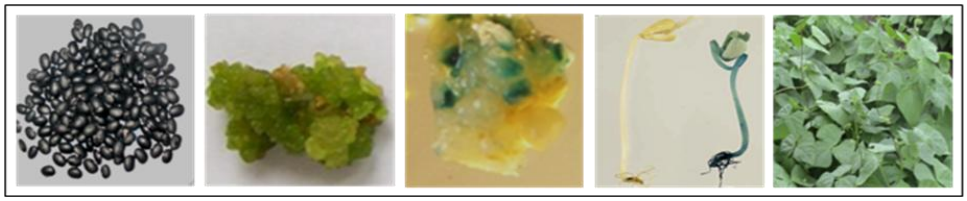
Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología
Carrera: Lic. Biología. 5to año

# **Título:** Estandarización de parámetros para mejorar la eficiencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. var CIAP 7247F

# TESIS DE DIPLOMA



**Autora**: Amanda Martirena Ramirez
**Tutora**: Dra. C. Novisel Veitía Rodríguez
**Consultante**: MSc. Raúl Collado López

**2012**

# TESIS DE DIPLOMA

**Título:** Estandarización de parámetros para mejorar la eficiencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. var CIAP 7247F

**Autora:** Amanda Martirena Ramirez

**Tutora:** Dra. C. Novisel Veitía Rodríguez (novisel@ibp.co.cu)

**Consultante:** MSc. Raúl Collado López

Instituto de Biotecnología de las Plantas

Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.

**2012**

## AGRADECIMIENTOS

Por fortuna, a lo largo del trabajo, fueron muchas las personas que de alguna manera, colaboraron directa o indirectamente en la realización del mismo. Por lo tanto, hago extensivo mi agradecimiento a todas ellas. No obstante, debo expresar un reconocimiento especial a las siguientes personas:

A mi abuela, María Teresa Hernández Nodarse por ser mi guía y mi apoyo en cada meta que me he trazado, impulsándome cada vez más a ser mejor y a luchar incesantemente por lo que quiero.

A mis padres, Miriam Ramirez López y Alfredo Lorenzo Martirena Hernández por su cariño, amor, paciencia, comprensión, confianza y apoyo incondicional, en todas las metas que me propongo en mi vida profesional.

A mis hermanos, Francisco José y Alfredo, por su cariño y amor que me han demostrado siempre a lo largo de todos estos años de estudio.

A Niury por su apoyo en momentos difíciles a lo largo de toda mi carrera y mi vida personal.

A mi tío Fernando y a mi tía María Teresa, por sus enseñanzas a través del ejemplo que me dieron desde muy temprano cuando era niña, y por estar siempre a mi lado cuando los he necesitado.

A mi tutora, la Dr. Novisel Veitía por su apoyo constante, dedicación, colaboración y tiempo en la planificación y desarrollo de los experimentos de proyecto de tesis y por su ayuda infinita en la escritura y revisión del documento escrito.

A mi consultante, Ms. Raúl Collado por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis y por su confianza en mi desempeño durante este tiempo.

A, Idalmis y Lurdes del Laboratorio de Cultivo de tejidos por su ayuda en la planificación y realización de los experimentos y en la confección del documento escrito.

A Damaris y Maritza por sus enseñanzas y consejos cuando todo se tornaba difícil en el día a día, en el trabajo en el laboratorio.

A Baby y Luis del Laboratorio de Biología Molecular por confiar en mí desempeño y apoyarme en el desarrollo de las tareas encomendadas durante el período de las Prácticas Laborales.

A Osmildo y Marta por su ayuda incondicional en todos los momentos que los he necesitado.

A mis compañeros de aula: Dianella, Odleny, Yudith, Rokmira, Ana María, Rosely, Dayana, Alejandro, Magdiel, Marlon, por todos los momentos lindos que hemos pasado juntos a lo largo de estos cinco años y por su amistad.

Al Director del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Osbaldito por darme la oportunidad de trabajar en el Programa de Frijol durante el desarrollo de mi tesis.

A todos los profesores por transmitirme sus conocimientos.

A todos mis amigos y amigas cuyos consejos han contribuido con el trabajo y a presentar este documento

A todos, Muchas Gracias

Amanda Marirena Ramirez

## RESUMEN

El frijol común presenta dificultades para la transformación genética, que van desde la introducción de genes, hasta la regeneración de plantas, pasando por problemas como la falta de reproducibilidad, desigual aplicabilidad para todas las variedades y la baja eficiencia de transformación. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar parámetros para la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en callos de *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247F, a través de la expresión transitoria de la β-glucuronidasa, y el chequeo molecular de las líneas de plantas supuestamente transformadas mediante la RCP. Los callos se transformaron con las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y C58C1 con los vectores de transformación pTJK136 y pCAMBIA3301. Los parámetros evaluados en la transferencia de ADN fueron: cepa bacteriana, plasmidios, condiciones de iluminación, concentración bacteriana, tiempo de subcultivo y la concentración mínima inhibitoria del agente selectivo. La mayor expresión *gus* transitoria se alcanzó al emplear como explantes, callos organogénicos en el segundo subcultivo de multiplicación, con la cepa EHA 105 (pCAMBIA3301), con fotoperíodo de 16-8 horas de luz/oscuridad, una concentración bacteriana de 0.5 de $DO_{600}$ y con el empleo de 0.50 $mg.l^{-1}$ de glufosinato de amonio como la concentración mínima inhibitoria para la selección de los callos. En estas condiciones se logró hasta el 50% del área del callo cubierta de puntos azules. La frecuencia de regeneración lograda fue de 3,05%. A través del análisis histoquímico se identificaron dos líneas genéticamente modificadas estables. El uso de la RCP permitió confirmar que los transgenes fueron transferidos de las plantas inicialmente transformadas, a sus progenies.

Palabras claves: *Agrobacterium tumefaciens*, β- glucuronidasa, callos, *Phaseolus vulgaris*.

**ABSTRACT**

Common bean presents difficulties for the genetic transformation that vary from the introduction of genes to regeneration of plants, going through problems such as lack reproducibility, unequal applicability for all the varieties and the drop of transformation efficiency. The present work aimed to standardize parameters for the genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* in callus of *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247F, through the transitory expression of the β-glucuronidase and molecular checking of lines of the pretended transformed plants by means of PCR. Calluses were transformed with the strains of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 and C58C1, with the vectors of transformation pTJK136 and pCAMBIA3301. The parameters evaluated in the transfer of DNA were: bacterial strain, plasmidos, lighting conditions, bacterial concentration, and time of subculture and minimal inhibitory concentration of the selective agent. The highest *gus* transitory expression was achieved by using as explants, organogenic calli in the second multiplication subculture, with the strain EHA 105 (pCAMBIA3301), under a photoperiod of 16-8 hours of light / darkness, a bacterial concentration of 0.5 of DO600 and using 0.50 mg.l-1 of ammonium glufosinato at the minimum inhibitory concentration for selecting the callus. Up to 50% of the callus area was cover of blue spots under these conditions. The frequency of regeneration achieved was 3.05%. Through the histochemical analysis, two genetically modified stable lines were identified. The use of PCR allowed confirming that the transgenes were transferred of the initially transformed plants, to its progeny.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, β-glucuronidase, callus, *Phaseolus vulgaris*

**Índice**


**1. Introducción**..... 1
**2. Revisión bibliográfica**..... 3
**2.1. *Phaseolus vulgaris* L**..... 3
**2.1.1. Clasificación y características morfofisiológicas**..... 3
**2.1.2. Situación mundial y distribución**..... 4
**2.1.3. Importancia económica**..... 4
**2.2. Mejoramiento genético**..... 6
**2.3. Cultivo de tejidos en *Phaseolus***..... 7
**2.4. Transformación genética**..... 8
**2.4.1. Métodos de transferencia de ADN al genoma de la planta**..... 9
**Transferencia directa de ADN**..... 9
**Transferencia indirecta de ADN**..... 11
**2.4.2 Transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens***..... 12
**2.4.2.1. Ventajas del sistema de transformación vía *Agrobacterium***..... 13
***2.5.* Factores que influyen en la eficiencia de transformación con *A. tumefaciens***..... 13
**2.5.1. Cepa bacteriana y plasmidio**..... 13
**2.5.2. Temperatura**..... 14
**2.5.3. Condiciones de iluminación y tiempo de cocultivo**..... 15
**2.5.4. Edad del explante**..... 16
**2.6. Selección de células transformadas**..... 17
**2.6.1. Genes marcadores de selección**..... 17
**2.6.2. Genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas**..... 18
**2.7. Evaluación de la eficiencia de transformación**..... 19
**2.7.1. Chequeo de plantas transformadas**..... 19
**3. Materiales y Métodos**..... 22
**Procesamiento estadístico**..... 26
**3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial glufosinato de amonio para la transformación genética en *P. vulgaris***..... 26
**3.2. Determinación de las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *P. vulgaris***..... 27
**3.2.1. Cepa bacteriana**..... 27
**3.2.2. Plasmidios**..... 28
**3.2.3. Condiciones de iluminación durante el cocultivo**..... 28
**3.2.4 Concentración bacteriana**..... 29
**3.2.5. Tiempo de subcultivo**..... 30
**3.3. Transformación genética de callos de *Phaseolus vulgaris* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y análisis molecular de líneas regeneradas**..... 31
**3.3.1. Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens***..... 31
**3.3.2. Análisis molecular de las líneas de plantas regeneradas**..... 31
**Extracción de ADN genómico vegetal**..... 31

**3.3.2.1.Análisis de la progenie mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)**..... 32
**4. Resultados**..... 34
**4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial glufosinato de amonio para la transformación genética en *P. vulgaris***..... 34
**4.2. Determinación de las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *P. vulgaris***..... 38
**4.2.1. Cepa bacteriana**..... 38
**4.2.2. Plasmidios**..... 40
**4.2.3. Condiciones de iluminación durante el cocultivo** ..... 41
**4.2.4 Concentración bacteriana**..... 42
**4.2.5. Tiempo de subcultivo**..... 43
**4.3. Transformación genética de callos de *Phaseolus vulgaris* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y análisis molecular de líneas regeneradas**..... 44
**4.3.1. Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens***..... 44
**4.3.2. Análisis molecular de las líneas de plantas regeneradas**..... 45
**4.3.2.1.Análisis de la progenie mediante la Reaccíón en cadena de la polimerasa (RCP)**..... 45
**5. Discusión de Resultados**..... 50
**5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial glufosinato de amonio para la transformación genética en *P. vulgaris***..... 50
**5.2. Determinación de las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *P. vulgaris***..... 52
**5.2.1. Cepa bacteriana**..... 52
**5.2.2. Plasmidios**..... 54
**5.2.3. Condiciones de iluminación durante el cocultivo** ..... 55
**5.2.4 Concentración bacteriana**..... 57
**5.2.5. Tiempo de subcultivo**..... 58
**5.3. Transformación genética de callos de *Phaseolus vulgaris* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y análisis molecular de líneas regeneradas**..... 60
**5.3.1. Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens***..... 60
**5.3.2. Análisis molecular de las líneas de plantas regeneradas**..... 60
**5.3.2.1. Análisis de la progenie mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)**..... 60
**6. Conclusiones**..... 62
**7. Recomendaciones**..... 63
**Referencias**

## 1- INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de las leguminosas, el frijol es considerado una de las especies más importantes a nivel mundial, ya que constituye una fuente de proteína de bajo costo (Amugune *et al*., 2011). Sin embargo, su producción se ha visto limitada por la alta incidencia de plagas, enfermedades y condiciones edafoclimáticas adversas; esto ha ocasionado un aumento en el número de aplicaciones de pesticidas e incremento de los costos de producción de este cultivo (Velcheva *et al*. 2005). Por tales razones, es de gran interés el desarrollo de nuevos cultivares con características agronómicas mejoradas.

El mejoramiento genético convencional en esta especie no ha podido solucionar estas dificultades debido al ligamiento genético y a las barreras de hibridación sexual. La transformación genética ha logrado eliminar la incompatibilidad sexual existente entre los individuos, permitiendo la transferencia de genes entre organismos genéticamente distantes (Kwapata *et al*. 2010). Sin embargo, el frijol común y otras especies del género *Phaseolus* se han considerado recalcitrantes a la transformación genética (Angenon y Thu, 2011). La limitada capacidad de regeneración y la baja transferencia de ADN, han sido las causas fundamentales que han limitado el desarrollo de estos métodos (Karami *et al*., 2009).

La organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* ha sido la principal vía para la regeneración de plantas (Gatica Arias *et al*., 2010; Kawapata *et al*., 2010; Quintero-Jiménez *et al*., 2010). Este sistema de regeneración unido a la transformación genética mediante el bombardeo de partículas en *Phaesolus vulgaris* ha sido descrito por Aragao *et al*, (2002) y Rech *et al*, (2008). Sin embargo; este método tiene como desventaja un patrón de integración del transgén complejo, de este modo, acrecienta la probabilidad del silenciamiento del transgén (Yang *et al*., 2005), a diferencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, mediante la cual se logra la integración de un segmento de ADN preciso, además de introducir pocas copias de este segmento en el genoma de la planta, evitando con esto problemas, como el silenciamiento génico (Gelvin, 2000).

Independientemente de la información disponible sobre la regeneración *in vitro* en *Phaseolus vulgaris*, la transformación genética presenta grandes limitaciones debido a que es genotipo dependiente y a la escasa estandarización de parámetros para la transferencia de ADN tales como: genotipo, cepa bacteriana, plasmidio, fotoperíodo, concentración de la bacteria, edad del explante y el agente selectivo. Por consiguiente, solamente un informe ha sido publicado para la producción de plantas transgénicas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris*, donde se combinan la sonicación e infiltración al vacío como tratamientos físicos al explante en la transferencia de genes por esta vía (Liu *et al.,* 2005).

Por tanto sería de gran interés mejorar la eficiencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de *Phaseolus vulgaris*, mediante la combinación efectiva de parámetros como: tiempo de cocultivo, edad del explante, concentración bacteriana, plasmidio, cepa de la bacteria, además del empleo de un sistema eficiente de selección de los tejidos transformados que facilite su recuperación. La cual permitirá la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* del cultivar cubano de frijol CIAP 7247F logrado a partir de métodos tradicionales con genes integrantes del banco de germoplasmas del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos trazamos los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

Estandarizar parámetros para la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247F.

De este objetivo general se derivan los objetivos específicos siguientes:

**Objetivos específicos:**

1- Determinar la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial Glufosinato de amonio para la transformación genética en callos de *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247F.

2- Determinar las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247F.

3- Transformar callos de *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247F con los parámetros estandarizados.

# 2. Revisión Bibliográfica

## 2.1 *Phaseolus vulgaris* L.

### 2.1.1 Clasificación y características morfofisiológicas

El frijol común (*Phaseolus vulgaris)* es una leguminosa, predominantemente autógama, domesticada por el hombre hace más de 7000 años en dos centros de origen: Mesoamérica (México y América Central) y la región Andina (Kaplan 1981). Es una planta herbácea, de ciclo anual que se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas. El sistema radicular es poco profundo y está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación. El tallo principal es herbáceo; se desarrolla en forma de hierba voluble, es decir que el tallo crece en espiral alrededor de un soporte, o también puede ser rastrero en cuyo caso, este se extiende por el suelo y sus rizomas corren en posición horizontal. Es una planta perenne o anual. Posee hojas, con folíolos enteros o a veces lobulados y también son estipeladas. Las flores son en racimo y en general son racimos paucifloros. La flor de esta especie está compuesta en su parte masculina por 10 estambres diadelfos; y en su parte femenina por un estilo largo y espiralado, un estigma apical alargado y oblicuo. El fruto es una legumbre lineal, cilíndrica, polisperma, bivalva y dehiscente. Las semillas son reniformes o subcilíndricas, con germinación epígea o hipógea (Gepts *et al*., 2005). Se distingue por ser una planta altamente poliforme, ya que es posible distinguir variaciones fenológicas entre la misma especie de una región a otra (Romero, 1993).

Su ubicación taxonómica fue dada a conocer por Linnaeus y en la actualidad se acepta de la siguiente forma (según *NCBI taxonomy*, disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov):

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Rosidae*
Orden: *Fabales*
Familia: *Fabaceae*
Subfamilia: *Faboideae*

Tribu: *Phaseoleae*
Subtribu: *Phaseolinae*
Género: *Phaseolus*
Especie: *P. vulgaris*

### 2.1.2 Situación mundial y distribución

La producción mundial de frijoles secos ronda los 19-23 millones de toneladas métricas (TM) anuales, que se siembran en 26 millones de hectáreas (ha) de las cuales 7 millones son producidas en América Latina y África (Broughton *et al.* 2003). En estos sitios constituyen una importante fuente de proteínas y calorías, pues, la proteína animal es limitada y el consumo de frijol satisface el requerimiento proteico. Además, el frijol común cuenta con el 22% de la proteína total consumida por los humanos en el mundo (Sánchez *et al*. 2005). Brasil es el principal productor universal de frijol, y logra una producción de 2.8 millones de TM. La India es el otro gran productor mundial, con un 31% del área y una participación del 14% en la producción mundial. En Cuba la producción de frijol en el 2010 fue de 80 400 t/año y se cosecharon alrededor de 11 2702 ha, para un total de 23 millones de TM. (FAOSTAT, 2010).

El frijol se cultiva en gran diversidad de climas entre los 0 a 3000 m.s.n.m. y sus mayores rendimientos se obtienen en zonas donde la temperatura promedio oscila entre los 15 y 27°C. Temperaturas promedio superiores a 27°C favorecen el desarrollo vegetativo, pero ocasionan el aborto y desprendimiento de las flores, reduciendo el número de vainas y de semillas por planta. Este grano se produce en regiones con 1500 a 2600 mm de precipitación anual, aunque teóricamente de 300 a 400 mm de lluvia bien distribuidos son suficientes para obtener una buena cosecha. El exceso o déficit de lluvia son igualmente perjudiciales para la producción, pues inciden directamente en el desarrollo de la planta y la susceptibilidad a enfermedades (Broughton *et al.* 2003).

### 2.1.3 Importancia económica

Entre las especies de leguminosas, el fríjol común es considerado económicamente el más importante y es ampliamente cultivado; ocupa más del 90% del área cultivada total

de especies de *Phaseolus* en todo el mundo. En particular, en países de Asia, África y América Latina representa una de las principales fuentes calórico-proteicas para cerca de 500 millones de personas (Broughton *et al.*, 2003). Se ubica como promedio, entre los cinco cultivos con mayor superficie dedicada a la agricultura en todos los países latinoamericanos. En América Central y del Sur se cultiva el 34% de la producción mundial de frijol (Peña, 2002). Diferentes autores (Castellanos*., et al* 1997; Pérez., *et al* 2002) han destacado las propiedades nutritivas que posee el fríjol, de manera fundamental su alto contenido en proteínas y en menor medida en carbohidratos. La semilla del frijol contiene entre 20%-25% de proteína, y la phaseolina es la principal. Contiene biotina la cual es un factor esencial para una variedad de carboxilasas y descarboxilasas establecidas en diversas vías metabólicas de todos los organismos (Herrera *et al.,* 2005). Se ha determinado que el fríjol no sólo suministra proteínas y carbohidratos, también tiene cantidades importantes de vitaminas y minerales. Además se destaca en este cultivo la presencia de antocianinas, indispensables en la prevención de enfermedades, entre ellas el cáncer de colon, la arterosclerosis y las inflamaciones intestinales, además contribuye a la prevención y tratamiento de patologías como la diabetes, por su aporte de micronutrientes así como por su alto contenido de aminoácidos, taninos, fitoestrógenos, fibra y aminoácidos no esenciales (Rodríguez y Fernández 2003). Frente a las tendencias de crecimiento de la población y de consumo de frijoles, puede ser esperado un aumento de la demanda para América Latina y África a niveles sin precedentes. Este incremento podrá asumirse solamente si son desarrollados nuevos cultivares de frijol con rendimientos más altos, resistencia múltiple a enfermedades y mayor tolerancia a la sequía y la baja fertilidad del suelo. Esto permitirá aumentar la productividad del frijol y alcanzar una mayor estabilidad del rendimiento (Popelka *et al*., 2004). Debido a la creciente demanda de nuevas variedades los programas de mejoramiento genético buscan tecnologías que aceleren el desarrollo de estas en el menor tiempo posible. Entre las herramientas con potencial para ello está la transformación genética, la cual posibilita la introducción de genes de especies afines o distantes.

## 2.2 Mejoramiento genético

El mejoramiento genético del frijol tiene como finalidades principales: desarrollar germoplasmas básicos para sistemas de cultivos que utilicen alta, baja o ninguna tecnología y establecer estrategias para el manejo de plagas y enfermedades que culminen con el lanzamiento de nuevas variedades adaptadas a condiciones especificas (Díaz *et al.*, 2004). Aunque el mejoramiento del frijol ha tenido resultados en las últimas décadas, para acelerar la obtención de nuevas variedades, es necesaria la búsqueda de genes nuevos en especies salvajes de *Phaseolus* y en especies distantes, relacionadas o no con el frijol. Muchos genes de interés para el mejoramiento genético, como los de resistencia a plagas y enfermedades, no están disponibles, debido a las barreras de cruzamientos interespecíficos. Algunas de estas barreras pueden ser eliminadas con el auxilio de técnicas como el rescate de embriones, asociados a las retrocruzas realizadas. Esta estrategia de introgresión de genes además de muy demorada y costosa, está limitada a pocas especies salvajes. El Centro Internacional de Agricultura Tropical viene trabajando en esta línea de investigación desde 1980, obteniendo resultados en la integración de genes que confieren resistencia al complejo bacteriano común, al saltahoja y tolerancia a la sequía; lo que es todavía considerado poco en relación a las necesidades actuales del mejoramiento genético en frijol (Acostas-Gallegos *et al*., 1997).

En la Universidad Central “Marta Abreu”de Las Villas, se obtuvo la variedad CIAP 7247F por selección a partir de la línea 7247 del banco de germoplasma de frijol procedente de una colecta realizada en la zona noreste de la provincia de Sancti Spíritus. Esta variedad fue estudiada desde 1982 hasta 1998 en la Estación Experimental Agrícola de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas y probada a nivel de extensión y generalización en distintas unidades de producción de la región central del país. Su rendimiento potencial es de 2500 Kg/ha y el medio experimental de 1737±592 Kg/ha, muy superior al rendimiento medio de este cultivo (700 kg/ha) en el país. En adición esta variedad es tolerante al mildium polvoriento y la bacteriosis, sin embargo es afectada por la roya, el virus del mosaico y la empoasca que causan pérdidas en cosecha entre 30 y 70%. (Quintero, 2000).

Debido a la creciente demanda de nuevas variedades, los programas de mejoramiento genético han buscado tecnologías que aceleren la obtención de estas. Entre las herramientas utilizadas está la transformación genética, que posibilita la introducción de genes de especies afines o más distantes. Para esto es necesario el desarrollo de protocolos eficientes, los cuales permitan estudios genéticos básicos aplicados (Gatica Arias *et al*., 2010).

### 2.3 Cultivo de tejidos en *Phaseolus*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales juega un papel importante en la manipulación de las plantas para su mejoramiento genético a través de la biotecnología. Actúa como intermediario entre la biología molecular y los métodos de transformación genética (Smith y Drew, 1990). En la mayoría de los trabajos de transformación genética de vegetales, ha sido requisito el disponer de un sistema de regeneración *in vitro* de plantas (Kobayaschi *et al*., 2003).

La regeneración de frijol común a partir del cultivo de tejidos se ha alcanzado con cierto grado de éxito en los últimos años. Sin embargo los efectos del genotipo en la capacidad regenerativa, así como la eficiencia y reproducibilidad han sido factores limitantes (Gelvin *et al*., 2003). Kartha *et al*, (1981) investigaron el proceso de regeneración de plantas a partir del cultivo de meristemos en algunas de las más importantes legumbres, para la crioconservación del germoplasma, utilizando un medio complementado con varias concentraciones de BAP. El BAP es una citoquinina, empleada en los medios de cultivo, para estimular la división celular (junto con otras auxinas) y reactivar la actividad de los brotes laterales. También induce la formación de brotes adventicios (Gaspar *et al.* 1996). Malík y Saxena (1991) argumentan que en el primer trabajo de regeneración de esta especie, sólo dos plantas fueron regeneradas en un medio que contenía extracto de semilla de frijol en una composición no definida. Además, Aragão y Rech (1997) mencionaron los efectos del BAP en la proliferación de brotes en ejes embrionarios del frijol común y el frijol Tepary en Mesoamérica. Sus resultados demostraron inducción prolífica de brotes múltiples. En un estudio realizado por Mohamed *et al*. (2006), en *Phaseolus angularis,* para promover el desarrollo de yemas y la inducción de brotes múltiples, los brotes adventicios fueron mantenidos en un medio de multiplicación que

consiste en sales MS (Murashige y Skoog 1962), vitaminas B5 y suplementado con 5 µM de BAP. Russell *et al.* (1993) obtuvieron las primeras plantas transgénicas de frijol común, vía descarga eléctrica de partículas recubiertas de ADN, aunque a muy bajas frecuencias de regeneración (0.03%). En Brasil, Aragão *et al. (*1996), lograron regenerar plantas transgénicas de frijol de la variedad andina "Olathe" a una frecuencia promedio de 0.9%. En este caso, se indujo la formación de brotes a partir de los meristemos apicales de ejes embrionarios bombardeados con micro proyectiles, impulsados por helio. Aragão y Rech (1997) encontraron varios aspectos anatómicos que inciden en la baja frecuencia de regeneración de plantas transformadas de frijol. Esto se logró con el examen de la morfología de los ápices meristemáticos de 17 cultivares andinos de tipo "Carioca" y "Jalo". En algunos cultivares, la región del meristemo apical está parcialmente o bastante recubierta por los primordios foliares, lo que dificulta la penetración de los micro proyectiles cubiertos de ADN por biobalística. En aquellos cultivares donde el grado de exposición del meristemo apical fue de 100%, lograron inducir múltiples brotes e incrementar la frecuencia de regeneración de plantas transgénicas a partir de los meristemos apicales bombardeados. Por otro lado, Albino (2005) desarrolló un método alternativo para la regeneración *in vitro* del frijol, que generó plantas vía organogénesis a partir de callos inducidos del cultivo de yemas apicales de ejes embrionarios de la variedad brasileña "Olathe Pinto". Este es un procedimiento bastante eficiente de regeneración *de novo* de plantas fértiles de frijol, donde se generaron unas 8 plantas enraizadas por callo, empleando 0.5mg/l de thidiazuron (TDZ) y 0.25mg/l de ácido indolacético (AIA). Los análisis histológicos confirmaron una neoformación de plantas vía organogénesis.

## 2.4 Transformación genética

La transformación genética se caracteriza por la introducción controlada de ácidos nucleicos en un genoma receptor (Potrykus, 1991). Actualmente gracias a las técnicas biotecnológicas, es posible la introducción en el genoma vegetal de características encontradas en otras plantas, animales, virus o bacterias.

Para la fijación de genes de especial interés y la introducción de genes que mejoren características agronómicas como: la resistencia a plagas, arquitectura o capacidad fotosintética de la planta y el valor nutricional de la misma (Aragao *et al*., 1996). El desenvolvimiento de la transformación genética, también ha posibilitado la eliminación de barreras como la incompatibilidad sexual existente entre individuos, posibilitando la transferencia de genes entre organismos genéticamente distantes, ampliando considerablemente, la formación de nuevas combinaciones que por el método convencional no ocurrían. Permite en un corto espacio de tiempo la introducción de genes de interés en cultivares de alto valor comercial, eliminando con esto las necesidades de cruzamientos que en programas de mejoramiento convencional pueden durar años. El frijol, así como otras leguminosas, presentan numerosas dificultades para la transformación genética. Estas van desde el cultivo de tejidos, regeneración de plantas y transformación genética, ante problemas de reproducibilidad, aplicabilidad en otras variedades y baja frecuencia de transformación (Zambre *et al*., 2001).

### 2.4.1 Métodos de Transferencia de ADN al genoma de la planta

Existen diversos métodos de transferencia de ADN al genoma de la planta, la elección del mejor método depende de la especie a ser transformada, el tipo de material vegetal utilizado (callo, tejido, protoplasto), la capacidad de regeneración de la especie, la disponibilidad de recursos, entre otros factores (Sanford *et al*., 1993). La transformación genética utiliza básicamente dos estrategias para realizar la transferencia de ADN a las plantas: la directa (métodos físicos) y la indirecta (vectores biológicos) (Hansen y Wright, 1999).

**Transferencia directa de ADN**

Entre los métodos de transferencia directa de ADN, podemos mencionar la microinyección, la transformación de protoplastos por polietilenoglicol o por electroporación o bombardeo con microproyectiles (biobalística). El objetivo común de

todos estos métodos consiste en eliminar la barrera de la pared celular y la membrana citoplasmática para permitir la libre penetración del ADN en la célula. En los métodos de transferencia directa son utilizadas moléculas simples de ADN, que constan de un pequeño fragmento de expresión. Estos fragmentos de expresión están constituidos por marcadores de selección, que son donados en plásmidos con origen de replicación de *Escherichia coli* y un gen marcador de resistencia a determinado antibiótico, utilizado en la selección de las bacterias que llevan el inserto. Los vectores de transformación genética generalmente poseen un tamaño de 4 a 7kb. Plásmidos de menor tamaño generalmente presentan menor estabilidad en la transferencia genética directa (Aragao y Rech, 1998). En la transferencia directa de ADN el principal método es la biobalística. La transformación por biobalística es una técnica versátil, pudiendo ser utilizada en la transformación de diferentes tipos de tejidos, órganos o células, independientemente del genotipo. La transformación puede ser realizada en suspensiones celulares, callos, embriones inmaduros, parte de embriones maduros, meristemos, polen, microspora. Especies agronómicas consideradas recalcitrantes para la transferencia de genes vía *Agrobacterium* han sido transformadas con auxilio de esta tecnología. Este sistema utiliza gas helio a alta presión para la aceleración de microproyectiles de un metal con alta densidad, en forma esférica, con un diámetro de 0,2 a 4um y velocidad de 300 a 600ms-1, suficiente para penetrar las paredes y membranas celulares. Estos proyectiles cargan moléculas de ADN precipitadas en una superficie donde son liberadas en los tejidos vegetales (Rech y Aragao, 1998).

Plantas transgénicas estables de *Phaseolus vulgaris* fueron obtenidas a partir de embriones, inicialmente, utilizándose un acelerador eléctrico de partículas recubiertas con ADN. La baja tasa de obtención de plantas transgénicas (0,03%) fue atribuida al protocolo de regeneración, que además de ser un proceso demorado, presenta una regeneración media de apenas dos brotes por explante (Russell *et al*., 1993). Plantas transgénicas estables también fueron obtenidas por otros investigadores, utilizando biobalística. Kim *et al*., (1996), obtuvieron seis plantas transformadas a partir de 319 embriones bombardeados (9%), Aragao *et al*., (1996) obtuvieron 27 plantas transgenicas

a partir de 3079 embriones (0,9%) y Aragao *et al*., (2002) obtuvieron dos plantas tolerantes al glufosinato de amonio, en 11607 embriones bombardeados (0,02%), con pérdida de parte del plásmido en ambos eventos. Estos estudios demuestran la baja eficiencia de transformación, así como la pérdida de estabilidad que presenta este método directo de transferencia de ADN, en la obtención de plantas transformadas.

**Transferencia indirecta de ADN**

La transferencia indirecta utiliza un vector biológico para promover la transferencia de ADN deseado a la planta. Algunos virus como caulimovirus y geminivirus, tienen la capacidad de infestar y transferir el ADN al genoma de la planta de un amplio espectro de especies vegetales, inclusive monocotiledóneas. Sin embargo estos virus no son utilizados frecuentemente como vectores de ADN a las plantas, son de gran importancia para el desenvolvimiento de la biología molecular. De ellos fueron aislados secuencias importantes como el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coli-flor (CaMV35S), de gran utilidad en construcciones genéticas utilizadas en experimentos de transformación. El principal vector utilizado en la transferencia indirecta de ADN al genoma vegetal es *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton *et al*., 1977). Las especies del género *Agrobacterium* son bacterias Gram-negativas aeróbicas, saprofítitas, cuyo hábitat es la materia orgánica en descomposición, constituyendo componentes ubicuos de la microbiota del suelo (Zhu *et al*., 2000). Sin embargo, algunas de estas especies causan enfermedades neoplásicas en plantas. Por ejemplo, *Agrobacterium rhizogenes,* causante de la formación de raíces adventicias; *Agrobacterium rubi* (enfermedad de la agalla de la caña), *Agrobacterium tumefaciens* (enfermedad de la agalla de la corona) y *Agrobacterium vitis* (agalla de la corona de la uva) (Chilton *et al.,* 1977). Estas enfermedades han sido descritas como una forma de “colonización genética”, debido a que se caracterizan por la transferencia y expresión de un conjunto de genes hacia las células de la planta que causan un crecimiento celular incontrolado y la producción por estas células de sustancias nutritivas para la bacteria. Estas sustancias, conocidas como opinas, son aminoácidos de bajo peso molecular y derivados fosfatados de azúcares (Schell *et al.,* 1979).

### 2.4.2 Transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* constituye uno de los métodos más utilizados para la introducción de genes en células vegetales, capaz de regenerar plantas transgénicas, por ser un sistema simple, eficiente y barato (Firoozabady y Kuehnle, 1995). La demostración por Chilton *et al*. (1977), de que a causa de la proliferación celular del tumor ocurre la transferencia de información genética de la bacteria a la célula vegetal, constituyó el punto de partida para la utilización de este sistema natural de transferencia de genes a las plantas. La característica de la enfermedad causada por *Agrobacterium tumefaciens es* resultado de la transferencia de un segmento de ADN (ADN-T) del plasmidio inductor de tumores (Ti) hacia la célula hospedera, su integración en el genoma y la expresión de los genes que contiene. El plasmidio Ti contiene dos componentes necesarios para la transformación: los genes *vir* y la región ADN-T (Gelvin 2003). Los genes *vir* codifican la mayor parte de las proteínas necesarias para el procesamiento, transporte y entrada al núcleo del ADN-T (Tzfira y Citovsky 2000). La región ADN-T contiene dos clases de genes: oncogenes y genes del metabolismo de opinas. Los oncogenes codifican proteínas para la síntesis de reguladores del crecimiento como auxinas y citocininas, así como para la modificación del efecto de estas substancias en la célula (Zhu *et al.,* 2000). Los genes del metabolismo de opinas codifican funciones de síntesis, captación y catabolismo de estos compuestos. Existen más de 20 clases de opinas descritas, de manera que cada cepa de *Agrobacterium* induce la producción y luego metaboliza un conjunto específico de estas. Estos conjuntos varían entre especies y solo unas pocas opinas son encontradas en varios a la vez (Escobar y Dandekar 2003). La región ADN-T, sin embargo, no contiene ninguna secuencia señal, ni codifica ninguna función de transporte o integración. De hecho, solo los bordes de este fragmento, que contienen repeticiones directas de 25 pares de bases, son necesarios como substrato de la integración, lo cual permite la substitución de los genes del ADN-T por genes de interés sin afectar el proceso de transformación (Scheiffele *et al.,* 1995). Precisamente aquí

radica la clave del uso tan extendido de *Agrobacterium* en ingeniería genética. El cocultivo de células o tejidos con *Agrobacterium tumefaciens* es el procedimiento más utilizado para transformar plantas dicotiledóneas (Tecnociencia, 2003). Este método se aplicó con éxito por primera vez en 1984 en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y girasol (*Helianthus agnus* L). Las leguminosas son plantas recalcitrantes, es decir que son difíciles de regenerar *in vitro*. Algunos autores afirman que las leguminosas y en particular el frijol, han presentado dificultad en organogénesis *in vitro* y embriogénesis somática; y otros procesos de regeneración usados en otras especies vegetales no han sido posibles en leguminosas (Diego- García, *et al.,* 2001). La transformación genética de frijol presenta dificultades, ya que no existe un protocolo eficiente de regeneración de plantas.

#### 2.4.2.1 Ventajas del sistema de transformación vía *Agrobacterium*

El sistema de transformación genética vía *Agrobacterium* es bastante atractivo, porque exige un costo mínimo en equipamientos y protocolos relativamente simples, aunque muchas especies presenten dificultad de transformación como las monocotiledóneas y muchas leguminosas (Ochoa *et al*., 2006). Resulta de la integración de un segmento de ADN preciso, definido por los bordes derecho e izquierdo del ADN-T, además de presentar otras ventajas como transferir segmentos relativamente grandes de ADN, introducir pocas copias de este segmento (en general una o dos) e integrarlo fácilmente en regiones especificas del genoma de la planta. Aunque algunos trabajos muestren la integración de múltiples copias, transformantes conteniendo copias únicas pueden ser fácilmente recuperados (Pagel *et al.,* 2004). Un menor número de copias evita problemas, como el silenciamiento génico, bastante común en sistemas de transformación por métodos directos.

## 2.5 Factores que influyen en la eficiencia de la transformación con *A. tumefaciens*

### 2.5.1 Cepa bacteriana y plasmidio

Existe una serie de factores que influyen en la eficiencia de la transformación de tejidos vegetales por *A. tumefaciens.* Uno de los más importantes es la virulencia de la cepa bacteriana utilizada (Grant *et al.,* 2003). De manera general existen cepas con virulencia baja, moderada o alta (Maheswaran *et al.,* 1992). Varios autores refieren las ventajas de

cepas altamente virulentas en cuanto a la eficiencia de la transformación (Lulsdorf *et al.,* 1991; Nadolska-Orczyk y Orczyk 2000), sin embargo otros trabajos demuestran la ventaja del uso de cepas menos virulentas cuando la planta desarrolla naturalmente una respuesta necrótica a *Agrobacterium* (Wroblewski *et al.,* 2005).

Las especies vegetales difieren grandemente en el grado de susceptibilidad ante la infección por *Agrobacterium* (Anderson y More, 1979). Lo mismo ocurre dentro de especies, cultivares o genotipos donde puede haber diferentes niveles de susceptibilidad al proceso de tumorogenésis por una raza particular de *Agrobacterium* que puede contener diferentes plasmidios. Esta diferencia ha sido observada en leguminosas (Schroeder *et al*., 1993), arabidopsis (Nan *et al*., 1997), eucalipto (Mullins *et al*., 1997) y otras especies. Cepas de *Agrobacterium* ampliamente usadas tales como: LBA4404, EHA101, EHA105 (pC3301), AGL, C58C1RifR (pGv2260), C58C1 (pMP90+pC3301) y han sido reportadas como capaces de infestar un amplio rango de variedades de especies de legumbres (Hellens *et al*., 2000).

Sin embargo además de el grado de susceptibilidad ante la infección por *Agrobacterium,* algunas diferencias en la frecuencia de transformación también pueden ser atribuidas a factores ambientales y fisiológicos, como el tipo de explante utilizado para la transformación, el tiempo de cocultivo, temperatura, fotoperíodo, edad del explante, y la concentración bacteriana (Tzfira *et al* .,2002).

### 2.5.2 Temperatura

El efecto de la temperatura durante el cocultivo sobre la distribución del ADN-T fue primeramente descrito en especies de dicotiledóneas. La temperatura de 22ºC se encontró que era óptima en la distribución de ADN en callos de *Phaseolus acutifolius* y hojas de tabaco (Dillen *et al*., 1997). Sin embargo, en otros trabajos, el co-cultivo a 25ºC permitió la transformación de un número más alto de plantas de tabaco, aunque 19 ºC fue óptima para la distribución del ADN (Salas *et al*., 2001). Estos resultados indican que la temperatura óptima para la transferencia del ADN puede no ser óptima para una transformación estable de una especie dada y explante. La temperatura óptima para una transformación estable debe ser evaluada para cada explante específico y cepa de *Agrobacterium* involucradas (Salas *et al*., 2001).

Estudios sobre el proceso de tumorogénesis han revelado que el desarrollo del tumor producido por *Agrobacterium* no se obtiene a altas temperaturas debido a un cambio conformacional de la proteína *vir*A, que ocurre a temperaturas cercanas a 32°C (Jin *et al*., 1993). La temperatura óptima para el co-cultivo depende del tipo de planta y explante, y se resalta que es mejor el uso de temperaturas cercanas o inferiores a 25°C. Además, temperaturas por encima de 25°C causan un mayor necrosamiento del tejido y una reducción en la tasa de transformación (Ortega *et al.,* 1991). Se ha asumido que las moléculas de señal, por ejemplo los fenoles de plantas y azúcares que potencian la expresión del gen *vir* regulón y del ADN son liberados de las plantas dañadas, sin embargo se ha mostrado recientemente que *Agrobacterium* puede inducir el gen *vir* y la transferencia del ADN a células de plantas aún en aparente ausencia de heridas (Brencic *et al*., 2005). Estos estudios no excluyen la posibilidad de que *Agrobacterium* por sí misma cause heridas microscópicas a través de la liberación de enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas; sin embargo los datos obtenidos indican que *Agrobacterium* puede sensibilizarse en niveles muy bajos que necesitan incitar tumores detectables. Estas observaciones llevan a preguntas inquietantes con respecto a la extensión en la naturaleza de células de plantas transformadas por *Agrobacterium* sin consecuencias discernibles fenotípicas y también sugiere la posibilidad de que *Agrobacterium* puede establecer contactos productivos con un rango mucho mas amplio de especies de plantas y tipos de células que los hasta aquí identificados.

### 2.5.3 Condiciones de iluminación y tiempo de cocultivo

En general las condiciones de luz, así como el tiempo de cocultivo varían considerablemente si se comparan diferentes protocolos de transformación de plantas. Existen varios datos comparativos sobre este aspecto. Dmgaard y Rasmussen (1991) reportaron incrementos de la velocidad de transformación en plantas de *Brassica* con *Agrobacterium* bajo condiciones de iluminación. En consecuencia, no es posible juzgar en qué fase las condiciones de luz fueron cruciales para el incremento de la transformación. Escudero y Hohn (1997) informaron la inhibición de la transferencia de ADN en semillas de tabaco intactas rociadas con *Agrobacterium tumefaciens* y mantenidas en la oscuridad durante tres días.

La Transferencia de ADN es un proceso estrechamente regulado y múltiples factores de ambas: la planta y las células bacterianas son requeridos simultáneamente para el proceso de transformación (Tzfira y Citovsky, 2002) cualquiera de estos factores pudieran afectar la respuesta ante diferentes condiciones de luz y tiempo de cocultivo empleados. Por parte de la bacteria, la eficiencia de la transferencia del ADN depende grandemente de cuán eficientemente los genes *vir* son inducidos.

### 2.5.4 Edad del explante

La eficiencia de la transferencia de ADN vía *Agrobacterium tumefaciens* a una planta varía considerablemente, no solo entre especies de plantas y cultivares, sino también entre tejidos. Varios protocolos para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de plantas usan hojas, ápices, raíces, hypocotilos, cotiledones, semillas y callos derivados de varias partes de una planta. En otros métodos, el tejido transformado no es quitado de la planta sino que se deja en su ambiente natural, por ello la transformación tiene lugar *in planta* (George *et al.*, 2008).

El cultivo exitoso de materiales de plantas *in vitro* es grandemente influido por la edad del tejido u órgano usado como explante inicial. La edad de cualquier fragmento de tejido puede ser medido de 5 formas: 1- edad del órgano o la planta completa de la cual se deriva, 2- edad fisiológica; en lo que el tiempo que lleva a alcanzar un estado particular es influido por factores ambientales por ejemplo la temperatura, 3- edad ontogenética o fase de crecimiento. En este sentido se puede caracterizar como joven o viejo de acuerdo con la fase de crecimiento de la planta de donde procede, 4- el grado de diferenciación. Las partes más jóvenes de una planta son indinferenciadas, mientras que en las plantas más viejas se encuentran células diferenciadas procedentes del meristemo, 5- período de cultivo; que es el tiempo desde que el cultivo fue comenzado (George *et al*., 2008).

Cada uno de estos componentes de edad de tejidos puede influir en sí en un explante de una planta almacenada o de un cultivo *in vitro* previo puede ser usado para iniciar el cultivo y puede modificar el potencial morfogenético directo e indirecto.

La edad de la planta y el grado de diferenciación de los tejidos están frecuentemente interrelacionados y producen efectos interactivos *in vitro*.

El tamaño y el grado de desarrollo de ciertos órganos, particularmente cotiledones, hipocotilos y hepicotilos dependen de la edad de la planta. Los cotiledones pueden ser una fuente de factores de crecimiento (Kamisaka y Shibata, 1977) y en muchas especies los explantes de los cotiledones o hipocotilos de plantas tienen un alto potencial morfogenético. Esto se debe a que estos tejidos son esencialmente juveniles, o porque los cotiledones son fuentes de sustancias difusibles promotoras de crecimiento. Los requerimientos de la regulación del crecimiento para la iniciación de callos frecuentemente difieren de acuerdo con la edad del tejido explantado. Resultados obtenidos en experimentos de transformación directa, utilizándose cultivo de células sincronizadas, indicaron que la división celular aumenta la frecuencia de inserción del ADN, principalmente en explantes donde predominen células diferenciadas en fase G1 del ciclo celular. Cuando la transformación ocurre durante la fase de desdiferenciación celular, existe el peligro de que el ADN se integre en regiones del cromosoma que no son expresadas en algunos tipos de células o en toda la planta. Los transformantes en fase S (síntesis de ADN) y fase M (Mitótica) tienden a tener un mayor número de copias integradas. En la fase S, son observados patrones completos de integración, en cuanto en la fase M, la integración es menos frecuente (Birch, 1997). En este caso, callos en pleno crecimiento, que presentan células en todas las fases del ciclo celular son explantes favorables a la transformación vía *Agrobacterium.*

## 2.6 Selección de células transformadas

### 2.6.1 Genes marcadores de selección

Las técnicas de transformación genética generalmente llevan la transferencia del ADN de interés a pocas células. Así mismo un pre-requisito esencial es un protocolo eficiente de regeneración, aliado a un sistema de selección que posibilite la recuperación de plantas a partir de estas células (Ryder, *et al.,* 1987). Rutinariamente son utilizados genes, conocidos como marcadores de selección, originarios de hongos, bacterias, insectos o de plantas. El propósito de usar un gen de selección es dar a las células transformadas una ventaja selectiva, permitiéndoles crecer más rápido y mejor que las células no transformadas.

Esos genes marcadores de selección producen proteínas con actividades enzimáticas que confieren resistencia a las células transformadas a un determinado sustrato, permitiendo que estas se multipliquen en presencia del agente selectivo (Hadi *et al*., 2002). Un gen marcador puede ser un propio gen de interés o uno que solo conferirá resistencia a las células transformadas cultivadas con determinados antibióticos o herbicidas (Rodriguez-Uribe *et al.,* 2006). Un gen marcador ideal debe ser capaz de expresarse en cualquier célula o tejido y en un gran número de especies vegetales. La forma más común de seleccionar dos tejidos transformados es la indirecta, basada en un gen adicional, el cual confiere ventajas selectivas en condiciones específicas. Una excepción es la resistencia a herbicidas. En este caso se puede seleccionar directamente las células, tejidos o plantas transformadas a partir de genes de interés agronómico.

La utilización concomitante de dos tipos de genes marcadores es común. Normalmente utilizar los genes que confieren resistencia a antibióticos o a herbicidas, conjuntamente con genes, cuyo producto de expresión puede ser expresado por técnicas de espectrofotometría o por ensayos histoquímicos.

### 2.6.2 Genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas

Los genes de resistencia a antibióticos y herbicidas han sido ampliamente usados para la selección en leguminosas transformadas genéticamente. Entre ellos el gen de la neomicina fosfotransferasa (*npt II*); el de la higromicina fosfotransferasa (*hpt*); los genes de resistencia a herbicidas *bar* y *pat* (que codifican para la acetil fosfinotricina transferasa y confiere resistencia a biolaphos, fosfinotricina o Glufosinato de amonio) y genes que codifican para el herbicida acetolactatosintasa (*ALS*) (Miki *et al*., 2009).

La producción de transformantes quiméricos y escapes de material transgénico que sobrevive a la selección son los problemas más frecuentes que han sido descritos en la transformación de leguminosas (Popelka *et al*., 2006; Muruganantham *et al*., 2007; Saini *et al*., 2007; Thu *et al*., 2007).

El Glufosinato de amonio es un compuesto que actualmente se usa como herbicida no selectivo, que actúa sobre las partes verdes de la planta. Está registrado en más de 80 países bajo diferentes denominaciones, tales como: Basta®, Liberty®, Finale® y Rely®

(Bayer CropScience, 2005). Este herbicida contiene intrínsecamente el isómero L- de la fosfinotricina, responsable de la actividad herbicida, que inhibe la acción de la enzima glutamina sintetasa, la cual interviene en la asimilación de nitrógeno y como resultado se alcanzan niveles tóxicos de amonio en las células de la planta. La resistencia a este herbicida ha sido desarrollada a través de un sistema de detoxificación. La enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) codifica para los genes *bar* (*bialafos resistance*) y *pat* (*phosphinothricin acetyltransferase*) que convierten el Glufosinato de amonio en N-acetil glufosinato que es un compuesto no fitotóxico a la planta (Kosky *et al*., 2010).

En el género *Phaseolus* existen pocos trabajos que describen la utilización del Glufosinato de amonio para la selección de tejidos transformados, solo (Aragao *et al*., 2002) describen su empleo en la transformación genética vía Biobalística de dos cultivares de frijol. La mayoría de los trabajos en *Phaseolus vulgaris* refieren el empleo de otros agentes de selección. (De Clercq *et al*., 2002; Zambre *et al*., 2005) geneticina, (Aragao *et al*., 1993; Amugune *et al*., 2011) kanamicina.

## 2.7 Evaluación de la eficiencia de transformación

### 2.7.1 Chequeo de plantas transformadas

Mediante la transgénesis de plantas es posible obtener individuos transformados que expresen un fenotipo diferente, con características deseables en cuanto a productividad, resistencia a patógenos y a la desecación. Dentro de las estrategias de obtención de plantas transformadas, la infección con *A. tumefaciens* que contenga un transgén en su ADN-T ha sido una de las más utilizadas por la capacidad de estas bacterias de transformar un amplio rango de tipos celulares y especies vegetales. El desarrollo de un protocolo de transformación por *Agrobacterium* requiere invariablemente un método de selección de las plantas regeneradas (Birch 2003). Es por tanto muy común la utilización de marcadores de selección en los vectores de transformación, que confieran resistencia a herbicidas, antibióticos, u otras condiciones de toxicidad o estrés para la planta ((Miki *et al*., 2009).

Otra forma de selección fenotípica es la utilización de genes reporteros, esto es, que bajo determinada condición o ensayo sencillo pueda determinarse su presencia por

expresión de alguna característica fenotípica o actividad enzimática (Gelvin 2003). Dentro de los más utilizados se encuentran los genes *gusA, lucFF, gfp y grp.*

El gen *gusA* codifica una glucuronidasa que al actuar sobre el sustrato 5-bromo-4-chloro-3-indolil-â-D-glucurónido forma un producto azul fácilmente visible (Jefferson *et al.,* 1987). El ensayo puede ser realizado de manera muy sencilla por exposición del tejido vegetal supuestamente transformado a una solución del sustrato en condiciones óptimas de reacción. El producto de esta reacción no presenta oxígeno, forma dímeros, resultando un precipitado insoluble de color azul. Esta es una técnica de evaluación rápida que permite determinar la presencia de ADN transferido a los explantes mediante *Agrobacterium*. Asimismo los ensayos de *B-glucuronidasa* son extremadamente utilizados en la identificación de tejidos de plantas supuestamente transformados y también como parámetros en estudios de optimización de condiciones de transferencia de genes. En explantes inoculados con *Agrobacterium* la eficiencia de transformación puede ser cuantificada por medio de contaminación de áreas de tejidos que expresan oxidación de la *B-glucuronidasa*, o por el número de puntos azules normalmente expresados en porcentaje (Salamov *et al*., 2000). Los puntos con expresión de *B-glucuronidasa* frecuentemente cubren áreas multicelulares, mas esto puede ser debido a la difusión de productos enzimáticos de una única célula (Gepts *et al.,* 2005).

El *gen lucFF* codifica la luciferasa, una enzima aislada a partir de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) que oxida a su substrato, la luciferina, liberando energía en forma de luz. Los genes *gfp* y *grp* codifican para las proteínas fluorescentes verde y roja, respectivamente. Estas dos proteínas fluorescen espontáneamente, por lo que al igual que la luciferina en presencia de su substrato pueden ser detectadas al observar un corte del tejido vegetal en condiciones de oscuridad (Hakkila *et al.,* 2002). Los métodos de selección fenotípica son muy útiles ya que constituyen un primer y rápido tamizaje de las plantas regeneradas. Sin embargo, es necesario además verificar la inserción de la construcción transgénica en el genoma hospedero. La técnica más utilizada para esto es la amplificación de los transgenes basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) sobre ADN de la planta transformada (Gachet *et al.,* 1998). Otras técnicas, que además permiten saber el número de copias insertadas, son la hibridación por *Southern Blot y* el PCR cuantitativo (Anand *et al.,* 2003). El conocimiento del número

de copias de un transgén es importante por cuanto puede influir directamente en los niveles de expresión, además de que está relacionado con el nivel de alteración del resto del genoma (Bejar *et al.,* 2002). Generalmente es deseable la inserción de una sola copia del transgén para minimizar ambos efectos. Tanto el PCR como *Southern blot* han sido utilizados para comprobar la transformación de *Phaseolus vulgaris* (Liu *et al.,* 2005). También es importante conocer el lugar exacto donde los transgenes se insertan. Especialmente si se quiere estudiar desde el punto de vista básico qué secuencia fue interrumpida por la inserción o si se quiere validar una línea transgénica con fines comerciales. La técnica de PCR invertido permite determinar el sitio de inserción a partir de la amplificación de las secuencias flanqueantes del inserto y su posterior secuenciación (Hoshi *et al.,* 2004).

## 3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Cultivo de tejidos y Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) en el período comprendido desde octubre del 2009 hasta enero de 2012.

### Procedimientos generales

#### - Cultivo *in vitro*

Los instrumentos utilizados para la manipulación aséptica del material vegetal fueron esterilizados en estufa a una temperatura de 180°C durante dos horas antes de cada sesión de trabajo. Todas las operaciones de disección y transferencias de los explantes se realizaron en cabinas de flujo laminar horizontal. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave vertical a 121°C y 1,2 Kg/cm2 de presión durante 20 min.

### Material vegetal

Se emplearon semillas maduras de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247F, obtenidas por selección a partir de la línea 7247 en el banco de germoplasma de frijol del Centro de Investigación Agropecuaria (CIAP) de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Las semillas fueron cosechadas en casa de cultivo y la desinfección de las mismas se realizó según el protocolo propuesto por Dillen *et al*. (1997).

### Germinación de semillas

Las semillas desinfectadas fueron colocadas en un medio de cultivo de germinación que contenía las sales Murashige y Skoog (1962) (MS) 100%, 1 $ml.l^{-1}$ de tiamina, 1.13 $mg.l^{-1}$ de 6- Bencilaminopurina, (6- BAP), 45 $g.l^{-1}$ de Sacarosa y 2.5 $g.l^{-1}$ de Phytagel. El material vegetal se mantuvo durante tres días a 25 ± 2°C y en oscuridad total.

**Inducción de callos**

Una vez germinadas las semillas (Figura 1A) se eliminó la testa y se seccionó el nudo cotiledonal con un cotiledón, se separaron los cotiledones (Figura 1B) y se utilizó como explante inicial el nudo cotiledonal con un cotiledón (Figura 1C). Los explantes fueron colocados en medio de inducción de callo (MIC), que contiene sales MS, vitaminas $B_5$ (Gamborg *et al*., 1968), 0.1g.$l^{-1}$ de mio-inositol, 2.0 mg.$l^{-1}$ de tidiazuron (TDZ), 0.05 mg.$l^{-1}$ de ácido indolacético (IAA), 3.0 g.$l^{-1}$ de sacarosa y 6.0 g.$l^{-1}$ de agar (Duchefa) (pH 5.7). El material vegetal se mantuvo a 25±2°C en la oscuridad durante siete días. Concluido este período los explantes fueron transferidos a una cámara de cultivo, bajo condiciones de fotoperíodo de 16/8 luz/oscuridad por 21 días. Para la iluminación de la cámara de crecimiento se emplearon lámparas fluorescentes de 45 µmol $m^2s^{-1}$.

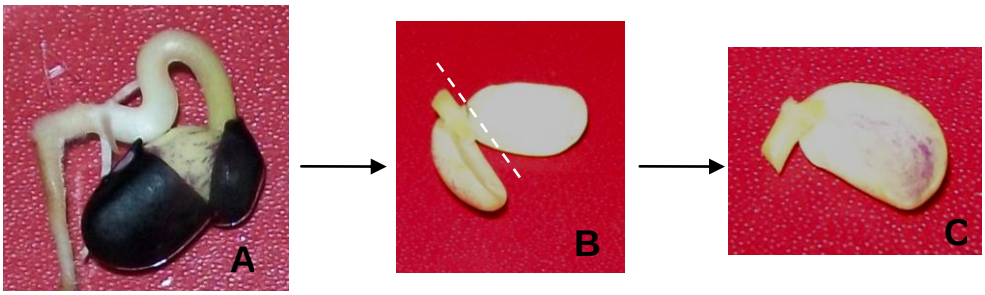


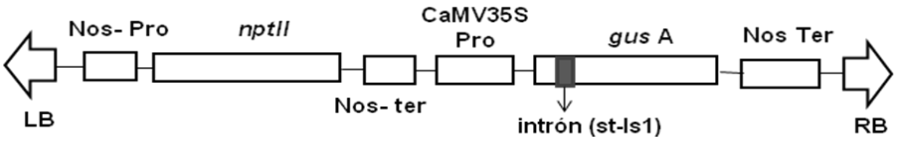

**Figura 1.** Explante inicial para la formación de callos de *P. vulgaris* var. CIAP7247F a partir de semillas germinadas. A) semilla germinada, B) nudo cotiledonal con ambos cotiledones, C) nudo cotiledonal con un cotiledón.

**- Transformación genética**

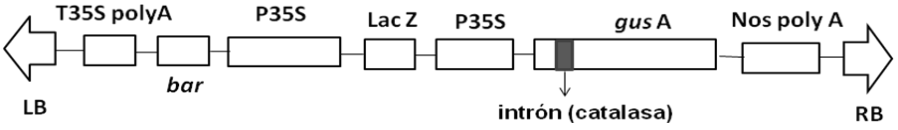
**Plasmidios**

Se emplearon para la transformación genética dos plasmidios: el pTJK136 y el pCAMBIA3301 (CAMBIA; 1997). El ADN-T del pTJK136, contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) (EC 2.7.1.95) bajo el control del promotor de la nopalina sintetasa (*nos*) y el terminador y las señales de poliadenilación de la octopina sintetasa. Este gen confiere resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y

geneticina al inactivarlos por fosforilación (Flavell, 1992). Además, la construcción contiene el gen de la β-glucuronidasa de *Escherichia coli* (*gus*A) (Jefferson *et al*., 1987) con el intrón st-ls1 de la papa (*Solanum tuberosum*), lo cual permite que este gen se exprese sólo en células vegetales. El gen *gusA* se encuentra bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV-35S) y el terminador y las señales de poliadenilación del gen *nos* (Kapila *et al*. 1997) (Fig 2A). El ADN-T del pCAMBIA3301 contiene el gen *bar* (Thompson *et al.*, 1987) que codifica para la enzima fosfinotricina N-acetil transferasa que confiere resistencia a los herbicidas que contengan fosfinotricina como producto activo. Este gen se encuentra regulado por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y el terminador 35S poliadenilado del mismo virus y el gen reportero *gusA* (Jefferson *et al.*, 1987) que codifica para la enzima β- glucuronidasa y está regulado por el mismo promotor del gen *bar* y por la secuencia terminadora T-NOS poliadenilada de la enzima nopalina sintetasa de *Agrobacterium* (Fig 2B).




**A**




**B**

**Figura 2.** Representación de la región ADN-T utilizadas en los experimentos de transformación genética. A) Plasmidio pTJK136, B) Plasmidio pCAMBIA 3301.

**Preparación de la bacteria**

Se inoculó una colonia aislada de *Agrobacterium tumefaciens* en 3 ml de medio de cultivo Luria- Bertani (LB) (Luria *et al*., 1960). Los antibióticos rifampicina (50 $mg.l^{-1}$), kanamicina (50 $mg.l^{-1}$), espectinomicina (100 $mg.l^{-1}$) y estreptomicina (100 $mg.l^{-1}$) fueron adicionados al medio de cultivo en dependencia de la cepa de la bacteria utilizada. El cultivo se mantuvo a 28°C durante 24 horas a 200 rpm. Posteriormente 100 µl del cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* se inoculó en 50 ml de medio de cultivo YEP (An *et al*. 1988), con los antibióticos apropiados y se mantuvo en las condiciones anteriormente mencionadas durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 21°C. Se decantó el medio de cultivo se lavó y resuspendió el *pellet* en el medio de cultivo de inducción de la bacteria (MIB) que contenía las sales MS al 50%, 3.9 $g.l^{-1}$ de ácido 2– [N-morfolino] etano sulfónico (MES), 1.98 $g.l^{-1}$ de glucosa, 200 µM de acetosiringona a pH 5.5. Se midió la concentración de la suspensión bacteriana y se diluyó hasta la densidad óptica deseada ($OD_{600}$). Finalmente se incubó durante dos horas a 28°C en agitación a 70 rpm en oscuridad.

**Infección y co-cultivo**

Como explantes blanco se utilizaron segmentos de callos de 4-5 mm de longitud. La infección se realizó durante 30 min a 25ºC en oscuridad a 90 rpm. Posteriormente se colocaron los callos sobre papel de filtro en una placa Petri de 9.0 cm de diámetro la cual contenía el medio de cultivo de proliferación de callos (Sales MS 100%, Vitamina B5, 0,05m $g.l^{-1}$ de AIA, 0,1 $g.l^{-1}$ de Mio-inositol, 2% de sacarosa, 6,0$gl^{-1}$ de agar, 0,04$gl^{-1}$ de TDZ, 200 µM de acetosiringona). Las placas fueron selladas con *parafilm*® y colocadas bajo las diferentes condiciones de cocultivo. Transcurrido este tiempo, los callos fueron lavados con una solución de timentina (200 $mg.l^{-1}$), secados sobre papel de filtro estéril y transferidos al medio de cultivo de selección de callos.

Para la detección histoquímica del gen *gus* se transfirieron los fragmentos de callos a tubos eppendorf de 1,5mm y seguidamente, se adiciono 250 µL del sustrato: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-glucurónido (X-Gluc) (Jefferson *et al*., 1987). El cual bajo la

acción de la enzima produce un producto incoloro (5-bromo-4-cloro-3-indolil) que sufre una dimerización oxidativa y forma un precipitado azul insoluble (dicloro-dibromo-índigo) en el mismo sitio de acción de la enzima. Luego de la incubación a 37ºC en la oscuridad durante 24h se realizó la observación de la actividad transitoria *gus* y el conteo de las áreas del callo cubierta por puntos azules con la ayuda de un microscopio estereoscópico (OLYMPUS).

**Procesamiento estadístico**

Todos los experimentos fueron desarrollados bajo un diseño aleatorio completamente al azar. Los análisis estadísticos fueron basados en la comparación de medias. Las diferencias entre los valores medios en los experimentos que no presentaron homogeneidad de varianza y distribución normal, fueron determinadas por los análisis no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskall-Wallis*. El paquete estadístico empleado fue *Statistic Packaged for Social cience* (*SPSS)* versión 18.0 sobre Windows.

### 3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial Glufosinato de amonio para la transformación genética en *P. vulgaris*

El presente experimento tuvo como objetivo determinar la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial Glufosinato de amonio para la transformación genética de *P. vulgaris* cv. CIAP7247F. Para ello se emplearon callos organogénicos, los cuales fueron colocados en el medio de cultivo de Proliferación de callos, como se describió anteriormente. Para el establecimiento de los tratamientos se adicionaron diferentes concentraciones del herbicida comercial Glufosinato de amonio (0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 y 0.60 mg. $l^{-1}$) al medio de cultivo anteriormente descrito. La solución inicial del herbicida se preparó a 15 mg.$ml^{-1}$, la cual se esterilizó por filtración y se añadió al medio de cultivo en la cabina de flujo laminar. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.7 y se esterilizó en autoclave a 121 ºC.

Los callos fueron colocados en placas Petri que contenían medio de cultivo de proliferación de callos con las diferentes concentraciones del agente selectivo para un total de seis tratamientos y un control sin inocular.

Se realizaron cuatro ciclos de selección: dos en medio de cultivo de proliferación de callos y dos en medio de cultivo de inducción de brotes (sales MS 100%, Vitamina, B5, 0.1g.$l^{-1}$ de mio-inositol, 3.0 g.$l^{-1}$ de sacarosa, 6.0 g.$l^{-1}$ de agar, 2,25 g.$l^{-1}$ de 6-Bencilaminopurina, (6- BAP). Cada 15 días se realizó el subcultivo. Se utilizaron cinco placas de Petri de 9.0 cm de diámetro por tratamiento, con diez explantes por placa.

Los callos fueron colocados en cámaras de crecimiento con fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad a 26±2°C e intensidad luminosa de 68,3-72,81 µE $m^{-2}$ $s^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes.

A las ocho semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de mortalidad de los callos y las afectaciones provocadas por el agente selectivo sobre estos.

El análisis estadístico del porcentaje de mortalidad de los callos, así como el análisis descriptivo de las afectaciones provocadas por el agente selectivo se realizó con la ayuda del Paquete estadístico *Statistic Packaged for Social cience* (*SPSS)* versión 18.0 sobre Windows. Se utilizó la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

## 3.2 Determinación de las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *Phaseolus vulgaris*

### 3.2.1 Cepa bacteriana

El presente experimento tuvo como objetivo determinar la cepa bacteriana más virulenta para la transformación genética de callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Para ello se emplearon callos cultivados en medio de cultivo de multiplicación (descrito en el acápite 3.1) 7 días después del segundo subcultivo, los cuales fueron inoculados con dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens:* C58C1 (pCAMBIA3301) y EHA105 (pCAMBIA3301). Las condiciones de infección son las que se describen en el acápite 3.1, el período de cocultivo se llevó a cabo durante tres días a 25ºC y 16/8 horas luz/oscuridad. Se emplearon cinco placas de Petri de 9.0 mm de diámetro por tratamiento, con 10 callos por placa. Este experimento se realizó dos veces en el tiempo.

La cepa de mayor virulencia fue definida por medio del ensayo histoquímico de la actividad transitoria del gen *gus* siguiendo el método descrito por Jefferson *et al*, (1987). Se evaluó el número de callos teñidos de azul y el área de estos cubierta por la tinción.

Los datos relacionados con el número de callos teñidos en azul y el área de estos cubierta por la tinción, se compararon mediante el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney* para $p<0.05$.

### 3.2.2 Plasmidios

El presente experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de los plasmidios pTJK136 y pCAMBIA3301 en la transformación genética de callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Para ello se emplearon callos cultivados en medio de cultivo de multiplicación (descrito en el acápite 3.1) siete días después del segundo subcultivo. Los callos fueron inoculados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* de mejores resultados del acápite 3.2.1. Las condiciones de infección son las que se describen en el acápite 3.1, el período de cocultivo se llevó a cabo durante tres días a 25ºC y 16 horas luz /8 horas oscuridad. Se emplearon cinco placas de Petri de 9.0 mm de diámetro por tratamiento, con 10 callos por placa.

El efecto del plasmidio en la transferencia de ADN se evaluó mediante la expresión transitoria del gen *gus* siguiendo el método descrito por Jefferson *et al*, (1987). Se evaluó el área del callo cubierta de punto azules según la escala desarrollada a partir de los resultados del acápite 3.2.1.

Los datos relacionados con el número de callos teñidos en azul y el área de estos cubierta por la tinción, se compararon mediante el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney* para $p<0.05$.

### 3.2.3 Condiciones de iluminación durante el cocultivo

El presente experimento tuvo como objetivo determinar la influencia de las condiciones de iluminación durante el cocultivo en la transformación genética de callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Para ello se emplearon callos

cultivados en medio de cultivo de multiplicación (descrito en el acápite 3.1). Los callos fueron inoculados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* de mejores resultados del acápite 3.2.1. Las condiciones de infección son las que se describen en el acápite 3.1, el período de cocultivo se llevó a cabo durante tres días a 25ºC. Se utilizó el plasmidio de mejores resultados del acápite 3.2.2. Se emplearon cinco placas de Petri de 9.0 mm de diámetro por tratamiento, con 10 callos por placa. Las variaciones en las condiciones de luz fueron: fotoperíodo de 16-8 horas/luz-Osc y oscuridad constante.

El efecto de las condiciones de iluminación en la respuesta a la transferencia de ADN se evaluó mediante la expresión transitoria del gen *gus* siguiendo el método descrito por Jefferson *et al,* (1987) y se evaluó el área del callo cubierta de punto azules según escala desarrollada a partir de los resultados del acápite 3.2.1.

Los datos relacionados con el número de callos teñidos en azul y el área de estos cubierta por la tinción, se compararon mediante el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney* para $p<0.05$.

### 3.2.4 Concentración bacteriana

El presente experimento tuvo como objetivo determinar la influencia de la concentración bacteriana y el tiempo de cocultivo en la transformación genética de callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Se emplearon callos cultivados en medio de cultivo de multiplicación (descrito en el acápite 3.1). Los callos fueron inoculados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* de mejores resultados del acápite 3.2.1. Las condiciones de infección son las que se describen en el acápite 3.1. La temperatura de cocultivo fue de 25ºC y las condiciones de luz fueron las de mejores resultados del acápite 3.2.3. Se utilizó el plasmidio de mejores resultados del acápite 3.2.2. Se emplearon cinco placas de Petri de 9.0 mm de diámetro por tratamiento, con 10 callos por placa. Se evaluaron dos densidades ópticas de la bacteria ($DO_{600nm}$): 0.05 y 0.5.

El efecto de la concentración bacteriana en la respuesta a la transferencia de ADN se evaluó mediante la expresión transitoria del gen *gus* siguiendo el método descrito por

Jefferson *et al,* (1987) y se evaluó el área del callo cubierta de punto azules según escala desarrollada a partir de los resultados del acápite 3.2.1.

Los datos relacionados con el número de callos teñidos en azul y el área de estos cubierta por la tinción, se compararon mediante el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney* para $p<0.05$.

### 3.2.5 Tiempo de subcultivo

El presente experimento tuvo como objetivo determinar la influencia del tiempo de subcultivo para la transformación genética de callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Para ello se emplearon callos cultivados en medio de cultivo de multiplicación (descrito en el acápite 3.1), los cuales se tomaron a los siete días después del primer y segundo subcultivo. Los callos fueron inoculados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* de mejores resultados del acápite 3.2.1. Las condiciones de infección son las que se describen en el acápite 3.1. La temperatura de cocultivo fue de 25ºC y las condiciones de fotoperíodo fueron las de mejores resultados del acápite 3.2.3. Se utilizó el plasmidio de mejores resultados del acápite 3.2.2 y la concentración bacteriana de mejores resultados del acápite 3.2.4. Se emplearon cinco placas de Petri de 9.0 mm de diámetro por tratamiento, con 10 callos por placa.

El efecto del tiempo de subcultivo en la respuesta a la transferencia de ADN se evaluó mediante la expresión transitoria del gen *gus* siguiendo el método descrito por Jefferson *et al,* (1987) y se evaluó el área del callo cubierta de punto azules según escala desarrollada a partir de los resultados del acápite 3.2.1 para $p<0.05$.

Los datos relacionados con el número de callos teñidos en azul y el área de estos cubierta por la tinción, se compararon mediante el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney*.

### 3.3 Transformación genética de callos de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens* y análisis molecular de líneas regeneradas

#### 3.3.1 Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens*

El experimento tuvo como objetivo obtener plantas transformadas de *P. vulgaris* var. CIAP7247F con la aplicación de los parámetros estandarizados en el presente trabajo. Después del cocultivo los callos fueron lavados con una solución de timentina (200 $mg.l^{-1}$), secados sobre papel de filtro estéril y transferidos al medio de cultivo de selección de callos con la concentración del agente selectivo de mejores resultados del acápite 3.1. El cultivo se mantuvo por dos meses con subcultivos cada 15 días. Los callos seleccionados fueron transferidos individualmente al medio de cultivo de inducción de brotes (descrito en el acápite 3.1). Los brotes regenerados fueron transferidos al medio de cultivo de elongación de plantas descrito por García *et al,* (2008). Con el empleo del protocolo propuesto por Jefferson et al. 1987, se determinó la expresión estable de la β- glucuronidasa en hojas de plantas regeneradas. Simultáneamente se sometieron al mismo tratamiento histoquímico hojas de plantas no transformadas que fueron usadas como control negativo. A las 16 horas de incubación todas las muestras fueron incubadas en etanol al 70 % (v/v) durante 12 horas para eliminar la clorofila y otros pigmentos foliares. El análisis del ensayo fue realizado por evaluación visual. La expresión estable se determinó de forma cualitativa, clasificándose como positiva si se observaba alguna porción del tejido teñido de azul.

#### 3.3.2 Análisis molecular de las líneas de plantas regeneradas

**Extracción de ADN genómico vegetal**

El ADN genómico fue aislado de las plantas T1 cultivadas en invernadero provenientes de las líneas transgénicas identificadas a través de la expresión de la β-glucuronidasa y de una planta no transformada. Para la extracción del ADN, se colectó 0.1g de tejido foliar de la primera hoja trifoliada, procedente de cada planta. Posteriormente se pulverizaron con nitrógeno líquido y se procesaron utilizando el sistema de purificación de ADN (Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kits).

Se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Luego de obtenido el ADN genómico, su integridad fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La concentración del ADN fue ajustada a 200 ng/µl para ser usados en el análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).

### 3.3.2.1 Análisis de la progenie mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

Las plantas T1 provenientes de las líneas transformadas fueron analizadas por RCP para detectar la integración del gen *gus*. Posteriormente, esta misma técnica se empleó para comprobar la presencia del gen *bar* en las plantas T1 que resultaron positivas a la amplificación del *gus*. Las secuencias de los cebadores empleados en la amplificación de los genes se relacionan en la Tabla I.

La amplificación fue realizada en un volumen de reacción final de 25 µL, que contenía: 200 µm de dNTPs, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 µM de cada primer, y 1.0 U de *Taq* polimerasa en solución tampón 1X. Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en el equipo de control térmico programable Mastercycler (Eppendorf, Alemania).

**Tabla I**: Cebadores utilizados en la detección por RCP de los genes *gusA* y *bar.* Las secuencias están escritas en el sentido 5' a 3' (leído de izquierda a derecha)

| **Gen** | **Secuencia** | | **Talla del Amplicón** |
|---|---|---|---|
| | **Directo** | **Reverso** | **(pb)** |
| *gusA* | CAGGAAGTGATGGAGCATCAG | TCGTGCACCATCAGCACGTTA | 637 |
| *bar* | CGAGACAAGCACGGTCAACTTC | GAAACCCACGTCATGCCAGTTC | 402 |

La secuencia de reacciones para amplificación del fragmento del gen *gusA* comenzó con una desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, 35 ciclos de (95°C por 50 S, 64°C

por 1.5 min, 72°C por 2.5 min) y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min. Para la amplificación del fragmento del gen *bar* la desnaturalización inicial fue a 95°C durante 3 min, 36 ciclos de (94°C por 50 S, 68°C por 1 min, 72°C por 1 min) y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (p/v) con tampón TBE 1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA). Diez µl de cada producto se mezclaron con 2.0 µl del tampón de carga (0.25 % (p/v) de bromofenol azul, 0.25 % (p/v) de xilen cianol FF y 40 % (p/v) de sacarosa). Luego se realizó la tinción con bromuro de etidio por 10 minutos y se observó en un transiluminador *MacroVue*, Pharmacia LKB mediante la incidencia de radiación ultravioleta. Como control positivo se realizó una reacción adicional, con las mismas condiciones experimentales antes descritas, y se usó como ADN molde 10 ng del plasmidio pCAMBIA 3301 que porta los genes *gus* y *bar*. Como marcador de peso molecular se usó el *GeneRuler™ DNA Ladder Mix*, Fermentas Co. Se emplearon dos controles negativos uno con ADN molde de una planta no transformada y otro donde el ADN se sustituyó por un volumen equivalente de agua y se siguieron las mismas condiciones experimentales.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial Glufosinato de amonio para la transformación genética en *Phaseolus vulgaris*

Todas las concentraciones de glufosinato de amonio estudiadas produjeron necrosis sobre los callos de *P. vulgaris* var. CIAP 7247F. Del total de los callos evaluados el 30.4% presentaron entre el 25 y 50% del callo con necrosis (Figura 1a), el 42% presentó más de la mitad del callo con necrosis (Figura 1b) y el 26.8% presentó necrosis total (Figura 1c).

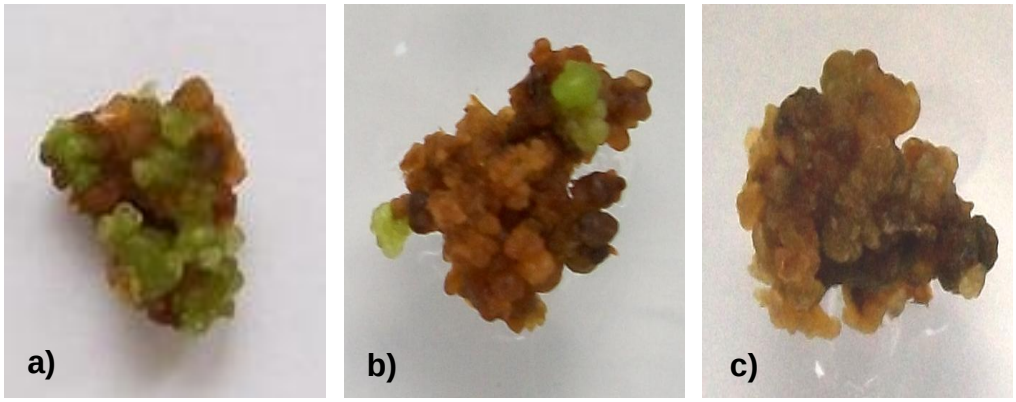



**Figura 1.** Afectaciones provocadas por el Glufosinato de amonio en callos de *P. vulgaris* var. CIAP7247F. a) Callo con un 25 y 50 % de necrosis; b) Callo con más del 50% con necrosis y c) Callo con necrosis total

Con las concentraciones del agente selectivo de 0,10, 0.20, 0,30 y 0.40 $mg.l^{-1}$ los callos presentaron desde necrosis entre el 25-50% hasta callos totalmente necrosados. Sin embargo con las concentraciones de 0,50 y 0,60 $mg.l^{-1}$ del agente selectivo el 87.5 y 93.8% de los callos presentaron necrosis total (Figura 2).

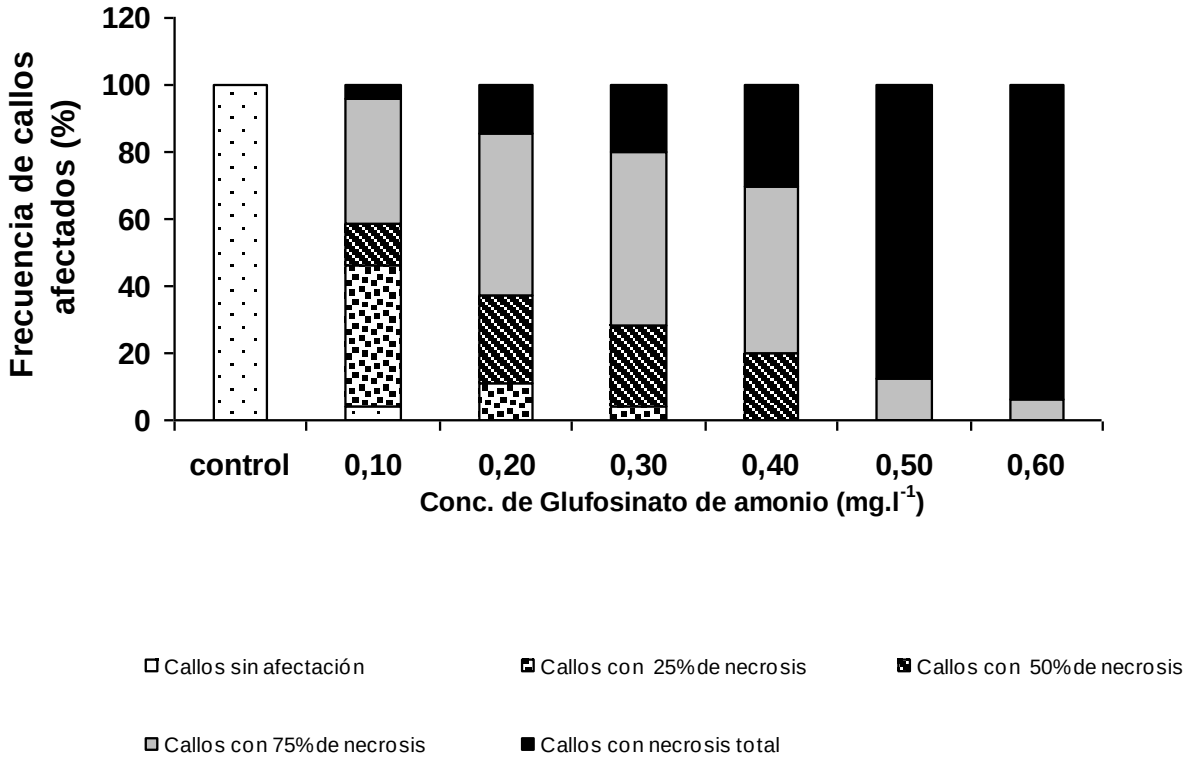



**Figura 2.** Efecto de la concentración de Glufosinato de amonio sobre callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F

Tomando en consideración los resultados de las afectaciones presentadas por los callos colocados en medio de cultivo con diferentes concentraciones del agente selectivo estudiado, se desarrolló una escala descriptiva de grados. La escala consta de cinco grados de afectación donde el grado 1 se refiere a los callos sin afectaciones y el cinco a los callos con necrosis total (Tabla II).

**Tabla II.** Escala descriptiva de grados propuesta para evaluar la afectación provocada por el Glufosinato de amonio sobre callos organogénicos de frijol cultivar CIAP 7247F a los 30 días de cultivo

| Grados de afectación | Descripción | |
|---|---|---|
| 1 | Callo sin afectación | |
| 2 | 25% del callo con necrosis | |
| 3 | 50% del callo con necrosis | |
| 4 | 75% del callo con necrosis | |
| 5 | Callos con necrosis total | |

El análisis de regresión lineal indicó que en la medida que aumentaron las concentraciones de Glufosinato de amonio se incrementó el porcentaje de mortalidad de los callos (Figura 3). Con las concentraciones de 0.50 y 0.60 $mg.l^{-1}$ del agente selectivo se produjeron porcentajes de afectación superiores al 85%. Estos resultados se correspondieron con los grados 4 y 5 de afectación provocados por el Glufosinato de amonio en los callos, según la escala de evaluación empleada, con callos con el 75% de necrosis y callos totalmente necrosados. De igual forma se observó que las concentraciones de 0.50 $mg.l^{-1}$ y 0.60 $mg.l^{-1}$ del agente selectivo produjeron los mayores valores en el grado de afectación, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla III).

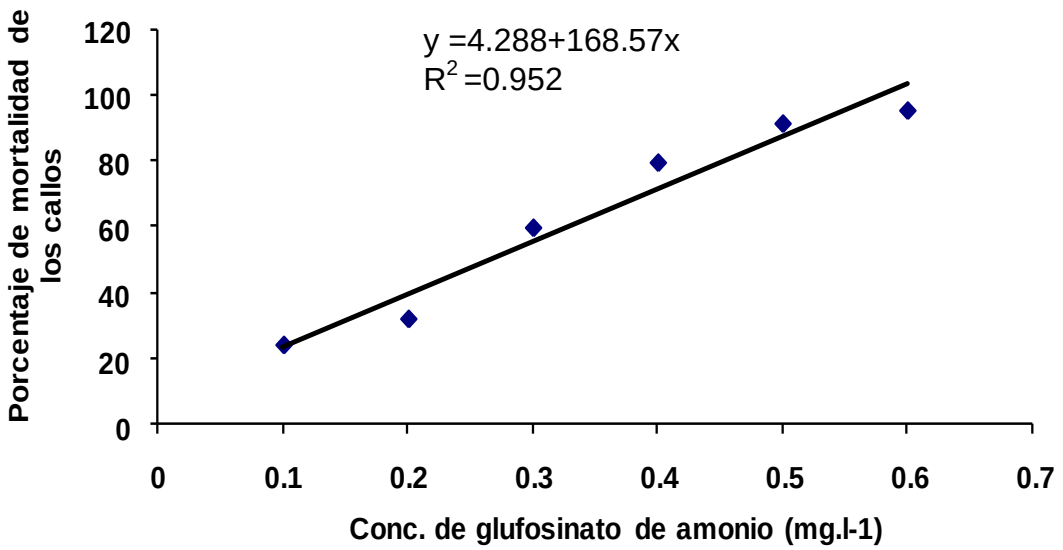



**Figura 3.** Efecto de las diferentes concentraciones del herbicida Glufosinato de amonio en la mortalidad de los callos organógenicos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F a las ocho semanas de cultivo

**Tabla III.** Efecto de las diferentes concentraciones del herbicida Glufosinato de amonio en la mortalidad de los callos organógenicos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F a las ocho semanas de cultivo

| **Concentración de Glufosinato de Amonio (mg.l$^{-1}$)** | **Grados de afectación *** | |
|---|---|---|
| | **Medias** | **Rangos medios** |
| 0.10 mg.l$^{-1}$ | 2.95 | 27.19 **c** |
| 0.20 mg.l$^{-1}$ | 3.66 | 29.00 **b** |
| 0.30 mg.l$^{-1}$ | 3.88 | 28.00 **b** |
| 0.40 mg.l$^{-1}$ | 4.10 | 25.50 **b** |
| 0.50 mg.l$^{-1}$ | 4.87 | 23.50 **a** |
| 0.60 mg.l$^{-1}$ | 4.93 | 23.50 **a** |
| Control | 1.00 | 8.50 **d** |

*Rangos medios con letras diferentes difieren significativamente para p<0.05 según la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis/Mann-Whitney*

De acuerdo con los resultados alcanzados se seleccionó la concentración de 0.50 $mg.l^{-1}$ de Glufosinato de amonio como la mínima inhibitoria, ya que a las ocho semanas de cultivo, produjo una mortalidad en los callos organogénicos de más del 85 por ciento y con predominio del grado de afectación cinco, que se corresponde con callos con necrosis total.

### 4.2 Determinación de las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F

#### 4.2.1 Cepa bacteriana

Las cepas bacterianas influyeron en la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. En todos los callos evaluados se observó la expresión *gus* transitoria independientemente de la cepa que se utilizó. Se observó que la frecuencia en el área de los callos con puntos azules varió desde menos del 25% hasta más del 75% del área teñida (Figura 4). Se determinó, que del total de callos evaluados el 68 % presentaron entre el 50 y 75% del área teñida. Sobre la base de estos resultados se elaboró una escala descriptiva para evaluar la expresión *gus* transitoria en callos de *P. vulgaris* var. CIAP 7247F. Dicha escala consta de cinco grados que expresan el área del callo teñida y comienza en grado uno que se describió como menos del 25% del área del callos cubierta de puntos azules hasta el grado cinco que incluyó los callos con más del 75% del área teñida (Tabla IV).

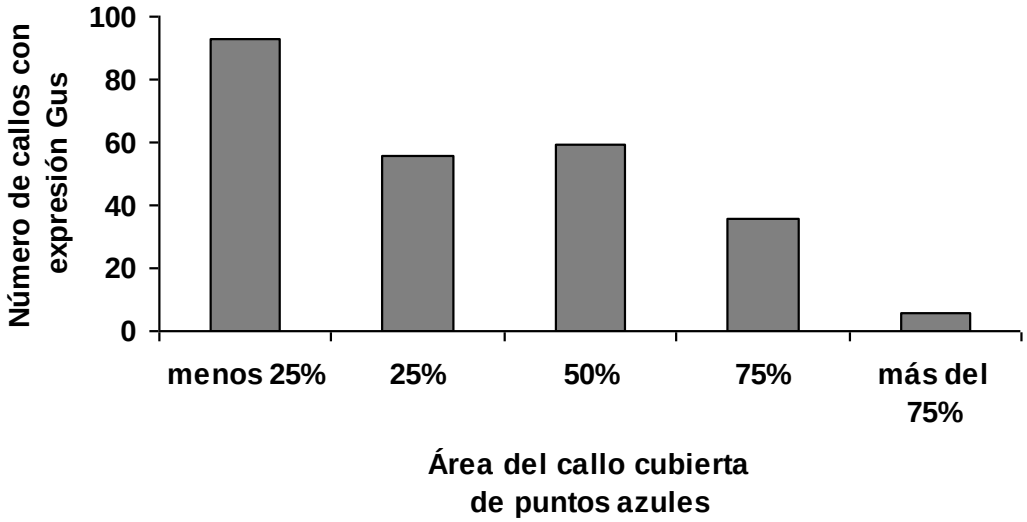
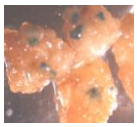
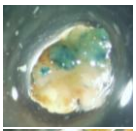
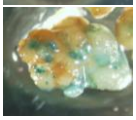
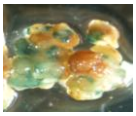
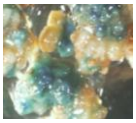



**Figura 4.** Frecuencia de callos con expresión *gus* transitoria en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F cocultivados con las cepas EHA105 (pCAMBIA3301) y C58C1(pCAMBIA3301) de *A. tumefaciens*. (n=200)

**Tabla IV.** Escala descriptiva para evaluar la expresión *gus* en callos organogénicos de *P. vulgaris* var. CIAP 7247F

| **Expresión *gus* transitoria (grado)** | **Descripción** | |
|---|---|---|
| 1 | Menos del 25% del callo teñido de azul |  |
| 2 | 25% del callo teñido de azul |  |
| 3 | 50% del callo teñido de azul |  |
| 4 | 75% del callo teñido de azul |  |
| 5 | Más del 75% del callo teñido de azul |  |

Por otro lado, respecto al número de callos teñidos de azul, no se encontró diferencia significativa y fue similar para las dos cepas de *A. tumefaciens* empleadas. Sin embargo, con la cepa EHA105 (pCAMBIA3301) se logró significativamente, el mayor valor del área del callo cubierta por la tinción, en concordancia con los grados de expresión alcanzados según la escala descriptiva utilizada (Tabla V).

**Tabla V.** Expresión *gus* (grados) en callos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F cocultivados con las cepas EHA105 (pCAMBIA3301) y C58C1 (pCAMBIA3301) de *Agrobacterium tumefaciens*

| Cepas de *A. tumefaciens* | Área del callo cubierta de puntos azules | Rangos medios |
|---|---|---|
| C58C1 (pCAMBIA3301) | 1.51 | 66.63 **b** |
| EHA105 (pC3301) | 3.09 | 121.55 **a** |

*Rangos medios con letras diferentes difieren significativamente para p<0.05 según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney*

De acuerdo con los resultados alcanzados se logró confeccionar una escala para la evaluación de la expresión *gus* transitoria en callos organogénicos de *P. vulgaris* var. CIAP 7247F que expresa el área del callos cubierta con puntos azules. Se seleccionó la cepa EHA105 (pCAMBIA3301) para la transferencia de ADN ya que produjo los mayores grados de expresión *gus* según la escala de evaluación desarrollada.

### 4.2.2 Plasmidios

Los plasmidios influyeron en la transformación genética de los callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Se observaron diferencias significativas en los grados de expresión *gus* transitoria cuando se realizó la transformación con la cepa EHA 105 con los plasmidios (pCAMBIA 3301 y pTJK 136).

Con el plasmidio pCAMBIA 3301 se logró el mayor valor del área del callo cubierta de puntos azules (3.49) según la escala de evaluación desarrollada en el presente trabajo, esto se correspondió con que la mayoría de los callos presentaron el 50% del área cubierta de puntos azules (Figura 5a). Mientras que, con el (pTJK 136) se logró 1.64 como valor promedio del grado de expresión *gus* transitoria el cual se correspondió con que los callos presentaron el 25% del área cubierta de puntos azules (Figura 5b).

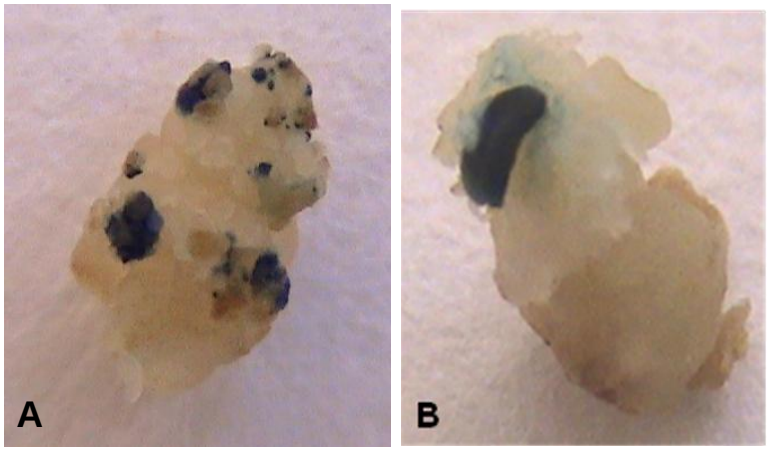



**Figura 5.** Expresión *gus* transitoria en callos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F cocultivados con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* portando diferentes plasmidios. A) pCAMBIA3301 y B) pTJK 136

Según los resultados del presente experimento se determinó utilizar para la tranformación genética de callos organogénicos de *P. vulgaris* var. CIAP7247F el plasmidio (pCAMBIA3301) ya que produjo los mayores grados de expresión *gus* según la escala de evaluación desarrollada.

### 4.2.3 Condiciones de iluminación durante el cocultivo

Las condiciones de iluminación estudiadas influyeron en la transformación genética de los callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris L*. var CIAP7247F. Se encontraron diferencias significativas en los grados de expresión *gus* transitoria cuando se realizó la transformación con las condiciones de iluminación: fotoperíodo de 16-8 horas/luz-Osc y

oscuridad constante. Con el fotoperíodo de 16-8 horas/luz-Osc se logró el mayor valor del área del callo cubierta de puntos azules (2.70) según la escala de evaluación desarrollada en el presente trabajo, esto se correspondió con que la mayoría de los callos presentaron el 50% del área cubierta de puntos azules (Figura 6a). Mientras que, a oscuridad constante se logró (1.83) como valor promedio del grado de expresión *gus* transitoria, el cual se correspondió con que los callos presentaron el 25% del área cubierta de puntos azules (Figura 6b).

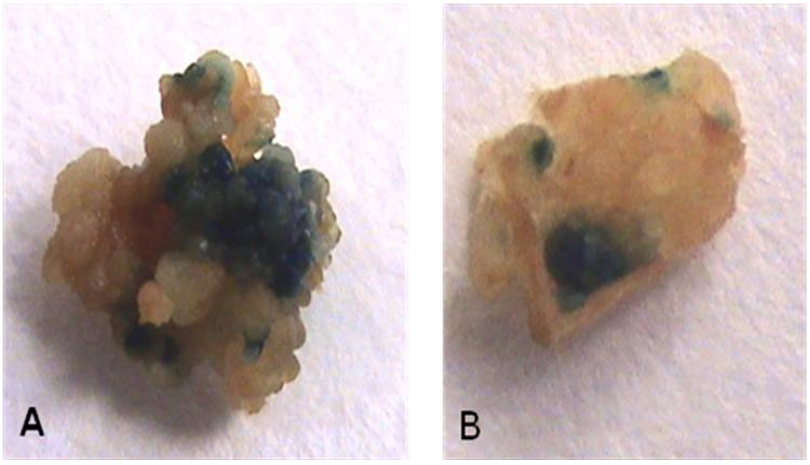



**Figura 6.** Expresión *gus* transitoria en callos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F cocultivados en dos condiciones de luz A) fotoperíodo de 16-8 horas/luz-Osc y B) oscuridad constante

Según los resultados del presente experimento se determinó utilizar para la transformación genética de callos organogénicos de *P. vulgaris* var. CIAP7247 el fotoperíodo 16-8 horas/luz-Osc ya que produjo los mayores grados de expresión *gus* transitoria según la escala de evaluación desarrollada.

### 4.1.3 Concentración bacteriana

Las dos concentraciones bacterianas estudiadas influyeron en la transformación genética de los callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Se presentaron diferencias significativas en los grados de expresión *gus* transitoria cuando

se realizó la transformación a una DO600nm: 0.5 y DO600nm: 0.05. Con la DO600nm: 0.5 se logró el mayor valor del área del callo cubierta de puntos azules (3.37) según la escala de evaluación desarrollada en el presente trabajo, esto se correspondió con que la mayoría de los callos presentaron el 50% del área cubierta de puntos azules (Figura 7a). Mientras que, con la DO600nm: 0.05 se logró (1.59) como valor promedio del grado de expresión *gus* transitoria, el cual se correspondió con que los callos presentaron el 25% del área cubierta de puntos azules (Figura 7b).

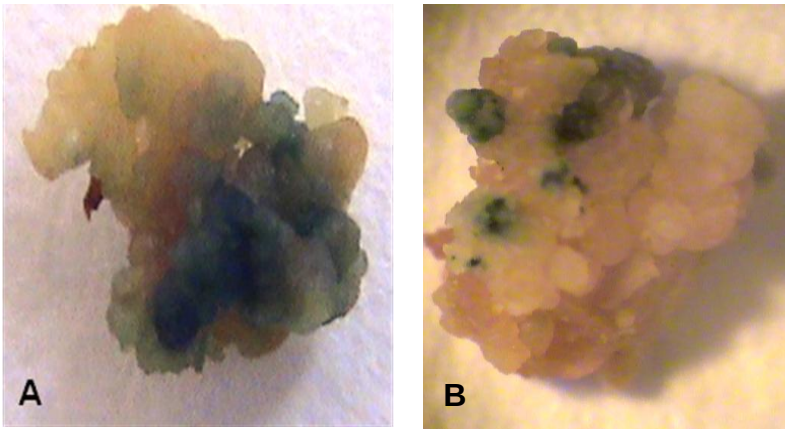



**Figura 7.** Expresión *gus* transitoria en callos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F cocultivados en dos concentraciones bacterianas A) DO600nm: 0.5 y B) DO600nm: 0.05

Según los resultados del presente experimento se determinó utilizar para la transformación genética de callos organogénicos de *P. vulgaris* var. CIAP7247 la concentración bacteriana a una DO600nm: 0.5 ya que produjo los mayores grados de expresión *gus* transitoria según la escala de evaluación desarrollada.

### 4.1.4 Tiempo de subcultivo

El tiempo de subcultivo influyó en la transformación genética de los callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F. Se observaron diferencias significativas en los grados de expresión *gus* transitoria cuando se transformaron callos de diferentes tiempos de subcultivo. En los explantes de 42 días de subcultivo se logró el mayor valor

del área del callo cubierta de puntos azules (2.52) según la escala de evaluación desarrollada en el presente trabajo, esto se correspondió con que la mayoría de los callos presentaron el 50% del área cubierta de puntos azules (Figura 8a). Mientras que, con explantes más jóvenes (21 días de subcultivo) se alcanzó 1.75 como valor promedio del grado de expresión *gus* transitoria el cual se correspondió con que los callos presentaron el 25% del área cubierta de puntos azules (Figura 8b).

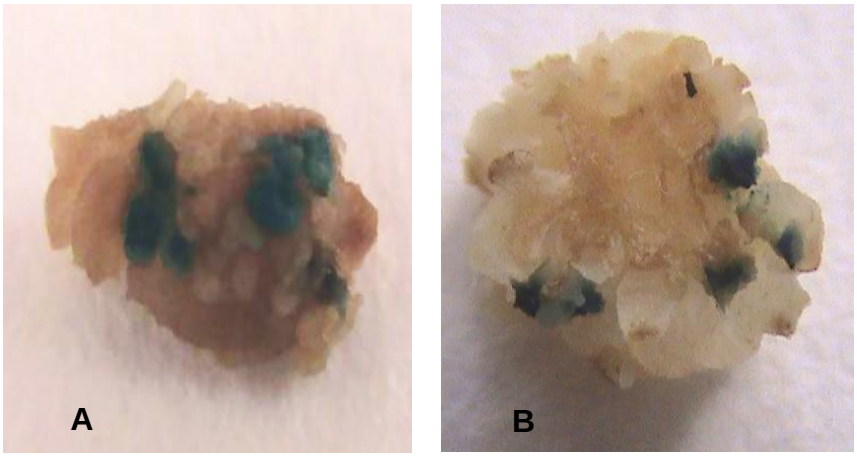



**Figura 8.** Expresión *gus* transitoria en callos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F cocultivados con dos tiempos de subcultivo A) 42 días y B) 21 días

Según los resultados del presente experimento se determinó utilizar para la transformación genética de callos organogénicos de *P. vulgaris* var. CIAP7247 el tiempo de subcultivo de 42 días ya que produjo los mayores grados de expresión *gus* transitoria según la escala de evaluación desarrollada.

### 4.3 Transformación genética de callos de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens* y análisis molecular de líneas regeneradas

#### 4.3.1 Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens*

Con la aplicación de los parámetros estandarizados en el presente trabajo, se obtuvieron plantas transgénicas de *Phaseolus vulgaris* var CIAP 7247F. Los callos seleccionados con glufosinato de amonio presentaron más del 75% del área con necrosis. El 21% de

los callos transformados sobrevivieron a la selección y la frecuencia de regeneración de plantas probablemente transgénicas fue de un 3.05%.

Del total de líneas probables transgénicas regeneradas (8), fueron detectadas, mediante el análisis histoquímico, dos líneas *gus*-positivas. La expresión estable del gen *gus*, en hojas de plantas regeneradas, indicó que la transformación fue estable, al igual que la expresión de los genes introducidos (Figura 9). Pese a que la expresión estable del gen *gus* fue evidente en las líneas transgénicas 1 y 2, se apreciaron diferencias notables en la intensidad de la tinción. La línea 2 mostró niveles de expresión más altos que la línea 1 (Figura 9).

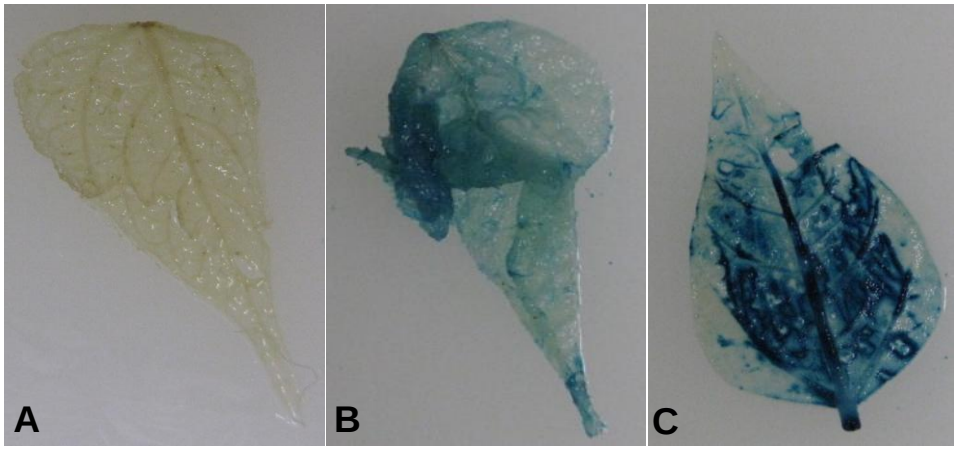



**Figura 9.** Expresión estable de la β-glucuronidasa. (A) hoja de planta no transformada, (B) hoja de planta positiva (línea 1), (C) hoja de planta positiva (línea 2)

### 4.3.2. Análisis molecular de las líneas de plantas regeneradas

#### 4.3.2.1 Análisis de la progenie mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

La integración del gen *gus* fue confirmada mediante el análisis de RCP en una de las plantas provenientes de la línea 1 y en tres de las plantas progenies de la línea 2 (Figura 10). La longitud (637pb) del producto de la amplificación con los oligunucleótidos *gus* en todas las muestras positivas coincidió con el control positivo utilizado (Figura 10). Los resultados demostraron que el gen *gus* fue transferido de la planta transformada a la

progenie en las dos líneas transgénicas obtenidas. Sin embargo, en el caso de la línea 1 este gen no fue heredado de forma Mendeliana, ya que el gen se detectó solo en una progenie de las siete analizadas. Es importante destacar que de cuatro descendientes obtenidos a partir de la línea 2, tres tuvieron el gen *gus* integrado a su ADN, lo que sugiere que en está línea la trasmisión de este gen cumplió los principios de la herencia Mendeliana con proporción de 3:1. Todas las plantas que resultaron *gus*-positivas provenientes de las dos líneas transgénicas analizadas tuvieron el gen *bar* insertado en su ADN (Figura 11), lo que corroboró una correcta integración de los transgenes de interés en el genoma de las plantas inicialmente transformadas. A modo de resumen, el protocolo de transformación propuesto se muestra en la figura 12. Al respecto en la literatura científica sólo se han descrito protocolos de regeneración para *Phaseolus vulgaris* (Veltcheva y Svetleva. (2005); Arellano *et al*., 2008; Kwapata *et al*., 2009*).* El protocolo de transformación propuesto en el presente trabajo constituye por tanto, el primer informe que describe un protocolo de transformación de callos organogénicos de *P. vulgaris*. El mismo podrá ser utilizado en posteriores trabajos de transformación en esta especie.

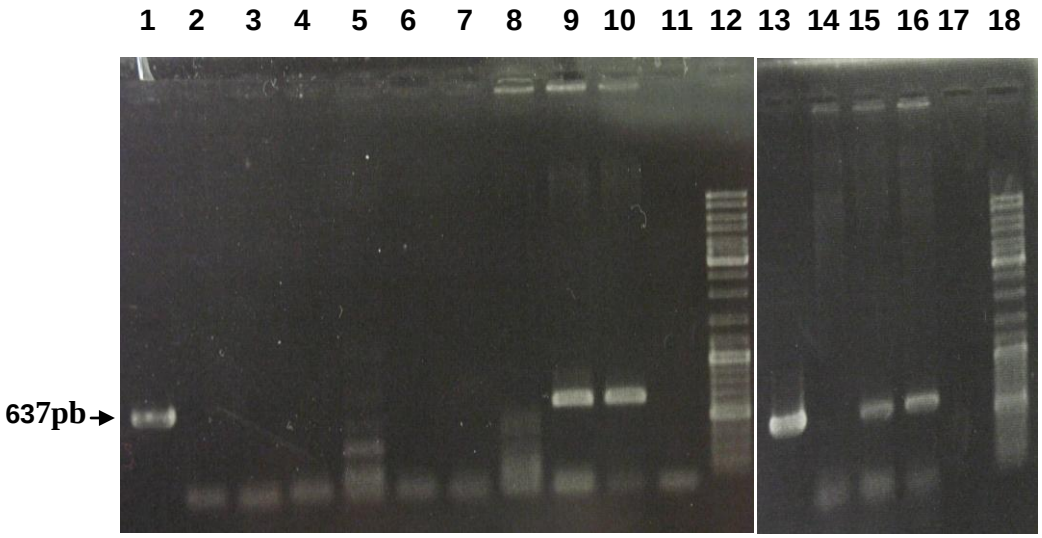



**Figura 10.** Análisis mediante la RCP utilizando ADN genómico de plantas T1 provenientes de de las líneas transgénicas 1 y 2. Amplificación de fragmento del gen *gusA*. 1 y 13) Plasmidio pCAMBIA3301; 2) ADN de planta no transformada, 3-9) ADN de plantas proveniente de la línea 1; 10, 14, 15 y 16) ADN de plantas provenientes de la línea 2; 11 y 17) Reacción de PCR sin ADN molde; 12 y 18) Marcador molecular (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix*). En cada caso se señalan las bandas del patrón de peso más cercanas al fragmento amplificado

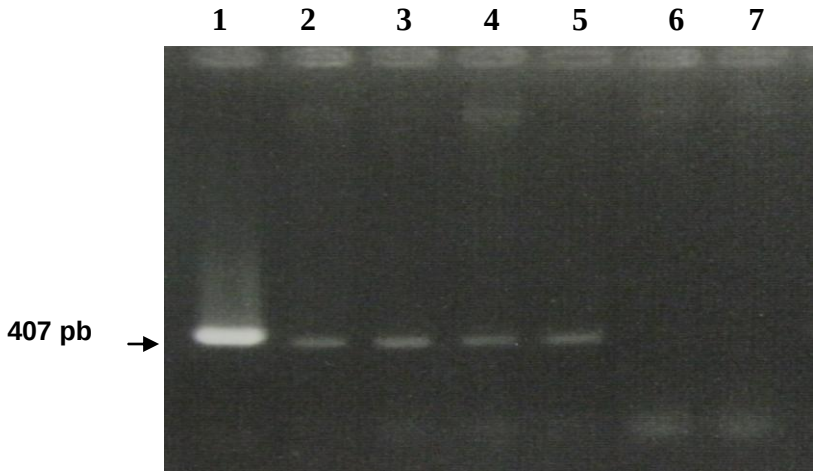



**Figura 11.** Análisis mediante la RCP utilizando ADN genómico de las plantas T1 *gus*-positivas provenientes de las líneas transgénicas 1 y 2. Amplificación de fragmento del gen *bar*. 1) Plasmidio pCAMBIA3301; 2) Línea 1: planta 7 *gus*-positivo, 3-5) Línea 2: plantas 1, 3 y 4 *gus*-positivo; 6) ADN de planta no transformada; 7) Reacción de RCP sin ADN molde

Con el empleo de los parámetros estandarizados se obtuvieron plantas transformadas de *P. vulgaris*. A través del análisis histoquímico se identificaron dos líneas genéticamente modificadas estables. El uso de la RCP permitió confirmar que los transgenes fueron transferidos de las plantas inicialmente transformadas, a sus progenies.

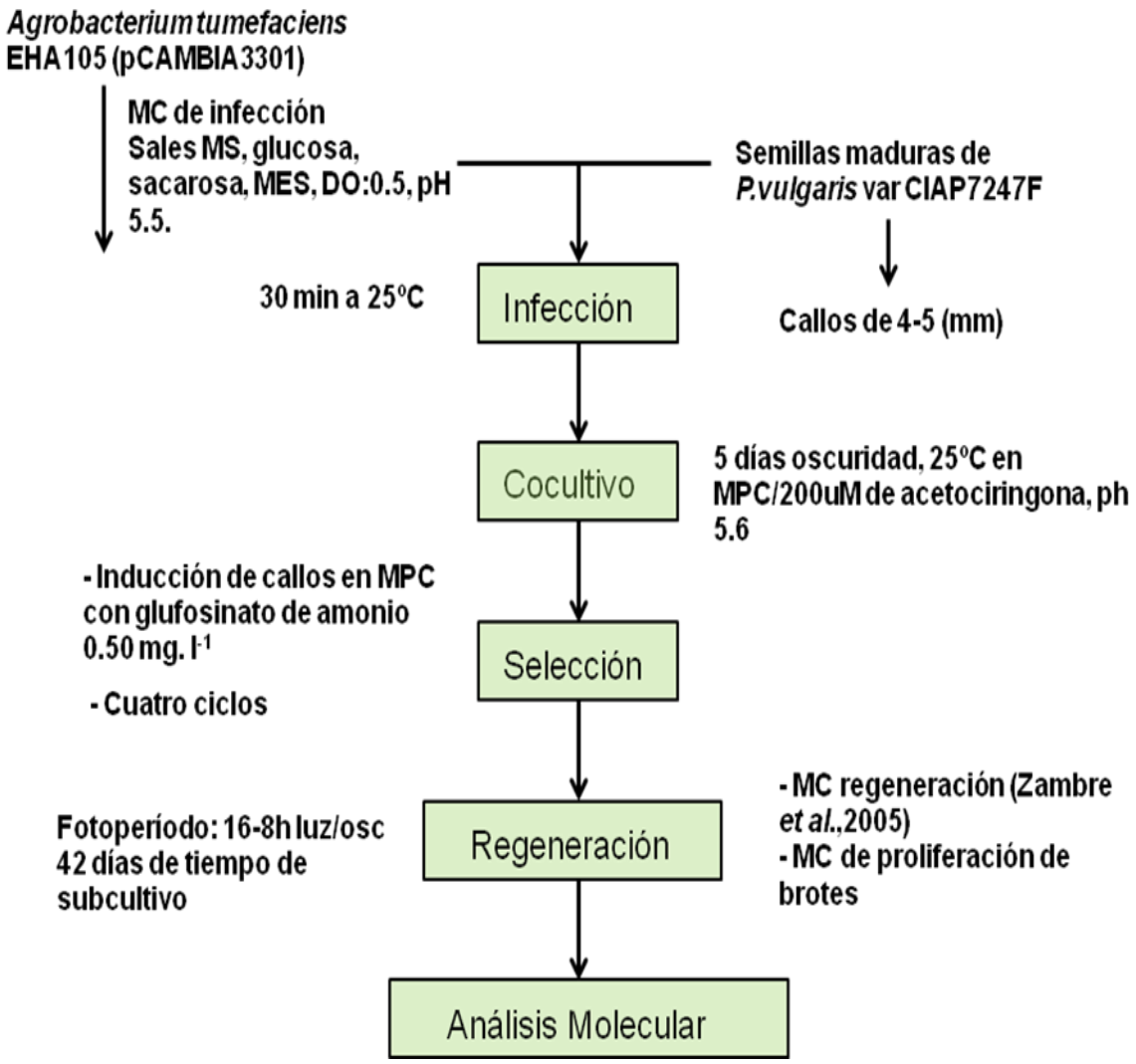



**Figura 12.** Protocolo de transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens.* MC: medio de cultivo. MPC: medio de cultivo de proliferación de callos

## 5- Discusión

### 5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del herbicida comercial Glufosinato de amonio para la transformación genética en *P. vulgaris*

Independientemente del método de transferencia de genes usado, el número de células que establemente integran y expresan los transgenes introducidos es pequeño. Por lo tanto se necesita que los genes marcadores de selección distingan eficientemente estas células, de una gran cantidad de células no transformadas. Los genes clásicos de resistencia a antibióticos y herbicidas (Miki *et al*., 2009) han sido ampliamente usados para la selección de leguminosas genéticamente transformadas.

El glufosinato de amonio es un proherbicida no selectivo, que es convertido por las plantas en la fitotoxina fosfinotricina (PPT). El herbicida actúa inhibiendo la enzima de la asimilación esencial de amonio: glutamina sintetasa (GS). Desde su descubrimiento, el sistema de genes *bar/pat*, han sido usados exitosamente en transferir resistencia al herbicida glufosinato en un gran número de cultivos incluyendo el arroz (Christou *et al*., 1991), trigo (Vasil *et al*., 1992), algodón (Keller *et al*., 1997), lechuga (Mohapatra *et al*., 1999), caña de azúcar (Falco *et al*., 2000), soya (Zeng *et al*., 2004) y frijol (Aragao *et al*., 2002).

En *Phaseolus vulgaris* se ha informado el uso del gufosinato de amonio como agente selectivo en la transformación genética vía Biobalística (Aragao *et al*., 2002). Estos autores indicaron como concentración mínima inhibitoria 500 g $ha^{-1}$ en condiciones de invernadero y 400 g $ha^{-1}$ en campo en los cultivares 'Olathe' y 'Carioca'. Sin embargo, en el presente trabajo se empleó como concentración mínima inhibitoria 0,5 mg $l^{-1}$ de glufosinato de amonio pero en condiciones *in vitro* en callos organogénicos de *P. vulgaris* var CIAP7247F los cuales mostraron más del 75% del área con necrosis y necrosis total. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Da Silva y Yuffá (2004) quienes seleccionaron esta misma concentración mínima inhibitoria pero en la transformación genética de callos y embriones somáticos de *Coffea arabica* (L.) cv. Catimor, en los cuales se observó necrosis en la totalidad de los callos bajo esta concentración.

En otras leguminosas se ha empleado 2 mg $l^{-1}$ de glufosinato de amonio, pero en diferentes explantes. Por ejemplo: Khalafalla *et al*. (2004) en hojas de *Vigna angularis* (Wild.) Adesoye *et al*. (2010) en *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Estos mismos autores, lograron una reducción del crecimiento de brotes y raíces de un 60% y un 80% respectivamente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los resultados logrados en la presente investigación al utilizar callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* para la transformación genética, pudieran estar relacionados con una respuesta diferencial del genotipo, además de las características morfogenéticas de los tipos de explantes blanco utilizados en cada uno de los estudios. Brukhin *et al.* (2000) indicaron que el nivel de tolerancia fue mayor, cuando se emplearon para la selección plantas adultas de *Picea abies*, donde la concentración del agente selectivo fue de 100 mg $l^{-1}$ de glufosinato de amonio.

En callos de otras especies se ha utilizado 2mg $l^{-1}$ como concentración mínima inhibitoria de glufosinato de amonio. Nakamura *et al* (2010) para callos de arroz y Long *et al*. (2011) en callos embriogénicos de *Festuca arundinacea* (Schreb.).

Por su parte varios autores indicaron 3 mg $l^{-1}$ como la concentración mínima inhibitoria en la transformación genética de diferentes especies de plantas; así Van Boxtel *et al*. (1997) en hojas de *C. arabica* L. cv (Catuai, cv KF21) y *C. canephora* (L.), Knapp *et al*. (2000) en tres géneros de orquídea (*Brassia*, *Catleya* y *Doritaenopsis*) indicaron la presencia de secciones necróticas de las hojas de las plantas transformadas en pocas semanas, y Hoa *et al*. (2008).en nudos cotiledonales de *Glicine max* (L.) Merrill.

Por otro lado, en leguminosas tales como: *Vigna radiata* (L.) Wilczek (Saini *et al*., 2007), *Vigna mungo* (L.) Hepper (Muruganantham *et al*., 2007), *Leucaena leucocephala* Wit. (Sandro Jube y Borthakur, 2008); se han utilizado concentraciones más bajas, pero del producto activo del glufosinato de amonio (fosfinotricina). En todos los casos se observó como principal afectación, la necrosis total del material tratado con este agente selectivo. Los autores anteriormente mencionados (Aragao *et al*., 2002; Da Silva y Yuffá, 2004; Khalafalla *et al*., 2004; Adesoye *et al*., 2010) no definieron los grados de las afectaciones en las plantas ante la presencia del agente selectivo, lo que dificulta su evaluación y la

comparación con otros estudios en esta especie. Al respecto en la literatura científica no se refiere la utilización de un sistema que permita la evaluación de los niveles de afectación provocados por el agente selectivo. La escala descriptiva de grados propuesta en el presente trabajo constituye el primer informe sobre esta herramienta de evaluación, de gran utilidad en la determinación de los niveles de afectación provocados por el glufosinato de amonio en callos organogénicos de *P. vulgaris* var CIAP7247F.

## 5.2 Determinación de las condiciones de cocultivo para la transformación genética en callos de *Phaseolus vulgaris*

La transferencia de ADN y su integración en el genoma de la planta está influido por varios factores que incluyen: genotipo, tipo de explantes, temperatura, composición del medio de cultivo, daño al tejido, supresión y eliminación de la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, después del cocultivo. La evaluación de la expresión transitoria para determinar la influencia de cada uno de estos factores en la transformación genética, es difícil por lo que varios autores difieren en cuanto a la manera en que la realizan. De Bondt *et al*. (1994) por conteo de zonas teñidas en general y De Clercq *et al.* (2002) por conteo de puntos y manchas azules. Al respecto en la literatura científica no se refiere la utilización de un sistema que permita la evaluación de los niveles de expresión *gus* transitoria. La escala descriptiva de grados propuesta en el presente trabajo para la evaluación de los sectores del callo con expresión *gus* transitoria, constituye el primer informe sobre esta herramienta de evaluación, de gran utilidad en la determinación de los niveles *gus* en callos organogénicos de *P. vulgaris* L. var CIAP7247F.

### 5.2.1 Cepa bacteriana

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada en la transferencia de ADN puede influir de manera importante en la eficiencia de la transformación genética. La virulencia, así como las diferencias estructurales y organizacionales del ADN-T y los genes *vir* pueden ser distintos entre una cepa y otra lo que afectaría su capacidad de infección (Cervera *et al*., 1998).

En algunas especies de plantas, cepas más virulentas incrementan la eficiencia de este proceso (Nadolska-Orczyk y Orczyk 2000) y en otras ocurre lo contrario (Wroblewski *et al.,* 2005). En general este último efecto ocurre debido a la muerte de la célula vegetal por la infección con cepas "súper-virulentas" que inducen una respuesta necrótica en algunas especies de plantas, como se ha observado en *A. thaliana* (L.) Heynh y *Nicotiana tabacum* L. (Wroblewski *et al.,* 2005).

Veltcheva *et al*. (2005) y Svetleva *et al*. (2003) estudiaron diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105, C58C1, LBA4404) en la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* y refirieron la influencia de las mismas en la eficiencia de este proceso.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron una mayor expresión *gus* cuando se empleó la cepa EHA105 en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F.

Según De Clercq *et al*. (2002) la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 o sus derivados (EHA105, o su progenitor oncogénico el A281) es reconocido como que es superior, facilitando la transferencia de genes a las células de las plantas. Sin embargo la respuesta de esta cepa en estudios de transformación genética en *P. vulgaris* no siempre ha presentado la misma eficiencia de transformación (Zhang *et al*., 1997). Jube y Borthakur (2009), informaron una baja eficiencia en la transformación genética de *Leucaena leucocephala* Wit. al utilizar la cepa EHA105. Resultados similares fueron obtenidos con esta misma cepa por Jaiwal *et al.* (2001), en la transformación genética de *Vigna radiata* (L.) Wilczek. De igual modo esto fue descrito en otras especies de plantas como: arroz (Hiei *et al*., 1994) y algodón (Sunilkumar y Rathore et al., 2001). Es por ello que es importante la evaluación de varias cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para cada especie y genotipo en investigación.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por Nadolska-Orczyk y Orczyk. (2000) quienes informaron una alta eficiencia de transformación con la cepa EHA105 en chícharo, comparado con las cepas LBA4404 y C58C1Rif$^{f}$ (pMP90).

Similares resultados fueron obtenidos por Solleti *et al*. (2008) quienes usaron estas mismas cepas, además de la AGL1 en la transformación genética de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, y obtuvieron con la cepa EHA 105 la mayor eficiencia de transformación (76%). Por otro lado Hood *et al*. (1993) al comparar la eficiencia de transformación de tres cepas de *Agrobacterium*: EHA105, MOG101 y MOG301, en secciones de hojas de tabaco, lograron altos porcentaje (66%) de explante transformados con la cepa EHA105. En estudios similares Akacay *et al*. (2009) emplearon tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens*: EHA105, C58C1, y KYRT1 las que portaron el plasmidio pTJK136 par la transformación genética de nudos cotiledonales de lenteja (*Lens culinaris* Medik), la cepa EHA105 fue la de mejores resultados. De igual forma Colina *et a*l. (2004) obtuvieron los mejores resultados al utilizar la cepa EHA105 con cinco días de cocultivo en la transformación genética de ápices procedentes de plantas *in vitro* del híbrido de *Carica papaya* (L.) IBP42-99.

### 5.2.2 Plasmidios

La construcción genética utilizada también contribuye a las diferencias en la eficiencia del proceso de transformación genética. Algunos autores, han obtenido resultados positivos en la transformación de frijol al usar construcciones que contienen el promotor CaMV35S (Zambre *et al*., 2005; Amugune *et al*., 2011).

En el presente trabajo al transformar callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F, se obtuvieron los mayores grados de expresión *gus* transitoria al utilizar la cepa EHA105 que contenía el plasmidio pCAMBIA3301. Esto pudo estar dado por las diferencias en el intrón presente en el gen *gusA*; en el pCAMBIA3301 se utilizó el intrón de catalasa, mientras en el pTJK136 se utilizó el intrón st-ls1 de la papa (*Solanum tuberosum* (L.), aunque esta especulación pudiese confirmarse con estudios más profundos de expresión estable, como estudios fluorométricos.

Al respecto, Tanaka *et al*. (1990) y Ohta *et al*. (1990) al estudiar el efecto del intrón catalasa en la expresión β-glucurunidasa, en protoplastos de tabaco (dicotiledónea) indicaron el efecto estimulador de este, en la expresión *gus,* lo cual estuvo correlacionado con un eficiente *splicing* del pre-ARNm y un incremento del ARNm

maduro. Estos resultados indicaron que el gen reportero *gus* con el intrón, fueron útiles en el monitoreo de la transferencia de genes vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Libiakova *et al*., 2001 al realizar la transformación genética en este mismo tipo de tejido, compararon dos construcciones genéticas: una que contenía en intrón st-ls1 con el marcador de selección *nptII*, y otra sin el intrón. Estos autores encontraron similar frecuencia de transformación con ambas construcciones.

### 5.2.3 Condiciones de iluminación durante el cocultivo

La Transferencia de ADN es un proceso estrechamente regulado, donde múltiples factores de la interacción planta hospedante y bacteria son requeridos simultáneamente para el proceso de transformación genética (Tzfira y Citovsky, 2002). Cualquiera de estos factores pudiera afectar la respuesta a diferentes condiciones de luz. Por parte de la bacteria, la eficiencia de la transferencia del ADN depende grandemente de cuán eficientemente los genes *vir* son inducidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron una mayor expresión *gus* cuando se empleó el fotoperíodo 16-8h luz/ osc en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F.

Según Zambre *et al*. (2003) el efecto promotor de la luz en la transferencia de ADN probablemente no es mediado por un aumento de los inductores del gen *vir*. Este autor planteó tres razones en relación a esto: los explantes fueron dañados, lo cual libera los inductores del gen *vir*, las bacterias fueron pre-inducidas con acetociringona antes del cocutivo y los medios de cocultivo fueron optimizados para la inducción del gen *vir* con relación al ph y la concentración de monosacáridos y acetociringona. Con mayor probabilidad las frecuencias de transferencia de ADN-T son influidas por la luz, no al nivel de la bacteria, sino a través de la competencia de las células de la planta por la fijación de *Agrobacterium* o la toma del ADN-T. Diferentes condiciones de luz pueden afectar diferentes factores fisiológicos que a su vez influyen en la competencia por la transferencia de ADN-T. Estos factores incluyen: el nivel de hormonas de la planta, la proliferación celular y el estadio del ciclo celular (Villemont *et al*. 1997).

Los mayores grados de expresión *gus* observados bajo un fotoperíodo de 16/8-h luz/oscuridad en callos de *P. vulgaris* var CIAP7247F, pudieron estar dados por las frecuencias en la transferencia de ADN, la cual es influida por la luz, ya que según este autor las condiciones de iluminación afectan los factores fisiológicos que influyen en la competencia por la transferencia de ADN.

Los resultados del presente trabajo coinciden con lo informado por De Clercq *et al*. (2002) quienes obtuvieron los mejores resultados en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en callos de *Phaseolus acutifolius* A. Gray con un fotoperíodo de 16/8-h luz/oscuridad, mientras que en la oscuridad constante se presentaron los menores grados de expresión *gus*. Por otro lado Nan *et al*. (1997) indicaron que la luz incrementa la cantidad de alcohol coniferyl; el inductor del gen *vir* de la orquídea *Dendrobium.*

Por su parte Zambre *et al*. (2003) utilizaron callos de *Phaseolus acutifolius* y segmentos de raíz de *Arabidopsis thaliana* en cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* con diferentes condiciones de luz como: oscuridad constante, fotoperíodo 16-8h luz/ oscuridad y luz continua. Estos autores concluyeron, que la transferencia del ADN estuvo altamente correlacionada con el período de luz, siendo mayor la actividad *gus* transitoria cuando se utilizó luz continua para los dos tipos de explantes. La actividad *gus* transitoria fue monitoreada a diferentes intervalos y las manchas observadas en los tejidos tratados en la oscuridad se desarrollaron solo después de una larga incubación (mayor de 24h). De igual forma Escudero y Hohn (1997) indicaron la inhibición de la transferencia de ADN en hojas de tabaco inoculadas con *Agrobacterium tumefaciens* y mantenidas en la oscuridad. Esta inhibición se atribuye al cierre de los estomas, puesto que estos son la ruta de infección más elegible en este sistema particular de transformación.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Landazábal *et al*, (2008), donde la oscuridad continua durante el cocultivo de clavel *(Dianthus caryophyllus* L.), incrementó la transferencia de ADN. Estos resultados pudieron estar relacionados con la inducción de genes de flagelación en la bacteria. La flagelación interviene en la motilidad de la

bacteria y en su respuesta quimiostática, ambos importantes factores de virulencia, determinantes en la interacción huésped-patógeno (Oberpichler *et al.* 2008).

### 5.2.4 Concentración bacteriana

La concentración óptima de *Agrobacterium tumefaciens*, es un parámetro importante a tener en cuenta en cualquier protocolo de transformación, puesto que cantidades pequeñas pueden tener por resultado la reducción de la transferencia de ADN, mientras que concentraciones más altas pueden causar muerte del explante banco. Ello depende de la cepa de *Agrobacterium* y del tejido de planta usado (Gurlitz *et al.,* 1987).

Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por Ko y Korban. (2004) quienes con una concentración bacteriana de 0,5 obtuvieron los mayores grados de expresión *gus* en la transformación genética de callos de *Glisine max*. En línea con estos resultados Zambre *et al*., (2005) determinaron 0,5 como la concentración bacteriana óptima para la transformación genética de callos de *Phaseolus acutifolius*.

Por otro lado, Sharma *et al.,* (2011) estudiaron el efecto de la concentración bacteriana en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en callos de *Eleusine coracana* (L.)

Gaertn. Estos autores describieron que con 0,8 y 25 minutos de infección fue la mejor concentración bacteriana, con un 58% de expresión *gus* transitoria. Betancourt *et al*. (2008) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones bacterianas en el proceso de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* en caña de azúcar, resultando como la mejor concentración la de 0,2 al momento de la inducción con acetociringona, con un tiempo de cocultivo de siete días. Estos autores concluyeron que a medida que la densidad óptica fue mayor el porcentaje de callos con expresión *gus* positiva disminuyó llegando a ser cero en los casos donde se empleó la mayor concentración.

Hiei *et al*. (1997) reportaron que la transformación de arroz fue posible cuando la densidad de *Agrobacterium tumefaciens* se hallaba entre$1.0 \times 10^{6}$ y $1.0 \times 10^{10}$ (cfu) $ml^{-1}$ y la concentración óptima fue aproximadamente $1.0 \times 10^{10}$ $cfuml^{-1}$. La misma densidad de *Agrobacterium tumefaciens* fue exitosamente usada mas tarde en maíz (Ishida *et al*., 1996) y adoptadas por muchos otros laboratorios para varios genotipos y explantes en

arroz. Densidades de *Agrobacterium tumefaciens* más altas o más bajas que 1.0 x $10^{10}$ $cfuml^{-1}$ fueron evaluadas sistemáticamente en maíz (Zhao *et al*., 2001). La expresión transitoria *gus* se incrementó con la densidad más alta, pero la frecuencia de iniciación de callos fue reducida y la frecuencia pico de transformación se alcanzó con 0.5 x $10^{10}$ $cfuml^{-1}$ de *Agrobacterium tumefaciens*. Experimentos con varios explantes de trigo mostraron que a densidades más altas de *Agrobacterium tumefaciens* podría incrementarse la expresión transitoria *gus*, pero no estaba correlacionada con una frecuencia más alta de transformación (Cheng *et al*., 1997).

Una densidad de *Agrobacterium tumefaciens* más alta que 1 x $10^{10}$ cfu usualmente dañan las células de la planta y resultaron en valores más bajos de recuperación celular, lo que redujo la frecuencia de transformación estable. Sin embargo cuando una densidad mayor de *Agrobacterium tumefaciens* es necesaria para explantes de especies recalcitrantes, la frecuencia de transformación puede ser incrementada con un período de inoculación corto, un enjuague suave del explante después de la inoculación con medio de inoculación fresco, o la adición de un agente bactericida como el nitrato de plata en el medio de cocultivo (Zhao *et al.,* 2001; Zhang *et al*., 2003).

### 5.2.5 Tiempo de subcultivo

Como bien lo mencionan varios autores, un factor importante a considerar en la transformación es el tipo de explante a utilizar, así como la edad del mismo (Kamisaka y Shibata, 1997; Birch, 1997). Además la edad del tejido u órgano usado como explante inicial, así como el tipo de explante a utilizar, influye en el cultivo eficiente de plantas *in vitro* (George *et al*., 2008). En *Phaseolus vulgaris* algunos autores confirmaron el rol determinante de la edad y el tipo de explante a utilizar en el proceso de regeneración; requisito indispensable a tener en cuenta en cada protocolo de transformación genética (Veltcheva y Svetleva, 2005; Arellano *et al.* 2009).

En el presente trabajo el uso de callos organogénicos de 42 días de edad de *P. Vulgaris*, fue determinante para la transformación genética de los mismos, ya que están conformados de células poco diferenciadas y mitóticamente activas, lo que facilita la infección por *Agrobacterium tumefaciens,* a diferencia de los callos más jóvenes (de 21

días de edad), con menor grado de actividad mitótica, en los cuales la infección se dificulta más, y por tanto presentaron un menor grado de expresión *gus.*

Estos resultados pudieran estar relacionados con que los callos de 42 días de cultivo tienen más tejido en fase de multiplicación y por lo tanto la epidermis de este tejido es más sensible y las heridas son mayores, de tal forma que dejan expuestas una mayor cantidad de células a la acción de *Agrobacterium tumefaciens*, por lo que se produce una mayor transferencia de ADN. Además, ello puede estar dado por la diferencia en el metabolismo de los tejidos, dependiendo de su estado de crecimiento ya que a los 21 días de subcultivo, los callos se encuentran recuperándose del estrés provocado por las condiciones de cultivo y comienzan el crecimiento. Sin embargo, a los 42 días, los mismos se encuentran con un crecimiento más estable y por tanto continuo, lo que pudiera condicionar un estado fisiológico que beneficie la transferencia de ADN.

Al parecer en los tejidos con división activa, las células mantienen un estado fisiológico más adecuado, debido a una mayor concentración de auxinas lo que le da a las células mayor competencia para la transformación genética (Ghorbel *et al*., 2000). Este estado fisiológico del tejido le permite responder más fácilmente al estímulo de los genes encargados de la transferencia de ADN y esto provoca que sean tejidos más susceptibles a la infección de *Agrobacterium tumefaciens*, y por tanto presenten mayor eficiencia de transformación.

Los resultados obtenidos demuestran que la transferencia de ADN está estrechamente relacionada con el grado de diferenciación de los tejidos. Estos resultados coinciden con lo señalado por Cervera *et al* (2000), que indicaron, en tejidos menos diferenciados, se incrementa la susceptibilidad de las células vegetales a la infección de *Agrobacterium*, lo que incrementa la eficiencia de transformación. Además de acuerdo Bond y Roose, (1998) informaron que en los tejidos adultos (diferenciados), hay menor número de células en división activa y por lo tanto son menos susceptibles a la integración del ADN-T.

## 5.3 Transformación genética de callos de *Phaseolus vulgaris* mediada por *A. tumefaciens* y análisis molecular de líneas regeneradas

### 5.3.1 Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens*

La expresión transitoria de los transgenes durante un protocolo de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un indicativo de la transferencia del ADN del vector a las células hospederas durante el cocultivo. Este indicador fue de gran importancia para la estandarización de los parámetros relacionados con la transferencia de ADN de *Agrobacterium tumefaciens* a las células de *P. vulgaris*.

En concordancia con los objetivos trazados en este trabajo se obtuvieron plantas transgénicas de *P. vulgaris*. El análisis histoquímico demostró que existieron diferentes patrones de expresión del gen *gus* para cada línea transgénica evaluada. Este resultado pudo estar dado por una integración diferente de los transgenes, lo que ocasionó variaciones en la respuesta de cada línea transformada respecto a la oxidación de la enzima β-glucuronidasa.

La expresión *gus* estable es un indicativo del porcentaje de líneas transformadas con transgenes funcionales, dentro del total de líneas regeneradas además de las inserciones completas del ADN-T en los protocolos de transformación por *Agrobacterium* (Gelvin, 2003).

Aunque la expresión de los transgenes reporteros en líneas transformadas, en cierta manera subestima la eficiencia de la transformación partir de estimaciones histoquímicas. La detección de plantas *gus*-positivas es un indicativo del porcentaje de líneas transformadas con transgenes funcionales, dentro del total de líneas regeneradas.

### 5.3.2 Análisis molecular de las líneas de plantas regeneradas

#### 5.3.2.1Análisis de la progenie mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

La confirmación de la presencia de los genes *gusA* y *bar* en las líneas transgénicas, así como la expresión de la β-glucuronidasa en la planta demuestran la funcionalidad de los promotores empleados para la transformación genética de *Phaseolus vulgaris.* Es importante destacar que a diferencia del análisis histoquímico, los análisis moleculares

como la RCP son más sensibles para la detección de plantas transgénicas. Pues este análisis molecular es capaz de identificar las secuencias de los transgenes aunque estos no se expresen. Con la aplicación de la RCP se demostró que los transgenes *gus* y *bar* fueron transferidos de las plantas originalmente transformadas a las progenies derivadas de estas. A través de esta misma técnica se identificó la línea en la que estos transgenes fueron heredados de forma Mendeliana con proporción de 3:1.

En el caso de la línea 1 donde el gen *gus* se transmitió en una proporción no esperada 1:6. Esta segregación anormal del transgén pudo ser debido a que la planta inicial transformada fuese una quimera ó a que esta planta presentó numerosas inserciones del gen. De ahí que por lo general es deseable la inserción de una sola copia debido a que se minimiza así la probabilidad de que el inserto interrumpa alguna secuencia funcional y por tanto afecte alguna otra función de la planta (Vaucheret y Fagard 2001). Este fenómeno también pudo haber sido condicionado por la falta de transmisión del gen *gus* por uno de los gametos, ya sean masculinos ó femeninos (Olhoft *et al*., 2003).

En resumen, puede decirse que las condiciones definidas para la estandarización de los parámetros en la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F fueron:

El empleo de callos organogénicos en el segundo subcultivo de multiplicación, con la cepa EHA 105 (pCAMBIA3301), con fotoperíodo de 16-8 horas de luz/oscuridad, una concentración bacteriana de 0.5 de $DO_{600}$ y una concentración mínima inhibitoria de 0.50 $mg.l^{-1}$ de glufosinato de amonio para la selección de los callos. En estas condiciones se logró la obtención de plantas transformadas genéticamente de con características estables en su progenie.

## 6. CONCLUSIONES

1- La determinación de la concentración mínima inhibitoria del agente selectivo glufosinato de amonio, permitió la selección de plantas transformadas de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F.

*2*- Con la estandarización de los parámetros: cepa bacteriana, plasmidio, fotoperíodo, concentración bacteriana y tiempo de subcultivo, se logró la transformación genética de callos organonénicos de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F.

3- La aplicación de los parámetros estandarizados permitió la obtención de plantas transformadas genéticamente de *Phaseolus vulgaris* var CIAP7247F con características estables en su progenie.

## 7. RECOMENDACIONES

1- Transformar callos organógenicos de *Phaseolus vulgaris* L. var. BAT-93, BAT-482 e Ica Pijao según los parámetros estandarizados en el presente trabajo.

2- Incrementar la precisión de la actividad *gus* transitoria mediante ensayos fluorométricos, en la estandarización de condiciones de cocultivo en los protocolos de transformación genética vía *A. tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247F

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Gallegos, J. A. y J. W. White (1997): Fenología y Rendimiento del Frijol de Temporal en el Altiplano de México. **Agricultural Tech**. 23:3-14.

Adesoye, A.I, A.O.Togun y J. Machuka (2010): Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) by *Agrobacterium* infiltration. **Journal of Applied Biosciences**. 30: 1845 – 1860.

Albino, M. C (2005): Regeneraçao de feijàso (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogênese e transformaçao genética via biobalistica. Ph. D. **Thesis. Universidade de Brasilia**. Brasilia, Brasil.

An G, P.R. Ebert, A. Mitra y S.B Ha (1988): Binary vectors. **Plant Molecular Biology Manual**. Kluwer Academic Publishers, Great Britain. pp.1-19.

Anand, A., T. Zhou, H N. Trick, B S. Gill, W W. Bockus y S. Muthukrishnan (2003): Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. **Journal of Experimental**. 54 (384): 1101-1111.

Anderson, A.R y L.W. Moore (1979): Host specificity in the genus *Agrobacterium*, **Phytopathology**. 69(4): 320-323.

Angenon G y T.T. Thu (2011): Grain legume improvement through genetic transformation. En: Pratap A and Kumar J (eds.), **Biology of food legumes**. pp. 178-192. CAB International.

Amugune No, B. Anyango y T.K. Mukiana (2011): *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. **African Crop Science Journal**. 19(3):137-147.

Aragao FJ, M.F. Sá, M.R. Davey, A.C. Brasileiro, J.C. Faria y E.L. Rech (1993): Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris*) using an electric acceleration device. **Plant Cell Reports.** 12:483-490.

Aragão F. J. L., L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, S. G. Ribeiro, F. D. Smith, J. C. Sanford, J. C. Faria y E. L. Rech (1996): Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**. 93: 142-150.

Aragão, F. J. L. y E. L. Rech (1997): Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a carioca cultivar. **International Journal of Plant Sciences**. 158 (2): 157-163.

Aragao, F. J.L y E.L. Rech (1998): Isolamento de vectores para transformacao directa,. **Manual de transformacao genética de plantas**. pp.17-33.

Aragao FJ, G. Vianna, M. Albino y E.L. Rech (2002): Transgenic dry bean tolerant to the herbicide Glufosinate Ammonium. **Crop Scienced** .42:1248–1302.

Akcay U. C, M. E. Mahmoudian, H. M. Kamci, E .H. Yucel y A. Oktem (2009): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of a recalcitrant grain legume, lentil (*Lens culinaris* Medik). **Plant Cell Rep**. 28:407–417.

Arellano, J., S.I. Fuentes, Castillo-Espana y G. Hernández (2009): Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 96:11-18.

Bejar, R, R.Yasuda, H.Krugers, K.Hood y M. Mayford (2002): Transgenic Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activation: Dose-Dependent Effects on Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. **Journal of Neuroscience**. 22(13): 5719-5726.

Barboza, L (2002): Estudio de la polinización natural del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Alajuela. Informe de práctica de especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

Bayer CropScience (2005): Technical information Glufosinate-ammonium. **CropScience**. pp. 38.

Betancourt B, M. F. Liliana, E. Muñoz y F. A. Sánchez (2008): Expresión transitoria del gen *gus* en caña de azúcar usando *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Agronómica.** 57(3): 161-166.

Birch R, I. Francois y W. Broekaert (1997): Plant transformation: Problems and strategies for practical applications. **Plant Mol.Biol**. 48: 297-326.

Birch, R G (2003): Plant Transformation: Problems and Strategies for Practical Application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 48(1): 297-326.

Bond, J. E. y M. L. Roose (1998): *Agrobacterium* mediated transformation on the commercially important citrus cultivar Washigton navel Orange. **Plant Cell Reports**. 18: 229-234.

Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts y J. Vanderleyden (2003): Beans (*Phaseolus spp*.) - model food legumes. **Plant and Soil**. 252: 55-128.

Brukhin, V., D Clapham y M. E. Von Arnold (2000): Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. **Plant Cell Rep**. 19: 899-903.

CAMBIA (1997): Cambia vectors Center of Application of Molecular Biology to International Agriculture.

Carrasco, J.F (1999): Plantas transgénicas. Butlletí del Centre d'Estudis de la Natura del Barcelonès Nord. 4 (3):299-310.

Castellanos J.Z., M. Guzmán H., A Jiménez, C. Mejía, J.J. Muñoz R, J. A. Acosta G., G. Hoyos, E. López S., D. González E., R. Salinas P., J. González A., J. A. Muñoz V., P. Fernández H. y B. Cáceres (1997): Hábitos preferenciales de los consumidores de fríjol común (*Phaseolus vulgaris L*.) en México. Rev. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición***.* 47 (2): 163–167.

Cervera, M, J. A Pina, J. Juárez, L. Navarro y L. Peña (1998): *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports.** 18(3): 271- 278.

Cervera, M, J. A Pina, J. Juárez, L. Navarro y L. Peña (2000): A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype. **Theor Appl Genet**. 100: 670-677.

Colina J.K, R.G. Kosky, M. Reyes, B. O. Díaz, I. Herrera y M. F. Seijo (2004): Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en híbrido de papaya a partir de ápices de plantas *in vitro.* **Biotecnología Vegetal**. 4(1): 37 – 42.

Cheng M, J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R .Duncan, T.W. Conner y Y. Wan (1997): Genetic Transformation of Wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiol.** 115:971-980.

Chilton, M.D; M.H Drummond, D. J Merlo, D Sciaky, A.L Montoya, M.P Gordon y E.W Nester (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: molecular basis of crown gall tumorigenesis. **The cell**. 11(2): 263-271.

Christou, O.P, T.L. Ford, y M. Kofro (1991): Production of transgenic rice (*Oriza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties zygotic embryos. **Nat. Biotechnology**. 9:957-962.

Damgaar O y O. Rasmussen (1991): Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyls infections with *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Mol Biol.** 17:1-8.

Da Silva. F. R y A. M. Yuffá (2004): Efecto del herbicida glufosinato de amonio en diferentes explantes de *Coffea arabica* cv. Catimor. **Plant Mol Biol.** 55: 211-217.

De Block, M, J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gossele, N.R. Movva, C.Thompsom, V. M. Monagu, y J. Leeman (1987): Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **EMBO J.** 6:2513-2518.

De Bondt, A, K. Eggermont, P. Druart, M. Vil, I. Goderis, J. Vanderleyden y W. F. Broekaert (1994): *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): An assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. **Plant Cell Reports**. 13(10): 587-593.

De Clercq. J, M. Zambre, M. Van Montagu, W. Dillen, y G. Angenon (2002): An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. **Plant Cell Reports**. 21: 333-340.

Díaz, M.L., D.C. Zappacosta, P.M. Franzone, y R.D. Ríos (2004): **Transformación genética**. En: Echenique, V, C.Rubinstein y L. Mroginski (eds.), Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. pp. 109-123. Buenos Aires, Argentina, INTA.

Diego-García E., O. Avendaño, G. Hernández, y M. Lara (2001): Genetic transformation of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). **American Society of Plant Biologists**. 13: 304-309.

Dillen W, J. De Clercq, A. Goossens, M. Van Montagu y G. Angenon (1997): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. **Theor Appl Genet**. 94:151–158.

Escobar, M. A y A. M. Dandekar (2003): *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. **Trends in Plant Science**. 8(8): 380-386.

Escudero J, y B. Hohn (1997): Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. **Plant Cell**. 9:2135-2142.

Falco MC, A. Tulmann-Neto y E.C. Ulian (2000): Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Rep**.19: 1188-1194.

FAOSTAT, (2010): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat agriculture data. http://faostat.fao.org/.

Firoozabady, E y A.R. Kuehnle (1995): *Agrobacterium*- mediated transformation. **Plant cell tissue and organ culture**. pp. 181-195.

Flavell, R B (1992): Selectable marker genes: safe for plants?. **Nature Biotechnology**. 10: 141-144.

Gamborg OL, R.A. Miller y K. Ojima (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp Cell Res**. 50:151–158.

García L, R. Collado, I. Bermúdez, N. Veitía, D. Torres y C. Romero (2008): Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. **Biotecnología Vegetal**. 8 (2): 109–114.

Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. Thorpe (1996): Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**. 32: 272-289.

Gatica Arias A. M, J. Muños Valverde, P. Ramírez Fonseca y M. Valdez Melara (2010): *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. **Electronic Journal of Biotechnology ISSN**. 13: 1–8.

Gachet, E, G. G Martin, F. Vigneau, y G. Meyer (1998): Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Trends in Food Science y Technology**. 9(11-12): 380-388.

Gelvin, SB (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu. Rev. **Plant. Physiol. Plant Mol. Biol**. 51:223-256.

Gelvin, S B (2003): Improving plant genetic engineering by manipulating the host. **Trends in Biotechnology**. 21(3): 95-98.

George, E. F, A. M. Hall y G. J. De Klerk (2008): **Plant Propagation by Tissue Culture 3rd** Edition. Volume 1 . The Background. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 355 pp.

Gepts, P., W.D. Beavis, E.C. Brummer, R.C. Shoemaker, H.T. Stalker, N.F. Weeden, y N.D. Young (2005): Legumes as model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiology**. 133: 1228-1235.

Ghorbel, R, A. Domínguez, L. Navarro y L. Peña (2000): High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citus aurantium*) and production of transgenic tress containing the coat protein gene of citus tristeza virus. **Tree Physiology**. 20: 1183-1189.

Grant, J. E, L. M. Thomson, M. D. Pither-Joyce, T. M. Dale, y P. A. Cooper (2003): Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**. 21(12): 1207-1210.

Gurlitz, R.H.G, P.W. Lamb y A.G. Matthysse (1987): Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium tumefaciens.* **J. Plant Physiol**. 83: 564-568.

Hadi MZ, E. Kemper, E. Wendeler y B. Reiss (2002): Simple and versatile selection of *Arabidopsis* transformants. **Plant Cell Reports**. 21: 130-135.

Hakkila, K, M. Maksimow, M. Karp y M. Virta (2002): Reporter Genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors. **Analytical Biochemistry** .301(2): 235-242.

Hansen, G y M.S. Wright (1999): Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**. 4(6): 226-231.

Hellens, R., P. Mullineaux y H. Klee (2000): A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**. 5: 446-451.

Herrera F.T.S, S.E Cárdenas, C.J. Ortiz, G.J. Acosta y C.M. Mendoza (2005): Anatomía de la vaina de tres especies del género *Phaseolus*. **Rev. Agrociencia**. 39 (6): 595–602.

Hiei Y, T. Komari y T. Kubo (1997): Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Mol Biol**. 35: 205-218.

Hoa T. C, T. V. Hai y L. C. Thang (2008): Transformation efficences of the soybean variety PC 19 (*Glicine max* (L.) Merrill) using *Agrobacterium tumefaciens* and the cotiledonary node method. **Omonrice**. 16: 1-8.

Hoshi, Y, M. Kondo, S. Mori, Y. Adachi, M. Nakano y H. Kobayashi (2004): Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports.** 22(6): 359-364.

Hood E.E, A.B. Gelvin y L.S. Melchers (1993): New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Res**. (2):208–218.

Ishida Y, H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari y T. Kumashiro (1996): High-efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens.* **Nat Biotech** 14: 745-750.

Jaiwal, P.K., R. Kumari, S. Ignacimuthu, I. Potrykus y C. Sautter (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) a recalcitrant grain legume. **Plant Science**. 161: 239-247.

Jefferson, R A, T .A Kavanagh, y M. W Bevan (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal 6**. 13: 3901–3907.

Jin, S., Y.N Song, W.Y Deng, M.P. Gordon, y E.W. Nester (1993): The regulatory *virA* protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. **J. Bacteriol**. 175:6830-6835.

Jube. S y D. Borthakur (2009): Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the tree-legume *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 96:325–333.

Kamisaka S. y K. Shibata (1977) Anticotyledon factor: competitive inhibitors of the action of dihydroconiferyl alcohol in stimulating gibberellic acid-induced lettuce hypocotyl elongation. **Plant Cell Physiol**. 18:1057-1066.

Kaplan, L. (1981): What is the origin of the common bean? **Economic Botany**. 35(2): 240-254.

Karami O, M. Esna-Ashari, G.K. Kurdistani y B. Aghavaisi (2009): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. **Biologia Plantarum**. 53: 201-212.

Karha, K.K, K. Pahl, N.L. Leung y L.A. Mroginski (1981): Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. **Canadian Journal of Botany.** 59:1671-1679.

Keller G, L. Spatola, D. McCabe, B. Martinell, W. Swain y M. E John (1997): Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos. **Transgenic Res**. 6: 385-392.

Khalafalla. M. M, A. El-Shemy, S. R Mizanur, T. Masayoshi y I. Masao (2005): Recovery of herbicide-resistant Azuki bean [*Vigna angularis* (Wild.), Ohwi & Ohashi] plants via *Agrobacterium*- mediated transformation. **African Journal of Biotechnology**. 4 (1): 61-67.

Kim, J.W y T. Minamikawa (1996): Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process. **Plant Science**. 117: 131-138.

Ko. T y S. Korban (2004): Enhancing the frequency of somatic embyogenesis following *Agrobacterium*- mediated transformation of immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **In Vitro Cell Dev. Biol-Plant**. 40:552-558.

Kobayashi, A.K, J.C. Bespalhok, L.F.Pereira y L. G.E. Vieir (2003): Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Cell tissue and Organ Culture**. 74:99-102.

Kosky RG, M.V. Reyes, I. Bermúdez-Caraballoso, B.P. Chong y Y.C. Alvarado (2010): Nuevo método para la selección rápida de plantas de banano (*Musa spp*. AAA cv. Grande naine) transformadas con el gen bar procedentes de campo, empleando el glufosinato de amonio. **Rev. Colomb. Biotecnol**. 12(2):248-258.

Kwapata K, R. Sabzikar, M. B. Sticklen y J.D. Kelly (2010): In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 100: 97–105.

Knapp, J. E, A. P. Kausch y J. M. Chandlee (2000): Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker. **Plant Cell Reports**. 19: 893-898.

Landazábal J. D. B y L. Franco-Lara (2008): Implementation of a Technique for the production of transgenic carnation *Dianthus caryophyllus* L. bagatel variety plants. **Physiol Mol Plant Pathol**. 4(1):94-111.

Liu Z, B.J. Park, A. Kanno y T. Kameya (2005): The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. **Mol. Breed**. 16:189–197.

Long. D, X. Wu, Z. Yang,I. Lenk, K. Kristian y C. Gao (2011): Comparison of three selectable marker genes for transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants by particle bombardment. **Plant Tissue Culture.**

Lulsdorf, M M, H. Rempel, J. A. Jackson, D. S Baliski, y S. L. A Hobbs (1991): Optimizing the production of transformed pea (*Pisum sativum* L.) callus using disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains. **Plant Cell Reports**. 9(9): 479-483.

Luria, S.E., J.N. Adams y R,C. Ting (1960). **Virology**. 12: 348-390.

Maheswaran, G, M. Welander, F.Hutchinson, J, Graham y D. Richards (1992): **Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens***. Munich, Allemagne, Elsevier.

Malik, K. A. y P. K. Saxena (1991): Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L: promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. **Planta.** 184: 148-150.

Miki B, A. Abdeen, Y. Manabe y P. MacDonald (2009): Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. **Plant Biotechnology Journal**. 7: 211-218.

Mohamed, S. V., J. M. Sung, T. L. Jeng y Ch. S. Wang (2006): Organogenesis of *Phaseolus angularis* L: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 86: 187-199.

Mohapatra U, M. S. McCabe, J.B. Power, F. Schepers, A. Van der Arend y M.R Davey (1999): Expression of the *bar* gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce. **Transgenic Res**. 8: 33-44.

Mullins, K.V, D.J. Llewellyn, V.J.Hartney, S. Strauss y E.S. Dennis (1997): Regeneration and Transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**. 16(11): 787-791.

Murashige, T. y F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**.15: 473-497.

Muruganantham M, S. Amutha, N. Selvaraj, G. Vengadesan y A. Ganapathi (2007): Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vigna mungo* using inmature cotyledonary-node explants and phosphinothricin as the selection agent. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**. 43:550-557.

Nadolska-Orczyk, A. y W. Orczyk (2000): Study of the factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.). **Molecular Breeding**. 6:185-194.

Nakamura. S, S. Mano, Y. Tanaka, M. Ohnishi, Ch. Nakamori, M. Araki, T. Niwa, M. Nishimura, H. Kaminaka, T. Nakagawa y S. Ishiguro (2010): Gateway Binary Vectors with Bialaphos Resistance Gene, *bar,* as a Selection Marker for Plant Transformation. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 74(6):1315-1319.

Nan G.L; C.S Tang, A.R Kuehnle y C.I Kado (1997): *Dendrobium* orchis contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. **Physiol Mol Plant Pathol**. 51: 391- 399.

Ochoa, I.E, M.W. Blair y J.P. Lynch (2006): QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. **Crop Sci**. 46:1609–1621.

Oberpichler I, R. Rosen, A. Rasouly, M. Vugman, E.Z. Ron y T. Lamparter (2008): Light affects motility and infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. **Environmental Microbiology**. 10: 2020–2029.

Olhoft P. M, E.E Lex, F. M. Christopher y D. A. David (2003): Somers Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**. 216: 723–735.

Ortega, M.L (1991): **Bioquímica**. En E. Mark Engleman (eds.), Contribuciones al conocimiento de frijol (*Phaseolus*) en México. pp. 101–112.

Pagel, J, J.G. Walling, N. D. Young, R.C. Shoemaker y S.A. Jackson (2004): Segmental duplications within the *Glycine max* genome revealed by fluorescence *in situ* hybrization of bacterial artificial chromosomes. **Genome**. 47: 764–768.

Perez H.P., E.G. Esquivel, S.R. Rosales y G.J.A. Acosta (2002): Caracterización física, culinaria y nutricional de fríjol del altiplano sub–húmedo de México. Rev. ***Archivos Latinoamericanos de Nutrición***. 52 (2): 172–180.

Popelka, J, N. Terryn y T.J.V. Higgins (2004): Review: Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?. **Plant Science**. 167: 195 – 206.

Popelka JC, S. Gollasch, A. Moore, L. Molvig y T. J. Higgins (2006): Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Reports**. 25:304-312.

Potrykus, I (1991): Gene transfer to plants: assessment of publisher approaches and results. **Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant. Mol. Biology**. 42:205-225.

Quintero F. E (2000): Manejo agrotécnico del frijol en Cuba. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, pp 28.

Quintero-Jiménez A, E. Espinosa-Huerta, J.A. Acosta-Gallegos, H.S. Guzmán-Maldonado, M. A. Mora-Avilés (2010): An improved method for in vitro regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agrociencia**. 44: 57–64.

Rech, E.L y F.J.L Aragao (1998): Biobalística. **Manual de transformacao genetica de plantas**, 51-64 pp.

Rech E.L, R. Giovanni, G. R. Vianna y F. J. L. Aragao (2008): High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nat Protoc**. 3:410–418.

Rodríguez, C. L. y R. X. Fernández (2003): Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. **Acta Médica Costarricense.** 45(3): 12-19.

Rodriguez-Uribe, L. y M.A. O'Connell (2006): A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary vean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). **Plant Sci.** 171: 300–307.

Romero, P.E (1993): **El fríjol y la alimentación**. En: Cuauhtémoc González Pacheco y Felipe Torres Torres (eds.), Los retos de la soberanía alimentaria en México. Tomo I. pp.53–67.

Russell, D. R., K. M. Wallace, J. H. Bathe y B. J. Martinell (1993): Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric discharge mediated particle acceleration. **Plant Cell Reports.** 12: 165-169.

Ryder, T.B., S.A Hedrick, J.N. Bell, X.W Liang, S.D. Clouse y C.J. Lamb (1987): Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. **Mol. Gen. Genet**. 210: 219–233.

Saini S, R. Singh y P. Jaiwal (2007): *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* α-amylase inhibitor-1 gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using *bar* as a selectable marker. **Plant Cell Report**. 26:187-198.

Smith, M.K y R. A Drew (1990): Current applications of tissue culture in planta propagation and Improvement. Aust. J. **Plant. Phisiol**. 17:269-289.

Salamov, A.A., y V.V. Solovyev (2000): *Ab initio* gene finding in *Drosophila* genomic DNA. **Genome Res**. 10:516–522.

Salas, M. G (2001): Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. **Plant Cell Reports**. 20: 701-705.

Sánchez, P. D, M. S. Ruíz, S. H. Maldonado, E. V. Pineda, M. G. Chavira, S. F. Velásquez, J. A. Gallegos y A. M. Avilés (2005): An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**. 7420: 1-6.

Sanford, J.C; F.D Smith y J.A. Russell (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzimology**. 217:483-509.

Scheiffele. P, W. Pansegrau y E. Lanka (1995): Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Processing. **Journal of Biological Chemistry**. 270(3): 1269-1276.

Schell, J, M. V Montagu, M. D Beuckeleer, M. D Block, A. Depicker, M. D Wilde, G. Engler, C Genetello, J. P Hernalsteens, M. Holsters, J. Seurinck, B. Silva, F.V Vliet, y R. Villarroel (1979): Interactions and DNA Transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-Plasmid and the Plant Host. **Proceedings of the Royal Society of London**. 204(1155): 251-266.

Schroeder, H.E; A.H Schotz, T Wardleyrichardson, D. Spencer y T.J.V. Higgins (1993): Transformation and regeneration of 2 cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**. 101(3):751-757.

Sharma M, A. Kothari-Chajer, S. Jagga-Chugh y S. L. Kothari (2011): Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 105:93–104.

Solleti, S.K, S. Bakshi y L. Sahoo (2008): Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme, and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Journal of Biotechnology**. 135:97-104.

Sunilkumar G y K.S. Rathore (2001): Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. **Mol Breed**. 8: 37-52.

Svetleva, D., M. Velcheva y G. Bhowmik (2003): Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement**. Euphytica**. 131:189-200.

Tecnociencia. (2003). Plantas transgénicas.
http://www.tecnociencia.es/especiales/transgenicos/4.htm

Thompson, C, R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J. Davies, M. Lauwereys, y J. Bottermann (1987): Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomices higroscopicus*. **EMBO J**. 9: 2519- 2523.

Thu TT, E. Dewaele, L.Q. Trung, M. Claeys, M. Jacobs y G. Angenon (2007): Increasing lysine levels in pegeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) seeds through genetic engineering. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 91:135-143.

Tzfira, T y V. Citovsky (2000): From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. **Molecular Plant Pathology**. 1(4): 202-212.

Tzfira, T.; M. Vaidya y V .Citovsky (2002): Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA**. 99(16): 10435-10440.

Van Boxtel, V. J., A. Eskes y M. Berthouly (1997): Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**. 33: 6-12.

Vasil, V., A.M. Castillo, M.E. Fromm y I.K. Vasil (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. **Nat. Biotechnology**. 10:667-674.

Vaucheret, H y M. Fagard (2001): Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. **Trends in Genetics.** 17(1): 29-35.

Veltcheva M, D. Svetleva, S. P. Petkova y A. Pearl (2005): *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—problems and progress. **Sci Hortic**. 107:2–10.

Villemont E, F. Dubois, R. S Sangwan, G. Vasseur, Y. Bourgeois y B. S. Sangwan-Norreel (1997): Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Petunia: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. **Planta**.201: 160-172.

Wroblewski, T, A. Tomczak y R. Michelmore (2005): Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. **Plant Biotechnology Journal.** 3(2): 259-273.

Xu, L., U. Najeeb, R. Raziuddin, W.Q. Shen, J.Y. Shou, G.X. Tang y W.J. Zhou (2009): Development of an efficient tissue culture protocol for callus formation and plant regeneration
of wetland species *Juncus effusus* L. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**. 45 (5): 610-61.

Yang, G., Y.H. Lee, Y. Jiang, S.P. Kumpatla y T.C. Hall (2005): Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice. **Plant Molecular Biology**. 58: 351-366.

Zambre, M; P. Geerts, A. Maquet, M .Van Montagu, W .Dillen y G. Angenon (2001): Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year Bean). **Annals of Botany**. 88: 371-377.

Zambre, M., N. Terryn, J. De Clercq, S. De Buck, W. Dillen, M. Van Montagu, D. Van Der

Straeten y G. Angenon (2003): Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. **Planta**. 216: 580-586.

Zambre, MA; C. Cardona; M. Van Montagu; N. Terryn y G. Angenon (2005): An efficient and reproducible *Agrobacterium* mediated transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean). **Theoretical and Applied Genetics**. 110: 914 – 924.

Zeng, P, D. A. Vadnais, Z. Zhang y J. Polacco (2004): Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Report**. 22:478–482.

Zhang Z, D.P Coyne y A. Mitra (1997): Factors affecting *Agrobacterium*- mediated transformation of common bean. **J Am Soc Hortic Sci**. 122: 300-305.

Zhang W, S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke y L. Gilbertson (2003): Cre/lox mediated gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. **Theor. Appl. Genet**. 107: 1157-1168.

Zhao Z-Y, W. Gu, T. Cai, L. Tagliani, D. Hondred, D. Bond, S. Schroeder, M. Rudert y D. Pierce (2001): High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Mol. Breed**. 8: 323- 333.

Zhu, J, P. M. Oger, B. Schrammeijer, P. J .J. Hooykaas, S. K. Farrand y S. C. Winans (2000): The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. **The Journal of Bacteriology.** 182(14): 3885-3895.