy importantes. Por otro lado en el caso de algunas leguminosas, la frecuencia de transformación estable por *Agrobacterium* es muy baja debido predominantemente a la baja eficiencia de regeneración en estas especies. Estos hechos hacen que este método de transformación no pueda ser rutinariamente utilizado en la mayoría de las monocotiledóneas y en algunas dicotiledóneas. Con el propósito de lograr transformar estas especies, se han desarrollado métodos alternativos. En la mayoría, el

DNA se introduce a células aisladas a las cuales se les ha removido la pared celular (protoplastos). Es importante subrayar que la aplicabilidad de estos métodos para la producción de plantas transgénicas, está limitada principalmente por las dificultades que existen para regenerar una planta completa a partir de una sola célula. Sin embargo, éstos métodos son sumamente útiles para estudios de regulación ya que la proporción de células transformadas es sumamente alta. No debemos olvidar que ya que las técnicas de regeneración vegetal avanzan día con día es posible que en un futuro cercano los métodos directos sean usados rutinariamente para la generación de plantas transgénicas. Un ejemplo de esto es que actualmente ya existen las primeras plantas transgénicas de arroz a partir de protoplastos usando transformación directa. A continuación describiremos las técnicas más importantes de transformación directa y discutiremos brevemente sus ventajas y desventajas así como su uso para estudios de expresión genética.

3) Microinyección. La inyección directa del DNA ha sido usada para transformar células animales. En el caso de células vegetales esta metodología ha enfrentado problemas técnicos serios, ya que a diferencia de las células animales, las células vegetales presentan una gran vacuola que comprime tanto al citoplasma como a los demás organelos a la periferia de la célula (Fig.1). Esto trae como consecuencia que la inyección directa al núcleo de la planta sea sumamente difícil y laboriosa, ya que la sobrevivencia de los protoplastos inyectados es muy baja. A pesar de esta limitante, algunos grupos han descrito la transformación estable de protoplastos de tabaco y de zanahoria. En estos últimos casos, ha sido posible la regeneración de embriones a partir de los protoplastos transformados (58) o de la microinyección de otro tipo de tejidos (57). Con los continuos avances tecnológicos esta metodología puede llegar a ser usada en poco tiempo con mayor frecuencia, especialmente si es posible inyectar automáticamente un número significativo de protoplastos o identificar las células transformadas a través de visualización directa. La gran ventaja de esta técnica es que con un método automatizado se podrían inyectar células germinales o embriones que obviarían la necesidad de regenerar a partir de una sola célula.

4) Transformación química. Como se mencionó, una de las principales limitantes de la microinyección es que en este método cada célula es tratada independientemente. Por este motivo se han

desarrollado técnicas alternativas, en las que el DNA es introducido simultáneamente a una gran cantidad de protoplastos. En 1982 Krens *et al.* (44), reportaron un método eficiente de transformación a través de la coincubación del DNA con los protoplastos en presencia de polietilenglicol (PEG). Posteriormente, ha sido probada la posibilidad de transformar a través de la incubación con otros compuestos químicos como el fosfato de calcio. Sin embargo, el método químico que se ha dado mejores resultados hasta la fecha es la transformación con PEG. Por ejemplo, en el caso de arroz se han regenerado plantas transformadas con el método de PEG. En estas plantas se demostró que el DNA de interés está integrado establemente en el genoma de la planta (64). La mayor limitación de este método reside en la variabilidad de los lotes de PEG, los cuales con alta frecuencia se encuentran contaminados con elementos tóxicos para las células vegetales. En algunas especies sumamente sensibles tanto a PEG como con cloruro de calcio, la frecuencia de transformación por ambos métodos es aún relativamente baja para contender con las bajas frecuencias de sobrevivencia y regeneración de los protoplastos tratados. Este hecho inspiró la búsqueda de métodos que dieran una alta eficiencia de transformación, uno de estos métodos es la electro transformación o electroporación.

5) Electroporación. Una de las técnicas de biología molecular que más difusión ha tenido durante los últimos años es la electro transformación o electroporación. Este gran éxito no solo se debe a la reproducibilidad de la técnica sino a la posibilidad de ser usada en la mayoría de los organismos. Se le ha dado este nombre al método de transformación que usa un campo eléctrico que permeabiliza reversiblemente a la célula. Aunque por el momento no se entiende perfectamente el fenómeno de electroporación, la idea más aceptada es que durante la duración del pulso la membrana celular actúa como un capacitor eléctrico incapaz de pasar corriente, este campo eléctrico provoca que la membrana celular se rompa en puntos específicos y forme hoyos o poros transitoriamente que permiten la entrada de DNA y otras moléculas (40). La diferencia de potencial requerida para producir estos "poros", depende de factores como la composición de la membrana, temperatura y duración del pulso eléctrico (69). Al parecer el cerrado de estos "poros" es un proceso natural al cabo del tiempo, sin embargo este fenómeno puede ser retardado si las células electroporadas son mantenidas a bajas temperaturas (0°C).

A pesar de que la electroporación fué primeramente usada en células de mamífero (14), ha sido rápidamente adoptada en sistemas vegetales (24) y más recientemente en sistemas bacterianos (69), ya que al estar basada en las características físicas de las células, es una técnica que es adaptada fácilmente a los diferentes tipos celulares. En el caso de organismos vegetales, la electroporación ha mostrado no solo ser efectiva para la introducción de material genético sino también para proporcionar una alta frecuencia de transformantes estables y una expresión transitoria elevada en una gran variedad de plantas como maíz, tabaco, arroz, zanahoria, etc. (ver Tabla 1)

Durante la electroporación, los ácidos nucleicos son introducidos a la célula receptora al aplicar un pulso eléctrico a través de la suspensión celular. El pulso eléctrico usualmente es generado por una descarga proveniente de un capacitor y sigue un decaimiento exponencial, en el cual el voltaje aplicado es la amplitud máxima del pulso (Fig. 2). A pesar de que la electroporación es efectiva para una gran variedad de tipos celulares, las condiciones óptimas para cada uno de ellos deben de ser establecidas experimentalmente.

Existen varios parámetros que son las variables que más se modifican para optimizar la eficiencia de electroporación dependiendo del origen celular (69) que son:

Voltaje. - Esta es una de las principales variables que influye en la eficiencia de transformación. El voltaje aplicado declina durante el tiempo como una función de t la cual depende directamente de la resistencia y la capacitancia de tal forma:

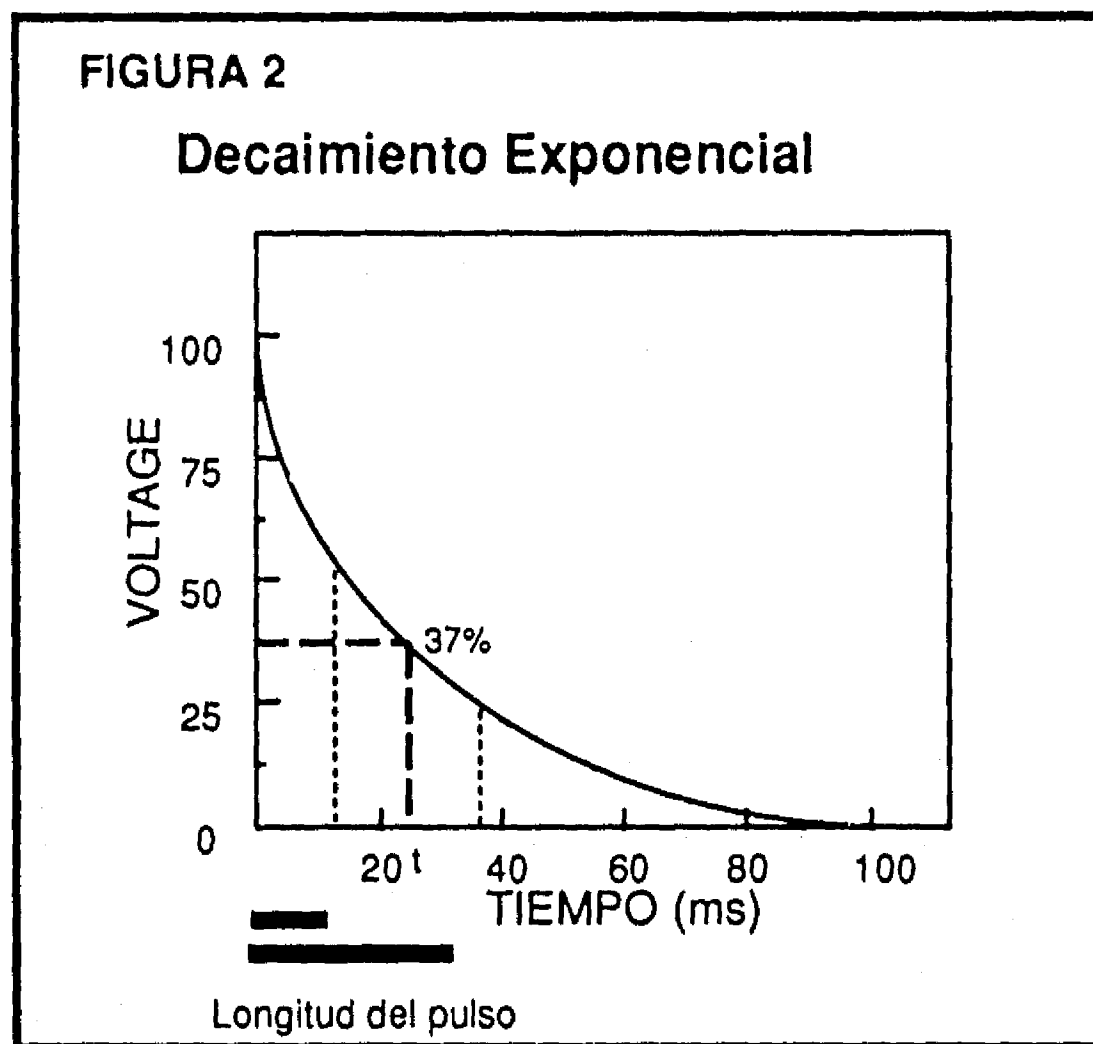
$$V_t = V_0 e^{-t/\tau}$$

Donde τ (t) es el tiempo en que se obtiene el 37% del voltaje inicial y depende de la resistencia (R) y la capacitancia (C) (Fig. 2) porque:

$$\tau = RC$$

Las células son permeabilizadas cuando el voltaje alcanza el punto de ruptura. Este punto depende principalmente del tamaño de la célula, de tal manera que entre más grande sea una célula más bajo voltaje y capacitancia son requeridos para su transformación (Fig 2). Generalmente se prefiere bajos voltajes y alta capacitancia.

El tiempo.- La descarga total de un pulso tiene una duración de aproximadamente 100 mseg, sin embargo solo durante los primeros mseg los protoplastos reciben un voltaje que corresponde al voltaje aplicado y posteriormente este voltaje decae en forma exponencial (Fig. 2). Algunos aparatos de electroporación permiten cortar el pulso a un tiempo determinado, esto produce un pulso semicuadrático. Otros sin embargo, generan un pulso exponencial en el cual el tiempo del pulso es constante (descarga total).



El buffer usado en la electroporación.- La resistencia de la muestra esta determinada por la fuerza ionica del buffer de electroporación. Existe una relación inversa entre la resistencia y la fuerza iónica, de tal manera que al aumentar esta última disminuye la resistencia y por lo tanto se obtiene un pulso con una τ (t) menor.

La distancia entre electrodos.- Este parámetro modifica directamente la resistencia que se aplica ya que al aumentar la distancia entre electrodos o bien reducir el área en que la solución toca el electrodo aumenta la resistencia. Este parámetro es sumamente útil cuando se requiere de altos voltajes como es el caso de las células bacterianas.

expresión transitoria (11, 17, 28). En sistemas animales, estudios transitorios han permitido identificar regiones involucradas en la regulación de diferentes genes así como aislar y analizar algunas proteínas regulatorias que actúan sobre estas regiones de DNA. Técnicas como la electroporación y el cultivo de tejidos han permitido que el análisis de algunos aspectos de la expresión genética comiencen a realizarse en plantas en las que no se han obtenido plantas transgénicas. Un ejemplo es el estudio del procesamiento de intrones e identificación de regiones importantes para la regulación de la expresión genética (10, 29), así como el estudio de algunos sistemas de interacción planta-patógeno (17).

A pesar de que las células vegetales intactas son supuestamente refractarias a ser electrotransformadas, existen reportes recientes de la introducción de DNA vía electroporación de células intactas (55) e incluso a tejidos completos. De ser cierta esta variante podría expandir las posibilidades de esta técnica, pues evitaría la necesidad de generar protoplastos que es el mayor problema de la electroporación ya que su regeneración es generalmente difícil.

6) **Biobalística.** En forma paralela a la introducción de DNA a protoplastos, se han llevado a cabo esfuerzos para encontrar métodos novedosos para la transformación de células intactas o tejidos ya que la regeneración de embriones inmaduros es un método relativamente rutinario. Uno de los desarrollos más significativos en esta área es la tecnología de la **pistola de microproyectiles de alta velocidad**. En este sistema el DNA es acarreado a través de la pared celular al citoplasma en la superficie de una partícula diminuta de metal (0.5 a 5 μm). Estas partículas son aceleradas a altas velocidades, varios cientos de metros por segundo, siendo capaces de penetrar a través de varias capas celulares y transformar aquella célula en la que la partícula queda alojada (66). La producción de células establemente transformadas por este método ha sido muy exitosa y de hecho muchas de las especies que habían sido incapaces de ser transformadas por otros métodos han dado resultados positivos con la biobalística (50). Esta técnica también, ha permitido la transformación de organelos como los cloroplastos de euglena y tabaco (7, 74), así como la mitocondria de levaduras. Muy recientemente dos grupos en forma simultánea han reportado por primera vez la obtención de una planta de maíz transformada que además es fértil (26). Al eliminar el paso por protoplastos, la "biobalística" es pues una de las técnicas con mayor potencialidad y espectro de aplicación. Actualmente se

Tabla 1. Especies de las cuales se han obtenido plantas transgénicas

Especies	Método de transformación
Dicotiledoneas herbáceas	
Petunia	<i>A. tumefaciens</i>
Tomate	<i>A. tumefaciens</i>
Papa	<i>A. tumefaciens</i>
Tabaco	Pistola <i>A. tumefaciens</i> , Transf. directa.
<i>Arabidopsis</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Lechuga	<i>A. tumefaciens</i>
Girasol	<i>A. tumefaciens</i>
Lino	<i>A. tumefaciens</i>
Algodón	<i>A. tumefaciens</i>
Remolacha	<i>A. tumefaciens</i>
Apio	<i>A. tumefaciens</i>
Soya	<i>A. tumefaciens</i> , Pistola
Alfalfa	<i>A. tumefaciens</i>
<i>Medicago varia</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Lotus	<i>A. tumefaciens</i> , <i>A. rhizogenes</i>
<i>Vigna aconitifolia</i>	Transf. directa
Pepino	<i>A. rhizogenes</i>
Zanahoria	<i>A. rhizogenes</i>
Coliflor	<i>A. rhizogenes</i>
Raíz fuerte o rabano picante	<i>A. rhizogenes</i>
Gloria de la mañana	<i>A. rhizogenes</i>
Dicotiledoneas leñosas	
Alamo	<i>A. tumefaciens</i>
Nogal	<i>A. tumefaciens</i>
Manzano	<i>A. tumefaciens</i>
Monocotiledoneas	
Esparrago	<i>A. tumefaciens</i>
Arroz	Transf. directa
Maíz	Transf. directa, Pistola
Centeno	Microinyección

Tomado de Gasser, C. y Fraley, T. (32).

está tratando de que esta metodología pueda ser aplicada para la transformación directa tanto de polen como del órgano reproductivo femenino. Ya que la regeneración a partir de embriones inmaduros es un método relativamente rutinario, de haber resultados positivos se obviaría cualquier problema de regeneración.

Existen otras técnicas que han sido usadas menos frecuentemente y con menos éxito como son la incubación del DNA con semillas (78), embriones o tejidos completos; fusión de liposomas usando tejidos o protoplastos (27), microlaser, etc. (63).

Es evidente que las técnicas para la modificación de las plantas se encuentran en un rápido desarrollo y probablemente muy pronto empezemos a disfrutar de los beneficios de la tecnología molecular moderna.

Generalidades de cultivo de tejidos vegetales y aislamiento de protoplastos

A diferencia de los animales superiores, las plantas presentan un desarrollo tal que permite una alta flexibilidad en su diferenciación. Esto se debe principalmente a que en la mayoría de los tejidos de una planta existen células poco diferenciadas (meristemáticas), capaces de diferenciarse hacia uno o más tejidos proceso que se conoce como morfogénesis (79). Sin embargo, esta flexibilidad no es exclusiva de las células meristemáticas sino que potencialmente todas las células vegetales son capaces de cambiar su patrón de diferenciación, a lo que se le denomina totipotencialidad. En la práctica no todas las células son capaces de revertir y rediferenciarse, especialmente aquellas que han alcanzado un alto grado de diferenciación. Generalmente en un tejido solo alguno o algunos tipos celulares son capaces de adoptar un nuevo patrón de desarrollo para dar lugar a la generación de estructuras e incluso a una planta completa (regeneración). El poder regenerar un organismo completo a partir de una o unas cuantas células, ha permitido que las técnicas de transformación tengan una repercusión en la generación de organismos permanentemente transformados.

Durante los últimos años los estudios de regeneración y de cultivo de tejidos vegetales han tenido un avance sorprendente. La regeneración de una planta a partir de un fragmento de un tejido vegetal, al cual se le denomina explante, puede provenir a partir de dos mecanismos; vía organogénesis o vía embriogénesis somática. En la primera de ellas algunas células de un explante, al ser puesto en condiciones adecuadas,

sufren una reprogramación de su estado de diferenciación. Este nuevo programa pasa por diferentes estados de diferenciación y concluye con la génesis de novo de una estructura, llamada brote. Este brote en algunos casos es capaz de generar todos los otros tejidos de una planta (raíz, tallo, hojas, etc) (21). La organogénesis es un proceso que se da en la naturaleza frecuentemente en plantas que se reproducen vía estolón, en este caso un fragmento de raíz es capaz de generar un brote a partir del cual se obtiene una planta completa.

Durante la embriogénesis somática, algunas células que se han desdiferenciado son capaces de generar una planta pasando por estadios semejantes a los de una embriogénesis normal (torpedo, corazón, etc.); una vez que estos embriones somáticos son separados de la planta madre pueden continuar con el desarrollo de una planta nueva sin pasar por un estado de germinación (1, 3). Desafortunadamente, no todas las plantas son capaces de llevar a cabo procesos de regeneración ya sea vía organogénesis o embriogénesis somática bajo las condiciones que han sido establecidas hasta la fecha y de hecho solo algunas especies son factibles de regenerar.

De la gran cantidad de estudios que han sido publicados, encaminados a la regeneración de diferentes especies vegetales ha quedado de manifiesto que el proceso morfogenético es sumamente complejo y que en él intervienen una gran cantidad de factores por lo que los métodos de regeneración son sumamente empíricos y sin reglas generales. Se ha visto que la relación de hormonas vegetales, especialmente auxinas y citoquininas, es un factor importante para el estado de diferenciación de vegetales. Inicialmente se pensó que esta relación era el principal inductor de morfogénesis (71), sin embargo, con el estudio de las especies recalcitrantes ha quedado de manifiesto que otros factores como algunos micro y macro nutrientes, vitaminas, aminoácidos, esteroides, algunas otras hormonas, así como factores físicos (pH, temperatura etc.) pueden afectar también de manera importante la morfogénesis en algunas especies vegetales (31, 34, 79).

Ha sido posible obtener *in vitro* diferentes patrones morfogenéticos como raíces, hojas, tallos, etc. De todos ellos el patrón más frecuente es el callo, el cual es un estado de diferenciación particular caracterizado por una activa división celular (82). Con anterioridad se pensaba que el callo era un tejido desdiferenciado, pero ahora con base en algunas caracterizaciones bioquímicas y moleculares es claro que representa un estado de diferenciación particular, probablemente más cercano al de las células meristemáticas.

El callo es producido en forma natural como una respuesta a daño en la planta, usualmente este tejido persiste por poco tiempo ya que es infiltrado por sustancias fenólicas que ayudan a cerrar la herida (82). Este tejido se puede mantener indefinidamente si una vez formado se separa de la planta y se pone a cultivar en presencia de una relación de hormonas tal que promueva la división celular. Sin embargo, una herida mecánica no es un requisito previo para la formación de un callo, éste puede ser iniciado a partir de diferentes estructuras como son semillas, hojas, tallos, etc. si estas son puestas en contacto con inductores de crecimiento (auxinas). Para la inducción de un callo *in vitro* se usan medios que suministran los micro nutrientes y macro nutrientes esenciales además de vitaminas y hormonas vegetales, tanto la cantidad como la calidad de cada uno de ellos depende del sistema vegetal del que se trate. La formación de un callo requiere que sean superados los factores de diferenciación endógena dados por el gradiente de hormonas dentro de la planta (65) y por el contacto célula-célula. Por lo que usualmente se utilizan pequeños explantes que son puestos en contacto con un medio artificial que suministra un medio hormonal diferente al del tejido inicial.

Un callo puede ser mantenido *in vitro* por largos periodos en continua proliferación. En algunas especies a partir de este tejido, aparentemente desorganizado, es posible obtener diferenciación y/o regeneración cuando se le pone en contacto con un medio adecuado (56). Otro aspecto importante de un tejido de esta naturaleza es que, a pesar de que pierde la mayoría de las características del tejido que le dió origen, conserva características básicas de una célula vegetal. Dado su rápida división celular y fácil manipulación el callo es un sistema muy atractivo para estudios de aspectos básicos de la biología molecular y fisiología vegetal. Finalmente, los callos son una fuente a partir de la cual es posible obtener gran cantidad de protoplastos usados para métodos de transformación directa.

A pesar de las ventajas antes enumeradas existen problemas intrínsecos de los cultivos vegetales. En algunas especies el cultivo establecido pierde su capacidad de diferenciación después de periodos prolongados de cultivo. Este hecho parece deberse principalmente a la acumulación de mutaciones espontáneas en las células que forman el callo, las cuales pierden su totipotencialidad. En algunos casos esta pérdida es aparente y la capacidad de regeneración de este cultivo puede ser revertida si se cambia a un medio con diferente balance hormonal (71) que promueve que otras células del callo activen su estado de diferenciación. Otro aspecto importante es que existe una alta frecuencia de mutación en las células del

cultivo, a lo que se conoce como variación somaclonal. Hasta el momento no se conoce a ciencia cierta la causa de la variación somaclonal pero se sugiere que la rápida división celular en estos tejidos pudiera ser un factor importante para su origen. La variación somaclonal puede ser una desventaja, en el caso de que se quiera mantener un fenotipo estable, pero también puede resultar en una ventaja para la generación de nuevos fenotipos (20).

Cultivo en Suspensión y Producción de Protoplastos

Una modalidad del cultivo de tejidos es la posibilidad de que éstos sean crecidos en un medio líquido y con agitación continua en las que las células vegetales proliferan en pequeños cúmulos capaces de ser pipeteados (3). Bajo estas condiciones se promueve la separación celular y las células se encuentran en íntimo contacto con el medio de cultivo. Los cultivos en suspensión, en forma equivalente a un cultivo bacteriano, presentan diferentes fases de crecimiento: una fase lag; durante la cual los cultivos se adaptan al medio de crecimiento y por lo tanto existen pocas divisiones celulares; una fase exponencial durante la cual existe una división celular activa y finalmente, una fase estacionaria en la que la división celular se detiene por la depleción de un nutriente, usualmente nitrógeno.

Una de las grandes ventajas de los cultivos en suspensión es que dado que las células se encuentran prácticamente disgregadas y en crecimiento activo, son excelente fuentes para la producción de protoplastos. Como se describió anteriormente la mayoría de los métodos de transformación directa requieren de la producción y aislamiento de protoplastos, que son células a las que se les ha removido la pared celular (3). La remoción de la pared celular puede ser lograda por métodos mecánicos o enzimáticos. Los métodos mecánicos fueron los primeros métodos para aislar protoplastos, sin embargo en la actualidad son usados en muy raras ocasiones ya que son muy laboriosos y el rendimiento que se obtiene es generalmente muy bajo. Este método consiste en plasmolisar a las células de tal manera que los protoplastos se separen de la pared, después a través de cortes finos se liberan aquellos protoplastos que quedan intactos. El segundo método, que se usa hoy en día, consiste en la incubación de las células vegetales en presencia de enzimas que sean capaces de degradar la pared celular por lo que la pared es removida y el protoplasto liberado. Los

protoplastos generados se separan de los restos celulares, de células no digeridas y de las enzimas usadas a través de centrifugaciones diferenciales o incluso con el uso de gradientes de sacarosa o percol. El tipo y cantidad de enzimas proteolíticas que son utilizadas dependen de la composición de la pared celular. La pared de las células vegetales contiene en su mayoría un alta proporción de polisacáridos dentro de los que se encuentran, la celulosa, la hemicelulosa, la pectina y en algunos casos polisacáridos menos comunes como la callosa. El tipo y proporción de estos polisacáridos varía entre las diferentes especies vegetales y aún durante el desarrollo y diferenciación de una célula dentro de una misma especie. La posibilidad de digerir la pared celular para la producción de protoplastos depende del uso de enzimas capaces de digerir la composición estructural de la pared de que se trate. Es imposible actualmente establecer reglas generales para la producción de protoplastos, pues depende del tipo de planta que se esté trabajando así como de su estado fisiológico. En la actualidad existen una buena cantidad de preparaciones enzimáticas comerciales para la producción de protoplastos. Sin embargo, en algunos casos estas preparaciones son extractos semicrudos de hongos por lo que pueden estar contaminadas con otro tipo de enzimas como proteasas, nucleasas, lipasas, etc. Estos contaminantes tienen un efecto tóxico para los protoplastos por lo que generalmente se trata de dar tiempos de incubación corta para la remoción de la pared. Una vez que la pared celular ha sido removida los protoplastos requieren mantenerse en un medio isosmótico para evitar que se lisen.

La producción de protoplastos ha sido una herramienta muy importante para múltiples aplicaciones dentro de las que destacan: el estudio de algunos fenómenos fisiológicos; estudios de síntesis de RNA, DNA o proteínas; el aislamiento de componentes celulares (mitocondrias, plasmodesmatas, etc) (33); la generación de híbridos (2, 3) o cfridos (8) somáticos a través de fusiones de protoplastos de diferentes orígenes y el desarrollo de métodos de transformación en plantas, para estudios de algunos aspectos de regulación en plantas.

Expresión genética en plantas superiores

En esta sección trataré de incluir algunas generalidades de los dos modelos de regulación que se presentan en el trabajo. En ambos casos se incluirán solo aspectos que sean importantes para la presentación de los resultados y la discusión.

Uno de niveles de regulación que han sido más estudiados a nivel molecular es el transcripcional. Dentro de la unidad de transcripción existen una serie de elementos que modulan conjuntamente los niveles de expresión de un gen; la región 5', que comprende al promotor y elementos regulatorios y la región 3'. De estas dos regiones la que a sido más extensamente estudiada en plantas es la región 5' especialmente aquellas secuencias involucradas en la activación tejido específica. Existen otras regiones importantes de ser caracterizadas, por ejemplo aquellas que reponden a señales medio ambientales. En contraste a la gran cantidad de estudios a nivel transcripcional que se han realizado, los que se ha hecho de la regulación post transcripcional en plantas son limitados. Esto probablemente se debe a que este nivel de regulación presenta serias dificultades técnicas, ya que usualmente involucra cuantificar la vida media de los diferentes mensajeros. Recientemente la innovación de nuevas técnicas de biología molecular (análisis de transcritos nacientes, protección de RNA, etc.) la utilización de experimentos transitorios permiten conocer la expresión de RNA en tiempos muy cortos para evaluar su vida media.

Modificaciones de la unidad transcripcional

Se ha visto que dentro de la unidad transcripcional tanto la región 5' no traducida del RNA como la región 3', regulan la vida media del mensajero y su eficiencia de traducción. En el caso del líder no traducido, los estudios realizados en plantas, han mostrado que existen secuencias que pueden modificar post transcripcionalmente los niveles de expresión de un gen. Por ejemplo, Gallie *et al.* (29), han demostrado que la secuencia líder derivada del virus del mosaico del tabaco (TMV), a la cual le denominó Ω , es capaz de aumentar los niveles de expresión de un gen en animales y vegetales en expresión transitoria e incluso en procariotes (30). Se ha propuesto que este aumento se debe a que esta secuencia promueve una traducción más eficiente del RNA que la porta, por lo que en algunos casos se le denomina aumentador traduccional. Aunque por el momento no se sabe a ciencia cierta como el RNA que lleva esta secuencia es preferencialmente traducido, se sabe que es estrictamente necesario que Ω se encuentre en el extremo 5' del RNA, lo que sugiere que el ribosoma tiene un contacto directo con Ω . Secuencias similares de otros virus son capaces de aumentar el nivel de expresión de genes (38).

Se ha reportado que la presencia de intrones aumenta los niveles de expresión tanto en células en cultivo de animales (9) como en vegetales (60, 80). En el caso particular de vegetales estudios con

monocotiledóneas mostraron que la expresión obtenida utilizando el promotor fuerte 35S, del virus del mosaico de la coliflor fusionado al gen de acetil transferasa de cloranfenicol era de 2 a 8 veces mayor cuando se introducía en el líder no traducido el primer intron del gen de deshidrogenasa alcohólica (*Adh1*) (10). Posteriormente estos resultados han sido confirmados con diferentes intrones (49). En dicotiledóneas no existe aún un trabajo en detalle que confirme el efecto de intrones y los reportes hasta el momento son contradictorios. Dean *et al.* analizando tabacos transgénicos, encuentra que los niveles de expresión de dos genes de la subunidad chica de la ribulosa bifosfato carboxilasa de petunia, disminuyen alrededor de cinco veces si se les remueve sus tres intrones naturales (16). En contraste ha estos resultados, Kuhlmeier *et al.* encuentra en tabacos transgénicos los mismos niveles de expresión del gene para la subunidad pequeña de rubisco proveniente de chícharo con o sin intrones (45).

Generalidades de la glutamina sintetasa de plantas superiores.

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima central en el metabolismo nitrogenado, ya que es el primer paso de la asimilación de amonio de plantas superiores. Esta enzima en combinación con la glutamato sintasa catalizan la biosíntesis de glutamina y glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato. Tanto la glutamina como el glutamato producidos por este ciclo son usados posteriormente para sintetizar todos los otros compuestos nitrogenados que la planta requiere. Usualmente el amonio intracelular proviene del nitrato presente en el suelo, que es la forma nitrogenada más abundante en el suelo. Sin embargo, en el caso específico de las leguminosas este amonio proviene predominantemente de la fijación de nitrógeno atmosférico a través de los nódulos de la raíz (59).

La GS de plantas superiores es un octámero con un peso molecular aproximado de 35-40 Kd (72). Ha sido reportada la existencia de más de una isoenzima denominadas GS1 y GS2, localizadas en el citosol y en el cloroplasto respectivamente (53). El monómero de la isoforma citosólica presenta, en el caso particular de frijol, por lo menos tres variantes isoelectrónicas de aproximadamente 43 Kd que se encuentran en diferentes proporciones en los tejidos vegetales. Cada una de estas variantes esta codificada por genes distintos pero relacionados (familia multigénica), expresados diferencialmente durante el desarrollo en forma tejido específica como se resume en la Figura 3. Actualmente en el caso de frijol, se han clonado y

secuenciado la mayor parte de estos genes y se han realizado estudios a nivel de RNA para conocer el patrón de expresión de cada uno de ellos así como para identificar sus posibles regiones regulatorias. De esta manera se sabe que el gene que codifica para la subunidad α ($gln-\alpha$) es expresado durante etapas tempranas del desarrollo y en la planta adulta se encuentra preferencialmente en las células meristemáticas de la raíz (61). En contraste $gln-\beta$ es la forma más abundante en raíz aunque también se le encuentra en hoja o nódulos como se ve en la Figura 3. Finalmente, $gln-\gamma$ es expresado mayoritariamente en nódulo por lo que por mucho tiempo se le consideró un gen nódulo específico (nodulina), pero recientemente se ha comprobado que este gen también se transcribe en otros tejidos (4).

La actividad de GS está presente en todos los órganos de la planta pero en la mayoría de ellos, su síntesis no ha sido rigurosamente estudiada. Estudios a nivel molecular son fundamentales para entender los múltiples factores que regulan la expresión de esta enzima en plantas superiores. La mayor parte de los estudios realizados en frijol, se han concentrado en la expresión diferencial del gen $gln-\gamma$ debido a que su expresión en el nódulo es muy elevada. Se sabe que se requiere una cierta diferenciación del nódulo para la expresión de este gen, aunque se conoce poco de las señales involucradas en promover dicha expresión. Al parecer la expresión del gen $gln-\gamma$ no requiere de que se fije nitrógeno (62), ya que mutantes de rhizobium en los genes involucrados en la fijación de nitrógeno son capaces de expresar este gen. En otras leguminosas, también existen genes inducibles durante la diferenciación del nódulo y de igual manera las señales involucradas en su transcripción se desconocen (22). Es interesante hacer notar que Dun *et al.* (18) han sugerido que el gene bacteriano *ntrA* puede estar involucrado en la inducción de uno de los genes de GS nódulo específico de alfalfa, ya que mutantes *ntrA*⁻ tienen disminuida su expresión.

En el caso de los genes citosólicos $gln-\beta$ y $gln-\alpha$, como en el del gen plastídico ($gln-\delta$), también se sabe que existen cambios en los niveles de expresión dependientes del tejido y del estado de desarrollo (61, 77). Sin embargo en estos casos, es aún menos claro los mecanismos y los factores involucrados en su regulación.

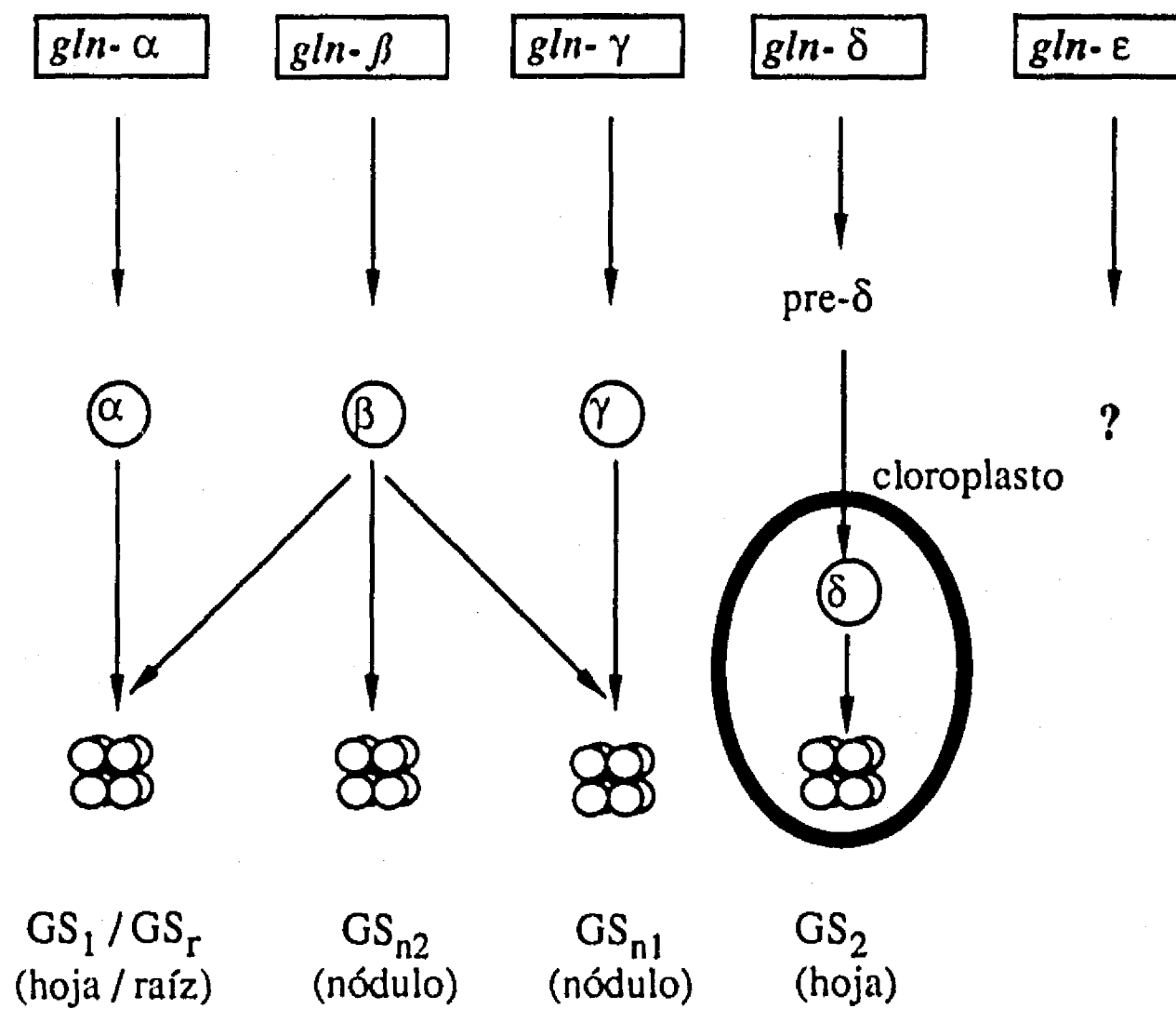
Recientemente han sido clonadas los tres genes citosólicos provenientes de *P. vulgaris* y se ha iniciado el análisis de la región de control para los genes $gln-\beta$ y $gln-\gamma$, usando un sistema heterólogo (23). En este sistema utilizando la región 5' tanto el gen $gln-\beta$ como $gln-\gamma$ se ha encontrado que cada uno de

ellos se expresan en zonas específicas nódulo. El gen *gln-γ* se encuentra exclusivamente en la zona central del nódulo que es la zona en la que se lleva a cabo la asimilación del nitrógeno producido por la fijación de nitrógeno. En contraste el gen *gln-β* parece expresarse en la región periférica del nódulo. A partir de estos estudios será posible el poder comprender algunos de los factores involucrados en la expresión tejida específica de GS.

Uno de los factores propuesto que pudiera regular la expresión de los genes de GS es la disponibilidad de la fuente nitrogenada. En plantas superiores las fuentes nitrogenadas dependen fuertemente de parámetros medio ambientales. Por ejemplo, el nitrógeno puede provenir ya sea de amonio o de nitrato o bien en el caso de las leguminosas a partir de N_2 . Esto determina las vías por las cuales el amonio será sintetizado, ya sea vía nitrato/nitrito reductasas o a través de las enzimas de fijación de nitrógeno. Por otra parte el aporte de esqueletos de carbono varía de acuerdo a la eficiencia fotosintética la cual a su vez depende de la luz, temperatura e incluso de la presencia de patógenos de la planta. En procariotes existe una estricta regulación sobre la expresión y actividad de GS dependiendo de la cantidad y la calidad de la fuente nitrogenada. En plantas superiores este circuito regulatorio se encuentra en discusión. Hirel *et al.* (37) han sugerido que en soya, la expresión de los genes citosólicos de GS parecen responder a la disponibilidad de NH_4^+ . Recientemente estos resultados han sido analizados y cuantificados en lotus transformados con la región regulatoria del gen nódulo específico de soya. En esta planta transgénica puede observarse que la expresión del gen reportero de β-galactosidasa, varía dependiendo de la cantidad de amonio, por lo que estos autores concluyen que el amonio directamente regula los niveles de expresión de este gen (52). A diferencia de la regulación en procariotes la transcripción de la GS de plantas pareciera inducirse al aumentar la cantidad de nitrógeno. En oposición a éstos resultados, Forde y Cullimore, utilizando experimentos de protección de RNA, concluyen que en frijol el aumento de amonio no parece ser el efector directo de la inducción de GS en el nódulo (22). Es óbvio que un trabajo más exhaustivo en éste aspecto es necesario para poder explicar las diferencias encontradas en estas dos diferentes especies.

Figura 3

Control genético de las isoformas de GS en *P. vulgaris*



Este diagrama muestra el modelo actual para la biosíntesis de las isoformas de GS en raíz, hoja y nódulo. La GS cloroplástica es también sintetizada en niveles bajos en el nódulo. Este diagrama se obtuvo del trabajo publicado por Forde y Cullimore (22)

Objetivo

El interés principal de este trabajo consiste en implementar un sistema de expresión transitoria que pueda ser usado para estudios de regulación en *Phaseolus vulgaris*. La finalidad que se persigue con ello es la de tratar de incrementar el número de estudios a nivel básico en esta especie, que de otra manera se encontrarían en espera de un método eficiente de generación de organismos transgénicos.

Aunque se consideraron varias alternativas con este fin, se decidió concretamente optimizar las condiciones de transformación utilizando células en suspensión y posteriormente tratar de aplicar este sistema para iniciar estudios de regulación. Los objetivos generales de este trabajo se detallan a continuación seguidos por algunos objetivos específicos:

1.- Establecer un sistema de células en cultivo de *P. vulgaris*, así como las condiciones de la producción de protoplastos susceptible de transformación por medios directos.

- Optimizar las condiciones para la producción de protoplastos derivados del cultivo en suspensión
- Optimizar algunos parámetros de transformación directa por dos métodos de transformación que son: vía polietilenglicol (PEG) o vía electroporación, valorando tanto los niveles de expresión transitoria como su viabilidad celular.

2.- Utilizar la expresión transitoria para el estudio de la regulación de la expresión genética en *P. vulgaris*.

- Analizar el efecto causado por la modificación de la región líder no traducida de un gen reportero en frijol.
- Analizar la expresión de la enzima glutamina sintetasa (GS) endógena y a través de estudios transitorios en diferentes condiciones nitrogenadas.

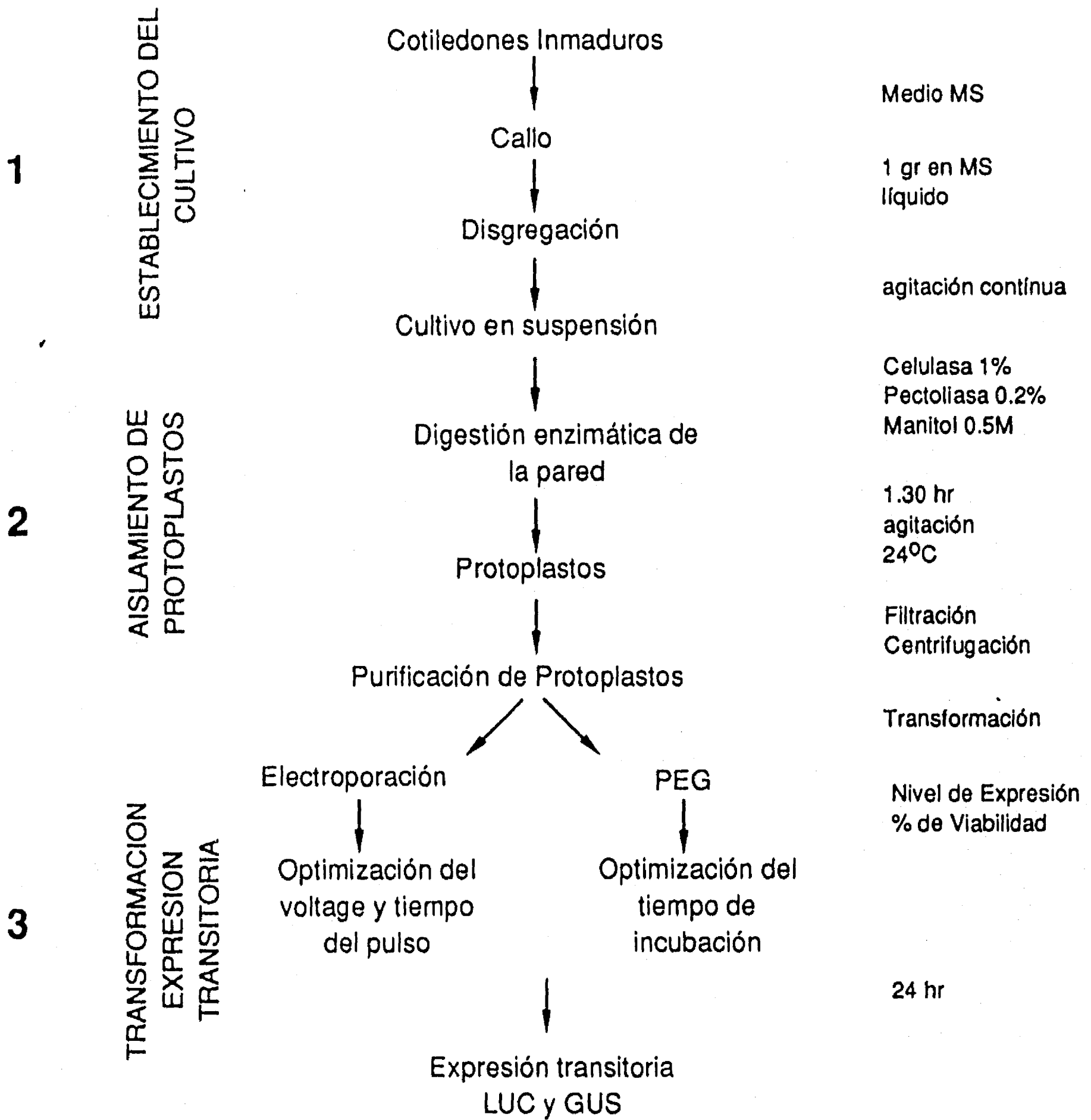
Resultados

El desarrollo de este trabajo puede dividirse en dos etapas. Durante la primera se estableció una línea de cultivo de *P. vulgaris* y se determinaron las condiciones óptimas para obtener expresión transitoria en estas células. En la segunda, se tomaron dos modelos sobre los que se han hecho algunos estudios de regulación de la expresión genética utilizando estudios transitorios. Específicamente se modificó el líder no traducido del gene reportero de luciferasa y la región del gen *gln-β* de GS.

Establecimiento del cultivo en suspensión y expresión transitoria en *P. vulgaris*

La mayor parte de los resultados de ésta primera etapa y parte de la segunda se describen en el artículo que se incluye en esta tesis. Un resumen de estos resultados que ilustra el procedimiento seguido para el establecimiento y transformación de frijol, se muestran en la Figura 3. A continuación del artículo, se describen algunos resultados que no se incluyen en él.

Esquema general de Transformación de *P. vulgaris*



Running title: Transient gene expression in *Phaseolus vulgaris*

Corresponding author: Virginia Walbot

Department of Biological Sciences

Stanford University

Stanford, CA 94305-5020

Telephone: 415-723-2227

Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture¹

Manuscript received _____

Revised manuscript received _____

Patricia Leon, Frederique Planckaert² and Virginia Walbot*

Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal, Universidad Nacional Autónoma de México Apdo Postal 565-A, Cuernavaca Morelos México and *Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA 94305-5020.

¹This work was supported support by the Rockefeller Foundation and DGAPA Grant from the National University of México.

² Present address: 17 rue Bandeliere, Fleville, 54710 France

ABSTRACT

A cell suspension culture of *Phaseolus vulgaris* cv Negro jamapa was established. Protoplasts isolated from this culture are suitable for transient gene expression studies after DNA transfer by either electroporation or treatment with polyethylene glycol. The optimized conditions for both methods were established, taking into consideration expression and cell viability. We have investigated two features of post-transcriptional gene regulation. We demonstrate that inclusion of the RNA leader sequence, omega (Ω), derived from tobacco mosaic virus (TMV), and a dicot intron in the leader region together enhance gene expression in this legume species about 10-fold.

Several methods have been developed to transfer DNA into plant protoplasts. In the legume family, both electroporation and polyethylene glycol (PEG) gene transfer (18) have been successfully used for transient expression and to stably transform protoplasts from soybean (3) and moth bean (14). In the case of *Phaseolus vulgaris*, no stable transformation and regeneration method is available, and the level of transient gene expression reported by Dron *et al.* (8) is very low. In this paper we report the establishment of a rapidly growing suspension culture of *P. vulgaris* as well as the conditions required for a high level of transient gene expression using constructs containing the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter.

Because one of our objectives is to obtain a high level of expression in beans, we have tested the effect of including sequences reported to stimulate gene expression in other species. For instance, introns have been shown to increase the levels of gene expression in both mammalian cell cultures (1) and in plant cells (2). Several reports have corroborated this finding using different introns from monocot genes, however, there are few reports on this 'intron enhancement' phenomenon in dicot species. Dean *et al.* (6) analyzed two differentially expressed *rbcS* genes of petunia in transgenic tobacco plants. They demonstrated that removal of all three intron sequences from the highly expressed gene resulted in a 5-fold decrease in steady state mRNA levels. The intron enhancement effect appears to be mediated by post-transcriptional steps rather than the presence of a transcriptional enhancer within the intron sequences, because all introns tested provide some enhancement (2).

Gallie *et al.* (9) have shown that the 67 bp leader sequence, Ω , derived from tobacco mosaic virus (TMV), stimulates gene expression in animals, plants and bacteria. The proposed mechanism is that Ω promotes preferential translation. Similarly, the leader sequence of bromo mosaic virus (12) acts as a translational enhancer. We have tested the impact of introns and the Ω leader on gene expression. We show that even though the use of a monocot intron did not increase expression, inclusion of a dicot intron and the Ω leader sequence enhanced expression up to 10-fold in *Phaseolus vulgaris*.

MATERIALS AND METHODS

Protoplast isolation.

Protoplasts were isolated three days after subculture from cells harvested by centrifugation and resuspended in an equal volume of an enzyme solution prepared by dissolving 1% (w/v) cellulase (CELFB, Worthington Biochemical), 0.2% (w/v) pectinase (Pectolyase Y23, Seishin Pharmaceutical Co.), 0.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma) and 0.05% (v/v) β -mercaptoethanol in a buffer containing 50 mM CaCl_2 , 12 mM sodium acetate and 450 mM mannitol (isolation buffer). After 60 to 90 min of digestion on a rotary shaker (60 rpm), the enzyme-protoplast mixture was filtered successively through a tea strainer, a 200 μm mesh screen and a 60 μm mesh screen; the protoplasts were pelleted by centrifugation at about 500 rpm for 5 min and washed once with the isolation buffer.

DNA transfer.

The isolated protoplasts were resuspended in electroporation buffer (10 mM HEPES, 130 mM potassium chloride, 10 mM sodium chloride, 4 mM calcium chloride and 0.2 M mannitol, pH 7.2) at a concentration of about 1×10^6 protoplasts per ml. Electroporation (X-Cell™ 450 Electroporation System from Promega Biotec) was performed by mixing 0.8 ml of the protoplast suspension, 20 μg of plasmid DNA and 50-100 μg denatured salmon sperm DNA as a carrier. The electrical pulse was delivered from a 1550 μF capacitor charged to the desired voltage for various times as specified for each experiment; the gap between the electrodes was 0.4 cm. Following electroporation, the protoplasts were kept at 4°C for 10 min and then diluted at room temperature with 4 ml of protoplast growth medium containing SH salts (7), 0.5 M mannitol and 20% conditioned medium. To transform bean protoplasts with polyethylene glycol, the method of Shillito *et al.* (18) was used with PEG 4000 (Sigma) in a buffer consisting of 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 0.4 M mannitol. After incubation at room temperature for 5 min (unless indicated), the

protoplasts were diluted carefully with the protoplast growth medium, spun down at 500 X g for 5 min and resuspended in 4 ml of the protoplast growth medium. After transformation the protoplasts were incubated in the dark at 25 °C for 24 h prior to analysis of reporter gene expression.

Assays.

Viability: Viability tests were performed using two methods: methylene blue staining (40 mg/ml in 0.5M mannitol) and fluorescein diacetate (FDA)/propidium iodine (PI) staining. All counting and photographic procedures were completed within 10 min of staining.

Luciferase assay (LUC): The protoplasts were collected by centrifugation (500 x g for 5 min) and resuspended in 400 µl extraction buffer containing 100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 1 mM EDTA and 7 mM β-mercaptoethanol. The protoplasts were disrupted by sonication. 5 to 10 µl of the extract were mixed with 200 µl of assay buffer (25 mM Tricine, pH 7.8, 15 mM MgCl₂ 5 mM ATP, 7 mM β-mercaptoethanol and 0.5 mg/ml BSA). The photons emitted in 10 s were counted in a luminometer (Analytical Luminescence Laboratories, model Monolight 2001). The reaction was started by injecting 100 µl of 0.25 mM luciferin (Analytical Luminescence Laboratories) solution.

β-Glucuronidase assay (GUS): The GUS fluorometric assay was used to determine GUS activity (11). Fluorescence was measured by excitation at 365 nm and emission at 455 nm in a TKO 100 DNA mini-fluorometer (Hoefer Scientific Instruments).

Protein assay: Protein content was determined using a commercial kit (Bio-Rad Protein Assay).

RESULTS and DISCUSSION

P. vulgaris cv Negro jamapa were grown in the greenhouse. Immature cotyledons were harvested 12 to 15 days post-anthesis and used to initiate the cultures. Two media were tested for

their ability to induce and maintain callus cultures: a Gamborg's B5 medium (10) supplemented with 2 mg/l of 2-4 dichlorophenoxyacetic acid (2-4D) and a Shenk and Hildebrant (SH) medium as modified by Dixon and Fuller (7) supplemented with 2mg/l p-chlorophenoxyacetic acid (pCA), 0.4 mg/l 2-4D and 1 mg/l kinetin. Callus formation was observed within a week of placing immature cotyledons on SH medium, in approximately 55% of the cultured cotyledons. When the immature cotyledons were placed on B5, callus formation occurred at a very low frequency (1 to 2% of the cultured cotyledons), and the calli formed degenerated after 2 to 4 weeks. After 6 to 8 weeks, calli maintained on SH medium developed into a more friable callus consisting of two cell types: 1. very elongated and 2. small, densely cytoplasmic cells.

Pieces of the most friable calli (1 to 2 g) were transferred to SH medium in order to establish a cell suspension culture. Initially the suspension contained the same mixed population of cells. To select for a more homogeneous population consisting mainly of small cells, the suspension was filtered through a 500 μm mesh screen when subcultured. After several subcultures, the cell suspension was more homogeneous for the size of the cell clusters, in which about 65% of the cells were small and densely cytoplasmic. The suspension was then subcultured every 5 d with a 1:3 (inoculum:fresh SH medium) dilution. This suspension culture was used for protoplast isolation.

The protoplast isolation and purification procedures described in the Materials and Methods yield clean populations of uninucleated protoplasts; these protoplasts have a dense cytoplasm, vary in size from 40 to 60 μm and are viable based on differential staining. Three concentrations of mannitol (0.3 M, 0.45 M and 0.6 M) were tested to optimize the osmolarity of isolation buffer. Both, yield and viability were optimal when the osmolarity of the isolation buffer was adjusted with 0.45 M mannitol (data not shown). Because both protoplast isolation efficiency and the level of transient gene expression are affected by the culture growth phase, for all experiments the protoplasts were isolated while in exponential growth (3 days after subculture). This time was chosen because protoplast yield was maximal compared to older growth phases where fewer cells became digested.

Optimal transformation conditions with constructs containing the CaMV 35S promoter coupled to the LUC or GUS genes (Fig. 1), were established for both PEG- and electroporation-mediated transformation. In the case of electroporation two parameters, field intensity and pulse length, were optimized. To optimize field intensity, the input voltage was varied keeping the pulse length constant at 12 ms (Fig. 2). This pulse length was chosen because it has been shown to be optimal for maize protoplasts isolated from maize or carrot suspension cultures (J. De Wet and V. Walbot submitted). The LUC and GUS activities were maximal between 450 V/cm and 525 V/cm (Fig. 2A and 2B). At higher voltages, both activities decreased because fewer protoplasts remained alive. A second parameter that can alter electroporation efficiency and transient expression is the discharge time applied to the protoplasts (pulse length). As shown in Figure 2C and 2D, both reporter genes activities are maximal when the electric pulse is applied for 50 msec; longer pulses result in less activity. Protoplast viability was also monitored during this experiment (Fig. 2). The optimized pulse length for both expression and viability is between 12 and 20 msec (Fig. 2C and 2D).

The PEG transformation was performed according to Shillito et al. (18) with some modifications (see Materials and Methods). Both transient expression and viability were measured during different incubation times of the protoplast-DNA mixture in the PEG solution. An incubation time of 5 min was the best compromise between expression and viability (data not shown). A comparison was made of the two transformation methods, carried out with the same protoplasts and plasmid DNA preparation and using optimal conditions for each. In our hands, the optimized PEG transformation could give a higher level of transient gene expression (Table I), but was inherently more variable, therefore, subsequent tests were done with electroporation.

In our attempt to increase transient gene expression in beans, we examined the effects of including sequences affecting post-transcriptional steps in gene expression. The 5' untranslated leader of TMV as well as monocot and dicot introns were inserted into the untranslated leader of the LUC gene. The analysis was done using a basic plasmid construct, pJD300, that contains the LUC gene coupled to the Nos 3' polyadenylation signal from the Ti plasmid of *Agrobacterium*

tumefaciens (Fig.1). The reporter gene is expressed from the CaMV35S promoter. The CaMV fragment used in this experiment extends from -363 to +1 relative to the transcription initiation site. The level of transient gene expression was determined using the optimal electroporation conditions outlined above. Supercoiled DNA was introduced into duplicate protoplast samples in each experiment and assayed for LUC activity after 18 to 24 h of incubation at 25°C (see Materials and Methods). Relative expression levels in transient assays show substantial variability between separate experiments because of differences between cell preparations (20); in bean protoplasts this variability can be up to 25-fold. Because of this variability in protoplast response, an internal control was introduced by co-electroporating a second plasmid carrying the GUS reporter gene. The internal control used was the pCaG plasmid (Fig. 1) that contains the β -glucuronidase gene driven by the CaMV 35S promoter. Table II shows that when the LUC expression levels of the pJD300 plasmid from four independent experiments were normalized with the GUS activity, variability between experiments was reduced to about 2.5-fold.

Inclusion of the TMV Ω sequence (pJD301), which has been reported to enhance translation (9), increased expression in beans about 4-fold compared with pJD300 (Table II). This enhancement is comparable to that reported for tobacco and agrees with the hypothesis that the TMV Ω sequence functions in all dicots.

Enhancement of transient gene expression by the inclusion of various introns in the transcriptional unit has been reported for several monocots (2). Specifically, the maize *Adh1* intron 1 enhances expression when this sequence is placed in the untranslated leader of a reporter gene (2). We were interested to find out if this phenomenon also occurs in bean protoplasts. We used plasmid pJD313 for this purpose; this plasmid contains the TMV Ω sequence and the maize *Adh1* intron 1 inserted upstream of the LUC gene (Fig. 1). The level of LUC transient gene expression was determined in two different experiments. As shown in Table II, the presence of this monocot intron provides no enhancement; rather LUC expression in bean protoplasts is reduced compared to pJD301, a similar plasmid that lacks the intron sequence. We hypothesize that the maize intron is inefficiently spliced in beans and other dicots, hence intron enhancement

would be prevented. In support of this idea, Keith and Chua (13), found that intron 6 of the maize *Adh1* was inefficiently spliced in transgenic tobacco plants. Similarly, *Adh1* intron 1 is inefficiently spliced in tobacco and carrot protoplasts (J. De Wet and V. Walbot, personal communication).

In dicots, inclusion of intron sequences in expression constructs has yielded contradictory results. For example, Dean *et al.* (6) reported that constructs containing the petunia *rbcS* gene with three introns were expressed 5-fold higher than the cDNA versions in transgenic tobacco plants. In this case, however, the enhancement effect was not associated with a particular intron. In contrast, Kuhlmeier *et al.* (16) found similar expression levels from the genomic and a cDNA version of a pea *rbcS* gene in transgenic tobacco plants. To test whether a dicot intron could enhance LUC expression, we obtained the second intron (IVS2) of the ST-LS1 gene from *Solanum tuberosum* to test if it could enhance the expression level of the LUC gene. The IVS2 represents a typical plant intron in being small, in having a high A+T content and in having conserved splice junctions (19). This intron was selected because it has been extensively characterized and because it has been modified by introducing useful restriction sites at both the 5' and 3' splice junctions (19). We made gene constructs in which the IVS2 and 38 bases of 5'-flanking CAT sequences were inserted into the *Sall* site upstream of the LUC gene in pJD301 to create plasmid pID1 (Fig. 1). After splicing, pID1 should yield an mRNA with 118 bases of untranslated leader. In plasmid pID2, 25 bases of the CAT flanking sequences were removed leaving a 93 base untranslated leader.

These intron-containing constructs were transformed into bean protoplasts and LUC expression was analyzed (Table II). Both plasmids stimulated LUC expression 1.5- to 2.5-fold compared to similar constructs without IVS2 (pJD301 vs pID1 and pID2). This demonstrates that inclusion of the IVS2 increases transient gene expression in dicot cells. We did find a difference between expression levels of pID1 and pID2. These plasmids are identical except in the untranslated leader region: pID1 has 25 extra bases of CAT+polylinker sequence. These extra bases in pID1 reduced the intron enhancing effect. Our result likely reflects a difference in the

splicing efficiency of the two transcripts, because the construction of pID2 changed conserved sequences at the 5' exon splice boundary (17). Kozak (15) has shown that stem-loop regions in the leader can reduce expression, however no stable secondary structure is expected in either the pID1 or pID2 leaders.

Successful application of standard genetic engineering procedures to *Phaseolus vulgaris* has been limited by the lack of an efficient transformation method and the inability to reproducibly regenerate plants. Although regeneration of transformed plants is required for studies on tissue-specific gene expression or for the introduction of new traits for agricultural benefit, the possibility of introducing DNA into bean protoplasts to measure transient gene expression allows analysis of factors affecting expression in a homologous system. Several *P. vulgaris* tissue culture lines have been established (4, 7); however, none has been successfully used for transformation. In this work we report the establishment of a suspension culture of *P. vulgaris*. Protoplasts from this culture are capable of a high level of transient gene expression, equivalent to other dicots such as tobacco and carrot. This culture provides a constant source of protoplasts compared to isolation methods using plant tissues. We have generated a new vector that gives high transient gene expression in beans. We propose that this vector, pID2, will be helpful for the study of the expression of homologous genes in *Phaseolus vulgaris*, especially those with low promoter expression. In the future, we plan to analyze the transcripts from this vector and, using additional introns, to study the splicing efficiency and splicing requirements in bean cells.

Acknowledgments - We would like to thank G. Dietrich for her help with the PEG direct transfer technique, M.J. Comejo for her assistance with the viability assays, Dr. Ken Luehrsen for many helpful suggestions and A. Bloom for her assistance with the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Buchman AR, Berg P (1988) Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol. Cell Biol.* 8: 4395-4405
2. Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Devel.* 1: 1183-1200
3. Christou P, Murphy JE, Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3962-3966
4. Crepy L, Barros LMG, Valente VRN (1986) Callus production from leaf protoplasts of various cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 5: 124-126
5. De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737
6. Dean C, Favreau M, Bond-Nutter D, Bedbrook J, Dunsmuir P (1989) Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of *Petunia rbcS* genes. *The Plant Cell* 1: 201-208
7. Dixon RA, Fuller KW (1976) Effects of synthetic auxin levels on phaseolin production and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant Path.* 9: 299-312

8. Dron M, Clouse SD, Dixon RA, Lawton MA, Lamb CJ (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6738-6742
9. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson T-MA (1987) The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucl. Acids Res.* **15**: 3257-3273
10. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158
11. Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405
12. Jobling SA, Gehrke L (1987) Enhanced translation of chimeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* **355**: 622-625
13. Keith B, Chua N-H (1986) Monocot and dicot pre-mRNAs are processed with different efficiencies in transgenic tobacco. *EMBO J.* **5**: 2419-2425
14. Kohler F, Golz C, Eapen S, Kohn H, Schieder O (1987) Stable transformation of moth bean *Vigna aconitifolia* via direct gene transfer. *Plant Cell Rep.* **6**: 313-317
15. Kozak M (1988) Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 283-292

16. Kuhlmeier C, Fluhr R, Chua N-H (1988) Upstream sequences determine the difference in transcript abundance of pea *rbcS* genes. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 405-411
17. Shapiro MB, Senapanthy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucl. Acids Res.* **15**: 7155-7174
18. Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *BioTechnology* **3**: 1099-1103
19. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 245-250
20. Vasil V, Clancy M, Ferl RJ, Vasil IK, Hannah LC (1989) Increased gene expression by the first intron of maize *shrunken-1* locus in grass species. *Plant Physiol.* **91**: 1575-1579

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Plasmids used in this study. All the plasmids listed were constructed in the pUC18 cloning vector. The features of the plasmids are shown in boxes as follows: 35S corresponds to the -363 to +1 CaMV 35S promoter fragment; Luc is the gene coding for the firefly luciferase (5); nos 3' is the polyadenylation signal of the nopaline synthetase gene; the black box is the TMV Ω sequence (9); *Adh1* intron 1 is from the maize *Alcohol dehydrogenase-1* gene (2); intron is IVS2 from the ST-LS gene (19); GUS is the gene encoding β -glucuronidase (11). Major restriction sites are shown in pJD300; only new restriction sites are shown in the other plasmids. The restriction sites are abbreviated as *Bam*HI, B; *Hind*III, H3; *Kpn*I, K; *Nco*I, N; *Pst*I, P; *Sal*I, S; *Sac*I, Sa; *Sna*BI, Sn.

Figure 2. Voltage and pulse length optimization. In A (GUS) and B (LUC), specific activity and the % cell viability is plotted relative to voltage during a 12 ms electroporation. For pulse length optimization, a 450 V/cm field was used. In C (GUS) and D (LUC) the % viability is plotted relative to a variable pulse given in ms. The data are the average of four different experiments. A and C: GUS specific activity given in nmol/min/ μ g of protein $\text{---}\blacksquare\text{---}$. B and D: Luciferase specific activity is given in 10^4 photons/10 s/ μ g protein $\text{---}\blacksquare\text{---}$. The % viability, $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, represents the percentage of living protoplasts compared to the control sample before electroporation.

Table I. Transient expression of *P. vulgaris* obtained using two transformation methods

Transformation method	Plasmid	LUC sp. act./ GUS sp. act. ^a		Fold ^b
		Experiment number		
		1	2	
Electroporation	pJD300	1.5X10 ⁴	2.2x10 ⁴	1.0
PEG	pJD300	2.71X10 ⁴	4.3X10 ⁴	1.8

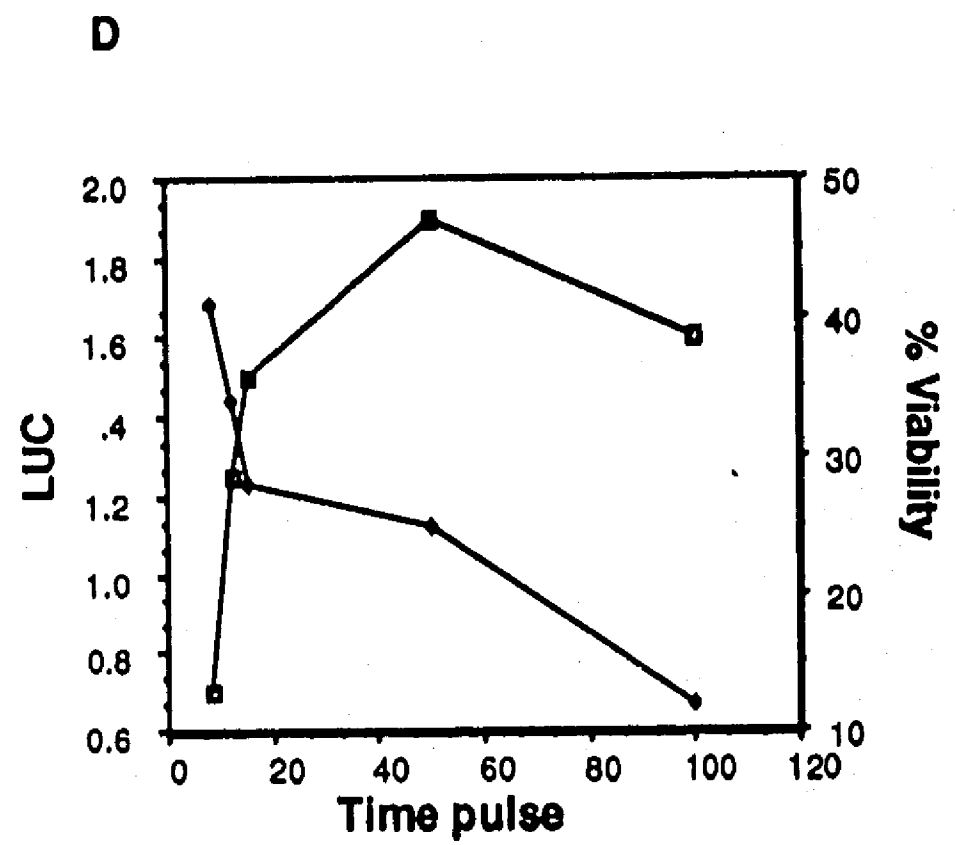
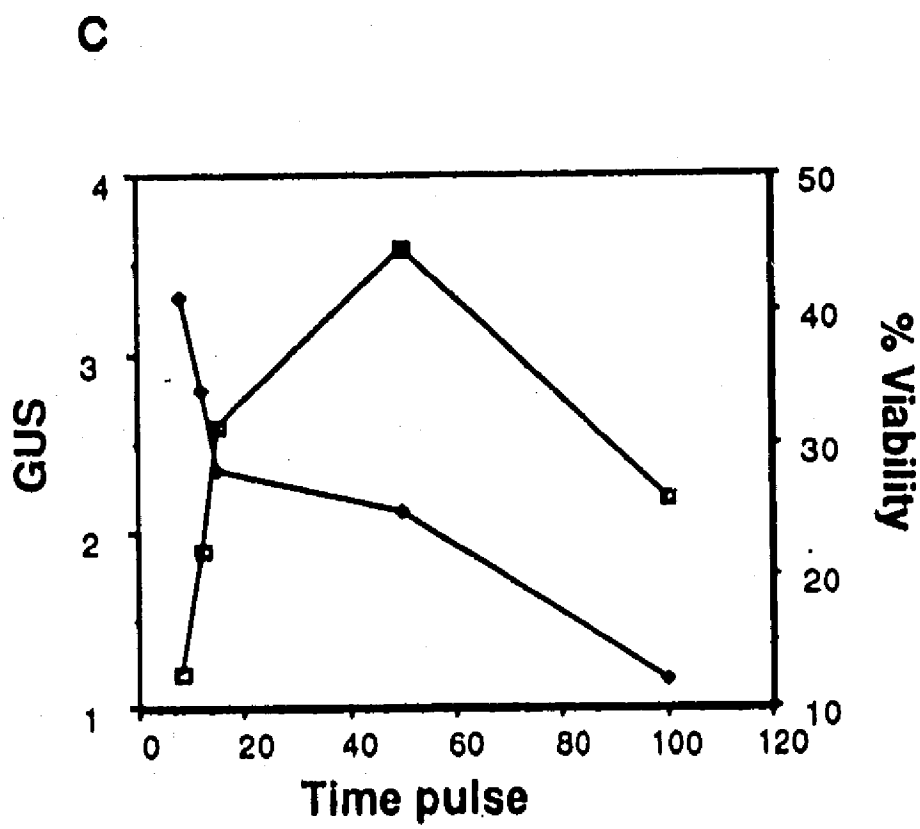
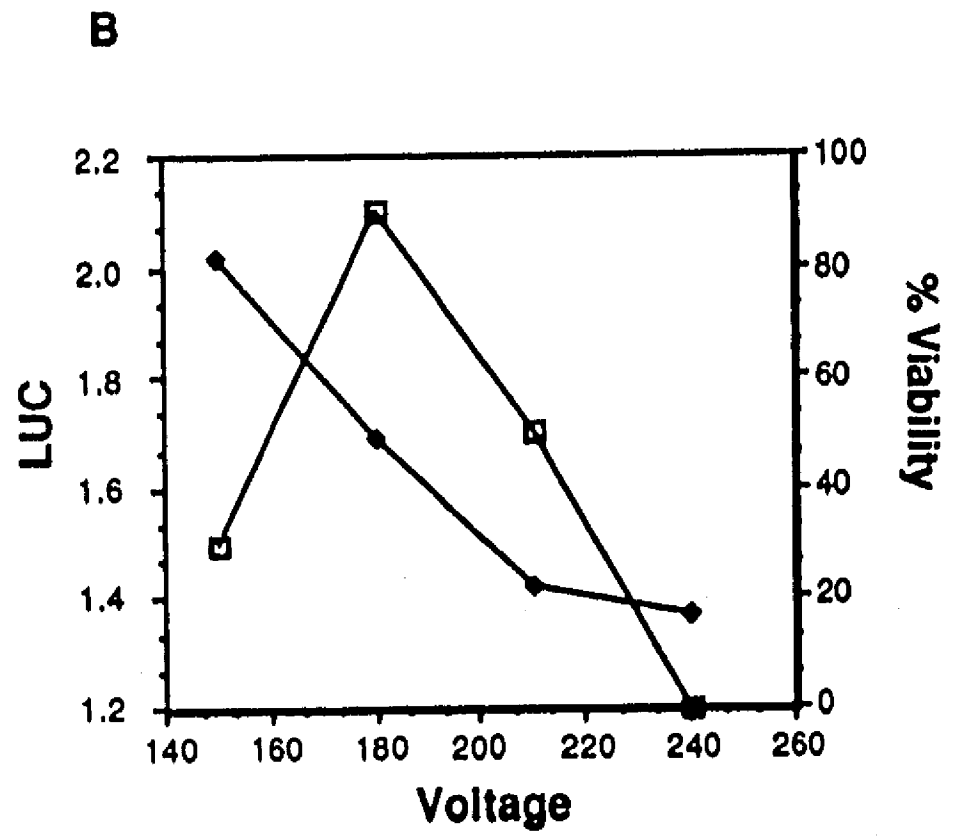
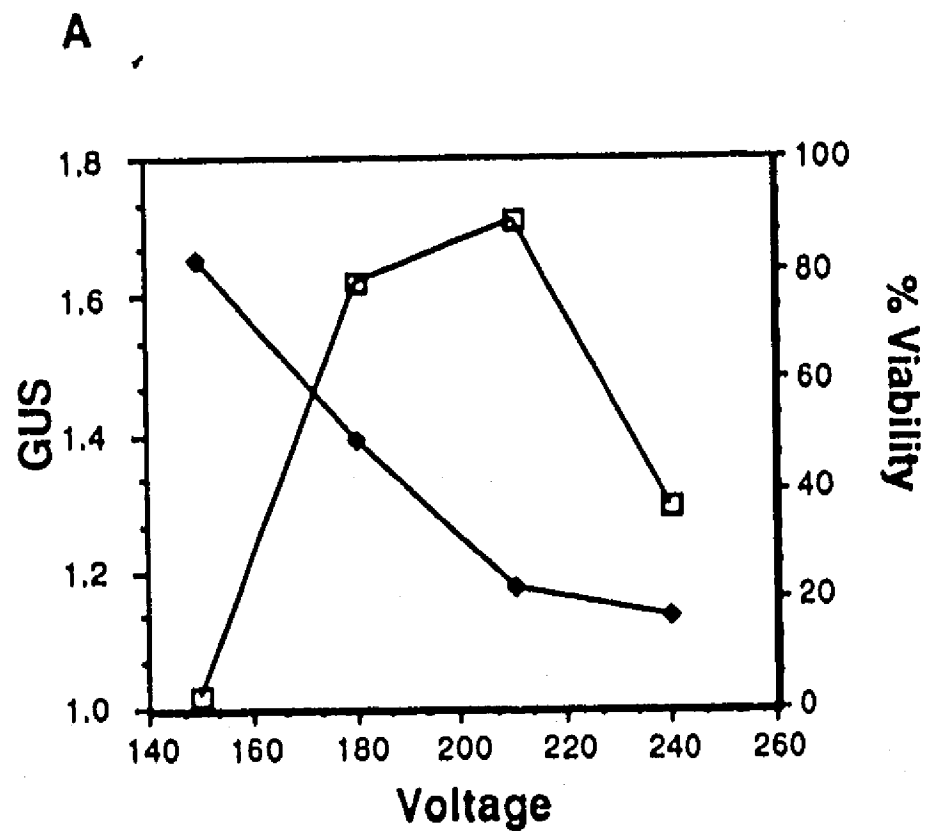
^aExpression is given as LUC sp. activity corrected by GUS sp. activity. LUC sp. activity is the photons per 10 sec per μg of protein; GUS sp. activity is nanomoles of MU per min per μg of protein. ^bFold increase is an average of the difference in expression found between the two methods.

Table II. Effect of TMV Ω and intron sequences in the level of luciferase transient gene expression

Plasmid	LUC sp. act./ GUS sp. act. ^a					Increment relative to pJD300
	Experiment number					
	1	2	3	4	5	
pJD300	1.5X10 ⁴	2.2X10 ⁴	1.0x10 ⁴	1.3X10 ⁴	0.9X10 ⁴	1.0
pJD301	3.0X10 ⁴	7.5X10 ⁴	3.7X10 ⁴	5.0X10 ⁴	6.0X10 ⁴	3.7
pJD313	1.4X10 ⁴	2.5X10 ⁴	—	—	—	1.4
pID1'	—	—	7.8X10 ⁴	8.8X10 ⁴	8.0X10 ⁴	5.9
pID2	—	—	—	10.7X10 ⁴	13.0X10 ⁴	10.8

^aLUC sp. act. is given in photons per 10 sec per μ g of protein; GUS sp. act. is the nmols of MU per min per μ g of protein

Plasmid name	Construction
pJD300	
pJD301	
pJD313	
pID1	
pID2	
pCaG	



1.-Optimización de la osmolaridad del medios de aislamiento de protoplastos

Uno de los parámetros que fueron optimizados para la producción de protoplastos del cultivo de Negro jamapa fué la osmolaridad del medio de aislamiento. Dado que las células sin pared celular requieren de encontrarse en un medio isosmótico para conservar su turgor, fué necesario probar diferentes osmolaridades. La osmolaridad óptima se estableció a través de cuantificar la viabilidad de los protoplastos aislados bajo diferentes condiciones. La viabilidad obtenida se muestra en la Tabla 2. A partir de estos resultados se estableció que la osmolaridad óptima se obtiene con una solución 0.5 M de manitol.

Tabla 2

Optimización de la Osmolaridad de los Protoplastos

Osmolaridad del Buffer de Digestión (Manitol)	Número de Protoplastos ^a
0.30 M	2.7X10 ⁶
0.45 M	5.7X10 ⁶
0.55 M	6.4X10 ⁶

^a El número de protoplastos es el resultado de tres experimentos separados

2.- Transformación con Polietilenglicol.

Otro de los métodos comúnmente utilizados para realizar estudios transitorios es la transformación con polietilenglicol. El protocolo de transformación usado fué esencialmente el de Shillito *et al.* (70) con algunas modificaciones. En este caso los protoplastos aislados se incubaron con 20 µg del DNA con el que se desea transformar y 50 µg de DNA de esperma de salmón en buffer CMS (40% PEG, 0.1M Ca (NO₃)₂ y

0.4M manitol). Después de incubar ésta mezcla a temperatura ambiente, los protoplastos se diluyeron cuidadosamente con el medio de crecimiento de protoplastos (PIM), se centrifugaron para remover el PEG y finalmente se resuspendieron en 4 ml del medio de crecimiento de protoplastos. Se optimizó el tiempo de coincubación DNA-protoplastos con el PEG para lo cual, fueron cuantificados el % de viabilidad y la actividad de dos genes reporteros a diferentes tiempos de incubación. Un promedio de tales resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Optimización de la Transformación con PEG^a

Tiempo	Act. Sp de LUC mM/10s/ μ g	Act. Sp de GUS mM/min/ μ g	% Viabilidad
2	1.8×10^4	3.4	73
5	4.5×10^4	3.6	70
10	5.0×10^4	7.0	50
15	3.3×10^4	7.1	38
30	3.0×10^4	5.7	10

^a Los resultados son el promedio de cuatro curvas

El tiempo óptimo tanto para la viabilidad como para el nivel de expresión se encuentra con una incubación de 5 a 10 min. Tiempos mayores tienen una considerable disminución del % de viabilidad que se obtiene. Esto es especialmente importante para casos en los que se requiera transformación estable. Como se puede ver en la Tabla 1 del artículo, los niveles de expresión que se obtienen con este método son

mayores que en el caso de electroporación. Sin embargo, es importante remarcar que en el caso de la optimización del tiempo de incubación con PEG se obtuvo una variabilidad mucho mayor que en el caso de la electroporación. Creemos que esta variabilidad se debe principalmente a que el método de PEG requiere de una mayor manipulación que el de electroporación, y que esto puede alterar la integridad de los protoplastos antes de la transformación.

Estudios transitorios de la regulación de la expresión genética

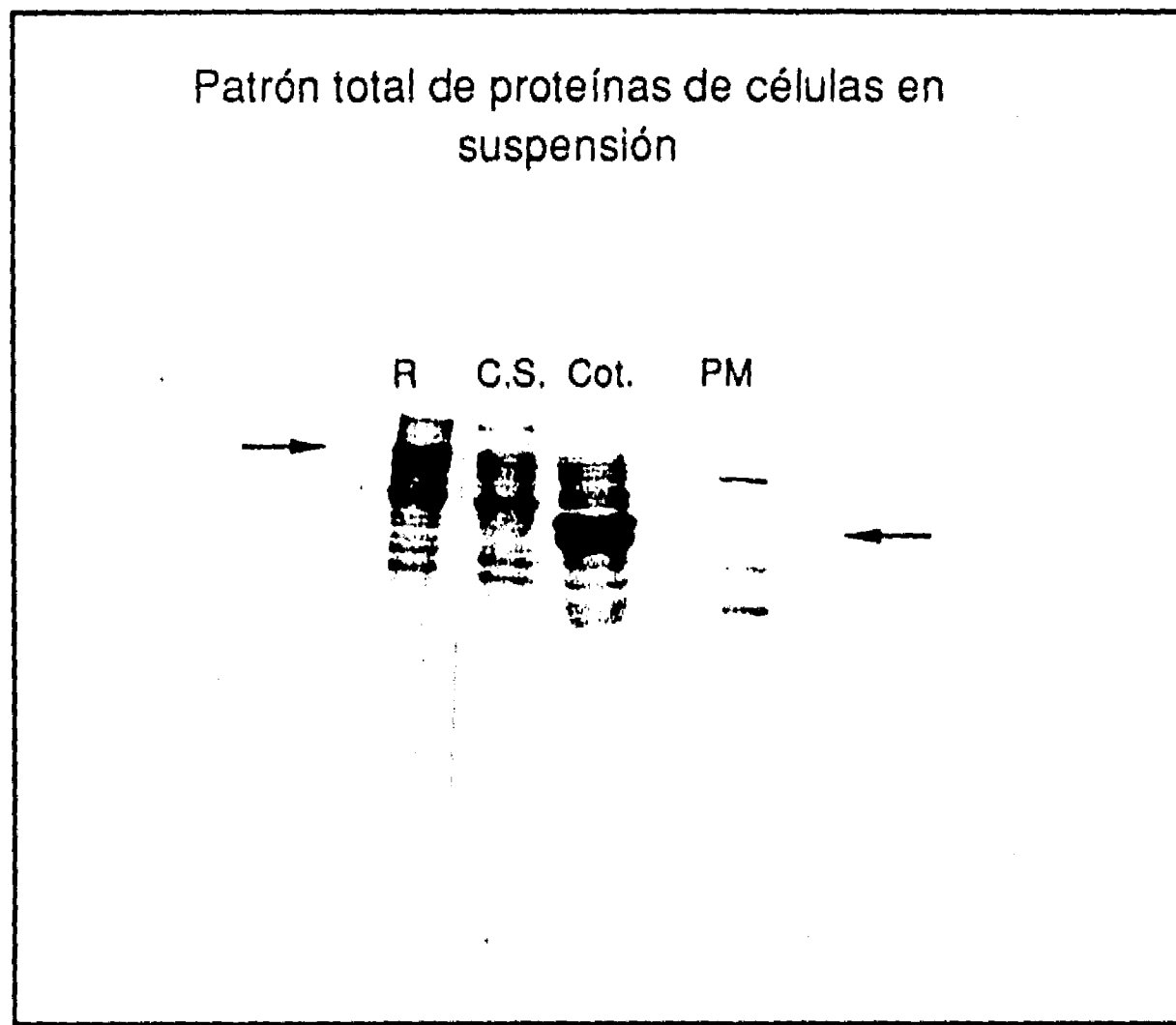
3.-Importancia del líder no traducido en la expresión de un gen en *P. vulgaris*

En este trabajo nos hemos concentrado en el efecto de la modificación del líder no traducido como modelo de estudio, utilizado el gen de luciferasa (proveniente de luciémaga) como marcador. Este gen se expresa a partir de un promotor fuerte en plantas superiores, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Se estudiaron dos modificaciones dentro del líder no traducido; la introducción del aumentador traduccional omega (Ω) y la de un intrón de monocotiledóneas y de dicotiledóneas.

Los resultados obtenidos para ambas modificaciones se muestran en la Tabla II del artículo anexo. Como puede verse ambas modificaciones tienen una repercusión en el nivel de expresión del gen de LUC. En el caso de la introducción de Ω en el líder, este es capaz de promover un aumento de alrededor de 4 veces en la expresión de LUC. El resultado obtenido con la introducción de Ω , es semejante a lo que se ha obtenido con otras dicotiledóneas. A pesar de que el efecto de Ω ha sido reportado en otras dicotiledóneas, en fíjol era interesante conocer los niveles de inducción ya que conjuntamente con la introducción del intrón se cuenta con un vector en el que será posible estudiar expresión aún cuando el promotor del gen en estudio sea muy débil.

En el caso de la introducción de un intrón, los resultados obtenidos indican que el intrón procedente de una dicotiledónea (IV2) es capaz de promover un aumento de alrededor de 2 a 2.5 veces en el nivel de expresión transitoria del gen de Luc. En contraste, el intrón proveniente de una monocotiledónea tiene un efecto negativo en el nivel de expresión (Tabla II del artículo) este hecho probablemente se deba a que este intrón no es procesado eficientemente en células de dicotiledóneas, al igual que ha sido reportado para este gene en plantas de tabaco (39).

Figura 5



Patrón total de proteínas de raíz (R), cultivo en suspensión (C.S) y cotiledones inmaduros (Cot.). PM indica marcadores de peso molecular. Las flechas indican algunas de las diferencias encontradas entre las proteínas de raíz o cotiledones y las de las células en suspensión

4.- Caracterización del cultivo de Negro Jamapa

Con el objeto de tener una idea sobre las características generales del cultivo establecido, se decidió obtener el patrón de proteínas totales de este cultivo y compararlo con diferentes tejidos de *P. vulgaris* cv Negro jamapa. Fueron preparadas proteínas totales de raíz, cotiledones inmaduros y del cultivo en suspensión y corridas en un gel desnaturizante tipo Laemeli. El resultado de tal experimento se muestran en la Figura 5.

El cultivo en suspensión de Negro Jamapa presenta un patrón de proteínas claramente diferente a la del tejido que le dió origen (cotiledones inmaduros), especialmente por la falta de algunas bandas muy abundantes que probablemente representen proteínas de almacenamiento. Es interesante señalar que el patrón de proteínas que se obtiene con el cultivo en suspensión presenta a simple vista alta similitud con el patrón en raíz. No sabemos si este hecho refleje realmente una similitud real a nivel bioquímico, pero concuerda con el hecho de que la organogénesis más frecuente a partir de callos o cultivos vegetales es hacia la formación de raíz.

Glutamino sintetasa como un modelo para el estudio de la expresión genética en cultivos de frijol

Como se describió en la introducción, una de las enzimas que mejor se han caracterizado a nivel molecular en frijol es la glutamino sintetasa. Se sabe que en esta especie existen múltiples genes expresados en forma tejido específica. Actualmente se encuentran clonados y casi totalmente secuenciados las regiones regulatorias de los genes citosólicos β y γ , por lo que este sistema es sumamente atractivo para el estudio de algunos aspectos de su regulación. Se ha hipotetizado que cada uno de los diferentes genes han evolucionado para su óptimo funcionamiento bajo las diferentes condiciones en las que son expresados, especialmente aquellos característicos de nódulo (γ) (46) o de células meristemáticas (61). Este hecho es apoyado ya que recientemente se ha visto que la expresión del gene *gln- γ* en plantas transgénicas, se encuentra en la zona de asimilación del nitrógeno con un patrón de expresión muy específico (23). Por lo tanto se piensa que la planta es capaz de contender con las variaciones en la disponibilidad y cambios en el

requerimiento nitrogenado en los diferentes tejidos al expresar diferentes isoformas. En otros sistemas como en *Escherichia coli*, tanto la transcripción como la actividad de la GS se regula por la disponibilidad de nitrógeno o bien como se ha postulado, dependiendo de la relación a-ceto- glutarato/glutamina en *Escherichia coli*. Como se mencionó en la introducción, en plantas la posibilidad de que la expresión de los genes que codifican para GS sean regulados por la disponibilidad de nitrógeno intracelular, ha sido contradictoria. Creemos que el uso de células en cultivo conjuntamente a estudios transitorios utilizando la región regulatoria del gen de GS bajo diferentes condiciones nitrogenadas puede ser útil para poder responder si la GS es capaz de ser regulada por la disponibilidad de nitrógeno en el caso de frijol. Como primer paso se decidió caracterizar de una manera muy general la expresión endógena de la enzima glutamino sintetasa en el cultivo en suspensión diferentes niveles de nitrógeno para poder posteriormente relacionarlo con los estudios transitorios.

5.- Caracterización de la actividad de la enzima GS en el cultivo en suspensión.

Se decidió medir la actividad de la enzima GS en extractos del cultivo en suspensión y correlacionarla a otros tejidos de la misma variedad de frijol. Se midió la actividad de transferasa de GS para medir esta enzima, para lo cual se hicieron extractos del cultivo, tanto durante diferentes estadios de crecimiento como de diferentes tejidos de frijol (cotiledones inmaduros, el cual es el tejido a partir de donde se originó este cultivo y raíz). El ensayo de transferasa usado es el reportado anteriormente por Ortega *et al.* (61), en este caso se utilizaron 50µl de cada uno de los extractos. Las actividades específicas obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Actividad de glutamino sintetasa de diferentes tejidos de
P. vulgaris vr. Negro Jamapa

Tejido	Act. Esp de transferencia de GS $\mu\text{M min } \mu\text{g proteína}$
Cultivo	3.3
Cotiledones	0.1
Raíz	2.0
Nódulo	4.8

Las actividades de transferasa muestran que el cultivo en suspensión tiene alrededor de 10 a 30 veces más actividad en comparación con los cotiledones inmaduros, semejante a la reportada en extractos de raíces de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Este resultado apoya la caracterización inicial del cultivo en suspensión, en el sentido de que este cultivo difiere del tejido que le dió origen. Es importante recordar que en cotiledones inmaduros existe la acumulación de proteínas de almacenamiento que usualmente son muy abundantes. Este fenómeno provocaría que la actividad específica de una enzima pueda verse alterada por la abundancia de otras proteínas. A pesar de esto y como se observa en la Figura 5, en los cotiledones este estado de desarrollo las proteínas mayoritarias, en el caso de ser proteínas de almacenamiento, se encuentran en su fase inicial de acumulación.

Dada la alta actividad de transferasa en las células de frijol, nos preguntamos si esta alta actividad se observa en otros cultivos vegetales que tienen una acelerada división celular. Se midió la actividad de transferasa para diferentes cultivos vegetales en suspensión como se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Actividad de glutamino sintetasa de diferentes cultivos en suspensión

Cultivo	Act. Esp. de transferencia de GS $\mu\text{M min } \mu\text{g proteína}$			
	2 min	4 min	6 min	Promedio
Negro Jamapa	3.0	3.0	2.9	3.0
C2 (Frijol)	0.4	0.5	0.5	0.5
Zanahoria	0.6	0.7	0.6	0.6
Maíz	1.1	1.0	0.9	1.0
Tabaco	1.0	1.2	1.2	1.2

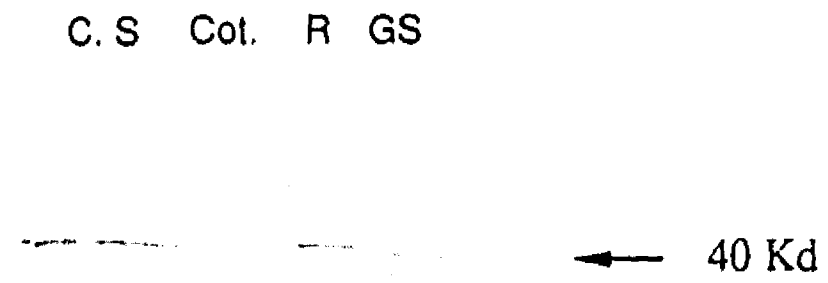
La actividad de GS no es particularmente alta en otros tejidos vegetales en suspensión aún provenientes de *P. vulgaris*, como es el caso de la línea en suspensión C2, que ha sido utilizada para algunos estudios de expresión (17). Los resultados obtenidos muestran diferencias importantes en la actividad de GS, a pesar de que el tiempo de división para todos ellos es muy semejante. Por el momento, es difícil interpretar estos resultados ya que los cultivos han sido crecido en medios diferentes lo que podría originar estas diferencias. Ya que las concentraciones de los macro y micronutrientes de los medios utilizados son muy parecidas, el único elemento que podría originar las diferencias encontradas en los niveles de GS serían las hormonas vegetales. No existe hasta la fecha en la literatura ningún reporte de que hormonas puedan regular la expresión de GS en plantas, por lo que creo que la alta actividad de transferasa encontrada parece ser una particularidad del cultivo de Negro Jamapa.

6.- Detección de la proteína de GS con anticuerpos

Usando anticuerpos específicos para la GS se decidió investigar si la cantidad de proteína para GS en el cultivo en suspensión era consistente con la actividad detectada. Con tal motivo y como se ve en la

Figura 6

Immunodetección de GS en diferentes tejidos
de frijol.



La inmuno detección fué hecha usando un anticuerpo específico contra GS de *P. vulgaris*. Los tejidos probados son: C.S, cultivo en suspensión en los dos primeros carriles ; Cot., cotiledones inmaduros; R, raíz y GS corresponde a la proteína pura. En cada carril fueron aplicados 10 µg de proteína total.

Fig. 6 se realizó un Western, el cual se reveló utilizando un anticuerpo específico para GS de nódulo pero que es capaz de reconocer a todas las isoformas de GS. Al igual que en el caso de las actividades, la cantidad de GS detectada en cotiledones es menor que tanto la del cultivo como la de raíz cuando se aplica la misma cantidad de proteínas. Este resultado no parece ser consecuencia de una mala medición de la cantidad de proteína total en la muestra de cotiledones, ya que en un gel similar teñido con azul de coomasie parece tener una cantidad semejante de proteínas totales.

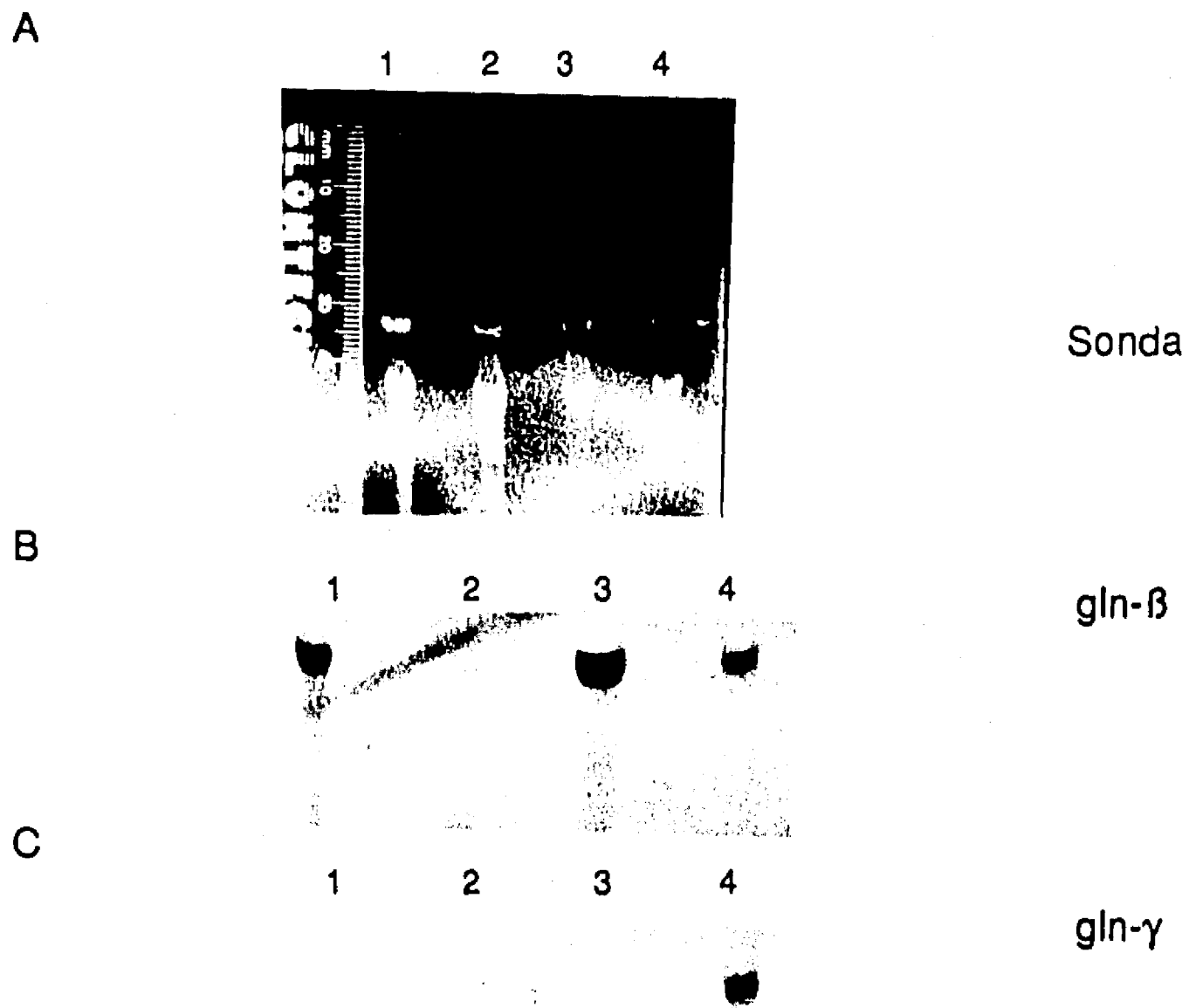
Dado el peso molecular de la banda reconocida por el anticuerpo, es posible concluir que las isoformas que se expresan predominantemente en el cultivo de tejidos corresponden a la formas citosólicas de GS y no a la cloroplástica cuyo peso molecular es de 43 Kd. Con esta técnica sin embargo, no es posible saber cual o cuales de las isoformas citosólicas descritas para frijol se expresan. Con el objeto de responder esta pregunta se decidió caracterizar los transcritos que se expresan en este tejido. Para ello se llevaron a cabo experimentos de RNA tipo Northern y se hibridaron utilizando probadores de dos de los genes citosólicos de GS (*gln-β* y *gln-γ*), los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. Bajo las condiciones normales de crecimiento el gene *gln-β* es expresado mayoritariamente, aunque al parecer *gln-γ* también se expresa (datos no mostrados). Por el momento no se cuenta con un probador específico de *gln-α* que sería el último gen citosólico que es necesario probar.

7.- Regulación de la expresión de *glnβ* por nitrógeno.

El principal interés de esta parte del trabajo consiste en tratar de analizar el efecto en la expresión de GS bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. Con tal motivo las células en suspensión fueron puestas en medios de cultivo que contenían diferentes cantidades de las dos fuentes nitrogenadas que son comúnmente utilizadas para mantener células en cultivo contínuo. El medio de cultivo óptimo para las células en suspensión contiene únicamente dos fuentes de nitrógeno; nitrato (25 mM) y amonio (2.5 mM) en una relación 10:1. Para los experimentos siguientes se decidió utilizar inicialmente cuatro condiciones en las cuales se varia la cantidad de amonio, nitrato o de ambas fuentes:

Figura 7

Caracterización de los niveles de mensajeros para los genes de *gln-β* y *gln-γ* en las células en suspensión



En el panel A se muestra la foto de un gel de RNA, los carriles corresponden a: 1, Células en suspensión; 2, RNA de levadura; 3, Raíz y 4, Nódulo. Este gel fué transferido e hibridizado con una sonda marcada específica para el gen *gln-β*, panel B y posteriormente con un probador para el gen *gln-γ*, panel C

Condición	Nitrato	Amonio
Normal (C)	10.0	1.0
1/10	1.0	0.1
10X	-	10.0
N ⁻	-	1.0

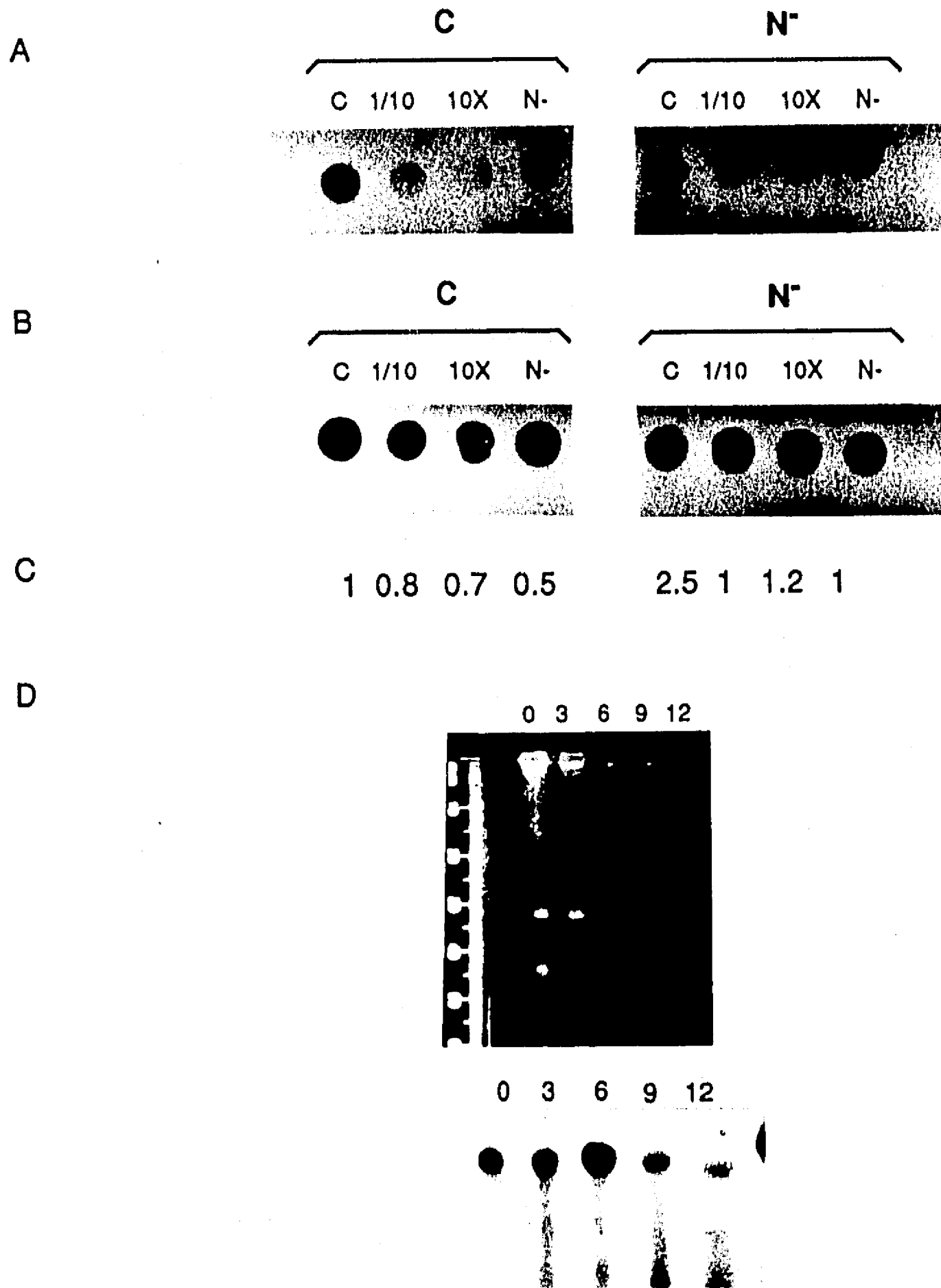
Se comprobó que en todas las condiciones usadas las células fueran capaces de crecer en forma semejante que en el medio normal. Sin embargo cabe mencionar, que en periodos de incubación de varios días en el medio 10X, que contiene amonio como única fuente de nitrógeno, existe una producción de compuestos fenólicos por lo que esta condición parece provocar un estrés en las células. Ha sido reportado con anterioridad que el NH₄⁺ puede ser tóxico para células en cultivo (48). Por tal motivo y para evitar que los cambios que se pudieran observar en cualquiera de las condiciones usadas se debieran a diferencias en crecimiento o por estrés, se decidió que la cuantificación de la expresión de GS tanto a nivel de RNA como de proteína se haría después de incubar a las células por tiempos cortos (horas) en los diferentes medios. La estrategia general que se utilizó en los siguientes experimentos se describe a continuación.

Células en división activa (tres días de cultivo) son transferidas ya sea a un medio normal (C) o a un medio sin nitrato (N⁻) y crecidas en condiciones normales por tres días. Después de este tiempo, alcuotas de cada uno de estos cultivos se transfieren a cuatro matraces con cada uno de los cuatro medios antes descritos y se incuban en agitación continua por 6 h. Al término de éste tiempo las células son recolectadas y el RNA de cada una de las condiciones extraído. El método de extracción de RNA consiste en romper las células usando un politrón en presencia de clorhidrato de guanidina 6M. Los ácidos nucleicos son extraídos con una mezcla de fenol:cloroformo (1:1) y centrifugados por 1 hr a 10000 rpm. El RNA se precipita utilizando 1/20 de volumen de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de etanol y es cuantificado para los experimentos posteriores. Para su análisis concentraciones iguales del RNA de cada una de las diferentes condiciones se aplican en una membrana para una hibridización en punto (dot blot).

Los resultados que se muestran en ésta sección corresponden a hibridizaciones utilizando un probador específico para el gen *glnβ*, el cual se ha demostrado que se expresa en éste cultivo. Como puede verse en la Figura 8 la diferencia más notable en la cantidad de RNA de *glnβ* se encontró en células que

Fig. 8

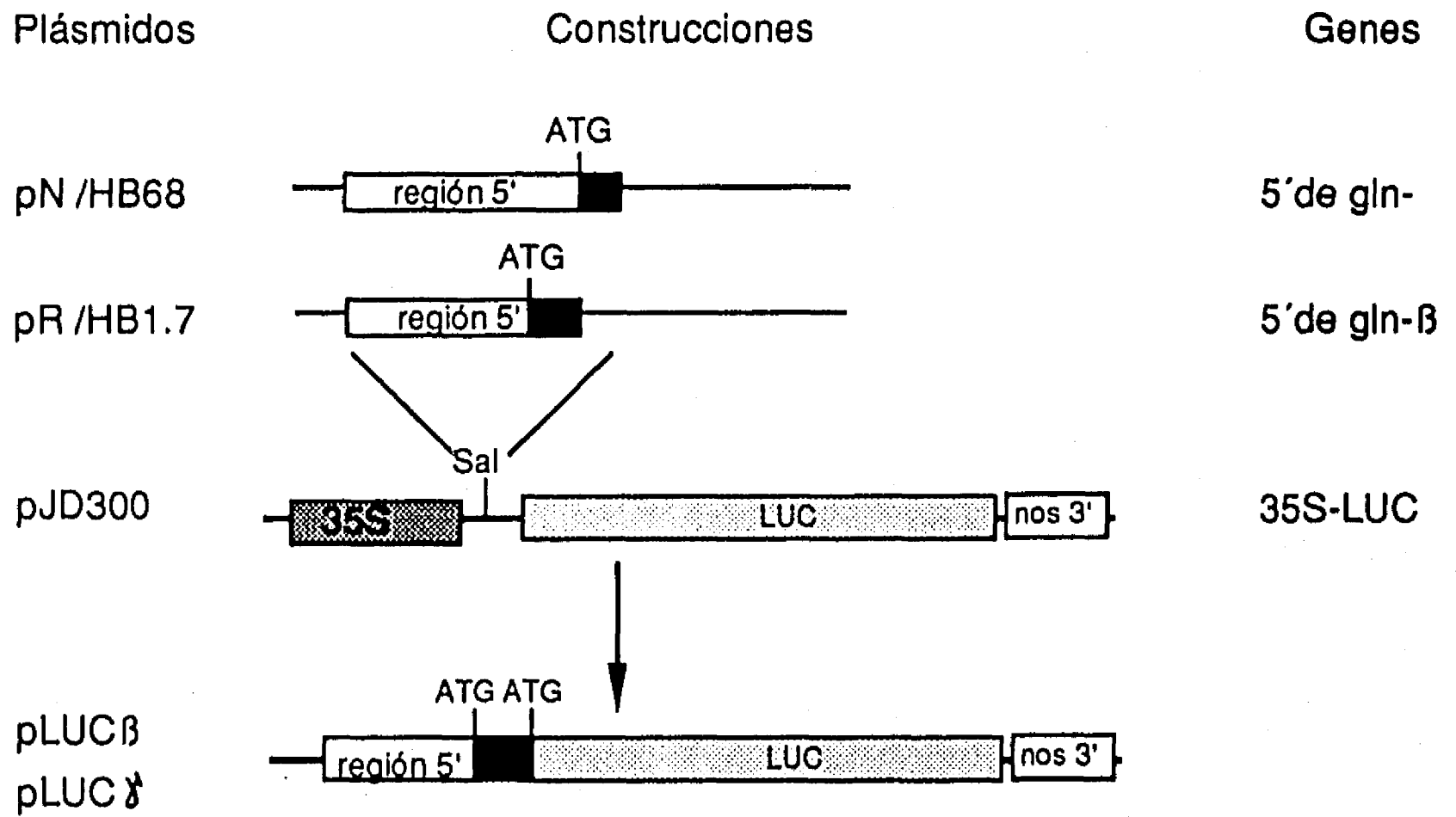
Quantificación de la cantidad de RNA de *glnβ* por la cantidad de nitrógeno



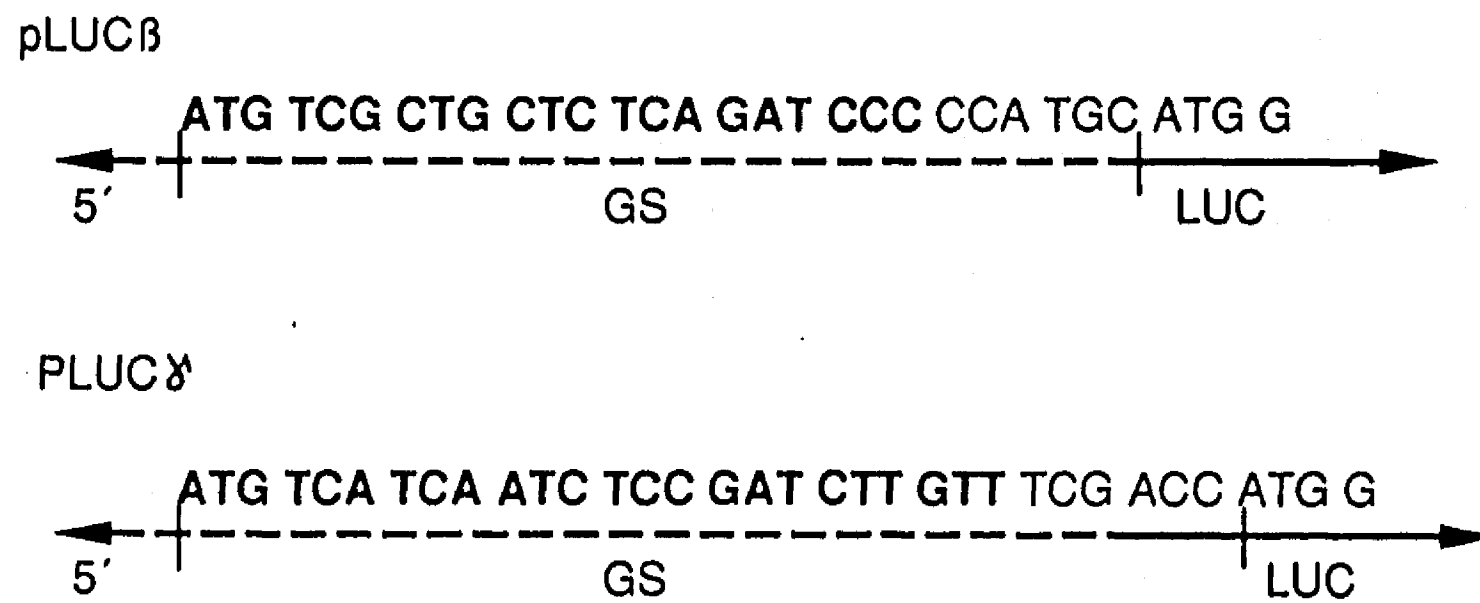
La figura muestra hibridaciones en punto de RNA purificado de células crecidas en medio con alto nitrógeno (C) o con bajo nitrógeno (N⁻). Estas células se transfirieron a diferentes medios nitrogenados por 6 h: alto nitrógeno (C), 1/10 de nitrógeno (1/10), alto amonio (10X) y bajo nitrógeno (N⁻). RNA se purificó de cada una de las condiciones y se hibridizó con: Panel A, probador de *glnβ*; Panel B, RNAs ribosomales. Panel C, cuantificación de la cantidad de RNA corregido por la cantidad de RNA ribosomal en cada carril. Panel D, Geles de una curva de inducción de RNA de células crecidas en medio N⁻ y transferidas a medio C. Los tiempos de incubación (h) se muestran para cada carril e hibridizadas con un probador para *glnβ*.

Figura 9

A Construcción de los plásmidos pLUC β y pLUC γ



B Secuencia nucleotídica del sitio de fusión



fueron transferidas de un medio de alto nitrógeno (C) a un medio de bajo nitrógeno (N⁻). Bajo éstas condiciones, el RNA específico para *glnβ* disminuye cuando las células se transfieren a limitación de nitrógeno y no así cuando se mantienen en alto nitrógeno (Fig. 8A, C vs N⁻). A pesar de que las diferencias encontradas son relativamente pequeñas son reproducibles y, aún más, este patrón de expresión se repite en un experimento inverso en el cual células que han sido crecidas en bajo nitrógeno (N⁻) se transfieren a un medio de alto nitrógeno (C) (Fig 8B carriles 1 vs 4). Como control de que la cantidad de RNA aplicada en cada caso fuera la misma, cada uno de los filtros fueron rehibridizados posteriormente con un probador control (rRNAs). La cuantificación de la cantidad de RNA en cada una de las condiciones usadas, corregidas por la cantidad de RNA ribosomal se muestran en la Figura 8C.

Una vez establecido en qué condiciones existe una aparente regulación por nitrógeno, estábamos interesados en conocer la cinética de esta respuesta. Con este objetivo se realizó una curva de inducción, para la cual se obtuvo RNA de células provenientes de bajo nitrógeno incubadas por diferentes tiempos en un medio con cantidades altas de nitrógeno (C). El resultado de dicho experimento puede verse en la Figura 8D, en la cual se puede apreciar que la mayor inducción del RNA específico para *glnβ* se encuentra entre las 6 y las 9 horas después de la transferencia. Esta respuesta parece ser transitoria ya que a tiempos más largos parece haber una disminución este RNA.

Con el propósito de estar seguros de que la hibridización que se encontraba se debía exclusivamente a *gln-β* y no a una hibridización cruzada con los otros genes citosólicos de GS, se decidió realizar una hibridización en la que se incluyeran otros tejidos de frijol. En específico se utilizaron raíz, nódulo y células en suspensión las cuales fueron hibridizadas tanto con *glnβ* como con *gln-γ*. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 7, al parecer tanto el probador para el gen *gln-β* como para *gln-γ* parecen ser específicos ya que no se encuentra hibridización con *gln-γ* en tejidos como raíz y *gln-β* por su parte hibridiza con todos los tejidos como era de esperarse.

8.- Fusiones traduccionales de GS

El interés primario de este estudio se centra en la regulación de la expresión genética en plantas. Para poder llevar a cabo estudios de expresión transitoria con los genes de *gln-β* y/o *gln-γ*, fueron

construidos dos genes quiméricos a través de una fusión traduccional de las regiones 5' de los genes *gln-β* y *gln-γ* con el gen de LUC. Estas construcciones nos permitirán caracterizar posibles regiones regulatorias en condiciones en las que endógenamente exista una modulación por nitrógeno. Debido a que ambas construcciones son una fusión traduccional, tanto el sitio de unión al ribosoma como el contexto del codón de iniciación son los mismos que para los genes *gln*. La estrategia particular que se siguió para cada uno de los casos se describe a continuación:

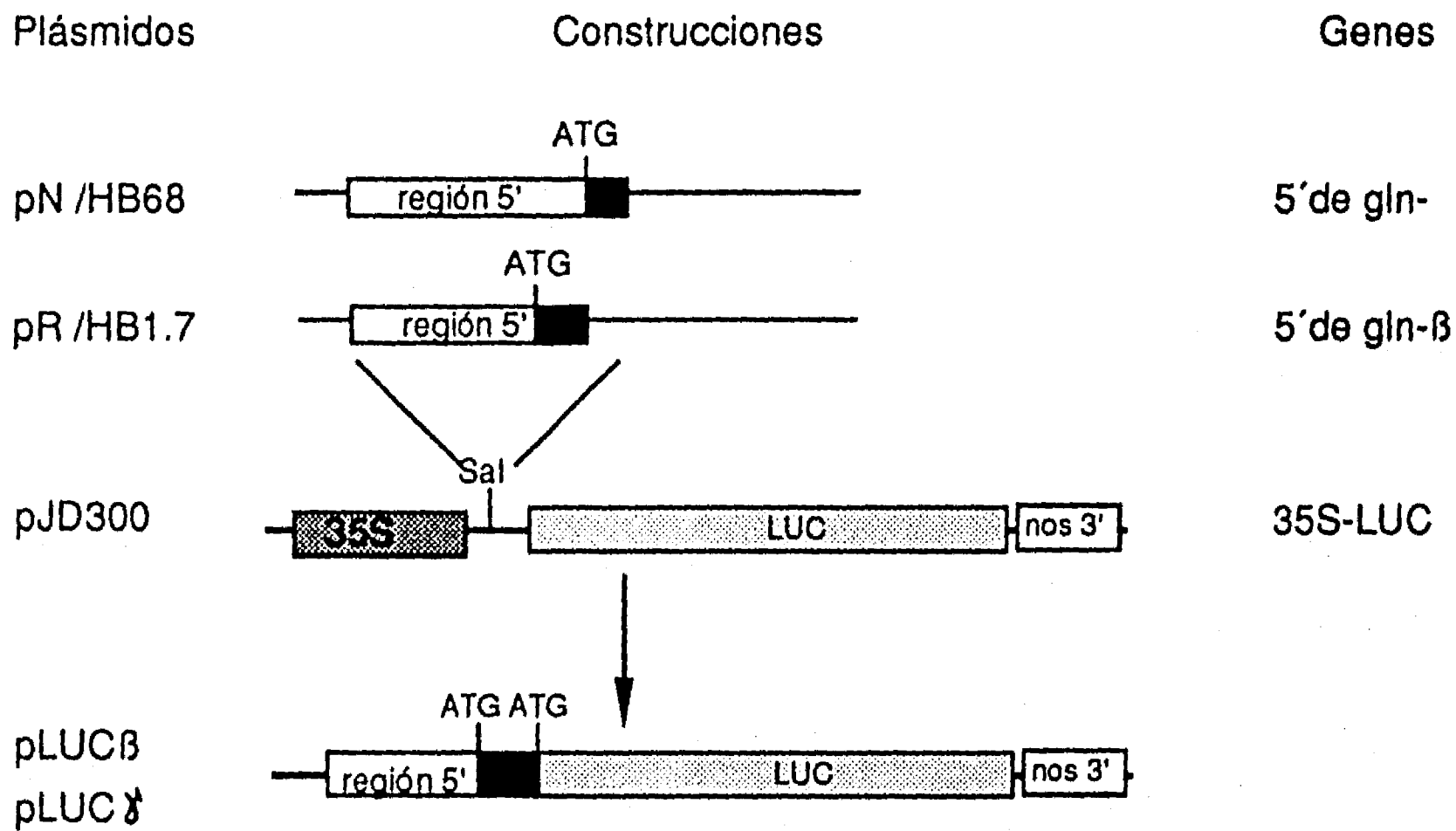
La región 5' utilizada para estas construcciones comprende, para el caso de *gln-β* en un fragmento de 1.7 Kb. Este fragmento contiene alrededor de 1 kb de la región 5' del gen que comprende al probable promotor, el líder no traducido y los primeros 5 aminoácidos de GS. Este fragmento se obtuvo digiriendo con las enzimas *EcoRI* (polimerizado) y *HindIII* al plásmido pR/HB1.7 (23) y se clonó en el vector pJD301 (Fig. 1 del artículo anexo) en el sitio de *NcoI* polimerizado y el sitio de *HindIII*, sustituyendo al promotor 35S de CaMV. De esta manera se creó al plásmido *glnβ-luc* (Fig 9A). Con el fin de corroborar la obtención de la fusión adecuada, se realizó la secuencia exacta de esta fusión se muestra en la Figura 9B.

En el caso de *gln-γ*, el fragmento clonado contiene 1.8 kb de la región 5' del gen conteniendo el probable promotor, el líder no traducido y 8 aminoácidos de la proteína. En este caso la construcción se hizo digiriendo al plásmido pN/HB68 con las enzimas *HpaI* y *HindIII*, el fragmento resultante (2 Kb) fue clonado en el pJD301 en los sitios de *SaII* (polimerizado) y el sitio de *HindIII* (Fig. 1 del artículo), en forma similar que la construcción anterior se analizó la secuencia nucleotídica de la región 5' fusionada con el gen de luciferasa Fig 9B.

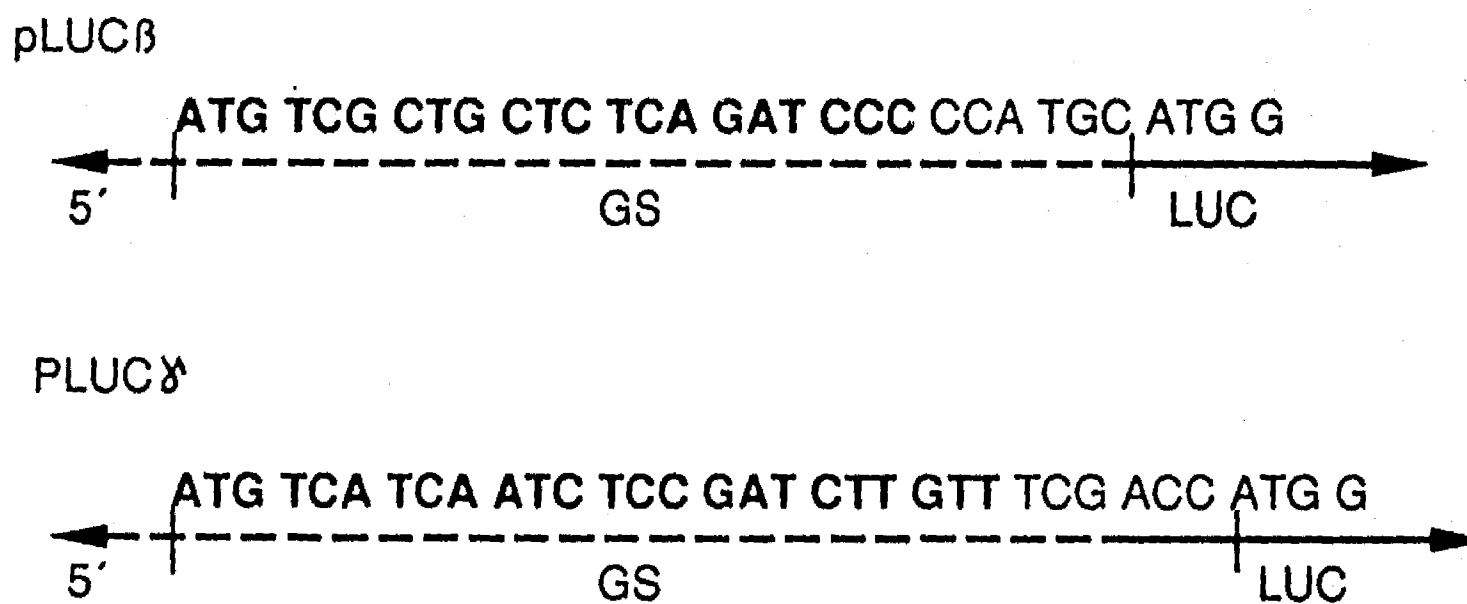
Hasta el momento se han utilizado estas construcciones para analizar los niveles de expresión de ambos genes en su sistema homólogo y los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 6. Para este experimento se utilizaron 20 μg de los dos plásmidos construidos y se electroporaron en las células en cultivo. Con el propósito de que las posibles diferencias que se obtienen no se deban a diferencias en el estado de los protoplastos se introdujo un control interno. Este control consiste en coelectroporar otro plásmido que lleva un segundo marcador, en este caso se usó el gen de β-glucoronidasa. Ya que este plásmido es el mismo, su expresión en cada una de las muestras debe de ser igual, de esta forma es posible estandarizar las actividades de luciferasa que se obtienen. La expresión de ambos marcadores fue cuantificada

Figura 9

A Construcción de los plásmidos pLUC β y pLUC γ



B Secuencia nucleotídica del sitio de fusión



24 h. después de la electroporación. Como puede verse los niveles de luciferasa tanto para la fusión con la región de *gln-β* como para la de *gln-γ*, son muy semejantes. La actividad de ambos promotores es alrededor de 3 a 5 veces menor que la del promotor 35S del CAMV que es un promotor fuerte en plantas

Tabla 6

Expresión transitoria de los plásmidos pLUC β y pLUC γ

Plásmidos	Act. esp de LUC / act esp. GUS ^a
pJD300	1.0 X 10 ⁴
pLUC β	0.2 X 10 ⁴
pLUC γ	0.4 X 10 ⁴

^a La actividad específica de LUC corresponden a los fotones emitidos en 10 seg/ μ g de proteína, la actividad de GUS son los nmols de MU/ min/ μ g de proteína. Ya que el plásmido que lleva el gen de β -glucoronidasa es el mismo, éste solo sirve de control interno. El ruido que se encuentra para la actividad de LUC en estas células es de solo 14 fotones en 10 seg.

Se pretende en un futuro analizar los niveles de expresión de éstas dos construcciones bajo las condiciones nitrogenadas en las que existan diferencias en los niveles de RNA endógeno de *gln β* .

DISCUSION

El principal interés de establecer una línea de cultivo con *P. vulgaris* y las condiciones para expresión transitoria, es el poder llevar a cabo estudios de sobre la regulación de la expresión genética en esta planta. Los estudios de expresión transitoria no son un sustituto para la generación de plantas transgénicas en frijol, sino un método alternativo que apoyará y en algunos casos acelerará estudios de regulación al no tener que pasar por plantas transgénicas. Los estudios transitorios tienen como cualquier otro método, ciertas ventajas y desventajas resumidas a lo largo de la tesis. Entre las que se encuentran; acortar el tiempo requerido para identificar regiones de importancia para la regulación y permitir estudiar ciertos aspectos de la regulación, en aquellos sistemas en los que no existe un método reproducible para generar plantas permanentemente transformadas, como en el caso de frijol.

Cabe remarcar que la generación de métodos para transformación estable o transitoria en vegetales progresa a un ritmo sumamente acelerado. Actualmente se cuenta con nuevas técnicas como es la biobalística en la que, por lo menos hasta la fecha, su mayor aplicación se ha dado para estudios transitorios tejido específicos. Esta técnica permitirá superar una de las principales desventajas de los métodos transitorios en células en cultivo, en las que es muy difícil estudiar expresión de genes que requieren de un estado de diferenciación particular.

Es indudable que para ciertos estudios de expresión se requiere de un tejido diferenciado. Sin embargo, el cultivo de células permite por una parte una manipulación fina de las condiciones de crecimiento y por la otra la posibilidad de generar patrones de diferenciación a través de la adición de factores externos. Este hecho es patente en sistemas animales, en los que estudios transitorios han permitido disectar algunos de los principales factores involucrados en la diferenciación. En el caso particular de frijol la baja eficiencia de transformación y regeneración han provocado que los pocos estudios de regulación que se han realizado con genes de frijol se hallan hecho en sistemas heterólogos. La generación de un sistema eficiente de transformación y expresión transitoria creemos que será útil para realizar de éste tipo de estudios en frijol. Cabe hacer notar que el sistema que se ha optimizado hasta el momento, promueve altos niveles de expresión transitoria semejantes a los que se encuentran con sistemas modelo como son tabaco y zanahoria cuando se utiliza un promotor como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Estudios de expresión en células de *P. vulgaris*

Modificación del líder no traducido

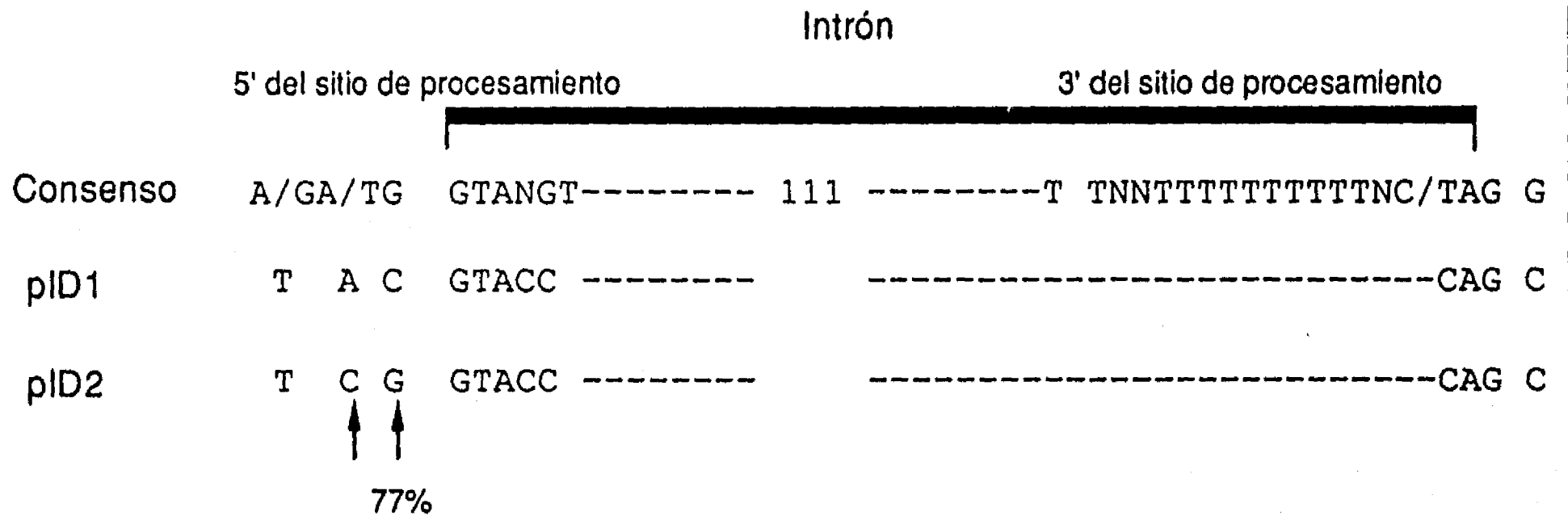
La posibilidad de manipular un sistema depende en gran parte del conocimiento básico del mismo. Con este interés se analizó el efecto de modificar el líder no traducido del gen reportero de luciferasa. Como se mencionó en la sección de resultados, las dos modificaciones que se analizaron fué la introducción de la secuencia aumentadora Ω y de intrones. Ambas modificaciones aumentan los niveles de expresión transitoria en éste sistema, en el caso de Ω este aumento es semejante al que se encuentra en otras dicotiledóneas.

Con respecto a la introducción de un intrón en el líder no traducido, es importante remarcar algunos aspectos. Uno de ellos es que, a pesar de que en el caso de monocotiledóneas los resultados por la introducción de un intrón parecen claros, en dicotiledóneas este efecto es contradictorio. De acuerdo a Kuhlmeier *et al.* (45) la expresión del gen de rbsS parece no modificarse con la presencia o ausencia de intrones. Este grupo obtiene los mismos niveles de expresión en tabaco usando el cDNA o la clona genómica del gen para rbsS proveniente de chícharo. Por su parte Dean *et al.*, (16) usando tabacos transgénicos encuentran que la expresión del gen de rubisco proveniente de *Petunia* aumenta al rededor de 5 veces con la presencia de sus tres intrones originales (16). Existe un solo reporte muy reciente hasta la fecha en el que se ha hecho un estudio cuidadoso de los niveles de expresión de un gen utilizando un solo intrón. En este reporte se utiliza un intrón de dicotiledóneas proveniente del gen de catalasa (pIG221). Los resultados reportados en este trabajo, encuentran un aumento de la expresión del gen de β -glucoronidasa de 2.2 veces para el caso de tabaco y de 10 a 40 veces en protoplastos de arroz (75). En este artículo se hace referencia a que el aumento que se obtiene en tabaco es realmente poco, sin embargo cabe mencionar que en los últimos reportes de la inducción promovida por intrones en maíz, este aumento es de alrededor de 4 a 10 veces y no como se había reportado anteriormente.

En el sistema reportado en esta tesis, se trato de resolver los problemas que origina usar varios intrones con el uso de un solo intrón en en el líder no traducido del gen de LUC en *P. vulgaris*. Como se comentó en resultados, de los dos intrones utilizados el único con que se encontró un efecto de inducción fué

Figura 10

Secuencia en el sitio de procesamiento



Los cambios en ambas construcciones estan señalados por flechas. El porcentaje corresponde a la frecuencia que se encuentra una G en esta posición en 111 secuencias analizadas

con el intrón IV2 que es un intrón típico de dicotiledóneas. IV2 provoca un aumento reproducible en los niveles de expresión de ésta enzima, que varía entre 1.5 a 2.5 veces dependiendo de la construcción que se use (pID1 o pID2 ver Figura 1 del artículo). Es interesante señalar que a pesar de que las dos construcciones reportadas en este trabajo contienen exactamente el mismo intrón así como las secuencias donadora y receptora de éste, existe una diferencia en el nivel de aumento (Tabla 3 del artículo). La única diferencia entre ambas construcciones reside en que la primera contiene 26 pb extras en el 5' del intrón, lo cual por un lado genera un líder más grande y por el otro cambia la secuencia 5' del sitio aceptor del intrón. Sería interesante realizar experimentos específicos para investigar la diferencia de expresión en ambos plásmidos. Sabemos que existen varias alternativas para esta diferencia. Hemos descartado hasta el momento, la existencia de estructuras secundarias importantes, que pudieran disminuir los niveles de expresión en pID1. A la fecha, pensamos que la explicación más plausible es que los niveles de expresión de ambas construcciones respondan a diferencias en la eficiencia de procesamiento del intrón. Ha sido reportado por Kosak (42) que regiones cercanas tanto al sitio donador como al receptor pueden influir en la eficiencia de procesamiento. Cabe remarcar que en la construcción pID2 la secuencia de la región 3' del exón ha cambiado una de las bases que al parecer son más conservadas en la vecindad exón-intrón acercándola al consenso reportado para intrones en plantas (67), por lo que pensamos que la diferencia entre ambas construcciones pueda deberse a este hecho (Fig. 10). Hasta el momento no se conoce el porque un intrón, aún en el líder, puede modificar los niveles de expresión de un gen. Este efecto parece ser un proceso post transcripcional más que un aumento en la transcripción, probablemente a nivel de estabilidad del mensajero.

Expresión de glutamina sintetasa en *P. vulgaris*

Al ser el ciclo GS-GOGAT la principal vía encargada de la asimilación de nitrógeno en la célula vegetal, estas enzimas juegan un papel sumamente importante para el metabolismo general de la planta, independientemente si este nitrógeno proviene del suelo (nitrato), es fijado por la asociación simbiótica con el género *Rhizobium* o proviene de la fotorespiración. El estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de estas enzimas es clave para un mejor entendimiento del metabolismo nitrogenado en plantas superiores. Ya que la GS es la única responsable de asimilar el amonio intracelular, es lógico pensar que

éste sustrato (o bien la relación C/N, como se ha postulado en el caso de procariotes) pudiera regular a ésta enzima. En células vegetales se ha visto que el amonio libre tiene un efecto potencialmente tóxico en el interior de la célula (35). Una posibilidad que es interesante tener en mente es que la regulación de la expresión de GS por amonio sería una forma de prevenir este efecto tóxico.

Hasta el momento parece claro que en la mayoría de las plantas existen más de una isoforma de GS; éstas variantes parecen ser responsables, por lo menos en parte, de contender con los requerimientos nitrogenados en los diferentes tejidos vegetales. Sin embargo, resultados recientes muestran que la expresión de éstos genes parecen responder a múltiples regulaciones como es el ejemplo de la GS cloroplástica (19). Es pues importante el tratar de caracterizar los diferentes efectores o reguladores que pudieran estar involucrados en la regulación de cada una de las isoformas de ésta enzima.

Con respecto a la regulación por nitrógeno, diferentes estudios han encontrado por lo menos a nivel de actividad, que la GS pareciera ser regulada por la fuente nitrogenada en algunas especies (13, 81). Sin embargo a nivel molecular, el único grupo que ha encontrado una clara influencia en el nivel de expresión de la GS por los niveles de NH_4^+ es Hirel y Verma para el caso de soya (37, 52). Estos autores han reportado que los niveles de la GS específica de nódulo en soya se incrementa cuando le es suministrado a las plantas amonio. Este aumento parece ser específico para NH_4^+ y según los resultados obtenidos por Miao et al. está limitado, para leguminosas ya que puede ser encontrado en Lotus pero no en tabacos transgénicos (52). A pesar de que estos resultados son hasta cierto punto difíciles de explicar, no debemos olvidar que se han encontrado profundas diferencias entre por ejemplo monocotiledóneas y dicotiledóneas en el mecanismo de procesamiento de intrones. Aunque no se esperarían diferencias tan notables entre especies de dicotiledóneas, es posible que con estudios como el reportado por Miao et al., sean encontrados ejemplos en los que grupos de plantas que parecieran muy cercanos guarden fuertes diferencias.

Para el caso de frijol, los reportes de Cock *et al.* parecen sugerir que no existe una evidente respuesta de las GS citosólicas (15). El problema de éste tipo de estudios se basa principalmente en que utilizan a la planta completa, la cual es puesta en condiciones de deficiencia o exceso de amonio. Desgraciadamente bajo estas condiciones una planta puede responder a un estrés de limitación a través de la movilización de reservas de diferentes regiones de la planta. Esto hace sumamente difícil poder lograr una

baja considerable en la cantidad de amonio intracelular. Por otro lado, y como es mencionado por Cock et al. (15), en el caso de raíz es imposible saber si hay cambios en la expresión de GS en regiones particulares de la raíz, pues el RNA utilizado en este estudio proviene de toda la raíz. Esto es muy importante si tomamos en cuenta que es posible que en la raíz, existan zonas preferentemente involucradas en la asimilación de nitrato.

En un cultivo en suspensión las células o los cúmulos celulares se encuentran en estrecho contacto con el medio de cultivo. Debido a que no existen tejidos de almacenamiento, la cantidad de reservas con que la célula cuenta son mucho más limitadas y por lo tanto cambios nutricionales en el medio tendrán una repercusión más dramática sobre la célula. Por el otro lado, en las células en suspensión no existen tejidos especializados por lo que es posible detectar cambios pequeños que de otra manera serían difíciles de cuantificar.

Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren que existe una diferencia en la cantidad de RNA de células en contacto con diferentes condiciones nitrogenadas. El análisis de los niveles de mensajero en las diferentes condiciones, tomando en cuenta la hibridización de un gen control, muestran una inducción de alrededor de 2 a 5 veces (Fig. 8C). Debido al método usado hasta el momento es imposible tener una cuantificación precisa especialmente por que hasta el momento solo se ha analizado uno de los genes citosólicos de GS. Hasta el momento no es posible saber si las diferencias en los niveles de RNA tienen alguna implicación biológica. Por otro lado el método usado no permite discernir si las diferencias encontradas se deben a modificaciones a nivel transcripcional o por cambios en la vida media del RNA. El estudio de los niveles de RNA para los otros genes citosólicos de GS en las condiciones usadas en este trabajo podrían mostrar diferencias importantes. Por otro lado, es necesario correlacionar estos datos con los niveles de proteína para cada una de las diferentes isoformas, ya que cambios en los niveles de estas apoyarían el significado biológico de los resultados encontrados a nivel de RNA. Es importante señalar que los datos obtenidos por Chiu and Shargool (13), muestran un incremento de alrededor de 2 veces en la actividad enzimática de GS de células de soya después de un tratamiento ya sea con NH_4^+ o nitrato. De igual forma Cock *et al.*, a pesar de concluir que no existe una clara modulación por nitrógeno en frijol,

encuentran un incremento en el nivel de mensajero de *gln-β* al suplementar con NH_4^+ a plantas inoculadas con una cepa Fix-, aunque en este caso no se habla de los niveles de este incremento (15).

Un aspecto interesante es el hecho de que a diferencia de Hirel, el gen de *glnβ* en las células en cultivo parece responder a cambios en la concentración de nitrato más que de amonio. Sin embargo éste hecho podría deberse a que en este sistema las células en suspensión tienen una asimilación del nitrógeno primordialmente a partir de nitrato.

Como se mencionó, es importante cuantificar los niveles de mensajero de los genes *gln-α* y *gln-γ* en el cultivo, especialmente por que en el trabajo reportado por Cock *et al.* (15) se menciona que existe una expresión marcadamente diferente del *gln-α* en plantas fijadoras crecidas en condiciones en las que el nitrógeno es substituido por argón. Esto de ser cierto sugeriría que cada una de las diferentes isoformas citosólicas para GS pueden responder a nitrógeno de manera diferente. Es posible que en las condiciones que se han usado, un aumento moderado en la cantidad de mensajero de *gln-β* podría corresponder a un aumento mayor o a una disminución de cualquiera de las otras isoformas.

Un resultado que es hasta cierto punto difícil de explicar, es que la inducción del mensajero de GS tras la adición de nitrato pareciera ser un evento transitorio por lo que la repercusión a nivel de proteína no es tan obvia. A pesar de esto existen varios ejemplos de inducción transitoria de genes originados por estímulos medio ambientales en eucariotes. La inducción de elicitores de plantas, algunos proto oncogenes de animales (*c-fos*) y la la nitrito reductasa de plantas (43). La explicación que se ha dado en estos casos es que, al parecer todos estos genes responden a múltiples factores regulatorios. Ahora bien, la inducción transitoria por cada uno de estos factores previene una transcripción elevada en forma continua que traería como consecuencia una síntesis innecesaria de los productos o la acumulación de productos tóxicos (43).

Finalmente, es interesante señalar que los niveles de expresión encontrados en los experimentos transitorios de frijol, utilizando las construcciones de pLUC-β y pLUC-γ son muy semejantes entre si. Esto es un tanto sorprendente ya que sugiere que ambos promotores son transcritos con la misma eficiencia en las células en suspensión. Sin embargo como ya se mencionó, los niveles endógenos de ambos genes son muy diferentes, tanto a nivel de proteína como a nivel de RNA. Esta discrepancia puede ser explicada por dos diferentes razones. Una es que las región regulatoria que se usó para las fusiones traduccionales de

gln-β no contengan los elementos necesarios para promover una mayor actividad que la de *gln-γ*; la otra es que exista una regulación post transcripcional. En el caso de la primera posibilidad es necesario mencionar que las regiones regulatorias usadas en este trabajo para los genes *gln-β* y *gln-γ*, contienen un fragmento semejante a la región 5' usada en el trabajo publicado por Forde et al. en plantas transgénicas (23). En este último caso la expresión de ambos genes es tejido específica lo que demuestra que la región clonada en las fusiones parecen conservar las señales necesarias para la expresión tejido específica. En el caso de que exista una regulación post traduccional implicaría que los niveles de mensajero acumulados por los genes *gln-β* y *gln-γ* son diferentes a los niveles de transcripción para ambos genes. Este tipo de regulación sería realmente novedosa para GS y creo que la única manera de tratar de contestar esta pregunta es utilizando expresión transitoria.

En conclusión en este trabajo se ha establecido un sistema que permite estudiar algunos aspectos de la regulación en *P. vulgaris*. Hemos presentado algunos experimentos preliminares de dos estudios de regulación en frijol. Estos estudios son un ejemplo del tipo de análisis que puede ser hecho utilizando el cultivo de células para expresión transitoria.

REFERENCIAS

1. Ammirato PV (1983) *In Editor*, ed. Sharp, Amminato and Yamada. Series Macmillan, New York.
2. Aviv D Fluhr, R., Edelman, M. and Gallum, E. (1980) Progeny analysis of the interspecific somatic hybrids: *Nicotiana tabacum* (cms) + *Nicotiana sylvestris* with respect to nuclear and chloroplast markers. *Theoret. Appl. Genet.* 56: 145-150
3. Bengochea T, Dodds JH (1986) Plant protoplasts A biotechnological tool for plant improvement. *In Editor*, ed. Series Chapman and Hall, London-New York.
4. Bennett MJ, Lightfoot DA, Cullimore JV (1989) cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase δ polypeptide of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* 12: 553-565
5. Binns AN, Thomashow MF (1988) Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 575-606
6. Block MD, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Rao Movva N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO.* 6: 2513-2518
7. Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark Kb, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science.* 240: 1534-1537
8. Bravo JE, Evans DA (1985) Protoplast fusion for crop improvement. *Plant Breed. Rev.* 3: 193-218
9. Buchman AR, Berg P (1988) Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol. Cell Biol.* 8: 4395-4405
10. Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Devel.* 1: 1183-1200

11. Callis J, Fromm M, Walbot V (1988) Heat inducible expression of a chimeric maize hsp70CAT gene in maize protoplasts. *Plant Physiol.* 88: 965-968
12. Chilton M, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of the crown gall tumorigenesis. *Cell.* 11: 263
13. Chiu JY, Shargool DP (1979) Importance of glutamate synthase in glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 63: 409-415
14. Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl. Acids Res.* 15: 1311-1326
15. Cock JM, Mould RM, Bennett MJ, Cullimore JV (1990) Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. *Plant Mol. Biol.* 14: 549-560
16. Dean C, Favreau M, Bond-Nutter D, Bedbrook J, Dunsmuir P (1989) Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of *Petunia rbcS* genes. *The Plant Cell.* 1: 201-208
17. Dron M, Clouse SD, Dixon RA, Lawton MA, Lamb CJ (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6738-6742
18. Dunn K, Dickstein R, Feinbaum R, Burnett BK, Peterman TK, Thoidis G, Goodman HM, Ausubel FM (1988) Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 66-74
19. Edwards JW, Coruzzi GM (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell.* 1: 241-248
20. Evans DA, Sharp WR, Bravo JE (1987) Nestlé Research News 1986/1987. *In Editor, ed.* Series Nestlec Ltd, Switzerland.

21. Flick CE, Evans DA, Sharp WR (1983) *In Editor*, ed. in Handbook of Plant Cell Culture. Series Macmillan, New York.
22. Forde BG, Cullimore JV (1989) The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *In Editor*, ed. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology.
23. Forde BG, Day HM, Turton JF, Shen W-J, Cullimore JV, Oliver JE (1989) Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell*. 1: 391-401
24. Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize cells after electroporation of protoplasts. *Nature*. 319: 791-793
25. Fromm M, Walbot V (1987) Transient expression of DNA in plant cells. *In* E T. Hohn et al., ed. *Advances in plant gene research*. Springer-Verlag, New York.
26. Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology*. 8: 833-839
27. Gad AE Rosenberg, N., and Altmann, A. (1990) Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant*. 78(1): In press
28. Gallie DR, Lucas WJ, Walbot V (1989) Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: Factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *The Plant Cell*. 1: 301-311
29. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson T-MA (1987) The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res*. 15: 3257-3273
30. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA (1987) A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 15: 8693-8711
31. Galston AW, Altman A, Kaur-Sawhney R (1978) Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplasts. *Plant Sci. Lett*. 11: 67-77

32. Gasser CS, Fraley RT (1989) Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*. 244: 1293-1299
33. Hall MD, Cocking EC (1974) *Protoplasma*. 19: 225-234
34. Hangarter RP, Peterson RD, Good NE (1980) Biological activities of indoacetyl amino acids and their use as auxins in tissue culture. *Plant Physiol*. 65: 761-767
35. Hecht U, Mohr H (1990) Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedling and its significance for ammonium toxicity and tolerance. *Physiol. Plant*. 78:
36. Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens J-P, Van Montagu M, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J*. 2: 987-995
37. Hirel B, Bouet C, King B, Layzell D, Jacobs F, Verma DPS (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J*. 6: 1167-1171
38. Jobling SA, Gehrke L (1987) Enhanced translation of chimeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature*. 355: 622-625
39. Keith B, Chua N-H (1986) Monocot and dicot pre-mRNAs are processed with different efficiencies in transgenic tobacco. *EMBO J*. 5: 2419-2425
40. Knight DE, Scrutton MC (1986) Gaining access to the cytosol: The technique and some applications of electroporation. *Biochem. J*. 234: 497-506
41. Knuston JC, Yee D (1987) Electroporation: Parameters affecting transference of DNA into mammalian cells. *Analyt. Biochem*. 164: 44-52
42. Kozak M (1988) Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. *Mol. Cell. Biol*. 8: 283-292
43. Kramer V, Lahners K, Back E, Privalle LS, Rothstein S (1989) Transient accumulation of nitrite reductase mRNA in maize following the addition of nitrate. *Plant. Physiol*. 90: 1214-1220

44. Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Scilperoort RA (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti- plasmid DNA. *Nature*. 296: 72-74
45. Kuhlmeier C, Fluhr R, Chua N-H (1988) Upstream sequences determine the difference in transcript abundance of pea rbcS genes. *Mol. Gen. Genet.* 221: 405-411
46. Lara M, Porta H, Padilla J, Foch J, Sánchez F (1984) Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76: 1019-1023
47. Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, De Greve H, Hernalsteens J.P., Van Montagu M, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1: 147-152
48. Loyola-Vargas VM, Sanchez de Jiménez E (1986) Effect of nitrate and glutamine on nitrogen assimilation enzymes during callus growth of maize. *J. Plant Physiol.* 125: 235-242
49. Luehrsen KR, Walbot V (1990) Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. *Mol. Gen. Genet.* :
50. McCabe DE, Swain WF (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology.* 6: 923-926
51. Messens E, Lenaerts A, Van Montagu M, Hedges RW (1985) Genetic bases for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol. Gen. Genet.* 199: 344-348
52. Miao GH, Hirel B, Marsolier M, Ridge RW, Verma DPS (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosol glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *The Plant Cell.* 3: 11-22
53. Mifflin BJ, Lea PJ (1980) Ammonia assimilation. *In Editor, ed. The Biochemistry of Plants.* Series Academic Press, New York.
54. Moore L, Warren G, Strobel G (1979) Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid.* 2: 617-626

55. Morikawa H, Iida A, Matsui C, Ikegami M, Yamada Y (1986) Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. *Gene*. 41: 121-124
56. Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166
57. Neuhaus G, Sopanzenberg G, Mittelsten-Scheid O, Schweiger HG (1987) Transgenic rapeseed plants obtained by microinjection of DNA into microspore-derived proembryoids. *Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36
58. Nomura K, Komamine A (1986) Embryogenesis from microinjected single cells in a carrot suspension culture. *Plant Science*. 44: 53
59. Oaks A, Hirel B (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 345-365
60. Oard JH, Paige D, Dvorak J (1989) Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat. *Plant Cell Rep.* 8: 156-160
61. Ortega JL, Campos F, Sanchez F, Lara M (1986) Expression of two different glutamine synthetase polypeptides during root development in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 80: 1051-1054
62. Padilla JE, Campos F, Conde V, Lara M, Sanchez F (1987) Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9: 65-74
63. Potrykus I (1990) Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology.* 8: 535-542
64. Potrykus I, Saul MW, Petruska J, Paszkowski J, Shillito RD (1985) Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* 199: 183-188
65. Salisbury FB, Ross CW (1985) *Plant Physiology. In Editor, ed. Series Wadsworth Publishing Company, Belmont, CA.*
66. Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 78(1): In press.

67. Shapiro MB, Senapanthy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucl. Acids Res.* **15**: 7155-7174
68. Shields R (1985) Engineering herbicide resistance. *Nature.* **317**: 668
69. Shigekawa K, Dower WJ (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Bio/Tech.* **6**: 742-750
70. Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *BioTechnology.* **3**: 1099-1103
71. Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**: 118-131
72. Stewart GR, Mann AF, Fentem PA (1980) Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. *In Editor, ed. The Biochemistry of Plants. Series Academic Press, New York.*
73. Stougaard J, Abildsten D, Marcker KA (1987) The *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 251-255
74. Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 8526-8530
75. Tanaka A, Mita S, Ohta S, Kyojuka J, Shimamoto K, Nakamura K (1991) Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6767-6770
76. Tepfer D (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell.* **37**: 959-967
77. Tingey SV, Coruzzi GM (1987) Glutamine synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* **84**: 366-373
78. Töpfer R, Gronerborn B, Shell J, Steinbiss HH (1989) Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *The Plant Cell.* **1**: 133-139

79. Tran Thanh Van KM (1981) Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 291-311
80. Vasil V, Clancy M, Ferl RJ, Vasil IK, Hannah LC (1989) Increased gene expression by the first intron of maize *shrunk-1* locus in grass species. *Plant Physiol.* 91: 1575-1579
81. Weber M, Schmidt S, Shuster C, Mohr H (1990) Factors involved in the coordinate appearance of nitrite reductase and glutamine synthetase in mustard (*Sinapsis alba* L.) seedling. *Planta.* 180: 429-434
82. Yeoman MM, Forche E (1980) Cell proliferation and growth in callus cultures. *In Editor, ed. International review of cytology, Supplement IIA. Series Academic Press, New York.*
83. Zaenen I, VanLarebeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1974) *Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing Agrobacterium strains.* *J. Mol. Biol.* 86: 109
84. Zambrysky P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without the alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2: 2143-2150