

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DE DIPLOMA

**Optimización de la transformación genética vía
Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsend) Conn en
Phaseolus vulgaris L.**

Autora: Lyselle Ruíz de León

Tutores: Dr. C. Raúl Collado López

Lic. Dianella Iglesias Rodríguez

Santa Clara
2017

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DE DIPLOMA

Optimización de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn en *Phaseolus vulgaris* L.

Autora: Lyselle Ruíz de León

Tutores: Dr. C. Raúl Collado López¹

Lic. Dianella Iglesias Rodríguez²

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara 54 830, Cuba. E-mail: raulc@ibp.co.cu

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara 54 830, Cuba. E-mail: diglesias@uclv.cu

Santa Clara
2017

Cuando eres entusiasta sobre lo que haces, sientes energía positiva. Es muy simple.

Paulo Coelho

Dedicatoria

A mis hermanitos Amy y Mauro porque son mi razón de vivir.

A mi mamá y mi abuela por todo el inmenso amor que me dan y porque las quiero con mi vida.

A mi primo Lucas porque lo quiero muchísimo.

A mi tío porque es mi ejemplo a seguir.

A mi familia que adoro y a todas esas personas que son muy especiales para mí.

A Diosito, por supuesto...

Agradecimientos

En la realización de este trabajo muchas personas de alguna manera me ayudaron y les estoy sumamente agradecida. Pero quisiera agradecer de una forma especial a las siguientes personas:

A mi familia, porque son mi sostén y mi todo y están siempre apoyándome y guiándome incondicionalmente y con mucho amor. En especial a las personas más importantes de mi vida y que me han apoyado de todas las maneras posibles: mi mamá, mi abuela y mis hermanitos Amy y Mauro. A mi abuelo y Amaury porque siempre están ahí para mí. A mi tío, por ser alguien a quien admiro y quiero mucho. A Félix y Mileidy porque siempre me han apoyado en todo lo que necesito con mucho cariño.

A mi tutora y amiga Dianella, por toda la paciencia y el cariño de sus enseñanzas. Por su dedicación en el desarrollo de los experimentos y por su ayuda infinita en la escritura y revisión del documento escrito. Además, por guiarme no solo en la realización de este trabajo sino también en mi vida personal demostrándome que es alguien con quien puedo contar siempre.

A mi tutor Dr. C. Raúl Collado, por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis, por su confianza en mi desempeño durante este tiempo y por los logros alcanzados en los resultados del trabajo.

A Orelvis y Katia, por ser como padres para mí. Por todo su afecto y porque siempre me apoyaron y aconsejaron con mucho cariño. Además quisiera agradecer especialmente a mi amiga Ana Paula por sus consejos, que a pesar de su corta edad, fueron de mucha ayuda en este trabajo.

A Damaris, por su amistad y por todas sus enseñanzas en el laboratorio y en la exposición y por estar allí siempre que la necesité apoyándome y animándome.

A Baby, por sus enseñanzas y por el afecto con el que siempre me ayudó cuando lo necesitaba en el laboratorio.

A Novisel y Amanda por todas sus enseñanzas y su preocupación para que tuviera éxito en mis resultados.

A Yanet, Yudith, Lisbey, Alan, Marilín, Yumy y Jose, por su ayuda en todos los momentos que los he necesitado.

A todos mis compañeros del aula por todos los momentos que hemos pasado juntos a lo largo de estos cinco años, en especial a mi amiga Claudia. Además de mis amigos Cindy, Liset, Diana, Alejandro, Seila, Sheila, Eduardo, Linette, Lisbet y Naylin. También a mi profesor y amigo Alejandro, por siempre estar dispuesto a ayudarme cuando lo he necesitado. Y a mi profesor Edgardo, que me ayudó en la corrección del documento escrito.

A todos mis profesores, que a lo largo de estos cinco años con sus enseñanzas hicieron posible que yo pudiera culminar mis estudios.

A todos mis amigos que no he nombrado pero que con sus consejos han contribuido en el trabajo y a presentar este documento.

A todos, muchísimas gracias,

Lyselle...

Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una leguminosa de gran importancia económica a nivel mundial. Su producción está limitada debido a factores bióticos y abióticos. La transformación genética brinda la posibilidad de vencer estas limitaciones, pero la baja eficiencia en la regeneración *in vitro* y la transferencia de ADN han limitado el desarrollo de protocolos para la obtención de plantas transformadas en esta especie. El objetivo de este trabajo fue la optimización de la transferencia de ADN de *Agrobacterium tumefaciens* a *P. vulgaris*, cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'. Para ello, se determinó la utilización de ½ NC-1 como posible explante inicial para la regeneración vía organogénesis indirecta. La respuesta de este explante se comparó con los explantes NC-1 y NC-2, utilizados en investigaciones previas. También, se determinó el efecto de la concentración de la suspensión de *A. tumefaciens*, el tiempo de infiltración por vacío y co-cultivo en la regeneración de brotes de *P. vulgaris*. El empleo de ½ NC-1 como explante inicial para la regeneración de *P. vulgaris*, no afectó la eficiencia del protocolo establecido para NC-1 y NC-2. La regeneración de los brotes, en los cultivares 'BAT 93' e 'ICA Pijao', estuvieron influenciados por la concentración de la suspensión de *A. tumefaciens*, el tiempo de infiltración por vacío y el período de co-cultivo. Los mayores porcentajes de regeneración se lograron al inocular los callos con una concentración de la suspensión de *A. tumefaciens* a DO_{600nm} de 0,1, infiltrados con vacío por 1 o 2 min y manteniéndolos tres días en co-cultivo a $22 \pm 2^{\circ}C$.

Palabras clave: frijol común, regeneración, transferencia de ADN

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume of great economic importance worldwide. Its production is limited due to biotic and abiotic factors. The genetic transformation offers the possibility of overcoming these limitations, but the low efficiency of *in vitro* regeneration and DNA transfer have limited the development of protocols for obtaining plants transformed in this specie. The aim of this work was to optimize the DNA transfer of *Agrobacterium tumefaciens* to *P. vulgaris*, 'ICA Pijao' and 'BAT 93' cultivars. For this, it was determined whether the ½ NC-1 can be used as the initial explant for regeneration via indirect organogenesis. The response of this explant was compared with NC-1 and NC-2 explants, used in previous research. In addition, the effect of the concentration of *A. tumefaciens* suspension, vacuum infiltration time and co-culture in the regeneration of *P. vulgaris* shoots was determined. The use of ½ NC-1 as the initial explant for regeneration of *P. vulgaris* did not affect the efficiency of the established protocol for NC-1 and NC-2. The shoots regeneration, in cultivars 'BAT 93' and 'ICA Pijao', were influenced by the concentration of the *A. tumefaciens* suspension, the vacuum infiltration time and the co-culture period. The highest percentages of regeneration were achieved by inoculating callus with a concentration of the *A. tumefaciens* suspension to DO_{600nm} of 0,1, vacuum infiltrated for 1 or 2 min and maintaining for three days of co-culture at $22 \pm 2^{\circ}C$.

Key words: Common bean, regeneration, DNA transfer

Índice

1	Introducción	1
2	Revisión bibliográfica	4
2.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	4
2.1.1	Origen, taxonomía y morfología	4
2.1.2	Generalidades del cultivo	5
2.1.3	Factores bióticos y abióticos que afectan el cultivo	7
2.1.4	Manejo del cultivo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	10
2.2	Transformación genética en <i>Phaseolus vulgaris</i>	11
2.2.1	Métodos de transferencia directa de ADN.....	12
2.2.2	Métodos de transferencia indirecta de ADN	14
2.2.3	Factores que intervienen en la transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
2.2.4	Transformación genética en leguminosas vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i> empleando diferentes sistemas de regeneración	21
3	Materiales y métodos	25
3.1	Comparación de los explantes NC-1 y NC-2 con ½ NC-1 para la regeneración vía organogénesis indirecta de <i>P. vulgaris</i>	26
3.1.1	Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1	26
3.1.2	Regeneración, elongación y enraizamiento de los brotes	26
3.2	Determinación del efecto de parámetros que influyen en la regeneración de brotes de <i>P. vulgaris</i> inoculados con <i>A. tumefaciens</i>	27
3.2.1	Determinación del efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, del tiempo de infiltración por vacío y co-cultivo en la regeneración de brotes de <i>P. vulgaris</i>	28
3.3	Procesamiento estadístico	30
4	Resultados	31

4.1 Comparación de los explantes NC-1 y NC-2 y ½ NC-1 para la regeneración vía organogénesis indirecta de <i>P. vulgaris</i>	31
4.1.1 Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1	31
4.1.2 Regeneración, elongación y enraizamiento de los brotes	31
4.2 Efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, del tiempo de infiltración por vacío y el co-cultivo en la regeneración de callos de <i>P. vulgaris</i> inoculados con <i>A. tumefaciens</i>	33
4.2.1 Concentración de la suspensión bacteriana	33
4.2.2 Tiempo de infiltración por vacío	35
4.2.3 Tiempo de co-cultivo	37
5 Discusión	40
5.1 Comparación de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1 para la regeneración vía organogénesis indirecta de <i>P. vulgaris</i>	40
5.1.1 Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1	40
5.1.2 Regeneración, elongación y enraizamiento de los brotes	41
5.2 Efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, del tiempo de infiltración por vacío y co-cultivo en la regeneración de brotes de <i>P. vulgaris</i>	42
6 Conclusiones	48
7 Recomendaciones	49

1 Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una leguminosa de gran importancia económica a nivel mundial (Lanna *et al.*, 2016). Su consumo garantiza un elevado aporte nutricional a la dieta humana (Menge *et al.*, 2014), pues representa más del 15% del total de calorías diarias consumidas y más del 30% de las proteínas vegetales fijadas en la alimentación (Thào *et al.*, 2013). Por esta razón, constituye un alimento básico en países de América Latina, África y Asia (Petry *et al.*, 2015). Sin embargo, se encuentra distribuido en los cinco continentes (FAO, 2017). Como resultado de esta diversificación de su hábitat, se enfrenta a condiciones ambientales que disminuyen su producción como factores bióticos tales como hongos, bacterias, insectos plagas y virus y a factores abióticos como el exceso de cloruro de sodio (NaCl) en el suelo, la sequía y las altas temperaturas (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2014).

Dentro del género *Phaseolus* existen algunas especies que presentan genes de resistencia ante diversas enfermedades que afectan el cultivo de *P. vulgaris*. Un ejemplo de esto lo constituye *Phaseolus polyanthus* L. que es una fuente de resistencia ante el BGYMV (del inglés *Bean golden yellow mosaic virus*) o *Phaseolus acutifolius* A. Gray que constituye una fuente de resistencia ante el insecto plaga *Empoasca kraemeri* Ross y Moore. Pero el cruzamiento de estas especies con *P. vulgaris* presenta limitaciones debido a que el apareamiento entre los cromosomas es imperfecto, ocurre una esterilidad masculina en híbridos F1, un aborto de embriones en híbridos interespecíficos y una correlación inversa de los caracteres deseados. Producto de estas limitaciones menos del 5% de la diversidad genética disponible en el género *Phaseolus* a podido ser utilizada en la generación de cultivares tolerantes o resistentes a diferentes factores de estrés (Singh, 2016).

La biotecnología vegetal junto a los métodos de mejoramiento genético convencional, pueden facilitar la generación de cultivares de *P. vulgaris* con tolerancia o resistencia a factores que provocan estrés, incrementar la calidad de la semilla o mejorar la arquitectura de la planta (Gatica *et al.*, 2010). En este sentido, la transformación genética es una alternativa viable para incrementar la producción en este cultivo (Allah *et al.*, 2015).

Los estudios de transformación genética en *P. vulgaris*, se han realizado generalmente a partir del empleo de métodos de transferencia directa de ADN como la biobalística, el cual resulta muy ventajoso. No obstante, con su aplicación se pueden silenciar genes que no son los de interés (Bonfim *et al.*, 2007). A diferencia de la biobalística, la transferencia indirecta de ADN mediante el empleo de vectores biológicos como *Agrobacterium tumefaciens*, posibilita la

transferencia de largas secuencias de ADN y la inserción de pocas copias de estas, lo cual garantiza el silenciamiento de los genes de interés (Darbani *et al.*, 2007).

Para el establecimiento de un protocolo de transformación genética vía *A. tumefaciens*, se necesita una adecuada diferenciación celular, el desarrollo de brotes y la regeneración de al menos una planta completa (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). En el caso de *P. vulgaris*, la transformación se dificulta debido a que los protocolos existentes se han desarrollado en cultivares específicos. Además, existe una escasa estandarización de parámetros que incrementan la transferencia de ADN (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013), como la concentración de la suspensión bacteriana (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013), la infiltración por vacío (Liu *et al.*, 2005) y el tiempo de co-cultivo (Amugune *et al.*, 2011)

En el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) se ha logrado la regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta en cinco cultivares comerciales de *P. vulgaris*, 'BAT 93', 'BAT 304', 'BAT 482', 'ICA Pijao' y 'CIAP7247F' (Collado *et al.*, 2016). También, se estableció un protocolo de transformación genética vía *A. tumefaciens* para el cultivar 'CIAP7247F'. Este procedimiento combinó la regeneración eficiente vía organogénesis indirecta, en la que se utilizaron callos nodulares verdes como explante blanco y un sistema de selección que emplea el gen *bar* y el herbicida Finale® para la obtención de plantas transgénicas. En el protocolo de transformación genética establecido para 'CIAP7247F' persisten ineficiencias como una baja frecuencia de transformación y la obtención de un alto porcentaje de plantas quimeras y escapes (Collado *et al.*, 2013).

El protocolo establecido para 'CIAP7247F' ha sido probado en otros cultivares comerciales. Sin embargo, su aplicación se dificulta producto de la naturaleza genotipo dependiente de *P. vulgaris* en diferentes cultivares de interés comercial como 'ICA Pijao' y 'BAT 93', debido a que se ha obtenido una baja regeneración. Por esta razón, aún es un propósito de los programas de mejoramiento genético establecer un protocolo de transformación genética vía *A. tumefaciens* eficiente, reproducible y rutinario. Para ello es necesario regenerar plantas fértiles a partir de tejido de *P. vulgaris* transformado y optimizar técnicas de transformación mediadas por *A. tumefaciens* que permitan una eficiente transferencia de ADN.

Como parte de un proyecto nacional que tributa al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), financiado por el programa de Alimento Humano y que contribuye a la sustitución de importaciones en Cuba, en el IBP se trabaja en el mejoramiento genético de *P. vulgaris*. En este sentido, los estudios se dirigen a la búsqueda de resistencia a factores que provocan estrés biótico y abiótico, para lo cual se deben optimizar diferentes parámetros que

intervienen en la transformación genética de *P. vulgaris* vía *A. tumefaciens* para aplicarlo en cultivares de interés comercial como 'ICA Pijao' y 'BAT 93'.

Teniendo en cuenta la problemática anterior nos planteamos la siguiente hipótesis científica:

La utilización de diferentes tipos de explantes y la determinación del efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, la infiltración por vacío y el tiempo de co-cultivo en la regeneración de brotes, permitiría optimizar la transferencia de ADN de *Agrobacterium tumefaciens* a *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' y 'BAT 93'.

Para cumplimentar la hipótesis planteada se definen los siguientes objetivos:

Objetivo general

Optimizar la transferencia de ADN de *Agrobacterium tumefaciens* a *Phaseolus vulgaris* L., cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'.

Objetivos específicos

1-Comparar tres explantes para la regeneración vía organogénesis indirecta.

2-Determinar el efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, el tiempo de infiltración por vacío y el co-cultivo en la regeneración de brotes.

2 Revisión bibliográfica

2.1 *Phaseolus vulgaris* L.

2.1.1 Origen, taxonomía y morfología

Phaseolus vulgaris, se originó a partir de *Phaseolus vulgaris* cv. 'Mexicanus' y 'Aborigineus'. Estos progenitores se distribuyeron en un área que se extendió desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Gepts, 2001). No obstante, el cultivo se ha diversificado a nuevos ambientes y condiciones agrícolas de regiones tanto europeas como africanas (Omae *et al.*, 2012). Aunque en el género *Phaseolus* existen otras tres especies domesticables como *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray y *Phaseolus polyanthus* Greenman, es *P. vulgaris* quien tiene la mayor importancia científica y económica (Gepts, 2001).

Esta especie pertenece al reino Plantae, a la división Magnoliophyta, a la clase Magnoliopsida, a la subclase Rosidae, al orden Fabales, a la familia Fabaceae, a la subfamilia Faboideae, a la tribu Phaseoleae, a la subtribu Phaseolinae, al género *Phaseolus* y su nombre científico es *P. vulgaris* (NCBI, 2017).

P. vulgaris es una planta herbácea, anual y de porte trepador o erecto, que se cultiva en regiones tanto tropicales como templadas. El sistema radical está formado por una raíz principal sobre la que se disponen raíces secundarias y terciarias. Estas pueden ser colonizadas por bacterias del género *Rhizobium* y establecer relaciones de simbiosis, que producen nódulos irregulares (Grada *et al.*, 2016). Aunque el sistema radical presenta variaciones, en la mayoría de los cultivares se considera fibroso (Beaver *et al.*, 2002).

El tallo joven es herbáceo y al final del ciclo vegetativo es semileñoso. Este se conforma por una sucesión de nudos y entrenudos, donde se insertan las hojas y complejos axilares. Además, el tallo presenta un eje principal de mayor diámetro que las ramas laterales (Vivanco *et al.*, 2011).

Las hojas pueden ser simples y compuestas, presentan formas ovaladas o rómbicas y se insertan tres en un nudo (Romero-Arenas *et al.*, 2013). Las primeras hojas verdaderas se desarrollan en el segundo nudo, son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo, se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres folíolos, con un peciolo y un raquis. Las hojas presentan variaciones en cuanto al tamaño, al color y a la vellosoidad, en dependencia de la variedad y las condiciones de luz y humedad (Nassar *et al.*, 2010).

Las flores pueden presentar un color púrpura o blanco. Estas se desarrollan en una inflorescencia de racimo, la cual puede ser terminal como sucede en las variedades de hábito determinado o lateral en las indeterminadas. La inflorescencia en su mayoría es pauciflora y asimétrica, consta de pedúnculo, raquis, brácteas y botones florales. Los botones florales pueden ser blancos, rosados o violetas (Gepts *et al.*, 2005). El fruto es en legumbre y de color variable, en su interior se encuentran de tres a 12 semillas estrechas y de colores variados (Beaver *et al.*, 2002; Romero-Arenas *et al.*, 2013) (Fig. 1).



Figura 1 Semillas, flores y vainas de los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93' de *P. vulgaris*. Tomado de Collado (2013)

2.1.2 Generalidades del cultivo

P. vulgaris es un cultivo de climas cálidos que muestra un adecuado desarrollo en ambientes con temperaturas comprendidas entre 16 y 26°C durante la etapa de crecimiento y con precipitaciones de 300 a 500 x 10³ mm a lo largo del ciclo de la cosecha. La maduración de los frutos coincide con la estación lluviosa, lo cual previene que el grano se manche y pierda calidad. El grano se siembra preferentemente en suelos aireados y no en suelo calizo o arcilloso (Romero-Arenas *et al.*, 2013). Sin embargo, para incrementar la diversidad de la producción se pueden sembrar las semillas de *P. vulgaris* en suelos secos con rotaciones con maíz en el período invernal (Emam *et al.*, 2010). Además, el cultivo necesita de la aplicación de fertilizantes como el potasio y el fósforo (Romero-Arenas *et al.*, 2013).

Este cultivo es considerado un alimento básico por su aporte proteico a la dieta humana, especialmente en las poblaciones rurales, donde el consumo de proteína animal es reducido debido a limitaciones económicas. Por esta razón, para más de 300 millones de personas en el este de África y en Latinoamérica, representa el 65% del total de proteínas consumidas

(Petry *et al.*, 2015). Esto se debe a que posee altas concentraciones de aminoácidos como lisina, fenilalanina y tirosina. También, es rico en carbohidratos como el almidón, de lo cual se deriva su aporte energético (Ulloa *et al.*, 2011) y constituye una fuente importante de micronutrientes como el hierro, el zinc, la tiamina y el ácido fólico (Petry *et al.*, 2015). En su composición se destaca la presencia de taninos, antocianinas, compuestos fenólicos y fibras, que contribuyen a la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Reynoso *et al.*, 2007).

P. vulgaris es uno de los cultivos más comercializados a nivel mundial, por lo cual existe un área de $29,2 \times 10^6$ ha dedicada a su producción (Amugune *et al.*, 2011) en 131 países, lo que representa un total de $23,3 \text{ t m}^{-2}$. La producción anual en 2013 fue de $23\ 713\ 064 \times 10^6$ t, de estas $6\ 048\ 036$ y $7\ 041\ 440 \times 10^6$ t fueron producidas por África y América, respectivamente. Entre los principales productores se destacan la India, Birmania, Myanmar y China. No obstante, se ha incrementado notablemente la producción en otros países como Indonesia, Irán, Vietnam y Turquía. En el continente americano se destacan Estados Unidos, México y Brasil, siendo este último el mayor productor de la región. Los principales consumidores se localizan en Asia, África y América Latina. En África oriental es donde se encuentran las más altas tasas de consumo *per capita*, específicamente en países como Kenya, Etiopía, Burundi, Ruanda y Uganda (FAO, 2017).

En Cuba, *P. vulgaris*, constituye una tradición en el hábito de consumo de la población (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013). A pesar de que en este país se cultivan 123 914 ha, con una producción de 133 000 t anuales, en 2015 (ONE, 2017), la productividad es baja en relación a otros países de América del Sur. Lo anterior puede deberse a varios factores como la falta de asistencia técnica, el escaso uso de insumos y problemas fitosanitarios (Echemendía *et al.*, 2010). No obstante, producto de la demanda de este grano, se han desarrollado programas de mejoramiento genético que han permitido obtener nuevos cultivares como 'CIAP7247F' (Quintero, 2000).

Para el cultivo de *P. vulgaris*, en Cuba, se consideran tres épocas de siembra. La época temprana de septiembre a octubre, caracterizada por la presencia de una alta humedad y altas temperaturas. La época óptima de octubre a noviembre, donde generalmente se registran los mejores rendimientos en este grano. La época tardía de diciembre a enero, en la que se realizan las siembras en los períodos húmedos que son de al menos 10 h continuas por la entrada de frentes fríos y la combinación con temperaturas moderadas a frescas (17 a 27°C) (Lamz *et al.*, 2016).

En Cuba, la obtención de granos de *P. vulgaris* está a cargo fundamentalmente del sector agrícola no estatal, constituido en su mayoría por fincas y pequeñas parcelas, con condiciones muy diversas y baja disponibilidad de insumos agroquímicos y energéticos (ONEI, 2017). Como resultado de estas condiciones adversas a las que el cultivo se enfrenta en el país, aumenta la incidencia de afectaciones provocadas por factores ambientales que disminuyen su producción.

2.1.3 Factores bióticos y abióticos que afectan el cultivo

Factores bióticos

La producción de *P. vulgaris* a nivel mundial se ve afectada por factores que provocan estrés biótico. Entre ellos se destacan enfermedades causadas por patógenos como bacterias, hongos y virus, además de insectos plagas.

Pseudomonas syringae Van Hall y *Xanthomona campestris* (Pammel) Dowson son bacterias que causan enfermedades de gran impacto económico en el cultivo (Muedi *et al.*, 2015). *P. syringae* provoca lesiones de forma pequeña, ovaladas y necróticas en las hojas, alrededor de las cuales el tejido se arruga (Chatterton *et al.*, 2016). En el caso de *X. campestris* la lesión provoca flacidez en el tejido, con una coloración marrón y necrótica con márgenes amarillos y verde claro (Vauterin *et al.*, 2000).

Entre los hongos que afectan el cultivo de *P. vulgaris* se destacan *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Fusarium solani* Mart. Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger que se considera la causa principal de pérdidas en las cosechas. *A. alternata* provoca lesiones de pequeño tamaño y con forma irregular de color marrón en las hojas, lo que puede conducir a una senescencia prematura (El-Gali y El-Zahaf, 2015). En el caso de *F. solani* provoca necrosis bajo el hipocótilo, al penetrar por las raíces (Ongom *et al.*, 2012). *S. sclerotiorum* provoca lesiones en las vainas, las hojas y los tallos, que pueden causar la muerte de toda una rama o de toda la planta (Schwartz y Singh, 2013). *R. solani* afecta las raíces y los peciolos de las hojas en la interfaz del suelo y provoca necrosis pequeñas y secas (Fernández-Herrera *et al.*, 2013). El hongo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, causante de la roya, influye significativamente en el rendimiento del cultivo durante la etapa de prefloración y floración en dependencia del grado de tolerancia de los diferentes cultivares (Lamz *et al.*, 2016).

Entre las afectaciones inducidas por virus se destacan las ocasionadas por el BGYMV (del inglés *Bean golden yellow mosaic virus*), el BGMV (del inglés *Bean golden mosaic virus*), BCMV (del inglés *Bean common mosaic virus*) y el BDMV (del inglés *Bean dwarf mosaic virus*).

El BGYMV induce en las hojas una marcada deformación, muchas de las cuales pueden tornarse completamente amarillas o casi descoloridas (Araya, 2008; Echemendía *et al.*, 2010; Martínez, 2008). En el caso del BGMV induce en las hojas un mosaico, caracterizado por presentar áreas de color verde oscuro bien definidas sobre un fondo verde claro. Estas áreas se distribuyen irregularmente a lo largo de las nervaduras. También induce una necrosis sistémica, caracterizada por el deterioro rápido o gradual del sistema vascular de las hojas trifoliadas más jóvenes (Mukeshimana *et al.*, 2003). El BDMV induce en las hojas la aparición de manchas irregulares cloróticas. Además, en estas zonas afectadas el tejido crece a un ritmo lento, causando una deformidad y enanismo en los cultivares más susceptibles (Seo *et al.*, 2004).

En *P. vulgaris* entre las afectaciones provocadas por insectos plagas se encuentra el complejo de chinches de la familia *Pentatomidae*. Estos afectan el cultivo durante su etapa reproductiva, ocasionando picaduras sobre las legumbres, las que se identifican por la aparición de puntos necróticos en el epicarpio. Estos succionan la savia de los granos y sus picaduras impiden el desarrollo normal de las semillas en formación, lo que origina legumbres vacías. También reducen su poder germinativo, dado que una sola picadura puede producir la muerte del embrión (Ramos *et al.*, 2011).

Este cultivo en su fase vegetativa se ve afectado por *E. kraemeri* y *Bemisia tabaci* (Gennadius). *E. kraemeri* afecta a *P. vulgaris* tanto en estado de ninfa como en estado adulto pues al succionar la savia ocasiona en las hojas clorosis y necrosis. Con esto se reduce el crecimiento de las plantas, se escinden las flores y no existe una adecuada formación del fruto. Cuando el ataque es muy intenso la planta muere y si no se controla puede ocasionar la pérdida casi total de la producción (Sánchez-Castro *et al.*, 2016). Por otro lado, *B. tabaci* puede causar daños directos al actuar como insecto chupador. Además, puede causar daños indirectos provocando una maduración no uniforme de los frutos así como posibilitando el desarrollo de hongos saprófitos sobre sus excreciones, lo cual interfiere con el funcionamiento de las hojas y mancha externamente los frutos. Sin embargo, la mayor importancia como problema fitosanitario deriva de su capacidad para transmitir enfermedades virales ocasionando cuantiosas pérdidas a escala mundial (Romay *et al.*, 2016).

Factores abióticos

P. vulgaris es afectado por factores abióticos que limitan su producción. Entre estos se encuentran el exceso de NaCl en los suelos, el déficit hídrico y las altas temperaturas.

El exceso de NaCl en el suelo afecta el cultivo debido a la absorción excesiva de iones sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-), lo que provoca un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales, el efecto osmótico y la combinación de los efectos antes mencionados (Munns y Tester, 2008). Este factor de estrés minimiza la habilidad de la planta para utilizar el agua y causa una reducción de la tasa de crecimiento, pues afecta procesos metabólicos importantes como la fotosíntesis, la transpiración, el crecimiento celular y la germinación de la semillas (Mena *et al.*, 2015). La ocurrencia de estas afectaciones se debe a la reducción del potencial hídrico en las raíces, causando déficit de agua, fitotoxicidad de iones como el Na^+ y Cl^- y un desbalance de nutrientes por la depresión de los tejidos de transporte en el tallo. Esto se atribuye a que el Na^+ compite con el potasio (K^+) por sitios de unión esenciales para el funcionamiento celular. Se debe tener en cuenta que el K^+ actúa como activador de 50 enzimas y el Na^+ no puede sustituirlo. La reducción del crecimiento debido al exceso de NaCl ocurre como consecuencia de la modificación del balance iónico, así como la disminución del nivel hídrico, la nutrición mineral, el desarrollo estomático, la eficiencia fotosintética y utilización del carbono (Gama *et al.*, 2007).

El déficit hídrico, provoca una disminución del potencial hídrico de las hojas, de la conductancia estomática, de la tasa fotosintética, del crecimiento y de la productividad (El-Tohamy *et al.*, 2013). Las primeras manifestaciones de afectación provocadas por déficit hídrico son visibles en las hojas, pues aparece una senescencia prematura, seguida de cambios morfológicos y metabólicos en las raíces y tejidos primarios, debido a la reducción de agua. El estrés hídrico provoca un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno e induce el cierre de los estomas inhibiendo la absorción de dióxido de carbono (CO_2) (Razinger *et al.*, 2010). En los tejidos de las plantas con déficit hídrico se incrementan las concentraciones de ácido abscísico (ABA), lo que favorece el incremento de la conductancia hídrica en las raíces (Aroca *et al.*, 2006). En las células de las plantas afectadas por la sequía se produce un desbalance entre sustancias pro-oxidantes y antioxidantes, después del cual ocurren daños oxidativos irreversibles (Razinger *et al.*, 2010).

Las altas temperaturas reducen el rendimiento y la calidad de los granos debido a que se afecta el desarrollo de los óvulos, se produce una abscisión de los órganos reproductivos y se inhibe la fertilización, con lo que tiene lugar la consecuente reducción del número de semillas (Rainey y Griffiths, 2005). Además, se ve afectado el potencial hídrico de las células debido a que la reserva interna de agua en la planta está asociada con la tolerancia a altas temperaturas (Omae *et al.*, 2006). En *P. vulgaris*, existe una gran variabilidad en cuanto a la manifestación de

la tolerancia a las altas temperaturas en dependencia del cultivar. Un ejemplo de ello es el cultivar 'Venture', el cual es altamente tolerante y podría ser utilizado para modificar genéticamente otros cultivares más sensibles (Rainey y Griffiths, 2005).

2.1.4 Manejo del cultivo de *Phaseolus vulgaris*

La esfera agroalimentaria es de gran importancia para la economía de un país. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de alternativas productivas, la diversificación, la capacitación de la fuerza de trabajo, la utilización de métodos agroecológicos, el estudio de diferentes cultivares y la obtención de semillas de calidad, con el objetivo de lograr un aumento gradual de la suficiencia agrícola (Peña *et al.*, 2015). Es por ello, que los programas de manejo integrado constan de medidas de control agrotécnicas, químicas y biológicas.

Control agrotécnico

Las medidas de control agrotécnico son empleadas para incrementar la producción de *P. vulgaris* a nivel mundial. Estas incluyen el empleo de semillas certificadas, evitar las siembras en suelos con mucha humedad o mal drenados, tener en cuenta la densidad de la plantación y el adecuado espacio entre una planta y la siguiente. Además, se deben eliminar los restos de las cosechas y realizar una adecuada rotación de los cultivos (Mwanauta *et al.*, 2015).

La rotación de los cultivos incrementa el rendimiento de la cosecha si se compara con la siembra en monocultivos. Esta proporciona varios efectos beneficiosos como un mayor aprovechamiento de la economía del agua, incrementa la humedad del suelo, la captación de nutrientes, así como una reducción de los componentes tóxicos en el mismo (Emam *et al.*, 2010). También, reduce la probabilidad de aparición de plagas y enfermedades recurrentes (Rosado *et al.*, 1985).

Control químico

El control químico de plagas que afectan a *P. vulgaris* se realiza a partir del empleo de grandes cantidades de plaguicidas. Entre estos se encuentra el imidacloprid, [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidina-2-ilideneaina], que actúa como controlador de *Aphis fabae* Scopoli, *Ophiomyia phaseoli* Tyron y *Oothea bennigseni* Weise. Mediante su empleo se ha reducido el número de vectores involucrados en la transmisión de enfermedades virales como el PLRV (del inglés *Potato leaf roll virus*), el FBNYV (del inglés *Faba bean necrotic yellows virus*) y el SbDV (del inglés *Soybean dwarf virus*) (Mwanauta *et al.*, 2015).

En el control del género *Empoasca* y *B. tabaci*, se han utilizado otros insecticidas como diazinon, [O-dietil O-2-isopropil-6-metil (pirimidina-4-il) fosforotioato] y la deltametrina [(S)-Alfa-ciano-3-fenoxibencil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato] (Quinteros-Hidalgo, 2015). Además, se emplea como ovicida el bifentrin [2-metilbifenil-3-ilmetil (Z)-(1RS, 3RS)-3-2-cloro-3,3,3-trifluoropropano-1-enil, 2-dimetilcicloropropano carboxilato] (Brown *et al.*, 2012).

El control químico de insectos plagas y hongos fitopatógenos en *P. vulgaris* provoca severos daños ambientales, así como la aparición de fungoresistencia e insectoresistencia. Por esta razón, es preciso valorar el empleo de organismos antagonistas y extractos de plantas como parte de la estrategia de manejo.

Control biológico

El control biológico se realiza a partir del empleo de organismos antagonistas como bacterias. Además, son utilizadas otras alternativas como los extractos de plantas.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner es utilizada en el control de larvas de lepidópteros, entre las que se encuentran *Helicoverpa*, *Spodoptera*, y *Chrysodeixis*, que afectan este cultivo (Mwanauta *et al.*, 2015). Además, se emplean extractos de plantas de *Azadirachta indica* A. Juss. para el control de *B. tabaci* (Zeledon, 1990). Otros extractos obtenidos a partir de bulbos de *Allium sativum* L., repelen insectos como *Tetranychus urticae* Koch (Hincapie *et al.*, 2008).

El manejo integrado del cultivo de *P. vulgaris* incluye estrategias de control agrotécnico, químico o biológico que con frecuencia no son efectivas o persistentes (Mwanauta *et al.*, 2015). La biotecnología vegetal, junto a los métodos de mejoramiento genético convencional, facilitan la generación de cultivares de *P. vulgaris* con resistencia o tolerancia a factores de estrés biótico o abiótico, respectivamente. Además contribuye al incremento de la calidad de la semilla y a la mejora de la arquitectura de la planta (Gatica *et al.*, 2010). En este sentido, la transformación genética como complemento de las técnicas convencionales es un vía para generar cultivares resistentes o tolerantes a diversos factores de estrés que afectan a *P. vulgaris*. Ello constituye una alternativa viable para incrementar su producción.

2.2 Transformación genética en *Phaseolus vulgaris*

El mejoramiento genético tradicional en *P. vulgaris* se basa en su variabilidad genética natural y la reproducción sexual. Esta variabilidad se ve restringida debido al ligamiento genético y a las barreras de hibridación sexual. Es por ello, que con el objetivo de eliminar la incompatibilidad sexual existente entre los individuos, se emplean métodos de transformación genética, que

posibilitan la transferencia de genes entre organismos genéticamente distantes (Kwapata *et al.*, 2010). Estos métodos de transformación genética se pueden dividir en directos o físicos e indirectos o biológicos, según sea la manera en la cual penetra el ADN. Aunque los métodos de transferencia indirecta son más populares, los métodos de transferencia directa son muy utilizados en la biotecnología vegetal (Rivera *et al.*, 2012).

2.2.1 Métodos de transferencia directa de ADN

La transferencia directa de genes incluye métodos como la biobalística, la electroporación (Tuteja *et al.*, 2012), el tratamiento con polietilenglicol y la microinyección (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013).

Biobalística

La biobalística es un método que permite mediante un co-bombardeo la penetración a la célula vegetal de partículas cubiertas de genes. De esta forma, se elimina la necesidad de emplear múltiples construcciones genéticas con varias secuencias de transformación. La implementación de este método es fácil pues no requiere de ningún tratamiento previo en la célula y es independiente a las propiedades fisiológicas de la misma (Veltcheva *et al.*, 2003).

La biobalística se ha empleado en la transformación genética de *P. vulgaris* para obtener resistencia al BGMV (del inglés *Bean golden mosaic virus*) con resultados satisfactorios (Bonfim *et al.*, 2007). Además, mediante este método se ha transformado genéticamente *P. vulgaris* con el gen *bar*, para conferir resistencia a herbicidas y el gen *HVA1* para conferir resistencia a la sequía, con resultados favorables en ambos casos (Kwapata *et al.*, 2012). No obstante, este método presenta la desventaja de requerir de continuas cadenas de insumos y puede dañar mecánicamente al ADN (Rivera *et al.*, 2012). Además, la introducción de múltiples copias del gen de interés puede ocasionar efectos no deseados como el silenciamiento de otros genes (Agrawal *et al.*, 2005).

Electroporación

La electroporación consiste en la aplicación de un campo eléctrico externo a través de una suspensión celular. Este método provoca en la membrana plasmática un aumento de la conductividad eléctrica y de la permeabilidad, que conducen a la formación de poros en la misma (Atif *et al.*, 2013). Además, este es un método simple, que puede realizarse en un corto período de tiempo y sin un elevado costo económico (Rivera *et al.*, 2012).

Mediante este método se han regenerado de forma satisfactoria plantas transgénicas de *Saccharum officinarum* L. (Arencibia *et al.*, 1992). La electroporación puede aumentar su eficiencia si se combina con el empleo del vector biológico *A. tumefaciens*, o la biobalística.

Sin embargo, la electroporación tiene la desventaja de ser solo aplicable a protoplastos, lo que conlleva a la implementación de técnicas de cultivo de tejidos muy laboriosas (Díaz y Chaparro-Giraldo, 2012). Además, es dependiente de las características electrofisiológicas de la planta, requiere del empleo de protocolos de larga duración para la regeneración y generalmente presenta una eficiencia baja (Rivera *et al.*, 2012). No obstante, puede ser empleado en el protoplasto de cualquier planta y utilizarse en diferentes tipos celulares (Khan, 2010).

Tratamiento con polietilenglicol

El tratamiento con polietilenglicol utiliza solamente protoplastos y se basa en la capacidad de esta sustancia para estimular la endocitosis, lo cual conduce a la captación del ADN. El tratamiento con polietilenglicol es poco utilizado producto de la baja frecuencia de transformación que se obtiene y por el bajo número de especies de plantas completas que pueden ser regeneradas a partir de protoplastos (Khan, 2010). Sin embargo, se han transformado por esta vía plantas de *Zea mays* L. y *Oryza sativa* Hochst. ex Steud (Hayashimoto *et al.*, 1990; Holm *et al.*, 1991; Young *et al.*, 2001).

Microinyección

La microinyección es un mecanismo de inyección de ADN dentro del núcleo o del citoplasma de las células, que se realiza empleando una pipeta de inyección con un lente microcapilar (Khan, 2010). Este método ha sido utilizado en *Brassica napus* L. y no se logró una transformación estable para todas las plantas evaluadas, lo cual pudo deberse a que no todo el ADN fue inyectado (Jones-Villeneuve *et al.*, 1995).

La microinyección requiere de un equipamiento costoso debido a la manipulación que es necesaria dentro de las células bajo el microscopio. Además, existen limitaciones al utilizarlo en células que presenten una pared celular delgada. La transformación mediante este método no consta de un protocolo de regeneración eficiente en la mayoría de la especies, lo cual constituye una desventaja para su aplicación (Khan, 2010).

2.2.2 Métodos de transferencia indirecta de ADN

Los métodos de transferencia indirecta de ADN utilizan como vectores biológicos a *A. tumefaciens* (Kwapata, 2015). De esta forma, se pueden transferir largas secuencias del ADN foráneo y se introducen pocas copias de estas secuencias, por lo que la probabilidad de inducir silenciamiento en los genes que no sean de interés en la planta es baja (Pérez *et al.*, 2008). Además, la transformación es accesible, consta de estabilidad y precisión (Darbani *et al.*, 2007), y el gen foráneo se transmite a la descendencia de manera estable (Alimohammadi y Bagherieh-Najjar, 2009).

Este procedimiento es rápido y sencillo, por lo que puede ser utilizado en plantas con sistemas de regeneración poco complejos, lo cual permite obtener elevados niveles de expresión de los genes de interés (Helm *et al.*, 2011). Sin embargo, entre sus desventajas se halla que, al ser las plantas infectadas por la bacteria, esta infección pueda interferir con el proceso de regeneración (Veluthambi *et al.*, 2003).

Interacción *Agrobacterium tumefaciens*-planta

A. tumefaciens, es una bacteria fitopatógena, Gram negativa, presente en los suelos. Esta tiene la capacidad de inducir tumores en la planta, denominados agalla de la corona, los que se caracterizan por presentar un crecimiento celular en la base del tallo. Esta bacteria afecta a plantas dicotiledóneas (Guo *et al.*, 2011) y algunas monocotiledóneas (Fukuona *et al.*, 2000). En la interacción *A. tumefaciens*-planta tienen lugar siete eventos fundamentales: reconocimiento y adherencia, identificación de señales de la planta, activación de genes *vir*, generación del ADN-T, exportación del ADN-T hacia la planta, importación del ADN-T dentro del núcleo de la planta e integración del ADN-T dentro del genoma del hospedante (Cullen y Binns, 2006). Seis de estos eventos se muestran en la Fig. 2.

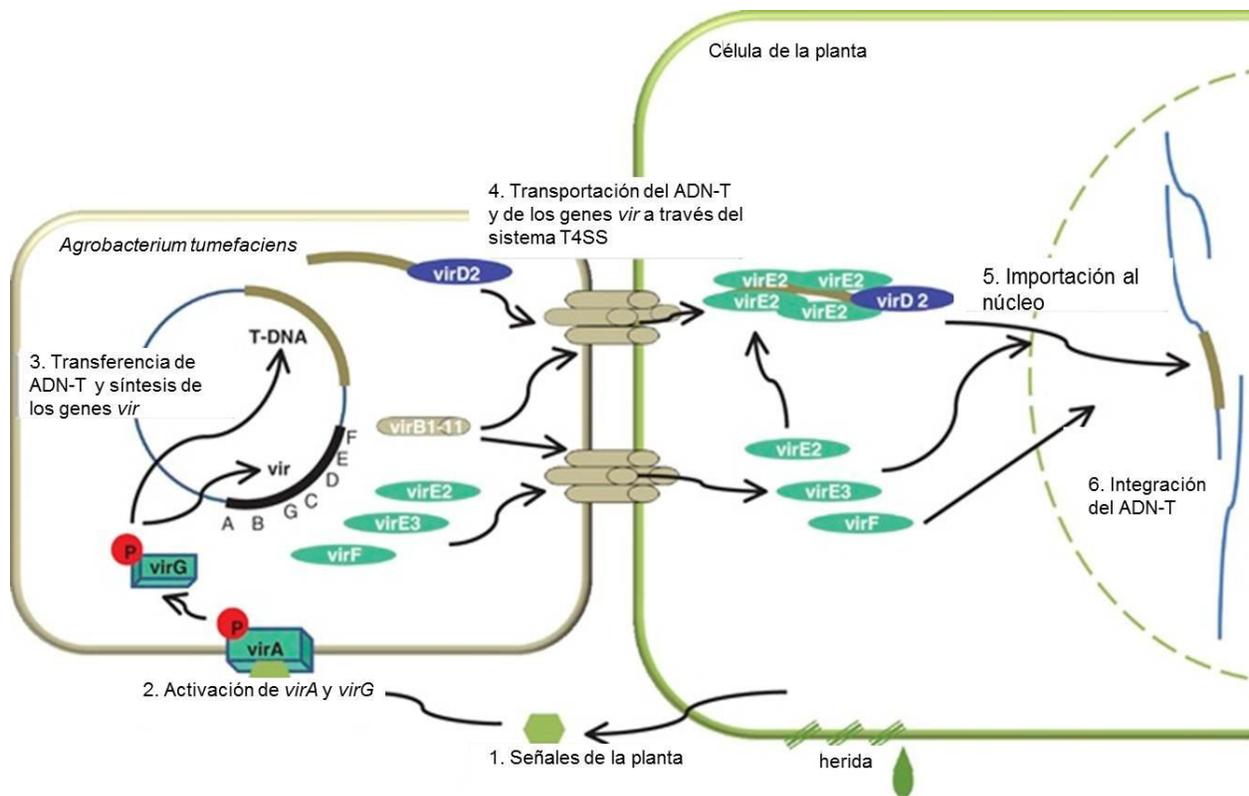


Figura 2 Mecanismo de infección de *Agrobacterium tumefaciens* en células de plantas. Tomado de Pitzschke y Hirt (2010)

En el reconocimiento y adherencia intervienen indirectamente los genes *chvA*, *chvB*, *pscA*, los cuales están involucrados en la síntesis, procesamiento y exportación del β -1,2-glucano cíclico. Este compuesto está implicado en la unión de la bacteria con las células de la planta (Guo *et al.*, 2011).

En la identificación de las señales producidas por la planta intervienen las proteínas VirA y VirG que reaccionan ante la presencia de exudados en las heridas de las plantas y promueven la activación transcripcional de otros genes *vir*. VirA detecta la presencia de compuestos fenólicos de las plantas como lignina, precursores de flavonoides y acetosiringona, cuya síntesis es inducida después de provocada la lesión por la bacteria (Zupan *et al.*, 2000). VirA se autofosforila y subsecuentemente fosforila a VirG, lo que permite la transducción de señales que activan los genes *vir* (Gelvin, 2003).

La generación del ADN-T tiene lugar por la acción de las proteínas VirD2 y VirD1, que actúan como endonucleasas, uniéndose al plásmido Ti en los bordes del ADN-T y haciendo cortes en la cadena del ADN-T. Después de hacer el corte, la proteína VirD2 se une covalentemente al

extremo 5' del ADN-T, específicamente a un residuo de tirosina, hasta su transferencia a la planta (Kakkar y Kumar, 2011). El ADN-T es cubierto por proteínas de unión al ADN de cadena simple que permiten su transporte. Las proteínas VirE2 también se unen al ADN-T y posiblemente cubren la cadena formando en conjunto con VirD2 un complejo de transferencia (Zambryski *et al.*, 1983; Valderrama *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2011).

La transferencia del ADN-T de *A. tumefaciens* a la célula de la planta es mediada por el sistema de secreción tipo IV (T4SS). Este transportador es fundamental en los procesos de patogénesis, pues exporta factores de virulencia importantes a través de la membrana de la bacteria. Entre estos factores se encuentran el operón VirB/VirD4 que es requerido para la transferencia del ADN a la planta hospedante, el sistema Trb que codifica para la transferencia por conjugación del plásmido Ti entre células de *Agrobacterium*, y el sistema AvhB que media la transferencia del ADN-T en ausencia de las proteínas VirB y el sistema Trb (Valderrama *et al.*, 2005). Cuando el ADN-T es transferido a la célula del hospedante codifica para la síntesis de hormonas vegetales como auxinas y citoquininas, las cuales provocan una gran proliferación celular, así como para aminoácidos de bajo peso molecular y para derivados de azúcares fosfatos llamados opinas. Estas opinas sirven como fuente de carbono y de nitrógeno, lo cual permite crear un nicho ecológico favorable para *A. tumefaciens*, debido a que la bacteria metaboliza estos nutrientes (Opabode, 2006).

La importación al núcleo de la planta del complejo VirD2-complejo T tiene lugar en conjunto con el transporte de las proteínas VirE2, VirF y VirE3. Las proteínas VirD2 y VirE2 son las que median directamente el proceso de importe nuclear del complejo T. En la célula vegetal, VirD2 y VirE2 pueden interactuar con proteínas chaperonas que permiten el importe nuclear del complejo T y su integración. Las proteínas chaperonas RocA, Roc4 y CypA al parecer mantienen la conformación de VirD2 durante el importe nuclear del complejo T y su integración. El importe nuclear del complejo T es asistido por proteínas celulares del hospedante como VIP1 que interactúa específicamente con VirE2 (Valderrama *et al.*, 2005).

La integración del ADN-T dentro del cromosoma de la planta esta mediada por la proteína VirD2 que contiene dominios con actividad para la recombinación y ligación (Zupan *et al.*, 2000).

2.2.3 Factores que intervienen en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transferencia del ADN-T de *A. tumefaciens* y su integración en el genoma de la planta durante el evento de transformación, está influenciada por varios factores. Estos incluyen el tipo de explante, la edad del explante, el tiempo de co-cultivo, la concentración de la suspensión bacteriana, de la cepa de *Agrobacterium* que se emplee, de la infiltración por vacío, los regímenes de selección y el cultivar empleado (Alimohammadi y Bagherieh-Najjar, 2009; Karami *et al.*, 2009).

Tipo de explante

El tipo de explante a utilizar en un evento de transformación depende del protocolo de regeneración establecido para el cultivo. En este sentido, han sido utilizados como explantes blancos: hojas, raíces, hipocótilos, callos y nudos cotiledonales, con los cuales se han obtenido altas eficiencias de transformación (George *et al.*, 2008).

En estudios de transformación genética mediante *A. tumefaciens* en leguminosas se han empleado varios tipos de explantes. En el caso de *Artemisia absinthium* L., se han empleado raíces, hojas e hipocótilos, obteniéndose una eficiencia de 100% en la transformación de los dos primeros y un 80% de expresión transitoria en hipocótilos (Mannan *et al.*, 2009). En *Vigna unguiculata* L. Walp al emplear nudos cotiledonales, se obtuvo una baja eficiencia de transformación (Raveendar e Ignacimuthu, 2010).

De modo similar, en varias investigaciones se ha obtenido una baja eficiencia en la transformación en *P. vulgaris* con el empleo de eje embrionario como explante blanco (Amugune *et al.*, 2011; Mukeshimana *et al.*, 2013), nudos cotiledonales (McClellan *et al.*, 1991), discos de hojas e hipocótilos (Franklin *et al.*, 1993).

Edad del explante

La edad del explante interfiere con el evento de transformación. De esta forma, los explantes jóvenes muestran altas tasas de transformación transitoria (70%). Sin embargo, en la medida que los explantes envejecen, la frecuencia de transformación disminuye notablemente entre 50 y 30%. Los tejidos jóvenes y con una división celular activa, generalmente son más susceptibles a la penetración de *A. tumefaciens* que aquellos envejecidos (Tazeen y Mirza, 2004).

A partir del empleo de epicótilos de cinco días como explante inicial se obtuvo una alta eficiencia de transformación en *Phaseolus angularis* L. vía organogénesis utilizando, N6-bencilaminopurina y tidiazuron (Varisai *et al.*, 2006). En este sentido, algunos estudios plantean que para explantes de siete días, se observan los mayores valores de expresión del gen *GUS* (100%). Sin embargo, cuando los explantes exceden las dos o tres semanas de edad, los niveles de expresión del gen *GUS* decrecen en un 90% y 70%, respectivamente (Mannan *et al.*, 2009).

Condiciones de co-cultivo

Las condiciones de co-cultivo establecidas para un evento de transformación influyen directamente en la eficiencia alcanzada en el proceso. De esta forma, fijar parámetros como la duración y la temperatura en correspondencia con la cepa de *A. tumefaciens* utilizada, contribuirá a la obtención de resultados satisfactorios.

La prolongación del tiempo de co-cultivo por más de tres días incrementa la frecuencia de transformación transitoria y subsecuentemente los incrementos en el tiempo de co-cultivo provocan un decrecimiento de la frecuencia de transformación (Tazeen y Mirza, 2004). Por esta razón, se debe considerar que los períodos largos de co-cultivo disminuyen la supervivencia y regeneración de los explantes (Naranjo *et al.*, 2002).

El efecto de la temperatura ha sido estudiado en plantas de *O. sativa* donde a temperaturas de 25 y 28°C, disminuyeron la eficiencia de la transformación en los callos, lo cual se constató con una disminución de la actividad de la β -glucuronidasa. No obstante, la temperatura óptima para el co-cultivo depende del explante y del genotipo (Pérez *et al.*, 2008).

Suspensión bacteriana

La concentración óptima de la suspensión de células de *A. tumefaciens*, es un parámetro importante a tener en cuenta en la transformación. Cuando se utilizan concentraciones bajas de la suspensión bacteriana puede disminuir la transferencia de ADN, mientras que concentraciones altas pueden causar la muerte del explante blanco (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013).

En la transformación de *Solanum tuberosum* L. se evaluaron dos concentraciones (1:50 y 1:10), y se determinó que ambas fueron efectivas. Sin embargo, al emplear la concentración de 1:10 se produjo un sobrecrecimiento de la bacteria en los explantes (López y Chaparro, 2007). En el caso de *P. vulgaris*, se requiere de elevadas densidades de células de *A. tumefaciens* para incrementar la eficiencia del proceso de transformación (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013). No

obstante, la concentración adecuada de la suspensión bacteriana depende en gran medida del tejido de planta utilizado y de la cepa de *Agrobacterium* empleada (Blanco *et al.*, 2003).

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

La eficiencia de la transformación genética depende de la cepa de *A. tumefaciens* que sea utilizada. Entre estas, se encuentran diferencias que afectan su capacidad de infección, tales como la virulencia, las diferencias en la estructura y organización del ADN-T y los genes *vir* (Grant *et al.*, 2003). Dicha respuesta está relacionada con la probabilidad de aparición de diferentes genes de resistencia en el hospedante susceptible (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013).

En diferentes estudios de transformación genética en *P. vulgaris* se ha evaluado la expresión transitoria del gen *GUS* empleando las cepas LBA4404 y EHA105 (Amugune *et al.*, 2011). En estudios similares, además de estas cepas se ha empleado GV310, con la cual se logró la mayor expresión del gen *GUS* (Mukeshimana *et al.*, 2013).

Infiltración por vacío

La infiltración por vacío favorece la eficiencia de la transformación en plantas por lo que ha sido muy utilizada en un gran número de especies (Wang y Pijut, 2014). Mediante este proceder, el explante en contacto con una suspensión de *A. tumefaciens* es sometido a una reducción de la presión de vacío. Esto facilita que se introduzca la bacteria en el interior de la célula. La aplicación de vacío provoca que los gases que se encuentran en el interior del explante salgan por los estomas o las lesiones. Cuando se interrumpe el vacío y la presión es incrementada rápidamente, la suspensión celular penetra al interior del explante y reemplaza los gases. El vacío aumenta la exposición de las células de la planta a *A. tumefaciens*, haciéndolas más susceptibles a la transformación (Sivanandhan *et al.*, 2012).

La infiltración por vacío debe ser realizada en un período de tiempo corto (Subramanyam *et al.*, 2011). En este sentido, en plantas de *Glycine max* (L.) Merrill se aplicaron tiempos de infiltración de 1, 2, 3 y 4 min y regímenes de presión de 500, 750, 1,000, y 1,250 mm de Hg. Al aplicar 2 min de vacío y regímenes de presión de 500 y 750 mm de Hg, se obtuvieron los mayores porcentajes de explantes transformados. Mientras que al aplicar 1 min de vacío y regímenes de presión de 1000 y 1250 mm de Hg disminuyó la frecuencia de transformación. Sin embargo, al aplicar tiempos de infiltración por vacío superiores a 2 min y regímenes de presión mayores de 750 mm de Hg, se afectó la supervivencia de los explantes y disminuyó notablemente la frecuencia de transformación (Sivanandhan *et al.*, 2012).

En *P. vulgaris* se aplicaron a explantes de ejes embrionarios 5 min de infiltración por vacío. Aunque sobrevivieron 138 explantes, solo 13 plantas lograron pasar a la fase de aclimatización. Las restantes plantas murieron producto de un sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*, que se volvió sistémica y provocó la muerte de los brotes en condiciones tanto *in vitro* como *ex vitro* (Lorenzo, 2010).

En el cultivar 'Negro Jamapa' de *P. vulgaris* se utilizaron para la transformación genética vía *A. tumefaciens* explantes de discos de hojas. En el mismo, los tiempos de infiltración por vacío de 20 a 25 min favorecieron la eficiencia de la transformación, pues, se obtuvo una eficiencia de la transformación de un 90% y entre el 60 y 85% de células transformadas por superficie de hojas (Nanjareddy *et al.*, 2016).

Regímenes de selección

En la transformación genética de plantas es común el uso de marcadores de selección. Estos son genes codificados para la resistencia a antibióticos o herbicidas, los que resultan efectivos para la selección y proveen de los medios para identificar rápidamente células y tejidos transformados, así como la regeneración de brotes (Rajasekaran *et al.*, 2008).

En *P. vulgaris*, el empleo de agentes selectivos como la kanamicina y el glufosinato de amonio fueron efectivos para identificar los genes *nptII* o *bar*, funcionales en el genoma de la planta (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). A partir del empleo de kanamicina como marcador de selección se ha optimizado la eficiencia en la transformación genética de *Daucus carota* L. vía *A. tumefaciens* (Blanco *et al.*, 2003).

En la selección de líneas de *Musa* sp., transformadas con una construcción que porta el gen *bar* como marcador de selección, se evaluó el efecto del glufosinato de amonio a partir del herbicida Finale®. De esta forma, se logró diferenciar las dos líneas transformadas del control no transformado, a partir de la expresión del gen *bar* (Gómez *et al.*, 2010).

Los marcadores de selección se integran en el genoma de la planta y esto puede provocar consecuencias después de su aplicación. Entre estas consecuencias se encuentra su dispersión en el ecosistema, produciendo efectos como la resistencia a los antibióticos (Williams *et al.*, 2016). No existen evidencias de que los marcadores de selección signifiquen un riesgo para la salud humana o animal. No obstante, debido a la percepción pública de los mismos, es preciso hallar alternativas para eliminarlos después del evento de transformación. Estas medidas se orientan hacia el empleo de marcadores que no se basen en la resistencia a

antibióticos o herbicidas y a la escisión o segregación de genes marcadores del genoma del hospedante después de la regeneración de las plantas transgénicas (Darbani *et al.*, 2007).

Cultivar

Las especies vegetales difieren en el grado de susceptibilidad ante la infección por *Agrobacterium*. En este sentido, en algunos estudios se ha determinado la susceptibilidad a la transformación por *A. tumefaciens* en diferentes cultivares de *P. vulgaris* como '4F 2409', 'Karacaflehir 90', 'Akman 98' y 'Eskiflehir 855'. Sin embargo, aunque se observaron altas frecuencias de transformación, los niveles variaron entre los diferentes cultivares empleados (Karakaya y Özcan, 2001).

La transformación de *P. vulgaris* mediada por *A. tumefaciens*, presenta limitaciones. Esto puede deberse a que después del contacto de la bacteria con la planta, tiene lugar un proceso de defensa que produce áreas necrosadas en el tejido, con la consecuente muerte celular (Valderrama *et al.*, 2005). En adición, el empleo de marcadores de selección no apropiados y la no determinación de las concentraciones adecuadas del agente selectivo, así como la susceptibilidad del cultivar empleado en la transformación, pueden tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de los explantes (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013). La obtención de protocolos que proporcionen una diferenciación celular eficiente, el desarrollo de brotes y la regeneración de la planta completa, son un prerrequisito para el empleo eficiente de la transformación genética (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

2.2.4 Transformación genética en leguminosas vía *Agrobacterium tumefaciens* empleando diferentes sistemas de regeneración

Las leguminosas, de modo general, presentan dificultades en la regeneración *in vitro* debido a su baja respuesta al rejuvenecimiento y marcada dependencia del genotipo. En estas especies, a pesar de desarrollarse eventos de transformación exitosos, se obtiene una baja frecuencia de regeneración. Es por ello, que el desarrollo de una planta transgénica en la mayoría de las legumbres, resulta un proceso muy lento (Kumar *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunos estudios en los géneros *Glycine*, *Vigna* y *Phaseolus* se han obtenido resultados satisfactorios mediante el empleo de *Agrobacterium* como vehículo para la transformación, combinado con diferentes protocolos de regeneración.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática tiene lugar cuando a partir de células se originan embriones somáticos o adventicios que no son producto de la fusión de gametos. Estos embriones son bipolares y no poseen conexión vascular con el tejido que le dio origen, además son capaces de crecer y formar plantas normales. Debido a la naturaleza bipolar del embrión, los sistemas de regeneración a partir de la embriogénesis somática son los más eficientes para la producción masiva de plantas *in vitro* (Jiménez, 1998).

Como la mayoría de las leguminosas, *P. vulgaris*, es difícil de cultivar *in vitro*, por lo cual no se ha logrado el establecimiento de un procedimiento de regeneración vía embriogénesis somática para la posterior transformación genética mediante *A. tumefaciens*. Sin embargo, en un estudio se logró la formación de embriones somáticos en cotiledones de semillas inmaduras de esta especie en el cultivar 'CIAP7247F'. En este se demostró que la adición de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) al medio de cultivo y la orientación del explante sobre este tuvieron un efecto determinante en la embriogénesis somática de esta importante especie (Collado *et al.*, 2011).

En *Glycine max* (L.) Merrill, ha resultado difícil establecer un protocolo de transformación rutinario e independiente del genotipo con resultados satisfactorios (Schenkel *et al.*, 2012). Sin embargo, al transformar cotiledones derivados de semillas inmaduras vía *A. tumefaciens*, se determinó que la embriogénesis somática fue el método más eficiente para la regeneración. De esta forma, se obtuvo una porción considerable de tejido embriogénico transformado y varias plantas transgénicas fértiles (Droste *et al.*, 2001).

En otro estudio de transformación genética empleando el vector biológico *A. tumefaciens* en *G. max* se empleó una regeneración vía embriogénesis somática. En el mismo, la adición de antibióticos necesarios para la transformación mediada por *Agrobacterium* provocó necrosis en el tejido embriogénico. Estos efectos aparecieron a los 35 días de comenzado el tratamiento y fueron más intensos al emplear los antibióticos cefotaxima y vancomicina (Wiebke-Strohm *et al.*, 2010).

El hecho de que la embriogénesis somática permita la formación de plantas a partir de una célula, incrementa la efectividad de la transformación genética. Esto puede deberse a que disminuye o se hace nulo el número de plantas quimeras formadas después de cada evento de transformación (Collado *et al.*, 2011).

Organogénesis

La organogénesis es un evento morfogénico, caracterizado por la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el posterior desarrollo de este en un brote vegetativo. Además, durante este evento existe una conexión entre los nuevos brotes y el tejido que le dio origen. Estos brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o de callos (organogénesis indirecta) (Jiménez, 1998).

En *Vigna radiata* (L.) Wilczek, se estableció un protocolo de regeneración eficiente y reproducible. En el mismo, se utilizó como explante nudos cotiledonales y se empleó a *A. tumefaciens* como mediador de la transformación. Este protocolo garantizó una eficiente regeneración y se obtuvo una expresión estable del gen *GUS*. Además, se describió que con el incremento en la concentración de *A. tumefaciens*, aumenta la frecuencia de transformación, lo cual se corresponde con resultados previos obtenidos en otras legumbres (Kumar *et al.*, 2012).

En *Vigna unguiculata* L. se estableció un protocolo de regeneración y transformación vía *A. tumefaciens* estable a partir de cotiledones inmaduros. Con este protocolo de regeneración se logró una transformación genética eficiente, pues se obtuvo una expresión estable del gen *GUS* (Aasim *et al.*, 2013).

En *Phaseolus polyanthus* Greenman, se estableció un protocolo eficiente y reproducible de regeneración y transformación. Como explante se utilizaron callos nodulares obtenidos de semillas germinadas *in vitro* en casa de cultivo. Este método se describió como un procedimiento básico, que permitió obtener plantas transgénicas de *P. polyanthus* (Zambre *et al.*, 2001).

En *P. vulgaris* se describió un protocolo de transformación viable empleando un sistema de regeneración vía organogénesis directa a partir de hipocótilos. En este trabajo se destacó cómo el empleo de una cepa en particular induce en la transformación una eficiencia diferenciada. Además, como la eficacia de la transformación depende del agente selectivo empleado, sin embargo no fue posible regenerar plantas transgénicas (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). En otra investigación, la combinación de la regeneración vía organogénesis indirecta, en la que se utilizaron callos nodulares verdes como explante blanco y un sistema de selección que emplea el gen *bar* y el herbicida Finale® para la selección del tejido transformado, se obtuvieron plantas transgénicas de *P. vulgaris* cv. 'CIAP7247F'. Estos autores estudiaron otro tipo de explante blanco (secciones de epicótilo) y lograron regenerar vía organogénesis directa, el tejido

transformado con *A. tumefaciens*, pero no lograron plantas totalmente modificadas, solo obtuvieron escapes y quimeras (Collado *et al.*, 2016)

La regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* a partir del cultivo de tejidos se ha alcanzado con cierto grado de éxito en los últimos años. Sin embargo, los efectos del cultivar en la capacidad regenerativa, así como la eficiencia y la reproductibilidad, han sido factores limitantes (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010).

3 Materiales y métodos

Procedimientos generales

Los instrumentos utilizados para el manejo aséptico del material vegetal se esterilizaron en un esterilizador a 320°C por 30 min antes de cada sesión de trabajo. Todas las disecciones y operaciones de transferencia de los explantes se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal (ICEM, Cuba) y el material transgénico en un flujo laminar vertical (Faster, Italia). El pH de todos los medios de cultivo se ajustó con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) antes de la esterilización en autoclave. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1,2 kg cm² de presión durante 20 min.

Material vegetal

Semillas maduras de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao' (Fig. 3a) y 'BAT 93' (Fig. 3b), provenientes del banco de germoplasma del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas se emplearon como material vegetal inicial.



Figura 3 Semillas maduras de *P. vulgaris* (a) cv. 'ICA Pijao', (b) cv. 'BAT 93'

Desinfección y germinación de las semillas

Las semillas se lavaron con una solución de detergente y agua común durante 10 min. Luego se enjuagaron con agua común y se desinfectaron en etanol al 70% por 20 s y se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCL) al 3% (v/v) durante 10 min. Posteriormente, fueron enjuagadas tres veces con agua desionizada estéril, con lo cual se eliminaron los residuos del desinfectante. Se colocaron diez semillas por frasco de vidrio de 250 ml de capacidad que contenía 30 ml de medio de cultivo de germinación (MG, Tabla I). El material vegetal se mantuvo a 27 ± 2°C en oscuridad total durante tres días para la germinación.

3.1 Comparación de los explantes NC-1 y NC-2 con $\frac{1}{2}$ NC-1 para la regeneración vía organogénesis indirecta de *P. vulgaris*

Preparación de los explantes

Con el objetivo de determinar si $\frac{1}{2}$ NC-1 puede ser utilizado para la regeneración se comparó este explante con los explantes NC-1 en el caso de 'ICA Pijao' y NC-2 en 'BAT 93' utilizados en investigaciones previas (Fig. 4). Para la obtención de NC-1 y NC-2 y $\frac{1}{2}$ NC-1 posterior a la germinación se eliminó la testa y la raíz. En el caso de NC-1, se separó un cotiledón con el nudo cotiledonal y para NC-2 dos cotiledones con el nudo cotiledonal. Para la obtención de $\frac{1}{2}$ NC-1, se realizó una herida en la unión del cotiledón con el eje embrionario y se separó el cotiledón con una fina lámina de la epidermis del eje embrionario.

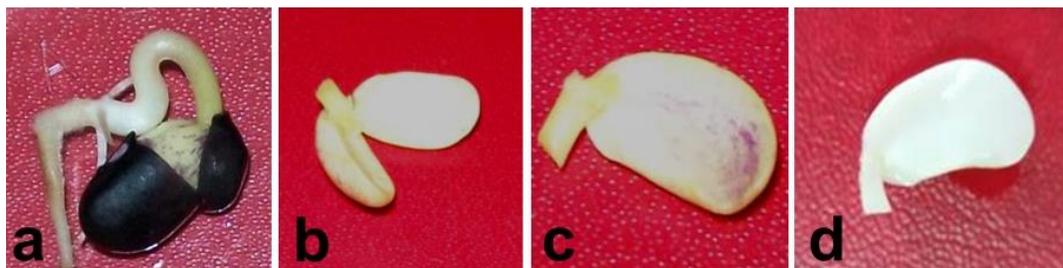


Figura 4 Preparación de los explantes de *P. vulgaris*; a) semilla germinada de tres días, b) NC-2, c) NC-1, d) $\frac{1}{2}$ NC-1

3.1.1 Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y $\frac{1}{2}$ NC-1

Los explantes NC-1, NC-2 y $\frac{1}{2}$ NC-1 se transfirieron a un medio de cultivo de formación de callos (MFC, Tabla I) y se mantuvieron en cámaras de cultivo a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante los primeros siete días en oscuridad. Luego, se eliminaron los brotes, se transfirieron nuevamente a MFC y se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y una intensidad luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 21 días. Para la obtención de los callos nodulares verdes, estos fueron separados del explante inicial sin ser fraccionados. A los 21 días de cultivo se evaluó el número de explantes que formaron callos y se determinó el porcentaje de formación de callos.

3.1.2 Regeneración, elongación y enraizamiento de los brotes

Los callos provenientes de NC-1, NC-2 y $\frac{1}{2}$ NC-1 fueron colocados en un medio de regeneración de brotes (MRB, Tabla I) para su regeneración y se mantuvieron en cámara de

cultivo a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, por 21 días. Luego, los brotes obtenidos fueron transferidos a un medio de elongación y enraizamiento (MEER, Tabla I), para lograr la elongación y enraizamiento de los mismos y se mantuvieron en cámaras de cultivo a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 30 días con sub-cultivos cada 15 días.

Se evaluó la capacidad de crecimiento de los brotes regenerados a partir de los explantes NC-1, NC-2, $\frac{1}{2}$ NC-1. A los brotes obtenidos se le determinó su longitud con una regla para establecer parámetros de comparación entre la regeneración de ambos explantes.

Se evaluó la regeneración y la formación de raíces de los brotes obtenidos a partir de callos de NC-1, NC-2 y $\frac{1}{2}$ NC-1. Para ello, se determinó el número de brotes con formación de raíces, así como la longitud promedio de los brotes enraizados.

3.2 Determinación del efecto de parámetros que influyen en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* inoculados con *A. tumefaciens*

Preparación de la suspensión bacteriana

La cepa de *A. tumefaciens* C58C1Rif^R, que contiene el plásmido (pTJK136 MtDHDPS3) conservada en glicerol, se estrió en una placa de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Tabla 1) semisólido con los antibióticos (Espectinomicina 100 mg.l⁻¹, Estreptomina 300 mg. l⁻¹, Gentamicina 50 mg. l⁻¹ y Rifampicina 50 mg. l⁻¹). Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h.

Una colonia de *A. tumefaciens* aislada del cultivo fresco, se suspendió en 3 ml de medio de cultivo LB líquido con los antibióticos mencionados con anterioridad y se incubó a 28°C en agitación constante (120 rpm) durante 24 h. El cultivo crecido (50-100 μl) se transfirió a un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo Yeast Extract Peptone (YEP) (Tabla I) con los mismos antibióticos. Este se incubó bajo las condiciones anteriormente mencionadas durante 12 h, período en el que se alcanza una densidad óptica DO_{600nm} entre 0,7 y 1,2.

Alícuotas de 45 ml del cultivo de *A. tumefaciens* se centrifugaron a 5000 rpm a 21°C por 10 min, en una centrífuga, (Eppendorf, Alemania). El pellet se lavó en un medio de cultivo líquido de inoculación de la bacteria (MIB, Tabla I). Después de la centrifugación, el pellet lavado se resuspendió en 45 ml de este medio y se centrifugó una vez más en las condiciones descritas. La suspensión bacteriana se diluyó en MIB y se ajustó a la densidad óptica deseada. A la suspensión bacteriana se le adicionó acetosiringona (100 μM) y se incubó a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 min antes de inocular los explantes.

3.2.1 Determinación del efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, del tiempo de infiltración por vacío y co-cultivo en la regeneración de brotes de *P. vulgaris*

Callos nodulares verdes obtenidos a partir ½ NC-1 en los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93' se utilizaron como explante blanco. Para la inoculación, en erlenmeyer de 250 ml de capacidad, se colocaron 100 callos nodulares verdes con 30 ml de la suspensión de *A. tumefaciens*, obtenida en las condiciones descritas anteriormente. Durante la inoculación se estudiaron tres concentraciones de la suspensión bacteriana: DO_{600nm} de 0,1, 0,2 y 0,3 y diferentes tiempos de infiltración por vacío: 1, 2 y 3 min, con un régimen de presión de 60-70 mm de Hg en una bomba de vacío (Thomas, EE.UU). Se utilizaron dos controles: un control que se inoculó con la bacteria, al cual no se le aplicó vacío y otro control sin inocular. Los callos se transfirieron a placas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían Medio de Multiplicación de Callos (MMC, Tabla I). Se estudiaron tiempos de co-cultivo de tres y cinco días, durante los cuales las placas se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Los callos inoculados, se enjuagaron tres veces con MIB (Tabla I) que contenía Timentina (200 mg l^{-1}). Se secaron sobre papel de filtro estéril y se transfirieron a MMC con Timentina (200 mg l^{-1}) durante siete días.

Para las evaluaciones se tuvo en cuenta la concentración de la suspensión bacteriana, el tratamiento de infiltración por vacío del que provenía el material genético y el tiempo de co-cultivo. Se realizó la primera evaluación durante el primer sub-cultivo a los 10 días posteriores a la inoculación y la segunda a los 21 días posteriores a la inoculación durante el segundo sub-cultivo. Se analizó en cada caso la regeneración a partir del número de explantes que formaron brotes.

Tabla I Medios de cultivos para la regeneración de plantas e inoculación de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* en *P. vulgaris*

Medio de cultivo	Componentes
MG	50% Sales MS (Murashige y Skoog), 1 mg l ⁻¹ tiamina, 1,13 mg l ⁻¹ N-6-bencilaminopurina (BAP), 30 g l ⁻¹ sacarosa y 8 g l ⁻¹ agar, pH 5,7
MIB	50% sales MS, vitaminas B5, 0,2 mg l ⁻¹ tidiazuron (TDZ), 0,05 mg l ⁻¹ 3-ácido indolacético (AIA), 3,9 g l ⁻¹ MES, 1,98 g l ⁻¹ glucosa, 20 g l ⁻¹ sacarosa, pH 5,5
MFC	50% sales MS, vitaminas B5, 0,2 mg l ⁻¹ tidiazuron (TDZ), 0,05 mg l ⁻¹ 3-ácido indolacético (AIA), 30 g l ⁻¹ sacarosa y 8 g l ⁻¹ agar, pH 5,7
MMC	100% sales MS, vitaminas B5, 0,05 mg l ⁻¹ AIA, 20 g l ⁻¹ sacarosa, 8 g l ⁻¹ agar, 0,4 mg l ⁻¹ TDZ, pH 5,7
MMC-C	100% sales MS, vitaminas B5, 0,05 mg l ⁻¹ AIA, 20 g l ⁻¹ sacarosa, 8 g l ⁻¹ agar, 0,4 mg l ⁻¹ TDZ, pH 5,5
MLCT	50% sales MS, vitaminas B5, 0,05 mg l ⁻¹ AIA, 20 g l ⁻¹ sacarosa, 0,4 mg l ⁻¹ TDZ, pH 5,92 + 200 mg l ⁻¹ Timentina
MMCT	100% sales MS, vitaminas B5, 0,05 mg l ⁻¹ AIA, 20 g l ⁻¹ sacarosa, 8 g l ⁻¹ agar, 0,4 mg l ⁻¹ TDZ, pH 5,92 + 200 mg l ⁻¹ Timentina
MMCTG	100% sales MS, vitaminas B5, 0,05 mg l ⁻¹ AIA, 20 g l ⁻¹ sacarosa, 8 g l ⁻¹ agar, 0,4 mg l ⁻¹ TDZ, pH 5,92 + 200 mg l ⁻¹ Timentina, 50 mg l ⁻¹ Geneticina
MRBTG	100% sales MS, vitaminas B5, 2,25 mg l ⁻¹ BAP, 30 g l ⁻¹ sacarosa, 8 g l ⁻¹ agar, pH 5,92 + 200 mg l ⁻¹ Timentina, 50 mg l ⁻¹ Geneticina
MEERTG	100% sales MS, vitaminas B5, 30 g l ⁻¹ sacarosa, 0,4 mg l ⁻¹ ácido indolbutírico, 3,18 mg l ⁻¹ nitrato de plata y 8 g l ⁻¹ agar, pH 5,92 + 200 mg l ⁻¹ Timentina, 50 mg l ⁻¹ Geneticina
MRB	100% sales MS, vitaminas B5, 30 g l ⁻¹ sacarosa, 0,4 mg l ⁻¹ ácido indolbutírico, 3,18 mg l ⁻¹ nitrato de plata y 8 g l ⁻¹ agar, pH 5,92 + 200 mg l ⁻¹
MEER	100% sales MS, vitaminas B5, 225 mg l ⁻¹ BAP, 30 g l ⁻¹ sacarosa, 0,4 mg l ⁻¹ ácido indolbutírico, 3,18 mg l ⁻¹ nitrato de plata y 8 g l ⁻¹ agar, pH 5,92
LB	950 ml H ₂ O, 10 g triptona, 10 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 15 g l ⁻¹ agar, pH 7,0
YEP	2% extracto de peptona, 1% de extracto de levadura, 2% de dextrosa, 1 l H ₂ O, pH 7,0

Nota: La Timentina se esterilizó por filtración y se le adicionó al medio de cultivo cuando este tuvo una temperatura aproximada entre 40-45°C

3.3 Procesamiento estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PASW *Statistics*, versión 23, para Windows verificándose los supuestos de normalidad Shapiro Wilk. Los datos que no seguían distribución normal se procesaron mediante análisis de varianza para dos variables no relacionadas, U de Mann Whitney y varias muestras independientes, Kruskal Wallis. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Comparación de los explantes NC-1 y NC-2 y ½ NC-1 para la regeneración vía organogénesis indirecta de *P. vulgaris*

4.1.1 Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1

En *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao' y 'BAT 93', los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1 formaron callos nodulares verdes satisfactoriamente, como se muestra en la tabla II. En los explantes evaluados se obtuvieron valores similares entre los porcentajes de formación de callos para cada cultivar de forma independiente. Además, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estos valores.

Tabla II Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1 en los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'

Cultivar	Porcentaje de explante que formaron callos (%)	
	Control	½ NC-1
'ICA Pijao'	64,0 (±14,4)	63,6 (±11,9)
'BAT 93'	86,2 (±11,2)	88,4 (±10,3)

*'ICA Pijao': explante control es NC-1

* 'BAT 93': explante control es NC-2

Los datos representan la media ± la desviación típica No se detectaron diferencias estadísticas significativas según prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis /U de Mann-Whitney para $p \leq 0,05$

4.1.2 Regeneración, elongación y enraizamiento de los brotes

Los callos provenientes de NC-1, NC-2 y ½ NC-1 presentaron valores similares en el porcentaje de callos que formaron brotes y el número promedio de brotes por callo, para cada cultivar de forma independiente. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estos valores, como se muestra en la tabla III.

Tabla III Regeneración de brotes de callos formados a partir de NC-1 y ½ NC-1 en los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'

Cultivar	Porcentaje de callos que formaron al menos un brote (%)		Número promedio de brotes por callo	
	Control	½ NC-1	Control	½ NC-1
'ICA Pijao'	87,3 (±3,8)	85,2 (±4,6)	4,3 (±0,6)	4,6 (±0,4)
'BAT 93'	35,6 (±6,4)	32,3 (±4,9)	2,2 (±0,3)	2,4 (±0,4)

* 'ICA Pijao': explante control es NC-1

* 'BAT 93': explante control es NC-2

EL número promedio de brotes por callo se cuantificó para los callos que formaron brotes. Los datos representan la media ± la desviación típica

No se detectaron diferencias estadísticas significativas según prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis /U de Mann-Whitney para $p \leq 0,05$

El tipo de explante empleado no influyó en el crecimiento de los brotes regenerados. Los brotes obtenidos a partir de callos originados de ½ NC-1 mostraron una longitud similar a los que se formaron a partir de callos derivados de NC-1 y NC-2, como se muestra en la tabla IV.

Tabla IV Longitud de los brotes regenerados de callos formados a partir de NC-1 y NC-2 y ½ NC-1 en los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'

Cultivar	Longitud promedio de los brotes (cm)	
	Control	½ NC-1
'ICA Pijao'	3,7 (±0,9)	3,5 (±0,6)
'BAT 93'	1,2 (±0,6)	1,5 (±0,4)

* 'ICA Pijao': explante control es NC-1

* 'BAT 93': explante control es NC-2

Los datos representan la media ± la desviación típica

No se detectaron diferencias estadísticas significativas según prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis /U de Mann-Whitney para $p \leq 0,05$

En el enraizamiento de los brotes formados a partir de los callos obtenidos de NC-1, NC-2 y ½ NC-1, no influyó el tipo de explante. Dentro de un mismo cultivar, de forma independiente al tipo de explante empleado, se observaron valores similares en el porcentaje de brotes con raíces, así como en la longitud promedio de estos brotes enraizados, como se muestra en la tabla V.

Tabla V Enraizamiento de brotes regenerados de callos formados a partir de NC-1, NC-2 y ½ NC-1 en los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'

Cultivar	Porcentaje de brotes con raíces (%)		Longitud promedio de los brotes enraizados (cm)	
	Control	½ NC-1	Control	½ NC-1
'ICA Pijao'	97,2 (±1,3)	96,4 (±1,0)	5,8 (±1,2)	5,6 (±1,6)
'BAT 93'	58,3 (±6,1)	55,8 (±8,3)	3,1 (±0,7)	2,9 (±1,1)

* 'ICA Pijao': explante control es NC-1

* 'BAT 93': explante control es NC-2

El número promedio de raíces por brote se cuantificó para los brotes que formaron raíces. Los datos representan la media ± la desviación típica.

No se detectaron diferencias estadísticas significativas según prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis /U de Mann-Whitney para $p \leq 0,05$

4.2 Efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, del tiempo de infiltración por vacío y el co-cultivo en la regeneración de callos de *P. vulgaris* inoculados con *A. tumefaciens*

4.2.1 Concentración de la suspensión bacteriana

En el cultivar 'ICA Pijao', al aumentar la concentración de la suspensión bacteriana disminuyó el porcentaje de regeneración de los explantes en el primer período de sub-cultivo. En el segundo período de sub-cultivo no se encontraron diferencias estadísticas significativas en los porcentajes de regeneración al aplicar las concentraciones de 0,1 y 0,2. Mientras que, al aplicar una concentración de 0,3 se obtuvieron porcentajes de regeneración inferiores al 10% (Fig. 5).

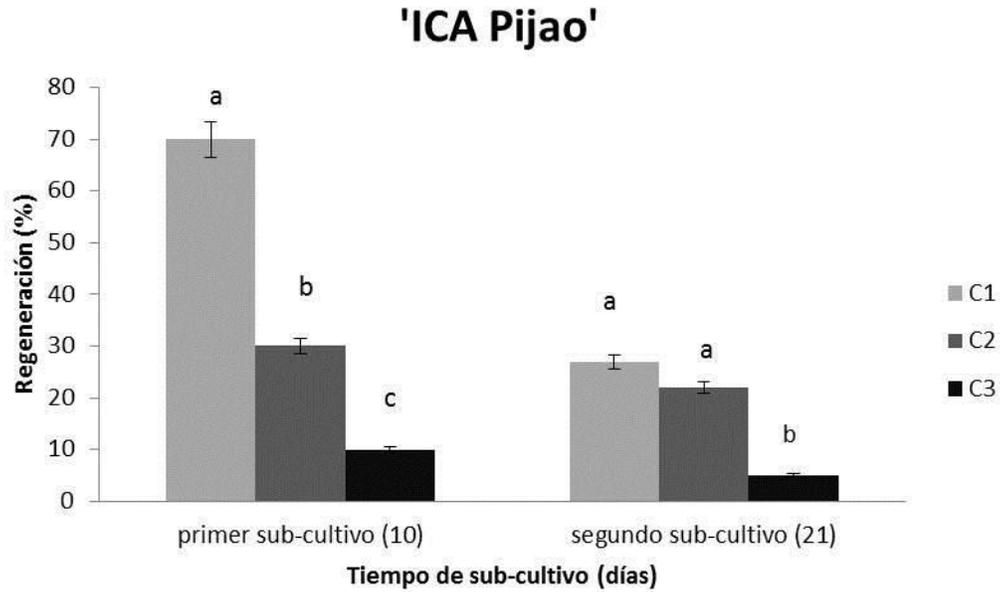


Figura 5 Efecto de la concentración de la suspensión de *A. tumefaciens* en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao'. C1-DO_{600nm}: 0,1; C2-DO_{600nm}: 0,2; C3-DO_{600nm}: 0,3
 Números con letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según análisis H de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y U de Mann Whitney ($p < 0,01$) a posteriori, dentro de un mismo período de sub-cultivo

En el cultivar 'BAT 93' a medida que aumentó la concentración de la suspensión bacteriana, se afectó la regeneración en ambos periodos de sub-cultivo. En el primer período de sub-cultivo, al emplear una concentración de 0,3, el porcentaje de regeneración disminuyó a 5%. En el segundo período de sub-cultivo al emplear una concentración de 0,3, el porcentaje de regeneración disminuyó a cero (Fig. 6).

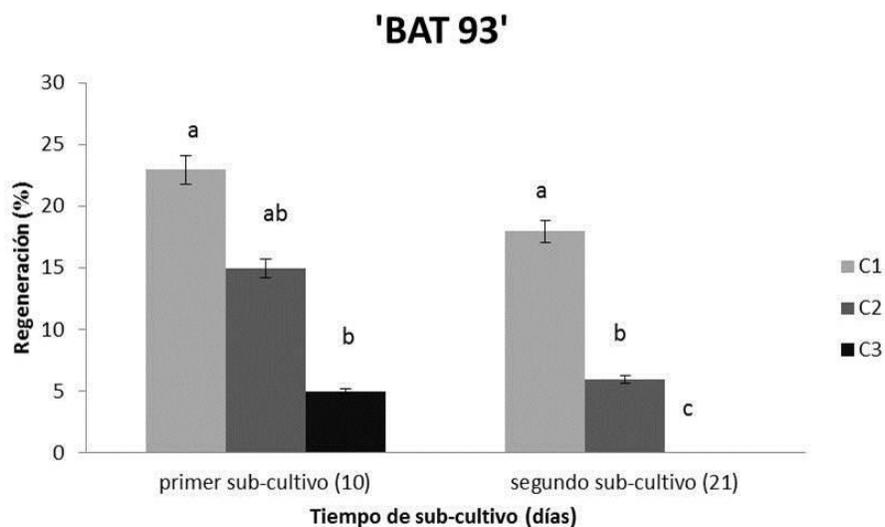


Figura 6 Efecto de la concentración de la suspensión de *A. tumefaciens* en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT 93'. C1-DO_{600nm}: 0,1; C2-DO_{600nm}: 0,2; C3-DO_{600nm}: 0,3

Números con letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según análisis H de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y U de Mann Whitney ($p < 0,01$) a posteriori, dentro de un mismo período de sub-cultivo

4.2.2 Tiempo de infiltración por vacío

En el cultivar 'ICA Pijao', la regeneración de brotes se afectó en el primer período de sub-cultivos al aplicar los tratamientos de infiltración por vacío, pues se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y los controles (Tabla VII). Durante el segundo período de sub-cultivo, la infiltración por vacío no afectó la regeneración de brotes (Fig.7).

Tabla VII Efecto del tiempo de infiltración por vacío en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao' en dos períodos de sub-cultivos

Tratamientos	Regeneración (%)	
	Tiempo de co-cultivo (10 días)	Tiempo de co-cultivo (21 días)
Control	62 (26,75) ^a	25 (± 16,25)
At Sin V	55 (25,33) ^a	28 (± 17,10)
At + V 1 min	20 (15,67) ^b	20 (± 13,93)
At + V 2 min	18 (13,67) ^b	18 (± 13,50)
At + V 3 min	25 (18,07) ^b	20 (± 11,13)

*At= *A. tumefaciens*, CSV= Control sin vacío; V1= 1 min de vacío; V2= 2 min de vacío; V3= 3 min de vacío

Números con letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas según prueba H de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y U de Mann Whitney ($p < 0,01$) a posteriori, dentro de un mismo período de sub-cultivo

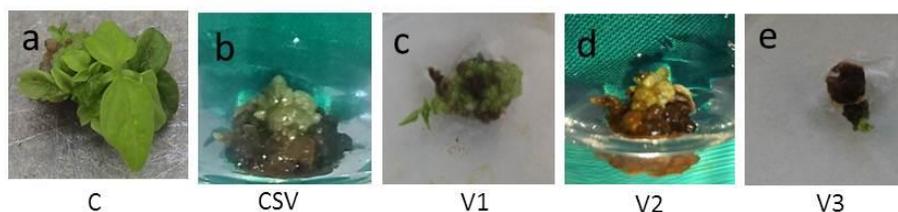


Figura 7 Influencia de la infiltración por vacío en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao' para el segundo período de sub-cultivo. (a) Control. (b) Control sin vacío. (c) 1 min de vacío. (d) 2 min de vacío. (e) 3 min de vacío

La infiltración por vacío afectó la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT 93' en ambos períodos de sub-cultivo, pues se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y los controles (Tabla VIII). En el primer período de sub-cultivo al aplicar 3 min de infiltración por vacío, disminuyó el porcentaje de regeneración. En el segundo período de sub-cultivo, los explantes tratados con los tres tiempos de vacío establecidos, mostraron porcentajes de regeneración de cero (Fig.8).

Tabla VIII Efecto del tiempo de infiltración por vacío en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT 93' en dos períodos de sub-cultivos

Tratamientos	Regeneración (%)	
	Tiempo de co-cultivo	Tiempo de co-cultivo
	(10 días)	(21 días)
Control	35 (43,83) ^a	28 (11,71) ^a
At Sin V	20 (39,77) ^b	0 (6) ^b
At + V 1 min	5 (25,72) ^c	0 (6) ^b
At + V 2 min	3 (22,92) ^c	0 (6) ^b
At + V 3 min	0 (20) ^d	0 (6) ^b

* At= *A. tumefaciens*, CSV= Control sin vacío; V1= 1 min de vacío; V2= 2 min de vacío; V3= 3 min de vacío

Números con letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas según prueba H de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y U de Mann Whitney ($p < 0,01$) a posteriori, dentro de un mismo período de sub-cultivo

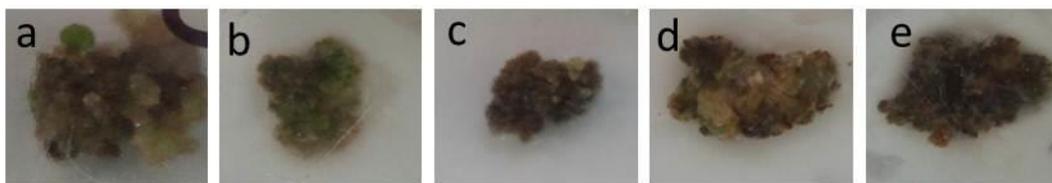


Figura 8 Influencia de la infiltración por vacío en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT 93' en el segundo período de sub-cultivo. (a) control. (b) control sin vacío. (c) 1 min de vacío. (d) 2 min de vacío. (e) 3 min de vacío

4.2.3 Tiempo de co-cultivo

El tiempo de co-cultivo afectó la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao' para ambos períodos de sub-cultivo (Fig. 9). Los mayores porcentajes de regeneración en ambos períodos de sub-cultivo, se observaron al aplicar tres días de co-cultivo.

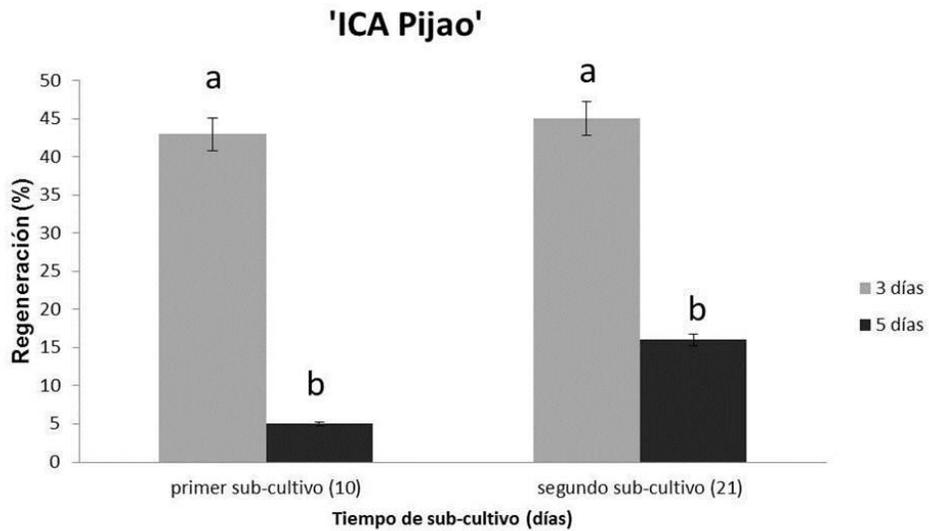


Figura 9 Efecto del tiempo de co-cultivo con *A. tumefaciens* en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao'

Números con letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según análisis H de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y U de Mann Whitney ($p < 0,01$) a posteriori, dentro de un mismo período de sub-cultivo

El tiempo de co-cultivo afectó la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT 93', para ambos sub-cultivos de forma independiente en cada caso. Los mayores porcentajes de regeneración en ambos períodos de sub-cultivo, de forma independiente en cada uno, se observaron al aplicar tres días de co-cultivo (Fig. 10).

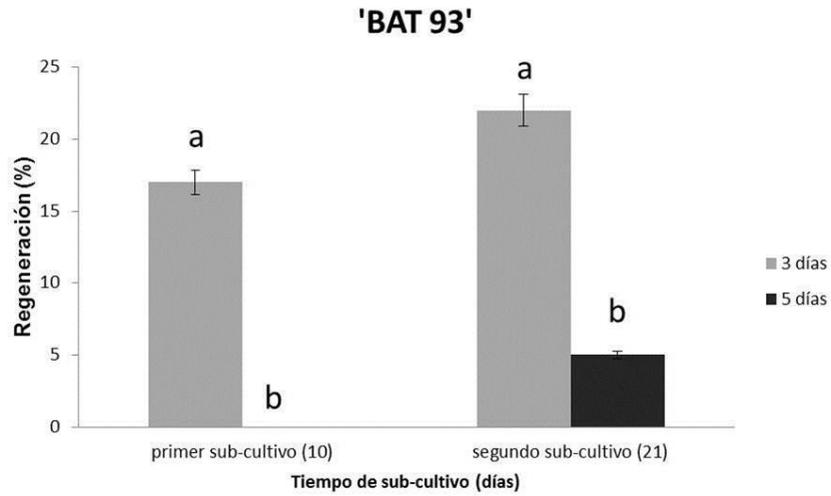


Figura 10 Efecto del tiempo de co-cultivo con *A. tumefaciens* en la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT 93'

Números con letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según análisis H de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y U de Mann Whitney ($p < 0,01$) a posteriori, dentro de un mismo período de sub-cultivo

5 Discusión

P. vulgaris es una leguminosa estudiada en todo el mundo por su importancia económica, la cual radica fundamentalmente en su aporte proteico (Menge *et al.*, 2014). La producción de este grano se ve afectada notablemente por factores bióticos y abióticos (Kwapata, 2015). Por esta razón, resulta necesario implementar estrategias que eleven el rendimiento de la especie, dentro de las cuales se haya la transformación genética (Gatica *et al.*, 2010). Para establecer un protocolo de transformación genética eficiente, es preciso contar con un sistema de regeneración efectivo que garantice la obtención de plantas vía embriogénesis somática u organogénesis. Sin embargo, en el género *Phaseolus* la regeneración *in vitro* es difícil debido a que este proceso es altamente dependiente del genotipo (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). De lo anterior deriva la ausencia de un protocolo óptimo de regeneración (Nanjareddy *et al.*, 2016).

5.1 Comparación de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1 para la regeneración vía organogénesis indirecta de *P. vulgaris*

5.1.1 Formación de callos a partir de los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1

En *P. vulgaris*, la formación de callos nodulares verdes compactos aumenta la frecuencia de regeneración. Por tal razón, el establecimiento de un protocolo exitoso vía organogénesis indirecta, depende de la selección del explante idóneo a partir del cual se obtendrán los callos (Collado *et al.*, 2016).

En *P. vulgaris* cv. 'CIAP7247F', se estudió la formación de callos nodulares verdes a partir de cotiledones desprovistos de la testa. Además, a los medios de cultivo se les aplicaron varios reguladores del crecimiento entre los cuales se encontraba el thidiazurón (TDZ). Para las concentraciones más altas de esta citoquinina, se observaron los mayores valores de formación de callos (García *et al.*, 2006).

En los cultivares 'BAT 93', 'ICA Pijao', 'BAT 304', 'BAT 482' y 'CIAP7247F', se evaluó la multiplicación de callos organogénicos y la regeneración de brotes obtenidos a partir del nudo cotiledonal con uno o dos cotiledones, en dependencia del cultivar. Los cultivares 'ICA Pijao', 'BAT 93' y 'CIAP7247F', mostraron los mayores valores de masa fresca en los callos. En la regeneración, los cultivares 'ICA Pijao' y 'CIAP7247F' mostraron los mayores valores en el número de callos con brotes y brotes por callo (Veitía *et al.*, 2012).

En el cultivar 'CIAP7247F', se describió satisfactoriamente un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta a partir del uso de los explantes NC-1 y NC-2, lo que fue determinante en la formación de los callos nodulares verdes. Este protocolo se aplicó

eficientemente en otros cultivares de importancia económica como 'BAT 93', 'ICA Pijao', 'BAT 304' y 'BAT 482' (Collado *et al.*, 2016).

A partir del empleo de otros explantes como meristemos apicales y nudos cotiledonales obtenidos de ejes embrionarios de semillas germinadas, se estableció un protocolo de regeneración vía organogénesis indirecta de *P. vulgaris* cv. 'Negro Jamapa'. La mayor producción de callos se obtuvo con la aplicación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. La frecuencia de regeneración de callos fue de 0,5 brotes por callos, con alta producción (100%) de raíces (Arellano *et al.*, 2009).

En este trabajo, la comparación entre los explantes NC-1, NC-2 y ½ NC-1 no presentó diferencias significativas para la formación de callos morfogenéticos. Este resultado confirma que la región donde se inserta el cotiledón al eje embrionario tiene un alto potencial de regeneración. Con el empleo de ½ NC-1 que es un cotiledón con una fina lámina de epidermis del eje embrionario, se reafirma que los reguladores de crecimiento almacenados en los cotiledones tienen un marcado efecto en la formación de callos nodulares verdes en esta especie. Estos callos nodulares verdes podrán ser empleados posteriormente como explante blanco para la transformación de *P. vulgaris*.

5.1.2 Regeneración, elongación y enraizamiento de los brotes

En *P. vulgaris* cv. 'Fönix' y 'Maxidor' se logró la inducción de múltiples brotes a partir de explantes de semillas intactas y de nudos cotiledonales. No obstante, un análisis comparativo entre ambos explantes reveló que las semillas intactas resultaron ser el explante óptimo para la inducción de brotes en medio MS. También, el nudo cotiledonal resultó un explante viable para la formación de brotes. Los brotes presentaron 2 cm de largo y dos hojas trifoliadas con formación y desarrollo de las raíces (Ahmed *et al.*, 2002).

En el cultivar 'CIAP7247F', se logró el crecimiento y elongación de brotes regenerados a partir de yemas adventicias. Además, se estudió la influencia de varios medios de cultivo propuestos en la literatura para especies del género *Phaseolus*, así como la influencia del uso de determinadas concentraciones de ácido giberélico (AG₃) y de nitrato de plata (AgNO₃). Las concentraciones mayores de AG₃ permitieron obtener brotes elongados con longitudes medias que oscilaron entre 0,94 cm y 1,30 cm (García *et al.*, 2009).

En un estudio en *P. vulgaris* se describió que el número de yemas y brotes producidos a partir de semillas intactas, sin raíces, fue perceptible a partir de explantes de nudos cotiledonales. Sin

embargo, en el mismo se observa desarrollo de raíces solamente para brotes a partir de 2 cm de largo (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2014).

En *P. lunatus* se describió un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta. La formación de callos y brotes tuvo lugar a partir de diferentes tipos de explantes (epicótilos, cotiledones e hipocótilos). Sin embargo, al emplear el explante epicótilo se observaron los mayores porcentajes de formación de brotes en comparación con el resto de explantes empleados (Nagamangala y Maffei, 2007).

En *P. vulgaris*, la regeneración *in vitro* es un proceso difícil y de baja eficiencia. En este sentido, el cultivar 'BAT 93' presenta una baja frecuencia de regeneración en comparación con otros cultivares. Sin embargo, en el cultivar 'ICA Pijao' se han obtenido valores elevados de regeneración, lo cual se pudo constatar con la formación de yemas múltiples (García *et al.*, 2012).

En este estudio se demostró que el empleo del explante ½ NC-1 para la regeneración de *P. vulgaris* en los cultivares 'BAT 93' e 'ICA Pijao' no afectó la eficiencia del protocolo establecido para NC-1 y NC-2. Esto pudo deberse a que en ambos explantes existen zonas o regiones que presentan células meristemáticas con habilidad para la regeneración. Tanto para callos provenientes de NC-1 y NC-2 como de ½ NC-1 se logró la formación de brotes, la elongación y enraizamiento de estos sin diferencias significativas basados en la comparación de los explantes iniciales.

5.2 Efecto de la concentración de la suspensión bacteriana, del tiempo de infiltración por vacío y co-cultivo en la regeneración de brotes de *P. vulgaris*

Concentración de la suspensión bacteriana

La concentración óptima de células de *A. tumefaciens*, es un parámetro importante a tener en cuenta en cualquier protocolo de transformación. Es por ello que el empleo de concentraciones pequeñas puede reducir la transferencia de ADN, mientras que concentraciones elevadas pueden causar la muerte del explante (Martirena-Ramírez y Veitía, 2013).

En *P. acutifolius* empleando como explantes callos nodulares verdes se realizó una transformación genética vía *A. tumefaciens*. Para la misma, se emplearon concentraciones de la suspensión bacteriana de DO_{600nm} de 0,8 y 0,05. La obtención de plantas transgénicas de *P. acutifolius* se confirmó mediante un Southern blott. En general no se obtuvieron raíces a partir de los brotes jóvenes sino a partir de los brotes adultos. El enraizamiento de los brotes ocurrió con una frecuencia comprendida entre el 25 y 40% (Zambre *et al.*, 2005).

En *P. vulgaris* cv. 'Flor de Mayo Anita' y 'Pinto Saltillo' se realizó una transformación genética vía *A. tumefaciens*. Como explante blanco se emplearon hipocótilos de cinco días, inoculados con una concentración de la suspensión bacteriana de DO_{600nm} de 0,8. La eficiencia obtenida en la transformación fue de 10-28%. Esta eficiencia presentó variaciones pequeñas debido a los antecedentes genéticos de cada cultivar, la cepa de *Agrobacterium* empleada y el agente de selección utilizado. Además, el cv. 'Pinto Saltillo' mostró una mejor respuesta a la regeneración (21-28 %) que 'Flor de Mayo Anita' (10-17 %) (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

En otras leguminosas como *G. max*, empleando a *A. tumefaciens* como vector para la transformación genética se utilizaron como explantes nudos cotiledonales provenientes de media semilla. La DO_{600nm} de 0,1 mostró una eficiencia de 55,9% en la transformación. Además, se describió que el incremento de la concentración de la kanamicina en 40 ó 50 mg l⁻¹ en el medio de selección, incrementó la eficiencia de la transformación. Sin embargo, estas concentraciones del antibiótico redujeron la regeneración de los explantes (Zia *et al.*, 2010).

En *V. radiata* se realizó una transformación genética vía *A. tumefaciens*, empleando como explante nudos cotiledonales. A diferencia de las concentraciones utilizadas en el presente estudio, estos autores variaron su DO_{560nm} entre 0,5 y 1,5 y determinaron que para la concentración de 0,8 se alcanzó la mayor eficiencia de la transformación (4,2%). Los mayores porcentajes de proliferación de brotes se observaron al reducir a la mitad la concentración de kanamicina en el segundo período de sub-cultivo (Kumar *et al.*, 2012).

En la transformación de *Vigna mungo* (L.) Hepper vía *A. tumefaciens* se emplearon como explantes hojas primarias con el peciolo intacto. Estos explantes se inocularon con una concentración de la suspensión bacteriana de DO_{600nm} de 0,7, con la cual se obtuvo una eficiencia de la transformación de 1,3%. Además, se describió que la adición de acetosiringona a la suspensión bacteriana y al medio de co-cultivo incrementó la eficiencia en la transformación. Esto coincide con estudios en otras especies de leguminosas, entre las que se encuentra *P. vulgaris*. La frecuencia mayor de regeneración fue de 95%. No obstante en este trabajo se demostró el marcado efecto del genotipo en la frecuencia de regeneración y en la inducción de brotes por explante (Sainger *et al.*, 2015).

A. tumefaciens sirvió como mediador de la transformación genética en *G. max*. En el mismo, fueron empleados nudos cotiledonales como explante para la transformación y se empleó una DO_{600nm} entre 0,8 y 1,0. La eficiencia de la transformación fue de 12,6% cuando se confirmó mediante Southern blott y de 14,6% cuando se confirmó mediante PCR. Los autores

describieron que el porcentaje de regeneración dependió del agente de selección empleado (Hada *et al.*, 2016).

En el presente estudio se demostró que los mayores porcentajes de supervivencia y regeneración se obtuvieron al inocular los callos con una concentración de la suspensión bacteriana de DO_{600nm} de 0,1. Esto pudo deberse a que *A. tumefaciens* es un patógeno que varía el pH del medio de cultivo, lo cual puede resultar desfavorable para los explantes que se encuentran en él. Además, con el aumento de la concentración de la suspensión bacteriana se dificulta la eliminación de la bacteria del medio de cultivo una vez finalizado el período de co-cultivo. Por esta razón, se produce la mortalidad de los explantes, impidiendo su regeneración.

Tiempo de infiltración por vacío

La infiltración por vacío resulta ventajosa en los protocolos de transformación genética vía *A. tumefaciens*. Este método constituye una herramienta útil que permite reducir el tiempo y el esfuerzo en estudios de transferencia de genes, fundamentalmente cuando se emplean callos como explante para la transformación (Safitri *et al.*, 2016). La aplicación de esta técnica ha incrementado los niveles de expresión del gen de interés en plantas de legumbres transformadas, en comparación con la infiltración alcanzada a partir de la presión atmosférica (Subramanyam *et al.*, 2011b).

En un estudio en *P. vulgaris* se utilizó la combinación de la sonicación y la infiltración por vacío para lograr una transformación genética exitosa vía *A. tumefaciens* con el gen *lea*. En el mismo a diferencia del presente trabajo, se empleó un tiempo de infiltración por vacío de 5 min, que resultó óptimo para la obtención de una eficiencia alta en la transformación. Las plantas transformadas presentaron habilidad para la regeneración. Estas fueron capaces de crecer bajo condiciones de estrés abiótico como déficit hídrico y salinidad (Liu *et al.*, 2005).

En un estudio en *Lens culinaris* Medikus, se aplicó un protocolo basado en la infiltración por vacío de *A. tumefaciens* a células de nudos cotiledonales. Para este tratamiento se evaluaron varios regímenes de presión de vacío; 200 mm de Hg, 400 mm de Hg, y 600 mm de Hg y tiempos de infiltración de 20 min y 30 min. El potencial regenerativo de los explantes no se afectó solamente empleando la combinación de un régimen de presión de vacío de 600 mm de Hg durante un tiempo de 20 min (Mahmoudian *et al.*, 2002).

En *G. max* se aplicaron tiempos de infiltración por vacío de 1, 2, 3 y 4 min en la transformación genética vía *A. tumefaciens*, utilizando como explante cotiledones inmaduros. Para 3 y 4 min.

de vacío, disminuyó la eficiencia de la transformación y la supervivencia de los explantes (Mariashibu *et al.*, 2013)., lo cual coincide con los resultados de nuestro trabajo.

En un estudio en *V. unguiculata*, se realizó una transformación genética vía *A. tumefaciens*, empleando como explantes nudos cotiledonales. En el mismo, se utilizó un protocolo de transformación que combinó 20 s de sonicación y una infiltración por vacío a 600 mm de Hg por 5 min. En el mismo se obtuvo una expresión transiente del gen *GUS* (95%). Además, se describió que la aplicación de la sonicación conjuntamente con la infiltración por vacío, aumentó la eficiencia de la transformación. El mayor porcentaje de regeneración para este tiempo de vacío fue de 3,30% (Bakshi *et al.*, 2011).

En un estudio en *Vigna mungo* (L.) Hepper, se realizó una transformación genética vía *A. tumefaciens*, empleando como explantes media semilla. En el mismo se aplicó un tiempo de sonicación de 3 min y una infiltración por vacío de 100 mm de Hg por 2 min. Para este protocolo se obtuvo una eficiencia de la transformación del 46%. Además, se tuvo en cuenta la eficiencia de la regeneración a partir de las concentraciones aplicadas del herbicida nanoselectivo Basta®. Donde se observaron signos de necrosis en las plantas por lo que la regeneración mostró muy bajos porcentajes (Kapildev *et al.*, 2016).

En el presente estudio se demostró que los mayores porcentajes de supervivencia y regeneración se lograron al aplicar 1 ó 2 min de infiltración por vacío. Esto pudo deberse a que el aumento del tiempo de vacío daña mecánicamente la vitalidad del explante. En la literatura consultada solo se ha encontrado un trabajo donde se emplee la infiltración por vacío para incrementar la eficiencia en la transformación genética en *P. vulgaris*, pero estos autores no emplean el cultivo de tejidos *in vitro* para la regeneración de plantas transformadas (Liu *et al.*, 2005). Por ello, los resultados de esta investigación constituyen los primeros aportes a la comunidad científica en dilucidar el efecto de la infiltración por vacío en la regeneración de tejido de *P. vulgaris* inoculado con *A. tumefaciens*.

Tiempo de co-cultivo

El co-cultivo es un tratamiento que *A. tumefaciens* necesita para entrar en contacto con las células de la planta y transferir el ADN-T dentro del núcleo. En este período ocurre el proceso de transformación y por tanto su tiempo de duración afecta la eficiencia de este proceso. En este sentido, el empleo de tres días como tiempo de co-cultivo, incrementa la frecuencia de transformación transiente, mientras que tiempos mucho mayores pueden ocasionar un

decrecimiento en la frecuencia de transformación, causado por un sobrecrecimiento de la bacteria (Kumar *et al.*, 2012).

En *P. vulgaris* se realizó una transformación genética vía *A. tumefaciens* empleando como explante embriones de semillas. Los explantes inoculados fueron co-cultivados en medio MS suplementado con vitamina B5, durante cuatro días. Sin embargo, no se logró una transformación genética exitosa, lo que pudo deberse a la ausencia de reguladores del crecimiento durante el tiempo de co-cultivo. Además los explantes presentaron una baja regeneración (Amunge *et al.*, 2011).

Plantas transgénicas de *V. mungo* se obtuvieron empleando a *A. tumefaciens* como vector biológico para la transformación. Los explantes blancos empleados fueron nudos cotiledonales y la punta de los brotes. Ambos fueron mantenidos tres días en co-cultivo. A partir de los explantes de la punta de los brotes se desarrollaron brotes verdes con una notable vitalidad, en un corto período de tiempo. Mientras que fue más lento el desarrollo de los brotes formados a partir de las áreas axilares de células meristemáticas en los explantes de nudos cotiledonales. No obstante, en este trabajo se describe que las células meristemáticas axilares de los nudos cotiledonales presentan habilidad para la regeneración y para la transformación (Muruganatham *et al.*, 2007).

En un estudio en *G. max*, *Agrobacterium* sirvió como mediador de la transformación genética, empleando como explante nudos cotiledonales. Los explantes fueron colocados por la región axial en un medio de suspensión con *Agrobacterium* y en relación con el presente estudio, emplearon tres días de co-cultivo. Los resultados mostraron una eficiencia en la transformación de 2,5 y 5,7%, en dependencia de los genotipos evaluados. En el mismo se describió que la capacidad de formar yemas en los explantes es un factor que reflejó la capacidad de regeneración de las células (Guo *et al.*, 2014).

En un estudio en *V. unguiculata*, se transformaron vía *A. tumefaciens*, explantes de cotiledones inmaduros. Estos se mantuvieron en co-cultivo en medio de MS por dos días. Las plantas transformadas mostraron resistencia a Basta[®]. Además, se describió una eficiencia en la regeneración de 62,5%, con 1,62 brotes transformados por explantes (Aasim *et al.*, 2013).

En *G. max* se realizó la transformación genética vía *A. tumefaciens* empleando como explantes cotiledones. Los explantes se mantuvieron co-cultivados con *Agrobacterium* y se evaluaron diferentes tiempos de co-cultivo (tres, cuatro y cinco días). Los explantes mostraron signos necróticos al poco tiempo de ser co-cultivados con *Agrobacterium*. Además, no existieron

diferencias estadísticas significativas entre los tiempos de co-cultivos evaluados con relación a los porcentajes de regeneración de los explantes (Yang *et al.*, 2016).

En este estudio se demostró que los mayores porcentajes de supervivencia y regeneración se lograron al aplicar el menor tiempo de co-cultivo. Esto pudo deberse a que el contacto prolongado del explante con *A. tumefaciens* pudo hacer más difícil la eliminación de su sobrecrecimiento, lo cual condujo al aumento de la mortalidad de los explantes disminuyendo su vitalidad.

Los mayores porcentajes de las variables estudiadas se lograron al inocular los callos con una concentración de la suspensión bacteriana de DO_{600nm} de 0,1, infiltrarlos por 1 ó 2 min, manteniéndolos tres días en co-cultivo.

6 Conclusiones

1-Se optimizaron parámetros relacionados con la transferencia de ADN de *Agrobacterium tumefaciens* a *Phaseolus vulgaris* para los cultivares 'ICA Pijao' y 'BAT 93'.

2-El cotiledón con una fina capa de la epidermis del eje embrionario (½ NC-1) puede ser utilizado como explante blanco para la transformación genética.

3-La regeneración de brotes de *Phaseolus vulgaris* cv. 'BAT 93' e 'ICA Pijao' estuvo influenciada por la concentración de la suspensión bacteriana, el tiempo de infiltración por vacío y el período de co-cultivo.

7 Recomendaciones

1-Aplicar los resultados obtenidos en la presente investigación en la transformación genética de los cultivares 'BAT 93' e 'ICA Pijao', para la obtención de líneas de *P. vulgaris* tolerantes a déficit de agua y altas temperaturas; así como resistentes a enfermedades causadas por virus.

2-Ampliar estos experimentos a otros cultivares de *P. vulgaris* de interés comercial con el objetivo de establecer protocolos de transformación genética rutinarios y reproducibles independientemente del genotipo.

Referencias bibliográficas

- Aasim, M., Khawar, K. M. y Özcan, S. (2013) Production of herbicide-resistant cowpea (*Vigna unguiculata* L.) transformed with the *bar* gene. *Turkish Journal of Biology*. 37: 472-478.
- Agrawal, K. P., Kohli, A., Twyman, R. M. y Christou, P. (2005) Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Molecular Breeding*. 16: 247-260.
- Ahmed, E. E., Bisztray, G. Y. D. y Velich, I. (2002) Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology*. 46: 27-28.
- Alimohammadi, M. y Bagherieh-Najjar, M. B. (2009) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors. *African Journal of Biotechnology*. 8: 5142-5148.
- Allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A. y Alwhibi, S. (2015) Alleviation of adverse impact of salt in *Phaseolus vulgaris* L. by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pakistan Journal of Botany*. 3: 1167-1176.
- Amugune, N. O., Anyango, B. y Mukiana, T. K. (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *African Crop Science Journal*. 19: 137-147.
- Araya, C. M. (2008) Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central. (IICA, ed.).
- Arellano, J., Fuentes, S. I., Castillo-España, P. y Hernández, G. (2009) Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 96: 11-18.
- Arencibia, A., Molina, P., Gutiérrez, C., Fuentes, A., Greenidge, V., Menéndez, E., Riva, G. d. I. y Selman-Houssein, G. (1992) Regeneration of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants from intact meristematic tissue transformed by electroporation. *Biotecnología aplicada*. 9: 156-165.
- Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J. M. (2006) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold and salinity stresses? *New Phytologist*. 173: 808-816.
- Atif, R. M., Patat-Ochatt, E. M., Svabova, L., Ondrej, V., Klenoticova, H., Jacas, L., Griga, M. y Ochatt, S. J. (2013) Gene Transfer in Legumes. *Progress in Botany*. 74: 37-87.

- Bakshi, S., Sadhukhan, A., Mishra, S. y Sahoo, L. (2011) Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Report*. 11: 1133-1138.
- Beaver, J. S., Godoy, G., Rosas, J. C. y Steadman, J. (2002) Estrategias para seleccionar frijol común con mayor resistencia a mustia hilachosa. *Agronomía Mesoamericana*. 13: 67-72.
- Blanco, M., Valverde, R. y Gómez, L. (2003) Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*. 1: 19-28.
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O. P. L., Mendes, É. A. y Aragão, F. J. L. (2007) RNAi-Mediated Resistance to Bean golden mosaic virus in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *The American Phytopathological Society*. 6: 717-726.
- Brown, S. A., Davis, J. A. y Ritcher, A. R. (2012) Efficacy of foliar insecticides on eggs of *Nezara viridula* (Hemiptera: *Pentatomidae*). *Florida Entomologist*. 95: 1182-1186.
- Collado, R., García, L. R., Angenon, G., Torres, D., Romero, C., Bermúdez, I. y Veitía, N. (2011) Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247. *Bioteología Vegetal*. 11: 235-240.
- Collado, R. (2013) *Phaseolus vulgaris* L. regeneration systems and their application for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation In: *Department of Bio-engineering Sciences*. Brussels: Vrije Universiteit Brussel, pp. 209.
- Collado, R., Veitía, N., Bermúdez-Carabaloso, I., García, L. R., Torres, D., Romero, C., Rodríguez-Lorenzo, J. L. y Angenon, G. (2013) Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. *Scientia Horticulturae*. 153: 109-116.
- Collado, R., García, L., Bermúdez, I., Veitía, N., Torres, D., Romero, C., Martirena, A., Ocaña, B., Rojas, L. E. y Angenon, G. (2016) *Phaseolus vulgaris* L. regeneration systems and their application for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Bioteología Aplicada*. 33: 2521-2523.
- Cullen, C. A. y Binns, A. N. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22: 101-127.

- Chatterton, S., Erickson, R. S., Hou, A., McLaren, D. L., Henriquez, M. A. y Conner, R. L. (2016) Identification of bacterial pathogens and races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from dry bean fields in Western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1: 41-54.
- Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C. N. y Camargo, W. N. (2007) Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal*. 2: 83-90.
- Díaz, C. y Chaparro-Giraldo, A. (2012) Métodos de transformación genética de plantas. *Revista Informativa de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*. 15: 49-61.
- Droste, A., Pimentel, P. C., Pasquali, G., Mundstock, E. C. d. y Bodanese-Zanettini, M. H. (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Scientia Agricola*. 4: 753-758.
- Echemendía, A. L., Ramos, P. L., Villarreal, N., Martínez, A. K., González, G. y Morales, F. J. (2010) Caracterización del virus del mosaico amarillo dorado del frijol en Cuba. *Fitosanidad*. 14: 11-17.
- El-Gali, Z. I. y El-Zahaf, B. r. S. (2015) Status and symptomatology of *Alternaria alternata* ceratoni blight of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in adjoining areas of El-Beida City - Libya. *Sky Journal of Microbiology Research*. 3: 30-35.
- El-Tohamy, W. A., El-Abagy, H. M., Badr, M. A. y Gruda, N. (2013) Drought tolerance and water status of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by citric acid application. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 86: 212-216.
- Emam, Y., Shekoofa, A., Salehi, F. y Jalali, A. H. (2010) Water Stress Effects on Two Common Bean Cultivars with Contrasting Growth Habits. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 9: 495-499.
- Espinosa-Huerta, E., Quintero-Jiménez, A., Cabrera-Becerra, K. V. y Mora-Avilés, M. A. (2013) Table efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Phaseolus vulgaris*. *Agrociencia*. 47: 319-333.
- FAO (2017) *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. [En línea] Disponible desde: <http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>. [Consultado: mayo 2017].

- Fernández-Herrera, E., Guerrero, J. C., Rueda, E. O. y Acosta, M. (2013) Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Revista de Ciencias Biológicas y de la salud*. 3: 46-50.
- Franklin, C. I., Trieu, T. N., Cassidy, B. G., Dixon, R. A. y Nelson, R. S. (1993) Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Reports*. 2: 74-79.
- Fukuona, H., Ogawa, T., Mitsuhashi, I., Iwai, T., Isuzugawa, K., Nishizawa, Y., Gotoh, Y., Nishizagawa, Y., Tagiri, A., Ugaki, M., Ohsima, M., Yano, H., Murai, N., Niwa, Y., Hibi, T. y Ohashi, Y. (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of monocot and dicot plants using the NCR promoter derived from soybean chlorotic mottle virus. *Plant Cell Reports*. 19: 815-820.
- Gama, P. B. S., Inanaga, S., Tanaka, K. y Nakazawa, R. (2007) Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 2: 79-88.
- García, L. R., Perez, J., Torres, D., Padrón, Y. y Romero, C. (2006) Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247F. *Biotecnología Vegetal*. 6: 73-77.
- García, L. R., Collado, R., Bermúdez-Carabaloso, I., Veitía, N., Torres, D. y Romero, C. (2009) Influencia del medio de cultivo en el crecimiento y desarrollo de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 1: 47-51.
- García, L. R., Bermúdez-Carabaloso, I., Veitía, N., Collado, R., Torres, D., Romero, C. y Martirena, A. (2012) Regeneración de plantas de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. vía organogénesis directa. *Biotecnología vegetal*. 12: 40-52.
- Gatica, A. M., Muñoz, J., Ramírez, P. y Valdez, M. (2010) *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13: 1-8.
- Gelvin, S. B. (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and molecular biology reviews*. 67: 16-37.
- George, E. F., Hall, A. M. y Klerk, G. J. D. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. The Netherlands pp. 420.

- Gepts, P. (2001) *Phaseolus vulgaris* (Beans). [En línea] Disponible desde: <http://agronomy.ucdavis.edu/gepts/geptslab.htm>. [Consultado: abril 2017].
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F. y Young, N. D. (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology*. 1: 113-143.
- Gómez, R., Reyes, M., Bermúdez, I., Chong, B. y Alvarado, Y. (2010) A new method for the rapid selection of banana plants (*Musa* spp. AAA cv. Grande naine) having bar gene in the field using ammonium glufosinate. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2: 248-258.
- Grada, K. I., Colás, A., Gutiérrez, Y., Cupull, R., Alvarado, Y. y R.Torres (2016) *Rhizobium* isolated effect on phenotypic parameters and nitrogen fixation in common bean genotypes (*Phaseolus vulagris* L.). *Centro Agrícola*. 43: 62-70.
- Grant, J. E., Thomson, L. M., Pither-Joyce, M. D., Dale, T. M. y Cooper, P. A. (2003) Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 12: 1207-1210.
- Guo, B. F., Guo, Y., Wang, J., Zhang, L. J., Jin, L. G., Hong, H. L., Chang, R. Z. y Qiu, L. J. (2014) Co-treatment with surfactant and sonication significantly improves *Agrobacterium*-mediated resistant bud formation and transient expression efficiency in soybean. *Journal of Integrative Agriculture*. 14: 1-17.
- Guo, M., Bian, X., Wu, X. y Wu, M. (2011) *Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation: History and Progress*. [En línea] Disponible desde: <http://www.intechopen.com/books/genetic-transformation/agrobacteriummediated-genetic-transformation-history-and-progress>. [Consultado: febrero 2017].
- Hada, A., Krishnan, V., Punjabi, M., Basak, N., Pandey, V., Jeevaraj, T., Marathe, A., Gupta, A. K., Jolly, M., Kumar, A., Dahuja, A., Manickavasagam, M., Ganapathi, A. y Sachdev, A. (2016) Refined glufosinate selection and its extent of exposure for improving the *Agrobacterium*-mediated transformation in Indian soybean (*Glycine max*) genotype JS-335. *Plant Biotechnology Reports*. 33: 341-350.

- Hayashimoto, A., Li, Z. y Murai, N. (1990) A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiology*. 93: 857-863.
- Helm, J. M., Dadami, E. y Kalantidis, K. (2011) Local RNA silencing mediated by agroinfiltration. *Methods in Molecular Biology*. 744: 97-108.
- Hincapie, L., López, P. y Torres, C. H. (2008) Comparación y Caracterización de Extractos de Bulbos de Ajo (*Allium sativum* L.) y su efecto en la mortalidad y repelencia de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: *Tetranychidae*). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 4: 317-327.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A. y Kononowicz, A. K. (2014) *Phaseolus vulgaris* — Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*. 32: 1205–1215.
- Holm, P., Knudsen, S., Olsen, F., Jensen, J., Muller, M., Molina-Cano, J. y Brufau, J. (1991) Genetic transformation of barley for quality traits. *Options Mediterraneennes. Serie A: Seminaires Mediterraneens*. pp. 45-54.
- Jiménez, E. (1998) Generalidades del cultivo *in vitro* In: *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. (UCLV, ed.). Cuba, pp. 13-22.
- Jones-Villeneuve, E., Huang, B., Prudhomme, I., S.Bird, Kemble, R., Hattori, J. y Miki, B. (1995) Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40: 97-100.
- Kakkar, A. y Kumar, V. (2011) *Agrobacterium* mediated biotransformation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 7: 29-35.
- Kapildev, G., Chinnathambi, A., Sivanandhan, G., Rajesh, M., Vasudevan, V., Mayavan, S., Arun, M., Jeyaraj, M., Alharbi, S. A., Selvaraj, N. y Ganapathi, A. (2016) High-efficient *Agrobacterium*-mediated in planta transformation in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Acta Phytophysiol Plant*. 1: 1-205.
- Karakaya, A. y Özcan, S. (2001) Susceptibility of Different Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Turkey Journal of Biology*. 25: 447-452.
- Karami, O., Esna-Ashari, M., Kurdistani, G. y Aghavaisi, B. (2009) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: The role of host. *Biologia Plantarum*. 53: 201-212.

- Khan, K. H. (2010) Gene Transfer Technologies and their Applications: Roles in Human Diseases. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*. 1: 208-218.
- Kumar, S., Katikala, S., Yellisetty, V., Kannepalle, A., Lakshmi, J., Maddi, V., Mandapaka, M., Kumar, A., Bandi, V. y Pulugurtha, K. (2012) Optimization of *Agrobacterium* mediated genetic transformation of cotyledonary node explants of *Vigna radiata*. *European Physical Journal* 1: 1-59.
- Kwapata, K., Nguyen, T. y Sticklen, M. (2012) Genetic Transformation of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with the Gus ColorMarker, the Bar Herbicide Resistance, and the Barley (Hordeum vulgare) HVA1 Drought Tolerance Genes. *International Journal of Agronomy*. 2012: 1-8.
- Kwapata, K. M. (2015) Development of drought tolerant transgenic bean lines using an improved gene transformation system. *Academia Journal of Biotechnology*. 2: 10-14.
- Kwapata, K. P., Sabzikar, R. S., Sticklen, M. B. y Kelly, J. D. (2010) *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tissue Org Cult* 100: 97-105.
- Lamz, A., Cárdenas, R. M., Ortiz, R., Montero, V., Martínez, B., Fé, C. F. d. I., Duarte, Y. y Alfonso, L. E. (2016) Evaluation of agro-morphological behavior based on the variability characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines for late sowings. *Cultivos Tropicales*. 2: 108-114.
- Lanna, A. C., Mitsuzono, S. T., Rios, T. G., Vianello, R. P. y Figueiredo, M. A. d. (2016) Physiological characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes, water-stress induced with contrasting response towards drought. *Australian Journal of Crop Science*. 1: 1-6.
- Liu, Z., Park, B. J., Kanno, A. y Kameya, T. (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. *Molecular Breeding*. 16: 189-197.
- López, A. y Chaparro, A. (2007) A system for transformation potato plants (*Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. *Pastusa suprema*) mediated through *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Colombiana*. 1: 16-25.
- Lorenzo, I. (2010) Cultivo *in vitro* y transformación genética por agroinfección de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo Anita. Mexico: Universidad de Morelos, pp. 100.

- Mahmoudian, M., Yücel, M. y Öktem, H. A. (2002) Transformation of Lentil (*Lens culinaris* M.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 20: 251-257.
- Mannan, A., Noor, T. y Mirza, B. (2009) Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. *Pakistan Journal of Botany*. 6: 3239-3246.
- Mariashibu, T. S., Subramanyam, K., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Theboral, J., Manickavasagam, M. y Ganapathi, A. (2013) Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Phytophysiol Plant*. 35: 41-54.
- Martínez, Y. (2008) Emergence of begomoviruses in Cuba. *Protección Vegetal*. 23: 11-15.
- Martirena-Ramírez, A. y Veitía, N. (2013) Factores que influyen en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. *Bioteconología Vegetal*. 13: 67-74.
- McClean, P., Chee, P., Held, B., Simental, J., Drong, R. F. y Slightom, J. (1991) Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2: 131-138.
- Mena, E., Leiva-Mora, M., Dilhara, E. K., García, L., Veitía, N., Bermúdez-Caraballoso, I., Collado, R. y Cárdenas, R. (2015) Effect of salt stress on seed germination and seedlings growth of *Phaseolus vulgaris* L.. *Cultivos Tropicales*. 3: 71-74.
- Menge, S. M. D., Makobe, M., Monda, O. E. y Okemo, O. P. (2014) Effects of crude extracts on some selected physiological parameters of French beans (*Phaseolus vulgaris*) infected with rust (*Uromyces appendiculatus*). *African Journal of Plant Science*. 7: 356-363.
- Muedi, H. T. H., Fourie, D. y McLaren, N. W. (2015) Distribution and severity of bacterial brown spot on dry beans in South Africa: An update. *South African Journal of Science*. 111: 1-6.
- Mukeshimana, G., Hart, L. P. y Kelly, J. D. (2003) Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus. Michigan State University Extension, pp. 145.
- Mukeshimana, G. C., Ma, Y. A., Aaron, E. W., Guo-qing, S. P. y James, D. K. (2013) Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnology Reports*. 1: 59-70.

- Munns, R. y Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-681.
- Muruganantham, M., Amutha, S., Selvaraj, N., Vengadesan, G. y Ganapathi, A. (2007) Efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Vigna mungo* using immature cotyledonary-node explants and phosphinothricin as the selection agent. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 43: 550-557.
- Mwanauta, R. W., Mtei, K. M. y Ndakidemi, P. A. (2015) Potential of Controlling Common Bean Insect Pests (Bean Stem Maggot (*Ophiomyia phaseoli*), Ootheca (*Ootheca bennigseni*) and Aphids (*Aphis fabae*)) Using Agronomic, Biological and Botanical Practices in Field. *Agricultural Sciences*. 6: 489-497.
- Nagamangala, C. y Maffei, M. (2007) Callus induction and shoot regeneration of *Phaseolus lunatus* L. cv. Wonder Bush and cv. Pole Sieva. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 92: 239-242.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Blanco, L., Arellano, E. S. y Lara, M. (2016) Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved *Agrobacterium* mediated leaf disc infiltration of *Phaseolus vulgaris*: tools for rapid gene expression analysis. *Algorithms for Molecular Biology*. 16: 1-53.
- Naranjo, E. J., Chavarriaga, P. y Atehortúa, L. (2002) Expresión transiente del gen reportero β glucuronidasa en embriones somáticos de *Heliconia stricta* transformados con *Agrobacterium tumefaciens*. *Actualidades biológicas*. 77: 5-12.
- Nassar, R. M. A., Ahmed, Y. M. y Boghdady, M. S. (2010) Botanical Studies on *Phaseolus vulgaris* L. I-Morphology of Vegetative and Reproductive Growth. *International Journal of Botany*. 1: 1-11.
- NCBI (2017) *NCBI taxonomy*. [En línea] Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [Consultado: abril 2017].
- Omae, H., Kumar, A., Kashiwaba, K. y Shono, M. (2006) Influence of High Temperature on Morphological Characters, Biomass Allocation, and Yield Components in Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Production Science*. 3: 200-205.
- Omae, H., Kumar, A. y Shono, M. (2012) Adaptation to High Temperature and Water Deficit in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the Reproductive Period. *Journal of Botany*. 2012: 1-6.

- ONE (2017) *Anuario Estadístico de Cuba*. [En línea] Disponible desde: <http://www.one.cu/aec2017>. [Consultado: abril 2017].
- ONEI (2017) *Producción agrícola por cultivos seleccionados de la agricultura no cañera. Sector estatal*. [En línea] Disponible desde: www.one.cu. [Consultado: marzo 2017].
- Ongom, P. O., Nkalubo, S. T., Gibson, P. T., Mukankusi, C. M. y Rubaihayo, P. R. (2012) Evaluating genetic association between *Fusarium* and *Pythium* root rots resistances in the bean genotype rwr 719. *African Crop Science Journal*. 1: 31-39.
- Opabode, J. T. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1: 12-20.
- Peña, K., Rodríguez, J. C. y Santana, M. (2015) Productive behavior of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) treaty with a promoter of the growth activated molecularly. *Avances*. 17: 327-337.
- Pérez, M., Coll, Y., Pujo, M., Armas, R., Alfonso, J., Hernández, C., González, A., Abreu, D., Valdivia, O. y Delgado, M. (2008) Las condiciones de cocultivo determinan la eficiencia de transformación de arroz (var. IACuba-28) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotecnología* 3: 21-33.
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P. y Hurrell, R. F. (2015) The Potential of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) as a Vehicle for Iron Biofortification. *Nutrients*. 7: 1144-1173.
- Pitzschke, A. y Hirt, H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induce tumor formation in plant transformation. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 29: 1021-1032.
- Quintero-Jiménez, A., Espinosa-Huerta, E., J. A. Acosta-Gallegos, Guzmán-Maldonado, H. S. y Mora-Avilés, M. A. (2010) An improved method for *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia*. 44: 57-64.
- Quintero, F. E. (2000) Manejo agrotécnico del frijol en Cuba. In: *Ingeniería Agrícola*. Cuba: UCLV.
- Quinteros-Hidalgo, M. (2015) Pesticides in the culture of bean (*Phaseolus vulgaris*): case of the Imidacloprid. *International Journal of Innovation and Scientific Research*. 2: 235-243.
- Rainey, K. M. y Griffiths, P. D. (2005) Differential response of common bean genotypes to high temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130: 18-23.

- Rajasekaran, C., Meignanam, E., Vijayakumar, V., Kalaivani, T., Ramya, S., Premkumar, N., Siva, R. y Jayakumararaj, R. (2008) Investigations on Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae): A Traditional Medicinal Plant of India. *Ethnobotanical Leaflets*. 12: 1213-1217.
- Ramos, Y., Gómez, J. R., Espinosa, R., Marichal, E. y Armentero, C. (2011) Afectaciones directas producidas por el complejo de chinches (Hemiptera: Pentatomidae) en granos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y determinación de *Nematospora* sp. *Fitosanidad*. 15: 179-183.
- Raveendar, S. e Ignacimuthu, S. (2010) Improved *Agrobacterium* mediated transformation in cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Asian journal of Plant Sciences*. 5: 256-263.
- Razinger, J., Drinovec, L., Šuštar-Vozlič, J., Čremočnik, B., Meglič, V. y Čerenak, A. (2010) Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to drought stress *Hmeljarski bilten / Hop Bulletin*. 17: 44-56.
- Reynoso, R., Ríos, M. C., Torres, I., Acosta, J. A., Palomino, A. C., Ramos, M., González, E. y Guzmán, S. H. (2007) El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agricultura Técnica en México*. 33: 43-52.
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F. y Loske, A. M. (2012) Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*. 9: 308-345.
- Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D. y Demey, J. (2016) *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae): Historia, situación actual y su rol como vector de enfermedades virales de plantas en Venezuela. *Entomotrópica*. 31: 276-293.
- Romero-Arenas, O., Damián, M. A., Rivera, J. A., Báez, A., Huerta, M. y Cabrera, E. (2013) The Nutritional value of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its importance for Feeding of Rural communities in Puebla-Mexico. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2: 59-65.
- Rosado, F. J., García, E. R. y Gliesman, S. R. (1985) Impacto de los fitopatógenos del suelo al cultivo del frijol en suelos bajo diferentes manejos en la Chontalpa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 13: 96.

- Safitri, F. A., Ubaidillah, M. y Kim, K. M. (2016) Efficiency of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using vacuum infiltration in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biotechnology*. 43: 66-75.
- Sainger, M., Chaudhary, D., Dahiya, S., Jaiwal, R. y Jaiwal, P. K. (2015) Development of an efficient *in vitro* plant regeneration system amenable to *Agrobacterium*- mediated transformation of a recalcitrant grain legume blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 4: 505-517.
- Sánchez-Castro, A., Miranda, I. y Fernández, B. M. (2016) Distribución espacial y temporal de *Empoasca* spp. (Typhlocybinae) en un campo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista de Protección Vegetal*. 31: 159-164.
- Schenkel, M., Wiebke-Strohm, B., Mayer, R. L. y Bodanese-Zanettini, M. H. (2012) Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genetics and Molecular Biology*. 4: 998-1010.
- Schwartz, H. F. y Singh, S. P. (2013) Breeding Common Bean for Resistance to White Mold: A Review. *Crop Science*. 53: 1-13.
- Seo, Y. S., Gepts, P. y Gilbertson, R. L. (2004) Genetics of resistance to the geminivirus, Bean dwarf mosaic virus, and the role of the hypersensitive response in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 786-793.
- Singh, I. (2016) Regeneration and Transformation of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *Agronomy and Horticulture Department*. Nebraska-Lincoln: University of Nebraska - Lincoln, pp. 82.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T. S. y Manickavasagam, M. (2012) Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) *Indian Crop Production*. 37: 124-129.
- Subramanyam, K., Sailaja, K. V., Srinivasulu, M. y Lakshmidivi, K. (2011) Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*. 30: 425-436.
- Subramanyam, K., Subramanyam, K., Sailaja, K. V., Srinivasulu, M. y Lakshmidivi, K. (2011b) Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*. 30: 425-436.

- Tazeen, S. y Mirza, B. (2004) Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.36: 121–139.
- Thảo, N. T., Phương, N. T., Hassan, F. y Jacobsen, H. J. (2013) *In vitro* propagation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Scientific Research and Development*. 6: 868-867.
- Tuteja, N., Verma, S., Kumar, R., Raveendar, S. y Lingeshwara, I. B. (2012) Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern. *Journal of Bioscience*. 37: 167–197.
- Ulloa, J. A., Rosas, C. P., Ramírez, J. C. y Ulloa, B. E. (2011) El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año 3*. 8: 5-9.
- Valderrama, A. M., Arango, R. y Afanador, L. (2005) Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 58: 2569-2585.
- Varisai, S., Sung, J. M., Jeng, T. L. y Wang, C. S. (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.
- Vauterin, S. L., Rademaker, J. L. W. y Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 90: 677-682.
- Veitía, N., Collado, R., García, L. R., Bermúdez-Caraballoso, I., Torres, D. y Romero, C. (2012) Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Bioteología Vegetal*. 3: 143 - 148.
- Veltcheva, M., Svetleva, D. y Petkova, S. (2003) In Vitro Cultivation and Regeneration of Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 17: 50-58.
- Veluthambi, K., Gupta, A. K. y Sharma, A. (2003) The current status of plant transformation technologies. *Current Science*. 84: 368-380.
- Vivanco, M., Zamar, M. y Sosa, M. (2011) Clave ilustrada para la identificación de larvas y adultos de trips (Insecta: Thysanoptera) presentes en el cultivo de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en Jujuy y Salta (Argentina). *Revista Agronómica de noroeste argentino*. 34: 259-260.

- Wang, Y. y Pijut, P. M. (2014) *Agrobacterium*-mediated transformation of black cherry for flowering control and insect resistance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 119: 107-116.
- Wiebke-Strohm, B., Droste, A., Pasquali, G., Osorio, M. B., Bucker-Neto, L., Pereira, L. M., Bencke, M., Schenkel, M., Margis-Pinheiro, M. y Bodanese-Zanettini, M. H. (2010) Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. *Euphytica*. 1: 1-12.
- Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., Guo, X. y Hashsham, S. A. (2016) Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environment Research*. 88: 1951-1967.
- Yang, X. F., Yu, X. Q., Zhou, Z., Ma, W. J. y Tang, G. X. (2016) A high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system using cotyledonary node as explants in soybean (*Glycine max* L.). *Acta Phytophysiol Plant*. 38: 1-60.
- Young, T. E., Ling, J., Geisler-Lee, C. J., Tanguay, R. L., Caldwell, C. y Gallie, D. R. (2001) Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiology*. 127: 777-791.
- Zambre, M., Geerts, P., Maquet, A., Montagu, M. V., Dillen, W. y Angenon, G. (2001) Regeneration of Fertile Plants from Callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year Bean). *Annals of Botany*. 88: 371-377.
- Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Montagu, M. V., Terryn, N. y Angenon, G. (2005) A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theoretical and Applied Genetics*. 110: 914-924.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M. V. y Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 2: 2143-2150.
- Zeledon, B. (1990) *Uso de extractos del árbol NIM Azadirachta indica A. Juss. en la proteccion de plantulas de frijol común Phaseolus vulgaris L. contra mosca blanca Bemisia tabaci Genn.* Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de Nicaragua pp. 26.

Zia, M., Rizvi, Z. F., Riaz-Ur-Rehman y Chaudhary, M. F. (2010) *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): some conditions standardization. *Pakistan Journal of Botany*. 4: 2269-2279.

Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. y Zambraski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*. 1: 11-28.

