

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

"Enseñar la explotación de la Tierra no del Hombre"

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Cultivo *in vitro* y transformación genética por
agroinfección de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)
var. Flor de Mayo Anita**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el título de:

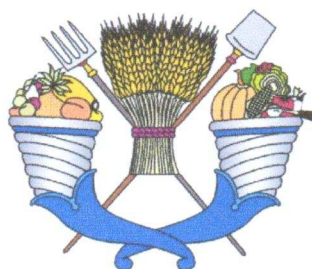
**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

PRESENTA:

ISRAEL LORENZO FELIPE

Chapingo, México, Junio de 2010





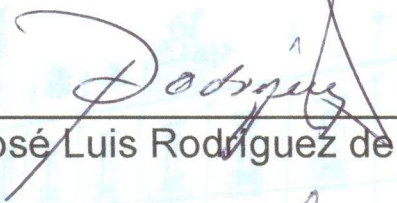
“Cultivo *in vitro* y transformación genética por agroinfección de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo Anita”, tesis realizada por el Ing. Israel Lorenzo Felipe bajo la dirección del comité Asesor indicado, aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

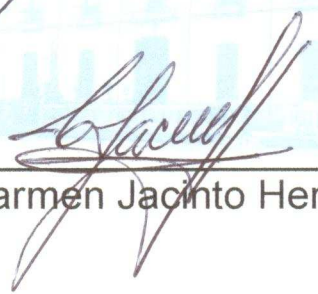
DIRECTOR:


Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:


Dra. Carmen Jacinto Hernández

Junio de 2010

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por ser el semillero de grandes profesionistas del sector agrícola y generadora de un amplio conocimiento que tanto se requiere en nuestro campo Mexicano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento recibido, pues sin éste apoyo la ciencia no podría avanzar en México.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por haberme permitido ser parte de su gran equipo de trabajo, por brindarme su conocimiento y apoyo en todo momento.

A la Dra. Carmen Jacinto, por apoyarme con sus valiosas aportaciones para el desarrollo y culminación de esta tesis.

A todo el equipo que conforma el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Fitotecnia, por darme el espacio para realizar toda la fase experimental de este trabajo, especialmente al Dr. José Luis Rodríguez de la O, a el MC. Alejandro Manzo, a la Ing. Norma Aguilar, a la Lic. Gisela de la Rosa, con quienes compartí alegría, trabajo y gran amistad.

A mi comité asesor, por su amplio conocimiento y sabiduría para poder encaminar este trabajo y lograr este trabajo, por su calidad humana y profesional.

A mis amigos con quien compartí grandes momentos y me ayudaron a en momentos de dificultad científica: Javier, Antelmo, Mariano, Ángeles, Pablo, Arely, Juanito.

En especial a mi familia que me brindo su apoyo para poder lograr un gran sueño.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

A mis padres

Margarita y Teódulo

A mis tíos

Juana y Félix

A mis hermanos

Aldo, Dennis y Rigo

A mis primos

A mis sobris

Aris y Litzy

DATOS BIOGRAFICOS

El autor de la presente tesis es Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, originario del Estado de México, nacido el 06 de Noviembre de 1984. Su interés por el ámbito agrícola se generó desde su educación básica al pertenecer al sector rural y sus estudios posteriores se vieron relacionados con el sector agrícola. Ya en la Universidad Autónoma Chapingo, se enfocó por la cuestión biotecnológica desde su llegada, siendo el cultivo de tejidos su principal interés, hasta llegar a la actual tesis, en donde maneja transformación genética.

**Cultivo *in vitro* y transformación genética por agroinfección de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo Anita**

***In vitro* culture and genetic transformation by agroinfection of common bean
(*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo Anita**

Israel Lorenzo Felipe¹; José Oscar Mascorro Gallardo²

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento básico de gran importancia económica alrededor del mundo, en particular en los países en desarrollo; sin embargo su crecimiento es afectado por las condiciones climáticas restringiendo el rendimiento de grano, en México se produce principalmente en ambientes con precipitación errática donde la sequía causa bajos rendimientos de grano, y el mejoramiento genético para resistencia a sequía en frijol se ha basado en métodos tradicionales, pero la ingeniería genética puede acelerar este proceso.

Se optimizó un protocolo de regeneración para *P. vulgaris*, encontrando que es más factible trabajar con ejes embrionarios obtenidos de plántulas germinadas en un medio con 1.0 mg·l⁻¹ de BA y 1.0 mg·l⁻¹ de tiamina por 5 días, reduciendo los niveles de oxidación y manteniendo el porcentaje de formación de callo en el nudo cotiledonar.

Y para incursionar en la transformación genética denominada SAAT (Transformación medida por *Agrobacterium* asistida por sonicación), se evaluó el efecto de diferentes tiempos de exposición de ultrasonido sobre la capacidad de regeneración *in vitro* de frijol,

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a staple of great economic importance around the world, particularly in developing countries. However, their growth is affected by climatic conditions restricting grain yield. In Mexico it is mainly produced in erratic rainfall environments where drought causes low grain yields, and breeding for drought resistance in common bean has been based on traditional methods, but genetic engineering can speed up this process.

A regeneration protocol for *P. vulgaris* was optimized, as a result of which it was found that it is more feasible to work with embryonic axes obtained from germinated seedlings in medium containing 1 mg·l⁻¹ BA and 1 mg·l⁻¹ of thiamine for 5 days, reducing the oxidation levels while maintaining the percentage of callus formation in the cotyledonary node.

And to venture into the genetic transformation called SAAT (Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation), the effect of different ultrasound exposure times on the *in vitro* regeneration capacity of common bean was evaluated. Seeds germinated in evaluated. Seeds germinated in darkness are more sensitive to ultrasound treatment (91.67 % mortality), while those

plantas germinadas en oscuridad son más sensibles a tratamientos de ultrasonido (91.67 % de mortalidad), mientras que las germinadas en luz solo presentan problemas de oxidación, y tratamientos prolongados (10 minutos) reducen la capacidad de regeneración *in vitro*, mientras que tiempos cortos (90 segundos) incrementan la capacidad de formación de callo en el nudo cotiledonar y los brotes son de mayor calidad. Cinco minutos de ultrasonido afectan la capacidad de formación de callo, generando la brotación de yemas adventicias, pero con lo anterior se puede incursionar en el proceso de transformación genética.

Utilizando SAAT, ejes embrionarios de plantas de cinco días de germinación se sometieron a la infección de *Agrobacterium tumefaciens* con la cepa LBA4404 utilizando sonicación por 5 minutos e infiltración por vacío por 5 minutos. Se lograron obtener 138 explantes resistentes a $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de PPT (6.16 %) y solo 13 plantas aclimatadas de un total de 2240 ejes infectados (0.58 %), mismas que murieron por efecto de *A. tumefaciens*, pues se volvió sistémica y mato los brotes tanto *in vitro* como *ex vitro*.

germinated in light only have oxidation problems, and prolonged treatments (10 minutes) reduce the capacity of *in vitro* regeneration, whereas short times (90 seconds) increase the capacity of callus formation in the cotyledonary node and shoots are of higher quality. Five minutes of ultrasound affect the capacity of callus formation, generating the sprouting of adventitious buds, but with the above it may intrude on the process of genetic transformation.

Using SAAT, embryonic axes of plants five days after germination were subjected to infection with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 using sonication for five minutes and vacuum infiltration for 5 minutes. It was possible to obtain 138 explants resistant to $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ PPT (6.16 %) and only 13 plants acclimated out of a total of 2240 infected axes (0.58 %), the same that died as a result of *A. tumefaciens*, as it turned systemic and killed the shoots both *in vitro* and *ex vitro*.

¹ Autor de la tesis, requisito para obtener el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. México.

² Profesor-investigador del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, México.

INDICE	Pág.
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Importancia del frijol.....	1
1.2 Mejoramiento clásico del frijol.....	1
1.3 Mejoramiento clásico y la ingeniería genética.....	3
1.4 Mejoramiento del frijol utilizando ingeniería genética de plantas.....	4
1.5 Métodos de transformación genética.....	4
1.6 Etapas de infección de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
1.7 Factores que afectan la transformación por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
1.9 Objetivos de la investigación.....	11
Literatura citada.....	11
 Capítulo 2. Efecto del ultrasonido en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol	20
Resumen.....	20
2.1 Introducción.....	20
2.2 Materiales y Métodos.....	22
2.2.1 Material vegetal.....	22
2.2.2 Obtención de explantes.....	23
2.2.3 Tiamina para la calidad de plántula.....	23
2.2.4 Ultrasonido para estimular la brotación.....	23
2.2.5 Regeneración: inducción de callo, brotación y elongación.....	23
2.2.6 Enraizamiento.....	24
2.2.7 Análisis estadístico.....	24
2.3 Resultados.....	25
2.3.1 Efecto de la tiamina.....	25
2.3.2 Cultivo <i>in vitro</i>	26
2.3.3 Efecto del ultrasonido sobre la mortalidad de ejes embrionarios....	27
2.3.4 Efecto del ultrasonido sobre la regeneración.....	29
2.4 Discusion.....	34
2.4.1. Tiamina.....	34
2.4.2. Cultivo <i>in vitro</i>	35
2.4.3. Efecto del ultrasonido sobre la mortalidad.....	38
2.4.4 Efecto del ultrasonido sobre la regeneración.....	39
2.5 Conclusiones.....	40
Literatura citada.....	41
 Capítulo 3. Ensayos de transformación genética por agroinfección de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. Flor de Mayo “Anita”	45
Resumen.....	45
3.1 Introducción.....	45
3.2 Material y métodos.....	46
3.2.1 Material vegetal.....	46
3.2.2 Medios de cultivo y condiciones experimentales.....	46
3.2.3 Sensibilidad a fosfonitricina.....	47
3.2.4 Cepas y construcción.....	47
3.2.5 Condiciones de transformación.....	48

3.2.6 Detección y evaluación de expresión transitoria del gen GUS.....	49
3.2.7 Selección y regeneración de plantas.....	50
3.2.8 Aclimatación.....	50
3.2.9 Análisis estadístico.....	50
3.3 Resultados.....	50
3.3.1 Sensibilidad de <i>P. vulgaris</i> a PPT.....	50
3.3.2. Expresión transitoria.....	51
3.3.3 Efecto de la infección sobre la regeneración.....	53
3.3.4 Obtención de plantas transgénicas.....	55
3.4 Discusión.....	58
3.4.1 Efecto de la infección sobre la regeneración.....	58
3.4.2 Efecto de la infección sobre el necrosamiento del tejido.....	59
3.4.3 Respuesta de hipersensibilidad por <i>A. tumefaciens</i>	60
3.4.4 Transformación genética.....	61
3.3.5 Persistencia de <i>A. tumefaciens</i>	63
3.4 Conclusiones.....	66
Literatura citada.....	66
Capítulo 4. Conclusiones generales.....	72

Índice de cuadros

Capítulo 2

Cuadro 1. Composición de los medios utilizados para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i>	24
Cuadro 2. Efecto de los días de obtención de eje embrionario sobre la respuesta morfo genética <i>in vitro</i> a los 15 días.....	26
Cuadro 3. Efecto del ultrasonido sobre la sobrevivencia de ejes embrionarios de frijol germinados en oscuridad o en luz, cuatro días después de la sonicación.....	28
Cuadro 4. Efecto del ultrasonido a los diez días sobre ejes embrionarios de frijol.....	30
Cuadro 5. Efecto del ultrasonido sobre la regeneración de ejes embrionarios a los 30 días después del tratamiento.....	32

Capítulo 3

Cuadro 1. Composición de los medios utilizados para la transformación <i>P. vulgaris</i>	47
Cuadro 2. Efecto de la concentración de PPT sobre la sobrevivencia (%) de ejes de frijol de cinco días de germinación.....	51
Cuadro 3. Nivel de expresión transitoria del gen GUS a los siete días después del co-cultivo en luz.....	53
Cuadro 4. Respuesta a diferentes tratamientos de infección, 5 días después del co-cultivo con la cepa LBA4404.....	54
Cuadro 5. Respuesta al cultivo <i>in vitro</i> después de la infección y co-cultivo en luz, a los 15 días del co-cultivo con la cepa LBA4404.....	55
Cuadro 6. Eficiencia de transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> en frijol var. Flor de Mayo Anita.....	56
Cuadro 7. Efecto del tratamiento de transformación genética sobre la	

regeneración <i>in vitro</i> de frijol, a los 10 días después del tratamiento.....	59
--	----

Índice de figuras

Capítulo 2

Figura 1. Efecto de la concentración de tiamina sobre la calidad de plántulas de frijol, seis días después de la germinación en oscuridad....	25
Figura 2. Regeneración <i>in vitro</i> de frijol variedad Flor de Mayo Anita.....	27
Figura 3. Efecto del ultrasonido sobre la sobrevivencia de ejes embrionarios de frijol a los cuatro días después del tratamiento.....	28
Figura 4. Diferentes respuestas <i>in vitro</i> por efecto de cinco min de sonicación.....	29
Figura 5. Efecto del ultrasonido sobre la regeneración de frijol a diferentes tiempos de exposición a los 45 días del tratamiento.....	33
Figura 6. Efecto de cinco minutos de ultrasonido sobre la brotación de <i>P. vulgaris</i>	

Capítulo 3

Figura 1. Esquema del vector pGREENRd29A-Bif utilizado para la transformación genética estable mediada por <i>Agrobacterium</i>	48
Figura 2. Expresión de GUS en <i>P. vulgaris</i> dos días después del cultivo.....	52
Figura 3. Expresión transitoria del gen GUS, siete días después del cultivo con la cepa LBA4404.....	53
Figura 4. Selección de ejes embrionarios en PPT 0.5 mg/l después de la infección con <i>A. tumefaciens</i>	57
Figura 5. Respuesta de sensibilidad por efecto de la inoculación de <i>A. tumefaciens</i>	60
Figura 6. Persistencia de <i>A. tumefaciens</i> en ejes embrionarios <i>in vitro</i> de frijol.....	65

.

.

Pagina en blanco

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del frijol

México es uno de los principales centros del origen de la agricultura en el mundo (Hancock, 2004); entre los cultivos alimenticios mas importantes domesticados se encuentran el maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y calabaza (*Cucurbita* spp.), por lo que plantas silvestres relacionadas con esos tres cultivos se encuentran en México y en regiones adyacentes (Maíz: Wilkes, 2004; Frijol: Freytag y Debouck, 2002; Calabaza: Montes-Hernández y Eguiarte, 2002).

El frijol (*P. vulgaris*) se originó en América, y fue exportado al resto del mundo al inicio del siglo XVI, y actualmente es un cultivo importante a nivel mundial (Gepts y Bliss, 1988; Gepts, 1990). Su domesticación se inició aproximadamente hace 4000 años en Mesoamérica y en regiones de los Andes en América del sur (Kaplan y Lynch, 1999). En México la principal leguminosa de grano en la alimentación humana es el frijol y su consumo *per cápita* es de 11.7 Kg por año.

En el año 2008 se cultivaron en México más de 1,626,021.82 hectáreas de frijol en la modalidad de riego y temporal, de las cuales únicamente se cosecharon un poco más de 1,503,237 hectáreas y el resto (122,183) presento algún tipo de siniestro (principalmente sequía), pero con las hectáreas cosechadas se alcanzó un volumen de producción promedio de 1,111,087 toneladas, reportándose un rendimiento promedio para riego y temporal de 0.739 t·ha⁻¹ y el precio de la tonelada fue en promedio de \$ 9,161.63 (Siacon, 2010) por lo que el frijol es un cultivo de suma importancia para el país.

1.2. Mejoramiento clásico del frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es producido en un gran rango de condiciones climáticas desde regiones tropicales húmedas en América Latina y África hasta las tierras altas semi-áridas de México y las llanuras altas de E.U.U.A y Canadá. Cada región tiene diferentes prácticas de producción y un único grupo de restricciones bióticas y abióticas. Por consiguiente, los objetivos de los programas de

mejoramiento deben ser diseñados para abordar las necesidades de los agricultores que usaran los cultivares (Santalla *et al.*, 2001; Singh, 2001; Kelly, 2001).

Los principales objetivos del mejoramiento genético incluyen: (1) rendimiento de semilla, el cual es un objetivo universal de todos los programas de mejoramiento genético, en donde, con la ayuda de las técnicas moleculares se pueden identificar los alelos deseables o permitir una selección indirecta para reducir las asociaciones negativas (Beaver y Osorno, 2009); (2) resistencia para restricciones bióticas, debido a que las plagas y enfermedades causan una pérdida significativa en el rendimiento de frijol (Schwartz *et al.*, 2005; Coyne *et al.*, 2003; Wortman *et al.*, 1998); (3) tolerancia para restricciones abióticas, ya que debido a que la producción a nivel mundial se ve amenazada por una serie de factores estresantes como sequía, baja fertilidad de suelos, suelos ácidos y temperaturas desfavorables para su crecimiento (Lynch, 2007), se ha logrado desarrollar líneas mejoradas que muestran un incremento en la tolerancia a muchos de estos factores estresantes como sequía (Brick *et al.*, 2008; Muñoz-Perea *et al.*, 2006; Frahm *et al.*, 2004), bajo contenido de fósforo en suelos (Beebe *et al.*, 2008; Lynch 2007) y altas temperaturas (Beaver *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2000); (4) aumento de la calidad nutritiva, para aumentar el nivel de los micronutrientes Zn y Fe para mejorar la nutrición humana en países en desarrollo (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2003; Frossard *et al.*, 2000).

Dentro de los métodos de mejoramiento clásico de frijol se encuentra el Pedigree, retro-cruza, selección individual (SSD, single seed descent), selección gamética, selección masal y selección recurrente, sin embargo, se requieren de varios ciclos de selección que por lo general son de 4-7 ciclos como mínimo, pero para obtener una buena línea se requiere de varios años, pues es necesario considerar el tiempo de preselección y la evaluación del material obtenido, por lo que se debe de considerar nuevos métodos como mejoramiento asistido (Beaver y Osorno, 2009) o ingeniería genética para reducir los tiempos de mejoramiento genético, y atender las necesidades de la gran diversidad de productores.

1.3 Mejoramiento clásico y la ingeniería genética de plantas

El desarrollo de nuevos cultivares es el resultado de un proceso cíclico, y cada ciclo consta de diversas etapas que se traslapan (Bos y Caligari, 1995; Hill *et al.*, 1998; Charrier *et al.*, 2001). Las fases incluyen (i) reunión y generación de nueva diversidad; (ii) selección y evaluación para identificar los recombinantes superiores; y (iii) lanzamiento, distribución y comercialización de las nuevas variedades. La primera fase incluye actividades como reunión de fuentes de diversidad genética para mejores actividades de mejoramiento de fuentes adaptadas o exóticas y recombinar estas fuentes de diversidad genética para crear nuevas combinaciones de genes, ya sea por cruza sexual o por ingeniería genética (IG). En la fase de selección, los mejoradores se las arreglan con asuntos como el tiempo de la selección (generación rápida vs lenta), el ambiente de selección (favorable vs estresante), y el número de años y localidades de evaluación. Finalmente, el lanzamiento y distribución de los nuevos cultivares no debe ser ignorado. Tener un nuevo genotipo superior no es en si una garantía de éxito extendido de un cultivar mejorado.

La mayor contribución del mejoramiento vegetal moderno como práctica del último siglo, ha sido la maximización de la expresión de rasgos de interés agronómico, principalmente la tolerancia a estrés ambiental y biológico (Duvick, 1992; Duvick y Cassman, 1999; Fehr, 1984)

La mayor contribución de la ingeniería genética es la generación de una diversidad genética adicional. A pesar de la búsqueda intensiva, algunos rasgos (calidad nutricional, tolerancia a factores bióticos o abióticos, etc.) no se han podido encontrar en grupos de genes domesticados o en parientes silvestres compatibles sexualmente (Harlan y de Wet, 1971).

En resumen la ingeniería genética complementa el mejoramiento clásico, pues es una fuerte vía para generar diversidad genética adicional, la cual es el punto de partida de cualquier programa de mejoramiento vegetal (Gepts, 2002). Además, la ingeniería genética no es necesariamente una alternativa más rápida y más precisa que el mejoramiento vegetal clásico. Es una poderosa herramienta que permite la generación de diversidad genética adicional que puede ser incorporada

dentro de cultivares agrícolas mejorados por los métodos y técnicas demostradas del mejoramiento vegetal (Gepts, 2002).

1.4 Mejoramiento del frijol utilizando ingeniería genética

Broughton *et al.* (2003) reportaron que los esfuerzos para la transformación de frijol común han tenido éxito limitado. En la actualidad, aun no existe un protocolo eficiente para la transformación de frijol. El primer reporte de transformación de frijol fue hecho en la década de 1990's usando aceleración de partículas por bombardeo (Russell *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 1996; Aragão *et al.*, 2002). En Brasil, las investigaciones usando la técnica de bombardeo de partículas para producir frijol transgénico han generado líneas con resistencia al virus del mosaico dorado (BGMV) (Bonfim *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2006), sin embargo la eficiencia de transformación reportada es aun baja (menor a 0.7 %).

Zambre *et al.* (2005) reportaron el desarrollo de un método reproducible de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para *P. acutifolius*, y con ayuda de las cruces inter específicas se pueden pasar genes de interés a *P. vulgaris*, sin embargo es necesario considerar los costos y el tiempo. Liu *et al.*, (2005) reportaron una exitosa transformación de frijol usando la transformación mediada por *Agrobacterium* y asistida por sonicación con una eficiencia de 12.5 %, reportando que los frijoles fueron mas tolerantes a suelos salinos y condiciones de sequía, pero dicho protocolo no ha podido ser repetido (Aragão, 2010¹).

1.5 Métodos de transformación genética

Para realizar transformación genética, existen dos vías, mediante técnicas directas como la electroporación, microinyección y biolística, o por agroinfección que utiliza a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

La electroporación consiste en la aplicación de un campo eléctrico mediante el cual se puede inducir un cambio en el potencial de membrana de la célula dando

¹ Comunicación personal.

lugar a la aparición de “microporos” que la hacen permeable a moléculas de gran tamaño (Fromm *et al.*, 1987), incluso en células vegetales provistas de pared celular (Lindsey y Jones, 1990). La aparición de poros o aperturas en la pared y membrana celular se puede provocar también mediante la utilización del láser (Weber *et al.*, 1998) o de ultrasonidos (Joersbo y Brunstedt, 1990). Otra estrategia consiste en la utilización de polietilenglicol (PEG) que es un polímero capaz de aumentar la permeabilidad de la membrana (Krüger-Lebus y Potrykus, 1987).

La técnica de biolística o aceleración de partículas consiste en bombardear células o tejidos con partículas de oro o tungsteno, recubiertas por ADN. Las partículas se aceleran mediante la utilización de un gas inerte, que provoca el impacto sobre el material vegetal y permite que las partículas penetren la pared celular, la membrana celular y membrana nuclear, por lo que una vez en el núcleo el ADN se libera y se da una recombinación para su incorporación dentro del genoma de la célula (Sanford, 1990).

Dentro de las técnicas indirectas, la utilización de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*; Tzfira y Citovsky, 2000) es la técnica más versátil y de amplia utilización por su repetitibilidad, pues se sabe que esta bacteria es capaz de introducir un fragmento de ADN en las células vegetales e insertarlo en el genoma (Chilton *et al.*, 1977).

Los primeros reportes científicos de plantas transgénicas utilizando *Agrobacterium* son del año 1983 con el desarrollo de callos resistentes a antibiótico (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), pero en 1984 se lograron obtener las primeras plantas transgénicas de tabaco resistentes al antibiótico kanamicina y cloranfenicol, fenotípicamente normales, fértiles y con heredabilidad tipo mendeliana (De Block *et al.*, 1984).

1.6 Etapas de infección de *Agrobacterium tumefaciens*

El género *Agrobacterium* pertenece a la familia *Rhizobiaceae*. Se trata de una bacteria del suelo, Gram negativa (Chriqui *et al.*, 1996) móvil, mediante 2 a 3 flagelos y que alberga un megaplásmido de más de 200 kpb llamado “Ri” (inductor

de raíces) o “Ti” (inductor de tumores) en el caso de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens* respectivamente (Zaenen *et al.*, 1974; Costantino *et al.*, 1981).

La respuesta de una planta a *Agrobacterium* ocurre en varias etapas y depende de distintos parámetros relacionados con la propia planta (susceptibilidad del genotipo, estado de desarrollo y tipo de tejido infectado, etc.), factores ambientales como el pH y temperatura y también de la cepa bacteriana usada para la infección (Chriqui *et al.*, 1996). Los principales pasos de la interacción planta/*Agrobacterium* son:

Reconocimiento planta-*Agrobacterium*: Durante el ciclo de vida de las agrobacterias, muchas se localizan en la superficie del tejido vegetal. Tras producirse una lesión en la planta, las células comienzan un proceso de reparación del tejido dañado mediante la producción de lignina. Los precursores de la lignina son compuestos fenólicos que, junto con otras sustancias encontradas en la zona herida como azúcares y aminoácidos, atraen a las agrobacterias por quimiotactismo (Stachel *et al.*, 1985; Bolton *et al.*, 1986; Delay *et al.*, 1992).

Adhesión de *Agrobacterium* a la célula vegetal: Una vez dentro de la herida, *Agrobacterium* se une ligeramente a la superficie de la célula vegetal mediante polisacáridos, y seguidamente la síntesis de celulosa fortalece esta unión y la hace irreversible. Estos procesos están codificados por los *locus attR* y *celABCDE*, respectivamente, localizados en el cromosoma de la bacteria (Matthysse, 1983; Matthysse, 1986; Matthysse *et al.*, 1995). La celulosa formada por las agrobacterias adheridas es pegajosa, por lo que las bacterias libres también quedan atrapadas en las fibrillas de celulosa, lo que hace que se formen agregados bacterianos en la superficie vegetal (Matthysse, 1983). Otros genes, denominados genes de virulencia cromosómica “*chv*” están también involucrados en la adhesión de la bacteria a la célula vegetal, y codifican para factores que permiten reconocer la proximidad de un posible huésped y su infección.

Activación de los genes de virulencia y producción de la hebra-T: Simultáneamente a la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales en el sitio de la herida, está ocurriendo la activación de los genes de virulencia bacterianos, “genes *vir*”, por varias condiciones inductivas comúnmente encontradas en las heridas de la planta. Estas condiciones engloban sustancias fenólicas como la

acetosiringona o la α -hidroxi acetosiringona, pH ácido (5-5.8) y azúcares (Binns y Thomashow, 1988). La percepción de estas condiciones de inducción activa, directa o indirectamente, el producto génico de *virA* que es una proteína sensora localizada en la membrana de *Agrobacterium*. Esta proteína tiene actividad autoquinasa, y luego transfiere el fosfato a la proteína *virG* que resulta así activada. La proteína *virG* tiene una localización citoplasmática y actúa activando la transcripción de todos los genes *vir*. El procesamiento del T-DNA, resultado directo de esta activación, comienza con sendos cortes en los extremos repetidos de los bordes derecho e izquierdo del mismo. La formación de esta cadena sencilla es posible gracias a la actuación del operón *virD*, del cual cabe destacar el papel de dos proteínas *virD1* y *virD2*, que actúan como endonucleasas y cortan en los bordes del T-DNA en presencia de Mg^{2+} . Después, *virD2* se une al extremo 5' del T-DNA y parece guiarlo primero hacia la membrana bacteriana y luego hacia la célula vegetal (Ward y Barnes, 1988; Young y Nester, 1988).

Transferencia del T-DNA a la célula vegetal: El complejo T-DNA/*virD2*, junto a otras proteínas *vir*, atraviesan la membrana plasmática vegetal a través de una estructura de transporte, o canal, formado por las proteínas codificadas por el operón *virB* (Fullner *et al.*, 1996; Lessi y Lanka, 1994). Una vez en el citoplasma de la célula vegetal la proteína *virE2* cubre el T-DNA y lo protege de las endonucleasas. Esta proteína junto con la *virD2* posee secuencias llamadas secuencias de localización nuclear por lo que ambas están implicadas en la transferencia del T-DNA hacia el núcleo. Además la proteína *virE2* confiere al complejo T-DNA/*virD2* la conformación adecuada para que pueda atravesar la envoltura del poro nuclear.

Integración del T-DNA en el cromosoma vegetal: Cuando el T-DNA, llega al núcleo de la célula huésped, la proteína *virE2* le dirige hacia la cromatina y probablemente inicia su integración en el genoma vegetal. En este proceso participan también enzimas vegetales, y la proteína *virD2* (Tinland, 1995). La integración del T-DNA en el ADN del huésped es aleatoria, aunque se ha descrito que ocurre preferentemente en secuencias transcripcionalmente activas (Herman *et al.*, 1990). La recombinación ocurre según el modo llamado “ilegitimo” que, a diferencia de la recombinación homóloga, no depende de una región de extensa similitud de secuencia (Chilton *et al.*, 1977; 1982).

Expresión del T-DNA en la célula vegetal: Como último paso, el T-DNA insertado en el genoma de la célula vegetal se expresa de forma estable y su transmisión a las siguientes generaciones se hace según las leyes Mendelianas (Stouggard *et al.*, 1987; Zambryski *et al.*, 1989). La expresión del T-DNA en la célula vegetal transformada conlleva la expresión de los oncogenes albergados en el mismo y quienes alteran el balance hormonal de dicha célula, lo que resulta en los eventos de crecimiento asociados a estos cambios (Akiyoshi *et al.*, 1983; Binns y Thomashow, 1988). Por otra parte la expresión del T-DNA en la célula vegetal se acompaña con la expresión de genes que codifican para enzimas de biosíntesis de opinas (genes *ops*). Dichas opinas representan la fuente de carbono y nitrógeno que soportan el crecimiento de la bacteria, y que solo pueden ser metabolizados por ella (Tempé *et al.*, 1984).

1.7 Factores que afectan la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*

Existen diferentes factores que intervienen en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* determinando el éxito o fracaso en la transferencia del gen de interés y su posterior integración y expresión. Dentro de los principales factores se encuentra la capacidad de contar con un eficiente protocolo de regeneración *in vitro*, para poder regenerar una planta completa a partir de las pocas células que llegan a ser transformadas genéticamente. Los mayores éxitos en la generación de plantas transgénicas han sido en aquellas especies donde existe un protocolo de regeneración a partir de embriogénesis somática u organogénesis indirecta; mientras que en plantas cuya regeneración es vía organogénesis directa es más complicado como en el caso de *P. vulgaris*.

Los factores varían de acuerdo a la especie vegetal pero se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: edad de la planta, tipo de tejido a transformar, cepa de *Agrobacterium* seleccionada para transformar, tiempo y condiciones de inoculación del tejido con *Agrobacterium*, densidad y período de pre-cultivo de la bacteria y presencia de necrosis en el tejido de la planta causada por *Agrobacterium* (Grevelding *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003).

Con el objetivo de inducir la expresión de los genes *vir* y facilitar la transformación se han utilizado diferentes inductores de la transformación como son los compuestos glucosa, acetosiringona y azacitidina; los resultados en el porcentaje de plantas transformadas varían de acuerdo a la especie vegetal evaluada y a la concentración utilizada (Boase *et al.*, 1998; Chakrabarty *et al.*, 2002). Recientemente se ha descrito que la exposición de líneas celulares de *Nicotiana tabacum*, *A. thaliana* y *Ageratum conyzoides* a sustancias inhibidoras de la síntesis de purinas y pirimidinas como la azaserina y acivicina eleva hasta 180 veces la frecuencia de transformación en comparación con aquellas líneas que no habían sido tratadas con estos compuestos. Los mecanismos moleculares involucrados en esta respuesta son desconocidos. (Roberts *et al.*, 2003).

La transferencia del T-DNA en algunos explantes ha sido fuertemente disminuida por la producción por parte de la planta de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales probablemente activan procesos de muerte celular programada o necrosis tisular, generando una barrera de células muertas alrededor del tejido infectado. Aunque estos compuestos promueven el necrosamiento del tejido, se han introducido diferentes inhibidores de enzimas que participan en este proceso para aumentar los porcentajes de plantas transformadas.

Algunos tratamientos anti-necróticos aplicados durante el proceso de transformación incluyen la adición de agentes reductores, inhibición por calor de enzimas que participan en el proceso oxidativo, reducción del pH y la adición de inhibidores de enzimas. Los compuestos más ampliamente utilizados son: inhibidores de etileno (AgNO_3), inhibidores de oxidasas y peroxidasas (quelantes de cobre y hierro, compuestos tiólicos como L-cisteína, tiosulfato de sodio y glutatión, DTT) (Olhoft y Somers 2001; Olhoft *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002).

Estudios sobre el proceso de tumorigénesis han revelado que el desarrollo del tumor producido por *Agrobacterium* no se obtiene a altas temperaturas debido a un cambio conformacional de la proteína VirA que ocurre a temperaturas cercanas a 32 °C (Jin *et al.*, 1993). Otros estudios mostraron que aunque la inducción óptima de los genes *vir* es a 25 °C la transferencia del T-DNA fue óptima a una temperatura de 19 °C (Fullner *et al.*, 1996). Estos trabajos resaltan la importancia de la temperatura de co-cultivo durante la transformación. La temperatura óptima para el co-cultivo

depende del tipo de planta y explante, y se resalta que es mejor el uso de temperaturas cercanas o inferiores a 25 °C. Además, temperaturas por encima de 25 °C causan un mayor necrosamiento del tejido y una reducción en la tasa de transformación (Salas *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002).

En general, las condiciones de luz durante el co-cultivo varían considerablemente si se compararan diferentes protocolos de transformación de plantas y este factor no ha sido evaluado ampliamente. Zambre *et al.* (2003), utilizaron callos de *P. acutifolius* y segmentos de raíz de *A. thaliana* en co-cultivo con *Agrobacterium* con diferentes condiciones de luz como oscuridad continua, fotoperíodo 16h luz/ 8h oscuridad y luz continua. En este estudio se concluyó que la actividad del gen GUS (gen que codifica para la enzima β -glucoronidasa) esta altamente correlacionada con el período de luz, siendo mayor la actividad cuando se utilizó luz continua para los dos tipos de explantes.

Los factores que contribuyen a una elevada eficiencia de transformación para *P. acutifolius* incluyen según Zambre *et al.*, (2005): (1) baja concentración inicial de la bacteria acompañada de un largo periodo de co-cultivación con el explante (OD= 0.8 para ejes embrionarios y dos días; OD= 0.05 para callos y siete días); (2) una selección inicial de los callos sobre un medio que contienen bajos niveles del agente de selección; (3) omisión del agente de selección del medio durante la diferenciación de los callos a brotes y (4) la conversión eficiente de brotes transgénicos en plantas fértiles (los brotes transgénicos regenerados *in vitro* pueden ser injertados como se ha reportado previamente (Zambre *et al.*, 2001).

Se ha encontrado que las condiciones óptimas de co-cultivación con *Agrobacterium* son 22 °C bajo un fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad), en un medio ácido (pH 5.5) y en presencia de 200 μ M de acetosyringona (De Clercq *et al.*, 2002), y los análisis de la actividad de GUS se ha realizado 4 días después de la co-cultivación (Dillen *et al.*, 1997).

Becker *et al.* (1994) incrementó la proliferación de explantes de nudo cotiledonar de *P. vulgaris* al co-cultivar con *A. tumefaciens* en presencia de 100 μ M de AS, por lo que se sabe que *P. vulgaris* es susceptible a la infección con *A. tumefaciens* (McClean *et al.*, 1991; Franklin *et al.*, 1993)

1.8 Objetivo de la investigación

El principal objetivo de este trabajo fue obtener plantas transgénicas de *P. vulgaris* que sobre expresen el gen quimérico *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* para biosíntesis de trehalosa, para evaluar su comportamiento ante estrés abiótico, principalmente sequía.

Para lograr lo anterior fue necesario: (1) evaluar un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* de *P. vulgaris* con la finalidad de obtener alta regeneración por organogénesis directa para su posterior transformación genética; (2) hacer pruebas de expresión transitoria con el gen GUS, mediante agro-infección, procurando la maximización de la expresión, evaluando diferentes cepas y condiciones de infección; y 3) obtener una transformación estable con la construcción *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*.

Lo anterior debido a que: (1) los protocolos de regeneración reportados pueden o no presentar los mismos valores de regeneración debido al material vegetal a utilizar, por lo que se tendrán que hacer algunas modificaciones; (2) la expresión del gen GUS puede darse sólo en una pequeña porción del explante o en todo el explante, ya que la inserción es azarosa; (3) para conseguir una transformación estable es necesario evaluar diversos tipos de cepas y condiciones, con la finalidad de lograr la inserción del gen y que el explante transformado se pueda regenerar.

Literatura citada

- Akiyoshi DE, Morris RO, Hinz R, Mischke PS, Kosuge T, Garfinkel DJ, Gordon MP, Nester EW. 1983. Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 407–411.
- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor Appl Genet* 93:142–151.
- Aragão FJL, Vianna GR, Albino MMC, Rech EL. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Sci* 42:1298–1302.

- Aragão Francisco J. L. 2010. Entrevista personal. Centro de Biotecnología, Universidad Autónoma de Morelos, Estado de Morelos, México, Febrero de 2010.
- Beaver JS, Porch TG, Zapata M. 2008. Registration of 'Verano' white bean. J Plant Registrations 2(3):187–189.
- Beaver JS., Osorno JM. 2009. Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. Euphytica 168: 145–175.
- Becker J, Vogel T, Iqbal J, Nagl W. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris*. Adaptation of some conditions. Ann Rep Bean Improv Coop 37: 127-128.
- Beebe S, Rao IM, Cajiao C, Grajales M. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. Crop Sci 48:582–592.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304: 184-187.
- Binns AN, Thomashow MF. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Ann. Rev. Microb. 42: 575-606.
- Boase, M. R.; Butler, R. C. and Borst, N.K. 1998. *Chrysanthemum* cultivar *Agrobacterium* interactions reveled by GUS expression time course experiments. Scientia Horticulturae. Vol. 77, p. 89-107.
- Bolton GW, Nester EW, Gordon MP. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. Science 232: 983–985.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira E, Érica A, Mendes EA, Aragão FJL. 2007. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Mol Plant Microbe Interact 20(6):717–726.
- Bos I, Caligari P. 1995. Selection methods in plant breeding Chapman and Hall, New York.
- Brick MA, Ogg JB, Singh SP, Schwartz HF, Johnson JJ, Pastor-Corrales MA. 2008. Registration of drought-tolerant, rust-resistant, high-yielding pinto bean germplasm line CO46348. J Plant Registrations 2:120–124.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legume. Plant Soil 252:55–128.

- Chakrabarty, R. *et al.* 2002. *Agrobacterium* mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *Journal of Bioscience*. Vol. 27, No.5, p. 495-502.
- Charrier AM, Hamon JS, Nicolas D. 2001. Tropical plant breeding. p. 1–569. Science Publishers, Enfield, NH.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, *et al.* 1977. Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: The Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis, *Cell*, 11: 263–271.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263–271
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature* 295:432-434
- Chriqui D, Guivarch A, Dewitte W, Prinsen Els, Van Onkelen H. 1996. *Rol* genes and root initiation and development. *Plant and Soil* 187: 47-55.
- Costantino P, Mauro ML, Micheli G, Risuleo G, Hooykaas PJJ, Schilperoort R. 1981. Fingerprinting and sequence homology of plasmids from different virulent strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 5: 170-182
- Coyne DR, Steadman JR, Godoy-Lutz G, Gilbertson R, Arnaud-Santana E, Beaver JS, Myers JR. 2003. Contributions of the bean/cowpea CRSP to management of bean diseases. *Field Crops Res* 82:155–168.
- De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO Journal* 3(8): 1681-1689.
- De Clercq J, Zambre M, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G. 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Rep* 21:333–340
- Delay D, Cizeau J, Delmotte F. 1992. Synthesis of aryl glycosides as *vir* genes inducers of *Agrobacterium tumefaciens*. *Carbohydr. Res.* 225: 179.
- Dillen W, De Clercq J, Kapila J, Zambre M, Van Montagu M, Angenon G. 1997. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *Plant J* 12: 1459-1463
- Duvick D, Cassman K. 1999. Post-green revolution trends in yield potential of temperate maize in the north-central United States. *Crop Sci.* 39:1622–1630.

- Duvick D. 1992. Genetic contributions to advances in yield of U.S. maize. *Maydica* 37:69–79.
- Faria JC, Albino MMC, Dias BAB, Cancado LJ, da Cunha NB, Silva LM, Vianna GR, Aragão FJL. 2006. Partial resistance to Bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated rep gene. *Plant Sci* 171:565–571.
- Fehr WR. 1984. Genetic contributions to yield gains of five major crop plants. CSSA, Madison, WI.
- Frahm MA, Rosas JC, Mayek-Pérez N, López-Salinas E, Acosta-Gallegos JA, Kelly JD. 2004. Breeding beans for resistance to terminal drought in the lowland tropics. *Euphytica* 136:223–232.
- Franklin CI, Trieu TN, Cassidy BG, Dixon RA, Nelson RS. 1993. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Rep* 12:74–79
- Freytag GF, Debouck DG. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. Botanical Research Inst. of Texas, Forth Worth.
- Fromm M, Callis J, Taylor LP, Walbot V. 1987. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. *Methods in Enzimology*, 153: 351-366.
- Frossard E, Bucher M, Mächler F, Mozafar A, Hurrell R. 2000. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn, and Ca in plants for human nutrition. *J Sci Food Agric* 80:861–879.
- Fullner KJ, Lara JC, Nester EW. 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273: 1107–1109.
- Fullner KJ, Lara JC, Nester EW. 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science*. Vol. 173, p. 1107-1109.
- Gepts P, Bliss FA. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ. Bot.* 42:86–104.
- Gepts, P. 2002. A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. *Crop science*, vol. 42: 1780–1790.
- Gepts, P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Econ. Bot.* 44:28–38.
- Greveling, C. *et al.* 1993. Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Molecular Biology*. 23(4): 847-860.

- Guzmán-Maldonado SH, Martínez O, Acosta-Gallegos JA, Guevara-Lara F, Paredes-López O. 2003. Putative quantitative trait loci for physical and chemical components of common bean. *Crop Sci* 43: 1029–1035.
- Hancock JF. 2004. Plant evolution and the origin of crop species. 2nd ed. CAB Int., Wallingford, UK.
- Harlan JR, de Wet MJM. 1971. Towards a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20:509–517.
- Herman L, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. 1990 Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration. *Mol. Gen. Genet.* 29: 248-256.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 3003:209-213.
- Hill J, Becker H, Tigerstedt P. 1998. Quantitative and ecological aspects of plant breeding Chapman and Hall, London.
- Jin, S. G. *et al.* 1993. The regulatory *virA* protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology* 175: 6830-6835.
- Joersbo M, Brunstedt J. 1990. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Reports*, 9: 207-210.
- Kaplan L, Lynch TF. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Columbian agriculture. *Econ. Bot.* 53:261–272.
- Kelly JD. 2001. Remaking of plant architecture for efficient production. *Adv Agron* 71:110–143
- Ko, T. S. *et al.* 2003. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics* 107(3): 439-447.
- Krüger-Lebus S., Potrykus I. 1987. A simple and efficient method for direct gene transfer to *Petunia hybrida* without electroporation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5: 289-294.
- Lessi M, Lanka E. 1994. Common mechanisms in bacterial conjugation and Timediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77: 321 324.
- Lindsey K., Jones M.G.K. 1990. Electroporation of cells. *Physiologia Plantarum*, 79: 168-172.

- Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya T. 2005. The novel use of combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) with lea gene. *Mol Breeding* 16:189–197.
- Lynch JP. 2007. Roots of the second green revolution. *Aust J Bot* 55:493–512.
- Matthysse AG, Thomas DL, White AR. 1995. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 177(4): 1076-1081.
- Matthysse AG. 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.* 154(2):906–915.
- Matthysse AG. 1986. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Crit. Rev. Microbiol.* 13: 281 307.
- McClellan P, Chee P, Held B, Simental J, Drong RF, Slightom JL (1991) Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. *Plant Cell Tissue Org Cult* 24:131–138
- Montes-Hernandez S, Eguiarte LE. 2002. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of Cucurbita (Cucurbitaceae) in western Mexico. *Am. J. Bot.* 89:1156–1163.
- Muñoz-Perea CG, Terán H, Allen RG, Wright JL, Westermann DT, Singh SP. 2006. Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. *Crop Sci* 46:2111–2120.
- Murai N. 1983. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222: 476-482.
- Myers JR, Baggett JR. 1999. Improvement of snap beans. In: Singh SP (ed) Common bean improvement for the 21st century. Kluwer, Dordrecht, pp 289–329.
- Olhoft PM, Somers DA. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports* 20: 706-711.
- Olhoft PM; Lin K; Galbraith J; Nielsen NC and Somers DA. 2001. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.* 20: 731-737.
- Roberts, R. L. *et al.* 2003. Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefaciens* transformation of yeast and plants. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 100(11): 6634-6639.
- Rosas JC, Castro A, Flores E. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro mesoamericano para Centroamérica y el Caribe. *Agron Mesoam* 11:37–46

- Russell DR, Wallace K, Bathe J, Martinell B, McCabe D. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep* 12:165–169.
- Salas, M. G. et al. 2001. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Reports* 20: 701-705.
- Sanford J.C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79: 206-209.
- Santalla M, Amurrio JM, de Ron AM. 2001. Interrelationships between cropping systems for pod and seed quality components and breeding implications in common bean. *Euphytica* 121:45–51.
- Schwartz HF, Steadman JR, Hall R, Forster RL. 2005. Compendium of bean diseases, 2nd edn. APS press. St. Paul
- Singh SP. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Sci* 41:1659–1675.
- Siacon, Sistema de Información Agroalimentaria y de Consulta. 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Sagarpa. <http://www.siap.gob.mx> consulta en Julio de 2010.
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski PC. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624–629.
- Stougaard J, Abildsten D, Marcher K A. 1987. The *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants. *Mol. Gen. Genet.* 207: 251-255.
- Tempé J, Petit A, Farrand SK. 1984. In: *Plant gene research*. D.P.S. Vernay Th. Holm (eds.). Springer-Verlag/Wien, pp. 271.
- Tinland B, Schoumacher F, Gloeckler V, Bravo-Angel AM, Hohn B. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.* 14: 3585-3595.
- Tzfira T, Citovsky V. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* 1(4): 202-212.
- Ward ER, Barnes WM. 1988. *VirD2* protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end to T-strand DNA. *Science* 242: 927-930.
- Weber G., Monajembashi S., Greulich K.O. y Wolfrum J. 1998. Genetic manipulation of plant cells and organelles with a laser microbeam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12: 219-222.

- Wilkes, G. 2004. Corn, strange and marvelous: But is a definitive origin known? p. 3–63, *In*: C. Smith (ed.) Corn: Origin, history, technology, and production. John Wiley & Sons, New York.
- Wortman CS, Kirkby RA, Eledu CA, Allen DJ. 1998. Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Africa. CIAT publication no. 297. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 131 pp.
- Ye X, Al-Babili S, Kloeti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. 2000. Engineering provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303–305.
- Young C, Nester EW. 1988. Association of the *virD2* protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 170: 3367-3374.
- Zaenen I, Van Lerebeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium*-strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127.
- Zambre MA, Geerts P, Maquet A, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G. 2001. Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year bean). *Ann Bot (Lond)* 88:371–377.
- Zambre MA, Goossens A, Cardona C, Van Montagu M, Terryn N, 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 weevil. *Theor Appl Genet* 110:914–924.
- Zambre MA. *et al.* 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* 216: 580–586.
- Zambryski P, Tempe J, Schell J. 1989. Transfer y function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti y Ri plasmids in plants. *Cell* 56: 193-201.

Pagina en blanco

CAPITULO 2. EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA REGENERACIÓN *in vitro* DEL FRIJOL

Resumen

Se optimizó un protocolo de regeneración para *Phaseolus vulgaris* variedad Flor de Mayo Anita, y se determinó que es más factible trabajar con ejes embrionarios obtenidos de plántulas germinadas en un medio con $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BA y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de tiamina por 5 días. Los niveles de oxidación se redujeron y se mantuvo el porcentaje de formación de callo en el nudo cotiledonar, con 10 mg/l de BA y 40 mg/l de sulfato de adenina en el medio de inducción de callo. Con estas condiciones se logró que a los 45 días 73.6 % de los ejes formaran brotes, con un promedio de tres por eje embrionario. Las plantas germinadas en oscuridad fueron más sensibles a tratamientos de ultrasonido (91.67 % de mortalidad), mientras que las germinadas en luz solo presentaron problemas de oxidación. Los tratamientos prolongados (10 minutos) redujeron la capacidad de regeneración *in vitro*, mientras que tiempos cortos (90 segundos) incrementaron la capacidad de formación de callo en el nudo cotiledonar y los brotes fueron de mayor calidad. Cinco minutos de ultrasonido afectaron la capacidad de formación de callo, generando la brotación de yemas adventicias. Estos resultados fueron satisfactorios para incursionar en el proceso de transformación genética.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, ejes embrionarios, sonicación, brotes.

2.1 Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) ha sido una especie muy recalcitrante al cultivo *in vitro*. Se han reportado diversos protocolos para la regeneración de *Phaseolus* spp., los cuales han mostrado bajas tasas de regeneración o bien, presencia de regeneración pero con pocos brotes por explante, utilizando principalmente ejes embrionarios y epicotilo.

En 1989 McClean y Grafton, mostraron que $1.12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BA es suficiente para su regeneración, pero con baja eficiencia, por ello se ha utilizado el TDZ en el cultivo *in vitro* de *P. vulgaris*, en donde la mejor regeneración de brotes y número de brotes por explante fue cuando los explantes se obtuvieron de semillas germinadas en oscuridad, y los análisis histológicos indican que los meristemos adventicios se formaron 6 a 8 días después del cultivo del explante (Mohamed *et al.*, 1992).

Se sabe que la utilización de BA con otras citocininas y auxinas favorece la formación de callo en explantes de tallo de plántulas de frijol de 5-6 días después de germinación (Sushama *et al.*, 2004).

Se sabe que los factores genéticos son importantes en la respuesta de cultivo de tejidos *in vitro* de frijol (Santalla *et al.*, 1998), aunque Delgado-Sánchez *et al.* (2006), utilizaron ejes embrionarios extraídos de semillas maduras de dos cultivares comerciales de frijol, cultivados en medio MS y la mayor formación de callo se dio en 10 mg·L⁻¹ de BAP y 40 mg·L⁻¹ de hemisulfato de adenina, para las dos variedades. Los callos se multiplicaron dividiéndolos en segmentos de 5mm y transfiriéndolos a un medio de inducción fresco cada dos semanas (cuatro subcultivos) con una eficiencia de transferencia del 60%, por lo que una misma concentración de reguladores puede promover el mismo efecto en diferentes cultivares aun con una gran distribución geográfica y genética (Delgado-Sanchez *et al.*, 2006; Gatica-Arias *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010).

Se pretende evaluar el efecto de la tiamina sobre el crecimiento *in vitro* de plántulas de frijol, pues la mayoría de las semillas contienen elevadas cantidades de tiamina (Friedrich, 1987) principalmente en forma inactiva metabólicamente (no fosforilada; Friedrich, 1987) en TBPs (proteínas de unión a tiamina) (Gołda *et al.*, 2004), pero al germinar puede ser convertida rápidamente en TPP (tiamina pirofosfato) (Howle y Fites, 1991; Molin *et al.*, 1980) por acción de una enzima de activación de tiamina y la enzima TPK (tiamina pirofosfoquinasa) (Howle y Fites, 1991; Molin *et al.*, 1980), puesto que se requiere de la movilización de las reservas de proteínas y carbohidratos (Shewry y Stobart, 1993), y el crecimiento de la plántula consume rápidamente energía que es provista por TPP, y en el caso de las leguminosas el contenido de tiamina disminuye en un 50 % a partir del sexto día de germinación (10.2 y 14.15 nmol·g⁻¹ de semilla seca de haba y chícharo, respectivamente, germinadas por 6 días en oscuridad), por lo que es necesario suplir las deficiencias de tiamina para favorecer el óptimo crecimiento de las plántulas *in vitro* de frijol.

El protocolo de Delgado-Sanchez *et al.*, 2006, ha sido recientemente reportado con algunas pequeñas modificaciones (Gatica-Arias *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) pues al parecer ha presentado la mejor combinación de reguladores del crecimiento para la regeneración *in vitro* de frijol y se sabe que el ultrasonido puede incrementar la capacidad de regeneración *in vitro* (Gaba *et al.*, 2006;

Ananthakrishnan *et al.*, 2007. Se ha reportado que el tratamiento de ultrasonido (2 min) puede estimular la regeneración de brotes múltiples en calabaza (Ananthakrishnan *et al.*, 2007) y no causa grandes daños en la superficie del área de regeneración de los explantes, en comparación con las observaciones de microscopia de barrido de Trick y Finer (1997, 1998). Para SAAT (transformación mediada por *Agrobacterium* asistida por sonicación), bajas dosis estimula la expresión transitoria de genes mediado por *Agrobacterium* por la generación de micro heridas (Trick y Finer 1997, 1998; Zaragoza *et al.*, 2004; Gaba *et al.*, 2006). El incremento de la dosis de ultrasonido causa un daño escalonado puesto que las micro heridas se producen más grandes (Trick y Finer 1997; Santarem *et al.*, 1998), al igual que los tratamientos prolongados pueden ser letales para los explantes (Meurer *et al.*, 1998; Santarem *et al.*, 1998), y el SAAT siempre reduce la proliferación de brotes en algunos cultivares de soya (Meurer *et al.*, 1998). El tratamiento de ultrasonido también puede reducir la regeneración de explantes de calabaza regenerables (Ananthakrishnan *et al.*, 2007).

Debido a que la transformación por SAAT es comúnmente el mas importante uso del ultrasonido en el cultivo de tejidos vegetales, y uno de los principales métodos para obtener plantas transgénicas, es necesario evaluar el efecto de diferentes dosis de ultrasonido sobre la capacidad de regeneración *in vitro* de frijol, por ello en este trabajo se pretende evaluar un protocolo de regeneración y el efecto de diferentes tiempos de exposición a ultrasonido sobre la regeneración *in vitro* de frijol.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Material vegetal

Semillas de frijol Flor de Mayo variedad “Anita” se desinfestaron utilizando etanol a 70 % por 5 min, Clorox® al 20 % v/v por 20 min, cuatro lavados con agua destilada estéril, y se dejaron embebiendo por 20 horas. Posteriormente se les retiró la testa y se colocaron 20 semillas por caja Megenta® conteniendo 50 ml de medio para germinación (Cuadro 1). Se mantuvieron en oscuridad o luz a 25-28°C, por un periodo de 5-6 días.

2.2.2 Obtención de explantes

Ejes embrionarios de 5-6 días (5 mm aprox., de longitud de nudo cotiledonar-apice) de plántulas germinadas en oscuridad o luz se utilizaron para realizar los ensayos de cultivo *in vitro* utilizando el medio de inducción de callo reportado por Delgado-Sánchez *et al.* (2006) (Cuadro 1).

2.2.3 Tiamina para la calidad de plántula

Debido a que se utilizó una metodología diferente a la reportada (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006) pues los ejes embrionarios se colocaron en el medio de inducción de callo después de haber germinado la semilla por 5-6 días en oscuridad o luz y no inmediatamente a la hidratación total de la semilla, fue necesario obtener plántulas de buena calidad, debido a que de esto podría depender la calidad del eje embrionario, por lo cual se evaluaron tres niveles de tiamina (0, 1 y 10 mg·l⁻¹).

2.2.4 Ultrasonido para estimular la brotación

Se ocuparon matraces estériles de 125 ml y se colocaron aproximadamente 50 ejes embrionarios conteniendo 75 ml de medio de sonicación (Cuadro 1), se cubrieron con papel aluminio estéril, para darles el tratamiento de ultrasonido en un Sonicador marca Ultrasonics® con un voltaje de entrada de 120 V AC, 50/60 Hz, y una salida de 35 W a 45 KHz., procurando que el nivel de la solución en el matraz coincidiera con el nivel del agua del sonicador. El matraz se colocó al centro del sonicador, ocasionalmente se retiró del sonicador y se agitó ligeramente.

Después del tratamiento de ultrasonido (sonicación) los ejes se colocaron sobre papel secante estéril para retirar los excesos de solución, y se colocaron en medio de inducción de callo (Cuadro 1).

2.2.5 Regeneración: inducción de callo, brotación y elongación

La regeneración se dio colocando los explantes con sus respectivos medios en el cuarto de incubación, a una temperatura de 25 ±1 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, con una luminosidad de 30-40 µmol m⁻²s⁻¹ dada por lámparas de luz fluorescente blanco frío.

La inducción de callo se dio colocando los ejes embrionarios en el medio MIC, y la aparición de estos se dio desde los 15-20 días posteriores a su siembra, se subcultivaron cada 15 días a medio fresco en cajas petri, por 2-3 veces.

Después de la formación de callo, se colocaron el medio de inducción de brotes (Cuadro 1), por 3 semanas aproximadamente, para posteriormente pasarlos al medio de elongación por otras 3 semanas, este ultimo en cajas Magenta®.

2.2.6 Enraizamiento

Cuando los brotes tenían una longitud de dos centímetros o más se colocaron en el medio de enraizamiento líquido (Cuadro 1) en donde duraron 20 minutos, posteriormente se retiró el exceso de medio, y se colocaron en cajas Megenta® conteniendo 50 ml de medio de enraizamiento sólido por un periodo de 15-20 días para generar un buen sistema radicular.

2.2.7 Análisis estadístico

Se realizó un experimento con un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, colocando 20 ejes por caja petri. Cada caja se considero una repetición. Se realizaron análisis de comparación de dos proporciones binomiales, y se registro la presencia o ausencia de las variables evaluadas, al ser una respuesta del tipo cualitativa (Ostle, 1994).

Cuadro 1. Composición de los medios utilizados para la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris*

Constituyentes	MG	MDS	MIC	MB	MEB	MRL	MRS
Sales MS y vitaminas	+	+	+	+	+	+	+
Tiamina (mg·l ⁻¹)	1	-	1	1	1	1	1
Myo-inositol (mg·l ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100
Sacarosa (g·l ⁻¹)	30	30	30	30	30	30	30
Agar (g·l ⁻¹)	6.8	-	6.8	6.8	6.8	-	6.8
BAP (mg·l ⁻¹)	1	10	10	1	-	-	-
SA (mg·l ⁻¹)	-	40	40	-	-	-	-
AIB (mg·l ⁻¹)	-	-	-	-	0.08	1.0	-
AG3 (mg·l ⁻¹)	-	-	-	-	1.4	-	-
AgNO3 (mg·l ⁻¹)	-	-	-	15.3	15.3	-	15.3
Acido cítrico (mg·l ⁻¹)	-	100	100	100	100	100	100
Acido ascórbico (mg·l ⁻¹)	-	150	150	150	150	150	150
MEPM (mg·l ⁻¹)	-	25	-	25	25	25	25
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

MG= medio de germinación; MDS= medio de sonicación; MIC= medio de inducción y mantenimiento de callo; MB= medio de brotación; ME= medio de elongación de brotes; MRL= medio de enraizamiento líquido; MRS= medio de enraizamiento sólido; BAP= bencil amino purina; SA= sulfato de adenina; AIB= ácido indol butírico; AG3= ácido giberélico; MEPM= antibiótico meropenem

2.3 Resultados

2.3.1 Efecto de la tiamina

Se obtuvo 98-100 % de germinación de las semillas a las que previamente se les retiró la testa, mientras que con la testa la germinación bajó hasta 60 % (datos no presentados), puesto que la presencia de la testa puede provocar dormancia o relacionarse con compuestos fenólicos, los cuales manchan el medio de cultivo durante la germinación (Shamsudeen *et al.*, 2006).

La vitamina B1 (tiamina) es un nutriente esencial para humanos, y su deficiencia causa beriberi, enfermedad que se manifiesta por alteraciones en el sistema nervioso central y circulatorio. Esta vitamina parece que es también de gran importancia en el crecimiento *in vitro* del frijol, ya que se encontró que la concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina favoreció el crecimiento de las plántulas de frijol *in vitro*, además a la concentración de 0 y $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se presentó contaminación por bacterias de las raíces y daños que provocaron oxidación en los cotiledones, además de un vigor menos marcado en estas plantas (Figura 1).

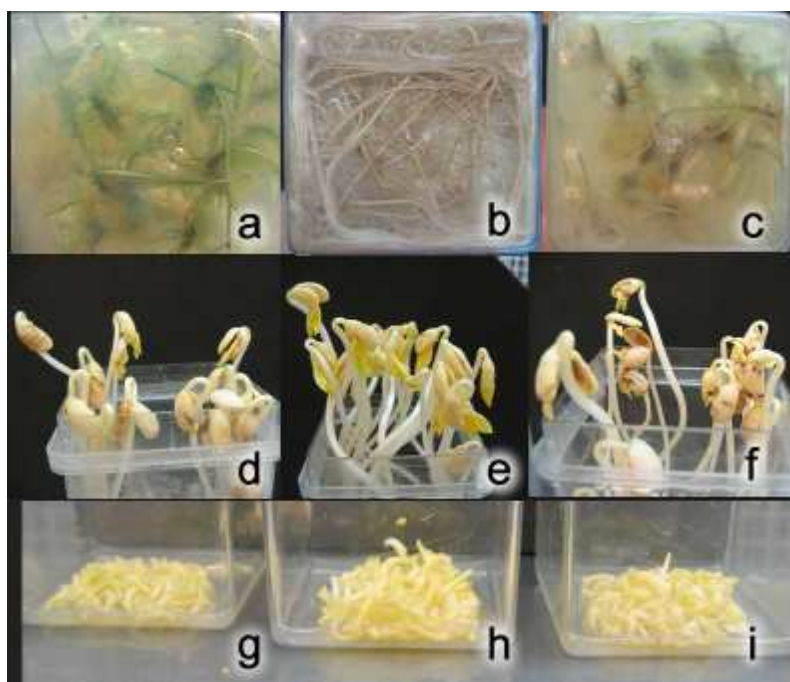


Figura 1. Efecto de la concentración de tiamina sobre la calidad de plántulas de frijol, seis días después de la germinación en oscuridad: $0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (a, d, g); $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (b, e, h); $10 \text{ mg/L mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (c, f, i). Raíces (a, b, c); cotiledones (d, e, f); ejes embrionario (g, h, i).

Aun no se tienen datos si la tiamina puede actuar a diferentes concentraciones teniendo un efecto similar al de un regulador del crecimiento vegetal, pero en el caso del frijol una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina (Figura 1c), redujo el vigor y favoreció el desarrollo de bacterias en la raíz, en comparación de plantas que crecieron a $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 1b). La contaminación a $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina pudo ser por la concentración de tiamina, pues su presencia permite el crecimiento de colonias bacterianas (Acar *et al.*, 1978) e interacción con plantas (Mironov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002).

2.3.2 Cultivo *in vitro*

Se partió en un principio del protocolo reportado por Delgado-Sanchez *et al.* (2006), pero se vio que la forma de extracción de los ejes embionarios era en cierto grado complicada y lenta, además de que manipular explantes tan pequeños generaba daños en los mismos, los cuales causaban oxidación pasados algunos días en el medio de inducción de callo (Cuadro 2); el mismo grupo propuso que era conveniente mejorar este protocolo (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Por ello se optó por extraer los ejes embionarios a los cinco días después de la germinación (Sushama *et al.*, 2004). Los ejes embrionarios de cinco días presentaron un menor porcentaje de oxidación tanto en el epicotilo como en el hipocotilo, y el porcentaje de formación de callo en el nudo cotiledonar fue similar para ambas fechas (Cuadro 2), y esto es muy importante porque se sabe que es la principal zona de regeneración (McClean y Grafton, 1989).

Cuadro 2. Efecto de los días de obtención de eje embrionario sobre la respuesta morfo genética *in vitro* a los 15 días.

Ejes embrionarios	Oxidación (%)		Formación de Callo (%)		Brotes (%)	
	Epicotilo	Hipocotilo	Ápice	NC	Ápice	NC
0 días	100 ^z a	70 a	75 a	95 a	65 a	92 a
5 días	30 b	10 b	45 b	93 a	35 b	90 a

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. NC= nudo cotiledonar

Utilizando ejes embionarios extraídos de plantulas geminadas durante cinco días en oscuridad se evaluó la regeneración *in vitro* previamente reportada; para ello

a los explantes se les retiraron los primordios foliares y se colaron en cajas petri conteniendo 30 ml de medio CIM, observando una buena presencia de callo organogenetico en la zona cotiledonar principalmente a los 20 días (Figura 2a). La formación de callo se dio hasta los 15-20 días después de la siembra de los ejes, y solo 26.4 % de los ejes formaron callo y 90-100 % de estos callos se formaron en el nudo cotiledonar (Figura 2a). El 73.6 % restante formó brotación de yemas axilares, y se pudieron obtener aproximadamente tres brotes por eje a los 45 días, uno en la zona del ápice y dos en la zona del nudo cotiledonar, lo que significa una simple brotación de las yemas presentes en dichas zonas (Figura 2c).

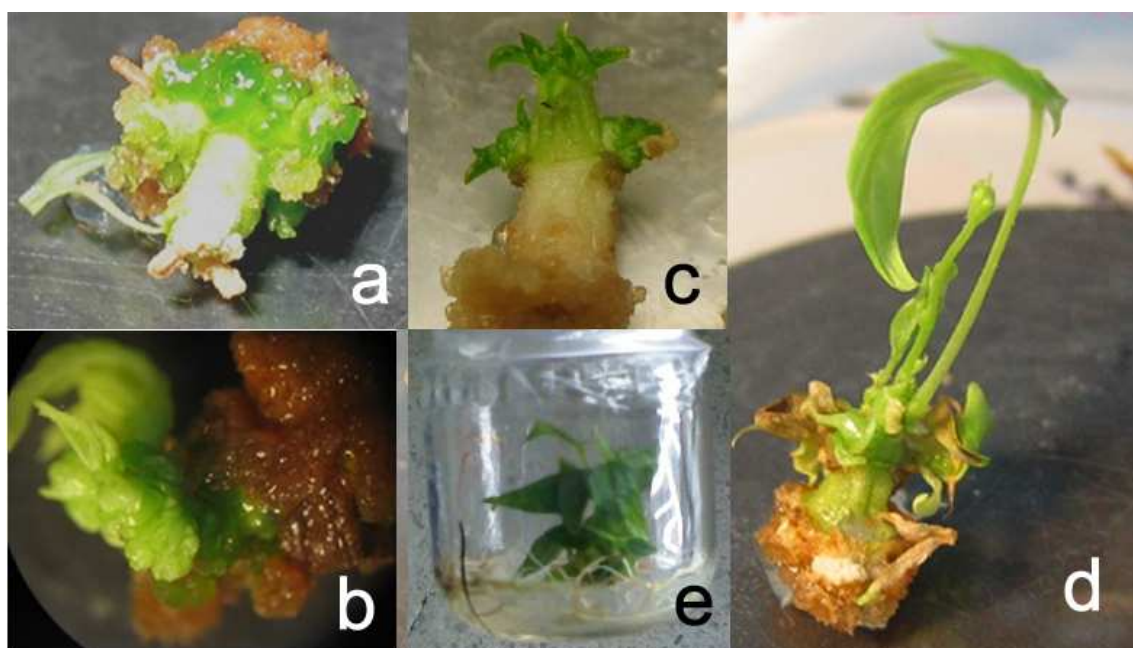


Figura 2. Regeneración *in vitro* de frijol variedad Flor de Mayo Anita. a) formación de callo en la zona del nudo cotiledonar; b) diferenciación de hojas a los 30 días en MIC; c) crecimiento de brotes a los 40 días; d) elongación y desarrollo de brotes a los 60 días en ME, brote de 2-3 cm; e) enraizamiento de brotes, 15 días en medio MRS.

2.3.3 Efecto del ultrasonido sobre la mortalidad de ejes embrionarios

Se evaluó el efecto del ultrasonido en la sobrevivencia de ejes embrionarios obtenidos de plantas germinadas en luz y en oscuridad y mantenidos en el medio MIC en condiciones de luz, y se encontró que a mayor duración del ultrasonido se genera un mayor daño de los ejes obtenidos de plántulas germinadas en oscuridad con una mortalidad de hasta el 91.67 % mismo que se muestra como ejes cloróticos, mientras que los ejes de plantas germinadas en luz no presentaron daños visibles a

los cuatro días después del tratamiento de ultrasonido (Cuadro 3), pero para los de oscuridad genera su muerte (Figura 3). Al igual que ya se había reportado, se recomienda utilizar 5 minutos de ultrasonido sobre ejes embrionarios de plántulas germinadas en oscuridad para aplicar la técnica de SAAT (Transformación por *Agrobacterium* Asistida por Sonicación, por sus siglas en ingles), pues se pueden generar un mayor número de micro lesiones que pueden facilitar una mayor entrada y acción de *A. tumefaciens* (Trick y Finer, 1997).

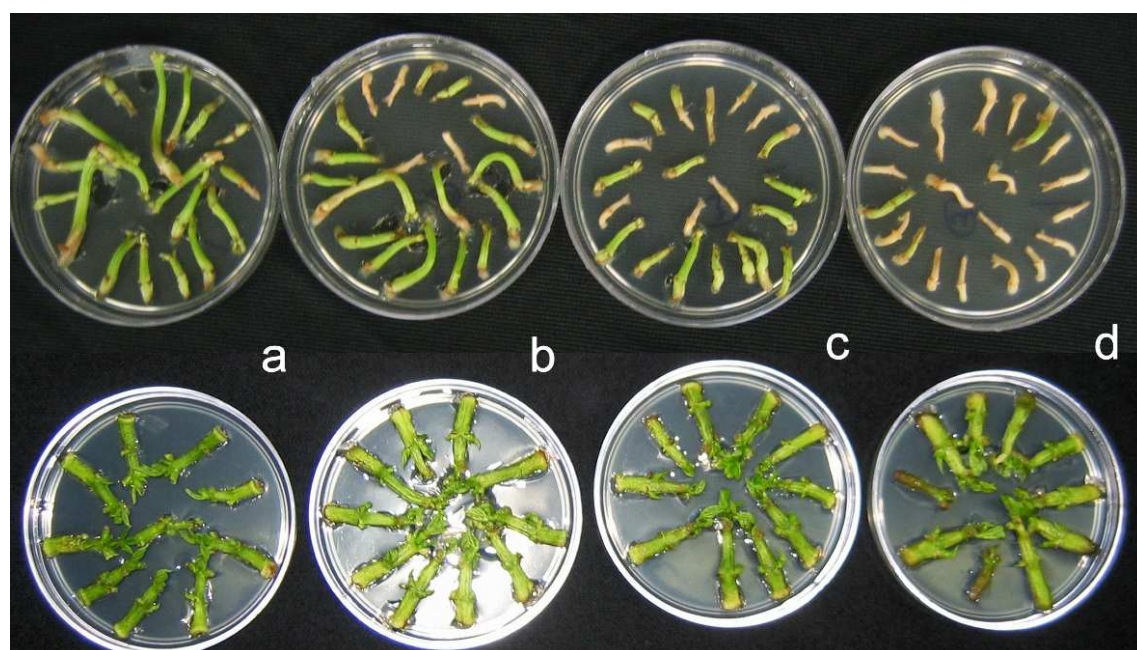


Figura 3. Efecto del ultrasonido sobre la sobrevivencia de ejes embrionarios de frijol a los cuatro días después del tratamiento. Control (a), 3 min (b), 5 min (c), y 10 min de ultrasonido (d). Ejcs obtenidos de plantas crecidas en oscuridad (superior) y en luz (inferior), y colocados a ultrasonido.

Cuadro 3. Efecto del ultrasonido sobre la sobrevivencia de ejes embrionarios de frijol germinados en oscuridad o en luz, 4 días después de la sonicación.

Duración (min)	Ejes oxidados (%)		Ejes cloróticos (%)	
	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz
0	70.83 ^z a	0 d	12.5 c	0 d
3	52.17 ab	0 d	45.65 b	0 d
5	61.22 ab	0 d	38.78 bc	0 d
10	10.42 c	20 c	91.67 a	0 d

^ZValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. Algunos ejes presentaron tanto oxidación como blanqueamiento, y valor es el porcentaje promedio por eje.

El blanqueamiento o presencia de ejes parcial o totalmente cloróticos (Figura 4), de los tejidos puede deberse a un efecto intenso del ultrasonido, que provoca la extracción de los pigmentos presentes en el eje embrionario, puesto que se ha utilizado el ultrasonido en la extracción de pigmento de otras especies vegetales, o afecta la viabilidad celular, aunque esta depende principalmente de la densidad de la energía acústica, el tiempo de exposición, y las propiedades mecánicas de las células determinadas por edad, y se sabe que los patrones de amplitud espacial de las ondas no son los mismos en todo el volumen, por lo que una mala distribución de las células puede provocar que algunas sufran mas daño por una mayor exposición a las ondas o a una mayor amplitud (Böhm *et al.*, 2000).



Figura 4. Diferentes respuestas *in vitro* por efecto de cinco minutos de sonicación, 15 días después de la sonicación. Ejes embrionarios de frijol presentando diferentes niveles de callo en el nudo cotiledonar y blanqueamiento (a), el callo esta marcado por una circunferencia ; ejes embrionarios con diferentes niveles de brotación (b).

2.3.4 Efecto del ultrasonido sobre la regeneración

En frijol una especie que se ha dicho es recalcitrante al cultivo *in vitro*, y la aplicación de ultrasonido (sonicación) puede favorecer la regeneración si se utilizan

tiempos de exposición inferiores a tres minutos, aunque tratamientos de cinco minutos de sonicación pueden favorecer una elevada tasa de regeneración (Figura 6g), pero es necesario considerar el porcentaje de mortalidad (Cuadro 3).

Para el caso de frijol, la aplicación de ultrasonido afectó la forma de regeneración (Figura 4, 5 y 6), pues ejes embrionarios después de 24 días en medio de inducción de callo no formaron callo cuando se les aplicó ultrasonido por cinco minutos de duración (Figura 6f) con respecto a ejes a los que no se les aplicó el ultrasonido (Figura 6c), este mismo efecto ha sido reportado para calabaza (Ananthakrishnan *et al.*, 2007) y pudiera deberse a un efecto de desbalance de reguladores de crecimiento en donde se está favoreciendo la brotación de yemas axilares y no la formación de callo a partir de dichas células (Figura 4).

Se encontró que el ultrasonido a una frecuencia de 45 KHz en diferentes tiempos de exposición sobre ejes embrionarios de frijol obtenidos de plantulas de cinco días germinadas en luz, genera una frecuencia de 100 % sobre la presencia de algún nivel de oxidación en todos los tratamientos evaluados, y se observó que a mayor tiempo de exposición (10 min) el porcentaje de oxidación por eje embrionario fue más alto, llegando a representar 54.3 % de toda la superficie del eje, mientras que a cinco minutos el nivel de oxidación por eje embrionario representó solamente 26.2 %, lo que significa que la aplicación de ultrasonido por cinco minutos incrementó el nivel de oxidación en aproximadamente 10 % con respecto al testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del ultrasonido a los diez días sobre ejes embrionarios obtenidos de plántulas de cinco días germinadas en luz de frijol.

Ultrasonido	Oxidación	Callo		Brotes	
		Ápice	Nudo	Ápice	Nudo
0 min	100 (16.3) ^z a	7 (1.5) a	27 (1.1) a	100 (3.2) a	90 (1.7) a
3 min	100 (18.7) a	3 (1) a	13 (1.3) a	100 (3.5) a	93 (2) a
5 min	100 (26.2) a	3 (1) a	13 (1) a	100 (3.4) a	93 (1.9) a
10 min	100 (54.3) a	3 (1) a	27 (1.3) a	83 (2.9) b	73 (1.6) b

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. El valor fuera del paréntesis representa la frecuencia de ausencia o presencia del evento, y el valor en paréntesis el promedio por eje embrionario con dicho evento. La letra esta dada por la frecuencia.

En lo que respecta a la presencia de callo tanto en el ápice como en el nudo cotiledonar, tampoco se encontraron diferencias, pero si en el tamaño del callo presente, siendo el testigo de un mayor tamaño (1.5) con respecto a los demás tratamientos de ultrasonido (1) para el caso del ápice del eje, mientras que en el nudo cotiledonar parece no verse afectada esta característica.

Se sabe que periodos prolongados de ultrasonido afectan la capacidad de regeneración *in vitro*, por lo que ejes embrionarios de frijol expuestos al máximo tiempo evaluado (10 min) presentaron una menor frecuencia de ejes con brotación (83 %) y el número promedio de brotes por estos ejes también disminuyen (2.9), en comparación a los otros tratamientos y testigo, en donde no se encontró diferencia alguna tanto para los brotes en el ápice como en el nudo cotiledonar, ya que el efecto positivo o negativo depende de la especie, explante, intensidad y duración del tratamiento.

Con la finalidad de encontrar una respuesta más favorable se utilizó la misma frecuencia de ultrasonido (45 KHz) pero por lapsos más cortos, ya que la mayoría de los trabajos reportan cortos periodos de exposición al ultrasonido, para obtener mejores resultados en la regeneración *in vitro*.

Se encontró que la respuesta a bajos periodos de exposición es más lenta, siendo mejor apreciada a un mes posterior al tratamiento en comparación con periodos más largos (3, 5 y 10 min). Se sabe que el cultivo *in vitro* del frijol tiene graves problemas de oxidación, pues el simple hecho de la manipulación para su cultivo *in vitro* genera necrosamiento y este puede incrementarse conforme a la duración del tratamiento de ultrasonido, pero tratamientos de hasta 120 segundos de ultrasonido no afectan incrementando el nivel de oxidación con respecto al testigo (Cuadro 5).

La frecuencia de la presencia de callo tanto en el ápice como en la zona del nudo cotiledonar, es una característica que si es afectada por el ultrasonido. El tratamiento de 90 segundos es el que generó más ejes embrionarios con presencia de callo en el ápice del eje (43 %) y en el nudo cotiledonar (90 %), siendo más grande el callo en la zona del nudo cotiledonar (1.7) que en el ápice (1.2), mientras que el no aplicar ultrasonido redujo la presencia de ejes embrionarios con callo, logrando obtener solo 27 y 37 % de los ejes con presencia de callo, en el ápice y nudo cotiledonar respectivamente.

Cuadro 5. Efecto del ultrasonido sobre la regeneración de ejes embrionarios a los 30 días después del tratamiento.

Ultrasonido	Oxidación	Callo		Brotos	
		Ápice	Nudo	Ápice	Nudo
Testigo	100 (39.7) ^z a	27 (1) ab	37 (2) c	97 (2.1) a	80 (1) a
0 seg	100 (40.0) a	20 (1) b	57 (1.6) bc	97 (2.2) a	90 (1.3) a
60 seg	100 (43.7) a	27 (1.6) ab	63 (1.5) bc	90 (2.6) ab	87 (1.3) a
90 seg	100 (40.7) a	43 (1.2) a	90 (1.7) a	87 (2.3) ab	90 (1.3) a
20 seg	100 (36.7) a	20 (1) b	73 (1.4) ab	100 (2.4) a	90 (1.2) a

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. El valor fuera del paréntesis representa la frecuencia de ausencia o presencia del evento, y el valor en paréntesis el promedio por eje embrionario con dicho evento. La letra esta dada por la frecuencia.

El tener una mayor frecuencia de ejes con presencia de callo redujo la frecuencia de ejes con presencia de brotes, pues a 90 segundos existió una reducción en la frecuencia de ejes con brotes en el ápice (87 %) con respecto a 120 segundos (100 %) siendo este ultimo el que presentó una menor frecuencia de ejes con presencia de callo en el ápice (20 %) con respecto a 90 segundos que presentó la mayor frecuencia (43 %), pero el promedio de brotes por eje en la zona del ápice no fue afectado, pues en 90 segundos se obtuvieron 2.3 brotes, mientras que a 120 segundos 2.4 brotes por eje embrionario. En lo que respecta a la frecuencia de brotes en la zona del nudo cotiledonar no existieron diferencias entre los tratamientos. El colocar los ejes embrionarios en el tratamiento de 0 segundos, en donde solo se colocaron por 20 minutos en la solución de sonicación sin tratamiento de ultrasonido, incrementó la frecuencia de ejes con presencia de callo en el nudo cotiledonar en 20 % con respecto al testigo.

Si el objetivo fuese simplemente incrementar la capacidad de regeneración de frijol sin incursionar en transformación genética, se sugieren menores tiempos de exposición a ultrasonido (60-120 segundos incrementan dicha capacidad, Figura 5).



Figura 5. Efecto del ultrasonido sobre la regeneración de frijol a diferentes tiempos de exposición a ultrasonido a los 45 días del tratamiento. 120 segundos (a); 90 segundos (b); 60 segundos (c); 0 segundos, 20 minutos en medio de sonicación (d); testigo (e).

Como se puede apreciar en el cuadro 5 no existe diferencia en el número de brotes por eje embrionario por efecto del ultrasonido a los 30 días, y este mismo valor se mantiene hasta los 45 días, pero el principal efecto del ultrasonido sobre la capacidad de regeneración no es sobre el número de brotes obtenidos, sino en la calidad de éstos, pues como se puede observar (Figura 5) a 120 segundos la longitud de los brotes es mayor con respecto al testigo (Figura 5a, e), aunque la mejor calidad puede apreciarse en 60 segundos de ultrasonido en donde las hojas de los brotes son más vigorosas, por lo que se puede considerar como el mejor tratamiento al generar la mayor frecuencia de ejes con callo a los 30 días y los brotes mas vigorosos a los 45 días del tratamiento.

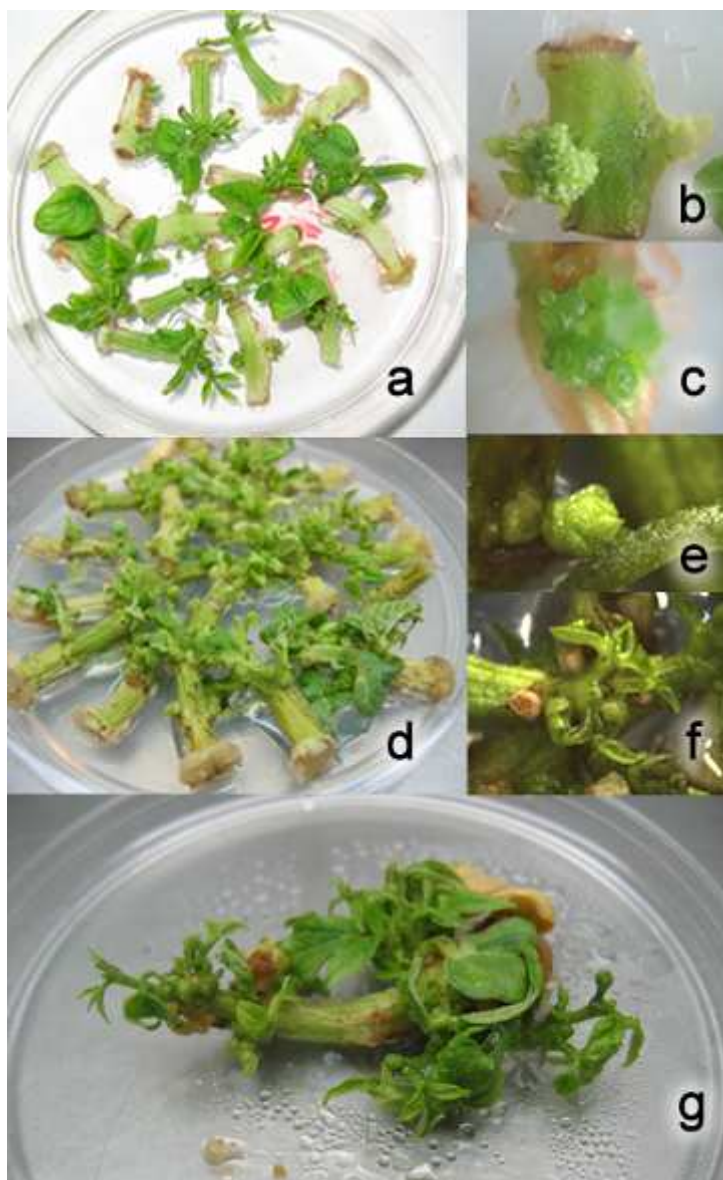


Figura 6. Efecto de cinco minutos de ultrasonido sobre la brotación de *P. vulgaris*. Ejes embrionarios a los 17 días en CIM (a, sin sonicación; d, con sonicación); Formación de callo organogénico a los 20 (b) y 24 (c) días en CIM sin sonicación; Formación de brotes sin pasar por la fase de callo después de la sonicación a los 20 (e) y 24 (f) días en CIM; eje embrionario 30 días en CIM después de 5 min de sonicación (g).

2.4 Discusion

2.4.1. Tiamina

El que a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de tiamina se hubiera presentado contaminación por bacterias pudo deberse a que por una mala desinfestación de la semilla, algunas bacterias pudieran estar presentes pero en bajas poblaciones y con un crecimiento mínimo, pero al colocar las semillas en el medio de germinación y con la tiamina presente se favoreció su crecimiento, pues se sabe que el crecimiento de algunas

bacterias es dependiente de la tiamina, y su presencia permite el crecimiento de colonias bacterianas (Acar *et al.*, 1978).

Pero el que no hayan aparecido bacterias en una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina, pudo deberse a una inhibición del crecimiento por retroalimentación, pues algunas bacterias tienen la capacidad de biosíntesis de tiamina para su crecimiento e interacción con plantas (Finan *et al.*, 1986; Mironov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002), y su biosíntesis esta sujeta por retroalimentación (Mironov *et al.*, 2002), por unión de tiamina a riboswitchs (Nudler y Mironov, 2004; Serganov *et al.*, 2006) mismos que pueden servir como antimicrobiales (Sudarsan *et al.*, 2005), por lo que se requiere de cierta concentración para activar los riboswitchs y evitar el crecimiento de las bacterias, pero se esperaría que a $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina tampoco se presentaran bacterias, pero para que esto suceda la tiamina tiene que ser convertida en TPP (tiamina pirofosfato) la forma biológicamente activa de la tiamina (Winkler *et al.*, 2002), y elevadas cantidades de tiamina pueden disminuir su eficiencia de conversión e incluso inactivar su transformación, por lo que no existe inhibición del crecimiento bacteriano por retroalimentación y al contrario se favorece su crecimiento por la presencia de tiamina.

Y en lo que respecta a el poco vigor en plántulas crecidas en medio sin tiamina y con $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina, se debió al estrés provocado por la presencia de las bacterias, además de que estas cubrieron gran parte de la zona radicular, lo que impidió una buena absorción de los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento de las plántulas de frijol. Además de generar raíces más vigorosas y sin presencia de bacterias, la concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ favoreció un mayor vigor en los ejes embrionarios para el cultivo *in vitro* (Figura 1h), pues se sabe que el efecto de la tiamina se moviliza a otras partes de la planta (Ahn *et al.*, 2005) y en su forma TPP proporciona gran parte de la energía necesaria para el metabolismo y crecimiento de la planta.

2.4.2. Cultivo *in vitro*

La respuesta tan favorable de regeneración al extraer los ejes embrionarios de plántulas de 5 días de germinación pudo deberse a un pre-acondicionamiento en donde las semillas germinaron en presencia de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y oscuridad, por lo al pasarlos al medio de inducción de callo en donde la concentración de BA fue de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y contenía además $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de sulfato de adenina, generó un efecto

positivo, pues se incrementó la concentración y además se adicionó un nuevo regulador que potenció el efecto que ya se había iniciado en el precultivo en germinación. Además, el precultivo se realizó en oscuridad, ya que Shamsudeen *et al.* (2006), encontraron que la frecuencia de regeneración de explantes se incrementó marcadamente cuando se hizo un precultivo en oscuridad, por lo que posiblemente mejoró la capacidad de formación de callo (Figura 1b).

Se ha reportado que la mejor posición para cultivar los explantes es la horizontal, formándose yemas adventicias y microbrotes en ambos extremos (Shamsudeen *et al.*, 2006), pero para el caso de *P. vulgaris* esta posición genera la formación de callo (Figura 2a, b), mientras que la posición vertical genera la brotación de las yemas axilares.

Utilizando otros reguladores del crecimiento (2.0 mg de BA + 2.0 mg de 2-ip + 1.0 mg de 2,4-D por litro), Sushama *et al.* (2004), han logrado la iniciación de callos en una semana y la inducción de brotes a las tres semanas para *P. vulgaris*, lo que representa un menor tiempo comparado con lo obtenido en este trabajo, pues la formación de callo se dio hasta los 15-20 días después de la siembra de los ejes.

Schryer *et al.*, (2005) reportan un protocolo de regeneración rápido de cinco semanas para preembriones de *P. angustissimus* y *P. vulgaris* de tres días después de la polinización se obtienen tasas de plantas regeneradas de 29.3% y 12.5% respectivamente. Para *P. angularis* L., la mejor brotación se obtuvo en 1.12 mg·l⁻¹ de BAP con un rango de 16-18 brotes por explante en menos de cuatro semanas (Shamsudeen *et al.*, 2006).

El efecto del genotipo propone que los factores genéticos son importantes en la respuesta de cultivo de tejidos *in vitro* (Santalla *et al.*, 1998). En este sentido, debido a la reducción de la variabilidad genética en los cultivares de frijol moderno, la revisión de un gran número de cultivares puede ser útil en el intento de conseguir la regeneración vegetal (Svetleva *et al.*, 2003; Veltcheva *et al.*, 2005), por lo que una misma concentración de reguladores puede promover el mismo efecto en diferentes cultivares aun con una gran distribución geográfica y genética (Gatica-Arias *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010; Delgado-Sanchez *et al.*, 2006).

Aunque se puede tener mejor respuesta con preembriones es mejor trabajar con semillas maduras, por la disposición del material, ya que la semilla se puede almacenar por un largo periodo y mantener su viabilidad y así poder trabajar en cualquier época del año.

Para el desarrollo de los brotes fue necesario disminuir las citocininas a $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP, y para favorecer su desarrollo se tuvo que agregar AG3, pues la concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP suprime el efecto de elongación característico de las giberelinas, mismo que se recupera con su adición exógena, puesto que las citocininas actúan en etapas tempranas durante la iniciación del control de la actividad meristemática (Schmulling, 2002), y las giberelinas actúan en etapas tardías, regulando la división y expansión celular para controlar la elongación celular (Richards *et al.*, 2001), por lo que se propone una relación cruzada entre estas dos hormonas, donde las giberelinas inhiben varias respuestas de las citocininas en diferentes etapas del desarrollo vegetal (Greenboim *et al.*, 2005). Algo muy importante es adicionar las giberelinas hasta que se hayan formado un gran número de yemas, pues suprimen actividades meristémicas (Hay *et al.*, 2002). Además en *Arabidopsis*, las giberelinas estimulan la elongación de la raíz aunque se ha observado que requiere de auxinas. La elongación de la raíz inducida por giberelinas fue inhibida por la remoción del ápice que es la mayor fuente de auxinas, y este efecto fue revertido por la aplicación de auxinas (Weiss y Ori, 2007).

Y debido que el frijol ha sido una especie muy recalcitrante al cultivo *in vitro*, y se sabe que entre los factores responsables para la recalcitrancia *in vitro* de especies vegetales, la producción de etileno en el cultivo *in vitro* es un factor clave (Chi y Pua, 1989; Chi *et al.*, 1991; Pua y Chi, 1993; Soumendra *et al.*, 2003), se decidió utilizar nitrato de plata para disminuir dicho efecto, pues ha mostrado tener buenos resultados (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000), mismos que se vieron en la regeneración de los brotes generados después de la formación de callo organogénico (datos no mostrados).

Delgado-Sanchez *et al.* (2006) lograron regenerar ocho brotes a partir de 20 grupos de yemas y con una eficiencia de regeneración de plantas completas de 25 % utilizando $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA y $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ SA, mientras que al reducir a $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ el SA y mantener el BA lograron obtener 18 % de formación de yemas y 50 % de regeneración de plantas completas.

Quintero-Jimenez *et al.* (2010) encontraron que $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA y $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ SA generan 61 % de ejes embrionarios con presencia de grupos de yemas, pero si se elimina la adenina se incrementa a 73.3 %, con un promedio de formación de brotes por grupo de yemas de 5.7 para el medio con adenina y 8.3 sin adenina, y un promedio de desarrollo de plantas completas de 0.7 por grupo de yemas para ambos

casos, y 50 % de los ejes embrionarios tenían presencia de plantas cuando crecieron en MS y Adenina, y 42 % cuando solo crecieron en MS. Pero al cambiar el medio basal MS por Gamborg, se incrementó la capacidad de obtener ejes con plantas hasta en 95.6-97.8 %, con un promedio de 3.7-3.9 plantas por grupo de yemas.

En este trabajo se utilizaron 40 mg·l⁻¹ de SA en lugar de los 20 mg·l⁻¹ reportados por Delgado-Sanchez *et al.* (2006) porque se ha visto que el SA puede incrementar la capacidad de formación de brotes en la concentración de 40 mg en comparación con 20 mg cuando se utiliza como única fuente para promover la brotación (Gatica-Arias *et al.*, 2010), pero también se incrementan los niveles de oxidación, pero con la adición de antioxidantes al medio de cultivo no se presentaron problemas severos con la oxidación, por lo que se lograron obtener 26.4 % de los ejes con presencia de callo en la zona del nudo cotiledonar principalmente, y el 73.6 % de los ejes embrionarios con presencia de brotación con tres brotes aproximadamente por eje embrionario, lo que es superior a lo encontrado por Delgado-Sanchez *et al.* (2006) y Quintero-Jimenez *et al.* (2010) que son parte del mismo grupo de investigación, y en su último reporte bajo condiciones casi similares a las nuestras reportan que el 50 % de sus ejes tenían presencia de plantas, mientras que en este trabajo se logro obtener 73.6 %, con el precultivo de las semillas en 1.0 mg·l⁻¹ de BA y 1.0 mg·l⁻¹ de tiamina por cinco días.

2.4.3. Efecto del ultrasonido sobre la mortalidad

El efecto de la sonicación sobre la mortalidad de plántulas de frijol ya se había reportado previamente por Liu *et al.* (2005), donde utilizaron semillas de frijol en germinación y las sometieron a diferentes tiempos de exposición a ultrasonido en una frecuencia de 45 KHz, observando que a mayor duración del tratamiento (12.5 min) se obtenía una menor sobrevivencia de las plantas (2 %), y dado que la sonicación puede facilitar la generación de plantas transgénicas de frijol, Liu *et al.* (2005), reportaron que la duración de 5 minutos genera el mayor porcentaje de plantas transgénicas (4 %) al igual que un 74 % de sobrevivencia de las plantas, mientras que con 2.5 minutos se obtiene una sobrevivencia del 96 % pero sin obtener plantas transgénicas, nosotros encontramos una sobrevivencia del 61 % (5 minutos de sonicación) cuando los ejes eran obtenidos de plántulas crecidas en oscuridad y del 100 % cuando las plántulas crecían en luz, ya que las plantas

germinadas en oscuridad se encontraban etioladas y más succulentas, y se sabe que la pared celular de este tipo de plantas es más débil por falta de una buena lignificación, misma que se debe al efecto de la luz, por ello fueron más sensibles al efecto de 5 minutos de sonicación (45 KHz), pero el germinar las plantas y extraer sus ejes es una buena opción para futuros experimentos de transformación genética utilizando 5 minutos de sonicación.

2.4.4 Efecto del ultrasonido sobre la regeneración

El que 5 minutos de ultrasonido hayan evitado la formación de callo a los 24 días en medio de inducción de callo pudo deberse a un desbalance hormonal provocado por la sonicación, mismo que permitió una entrada en exceso de BA y SA, además de nutrientes, pues el ultrasonido afecta la permeabilidad de las membranas (Joersbo y Brunstedt 1990; Dong *et al.*, 2002) y puede provocar la apertura e incluso ruptura de estomas (Ananthakrishnan *et al.*, 2007). Esta entrada de reguladores y nutrientes pudieron favorecer la brotación de las yemas presentes en lugar de dar paso a la formación de callo, pues el medio MS se caracteriza por tener elevados niveles de nitratos, mismos que se sabe que inducen la expresión de genes para la biosíntesis de citocininas, resultando en un incremento de las mismas (Takei *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004) y alteran la biosíntesis de auxinas, disminuyendo su biosíntesis y contenido (Walch-Liu *et al.*, 2006), y es muy conocido que para la formación de callo debe existir un balance entre auxinas-citocininas.

Las citocininas trabajan en una compleja interacción con las auxinas, las cuales frecuentemente actúan como antagonistas por la represión de la síntesis de las citocininas (Takei *et al.*, 2004), pero la activación mediada por las auxinas ha sido también descrita para síntesis de genes individuales de síntesis de citocininas (Miyawaki *et al.*, 2004). La aplicación externa de citocininas induce cambios en el tejido de la raíz que reorganiza el tejido en callo (Zubko y Meyer, 2007)

El ultrasonido generó diferentes efectos para un mismo tiempo evaluado en experimentos aislados, y esto puede ser por efecto del ultrasonido pues se sabe que su efecto puede ser diferente para cada especie, ya que la frecuencia y el tiempo de exposición que es favorable para el crecimiento de algunas, podría inhibir el de otras (Timonin, 1966). El ultrasonido a nivel de la planta puede aumentar la germinación de varias semillas y el subsecuente desarrollo de las plántulas (Gaba *et al.*, 2006).

Para el caso del frijol no se presentaron problemas de hiperhidricidad a 5 ó 10 minutos, aunque en calabaza este problema esta presente y con daños en la superficie por lo que el ultrasonido afecta su proceso normal de regeneración, mientras que tratamientos de ultrasonido de 0.5 a 2 minutos estimula la regeneración de brotes múltiples en elevados niveles de explantes de cotiledones recalcitrantes de calabaza, y en tratamientos prolongados de 5 a 10 minutos también pueden provocar el mismo efecto pero además hiperhidricidad (Ananthakrishnan *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que después de 30 días del tratamiento no existe diferencia en la respuesta de regeneración al haber utilizado agua destilada, medio Luria Broth o medio basal MS líquido (Ananthakrishnan *et al.*, 2007), pero si se requiere un efecto positivo lo más recomendable es utilizar el medio MS, suplementado con antioxidantes para reducir las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski, 2008) y evitar el daño oxidativo provocado por la sonicación. Además, de que este tratamiento es un ensayo previo para transformación genética por SAAT, y en estos trabajos se ha visto que el utilizar el medio Luria Broth genera altos niveles de oxidación por la presencia de elevados niveles de cloruro de sodio, y el uso de agua destilada no tiene efectos positivos, por lo que lo mejor es resuspender la bacteria en MS.

En la figura 4 se puede observar diferentes niveles de respuesta al efecto del ultrasonido, mientras que el testigo presentó una sola respuesta en general, siendo diferente a lo encontrado en calabaza en donde los explantes control tuvieron tres tipos de respuesta en el medio de regeneración; 38 % regeneraron muy pequeñas yemas, hojas o primordios foliares y 27 % regeneraron pequeños brotes, y sin múltiples brotes, pero el tratamiento con ultrasonido estimuló grandemente el desarrollo de múltiples brotes en 68 % (Ananthakrishnan *et al.*, 2007).

2.5 Conclusiones

Se logró optimizar el protocolo para la regeneración de frijol y se encontró un efecto tanto positivo como negativo del ultrasonido sobre la respuesta *in vitro*, sin embargo, el protocolo aquí reportado mostró buena respuesta al desarrollo *in vitro* de ejes embrionarios de frijol, por lo que puede ser una alternativa confiable para la transformación genética de *P. vulgaris*.

Literatura citada

- Acar JF, Goldstein FW, Lagrange P. 1978. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 8(2):142-147.
- Ahn II-P, Soonok K, Yong-H L. 2005. Vitamin B1 Functions as an Activator of Plant Disease Resistance. Plant Physiology, Vol. 138, pp. 1505–1515.
- Ananthakrishnan G., Xia Xiaodi, Amutha S., Singer S, Muruganantham M, Yablonsky S, Fischer E, Gaba V. 2007. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants in vitro. Plant Cell Rep 26: 267–276.
- Böhm H.; Anthony P.; Davey M.R.; Briarty L.G.; Power J.B.; Lowe K.C.; Benes E. and Gröschl M. 2000. Viability of plant cell suspensions exposed to homogeneous ultrasonic fields of different energy density and wave type. Ultrasonics 38: 629–632.
- Chi GL, Pua EC, Goh CJ. 1991. Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) olsson in vitro. Plant Physiol. 96: 178–183
- Chi GL, Pua EC. 1989. Ethylene inhibitors enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (chinese cabbage) in vitro. Plant Science 64: 243–250
- Cruz de Carvalho MH, Van Le B, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Thanh Van KT. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer cultura and silver nitrate. Plant Sci. 159: 223-232.
- Delgado-Sánchez P, Saucedo-Ruiz M, Guzmán-Maldonado SH, Villordo-Pineda E, González Chavira M, Fraire-Velázquez S, Acosta-Gallegos JA, Mora-Avilés A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Plant Sci 170:822–827.
- Dong LL, Yong WJ, Lin LD, Wu JY. 2002. Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. Biotechnol Bioeng 78:81–88
- Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, et al. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol. 167(1):66-72.
- Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Rella MG, Meier B, Dincher SS, Staub T, Uknes S, et al. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant J 10: 61–70
- Friedrich W.1987. Thiamine (vitamin B1, aneurin), Handbuch der Vitamine, Urban & Schwarzenberg, pp. 219–259 Munchen, Wien, Baltimore (Chpt. 5).
- Gaba V, Kathiravan K, Amutha S, Singer S, Xiaodi X, Ananthakrishnan G. 2006. The uses of ultrasound in plant tissue culture. In: Dutta GS, Ibaraki Y (eds) Focus on biotechnology, vol VI. Plant tissue culture engineering. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 417–426
- Gatica-Arias AM, Muñoz VJ, Ramírez FP, Valdez MM. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N⁶-benzylaminopurine and adenine sulphate. Electronic Journal of Biotechnology 13(1): 1-8.
- Gołda A, Szyniarowski P, Ostrowska K, Kozik A, Rapala-Kozik M. 2004. Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereals and legumes. Plant Physiology and Biochemistry 42: 187–195.

- Hay A., Kaur H., Phillips A.S., Hedden P., Hake S., Tsiantis M. 2002. The gibberellin pathway mediates knotted1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* 12: 1557–1565.
- Howle PKW, Fites RC. 1991. Pyrithiamin is a competitive inhibitor of ATP:thiamin pyrophosphorylase (EC 2.7.6.2) from dark-grown soybean (*Glycine max* (L.) Merr., cv. Ransom II) seedling axes. *Plant Sci.* 73: 161–166.
- Joersbo M, Brunstedt J. 1990. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Rep* 9:207–210
- Kwapata K, Sabzikar R, Sticklen MB, Kelly JD. 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 100:97–105
- Liu Z, Park BJ, Kanno A, 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.
- Matkowski A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances* 26: 548–560.
- McClellan PH, Grafton KF. 1989. Regeneration of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Sci.*, 60: 117–122.
- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep* 18:180–186.
- Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Errais Lopez L, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E. 2002. Sensing Small Molecules by Nascent RNA: A Mechanism to Control Transcription in Bacteria. *Cell*, 111: 747–756.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. and Kakimoto, T. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37, 128–138.
- Mohamed MF, Read PE, Coyne DP. 1992. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 117(4): 668–672.
- Molin WT, Wilkerson CG, Fites RC. 1980. Thiamin phosphorylation by thiamin pyrophosphotransferase during seed germination. *Plant Physiol.* 66: 313–315.
- Nudler E, Mironov AS. 2004. The riboswitch control of bacterial metabolism. *TRENDS in Biochemical Sciences* 29(1): 11–17.
- Ostle B. 1994. Estadística aplicada. Técnicas de la estadística moderna, cuando y donde aplicarlas. Ed. Limusa, México.
- Quintero-Jiménez A, Espinosa-Huerta E, Acosta-Gallegos JA, Guzmán-Maldonado HS, Mora-Avilés MA. 2010. Método Eficiente de Regeneración *in vitro* de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia* 44: 57–64.
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harber NP. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 67–88.
- Santalla M, Power JB, Davey MR. 1998. Efficient in vitro shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102:195–202
- Santarem ER, Trick HN, Essig JS, Finer JJ. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep* 17:752–759.
- Schmulling T. 2002. New insights into the functions of cytokinins in plant development. *J. Plant Growth Regul.* 21: 40–49.

- Schryer PA, Lu Q, Vandenberg A, Bet KE. 2005. Rapid regeneration of *Phaseolus angustissimus* and *P. vulgaris* from very young zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83 (1): 67-74.
- Serganov A, Polonskaia A, Tuân Phan A, Breaker RR, Patel DJ. 2006. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* 441(29): 1167-1171.
- Shamsudeen VM, Jih-Min S, Toong-Long J, Chang-Sheng W. 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 Tiss Organ Cult*, 86:187–199.
- Shewry PR, Stobart K. 1993. *Seed Storage Compounds*, Clarendon Press, Oxford.
- Soumendra K. Naik, Pradeep K. Chand. 2003. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 423–430.
- Sudarsan N, Cohen-Chalamish S, Nakamura S, Emilsson GM, Breaker RR. 2005. Thiamine Pyrophosphate Riboswitches Are Targets for the Antimicrobial Compound Pyrithiamine. *Chemistry & Biology*, 12: 1325–1335.
- Sushama PR, Chary SN, Bhalla JK. 2004. *In vitro* plant regeneration from stem explants of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 5(1/2): 77-80.
- Svetleva D, Velcheva M, Bhowmik G. 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) improvement. *Euphytica*, 131(2): 189-200.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K et al. 2004. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 45:1053–1062.
- Timonin MI. 1966. Effect of ultrasound on the germination of white spruce and jack pine seeds. *Can J Bot* 44:113–115
- Trick HN, Finer JJ. 1997. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation. *Transgenic Res* 6:329–336
- Trick HN, Finer JJ. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17:482–488
- Velcheva M, Svetleva D, Petkova SP, Pearl A. 2005. *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—problems and progress. *Sci Hortic* 107: 2–10.
- Walch-Liu P, Ivanov II, Filleur S, Gan Y, Remans T, Forde BG. 2006. Nitrogen regulation of root branching. *Ann Bot (Lond)* 97:875–881.
- Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M et al. 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol* 136:2512–2522.
- Weiss D, Ori N. 2007. Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. *Plant Physiology*, Vol. 144, pp. 1240–1246.
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419(31): 952-956.
- Zaragoza C, Munoz-Bertomeu J, Arrillaga I. 2004. Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT. *Plant Cell Rep* 22:832–838.
- Zubko E, Meyer P. 2007. A natural antisense transcript of the *Petunia hybrida* Sho gene suggests a role for an antisense mechanism in cytokinin regulation. *The Plant Journal* 52, 1131–1139.

Pagina en blanco

CAPITULO 3. ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN GENETICA POR AGROINFECCIÓN DE *Phaseolus vulgaris* L. var. FLOR DE MAYO “ANITA”.

Resumen

Con el objetivo de obtener plantas transgénicas de frijol, los ejes embrionarios de plantas de 5 días de germinación se sometieron a la infección de *Agrobacterium tumefaciens* con la cepa LBA4404, utilizando sonicación por 5 min e infiltración por vacío por 5 min. Se lograron obtener 138 explantes resistentes a $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de PPT (de 2240 ejes embrionarios) y solo 13 plantas aclimatadas, mismas que murieron por efecto de *A. tumefaciens*, pues se volvió sistémica y mato los brotes tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Palabras clave: frijol, ejes embrionarios, sonicación, vacío, *Agrobacterium*.

3.1 Introducción

La productividad de las plantas está fuertemente influenciada por los factores como la deshidratación inducido por la sequía, salinidad o las bajas temperaturas ambientales, y las plantas responden a estas condiciones desplegando una respuesta de muchos genes. La sequía y la salinidad son de los más serios problemas para la producción de cultivos en la actualidad, limitando el crecimiento y productividad de los mismos (Zhou *et al.*, 2007). Tanto el mejoramiento tradicional como la ingeniería genética de cultivos vegetales han sido utilizados para proveer de tolerancia o resistencia hacia estos factores con el objetivo de incrementar la productividad agrícola en regiones afectadas. La reciente búsqueda en las respuestas a la sequía o salinidad en *Arabidopsis* implica que una gran porción del genoma esta involucrado en la respuesta a sequía (Shinozaki *et al.*, 2003), y en algunos casos se ha mostrado que la alteración del nivel de expresión de genes individuales puede impactar significativamente en las respuestas a sequía (Garg *et al.*, 2002; Haake *et al.*, 2002).

Dentro de los genes que se han evaluado en una investigación más intensa para explorar su posible utilización en la generación de plantas transgénicas tolerantes a sequía, se encuentran los que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de osmolitos (Bajaj *et al.*, 1999). Existen tres grupos de osmolitos en las plantas: aminoácidos como la prolina, azúcares y polioles como el manitol y la

trehalosa, y compuestos cuaternarios de amonio como la glicina betaína y el 3-dimetil sulfonio propanato (Nuccio *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que la trehalosa es capaz de preservar la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones desnaturalizantes (calor, frío y sequía) tanto *in vitro* como *in vivo* (Colaco *et al.*, 1992; Crowe *et al.*, 1992), lo que permite suponer que plantas de *P. vulgaris* que acumulen trehalosa serán capaces tolerar condiciones de sequía sin morir, y podrán recuperar sus funciones vitales cuando exista humedad aprovechable. Se ha reportado transformación genética de frijol con la técnica de biobalística, pero se ha obtenido una eficiencia de transformación muy baja (Aragão *et al.*, 2002), por lo que se pretende realizar transformación con *Agrobacterium tumefaciens* con la finalidad de obtener plantas transgénicas de *P. vulgaris* que sobre expresen el gen quimérico *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* para biosíntesis de trehalosa, con la finalidad de que adquieran tolerancia a sequía.

3.2 Material y métodos

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron ejes embrionarios de *P. vulgaris* var Flor de Mayo Anita, para lo cual las semillas se desinfestaron utilizando etanol a 70 % por 5 minutos y Clorox® a 20 % por 20 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Aproximadamente 200 semillas se colocaron a embeber en una matraz de 500 ml, conteniendo 300 ml de agua destilada estéril, la semilla se dejó embebiendo por 20 horas. Se les retiró la testa y se colocaron en medio de germinación (Cuadro 1), colocando 20 semillas por caja Magenta® con 50 ml de medio de germinación y se dejaron en luz hasta que el epicotilo alcanzó una longitud aproximada de 5-10 mm (5-6 días después de la germinación).

3.2.2 Medios de cultivo y condiciones experimentales

Los medios utilizados se describen en el Cuadro 1 y todos los cultivos se mantuvieron bajo una temperatura de 25 ± 1 °C (16 horas de fotoperíodo, $96 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, con lámparas fluorescentes).

Cuadro 1. Composición de los medios utilizados para la transformación *P. vulgaris*.

Constituyentes	MG	MIF	MCC	ML	MIC	MB	MEB	MRL	MRS
Sales MS y vitaminas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tiamina (mg·l ⁻¹)	1	-	-	-	1	1	1	1	1
Myo-inositol (mg·l ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sacarosa (g·l ⁻¹)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Glucosa (g·l ⁻¹)	-	2	2	2	-	-	-	-	-
Agar (g·l ⁻¹)	6.8	-	-	-	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
MES (g·l ⁻¹)	-	3.9	3.9	3.9	-	-	-	-	-
Acetosyringona (μM)	-	200	-	-	-	-	-	-	-
BAP (mg·l ⁻¹)	1	10	10	10	10	1	-	-	-
SA (mg·l ⁻¹)	-	40	40	40	40	-	-	-	-
AIB (mg·l ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	0.08	1.0	-
AG ₃ (mg·l ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-
AgNO ₃ (mg·l ⁻¹)	-	-	-	-	-	15.3	15.3	-	15.3
Ac. cítrico (mg·l ⁻¹)	-	100	100	100	100	100	100	100	100
Ac. ascórbico (mg·l ⁻¹)	-	150	150	150	150	150	150	150	150
MEPM (mg·l ⁻¹)	-	-	-	25	25	25	25	25	25
PPT (mg·l ⁻¹)	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	-	-
pH	5.8	5.5	5.5	5.5	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

MG= medio de germinación; MIF= medio de infección; MCC= medio de co-cultivo; ML= medio de lavado; MIC= medio de inducción y mantenimiento de calo; MB= medio de brotación; MEB= medio de elongación de brotes; MRL= medio de enraizamiento líquido; MRS= medio de enraizamiento sólido; MES= ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico; BAP= bencil amino purina; SA= sulfato de adenina; AIB= ácido indol butírico; AG₃= ácido giberélico; MEPM= meropenem; PPT= fosfonitricina.

3.2.3 Sensibilidad a fosfonitricina

Ejes de *P. vulgaris* se obtuvieron de plántulas cuando el epicotilo alcanzó una longitud aproximada de 5-10 mm, se les retiró la radícula, cotiledones y primordios foliares, y se colocaron en el medio de inducción de calo en forma horizontal en cajas petri con 30 ml de medio, además de diferentes niveles de fosfonitricina (PPT, Duchefa) para evaluar el nivel de tolerancia (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg·l⁻¹ de PPT). Los ejes se colocaron a 25 ± 1 °C (16 horas de fotoperíodo) y se sub-cultivaron cada dos semanas.

3.2.4 Cepas y construcciones

Para la expresión transitoria se utilizaron tres cepas: LBA4404 (p35GUSint); EHA105 (p35GUSint) y C58L1(p35GUSint) (Vancanneyt *et al.*, 1990). En la transformación estable se utilizó la cepa LBA4404 con el vector pGREENRd29A-Bif (Figura 1), con el gen de selección *bar* y el promotor *nos* (Miranda *et al.*, 2007). Las cepas estaban almacenadas a -20 °C en un bial con glicerol a 50%, por lo que se

tomó una muestra y se cultivó en medio LB (Luria-Bertani) sólido con 50 mg·L⁻¹ de Kanamicina y 100 mg·L⁻¹ de Rifampicina durante 3-4 días a 27-28 °C. Posteriormente se tomó una colonia y se cultivó en medio LB líquido con los mismos antibióticos pero se colocó en un matraz estéril y se mantuvo a 200rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀=0.8-1.2. El cultivo fue centrifugado a 4000 rpm y re-suspendido en el medio de infección (cuadro 1) a una OD₆₀₀= 0.8.

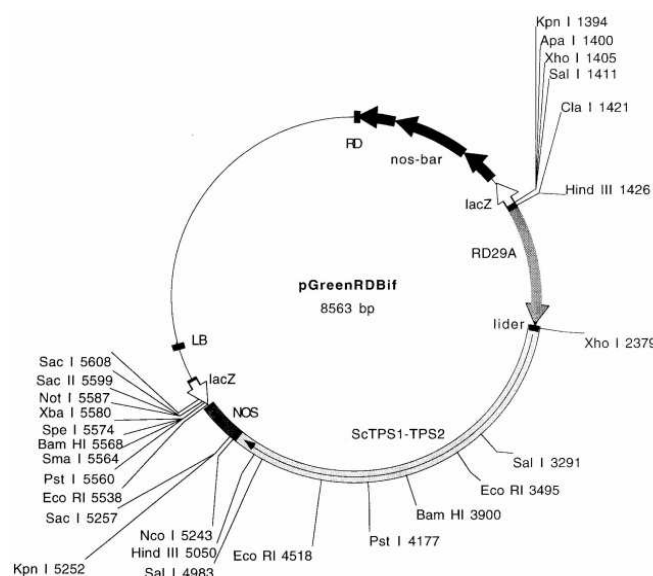


Figura 1. Esquema del vector pGREENRd29A-Bif utilizado para la transformación genética estable mediada por *Agrobacterium*.

3.2.5 Condiciones de transformación

Cuando el epicotilo alcanzó un tamaño de 5-10 mm, se les retiró los cotiledones al igual que la radícula y hojas cotiledonares, dejando de 5-7 mm por debajo del nudo cotiledonar, se colocaron en el medio de infección al cual previamente se le había colocado la acetosiringona y dejado en agitación a 200 rpm por 20 minutos. Se colocaron aproximadamente 50 ejes embrionarios en un matraz de 125 ml conteniendo 75 ml de medio infección y se cubrió con papel aluminio estéril, para darles un tratamiento de ultrasonido por 5 minutos en un sonicador marca Ultrasonics® con un voltaje de entrada de 120 V AC, 50/60 Hz, y una salida de 35 W a 45 KHz. Se procuro que el nivel de la solución del matraz coincidiera con el nivel del agua del sonicador y el matraz se colocó al centro del sonicador, ocasionalmente el matraz se retiró del sonicador y se agitó ligeramente.

Posteriormente se le retiró el papel aluminio y se colocaron en una cámara de vacío, para someterlos a infiltración por vacío (20 In Hg) por 5 minutos. Después del vacío se dejaron en el medio de infección por 20 minutos y se retiró el exceso de bacteria utilizando papel filtro estéril, y se colocaron 20 ejes por cajas petri con papel filtro estéril, agregando medio de co-cultivo tratando de humedecer el papel filtro, las cajas petri se mantuvieron a 25°C en luz por dos días para el co-cultivo. Terminado el co-cultivo los ejes se lavaron utilizando 25 mg·l⁻¹ del antibiótico Meropenem, se les retiró el exceso de medio de lavado con papel secante estéril y se colocaron en medio de inducción de callo más antibiótico.

3.2.6 Detección y evaluación de expresión transitoria del gen GUS

Este gen, procedente de *E. coli*, codifica para la enzima β -glucuronidasa que cataliza la reacción de hidrólisis de los β -D-glucurónidos. La hidrólisis del sustrato incoloro produce un precipitado de color, detectable visualmente (Jefferson *et al.*, 1987). La actividad de la enzima β -glucuronidasa en los ejes se demostró mediante tinción histoquímica siguiendo el protocolo de Jefferson (1987) y, para ello se utilizaron ejes transformados inducidos por las cepas EHA105, LBA4404 y C58 de *A. tumefaciens* portadoras de gen *gusAint*. Este gen presenta unas modificaciones para evitar su expresión en la agrobacteria que consisten en la inserción de un intrón y una señal de poliadenilación final que impiden que la maquinaria de transcripción y traducción bacteriana sintetice una proteína funcional, y solamente permite su correcta expresión en la célula vegetal (Vancanneyt *et al.*, 1990). Por lo que los ejes completos de dos días después del co-cultivo, se incubaron con el sustrato cromogénico X-Glu [50 mM Na₂HPO₄ + 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, 0.5 mM K₄Fe(CN)₃·3H₂O, 0.1% Triton X-100 y X-Gluc 1 mg·ml⁻¹] durante una noche a una temperatura de 37 °C. Como control positivo se usaron plántulas de *A. thaliana* transformadas con el mismo gen. Posteriormente los tejidos fueron decolorados con una solución de metanol y acetona en una proporción 3:1. Para evaluar la frecuencia de transformación, se estimó el porcentaje de explantes con reacción positiva a X-gluc, la estimación en la frecuencia de expresión de GUS se llevó a cabo analizando 16 ejes.

3.2.7 Selección y regeneración de plantas

Después de haber sido co-cultivados los ejes, se colocaron en medio de inducción de callo con $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de MEPM por siete días en cajas petri y sin PPT, posteriormente se colocaron aproximadamente 20 ejes en forma vertical en cajas Magenta® con 50 ml de medio de inducción de callo + $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ MEPM + 0.5 mg/l $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ PPT, para iniciar con la selección, se subcultivaron cada 10 días hasta por cuatro veces, posteriormente se pasaron al medio de brotación y se dejaron dos semanas, para colocarlos en el medio de elongación de brotes por otras 2-3 semanas, y cuando los brotes ya tenían más de dos centímetros de longitud se colocaron en el medio líquido de enraizamiento por 20 minutos, se retiró el exceso de medio y se colocaron en el medio de enraizamiento por 2-3 semanas.

3.2.8 Aclimatación

La aclimatación se dio cuando los brotes tenían una raíz de más de tres centímetros de longitud. Los brotes se colocaron en vasos de poliuretano conteniendo una mezcla de Peat-moss: Perlita 1:1 como sustrato, previamente humedecido y estéril, se cubrieron con bolsas de polipropileno y se dejaron bajo condiciones de laboratorio. Pasados 5-6 días se inició con las perforaciones en la bolsa, una cada tercer día hasta que las plantas se aclimataron a los 20-25 días.

3.2.9 Análisis estadístico

Se realizó un experimento con diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, colocando 20 ejes por caja petri y cada caja se consideró una repetición. Se realizaron análisis de comparación de dos proporciones binomiales, registrando la presencia o ausencia de las variables evaluadas, al ser una respuesta del tipo cualitativa (Ostle, 1994).

3.3 Resultados

3.3.1 Sensibilidad de *P. vulgaris* a PPT

Los ejes de frijol son muy sensibles a la presencia de PPT pues a los 14 días después de haber colocado los ejes en el medio de selección a concentración de 3 mg se presentó 100 % de mortalidad, mientras que a 0.5 mg solo 15 %, pero conforme se incrementaban los días de exposición la concentración de 0.5 mg también se volvió letal a los 30 días (Cuadro 2), por lo que se pueden seguir dos

vías de selección, una rápida colocando los ejes por 15 días a $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de PPT, o una lenta seleccionando por más de 30 días a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de PPT, y conforme a lo establecido por Zambre *et al.* (2005) el cual menciona que una elevada eficiencia de transformación incluye una selección inicial sobre un medio que contiene bajos niveles del agente de selección, lo más recomendable es utilizar la concentración de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para seleccionar ejes transformados de frijol.

Korban (1994) menciona que todos los brotes de frijol mueren de 7-10 días después de haberlos colocado en $1-5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de PPT, utilizando una variedad tropical, por lo que la sensibilidad al PPT no es la misma para cada cultivar de frijol. Además menciona que la concentración letal es de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ sobre los brotes regenerados de nudos cotiledonares partidos a la mitad, y la concentración sub-letal fue de $0.8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Cuadro 2. Efecto de la concentración de PPT sobre la sobrevivencia (%) de ejes de frijol de cinco días de germinación.

PPT (mg)	7 días	14 días	21 días	30 días
0	100	100	100	95
0.5	100	85	45	0
1	100	70	0	0
2	100	65	0	0
3	85	0	0	0
4	80	0	0	0
5	80	0	0	0

3.3.2. Expresión transitoria

La cepa C58L1 no tuvo efecto visible sobre la infección, pues no se logró observar la expresión del gen GUS a los dos días después del co-cultivo, mientras que las otras dos cepas (EHA105 y LBA4404) mostraron expresión del gen GUS al someterlas a tinción, observándose una coloración más fuerte en ejes donde se utilizó la cepa EHA105 (Figura 1a) pero también presentó mayor nivel de oxidación en el tejido.

Los ejes con la cepa LBA4404 mostraron una buena expresión de GUS al igual que con la cepa EHA105 (Figura 2b), pero con menor porcentaje de oxidación, por lo que se consideró a LBA4404 como la mejor cepa, debido a que el frijol tiene grandes problemas en la regeneración *in vitro* por lo que se tienen que evitar o disminuir los factores que pudieran afectar la baja capacidad de regeneración, y la oxidación es un gravísimo problema que afecta negativamente la regeneración *in*

vitro del frijol (Kwapata *et al.*, 2010; Gatica-Arias *et al.*, 2010; Quintero-Jimenes *et al.*, 2010).

Con la cepa EHA105 20 % de los ejes mostraron tinción, mientras que con la cepa LBA4404 28 % de los ejes mostraron expresión de GUS, por lo que se considero como la mejor cepa para poder obtener una mayor posibilidad de generar plantas transgénicas con algún gen de interés.

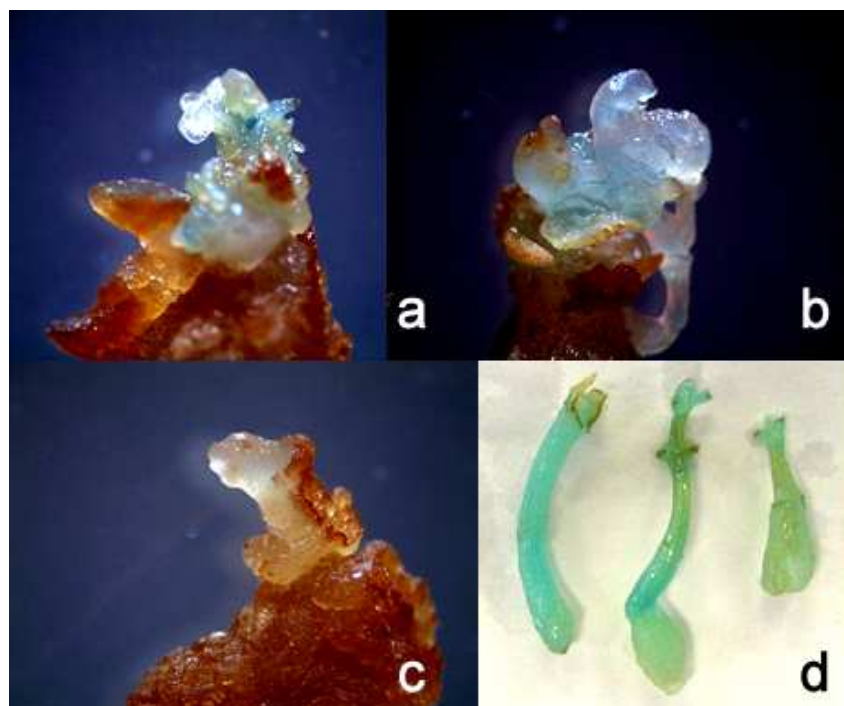


Figura 2. Expresión de GUS en *P. vulgaris* dos días después del co-cultivo. EHA105 (a), LBA4404 (b), C58 (c) y LBA4404 asistida con sonicación (5 min) y vacío (5 min) (d).

Después de haber identificado que la cepa LBA4404 es la mejor en la expresión transitoria y que la sonicación más vacío genera más expresión transitoria (Figura 2), se realizaron diferentes tratamientos para la expresión transitoria del gen GUS, por lo que se utilizó la combinación de la sonicación e infiltración por vacío, mismas que han mostrado ser eficientes en la obtención de plantas transgénicas de frijol. Para los tratamientos solo se hizo variar los tiempos de ultrasonido (sonicación), manteniendo un solo tiempo de infiltración por vacío por cinco minutos, pues por trabajos previos se sabe que es el tiempo óptimo para frijol, además se requieren heridas para que penetren las bacterias y la sonicación puede afectar más esta característica que la infiltración por vacío.

De acuerdo a los resultados (Cuadro 3, Figura 3) no existió diferencia alguna en la frecuencia de ejes con presencia de tinción del gen GUS para ninguno de los tratamientos evaluados, así como tampoco en el nivel de expresión sobre los ejes infectados, por lo que se recomienda el tratamiento de 5 minutos de sonicación más 5 minutos de infiltración por vacío.

Cuadro 3. Nivel de expresión transitoria del gen GUS a los 7 días después del co-cultivo en luz con la cepa LBA4404. Promedio de tinción por eje embrionario, el 100 % de los ejes presentaron algún nivel de tinción.

Ultrasonido	Ápice	Nudo	Eje total
60 seg + 5 min vacío	96 ^z a	64 a	70 a
90 seg + 5 min vacío	72 a	74 a	61 a
3 min + 5 min vacío	86 a	80 a	68 a
5 min + 5 min vacío	83 a	72 a	69 a

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales.

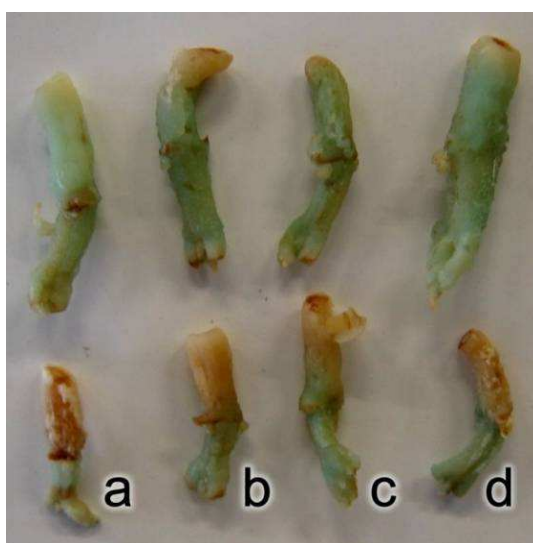


Figura 3. Expresión transitoria del gen GUS, siete días después del co-cultivo con la cepa LBA4404. 60 segundos (a), 90 segundos (b), 3 minutos (c) y 5 minutos (d) de ultrasonido más 5 minutos de infiltración por vacío.

3.3.3 Efecto de la infección sobre la regeneración

El cultivo *in vitro* de frijol representa por si mismo un gran problema puesto que no existe un protocolo de regeneración eficiente, y su regeneración se agrava aún más cuando los explantes a regenerar se someten ante un factor estresante biótico o abiótico, o aun peor cuando existe la mezcla de ambos en el proceso de

transformación genética mediada por *Agrobacterium* y asistida por sonicación mas infiltración por vacío, por lo que fue necesario evaluar su respuesta morfogénica, y por ello se evaluaron diferentes tiempos de sonicación, más 5 minutos de infiltración por vacío y dos condiciones de co-cultivo (luz y oscuridad) (Cuadro 4).

En lo que respecta al problema del necrosamiento de tejidos, se encontraron diferencias en el co-cultivo en oscuridad con las frecuencias más bajas a 5 minutos (20 %) y 3 minutos (60 %), pero el problema más grave de co-cultivar en oscuridad y pasar los explantes a luz, es la elevada frecuencia de ejes con presencia de blanqueamiento (pérdida de pigmentación), a 60 segundos 80 % con un promedio de 32.5 % por eje, a 90 segundos una frecuencia del 40 % con un promedio de blanqueamiento por eje de 75 %, 3 y 5 minutos con una frecuencia de 100 % con 91 y 98 % por eje respectivamente, lo que representa una mortalidad total del eje y sin posibilidad de regenerar, por lo que el co-cultivo en oscuridad no es recomendable por los elevados índices de mortalidad después de pasar los explantes a condiciones de luz para su regeneración *in vitro* (Cuadro 4), en lo que respecta a las otras características evaluadas como son presencia de callo y brotes en la zona del ápice y nudo cotiledonar no se encontraron diferencias para todos los tratamientos evaluados.

Cuadro 4. Respuesta a diferentes tratamientos de infección, 5 días después del co-cultivo con la cepa LBA4404.

Ultrasonido + 5 min vacío	Oxidación	Blanqueamiento	Callo		Brotes	
			Ápice	Nudo Cotiledonar	Ápice	Nudo Cotiledonar
60 seg + osc	100 (58) ^z a	80 (32.5) a	0 (0) a	0 (0) a	20 (3) a	20 (2) a
60 seg + Luz	100 (78) a	0 (0) bc	0 (0) a	0 (0) a	20 (1) a	40 (1) a
90 seg + osc	80 (40) a	40 (75) ab	0 (0) a	0 (0) a	40 (1) a	20 (1) a
90 seg + luz	100 (40) a	20 (10) ab	20 (1) a	40 (1) a	40 (1) a	40 (1.5) a
3 min + osc	60 (15) ab	100 (91) a	0 (0) a	0 (0) a	0 (0) a	0 (0) a
3 min+ luz	100 (87) a	0 (0) bc	0 (0) a	0 (0) a	20 (1) a	0 (0) a
5 min + osc	20 (10) b	100 (98) a	0 (0) a	0 (0) a	0 (0) a	0 (0) a
5 min + luz	100 (85) a	0 (0) bc	0 (0) a	0 (0) a	20 (1) a	20 (1) a

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. El valor fuera del paréntesis representa la frecuencia de ausencia o presencia del evento, y el valor en paréntesis el promedio por eje embrionario con dicho evento. La letra esta dada por la frecuencia.

La mejor respuesta al co-cultivo con *A. tumefaciens* se obtuvo en luz, ya que a los 15 días se presentó una menor frecuencia de mortalidad de ejes embrionarios de frijol en comparación con el co-cultivo en oscuridad, además, no se encontraron diferencias para las características: oxidación, blanqueamiento y presencia de callo en el ápice.

Se encontró que un incremento en el tiempo de ultrasonido y la presencia de *Agrobacterium*, reduce la frecuencia de ejes embrionarios con presencia de callo en la zona de nudo cotiledonar (Cuadro 5), mientras que a menor tiempo de ultrasonido la frecuencia de ejes con presencia de brotes en el ápice fue menor, pues a 60 segundos no existieron ejes con brotes en el ápice, mientras que en los demás tratamientos si existió presencia de brotes tanto en el ápice como en el nudo cotiledonar. El tratamiento que permitió tener una respuesta óptima a la infección con *A. tumefaciens* fue el de 5 minutos de ultrasonido y 5 minutos de infiltración por vacío para, pues generó mayor frecuencia de ejes con presencia de brotes en la zona de nudo cotiledonar (45 %), logrando obtener hasta un promedio de 1.2 brotes por esta zona (Cuadro 5).

Cuadro 5. Respuesta al cultivo *in vitro* después de la infección y co-cultivo en luz, a los 15 días del co-cultivo con la cepa LBA4404.

Ultrasonido + 5 min vacío	Oxidación	Blanquea- miento	Callo		Brotes	
			Ápice	Nudo Cotiledonar	Ápice	Nudo Cotiledonar
60 seg	100 (68.5) ^z a	0 (0) a	0 (0) a	45 (1.1) a	0 (0) b	15 (1) ab
90 seg	100 (76) a	5 (10) a	5 (1) a	30 (1.2) ab	35 (1.3) a	25 (1) ab
3 min	100 (86) a	0 (0) a	0 (0) a	15 (1) b	20 (1.5) a	10 (2) b
5 min	95 (72.4) a	100 (60) a	5 (1) a	5 (1) c	20 (1.5) a	45 (1.2) a

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. El valor fuera del paréntesis representa la frecuencia de ausencia o presencia del evento, y el valor en paréntesis el promedio por eje embrionario con dicho evento. La letra esta dada por la frecuencia.

3.3.4 Obtención de plantas transgénicas

Con la finalidad de corroborar que la selección era efectiva, se colocaron ejes sin infectar sobre medio de selección y sin medio de selección. Este ensayo corroboró la excelente selección de los ejes embrionarios de frijol (Figura 4a, b), por

lo que fue confiable la selección de los ejes transformados con *A. tumefaciens*, y a los 35 días en selección se observaron brotes verdes principalmente en la zona del nudo cotiledonar (Figura 4c, d, e, d, g), y de esta zona se lograron regenerar los brotes que posteriormente fueron aclimatados (Figura 4h, i).

Para la obtención de plantas transgénicas de frijol se infectaron 2,240 ejes embrionarios de la variedad Flor de Mayo Anita, utilizando sonicación por 5 min e infiltración por vacío por 5 min, y co-cultivados por 2 días en luz a 25 °C. Después de 40 días en medio de selección se logró obtener 138 brotes resistentes a 0.5 mg·l⁻¹ de PPT (Cuadro 6), de los cuales solo se pudieron aclimatar 13 plantas debido a la persistencia de *A. tumefaciens* en los brotes, lo que provocó oxidación y necrosamiento de los brotes menores a un centímetro de longitud que habían logrado resistir 0.5 mg·l⁻¹ de PPT.

El motivo por el cual en la mayoría de los experimentos no se lograron aclimatar plantas (Cuadro 6) fue que en esos experimentos se eliminaba el tejido oxidado, lo que generaba una re-infección por *A. tumefaciens* (Figura 6b), incluso hasta la parte superior del eje embrionario, provocando la muerte de los brotes resistentes localizados principalmente en la zona del nudo cotiledonar por efecto del bloqueo de nutrientes por la presencia de la bacteria en el xilema, por ello se optó en los últimos experimentos por no eliminar el tejido necrosado en etapas tempranas, sino hasta que el brote tuviera una longitud de 2-3 centímetros o incluso dejarlo aun al momento de aclimatar los brotes resistentes al PPT (Figura 4h).

Cuadro 6. Eficiencia de transformación mediada por *A. tumefaciens* en frijol var. Flor de Mayo Anita.

Número de ejes infectados	Número de brotes resistentes a PPT	Plantas aclimatadas
156	12	0
199	13	0
149	7	0
260	16	0
180	23	0
175	12	0
161	3	0
443	26	0
172	2	1
345	24	12
2240	138	13

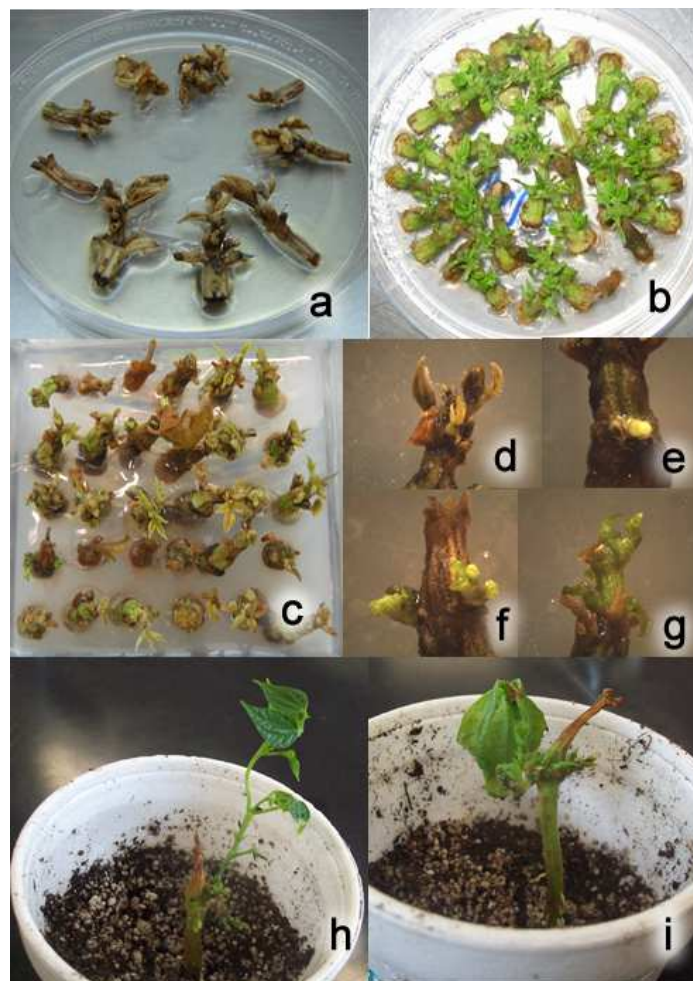


Figura 4. Selección de ejes embrionarios en PPT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ después de la infección con *A. tumefaciens*. Ejes sin infectar a los 30 días en selección (a); ejes sin infectar a los 30 días sin selección (b); ejes infectados 35 días en selección (c); sobrevivencia e inicio de la brotación a los 35 días en selección (d, e, f, g); brotes 10 días después de la aclimatación y seleccionados por 60 días en medio de selección (h, i).

Sin embargo, ninguna de las plantas aclimatadas sobrevivió mas de 25 días en condiciones ambientales aun después de haber sido aclimatadas, esto debido aun marchitamiento de los brotes por presencia de bacterias que bloquearon los sistemas de conducción de la planta, provocando un déficit hídrico y su posterior muerte, a pesar de haber aplicado una solución con $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Agri-mycin® por ser un bactericida de acción sistémica que contiene Estreptomicina y Oxitetraciclina dos potentes antibióticos usados comúnmente en la agricultura.

Se trató de rescatar los brotes al observar el escaso efecto del bactericida, pero existieron graves problemas de contaminación de los brotes rescatados principalmente por *A. tumefaciens* y hongos en condiciones *in vitro*, por lo que no pudieron sobrevivir por efecto de una elevada tasa de contaminación.

3.4 Discusión

3.4.1 Efecto de la infección sobre la regeneración

La regeneración de *P. vulgaris* se ve afectada por el tratamiento de infección, principalmente por el ultrasonido, pues se sabe que el ultrasonido puede provocar la muerte de semillas de frijol (Liu *et al.*, 2005), al generar micro lesiones (Trick y Finer, 1997) mismas que propician la formación de radicales libres (Joersbo y Brunstedt, 1992; Wu y Lin, 2002) al destruir estructuras celulares como membrana celular, citoesqueleto y mitocondria (Sawidis y Reiss, 1995) en las cuales muchas enzimas y canales iónicos son afectados (Liu *et al.*, 2003), además de que incrementa la permeabilidad de la membrana liberando el contenido celular dañado, por lo que tratamientos prolongados pueden ser letales (Meurer *et al.*, 1998; Santarem *et al.*, 1998), y en lapsos cortos puede promover la capacidad de regeneración de zonas no regerables o reducir en zonas regenerables (Ananthakrishnan *et al.*, 2007).

Para favorecer la infección se utilizó la sonicación por 5 minutos seguido de infiltración por vacío por 5 min (Liu *et al.*, 2005), y se encontró que dicho tratamiento aunado a la presencia de la bacteria disminuyeron la capacidad de regeneración de ejes embrionarios de frijol (Cuadro 7) en comparación con ejes que solo fueron crecidos en medio de inducción de callo sin ningún tratamiento de sonicación o infiltración, ni presencia de bacteria. Este tratamiento redujo sustancialmente la formación de callo tanto en el ápice (40 %) como en el nudo cotiledonar (78 %), al igual que la brotación en el nudo cotiledonar (45 %) que es la principal zona de regeneración (McClean y Grafton, 1989), mientras que la brotación en el ápice no se ve tan afectada (Cuadro 7).

En controles *in vitro* el SAAT incrementó el número de brotes tanto normales como deformes, sin una gran disminución en la sobrevivencia, y con un incremento en la formación de callos amarillos con selección, pero la capacidad de regeneración de brotes en tabaco esta influenciada por el método de introducción de genes, el SAAT estimula esta capacidad, mientras que la simple inoculación con *Agrobacterium*, biobalística o *Agrolística* (una combinación de biobalística y *Agrobacterium*) inhibe esta capacidad de regeneración de brotes, pero también esta influenciada por el explante y el medio de regeneración (Teixeira, 2005).

Cuadro 7. Efecto del tratamiento de transformación genética sobre la regeneración *in vitro* de frijol, a los 10 días después del tratamiento.

Tratamiento	Regeneración de explantes (%)					
	Formación de callo		Brotación		Oxidación	Blanqueamiento
	Ápice	NC	Ápice	NC		
Control	45 (1) ^z a	93 (1) a	35 (3.1) a	90 (1.6) a	90 (40) a	0 (0) b
Infección	5 (1) b	15 (1) b	20 (1.5) a	45 (1.2) b	90 (72.4) a	10 (60) a

^zValores con diferente letra en columna presentan diferencias estadísticas con $p=0.05$, por comparación de dos proporciones binomiales. NC= nudo cotiledonar; Infección OD₆₀₀=0.8, sonicación 5 min, vacío 5 min.

3.4.2 Efecto de la infección sobre el necrosamiento del tejido

En lo que respecta a la oxidación, el tratamiento de infección provocó 32.4% con respecto al testigo (Cuadro 7), pues se sabe que el ultrasonido puede actuar como un potente elicitor abiótico para inducir las respuestas de defensa de las células vegetales y estimular la producción de metabolitos secundarios (Wu y Lin, 2002), mismos que pueden generar un estrés oxidativo manifestado por elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son el resultado de respuestas biofísicas a estímulos físicos, y en la mayoría el incremento de la habilidad de anti-oxidación de las células se da por la estimulación del ultrasonido al generar enzimas para disminuir los ROS (Chen *et al.*, 2008), pero la viabilidad celular depende primariamente de la densidad de la energía acústica, el tiempo de exposición, y las propiedades mecánicas de las células determinadas por la edad (Böhm *et al.*, 2000). Además se sabe que los patrones de amplitud espacial de las ondas no son los mismos en todo el volumen, por lo que una mala distribución de las células puede provocar que algunas sufran mas daño por una mayor exposición a las ondas o a una mayor amplitud (Böhm *et al.*, 2000). Pero la oxidación se mantuvo a niveles bajos por efecto de la adición de antioxidantes en los diversos medios utilizados (Cuadro 1), pues se evitan las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski, 2008). Un 10 % de la oxidación puede atribuirse al efecto del ultrasonido y 46.2 % por efecto de la bacteria, y solo 16.3% por el simple manejo *in vitro* de los ejes embrionarios de frijol (datos no mostrados) por lo que el principal efecto negativo esta dado por la agroinfección.

3.4.3 Respuesta de hipersensibilidad por *A. tumefaciens*

El tipo de defensa necrótico o hipersensitivo es bastante común, los tejidos necróticos aíslan al parásito de las sustancias vivas (que lo alimentan) lo cual induce a su inanición y muerte, y cuando más rápido mueran las células del hospedero después de haber sido infectadas es más resistente a la infección (Agrios, 1986). Para el caso de frijol, se ha encontrado que es una especie susceptible a la infección (McClean *et al.*, 1991), y la reacción hipersensitiva se produce a una velocidad mucho menor y la muerte de las hojas inoculadas con *A. tumefaciens* ocurre 20 días después de la infección. Pero ejes embrionarios sonificados e infectados producen compuestos fenólicos como defensa bioquímica inducida por el ataque de la bacteria (Perl *et al.*, 1996) y daño mecánico por la sonicación, provocando la oxidación del tejido e impidiendo la regeneración *in vitro* de células transformadas, lo cual puede disminuir con la adición de antioxidantes (Das *et al.*, 2002).

En condiciones naturales, las poblaciones de *A. tumefaciens* en el interior de las plantas hospederas disminuyen gradualmente cuando se liberan al suelo en donde viven como organismo saprofítico facultativo [se multiplican mayoritariamente en el huésped pero pueden sobrevivir en restos de tejido y en el suelo (Agrios, 1986)], y se cultiva fácilmente en medio artificial en el laboratorio (Arauz, 1998) por lo que puede crecer rápidamente en el medio de cultivo *in vitro* de frijol, y en tejido vivo al igual que necrosado, lo que dificulta su control.

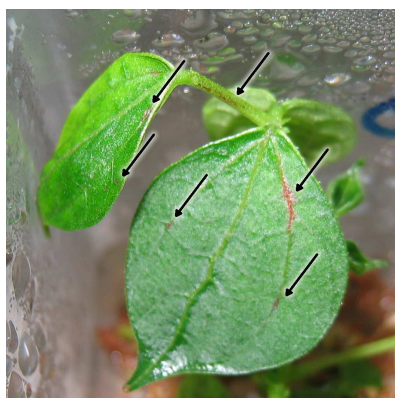


Figura 5. Respuesta de sensibilidad por efecto de la inoculación de *A. tumefaciens*. Hojas de frijol cultivados *in vitro*, se infectaron con *A. tumefaciens* LBA4404 a una $OD_{600}=1.0$, y la imagen fue tomada a las 48 horas a la infección.

Chakrabarty *et al.*, (2002) encontraron que explantes de hipocotilo de *B. oleraceae* var. Botrytis fueron más hipersensibles al cultivo de bacterias cuando no se pre-cultivaron. Los explantes mostraron necrosis y se observó 97.6 % de

mortalidad de hipocotilos. Los explantes dañados se hincharon, oxidaron, necrosaron y finalmente murieron cuando fueron directamente inoculados con *Agrobacterium* sin un pre cultivo.

La viabilidad de los hipocotilos y cotiledones generalmente disminuye con la duración del tratamiento de ultrasonido, pero el mayor efecto deletéreo sobre el tejido vegetal es causado por la presencia de la bacteria durante el co-cultivo (Beranová *et al.*, 2008), y la adición de antioxidantes al medio de cultivo aumentan las tasas de transformación por la reducción de la respuesta de hipersensibilidad (Perl *et al.*, 1996) por lo que hemos utilizado 100 mg de ácido cítrico (AC) y 150 mg por litro de ácido ascórbico (AsA) para el medio de infección (Cuadro 1) y así se logró reducir los niveles de oxidación por efecto de hipersensibilidad y/o daño mecánico (Cuadro 7), pues el AsA provee la primera línea de defensa en contra del daño de especies reactivas de oxígeno (ROS), y ayuda a proteger las células vegetales de muchos factores que inducen estrés oxidativo, incluyendo daño mecánico, ozono, salinidad, y ataque de patógenos (Suza *et al.*, 2010). Es muy necesaria la adición de AsA porque la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ocurre más rápido que la producción de ácido salicílico (SA), durante una interacción planta-patógeno (Dangl y Jones 2001), o durante la respuesta al daño mecánico o heridas (Orozco-Cárdenas y Ryan 1999). En caso de no controlarse, se puede dar la acumulación de ARNm de *PvLOX6* inducida por H_2O_2 (Porta *et al.*, 2008), el cual está involucrado en el desarrollo y defensa, e incrementa la respuesta de hipersensibilidad en frijol.

3.4.4 Transformación genética

La transformación genética de frijol siempre ha presentado grandes problemas y han sido ya varios años de intentos constantes sin lograr obtener resultados favorables; en primero porque no se había podido obtener un protocolo de regeneración *in vitro* o su eficiencia de regeneración era muy baja, y porque después de haber transformado e iniciado el proceso de regeneración los callos transformados no regeneraban o la persistencia del gen en la T1 ó T2 no era presente. Nosotros logramos obtener 138 brotes resistentes a PPT, pero solo se lograron aclimatar 13 plantas, mismas que presentaron graves problemas de re-contaminación lo que representa otro gran problema utilizando *A. tumefaciens*. Genga *et al.* (1990), evaluaron dos cultivares de frijol con diferentes razas de

Agrobacterium, encontrando su susceptibilidad, por lo que discos de hoja fueron co-cultivados, observando crecimiento de callo en medio de selección con kanamicina, y la transformación de los mismos fue confirmada por un análisis de PCR de la actividad de NPTII.

Es necesario considerar que el obtener brotes resistentes al agente de selección no siempre implica tener plantas transformadas con el gen de interés, pues en 1994, Korban realizó transformación genética mediada por *Agrobacterium* en *P. vulgaris* var ICA Pijao, utilizando el gen GUSint, obteniendo cuatro de ocho posibles transformantes con el gen GUSint después de un análisis de PCR, sin embargo no fue posible una integración estable del gen GUSint en la progenie R1.

Diego-García *et al.* (2001), transformaron nudos cotiledonares de frijol con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 y el plásmido pBI121, y reportaron una integración estable por PCR y análisis de *Southern blot*, con una eficiencia del 10 %, logrando observar la expresión del gen *uidA* por el análisis histoquímico de la actividad de β -glucoronidasa (GUS).

Además, se ha desarrollado la regeneración *in vitro* de frijol a partir de cotiledones utilizando la colección Xan 159 (CIAT), siendo 10 μ M de CPPU más 10 μ M de AIA la mejor combinación en la formación de callo, además 10 μ M de nitrato de plata favorece la mejor calidad del callo, en 114 días se logra una buena formación de callo, 60 días en medio de elongación de brotes y 30 días en enraizamiento (Guidolin, 2003), por lo que se esperaba obtener un protocolo eficiente de transformación a partir de la regeneración de forma indirecta. Se encontró que la cepa LBA4404 genera la mejor expresión del gen GUS apoyado de 60 segundos de sonicación, y la selección de los callos se realizó con 0.4 mg·l⁻¹ de glufosinato de amonio por 30 días, pero no reportan brotes transformados o plantas regeneradas modificadas genéticamente (Guidolin, 2003).

Con el objetivo de generar plantas transgénicas de frijol se han evaluado otros métodos como la electroporación de polen, en el cual se realizaron 1,108 polinizaciones, 667 con la variedad Morales y 441 con Tío Canela 75, resultando fecundadas 80 de Morales y 14 de Tío Canela 75, pero después de la evaluación con PCR, *Southern Blot*, y glufosinato, se determinó que no hubo presencia de plantas transformadas genéticamente (Aranda, 2007).

Recientemente se ha reportado la transformación genética de frijol para tolerancia al virus del mosaico dorado del frijol mediante bombardeo y con el gen de

selección *ahas* que confiere tolerancia a imazapyr, el cual actúa sobre los ápices meristemáticos, obteniendo una eficiencia de transformación de 0.66% al bombardear 2,706 ejes embrionarios con el vector pBGMVRNAiAHAS (Bonfim *et al.*, 2007).

Muchos trabajos concluyen que la transformación genética de frijol mediante *A. tumefaciens* resulta complicada, pues lo máximo que se ha podido obtener ha sido la transformación genética de callo, pero sin la capacidad de formación de brotes a partir de estos callos, por lo que aun es complicada la transformación genética de frijol común utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Aragão, 2010), aunque se ha reportado la transformación genética de frijol variedad Flor de Mayo Anita usando ejes embrionarios y transformados con el gen de defensinas de *Arabidopsis* que provee un amplio rango de protección contra hongos y bacterias, ocupando la cepa pGV2260 de *Agrobacterium* con el plásmido pKYLX80 y seleccionando con 10 mg·l⁻¹ de kanamicina para obtener seis líneas transgénicas, que presentaron 50 % menor en las lesiones causadas por *Colletotrichum lindemuthianum*, pero no reportan eficiencia de transformación (Quintero-Jiménez *et al.*, 2007).

3.3.5 Persistencia de *A. tumefaciens*

Meropenem (MEPM) y Moxolactam (LMOX) son antibióticos que han mostrado baja fitotoxicidad en cotiledones e hipocotilos de tomate a la concentración óptima para el control del crecimiento de *Agrobacterium* (25 mg·l⁻¹), además de ser efectivos para tabaco y arroz, con las cepas LBA4404 y EHA105 (Ogawa y Mii, 2007) y en naranja la cepa EHA101 se controla con 12.5 mg·l⁻¹ de MEPM (da Silva *et al.*, 2009), además se encontró que MEPM al igual que ticarcilina no afectan la capacidad de enraizamiento.

Meropenem resulta ser más efectivo que Moxolactam para el control de *Agrobacterium*, pero también puede ser más tóxico, y cuando Meropenem resulta tóxico puede ser remplazado por Moxolactam mismo que presenta buen control sobre el crecimiento de la bacteria (Ogawa y Mii, 2007).

Matzk *et al.* (1996), mostraron que *A. tumefaciens* fue detectable en tabaco transgénico crecido *in vitro* por un año después de la transformación, y encontraron que puede persistir en plantas transgénicas crecidas en suelo por 3-6 meses, por lo que concluyen que *A. tumefaciens* persiste en plantas transgénicas crecidas ex

vitrum. Barrett *et al.* (1997); también encontraron la persistencia *in vitro* de *A. tumefaciens* en *Brassica*, *Solanum* y especies de *Rubus*, además de ser detectada en 45-65 % de explantes transgénicos de cítricos (Cubero y López, 2005). También se ha encontrado su persistencia en cultivos de manzana transformada, y solo se ha podido reducir por la infiltración de los tejidos por una hora en un medio acidificado seguido por 18 horas en infiltración por vacío con 5 mg·ml⁻¹ de cefotaxima y la subsecuente incubación en medio conteniendo antibióticos (Hammerschlag *et al.*, 1997).

Se conoce que *A. tumefaciens* persiste en las plantas y puede ser difícil su eliminación utilizando antibióticos (Hammerschlag *et al.*, 1997; Leifert y Cassells, 2001). Las especies de *Agrobacterium* también son conocidas por su habilidad para sobrevivir en un gran número de diversos ambientes como el agua, la risosfera e incluso en humanos (Lehoczky, 1968; Southern, 1996; Marti *et al.*, 1999; Leifert y Cassells, 2001). Por lo tanto, si *Agrobacterium* genéticamente modificado sobrevive a una respuesta de selección con antibiótico y continua persistiendo en plantas transgénicas creciendo en campo, pueden existir complicaciones por sus repercusiones ambientales (Stewart *et al.*, 2000).

Se sabe que las poblaciones de *A. tumefaciens* declinan rápidamente en los primeros cinco días post cultivo, pero generalmente se reducen mas lento en pino, en comparación con picea. Ninguna bacteria fue detectada en tejido embriogénico de picea más allá después de cuatro semanas después del co-cultivo, sin embargo en pino existía la formación de aproximadamente 100 unidades de colonia por gramo de tejido a las 10 semanas post co-cultivación (Charity y Klimaszewska, 2005).

En los ejes de frijol transformados genéticamente utilizando *A. tumefaciens* encontramos la persistencia de la bacteria en condiciones *in vitro*, aun cuando el medio de selección contenía 25 mg·l⁻¹ de MEPM, pero en el gel la bacteria se presentaba por lo general después de 10-12 días de haber sub-cultivado a medio fresco, y esto puede deberse a la rápida degradación de este antibiótico, pues se sabe por parte del fabricante (Astra zeneca, 2010) que la vida útil del antibiótico no va mas allá de 48 horas y dicho tiempo depende de que la solución se encuentre en bajas temperaturas 4 °C, y las condiciones de incubación de los ejes se dio a la temperatura de 25 °C, por lo que su efecto en el medio de cultivo solo puede durar

menos de diez días, y esto implica que se debe de subcultivar a medio fresco en este lapso.

Para eliminar la re-colonización de la bacteria se utilizaba una solución líquida con $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MEPM, pero solo era efectiva por pocos días, pues volvía a presentarse una nueva contaminación (Figura 6), pues *A. tumefaciens* se volvió sistémica, ya que para favorecer la transformación se utilizó una combinación de sonicación mas infiltración por vacío, lo que permitió la entrada de la bacteria en el sistema de conducción (xilema y floema) de los ejes embrionarios, provocando que *A. tumefaciens* no se pudiera controlar totalmente al encontrarse dentro de los haces vasculares. Así mismo se pudo observar su desarrollo en la zona apical de los ejes embrionarios al eliminar los ápices oxidados (Figura 6b), y no fue posible controlar la bacteria aun después de haber incrementado la concentración de MEPM a $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en la solución de lavado (datos no presentados).

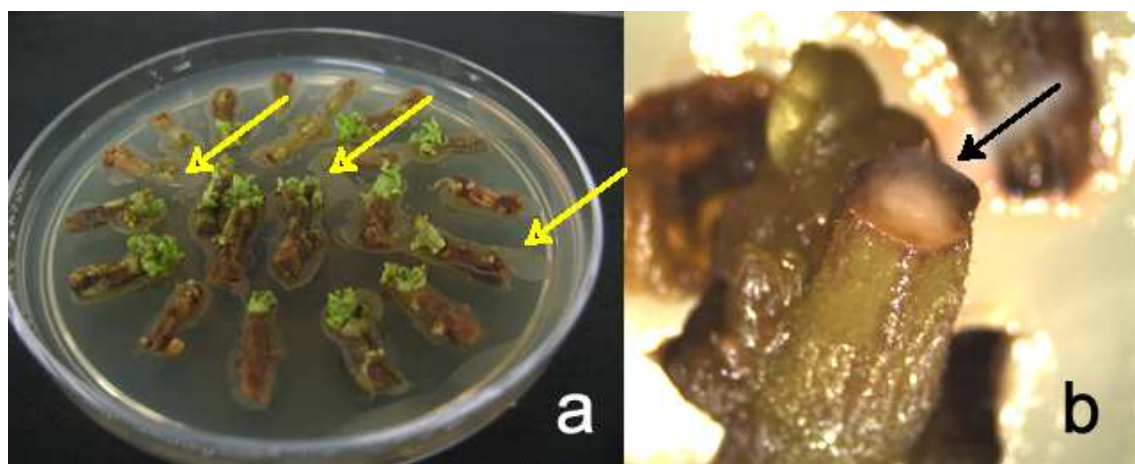


Figura 6. Persistencia de *A. tumefaciens* en ejes embrionarios *in vitro* de frijol. Re-contaminación en el medio de cultivo (a); presencia de bacteria en forma sistémica (b).

Aun con todos los problemas de re-colonización se lograron aclimatar 13 plantas, mismas que no lograron sobrevivir, pues se presentaron los mismos problemas de re-contaminación, pero los efectos solo fueron visibles hasta que las plantas mostraron severos daños de deshidratación, y al identificar el factor causal, se aplicó un bactericida agrícola, pero no fue posible controlar la contaminación y murieron, se rescataron tres brotes de tres plantas, y se cultivaron nuevamente bajo condiciones *in vitro*, pero mostraron contaminación por *A. tumefaciens* y hongos,

concluyendo que esta bacteria se vuelve sistémica si se utiliza este sistema de transformación. Para solucionar el problema de recolonización con *A. tumefaciens*, se pueden sumergir los ejes embrionarios en el medio de lavado (Cuadro 1) con 50 mg·L⁻¹ de meropenen y darles un tratamiento de infiltración por vacío por 30 min, secarlos y colocarlos en medio sólido con 25 mg·L⁻¹ de meropenen. Si esto no fuera suficiente, se puede evaluar el producto Plant Protection Mix PPM® bajo el mismo sistema y colocarlos por algunos días en un sistema de agitación constante. También se puede evaluar una mezcla de ambos productos, utilizando primero el antibiótico y después PPM® en agitación constante.

3.4 Conclusiones

Fue posible obtener elevados niveles de expresión transitoria del gen GUS, y se lograron obtener brotes de frijol en medio de selección con PPT, logrando su aclimatación, pero se presentan elevados niveles de re-contaminación con *A.tumefaciens*, pero se presentan elevados niveles de re-contaminación con *A.tumefaciens* al volverse sistémica utilizando 5 minutos de sonicación como de vacío para favorecer la transformación genética.

Literatura citada

- Agrios GN. 1986. Fitopatología. Ed. Limusa, México. 756 p.
- Ananthakrishnan G., Xia Xiaodi, Amutha S., Singer Sima, Muruganantham M., Yablonsky Sara, Fischer Erwin, Gaba Victor. 2007. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants in vitro. Plant Cell Rep 26: 267–276.
- Aragão FJL, Vianna GR, Albino MMC, Rech EL. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. Crop Sci 42:1298–1302
- Aragão Francisco J. L. 2010. Entrevista personal. Centro de Biotecnología, Universidad Autónoma de Morelos, Estado de Morelos, México, Febrero de 2010.
- Aranda Rocha Luwbia. 2007. Desarrollo de métodos para la transformación genética de frijol común a través de electroporación. Tesis para el grado de Maestro en Ciencias, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, 78 p.
- Arauz CLF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 1 ed. Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Astra Zeneca, 2010. MERONEM® I.V., 500 (Meropenem). <http://www.astrazeneca.es/> , consultada el 19 de mayo de 2010.
- Bajaj S, Targolli J, Liu LF, Ho THD, Wu R. 1999. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. Mol. Breed. 5: 493-503.

- Barrett C, Cobb E, McNicol R, Lyan G. 1997. A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens* and implications for analysis of transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47:135–144
- Beranová M, Rakouský S, Vávrová Z, Skalický T. 2008. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 94:253–259
- Böhm H, Anthony P, Davey MR, Briarty LG, Power JB, Lowe KC, Benes E, Gröschl M. 2000. Viability of plant cell suspensions exposed to homogeneous ultrasonic fields of different energy density and wave type. *Ultrasonics* 38: 629–632.
- Bonfim K, Faria JC., Nogueira EOPL., Mendes ÉA., Aragão FJL. 2007. RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6): 717–726.
- Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD, Chopra VL. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *J Biosci* 27(5):495–502
- Charity JA, Klimaszewska K. 2005. Persistence of *Agrobacterium tumefaciens* in transformed conifers. *Environ. Biosafety Res.* 4: 167–177.
- Chen B, Huang J, Wang J, Huang L. 2008. Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 61: 88–92.
- Colaco C, Sen S, Thangavelu M, Pinder S, Roser B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnol.* 10: 1007–1011.
- Crowe JH, Hoekstra FH, Crowe LM. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579–599.
- Cubero J, López M. 2005. *Agrobacterium tumefaciens* Persistence in Plant Tissues after Transformation. In *Methods in Molecular Biology*, Volume 286, Peña L. (ed.), *Transgenic Plants Methods and Protocols*, Humana Press, Inc. Totowa, NJ
- da Silva MA F, Cardoso CL, Peixoto de Oliveira ML, Campos OW, Dos Santos Soares-Filho W, Cardoso CMG. 2009. Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison to cefotaxime on plant regeneration of *Citrus sinensis* L. Osb. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 97:331–336.
- Dangl JL, Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833.
- Das DK, Reddy MK, Upadhyaya KC, Sopory SK. 2002. An efficient leaf-disk culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant cell Rep.* 20: 999–1005.
- Diego-García, E., Avendaño O., Hernández G, Lara, M. 2001. Genetic transformation of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). *American Society of Plant Biologists. Abstracts* 304. Poster.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15898–15903.
- Gatica-Arias AM, Muñoz VJ, Ramírez FP, Valdez MM. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N⁶-

- benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1): 1-8.
- Genga AM, Allavena A, Ceriotti A, Bollini R. 1990. Towards genetic transformation of bean by *Agrobacterium tumefaciens*. p. 527-536. *In: 1 International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Acta Horticulturae* 280. Milan, Italy.
- Guidolin, Altamir Frederico. 2003. Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium*. Tesis para el grado de Doctor en Ciencias, Universidad de São Paulo, Piracicaba, Estado de São Paulo – Brasil, 100 p.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ. 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130:639-648.
- Hammerschlag FA, Zimmerman RH, Yadava UL, Hunsucker S, Gercheva P. 1997. Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants and on shoot regeneration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 758–763
- Jefferson RA. 1987 Assaying chimeric genes in plants. The *gus* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:287–405.
- Joersbo M, Brunstedt J. 1992. Sonication: a new method for gene transfer to plants. *Physiol. Plant.* 85: 230-234.
- Korban M. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Thesis of Doctor of Philosophy. Department of Plant Science, McGill University, Macdonald Campus Montreal, Quebec Canada.
- Kwapata K, Sabzikar R, Sticklen MB, Kelly JD. 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 100:97–105
- Lehoczký J. 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *Phytopath. Z.* 63: 239–246
- Leifert C, Cassells A. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37: 133–138
- Liu Y, Yoshikoshi A, Wang B, Sakanishi A. 2003. Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27: 287-293.
- Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya T. 2005. The novel use of combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) with *lea* gene. *Mol Breeding* 16:189–197.
- Marti R, Cubero J, Daza A. 1999. Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 39–50
- Matkowski A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances* 26: 548-560.
- Matzk A, Mantell S, Schiemann J. 1996. Localization of persisting *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 373–381
- McClean Ph., Grafton K.F. 1989. Regeneration of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Sci.*, 60: 117-122.
- McClean P, Chee P, Held P, Simental J, Drong RF, Slightom J. 1991. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: Transformation of cotyledonary node and hypocotyl tissues. *Plant cell, tissue and organ culture* 24: 131-138.

- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep* 18:180–186
- Miranda JA, Avonce N, Suárez R, Thevelein JM, Van Dijck P, Iturriaga G. 2007. A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226:1411–1421.
- Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD, Hanson AD. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol* 2: 128–134.
- Ogawa Y, Mii M. 2007. Meropenem and moxalactam: Novel b-lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Science* 172: 564–572.
- Orozco-Cárdenas M, Ryan CA. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6553–6557.
- Ostle B. 1994. Estadística aplicada. Técnicas de la estadística moderna, cuando y donde aplicarlas. Ed. Limusa, México.
- Perl A, Lotan O, Abu-Abied M, Holland D. 1996. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Natur Biotechnol.* 14: 624-628.
- Porta H, Figueroa-Balderas RE, Rocha-Sosa M. 2008. Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*, 227:363–373
- Quintero-Jiménez A, Espinosa-Huerta E, Acosta-Gallegos JA, Guzmán-Maldonado HS, Mora-Avilés MA. 2010. Método Eficiente de Regeneración *in vitro* de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia* 44: 57-64.
- Quintero-Jiménez A, Saucedo-Ruiz M, Espinosa-Huerta E, Rodríguez-Guerra R, Guzmán-Maldonado HS, Acosta-Gallegos JA, Mora-Avilés MA. 2007. Transformación de frijol común con el gen defensina de *Arabidopsis thaliana* por medio de *Agrobacterium*. VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria REDBIO 2007 22-26 de octubre Viña del Mar, Chile.
- Santarem ER, Trick HN, Essig JS, Finer JJ. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep* 17:752–759
- Sawidis T, Reiss HD. 1995. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure, *Protoplasma* 185: 113-122.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6:410–417.
- Southern PM. 1996. Bacteremia due to *Agrobacterium tumefaciens* (Radiobacter). Report of infection in a pregnant woman and her stillborn fetus. *Diag. Microbiol. Infection Dis.* 24: 43–45
- Stewart C, Richards H, Halthill M. 2000. Transgenic plants and biosafety: science, misconceptions and public perceptions. *BioTechniques* 29: 832–843
- Suza WP, Avila CA, Carruthers K, Kulkarni S, Goggin FL, Lorence A. 2010. Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism, *Plant Physiol. Biochem.* Article in Press (2010), doi:10.1016/j.plaphy.2010.02.004
- Teixeira da Silva Jaime A. 2005. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. *Plant Science* 169: 1046–1058

- Trick HN, Finer JJ. 1997. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation. *Transgenic Res* 6:329–336
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L., Rocha- Sosa M. 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220: 245–250.
- Wu J., Lin L. 2002. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 51–57.
- Zambre M, Goossens A, Cardona C, Van Montagu M, Terryn N, 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. *Theor Appl Genet* 110(5):914–924
- Zhou J, Wang X, Jiao Y, Qin Y, Liu X, He K, Chen C, Ligeng M, Wang J, Xiong L, Zhang Q, Fan L, Wang DX. 2007. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Mol Biol* 63: 591–608.

Pagina en blanco

CAPITULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

Se logró optimizar el protocolo de regeneración *in vitro*, para poder regenerar una planta completa a partir de las pocas células que llegan a ser transformadas genéticamente, usando ejes embrionarios obtenidos de plántulas de cinco días de germinación.

La aplicación de ultrasonido con diferente tiempo de tratamiento indujo cambios en la capacidad de regeneración *in vitro*, así como en la formación de callos y brotes.

Los resultados permitieron incursionar en la transformación genética, y se generaron elevados niveles de expresión transitoria del gen GUS, y se obtuvieron brotes de frijol en medio de selección con PPT, logrando su aclimatación, pero se presentan elevados niveles de re-contaminación con *A.tumefaciens*.

Se detecto que *A.tumefaciens* se vuelve sistémica utilizando cinco minutos de sonicación como de vacío para favorecer la transformación genética

Este trabajo presenta resultados que pueden permitir la transformación genética de ejes embrionarios de frijol común, si se puede controlar eficazmente *A.tumefaciens*.