



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
INSTITUTO DE HORTICULTURA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN HORTICULTURA

TESIS

REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA Y TRANSFORMACIÓN
GENÉTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) MEDIANTE BOMBARDEO
DE MICROPARTÍCULAS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

BENJAMÍN MARTÍNEZ CASTILLO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Abril del 2014
Chapingo, México

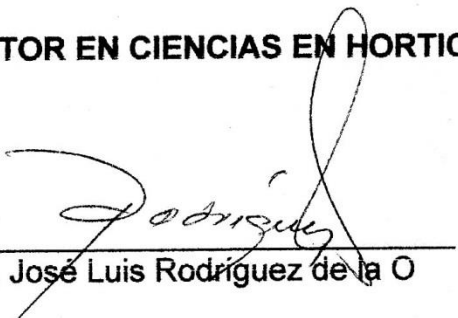
COMITÉ ASESOR DE LA TESIS DE DOCTORADO

**REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA Y TRANSFORMACIÓN
GENÉTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) MEDIANTE BOMBARDEO DE
MICROPARTÍCULAS**


Tesis realizada por M. C. Benjamín Martínez Castillo bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O


ASESOR:


Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR


Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

ASESOR EXTERNO


Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente

LECTOR EXTERNO


Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

DEDICATORIA

*“Con amor y respeto de manera muy especial,
a mi Esposa Rosalva por su Amor,
por su apoyo permanente y
por creer en mí”.*

*“Con Amor a mis hijas Claudia,
Cynthia R. y R. Lizbeth, quienes
me han dado la gran satisfacción
de ser **Padre y Abuelo**”.*

*A mi madre Esthela Castillo y a
mi Padre Benjamín Martínez (†)
con amor, cariño y respeto.
quienes me dieron la vida y.
sembraron en mí el amor por el estudio.*

*Con gran amor y cariño
a mis nietas: Frida, Ximena, Paulina,
y a mis nietos: Alan, Emiliano y Julio.*

*A mis yernos Cesar, Ismael y Saúl
a todos mis familiares y amigos.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por ser mi amigo, consejero y por apoyarme para iniciar este trabajo en su laboratorio, el cual se ha constituido como parte de mi vida. Adicionalmente, por su importante dirección del trabajo.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por ser mi amigo, consejero y que me apoyó de manera muy significativa en el desarrollo del trabajo y por sus atinadas observaciones en el desarrollo del escrito.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez por su apoyo y paciencia, por sus buenos consejos a la hora de evaluar el trabajo, la revisión del artículo y conclusión de la tesis.

Al Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente por su apoyo constante y sus atinados consejos. Por encabezar un proyecto externo que sirvió de apoyo a este trabajo.

Al Dr. Francisco J. L. Aragão por su apoyo para realizar mi estancia de capacitación en las instalaciones de EMBRAPA, Brasilia, Brasil.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por su apoyo como lector externo y sus atinados y significativos consejos en la conclusión del escrito.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma me apoyaron en todo momento para la realización de este trabajo.

A la Academia de Genética, del Área de Agronomía, Departamento de Preparatoria Agrícola, por su apoyo constante para concluir con mi doctorado.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en Monterrey, Nuevo León. Realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Ejerció como Instructor de Laboratorio por dos años en el laboratorio de Biología de la misma facultad.

El autor ha trabajado para la Universidad Autónoma de Chapingo por un periodo de 33 años en el Departamento de Preparatoria Agrícola (Áreas de Biología-Agronomía).

Realizó estudios de Maestría en Genética, en el Colegio de Posgraduados, Montecillos, México (1985-1988).

Actualmente realiza el Doctorado en Horticultura en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo (2008-2014).

Durante ese período ha realizado estancias sabáticas y de capacitación en el CINVESTAV-Irapuato, Gto; CIAT-Cali, Colombia y EMBRAPA-Brasilia, Brasil.

ÍNDICE

	PAG.
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	vi
ABREVIACIONES.....	ix
RESUMEN GENERAL.....	xii
GENERAL ABSTRACT.....	Xii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS GENERALES.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	7
HIPÓTESIS.....	8
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
2.1 El cultivo de tejidos en frijol.....	9
2.2 Regeneración <i>in vitro</i>	10
2.2.1 El cultivo de meristemas y la regeneración a través de Organogénesis directa.....	10
2.2.2 Factores que afectan la regeneración a través de Organogénesis directa.....	13
2.3 Transformación genética.....	20
2.3.1 Bombardeo de micropartículas.....	21
ARTÍCULO 1: ORGANOGÉNESIS <i>in vitro</i> EN EJES EMBRIONALES DE FRIJOL.....	24
RESUMEN.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUCCIÓN.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32

CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ARTÍCULO 2. OBTENCIÓN DE PLANTAS <i>in vitro</i> DE FRIJOL POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA DE EJES EMBRIONALES MADUROS...	44
RESUMEN.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUCCIÓN.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ARTÍCULO 3. ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POR BIOBALÍSTICA.....	72
RESUMEN.....	72
ABSTRACT.....	73
INTRODUCCIÓN.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES.....	88
BIBLIOGRAFÍA.....	90
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	92
LITERATURA CITADA.....	97
ANEXO I.....	106
ANEXO II.....	108
ANEXO III.....	109

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS	CAPÍTULO 1. PRIMER ARTÍCULO	PAG.
1	Concentraciones de BAP en diferentes medios de cultivo para la Etapa I (Medio Inductor de brotes) y II (Medio del desarrollo de brotes).....	31
2	Inducción de brotes múltiple vía organogénesis directa, longitud del epicótilo y desarrollo de raíz (morfogénesis) o callo (desdiferenciación) en hipocótilo de ejes embrionales de frijol común, <i>P. vulgaris</i> var. BAY, con diferentes concentraciones de BAP a las cuatro semanas de incubación.....	34
3	Inducción secundaria de brotes múltiples en ejes embrionales de frijol común var. BAY, transferidos de Etapa I a Etapa II.....	36
4	Resultados obtenidos en la prueba de enraizamiento de brotes inducidos en medio MSB5 suplementado con diferentes concentraciones de BAP o ANA sobre tres variedades de frijol.....	38
5	Diferentes tratamientos de BAP por etapas para obtener plantas con semillas.....	39
 CAPÍTULO 2. SEGUNDO ARTÍCULO		
1	Comparación de rangos para determinar las diferencias entre los tratamientos de BAP y TDZ en ejes embrionarios de frijol <i>P. vulgaris</i> var's. 'Flor de mayo 199' y 'Bayomex'.....	55
2	Efecto de diferentes tratamientos de BAP y TDZ en el alargamiento promedio del brote de los ejes embrionarios en	

dos variedades de frijol.....	62
-------------------------------	----

CAPÍTULO 3. TERCER ARTÍCULO

1	Diferentes condiciones de bombardeo sobre los ejes embrionarios de frijol.....	80
2	Unidades de expresión transitoria en ápice, epicótilo e hipocótilo de ejes embrionarios para dos variedades de frijol bombardeados con micropartículas de oro cubiertas con p35SGUSint, evaluados después de 48 h de incubación....	88
3	Respuesta de la expresión GUS en hojas de plantas de frijol obtenidas de semillas de plantas bombardeadas con ADN plasmídico y regeneradas de la variedades de frijol 'Flor de Mayo' y 'Bayomex'.....	87

FIGURA	CAPÍTULO 1. PRIMER ARTÍCULO	PAG.
1	Etapas del protocolo de regeneración a partir de ejes embrionales de frijol <i>P. vulgaris</i> L. a) Etapa I (temprana), ejes embrionales (EE) en etapa de inducción de brotes múltiples, b) Etapa I (tardía), EE con las partes apical y axilar en nudo cotiledonar con yemas o brotes desarrollados, c) brotes desarrollados en la parte apical y callo en la base (hipocótilo) del EE, d) Etapa II (temprana), EE en la etapa de elongación, e) Etapa III alargamiento de brotes y desarrollo de raíz simultáneamente, f) Etapa IV, Acimatación en suelo.....	40

CAPÍTULO 2. SEGUNDO ARTÍCULO

1	A) Eje embrionario utilizado como explante, B) Explantes con brotes alargado y herida necrosada, C) Explantes con callo formado en el sitio de la herida y primordios de tallo y brotes, D) Explantes con raíces formadas en el sitio de la herida, E) Explantes con grupo de brotes o yemas, y raíz o callo inducida en herida, y F) Explantes con brote desarrollado.....	54
2	Respuesta de inducción de raíz (A y B) y callo (C y D) en Etapa I a diferentes concentraciones de TDZ y BAP en ejes embrionarios de dos variedades de frijol.....	60
3	Etapas en la propagación <i>in vitro</i> de frijol por organogénesis directa a partir de ejes embrionarios de semillas maduras. El proceso completo lleva al menos 120 días para las variedades 'Flor de Mayo' y 'Bayomex.....	69

CAPÍTULO 3. TERCER ARTÍCULO

1	Plásmido p35S GUS INT. Clonación del intron portátil en el gen fl-glucuronidasa (GUS).....	79
2	Desarrollo de los meristemos de los ejes embrionarios de frijol var'ís 'Flor de Mayo' (A-D) y 'Bayomex' (E-H) entre 12 a 120 horas después de la disección.....	82
3	Diferentes explantes con expresión transitoria del gen <i>uidA</i> bombardeados con 1100 psi presión helio, un disparo y a 6 cm de distancia entre la malla de retención y los explantes....	83
4	Explantes completos y ápices con expresión transitoria, evaluados a las 72 h de incubación.....	84
5	Porcentaje de plantas regeneradas y de plantas R0/T0 que generaron semillas.....	86
6	Plantas R0 fértiles que dieron semilla (verdes), obtenidas de explantes bombardeados y regenerados. Análisis PCR de	

	siete líneas de frijol T ₂ . (6) FM-F4.3, (9) BAY-I7, (8) FM-F5, (16) BAY-H3, (14) FM-A2, (15) FM-D7/1, (7) FM-E1.....	87
7	Explantos disectados (A) para el bombardeo y su evaluación de la expresión transitoria GUS en ejes embrionarios (B) bajo diferentes condiciones de bombardeo (C-D). Explantes desarrollados (E-F), regenerados y aclimatados de la primera generación (G-H). Evaluación de la expresión transitoria GUS en pecíolo y hoja de R0/T0 (I-J). Obtención de vainas y semillas a partir de plantas R0/T0 (K-L).....	89

ABREVIACIONES

<i>ahas</i>	=	gen de resistencia a Imazapir (herbicida)
<i>uidA</i>	=	gen de la glucuronidasa
<i>nptII</i>	=	gen de la Neomicin-fosfotransferasa
$\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	=	microgramos por microlitros
$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	=	microgramos por miligramo
2,4-D	=	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	=	ácido 6-g-g-dimethylallylaminopurina
ABA	=	benziladenina
ADN	=	ácido desoxirribonucleico
AG ₃	=	ácido giberélico
AgNO ₃	=	nitrate de plata
AIA	=	ácido Indolacético
ANA	=	ácido Naftalenacético
Au	=	oro
B-5	=	medio de cultivo de Gamborg (1965)
BAP	=	6-benzilaminopurina
BAY	=	variedad Bayomex
<i>b</i> -CD	=	<i>b</i> -ciclo dextrina

cm	=	centímetros
CPPU	=	N-(2-cloro-piridil)-N-fenilurea
ET	=	expresión transitoria de genes
<i>et al.</i>	=	y colaboradores
FM38	=	variedad Flor de mayo 38
FM199	=	variedad Flor de Mayo 199
g·litro ⁻¹	=	gramos por litro
h	=	hora (s)
I.A.	=	ingrediente activo (concentración en solución de un elemento)
IBA	=	ácido indolbutírico
JA	=	ácido jasmónico
Kg·cm ²	=	kilogramos por centímetro cuadrado
Kin	=	kinetina
L.	=	Linneo
LEA	=	proteínas abundantes de la embriogénesis tardía
mg·litro ⁻¹	=	miligramos por litro
MID	=	medio Inductor de brotes
mm	=	distancia en milímetro
min	=	minutos
MS	=	medio de cultivo Murashige and Skoog (1962)
MS0	=	medio Murashige and Skoog, 1962 sin reguladores del crecimiento
MSB5	=	medio con sales de Murashige and Skoog y vitaminas Gamborg
N-6	=	medio de cultivo Chu <i>et al</i> (2000)
NaClO	=	hipoclorito de sodio
NOS	=	nopalina sintetasa
°C	=	grados centígrados
p	=	probabilidad
PCR	=	reacción en cadena de la polimerasa

PEG	=	polietilenglicol
pH	=	potencial de hidrógeno
psi	=	medida de presión de los gases como el helio
R0	=	plantas regeneradas <i>in vitro</i>
R ²	=	valor de correlación
RN i	=	ARN de interferencia
RR	=	variedad Rojo Rayado
T0	=	plantas transformadas regeneradas
T1, 2, 3...	=	plantas transformadas de 1 ^a , 2 ^a , 3 ^ageneración
TCL (CDC)	=	capa delgada de células
TDZ	=	tiadiazurón (N-fenil-N0-1, 2,3-tiadiazol-5-il-urea)
UET	=	unidades de expresión transitoria
μM	=	micro molar
μM·m ⁻² ·s ⁻¹	=	micro moles por metro cuadrado por segundo

REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) MEDIANTE BOMBARDEO DE MICROPARTÍCULAS

DIRECT ORGANOGENESIS REGENERATION OF GENETICALLY TRANSFORMED BEAN PLANTS (*Phaseolus vulgaris* L.) THROUGH MICROPARTICLE BOMBARDMENT

RESUMEN GENERAL

La transformación genética de frijol requiere de un protocolo de cultivo de tejidos para regenerar plantas completas, así como de un método eficiente de transferencia de genes. Esta especie ha sido considerada recalcitrante a ambos métodos, por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron: establecer un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente para diferentes variedades de frijol por medio de organogénesis directa y un método de transformación genética mediante bombardeo de micropartículas para frijol. Respecto al primer objetivo, a partir de cinco

GENERAL ABSTRACT

The genetic transformation of bean requires a tissue culture protocol to regenerate whole plants, as well as an efficient method of gene transfer. This species have been considered recalcitrant to both methods; therefore, the objectives of this study were to establish an efficient *in vitro* regeneration protocol for several bean varieties through direct organogenesis, and an efficient method for genetic transformation by microparticle bombardment. Regarding the first objective, from five commercial varieties grown for four weeks in medium with 10 μ M

variedades comerciales sembradas por cuatro semanas en medio con 10 μM benzilaminopurina (BAP) se eligieron a 'Flor de mayo' (FM-199) y 'Rojo rayado' (RR) con base en la inducción de brotes múltiples, cuyo porcentaje fue de 78 y 84 % (explantes con brotes), respectivamente. Además, respecto al número de brotes por explante la mejor fue 'Bayomex' (BAY) con 3.2; BAY tuvo respuestas adecuadas con 0.6 y 1.0 $\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de BAP (el callo es casi nulo y los primordios de raíz presentes). La regeneración de plantas por organogénesis directa con ejes embrionales fue promovida en medios de cultivo con sales inorgánicas MS 100 %, vitaminas Gamborg B5 (MSB5) y diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP) y de thidiazurón (TDZ), en BAY y FM el TDZ benzylaminopurine (BAP), based on the induction of multiple shoots, 'Flor de Mayo' (FM-199), and 'Rojo Rayado' (RR) bean varieties were selected, with a total of 78 and 84 % shoots per explant, respectively. However, 'Bayomex' (BAY) variety produced the highest number of shoots from explant (3.2). Bay had adequate responses at 0.6 and 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP (presence of root primordial with rarely callus formation). Plant regeneration by direct organogenesis on embryonic axis was promoted in culture media with inorganic salts MS 100 %, Gamborg B5 vitamins (MSB5) and different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ), in BAY and FM TDZ induced 2.9 and 2.5, and 1.8 BAP and 2.2 shoots per explant, respectively. The length of the apical

indujo 2.9 y 2.5, y BAP 1.8 y 2.2 brotes por explante, respectivamente. La longitud de los nudos de la parte apical se redujo significativamente cuando aumentó la concentración de ambas citocininas. En la zona del hipocotilo, la raíz se indujo con concentraciones de TDZ entre 0.41 y 1.73 μM , y entre 0.44 y 1.68 μM de BAP; y el callo se indujo entre 2.72 y 4.54 μM de TDZ y entre 2.66 y 4.44 μM de BAP. Cuando los brotes obtenidos en MSB5 con 2.72 y 4.54 μM de TDZ en FM fueron cultivados posteriormente en medio MSB5 con 2.72 μM de TDZ, éste promovió el desarrollo y la regeneración de plantas; en BAY los brotes obtenidos en medios con TDZ cultivados posteriormente en MSB5 con 0.44 μM de BAP produjeron 4.4 brotes por explante. La formación de raíz en los brotes se promovió en medio MSB5 con 0.44 μM de BAP o en medio con

nodes was significantly reduced when concentration of both cytokinins were increased. At the hypocotyl area the root was induced with TDZ concentrations between 0.41 and 1.73 μM , and from 0.44 to 1.68 μM BAP, while calli production was induced with 2.72 and 4.54 μM TDZ and between 2.66 and 4.44 μM of BAP. When shoots obtained in MSB5 with 2.72 and 4.54 μM of TDZ using FM was subsequently cultured in MSB5 media with 2.72 TDZ, regeneration and plant development was promoted. However, for BAY bean variety, the highest number of shoots (4.4 per explant) was obtained using MSB5 at 0.44 μM . Shoots toot formation was promoted both using MSB5 media at 0.44 μM or without hormones (MS0). Acclimatized plants produced flowers and seeds. Embryonic axis cultured at MSB5 with 10 μM of BAP had the

ausencia de reguladores (MS0). highest meristematic opening
Plantas aclimatadas en suelo, between 48 and 72 h; afterwards, they
produjeron flores y semillas. Los ejes were bombarded with microparticles
embrionarios cultivados en medio coated with plasmid DNA
MSB5 con 10 μ M de BAP tuvieron la (p35SGUSINT). Transient expression
mayor apertura meristemática entre (TE) of GUS reporter gene was
48 y 72 h; posteriormente, fueron detected at 87.5 % of explants, with
bombardeados con micropartículas one shot of 900 psi at 6 cm from the
cubiertas con DNA plasmídico target was performed. Units of
(p35SGUSINT). La expresión transient expression (UTE) recoded
transitoria (ET) del gen reportero GUS were 6.97 at epicotyl, 63.7 for
fue evaluada y se obtuvo 87.5 % de hypocotyl and only 0.38 in the
los explantes con ET a 900 psi, 6 cm meristem zone, therefore showing the
de distancia del blanco y un disparo; lowest efficacy. The average
por cada explante en promedio se percentage of plant regeneration
presentaron 6.97 unidades de obtained at this experiment was 68.2.
expresión transitoria (UET) por Complete plants (R0) were transferred
epicótilo, 63.7 por hipocótilo y sólo to greenhouse for acclimatization. The
0.38 en el meristemo, lo que mostró seeds were germinated "*in vitro*" and
una eficiencia muy baja. La cultured into complete plants (R1/T0).
regeneración se presentó con un Positive TE of GUS gene was
promedio de 68.2%. Plantas detected in 73.3 % of the regenerated
completas (R0) fueron transferidas plants. However, when genetically
transformed plants were subjected

al invernadero para su aclimatación. Las semillas fueron germinadas “*in vitro*” y desarrolladas a plantas completas (R1/T0), la ET del gen GUS fue evaluada en hoja y peciolo, la respuesta positiva fue 73.3 %. Finalmente, mediante PCR con un inserto del gen *nptII*, indicó que de 19 plantas adultas sólo cuatro presentaron amplificación del fragmento correspondiente, lo que demostró un bajo porcentaje de transformantes.

Palabras claves: Cultivo de tejidos, brotes múltiples, ejes embrionales, transferencia de genes, biobalística.

to PCR analyses using the NPTII gene insert, only four out of 19 adult bean plants showed amplification, thus demonstrating a low percentage of transformants.

Keywords: Tissue culture, multiple shoots, embryonic axes, gene transfer, biobalistics.

1 INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las especies más importantes de la familia de las leguminosas, fue domesticado desde hace 7000 años en dos centros de origen mesoamericano, uno en México y América Central, y otro en la región Andina. Ha sido considerada la legumbre más importante como alimento para África y América Latina, siendo una fuente importante de proteínas en los países de estas regiones (Gepts *et al.*, 2008).

Los métodos de mejoramiento genético tradicional han logrado avances importantes en el desarrollo de caracteres agronómicos de interés, sin embargo además de consumir mucho tiempo y de tener una gran labor de campo, se conjugan con una amplia gama de problemas como es la susceptibilidad a la sequía, las plagas y enfermedades, la calidad nutricional, así como la baja supervivencia de híbridos interespecíficos (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007).

Los métodos biotecnológicos ofrecen estrategias complementarias al mejoramiento clásico para mejorar la propagación, la producción y la calidad de la semilla de frijol. Sin embargo, con ciertas excepciones, se ha visto que las leguminosas y particularmente el caso del frijol, se consideran muy recalcitrantes para regenerar *in vitro*, ya que los métodos desarrollados no son

fácilmente reproducibles (Santalla *et al.*, 1998; López, 1999). Adicionalmente, para que algunas de las técnicas de transformación genética (*Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo de micropartículas) sean altamente eficientes es necesario contar con un método de regeneración que resulte en una buena diferenciación, un buen desarrollo del brote y un desarrollo completo de la planta, lo cual es un requerimiento esencial.

Dentro del cultivo de tejidos, la regeneración de frijol se ha obtenido vía organogénesis directa (McClellan *et al.*, 1989; Franklin *et al.*, 1991; Malik y Saxena, 1991; Mohamed *et al.*, 1993; Santalla *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 1998), así como por medio de organogénesis indirecta (Arellano *et al.*, 2009) y algunos reportes sobre embriogénesis somática han sido a nivel de desarrollo de embrioides (Martín y Sondahl, 1984; Malik y Saxena, 1991; López, 1999; Jacobsen, 1999). Adicionalmente, los métodos de regeneración desarrollados para otras especies del género *Phaseolus*, por ejemplo: *P. acutifolius*, *P. coccineus* y *P. polyanthus*, produjeron resultados diferentes cuando estos métodos fueron aplicados al frijol, en ciertos casos formando sólo brotes en lugar de plantas completas.

El uso de ejes embrionales con capas delgadas transversas de células derivadas de plántulas de 14 días de edad (Cruz de Carballo *et al.*, 2000) y de ejes embrionales derivados de semillas maduras (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Kwapata *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) han sido reportados, donde la eficiencia de regeneración ha sido mayor en el primer caso.

Adicionalmente se han usado cotiledones con una porción del eje embrionario como explante (Dang y Wei, 2009). En la mayoría de los protocolos, la principal citocinina usada ha sido el BAP, por su capacidad de inducir brotes múltiples.

Las propiedades del TDZ, como un regulador con efecto tipo citocinina fueron establecidas al inducir callos en la regeneración de *P. acutifolius* (Zambre *et al.*, 1998a; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000; Zambre *et al.*, 2001). También se han empleado combinaciones de TDZ y AIA para la obtención de plantas a partir de callos en cv. “Xan159” y “GN-Tara”, ambos genotipos obtenidos de cruzamientos interespecíficos entre *P. vulgaris* con *P. acutifolius*; al parecer un factor genético de la segunda especie favorece esta regeneración (Mohamed *et al.*, 1993; Zambre *et al.*, 1998b).

El tipo y concentración de reguladores del crecimiento son elementos claves en determinar la vía morfológica de la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris*. Sobre todo la organogénesis promovida por BAP y la embriogénesis por TDZ (Kwapata *et al.*, 2010). El TDZ ha demostrado ser una citocinina muy activa con bajas concentraciones, y ha sido utilizado específicamente en frijol para promover organogénesis indirecta a partir de pecíolos foliares (Veltcheva y Svetleva, 2005), organogénesis directa a partir de nudos cotiledonares (Dang y Wei, 2009) e inducir procesos morfogénicos y regeneración a partir de ejes embrionales (Kwapata *et al.*, 2010).

Los niveles moderados de citocininas favorecen el incremento del número de brotes múltiples en la parte apical (Kwapata *et al.*, 2010). Sin embargo, la inducción de callo en el sitio de la herida (hipocotilo) por la presencia de citocininas, bloquea la formación de raíz y aumenta la producción de compuestos fenólicos, lo cual causa la muerte del tejido debido a la oxidación (Arnaldos *et al.*, 2001). Por lo tanto, la presencia de callo y compuestos fenólicos son factores limitantes en la viabilidad y el enraizamiento de los brotes bajo regeneración *in vitro* en *P. vulgaris*, y posiblemente está directamente relacionado a la recalcitrancia de esta especie y de otras.

Mientras en la década de los 80's estaban siendo desarrollados los protocolos de transformación genética para algunas de las especies comercialmente importantes (jitomate, papa, etc.), dentro de la familia de las leguminosas, dichos protocolos se restringían a leguminosas forrajeras (Dale, 1984), mientras que las legumbres de grano probaron ser muy recalcitrantes a la manipulación *in vitro* (Allavena, 1984) así como a la transformación genética, como ha sido el caso para el frijol.

Una metodología fue desarrollada y se denominó “bombardeo de micropartículas”, probándose particularmente en ejes embrionales y ápices de *P. coccineus* y *P. vulgaris*, los cuales expresaron la actividad del gen reportero *uidA* de *E. coli* que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS, por su abreviación en inglés), y denota la introducción/expresión de dicho gen (Genga *et al.*, 1991a; Aragão *et al.*, 1992). En esta primera etapa de la transformación

de frijol se obtuvo expresión transitoria de genes reporteros (Bustos *et al.*, 1991; Genga *et al.*, 1991a; León *et al.*, 1991). La técnica de bombardeo mediante la aceleración de micropartículas por descarga eléctrica, también demostró cierto grado de eficiencia para introducir genes en especies de *Phaseolus* (Aragão *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1993).

El mejoramiento genético de frijol a través de ingeniería genética fue una realidad de manera efectiva a través del sistema de transformación basado en el bombardeo de micropartículas (Russell *et al.*, 1993; Aragón *et al.*, 1996, 1998 y 1999). Debido a las dificultades de regeneración de esta planta a través de organogénesis indirecta y a la imposibilidad mediante embriogénesis somática, el bombardeo de micropartículas en meristemas apicales y su regeneración (organogénesis directa) ha sido la manera para transformar y regenerar plantas transgénicas fértiles, aunque con baja eficiencia (Aragão *et al.*, 2008).

El bombardeo de los ejes embrionarios fue usado para establecer ciertas condiciones de transformación, como criterio se usó el gen reportero *uidA* al que llamaremos en lo sucesivo como GUS para evaluar la expresión transitoria y el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y la resistencia a glufosinato como genes marcadores o de selección. Considerando la susceptibilidad de los tejidos de frijol a los antibióticos, en particular a la kanamicina, se ha evitado su presencia en medios para la selección de explantes y plántulas (Russell *et al.*, 1993).

Algunos trabajos recientes sobre transformación reportaron entre 0.2 a 0.9 % en eficiencia de acuerdo con el tipo de cultivar. El uso del gen “*ahas*” (sistema de selección basado en el uso del herbicida, *Imazapir*, que selecciona de forma específica las células meristemáticas transformadas), como un gen marcador de selección, resultó en el incremento significativo de recuperación de plantas de frijol transgénicas fértiles a razón de tres veces más que con el uso de otros genes marcadores o de selección (Aragão *et al.*, 1996, 1998 y 1999).

Por lo tanto, las leguminosas siendo una familia de gran interés comercial han sido sujetas a una serie de intentos por establecer un eficiente protocolo de regeneración y de transformación genética en ciertas variedades. Las legumbres en general y *P. vulgaris* en particular, han presentado dificultades con la organogénesis y la embriogénesis somática. Sin embargo, el mayor problema es la modificación genética, la cual presenta serias dificultades debido a la ausencia de un eficiente protocolo de selección. Por lo anterior se estableció el presente trabajo con los siguientes objetivos:

OBJETIVOS:

Establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* en diferentes variedades de frijol mediante organogénesis directa.

Establecer un protocolo eficiente de transformación genética mediante bombardeo de micropartículas en frijol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer pruebas de inducción de brotes múltiples en ejes embrionales de cinco variedades de frijol.

Obtener un protocolo de regeneración eficiente mediante organogénesis directa en dos variedades de frijol.

Establecer pruebas de bombardeo de micropartículas para determinar condiciones adecuadas para la transformación con el uso del gen GUS como reportero y *nptII* como marcador de selección.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el frijol de forma particular es recalcitrante a regeneración y transformación genética; lo cual se refleja en la baja eficiencia lograda por diferentes investigadores, se requiere continuar con este tipo de investigaciones para generar protocolos de mayor eficiencia que faciliten el uso cotidiano de estas técnicas en ámbitos como el mejoramiento genético e investigación básica. Es necesario considerar que estos protocolos deberán ser particulares de acuerdo con los genotipos empleados. Así, el presente trabajo deberá

plantear, adicionalmente, la propuesta de una ruta crítica que facilite la investigación en diferentes genotipos de frijol.

HIPÓTESIS

La recalcitrancia de las leguminosas en la regeneración *in vitro* es dependiente del genotipo, y la inducción de callo y la síntesis de compuestos fenólicos a altas concentraciones de citocininas en los tejidos heridos son mecanismos que limitan la regeneración. Por lo que si la respuesta varía dependiendo del genotipo es necesario seleccionar el genotipo adecuado. Así mismo, si se inducen brotes con TDZ y se desarrollan hasta plántulas con BAP a bajas concentraciones, se aumentará el número de brotes sin dañar los explantes.

La transformación mediante bombardeo requiere de promover el mayor número de impactos en la zona meristemática para aumentar la probabilidad de éxito, por lo que el contar con una variedad con alto nivel de regeneración y área meristemática expuesta mejoraría el método de transformación. Así mismo, al ajustar la presión de gas helio (psi) para la aceleración de partículas, la cantidad de partículas, la cantidad de ADN plasmídico, la distancia al objetivo y el número de disparos se podrá incrementar el número de transformantes.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta útil para promover la inducción de variabilidad genética y la producción de híbridos interespecíficos mejorados con tolerancia a patógenos y algunas condiciones edáficas. Únicamente las legumbres forrajeras han sido consistentemente propagadas sucesivamente por medio de organogénesis directa o indirecta y embriogénesis. Sin embargo, las legumbres de grano llegan a ser recalcitrantes cuando éstas están bajo proliferación a través de estas técnicas (Chandra y Pental, 2003).

Adicionalmente se requieren trabajos de investigación para desarrollar cultivo de tejidos mediante organogénesis directa e indirecta, embriogénesis somática, cultivo en suspensión, cultivo de protoplastos, cultivo de anteras, rescate de embriones, con la finalidad de proveer protocolos de regeneración y multiplicación masiva de plantas, estudios bioquímicos y fisiológicos, producción de metabolitos y particularmente la transformación genética de plantas, para la obtención de características agronómicas favorables.

2.2 Regeneración *in vitro*

La regeneración *in vitro* de frijol se ha documentado como un proceso de baja eficiencia y pobre repetibilidad. Hammatt *et al.* (1986) sugirieron que la recalcitrancia de las leguminosas de semilla grande en la regeneración *in vitro* pudo haber resultado de su larga historia de mejoramiento y selección de genotipos de alto rendimiento, que llevó a la reducción de la variabilidad genética y a la pérdida de totipotencia por vías que no sean la meristemática.

La regeneración en especies de *Phaseolus* ha tenido dificultades desde los primeros intentos realizados por Hildebrandt en 1963 (Nagl *et al.*, 1997). Desde entonces, las referencias sobre la regeneración de plantas a partir de callos en especies de *Phaseolus* son limitadas. La composición y concentración de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, son factores determinantes para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas en los sistemas de cultivo *in vitro*. Las auxinas y citocininas, han sido los reguladores del crecimiento más utilizados (Frank y Schmölling, 1999).

2.2.1 Regeneración vía organogénesis directa

El cultivo de meristemas es una herramienta útil para la propagación en masa de plantas, la eliminación de patógenos virales (incluidas las infecciones virales originadas en las semillas de las leguminosas) y la preservación de

germoplasma (Kantha, 1982). Resultados preliminares sobre la regeneración de cultivo de meristemas en frijol fueron reportados por Kueneman (1976), Herselman y Mienie (1995), y Grum *et al.* (1998), quienes desarrollaron procedimientos para la producción de semillas libres de patógenos. La combinación de tratamiento seco de semillas, termoterapia de plántulas y cultivo de meristemas llevó a la eliminación exitosa de bacterias patógenas.

Peralta *et al.* (1978) regeneraron plantas completas a través del cultivo de meristemas apicales en un medio de cultivo suplementado con agua de coco (o agua miel) sin ningún tipo de reguladores del crecimiento, y adicionalmente determinaron el papel crucial de la luz en el proceso de regeneración. Crocomo *et al.* (1979) reportaron que la variación en la proporción de kinetina/auxina puede controlar el desarrollo *in vitro* de los ejes embrionarios. Kantha *et al.* (1981) investigaron el proceso de regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de meristemas de algunas de las más importantes leguminosas de grano, como requisito previo para la criopreservación del germoplasma. Ellos lograron la regeneración con éxito en un medio suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

Allavena y Rossetti (1983) suponen que el nivel de hormonas sintetizadas por un meristemo que produce brotes múltiples es proporcional al número de brotes regenerados. El papel de algunos aminoácidos en el proceso de regeneración de las plantas fue determinado con la adición de metionina y cisteína por separado al medio de cultivo, lo que disminuyó el porcentaje de

plantas alargadas. Rubluo y Kartha (1985) evaluaron la respuesta morfogénica *in vitro* mediante temperatura, combinaciones hormonales y tratamientos osmóticos. La regeneración de plantas se obtuvo cuando fue utilizado BAP y la temperatura óptima se estimó en 26-28°C.

Moda-Cirino *et al.* (1995) también regeneraron plantas mediante organogénesis meristemática. Benedicic *et al.* (1997) encontraron que la inducción de yemas depende de las concentraciones de BAP, 2iP y AG₃. La fuerte dependencia a las citocinina se vió implicada en el proceso de iniciación del brote y el alargamiento de brotes. La regeneración de frijol vía organogénesis de meristemas apicales transformados por el método biobalístico fue obtenida por Aragão y Rech (1997). Ellos encontraron que un pre-requisito para la transferencia eficiente del transgen dentro de las células regeneradas es que los meristemas de los brotes estén completamente abiertos para que sean accesibles al bombardeo con partículas recubiertas con el gen GUS.

La inducción de brotes en los meristemas apicales de frijol finalmente pudo lograrse mediante el cultivo de embriones maduros en presencia de las citocininas como: kinetina, zeatina y BAP (Martin y Sondahl, 1984; McClean y Grafton, 1989; Franklin *et al.*, 1991; Malik y Saxena, 1992b; Mohamed *et al.*, 1992b, 1993; Aragão y Rech 1997). Brotes múltiples fueron formados en las regiones periféricas del meristemo apical (Aragão y Rech, 1997).

2.2.2 Factores que afectan la regeneración a través de organogénesis directa

El frijol común ha sido considerado recalcitrante en su capacidad de regeneración *in vitro*, por lo que fue necesario estudiar diferentes factores, por ejemplo efecto dependiente del genotipo, el tipo de explante, edad de la planta, tipo y concentración de reguladores.

La dependencia de los protocolos al genotipo es importante, Malmberg (1979) sugirió la detección o rastreo de un gran número de líneas genéticas como primer paso hacia el desarrollo de un sistema de regeneración en frijol. Acorde con esto, Rubluo y Kartha (1985) observaron una dependencia del genotipo de los explantes de frijol en diferentes medios de regeneración. La habilidad en la regeneración depende tanto del genotipo o estado fisiológico del explante, tejido y especialización celular del cultivo como de las condiciones de cultivación (Jacobsen, 1991; Mohamed y Coyne, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Existen reportes de regeneración en el frijol común por organogénesis directa, los cuales han desarrollado plantas a partir de meristemas apicales o axilares, con el inconveniente en que estos protocolos son dependientes del genotipo por lo que su uso debe ser adaptado a diferentes variedades para lograr una eficiente regeneración (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006).

Un explante específico es un requisito importante para la regeneración con éxito de cualquier variedad o especie vegetal (Genga y Allavena, 1991).

Crocomo *et al.* (1976) cultivaron secciones de hojas de frijol, mientras que Malik y Saxena (1991) regeneraron plantas a través de organogénesis del brote a partir de explantes de hoja juvenil y pecíolo. La importancia del tratamiento subsecuente con BAP de las plántulas donantes y los explantes fue determinada, por Klu (1997), el cual regeneró plantas de frijol a través de organogénesis directa a partir del tejido nodal cotiledonal. Los estudios histológicos revelaron que los brotes fueron desarrollados a partir de células sub-epidérmicas del nódulo y confirmaron la naturaleza adventicia de estas estructuras.

Se ha obtenido el desarrollo de plantas a partir de meristemos apicales del brote de *P. vulgaris* (Kartha *et al.*, 1981; Martins y Sondahl, 1984b; Rubluo y Kartha, 1985). Así mismo, la regeneración de plantas ha sido descrita en *P. vulgaris* y *P. coccineus* a partir de nudos cotiledonares y puntas del brote (Ruiz *et al.*, 1986; Vaquero *et al.*, 1993; Fernández-Caso *et al.*, 1996), a partir de nudos cotiledonares (McClellan y Grafton, 1989; Mohamed *et al.*, 1992a), el cotiledón con eje embrionario "Split" (Franklin *et al.*, 1991; Santalla *et al.*, 1998), el eje embrionario (Mohamed *et al.*, 1992b) y a partir de pecíolos con lámina foliar (Malik y Saxena, 1991). La organogénesis directa e inducción prolífica de brotes fue observada en plántulas intactas de *P. vulgaris*, *P. coccineus* y *P. acutifolius* (Malik y Saxena, 1992 a, b).

La edad y estado fisiológicos de la planta madre pueden contribuir al éxito de la organogénesis *in vitro*. Un gran número de investigaciones fueron

llevadas a cabo con el cultivo de nódulos primarios y con tejido cotiledonar derivados de las plántulas germinadas *in vitro* (Martins y Sondahl, 1984; McClean y Grafton, 1989, Franklin *et al.*, 1991.; Kalantidis y Griga, 1993; Ebida, 1996; Klu, 1997, Ahmed *et al.*, 1998; Santalla *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 1998a; Yancheva *et al.*, 1999). Geerts *et al.* (2000) obtuvieron la regeneración de plantas a partir de embriones muy inmaduros de *P. vulgaris*.

El uso de suplementos al medio ha favorecido la regeneración. Cruz de Carvalho *et al.* (2000) desarrollaron un protocolo reproducible y eficiente con la técnica de la capa delgada de células (CDC) para la regeneración de frijol vía organogénesis directa, y propusieron cuatro factores importantes que mejoran la eficacia del protocolo: pre-cultivo del explante inicial en medio con TDZ, el uso de explantes derivados de CDC, la aplicación de BAP y el uso de AgNO₃ para el desarrollo de los brotes.

Por otra parte, se ha investigado la influencia del tipo de reguladores del crecimiento, su concentración y la interacción entre ellos en el proceso de regeneración. Saam *et al.* (1987) investigaron la influencia de algunas citocininas y auxinas en la regeneración de frijol. Un amplio rango de concentraciones de BAP ha sido capaz de inducir organogénesis. Dorneles *et al.* (1994) reportaron una correlación entre la capacidad de regeneración, el tiempo de cultivo y la concentración de BAP. Tamas *et al.* (1989) establecieron factores para la regeneración de brotes como: la correlación entre la yema axilar, el crecimiento y la orientación basal-apical de los explantes en los

medios, el crecimiento de las plantas con la aplicación exógena de los reguladores y la dirección de la polaridad del transporte de Ácido Indolacético (AIA).

La capacidad de regeneración de seis diferentes variedades de *P. vulgaris* cultivadas en medios con diferentes hormonas (2,4-D, ANA, Kin, y BAP) fue estudiada y la regeneración de brotes se observó en los medios de inducción que contiene BAP (Ruiz *et al.*, 1986). Ravnkar *et al.* (1990) y Benedicic *et al.* (1991) reportaron un efecto estimulante del ácido jasmónico sobre la capacidad de inducción de brotes. Franklin *et al.* (1991) desarrollaron un sistema de organogénesis recurrente en grano verde con glutamina como fuente de nitrógeno. En la mayoría de los casos, la regeneración fue baja aún con el uso de algunos aditivos como extracto de semilla (Crocomo *et al.*, 1976).

Por su parte Siranut *et al.* (1992) desarrollaron tres métodos diferentes para la formación de brotes múltiples. El efecto estimulante de BAP y ácido 1-naftaleno-acético (NAA) fue determinado en la regeneración de frijoles rojos. Fernández Caso *et al.* (1996) optimizaron el sistema de regeneración de brotes con precisión en términos de la resolución del BAP y GA₃ en la inducción de brotes.

Modificar el estado fisiológico inicial de las plantas fue uno de los enfoques que pudo alterar la capacidad regenerativa *in vitro* (Malik y Saxena, 1991; Mohamed *et al.*, 1992 a, b; 1996; Zhang-Zhang *et al.*, 1997; Santalla *et*

al., 1998; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Las investigaciones se centraron en el papel crucial de BAP, TDZ, y CPPU en pre-cultivo *in vitro* para la inducción de la embriogénesis o la organogénesis indirecta de frijol. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo fisiológico y molecular de las citocininas en la regeneración cuando se aplican en pre-cultivo.

Se ha propuesto que se requiere un estado fisiológico específico para que las células sean competentes para la regeneración en un esquema “ventana-tiempo” (Jacobsen, 1991). La organogénesis ha sido limitada a las regiones circundantes de tejidos embrionarios y de los pedicelos de las yemas de floración (Mohamed *et al.*, 1996), cotiledones (Mohamed *et al.*, 1992 a, b; Yancheva *et al.*, 1999), eje embrionario (Mohamed *et al.*, 1992 a, b), y los embriones inmaduros (Geerts *et al.*, 2000). Es de suponer que el cultivo en BAP, TDZ o CPPU active y/o induce la proliferación de las células competentes ya existentes en el tejido. La capacidad de regeneración de plantas se redujo drásticamente después de la germinación de semillas y el posterior desarrollo de las plantas.

La concentración específica de los reguladores es crucial. En relación a esto Kartha *et al.* (1981) promovieron el desarrollo de yemas a partir de explantes con meristemos con 10 μM BAP ($2.25 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), mientras que la regeneración de plantas ocurrió a una frecuencia de 73 % cuando los meristemos fueron cultivados en 1 μM NAA ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$). De manera similar, McClean y Grafton (1989) obtuvieron inducción de brotes múltiples en explantes

de nudo cotiledonar en medio MS suplementado con 5 μM BAP ($1.125 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$). Mohamed *et al.* (1992a) regeneraron plantas de yemas adventicias desarrolladas a partir de ejes embrionarios cigóticos en presencia de 5 μM ($1.125 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) de BAP y luego transferidas a medio sin reguladores del crecimiento. Estas plantas tuvieron una sobrevivencia del 100%. Más adelante, los mismos investigadores iniciando a partir de nudos cotiledonares sin yemas laterales, incrementaron de 2 a 5 veces el número de brotes cuando el explante fue cultivado a concentraciones de 0.25 o 1 μM CPPU o TDZ, que cuando crecieron en 5 μM BAP (Mohamed *et al.*, 1992b).

Mohamed *et al.* (1992a) indujeron brotes múltiples y regeneraron plantas fértiles a partir de ejes embrionarios en frijol “Tepary” y frijol común. Estos resultados fueron obtenidos por cultivo de ejes embrionarios en medio B5 de Gamborg suplementado con 5 o 10 μM BAP (1.12 and $2.25 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, respectivamente). El enraizamiento fue inducido en medio sin reguladores del crecimiento. De forma similar, Santalla *et al.* (1998) ensayaron un procedimiento para líneas mejoradas de *P. vulgaris* y razas de *P. coccineus*, a partir de explantes de plántulas conteniendo un cotiledón y una pequeña porción del eje embrional. Los explantes fueron cultivados en medio MS suplementado con 15 μM BAP ($3.4 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) y 2 μM GA₃ ($0.7 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$). La morfología de las yemas y brotes desarrollados fue mejor en *P. coccineus* que en *P. vulgaris* y 63 % de los brotes en ambas especies produjeron raíz.

Similares resultados fueron obtenidos por Malik y Saxena (1992b), quienes encontraron que una concentración menor de TDZ que la de BAP (10 y 80 μM , respectivamente) se requiere para obtener formación de brotes a partir de yemas de *P. vulgaris*. A bajas concentraciones, el TDZ induce la formación de brotes en el frijol común, y ha demostrado ser una citocinina muy activa (Huetteman y Preece, 1993). La proliferación y posterior desarrollo de yemas fueron inducidas cultivando estos explantes en medio suplementado con BAP y AgNO_3 (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Los efectos positivos en la producción y elongación de brotes por BAP y AgNO_3 fueron también encontrados en organogénesis indirecta inducida a partir de explantes de cotiledón (Guidolin, 2003).

La modificación del estado fisiológico inicial de la planta es una de las habilidades de aplicación para alterar la respuesta *in vitro* (Mohamed, 1990). Diferentes sistemas de regeneración para frijol han sido publicados usando el precultivo de los explantes, pero dichos protocolos han tenido una repetibilidad baja debido a la especificidad del genotipo individual (Mohamed y Coyne, 1995). La expectativa teórica del precultivo de las plantas parentales en medio con fitoreguladores se basa en la modificación de la respuesta *in vitro*, como un resultado de la ruptura de la tasa hormonal endógena, de la inducción de cambios fisiológicos o metabólicos del material vegetal. Zang *et al.* (1999) también usaron precultivo con BAP para el desarrollo de sistemas eficientes de regeneración.

Los efectos del genotipo en la capacidad regenerativa, así como en la reproducibilidad han sido factores limitantes (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Kwapata *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Kwapata *et al.* (2010) reportaron que el cultivo *in vitro* de un solo primordio de meristemo apical del brote podría producir hasta 20 brotes múltiples, que es un número relativamente mayor en comparación con el trabajo presentado anteriormente. Sin embargo, la eficiencia de regeneración *in vitro* es aún muy baja.

2.3. Transformación genética

La eficiencia de transformación genética en *P. vulgaris* es muy baja también, por lo que se considera una especie recalcitrante. Sin embargo, varios autores han reportado la transformación genética transitoria y estable de diferentes explantes de frijol (Genga *et al.*, 1990; McClean *et al.*, 1991; Franklin *et al.*, 1993; Lewis y Bliss, 1994). Hasta este momento, la falta de un sistema de regeneración confiable ha sido obstáculo importante para obtener plantas transformadas de manera eficiente.

La transformación mediada por *Agrobacterium* y el método de bombardeo con micropartículas o pistola de genes se han utilizado para la transformación genética de *P. vulgaris*. Sin embargo, ninguno de estos sistemas ha demostrado ser tan alto en eficiencia como los que se observan en la transformación genética de los cereales (Sticklen y Oraby, 2005).

2.3.1 Bombardeo de micropartículas

Debido a problemas de reinfección de los cultivos con *Agrobacterium tumefaciens* y otros obstáculos relacionados con la adquisición de competencia celular, se prefirió a menudo la transformación ya sea por bombardeo de partículas, electroporación, o captación de ADN desnudo por PEG (Genga *et al.*, 1990; León *et al.*, 1991; Aragão *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1993; Dillen *et al.*, 1995; Kim y Minamikawa, 1996; Aragão y Rech, 1997; Kim *et al.*, 1997; Saker y Kuhn, 1998). Haciendo uso de bombardeo de partículas, se obtuvo transformación estable hasta por cinco generaciones para el gen *bar*, GUS, y el gen de la proteína de la cubierta del geminivirus del mosaico dorado del grano (Russell *et al.*, 1993). La eficiencia de la transformación con bombardeo de micropartículas se ha incrementado utilizando el recubrimiento de las partículas con calcio-espermidina, una baja cantidad de partículas de oro, la concentración de ADN, la distancia entre la descarga de la cámara y la pantalla de contención y el vacío (Aragão *et al.*, 1993).

Estos investigadores transformaron con éxito *P. vulgaris* por bombardeo de partículas de embriones maduros con los genes GUS, neo (neomicin fosfotransferasa), y la albúmina 2S de la nuez de Brasil, tratando de compensar la deficiencia de metionina en las leguminosas. Dos años más tarde, obtuvieron frijol transgénico que expresaba el ARN viral en antisentido lo cual provoca un retraso en la infección viral y atenúa los síntomas del geminivirus del mosaico dorado del frijol (BGMV).

Con el bombardeo de una construcción que contiene el gen *bar*, Aragão *et al.* (1996) desarrollaron *P. vulgaris* transgénico que confiere resistencia al glufosinato de amonio, el ingrediente activo del herbicida Liberty (Aventis, Estrasburgo, Francia), el cual se utiliza a concentraciones de 500 g·ha⁻¹ en invernaderos y 400 g·ha⁻¹ en el campo. *P. vulgaris* también fue transformado genéticamente por Bonfim *et al.* (2007) utilizando horquilla de RNAi construido para silenciar la región CA₁ del genoma viral del geminivirus mosaico dorado del grano (VLB). Sin embargo de 2,706 plantas, sólo se obtuvieron 18 líneas transgénicas putativas. De las 18 supuestas plantas transgénicas, sólo una planta exhibió resistencia al virus. Los ensayos de campo de las progenies de la única planta transgénica mostraron resistencia a este virus (Aragão y Faria, 2009; Pinheiro *et al.*, 2009). Vianna *et al.* (2004) desarrollaron un enfoque para transferir el conjunto de transgenes como piezas de fragmentos de ADN, en lugar de todo el plásmido en *P. vulgaris*.

Tollefson (2011) acaba de anunciar el uso comercial de *P. vulgaris* transgénico resistente a virus del mosaico dorado desarrollado a través del ARN de interferencia mediante el bloqueo de la replicación del gen del virus (Bonfim *et al.*, 2007). Este es sin duda un paso importante en la aceptación de la bioseguridad de los transgénicos de *P. vulgaris*. Además, investigadores de Dinamarca informaron recientemente la clonación de genes del virus del mosaico común del frijol (BCMV) y su aplicación para el desarrollo de la resistencia a BCMV (Naderpour y Johansen, 2011).

Recientemente, cinco variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 'Cóndor', 'Matterhorn', 'Sedona', 'Olathe', y 'Montcalm' se transformaron genéticamente a través del bombardeo de los meristemas en los brotes apicales. Los transgenes incluyeron marcador GUS que confirmó visualmente el evento transgénico, el marcador de selección *bar* (resistencia a herbicida) utilizado para la selección *in vitro* de cultivos transgénicos y que confirmó la resistencia de las plantas a los herbicidas Liberty, y la proteína abundante de embriogénesis tardía (HVA1) de la cebada (*Hordeum vulgare*), que confiere tolerancia a la sequía con un aumento correspondiente en la longitud de la raíz de las plantas transgénicas (Kwapata *et al.*, 2012).

ARTÍCULO 1

ORGANOGENESIS *in vitro* EN EJES EMBRIONALES DE FRIJOL

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado recalcitrante a la regeneración *in vitro*, aun así, se han desarrollado protocolos para la obtención de plantas mediante la organogénesis directa cultivando los meristemos apicales. Para evaluar las respuestas organogénicas en variedades, fueron considerados tanto los explantes, como el tipo y la concentración de reguladores del crecimiento, identificando los tratamientos que permitieran la regeneración de plantas y su multiplicación, en cada una de las etapas que determinan un protocolo *in vitro*. Se evaluaron cinco variedades de frijol dentro de las cuales 'Flor de mayo 199' (FM199) y 'Rojo rayado (RR)' tuvieron el mayor número de explantes (78 y 84 %, respectivamente); además la variedad 'Bayomex' (BAY) presentó el mayor número de brotes por explante (3.6) con 10 μ M BAP. En BAY las mejores concentraciones de reguladores fueron entre 0.6 a 1.0 mg-litro⁻¹, donde la presencia de callo es nula y la formación de raíz es activa. Lo anterior permite contar con un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* lo que pudiera dirigirse a la multiplicación de plantas de este género o bien para variedades comerciales de frijol mediante la organogénesis directa.

Palabras claves: Cultivo de tejidos, regeneración, embrión, callo, diferenciación.

ORGANOGENESIS *in vitro* IN EMBRYONIC AXES OF BEAN

ABSTRACT

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is considered recalcitrant to *in vitro* regeneration; even so, protocols for the production of plants by direct organogenesis by culturing apical meristems have been developed. To evaluate the organogenic responses, number of explants, and plant growth regulators types and concentrations were scored to identify treatments which allowed regeneration of plants and their propagation, for each of the stages of the *in vitro* protocol. Five bean varieties were evaluated, from those 'Flor de Mayo 199' (FM199) and 'Rojo Rayado' (RR) showed high number of explants exhibiting shoots (78 and 84 %, respectively). However, 'Bayomex' (BAY) variety had the highest number of shoots per explant (3.6) when cultured at 10 μM BAP. BAY variety, optimal regulator concentrations varied from 0.6 to 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, where the presence of callus was almost inexistent and root formation was active. These results provide a suitable protocol for *in vitro* regeneration of bean plants that can be used for multiplication of plants of this genus or with commercial bean varieties by direct organogenesis.

Keywords: Tissue culture, regeneration, embryo, callus, differentiation.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las especies más importantes de la familia de las leguminosas como alimento para África y América Latina, siendo una fuente importante de proteínas, carbohidratos, minerales como el hierro y zinc, y algunas vitaminas (Gepts *et al.*, 2008).

Los principales protocolos de regeneración *in vitro* reportados para esta especie han sido obtenidos vía organogénesis directa (Santalla *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 1998;). La organogénesis directa es considerada como el desarrollo de meristemas apicales o axilares hasta plántulas. Se ha reportado un procedimiento eficiente de regeneración para dos cultivares de *P. vulgaris* a partir de ejes embrionales derivados de semillas maduras (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). Sin embargo, el frijol ha sido considerado recalcitrante para regenerarlo *in vitro*, debido a que los protocolos desarrollados para las otras especies de *Phaseolus* no son fácilmente reproducibles (Santalla *et al.*, 1998; López, 1999).

La habilidad en la regeneración depende del genotipo o estado fisiológico del explante, tejido y especialización celular del cultivo y las condiciones de cultivación (Mohamed y Coyne, 1995; Zhang *et al.*, 1997). Los efectos del

genotipo en la capacidad regenerativa, así como en la reproducibilidad han sido factores limitantes (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Kwapata *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Por lo que es necesario ajustar condiciones de inducción de brotes para cada variedad o elegir la mejor de acuerdo a ciertos caracteres y obtener su protocolo particular.

Otro factor importante es la elección del medio de cultivo o la manipulación de los componentes. La organogénesis directa fue obtenida usando cultivo de capa delgada de células con explantes de epicotilo, así como la proliferación y posterior desarrollo de yemas fueron inducidos cultivando estos explantes en medio suplementado con BAP y AgNO₃ (Carvalho *et al.*, 2000). Los principales medios que han sido usados son el MS (Murashige and Skoog, 1962) y B5 (Gamborg *et al.*, 1968), entre otros. La inducción de brotes múltiples vía organogénesis directa es afectada por la concentración del regulador. Mohamed *et al.* (1992a) regeneraron plantas de yemas adventicias desarrollados a partir de ejes embriogénicos cigóticos en presencia de 5 µM (1.125 mg·litro⁻¹) de BAP y luego transferidas a medio sin reguladores del crecimiento. Estas plantas tuvieron una tasa de sobrevivencia alta.

La modificación del estado fisiológico inicial de la planta es una de las habilidades de aplicación para alterar la respuesta *in vitro* (Mohamed, 1990). La expectativa teórica del precultivo de las plantas parentales en medio con fitoreguladores se basa en la modificación de la respuesta *in vitro*, como un resultado de la ruptura de la tasa hormonal endógena y de la inducción de

cambios fisiológicos o metabólicos del material vegetal. Zang *et al.*, (1999) también usaron precultivo con BAP para el desarrollo de sistemas eficientes de regeneración.

Los ejes embrionales bajo cultivo de tejidos y sujetos a heridas realizadas por cortes en los mismos, provocan la inducción de callo a altas concentraciones de citocininas. Así mismo se ha encontrado que dichos tejidos inducidos producen compuestos fenólicos para evitar la infección en los sitios de heridas. Sin embargo ambos aspectos actúan promoviendo un necrosamiento de la zona de herida y éste puede generalizarse al resto del tejido por lo que impide el desarrollo de tejido en división, crecimiento y diferenciación (Kwapata *et al.*, 2010). Lo anterior puede afectar el desarrollo de las etapas posteriores.

Por lo que los objetivos de este trabajo fueron definir la (s) variedad (es) de frijol óptimas para realizar las pruebas de regeneración, las concentraciones y el tipo de regulador, el rango de tratamientos en el cual la presencia de raíz y ausencia de callo permita mejorar la ruta del protocolo de regeneración, así como definir las diferentes etapas de dicho protocolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cinco variedades de frijol: Flor de Mayo 199 y 38, Bayomex, Pinto y Rayado Rojo, proporcionadas por el Dr. Luis Manuel Serrano Covarrubias, Universidad Autónoma Chapingo.

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70 % por 1 min, después fueron colocadas en NaClO 5 % (Cloralex, 6 % I.A.) por 20 min, y fueron lavadas 5 veces con agua destilada estéril. Adicionalmente, las semillas desinfectadas fueron embebidas en agua destilada estéril por 24 h y después fueron transferidas a la campana de flujo laminar para disectar los ejes embrionales con la eliminación de la testa, los cotiledones, las plúmulas y una parte de la radícula.

Inducción de brotes múltiples en Etapa I

Las semillas de la variedad 'Bayomex' (BAY), 'Flor de Mayo 199' (FM199), 'Flor de Mayo 38' (FM38), 'Pinto', 'Rayado Rojo' (RR) fueron desinfectadas y embebidas por 24 h en medio MSB5 líquido complementado con 1 μ M de BAP. Posteriormente fueron disectados los ejes embrionales. Estos fueron transferidos a cajas Petri con medio MSB5 con BAP 10 μ M e incubados bajo condiciones de fotoperiodo 16/8 h de luz oscuridad a 26 ± 2 °C

durante cuatro semanas para determinar porcentaje de explantes que presentan brotación en cada variedad, así como determinar brotes por explante que se formaron en la parte apical.

Inducción de yema o brote múltiple, callo o raíz

Para establecer la concentración de regulador que marca el límite entre la formación de raíz y la ausencia de callo en el sitio de la herida. Las semillas de BAY fueron desinfectadas y los ejes embrionales disectados. Estos fueron colocados en cajas de Petri con medio MSB5 suplementado con sacarosa 30 g·litro⁻¹, a un pH 5.8 ± 0.1 solidificado con agar 7 g·litro⁻¹ (MIB = medio inductor de brotes) y diferentes concentraciones de BAP entre 0.06 y 79.84 µM (0.01 hasta 17.98 mg·litro⁻¹) para la Etapa I (inducción de brotes), periodo comprendido entre el embrión disectado y la inducción de los brotes (Cuadro 1). Las cajas fueron incubadas en el cuarto de crecimiento por espacio de 4 semanas con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad a 24 ± 2°C, para inducir la brotación múltiple.

La evaluación del material se realizó considerando los siguientes parámetros: número de brotes por explante, longitud del explante y aparición de raíz o callo en la zona de corte del hipocótilo, obteniendo sólo los promedios de rangos dentro de los tratamientos.

Cuadro 1. Concentraciones de BAP en diferentes medios de cultivo para la Etapa I (Medio inductor de brotes) y II (Medio del desarrollo de brotes).

Benzilaminopurina (BAP)					
MIB Etapa I			MDB Etapa II		
Tratamiento	μM	$\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$	Tratamiento	μM	$\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$
A0	0	0	A2	0.06	0.01
A2	0.06	0.01	A3	0.09	0.02
A3	0.09	0.02	A4	0.15	0.03
A4	0.15	0.03	A5	0.26	0.05
A5	0.26	0.05	A6	0.40	0.09
A6	0.40	0.09	A7	0.65	0.14
A7	0.65	0.14	A8	1.08	0.23
A8	1.08	0.23	A9	1.69	0.38
A9	1.69	0.38	B1	2.74	0.61
B1	2.74	0.61	B2	4.43	1.00
B2	4.43	1.00			
B3	7.18	1.61			
B4	11.61	2.61			
B5	18.80	4.23			
B6	30.41	6.85			
B7	49.22	11.08			
B8	79.84	17.94			

Los explantes evaluados fueron transferidos a medios MDB (medio de desarrollo de brotes) en Etapa II, que comprende el periodo en donde los entrenudos se alargan y las hojas crecen, con MSB5 y diferentes concentraciones de BAP (Cuadro 1) con la finalidad de evitar el efecto de altas concentraciones de citocininas y permitir el desarrollo de los brotes pequeños, así mismo determinar su efecto sobre el proceso de regeneración. Adicionalmente se determinó su capacidad de enraizamiento con el mismo medio u otro de forma adicional en la etapa II. Finalmente, los brotes desarrollados se colocaron para aclimatación en vasos de unicel con turba y

posteriormente en macetas con suelo esterilizado hasta la formación de semillas.

Análisis Estadísticos

Los diferentes rangos de tratamientos de la Etapa I o de inducción de brotes primarios y la longitud de los explantes, así como los rangos de tratamientos de la Etapa II o de desarrollo de brotes e inducción de brotes secundarios fueron evaluados mediante un análisis de varianza para determinar si se presentaron diferencias significativas en al menos dos rangos de tratamientos. Así mismo se usó la Prueba de separación de medias de Tukey entre promedios de brotación y longitud de explantes en las Etapa I y II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organogénesis directa

Inducción de brotes múltiples en Etapa I

La respuesta promedio de los ejes embrionales en cuatro variedades de frijol fue de 84, 78, 72 y 66 % de explantes con brotes, en RR, FM 199, 'Pinto' y

FM38, respectivamente. Por otra parte, el mejor promedio de brotes por explante fue en 'Bayomex' con 3.6, superior al resto de las variedades con valores de 2.2, 2.36, 2.57 y 2.61 en FM38, 'Pinto', RR y FM199, respectivamente.

En ciertos trabajos, las variedades del grupo de los frijoles pintos como la var. 'Olathe' han sido seleccionados como modelo de trabajo en transformación genética (Aragão *et al.*, 2008), y a pesar del interés en este grupo en el presente trabajo su promedio fue menor que RR y FM. Por lo que se consideró continuar con la variedad FM 199 por ser la que dio una de las mejores respuestas en porcentaje de explantes con brotes. Estos resultados coinciden con otros trabajos que también seleccionaron dos variedades tipo Flor de Mayo ('Anita') y Flor de Junio ('Marcela') para desarrollar un protocolo de regeneración (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). En el presente estudio se incluyó también la variedad BAY debido a que produjo el mayor número de brotes por explante.

Los resultados en la inducción de brotes múltiples para BAY con diferentes concentraciones, indicaron que entre 1.61 - 4.23 mg·litro⁻¹ se obtuvo el mayor número de brotes por explante con 8.03 ± 0.65 , en el resto de los rangos de tratamientos el número fue 3.87 ± 0.25 brotes o menor. La mayor longitud del epicotilo se obtuvo entre las concentración 0.00 - 0.02 mg·litro⁻¹ con 1.76 ± 0.10 cm. En contraste, las longitudes menores ocurrieron dentro de las

mayores concentraciones de BAP (6.85 - 17.94 mg·litro⁻¹) con 0.18 ± 0.03 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Inducción de brotes múltiple vía organogénesis directa, longitud del epicotilo y desarrollo de raíz (morfogénesis) o callo (desdiferenciación) en hipocotilo de ejes embrionales de frijol común, *P. vulgaris* var. BAY, con diferentes rangos de concentraciones de BAP (6-benzilaminopurina) a las cuatro semanas de incubación.

Etapa I MSB5 (mg·litro ⁻¹)	† Brotes/ explante	†† Longitud del Epicótilo (cm)	Observación (Hipocótilo con raíz o callo)
0.00 - 0.02	1.63 ± 0.32 ^{cd}	1.76 ± 0.10 ^a	Raíz
0.03 - 0.09	1.78 ± 0.16 ^{cd}	0.99 ± 0.60 ^{ab}	Raíz
0.14 - 0.38	1.32 ± 0.50 ^d	0.53 ± 0.38 ^b	Raíz y/o Callo
0.60 - 1.00	2.82 ± 0.83 ^{bc}	0.37 ± 0.045 ^b	Raíz y/o Callo
1.61 - 4.23	8.03 ± 0.65 ^a	0.31 ± 0.13 ^b	Callo
6.85 - 17.94	3.87 ± 0.25 ^b	0.18 ± 0.03 ^b	Callo

ANAVA † (F = 73.69 vs F_{0.01} = 5.06) DS** y †† (F = 11.86 vs F_{0.01} = 5.06) DS**. Prueba de Tukey

A medida que la cantidad de brotes aumentó, la longitud del entrenudo se redujo. Esta respuesta se asoció con la concentración de las citocininas, las cuales promueven la formación de yemas que se desarrollan en brotes en el explante, sin embargo actúan antagónicamente con las auxinas endógenas las cuales no promueven el alargamiento de la parte apical. Entonces se vuelve necesario revertir la inhibición de alargamiento promovida por la alta concentración de citocininas para que el desarrollo de los brotes se promueva y permita su posterior enraizamiento.

La respuesta de inducción de raíz en la zona del corte del hipocótilo fue entre 0 a 0.6 mg·litro⁻¹, y se presentó poca raíz entre 0.14 y 0.6. Así mismo,

entre 1.0 y 17.94 mg·litro⁻¹ se presentó la formación de callo, siendo mayor conforme la concentración de citocinina aumentó, sólo en un tratamiento se presentaron ambos procesos de inducción de raíz y formación de callo (Cuadro 2).

Los resultados anteriores muestran cuando empieza a declinar la formación de raíz (morfogénesis) y a crecer el callo (desdiferenciación), producto del aumento de la concentración de citocininas exógenas y su interacción con las concentraciones de auxinas y citocininas endógenas. Se observó el límite donde ya no se promueve callo y se presentó la formación de primordios de raíz, lo anterior permitió establecer una prueba que pueda hacer más eficiente el protocolo de regeneración. Este tipo de efectos no han sido explicados por lo que es necesario seguir realizando pruebas con el fin de determinar con precisión los factores que promuevan una eficiencia en el protocolo de regeneración y evitar aquéllos que impiden un buen desarrollo de los explantes, lo cual reduce la eficiencia en la regeneración (Kwapata *et al.*, 2010)

Desarrollo de los brotes (Etapa II)

Los explantes con mayor número de brotes presentaron reducción en la longitud de entrenudos mientras que en los explantes con menor número de brotes la longitud fue mayor, por lo que fue necesario buscar disminuir el

alargamiento de los explantes con el fin de aumentar el número de brotes por explantes y posteriormente aumentar el tamaño de los mismos. Así mismo, fue necesario establecer un experimento donde se redujo la concentración de BAP en los medios de desarrollo del brote (Etapa II).

Los resultados obtenidos en medios con alta concentración de BAP ($17.942 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) mostraron que era necesario reducir la concentración hasta $1.8 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ lo que promovió un aumento de 3 a 4 brotes por explante en esta segunda etapa, sin embargo, el cultivo en medios con concentraciones de BAP ($0.618 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) transferidos a medios con concentraciones bajas de BAP ($0.0901 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) aumentó hasta en 5 brotes más y se mantuvo el desarrollo de los explantes. Aun así de acuerdo al análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Un trabajo anterior se encontró que de forma general con concentraciones altas de citocininas en la segunda etapa se llegan a desarrollar hasta 10-12 brotes por explante, sin embargo la eficiencia de regeneración siguió siendo baja (Mohamed *et al.*, 1992).

Cuadro 3. Inducción secundaria de brotes múltiples en ejes embrionales de frijol común var. 'Bayomex', transferidos de Etapa I a Etapa II.

ETAPA I	ETAPA II	Brotos / Explantes
BAP ($\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)	BAP ($\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)	
0.15	0.016	2.57 ± 1.1 ^{NS}
0.61	0.09	3.63 ± 1.42 ^{NS}
2.57	0.24	3.07 ± 0.55 ^{NS}
6.62	0.65	2.1 ± 0.66 ^{NS}
17.94	1.8	3.00 ± 0.71 ^{NS}

ANAVA (F calc.= 3.10 vs $F_{0.05} = 3.48$: NS). Prueba de Tukey (W = 6.99).

Por lo tanto, fue considerado probar en el siguiente experimento los tratamientos entre 0.01 a 1.0 mg·litro⁻¹ con el fin de inducir brotación y mantener el proceso morfogénico en el explante, y con la ausencia de callo se reducen los riesgos de daño en el desarrollo de los brotes. Adicionalmente, era importante incluir el TDZ en los medios de la primera etapa, ya que tiene un efecto tipo citocinina con la inducción de procesos morfogénicos y ha sido recomendado ya que formó 2 o 3 veces más brotes que el BAP (Mohamed *et al.*, 1992), lo que permitiría aumentar el número de brotes que promueve BAP en la etapa I. Además fue factible manejar la etapa II con la reducción en la concentración de citocininas (BAP), con el fin de aumentar el número de brotes y la frecuencia de regeneración.

Enraizamiento (Etapa III)

Brotes desarrollados en Etapa II fueron disectados y colocados en diferentes medios, sin reguladores o con la adición de auxina (ANA), la cual ha sido recomendada para el enraizamiento en frijol. Los resultados obtenidos mostraron que la inducción de raíz en los brotes fue independiente del genotipo y de la concentración inicial de BAP en el medio inductor de brotes (MIB). Se aplicaron a los medios bajas concentraciones de BAP en Etapa I y II, en la tercera etapa III (enraizamiento) a los medios se les adicionaron bajas concentraciones de ANA y se observó un buen desarrollo de raíz (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados obtenidos en la prueba de enraizamiento de brotes inducidos en medio MSB5 suplementado con diferentes concentraciones de BAP o ANA sobre tres variedades de frijol.

Variedad	Etapa I (MIB) BAP (μM)	Etapa II (MDB) BAP (μM)	Etapa III ANA (μM)	Respuesta [∞]
BAY	0.1	1.0	0.03	+++
BAY	0.1	1.0	0.0	++
BAY	0.24	1.0	0.0	--

[∞]Enraizamiento: (--) nulo, (+) pobre, (++) regular y (+++) bueno.

Los resultados obtenidos muestran la importancia de las auxinas en el enraizamiento de frijol, cuando se inicia un protocolo con BAP 10 μM en Etapa II y se redujo a 5 μM en la etapa II para el desarrollo del explante se requirió el uso de GA₃ o ANA junto con una baja concentración de BAP (1 μM) para promover su alargamiento, ya en la etapa III (enraizamiento) se usó un medio con auxinas (ANA) y fue mejor el desarrollo de la raíz que con el medio sin reguladores (Mohamed *et al.*, 1992a).

Aclimatación

Las plantas desarrolladas y enraizadas en medio sin reguladores MS0 o con muy baja concentración de BAP en Etapa III, fueron trasplantadas para su

aclimatación y se mantuvieron en el invernadero hasta la obtención de semilla.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 5.

Sólo tres rutas con diferentes tratamientos con BAP permitieron obtener plantas que produjeron vainas y semilla fértil: 17.94-2.62-0; 0.03-0.03-0.01 y 0.01-0.01-0.01 (Cuadro 5). Etapas del protocolo de regeneración a partir de ejes embrionales de frijol (*P. vulgaris* L.) (Figura 1). Es posible que sea necesario establecer pruebas de manejo adecuado en invernadero con la finalidad de que las plántulas lleguen a ser fértiles, ya que puede haber un efecto negativo al usar diferentes rutas de regeneración o diferentes tipos o concentraciones de los reguladores.

Cuadro 5. Diferentes tratamientos de BAP por etapas para obtener plantas con semillas

Etapa I	Etapa II	Etapa III	Morfogénesis	Observación
BAP [†] . (mg·litro ⁻¹)	BAP (mg·litro ⁻¹)	BAP (mg·litro ⁻¹)		
17.94	2.6	0	Raíz	Semilla *
1.24 a 11.08	1	0	Raíz	Sin semilla
0.03	0.03	0.01	Raíz	Semilla *
0.02	0.15	0.01	Raíz	Sin semilla
0.01	0.01	0.01	Raíz	Semilla *

[†]6-benzilaminopurina

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se seleccionaron las variedades de frijol 'Flor de Mayo' 199 y 'Bayomex' por

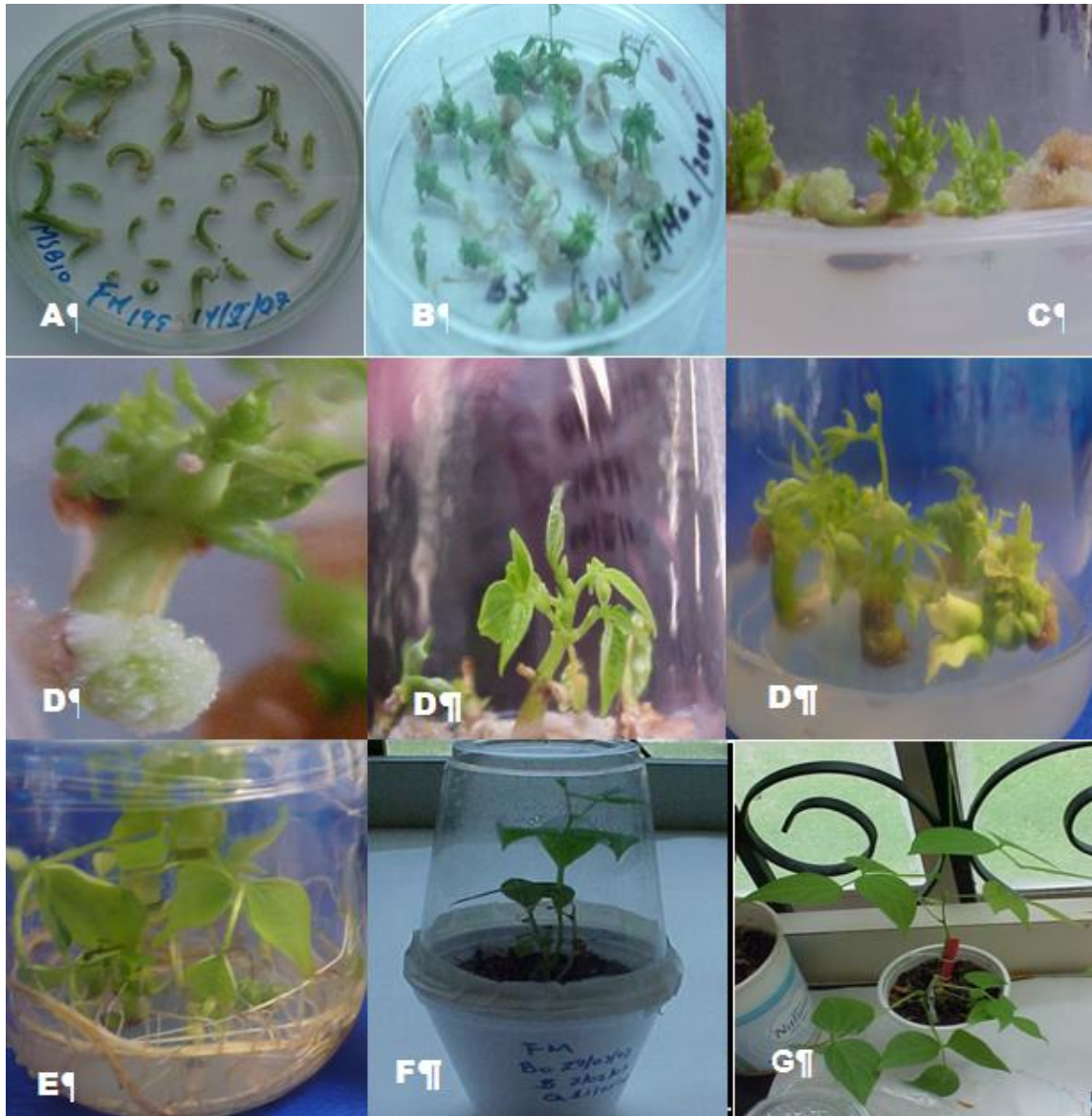


Figura 1. Etapas del protocolo de regeneración a partir de ejes embrionales de frijol (*P. vulgaris* L.) a) Etapa I, ejes embrionales (EE) en etapa de inducción de brotes múltiples, b) Etapa I, EE con las partes apical y axilar en nudo cotiledonar con yemas o brotes desarrollados, c) brotes desarrollados en la parte apical y callo en la base (hipocótilo) del EE, d) Etapa II, EE en la etapa de elongación, e) Etapa III alargamiento de brotes y desarrollo de raíz simultáneamente, f) Etapa IV, Aclimatación en suelo. g) planta regenerada.

presentar un buen porcentaje de respuesta y buen desarrollo de brotes por explantes, respectivamente. Se encontró una relación directa entre la concentración de BAP y el número de brotes por explante, al aumentar la concentración de citocininas disminuye la longitud de los explantes y

particularmente de los entrenudos. Es factible revertir los efectos de las citocininas en la etapa de inducción (Etapa I) disminuyendo su concentración en la etapa de desarrollo (Etapa II). El enraizamiento fue mejor con el uso de ANA a bajas concentraciones aunque también es recomendable el uso de medios sin reguladores.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAGÃO F., J.L.; VIANNA G., R.; RECH E., L. 2008. High-efficiency transformation by biolistic of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3 (3): 410-418.
- CRUZ DE CARVALHO, M.H.; VAN-LE, B.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.T.; THANH-VAN, K.T. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159: 223–232.
- DELGADO-SÁNCHEZ, P.; SAUCEDO-RUIZ, M.; GUZMÁN-MALDONADO S., H.; VILLORDO-PINEDA, E.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; FRAIRE-VELÁSQUEZ, S.; ACOSTA-GALLEGOS J., A.; MORA-AVILÉS, A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 170: 822-827.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GEPTS, P.; ARAGÃO F., J.L.; DE-BARROS, E.; BLAIR M., W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. 2008. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. P.H., R. MING (eds.), *Genomics of Tropicals Crop Plants*, Springer. 113-143.
- KWAPATA, K.; SABZIKAR, R.; STICKLEN, M.B.; KELLY, J.D. 2010. *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 97–105.
- LÓPEZ M., L. 1999. Inducción y propagación *in vitro* de frijol *Phaseolus vulgaris* L. por embriogénesis somática, Tesis de licenciatura, CINVESTAV, Irapuato, Gto., México. 124 p
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D. P. 1992a. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *Journal American Society Horticultural Science*. Alexandria, Va. The Society 117 (4): 668-672.

- MOHAMED M.,F.; COYNE, D. P. 1995. Photoperiod sometimes influences common bacterial blight disease of beans. *HortScience* 30: 551-553.
- MOHAMED, M.F. 1990. Improved recovery of interspecific hybrid plants in *Phaseolus* on medium supplemented with growth regulators. *Assiat J. Agric. Sci* 21, 373–387.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473–493.
- QUINTERO-JIMÉNEZ, A.; ESPINOSA-HUERTA, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; GUZMÁN-MALDONADO, H.S.; MORA-ÁVILÉS, M.A. 2010. An improved method for *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia* 44: 57-64.
- SANTALLA, M.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. 1998. Efficient *in vitro* regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102: 195-202.
- ZAMBRE, M.A.; CLERQ, J.; VRANOVA, E. 1998. Plant regeneration from embryo derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (“common bean”) and *Phaseolus acutifolius* A. Grey (tepariy bean). *Plant Cell Rep* 17: 626–630.
- ZHANG-ZHANG, Y.; XING, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56: 37-46.
- ZHANG-ZHANG, Y.; COYNE, D.P.; MITRA, A.; ZHANG, Z.Y. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 122: 300-305.

ARTÍCULO 2

OBTENCIÓN DE PLANTAS *in vitro* DE FRIJOL POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA DE EJES EMBRIONALES MADUROS

RESUMEN

La regeneración de plantas de frijol por organogénesis directa con ejes embrionales, en variedades 'Flor de Mayo' (FM) y 'Bayomex' (BAY), fue promovida en medios de cultivo con sales inorgánicas MS 100 %, vitaminas Gamborg B5 (MSB5), seis concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP) y seis de tidiazurón (TDZ) entre 0 a 5 μM . El TDZ indujo 2.9 y 2.5 brotes por explante, mientras que BAP indujo 1.8 y 2.2 brotes en BAY y FM, respectivamente. La longitud de los nudos de la parte apical se redujo significativamente cuando la concentración de ambas citocininas aumentó. En explantes provenientes de la zona del hipocotilo, la raíz se indujo con concentraciones de TDZ entre 0.41 y 1.73 μM , y entre 0.44 y 1.68 μM de BAP; mientras que el callo se indujo entre 2.72 y 4.54 μM de TDZ y entre 2.66 y 4.44 μM de BAP. En los brotes obtenidos en MSB5 con 2.72 y 4.54 μM de TDZ en FM y cultivados posteriormente en medios MSB5 con 2.72 μM de TDZ, se promovió el desarrollo y la regeneración de plantas; mientras que en BAY los brotes obtenidos en medios con TDZ cultivados posteriormente en MSB5 con 0.44 μM de BAP se aumentó a 4.4 brotes por explante. La formación de raíz en los brotes se promovió en Medio MSB5 con 0.44 μM de BAP así como en

medio en ausencia de reguladores (MS0). Plantas completas fueron aclimatadas en suelo, las cuales posteriormente produjeron flores y semillas.

Palabras Claves: Cultivo de tejidos, regeneración, citocininas, brotes múltiples.

OBTENTION OF *in vitro* BEAN PLANTS THROUGH DIRECT ORGANOGENESIS FROM MATURE EMBRYONIC AXES

ABSTRACT

Regeneration of bean plants through direct organogenesis from embryonic axes, on two varieties, 'Flor de Mayo' (FM) and 'Bayomex' (BAY), was promoted when cultured in media with 100 % MS inorganic salts, B5 Gamborg vitamins (MSB5), six concentrations of benzylaminopurine (BAP), and six of thidiazuron (TDZ), from 0 to 5 μM . TDZ induced 2.9 and 2.5 shoots per explant, while 1.8 and 2.2 BAP induced shoots in BAY and FM, respectively. Apical nodes length was significantly reduced when concentration of both cytokinins increased. In explants from hypocotyl area, root was induced with concentrations 0.41 and 1.73 μM TDZ or 0.44 to 1.68 μM of BAP; while callus formation was promoted when cultured at 2.72 and 4.54 μM of TDZ or 2.66 a 4.44 μM of BAP. In the shoots MSB5 obtained in with 2.72 and 4.54 μM TDZ in FM and then cultured in media with 2.72 μM MSB5 TDZ, promoted the development and regeneration of plants; while when BAY shoots obtained in media with TDZ were subsequently

cultured at MSB5 with 0.44 μM of BAP, an increase of 4.4 shoots per explant was obtained. Shoot rooting was promoted both using MSB5 medium with 0.44 μM of BAP, and also culturing at medium without regulators (MS0). Regenerant plants were acclimatized in soil, which in turn produced flowers and seeds.

Key words: Tissue culture, regeneration, cytokinins, multiple shoots.

INTRODUCCIÓN

El frijol es una de las principales leguminosas de grano para consumo humano en América Latina, África y Asia. Representa una fuente importante de proteínas y minerales, tales como hierro y zinc, y de ciertas vitaminas (Gepts *et al.*, 2008). Sin embargo, el desarrollo de la planta y la producción de semillas son limitados por patógenos (virales, fúngicos o bacterianos), insectos, sequía y deficiencias nutricionales. En este contexto, el uso de cultivo de tejidos para la regeneración de plantas y la ingeniería genética para la introducción de genes que confieran características sobresalientes, los cuales no siempre es posible incorporarlos con métodos de mejoramiento convencional, representan una buena opción para el mejoramiento del frijol.

Dentro del cultivo de tejidos, existen reportes de regeneración en el frijol común por esta vía, los cuales han desarrollado plantas a partir de meristemas apicales o axilares, con el inconveniente de que estos protocolos son dependientes del genotipo y su uso debe ser adaptado a diferentes variedades para lograr una eficiente regeneración (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006).

El uso de ejes embrionales con capas delgadas transversas de células derivadas de plántulas de 14 días de edad (Cruz de Carballo *et al.*, 2000) y de

ejes embrionales derivados de semillas maduras (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Kwapata *et al.*, 2010; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) han sido reportados, aunque la eficiencia de regeneración ha sido mayor en el primero caso. Adicionalmente se han usado cotiledones con una porción del eje embrionario como explante (Dang y Wei, 2009). En la mayoría de los protocolos, la principal citocinina usada ha sido el BAP, por su capacidad de inducir brotes múltiples con concentraciones entre 22.2 y 88.8 μM .

Las propiedades del tiazurón (TDZ), como un regulador con efecto tipo citocinina fueron establecidas al inducir callos en la regeneración de *P. acutifolius* (Zambre *et al.*, 1998; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000; Zambre *et al.*, 2001). También se han empleado combinaciones de TDZ y Ácido indolacético (AIA) para la obtención de plantas a partir de callos en cv. 'Xan 159' y 'GN-Tara', ambos genotipos obtenidos de cruzamientos interespecíficos entre *P. vulgaris* con *P. acutifolius*; al parecer un factor genético de la segunda especie favorece este proceso de regeneración (Mohamed *et al.*, 1993; Zambre *et al.*, 1998).

El tipo y concentración de reguladores del crecimiento son elementos claves en determinar la vía morfológica de la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris*. Sobre todo la organogénesis promovida por BAP y la embriogénesis por TDZ (Kwapata *et al.*, 2010). El TDZ ha demostrado ser una citocinina muy activa a bajas concentraciones, y ha sido utilizada específicamente en frijol para promover organogénesis indirecta a partir de peciolos foliares (Veltcheva y

Svetleva, 2005), organogénesis directa a partir de nudos cotiledonares (Dang y Wei, 2009) e inducir procesos morfogénéticos y regeneración a partir de ejes embrionales (Kwapata *et al.*, 2010).

Niveles moderados de citocininas entre 8.88 y 22.2 μM , favorecen la obtención de brotes múltiples en la parte apical (Kwapata *et al.*, 2010). Sin embargo, la inducción de altas cantidades de callo en el sitio de la herida (hipocótilo) por la presencia de citocininas (entre 4.44 y 88.8 μM), bloquea la formación de raíz y aumenta la producción de compuestos fenólicos, lo cual causa la muerte del tejido debido a la oxidación (Arnaldos *et al.*, 2001). Por lo tanto, la presencia de callo y compuestos fenólicos son factores limitantes en *P. vulgaris* para la viabilidad y el enraizamiento de los brotes bajo regeneración *in vitro*.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del BAP y TDZ en ejes embrionales de dos variedades comerciales de frijol, con la finalidad de desarrollar un sistema eficiente y reproducible de regeneración *in vitro* que permita la posterior transformación genética de estas variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de frijol de las variedades 'Flor de Mayo' (FM) y 'Bayomex' (BAY) fueron sumergidas en solución de detergente comercial por 2 min,

después se introdujeron a etanol al 70 % por un min, se adicionó hipoclorito de sodio (NaClO) 5 % de cloro comercial (6 % ingrediente activo) por 15 min, se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada y se mantuvieron en agua durante 24 h. Posteriormente, en la campana de flujo laminar, las semillas fueron desprovistas de la testa y los ejes embrionarios fueron disectados, las plúmulas y la radícula también fueron eliminadas (Figura 1 a).

Etapa I. Inducción de primordios de tallo y brotes

Los ejes embrionarios o explantes (Figura 1 b) fueron cultivados en sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con vitaminas B5 (Gamborg *et. al.*, 1968) (Medio de cultivo MSB5) adicionado con sacarosa (3 %), agar (0.7 %) con pH 5.8. El medio fue esterilizado con 121 °C (1.1 kg·cm²) por 15 min. Los tratamientos de la Etapa I consistieron en seis concentraciones de BAP (0.40, 0.66, 1.00, 1.68, 2.66 y 4.44 µM) y seis de N-fenil-N-0, 1, 2, 3,-tiadiazol-5-il-urea (TDZ) (0.41, 0.68, 1.02, 1.73, 2.72 y 4.54 µM).

Los ejes embrionarios se colocaron en cajas Petri (Figura 2 Etapa I) y se incubaron a 26 ± 2 °C bajo iluminación artificial (40 µM·m⁻²·s⁻¹) con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, durante cinco semanas (35 días), para inducir la formación de yemas o primordios de tallo y brotes. Las unidades experimentales fueron 10 ejes embrionarios en cada concentración de BAP y de

TDZ, se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones.

Fueron evaluados los números de: brotes por ápice, brotes por nudo del cotiledón y brotes totales por explante; así mismo, la presencia de raíz o callo en el área de corte del hipocótilo del explante y la longitud de la zona apical, desde el nudo del cotiledón al meristemo apical (Figura 1 a y b), no se contabilizaron las yemas ni los agrupamiento de yemas.

Etapa II. Desarrollo de los brotes a partir de yemas

Para promover el desarrollo de los brotes a partir de las yemas o primordios de tallo obtenidos en la Etapa I (Figura 1 c, d, e y f), se eliminó el callo o la raíz de los explantes antes de ser subcultivados. Para la variedad FM, los explantes provenientes de la etapa de inducción de brotes, los tratamientos con TDZ fueron subcultivados a medios MSB5 tanto con TDZ como con BAP a las mismas seis concentraciones de la Etapa I, para probar el efecto del TDZ sobre los explantes en dos Etapas sobre la regeneración. Para los tratamientos con BAP, los explantes fueron transferidos únicamente a medios MSB5 con BAP de manera correspondiente por un periodo adicional de cuatro semanas. Para la variedad BAY, tanto los tratamientos con TDZ como BAP fueron transferidos sólo a medios MSB5 con BAP (Figura 3, Etapa II).

Etapa III. Enraizamiento

Para promover el enraizamiento, los brotes bien desarrollados en la etapa II se disectaron del explante y se subcultivaron en medios sin reguladores de crecimiento (MS0), en MSB5 con 0.4 μ M de BAP y en MSB5 con 0.62 μ M de Ácido naftalenacético (ANA) como auxina (Figura 3, Etapa III).

Etapa IV. Aclimatación

Las plantas jóvenes completas enraizadas (plántulas) fueron aclimatadas en una mezcla comercial de turba ("Peat-moss") y cubiertas con bolsas de plástico (Figura 3, Etapa IV a), fueron regadas con una solución de $\frac{1}{2}$ MS (sales MS diluidas al 50 %) por un periodo de dos semanas. Posteriormente, las plantas fueron transferidas a macetas con una mezcla de suelo con agrolita regadas con sales MS al 50 %, y se alternó con riegos de agua, por un periodo similar (Figura 3, Etapa IV b).

Análisis estadístico

Para determinar si se presentaron diferencias significativas en al menos dos de los tratamientos de BAP y TDZ en ejes embrionarios de dos variedades

se aplicó la prueba de Kruskal y Wallis o pruebas de comparación de rangos para las variables: números de brotes por explante, número de brotes por ápice y por nudo cotiledonar. Mientras que el análisis de la longitud de los ápices se realizó mediante un análisis de varianza y prueba de separación de medias de Tukey. Para el caso de frecuencia de explantes con raíz o callo se realizaron pruebas de hipótesis para comparar proporciones binomiales ($p = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapas I (EI). Inducción de primordios de tallo y brotes

Los tratamientos probados indujeron la formación de un gran número de primordios de tallo (“Shoot meristems”) (Kwapata *et al.*, 2010) o grupos de yemas (“bud clusters”) (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006) (Figura 1 c, f), así como brotes múltiples (Figura 1 d, e). La frecuencia de inducción de yemas y brotes múltiples en la variedad FM fue de 73 y 63 % con 4.44 de BAP y 4.54 μ M de TDZ, obteniéndose 4 y 6 brotes por explante, respectivamente.

En el Cuadro 1 se presentan los números de brotes por explante, por ápice y por nudo cotiledonar de los tratamientos estudiados. Al considerar la variedad FM cuando el medio fue adicionado con 4.44 μ M de BAP se obtuvo el mayor número de brotes por explante (2.2) y brotes por ápice (2.0) ($\alpha \geq 0.05$). En cuanto a número de brotes por nudo cotiledonar, no hubo diferencias

estadísticas entre tratamientos, sólo con respecto al testigo ($p=0.05$). Al revisar la respuesta con la adición de TDZ en FM, la mayor concentración ($4.54 \mu\text{M}$) generó la mayor expresión del número de brotes por explante (2.5).

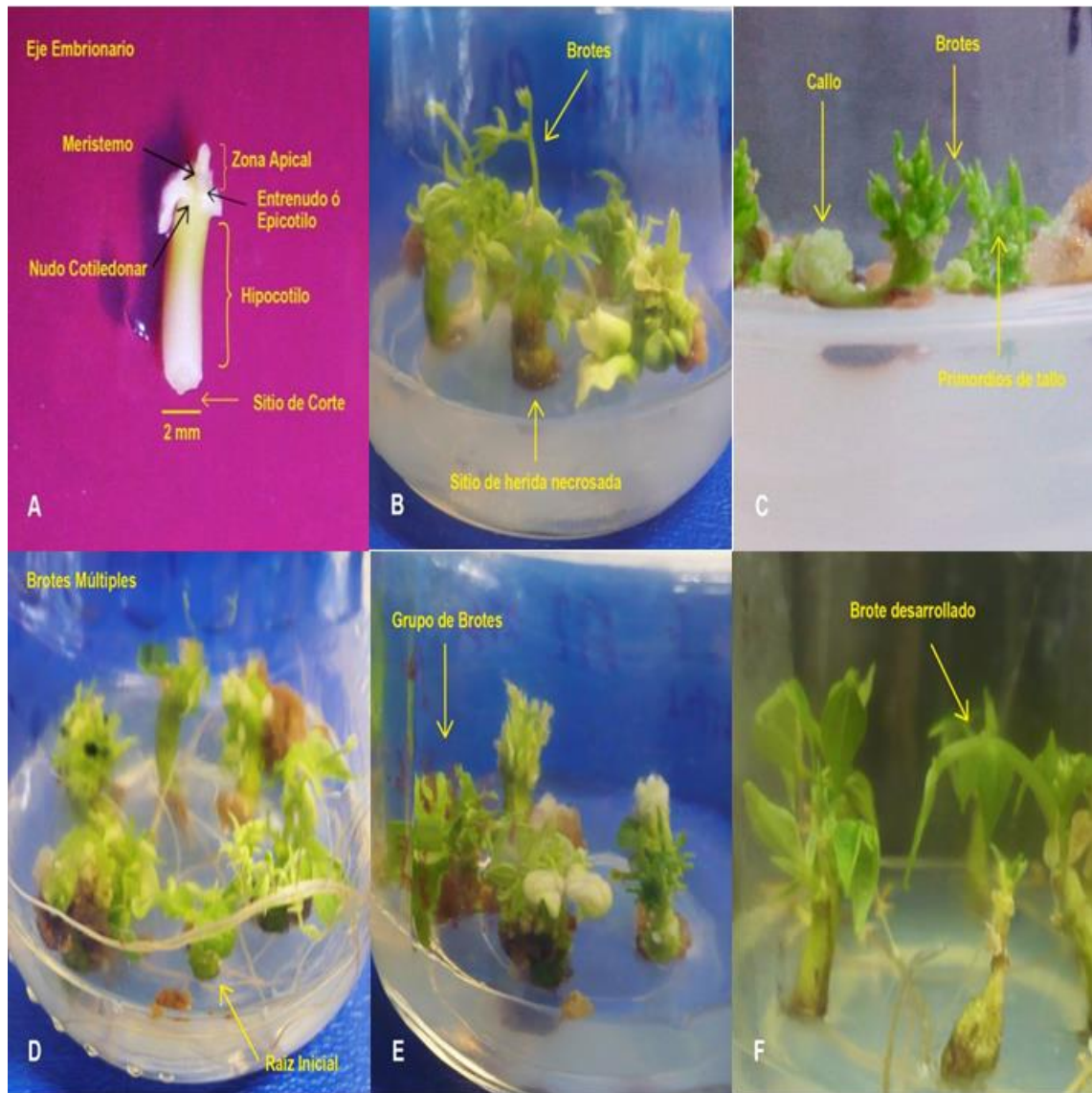


Figura 1. a) Eje embrionario utilizado como explante, b) Explantes con brotes alargado y herida necrosada, c) Explantes con callo formado en el sitio de la herida y primordios de tallo y brotes, d) Explantes con raíces formadas en el sitio de la herida, e) Explantes con grupo de brotes o yemas, y raíz o callo inducida en herida, y f) Explantes con brote desarrollado.

Cuadro 1. Comparación de rangos para determinar las diferencias entre los tratamientos de BAP y TDZ en ejes embrionarios de frijol *P. vulgaris* vars. 'Flor de mayo 199' y 'Bayomex'.

	(µM)	BAY			FM		
		Brotos / explante ^y	Brotos / ápice ^y	Brotos /Nudo ^y	Brotos / explante ^y	Brotos / ápice ^y	Brotos / Nudo ^y
TDZ	4.54	2.95 ^{b z}	1.62 ^c	1.33 ^a	2.55 ^a	2.05 ^a	0.50 ^a
	2.72	4.15 ^a	2.85 ^a	1.30 ^a	1.85 ^b	1.45 ^{ab}	0.40 ^{ab}
	1.73	2.91 ^b	2.00 ^{ab}	0.91 ^{bc}	1.33 ^b	1.23 ^{bc}	0.10 ^{bc}
	1.02	3.44 ^{ab}	2.15 ^{ab}	1.29 ^a	1.39 ^{bc}	1.04 ^{cd}	0.35 ^{ab}
	0.68	3.25 ^{ab}	2.05 ^{ab}	1.20 ^b	1.15 ^c	1.00 ^d	0.15 ^{bc}
	0.41	2.41 ^b	1.81 ^b	0.60 ^c	1.19 ^{bc}	1.04 ^{cd}	0.15 ^{bc}
	0.00	1.00 ^c	0.83 ^d	0.17 ^d	1.23 ^{bc}	0.88 ^d	0.35 ^{ab}
	BAP	4.44	1.70 ^{ab}	0.96 ^b	0.74 ^a	2.27 ^a	2.00 ^a
2.66		1.85 ^a	1.27 ^a	0.58 ^a	1.70 ^b	1.35 ^b	0.35 ^{ab}
1.68		1.78 ^a	1.19 ^a	0.59 ^a	1.50 ^{bc}	1.04 ^c	0.46 ^a
1.00		1.81 ^a	1.00 ^{ab}	0.81 ^a	1.33 ^{bcd}	1.00 ^c	0.33 ^{abc}
0.66		1.72 ^a	1.24 ^a	0.48 ^a	1.20 ^{bcd}	1.10 ^c	0.10 ^{bc}
0.44		1.40 ^b	1.03 ^{ab}	0.37 ^a	1.20 ^{bcd}	1.03 ^c	0.17 ^{abc}
0.00		1.50 ^{ab}	1.00 ^{ab}	0.50 ^a	1.00 ^{cd}	1.00 ^c	0.00 ^{bc}

^y Prueba de rangos de Kruskal y Wallis para varias muestras independientes (diseño completamente al azar) y comparaciones de medias de rangos ($p = 0.05$).

^z Rangos con la misma letra no son diferentes significativamente.

Al considerar a la variedad BAY cuando el medio fue adicionado con BAP o TDZ, la frecuencia de inducción de brotes múltiples fue de 67 y 90 %, respectivamente (Cuadro 1). La respuesta de adición de TDZ en BAY, con la concentración de 2.72 µM se obtuvo la mayor expresión de número de brotes por explante y por ápice los cuales fueron 4.15 y 2.85, respectivamente, superiores al testigo ($\alpha \geq 0.05$). Particularmente, la mayor cantidad de yemas o grupos se observaron con esta variedad y el regulador TDZ.

Los resultados coinciden con la idea de que el TDZ promueve mejores respuestas morfogénicas que el BAP y ejerce influencia modificando el

metabolismo de las citocininas endógenas (Dang y Wei, 2009). En el frijol de manera particular, el TDZ ha inducido más brotes a una concentración de 10 μM que el BAP a 80 μM , pero la viabilidad de los brotes es baja ya que se forma mayor número de grupos de yemas en las zonas meristemáticas y callo en las zonas de corte. Así mismo, el TDZ promovió mejor respuesta en ambas variedades en comparación con la obtenida con el BAP.

Al comparar ambos reguladores, la respuesta en la inducción de brotes fue menor en bajas concentraciones. El valor promedio más alto de inducción de brotes en este trabajo fue de 4.15 brotes por explante al aplicar 2.72 μM de TDZ a la variedad Bayomex (Cuadro 1). A pesar de que en promedio se han reportado entre 10 y 20 brotes, la respuesta depende del cultivar, ya que las variedades 'Olathe' y 'Sedona' formaron 12 brotes al ser cultivadas con 2.5 $\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ (10 μM) de BAP y 0.1 $\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de AIA (Kwapata et al., 2010). Si se hubiera aumentado la concentración, se alcanzarían los promedios reportados para esta variedad, sin embargo existen efectos en la zona de heridas que reducen la viabilidad de los brotes.

Adicionalmente, ejes embrionarios de semillas maduras de los cultivares 'Flor de Mayo Anita' y 'Flor de Junio Marcela' mostraron una eficiencia de regeneración de 88 % con 44.4 μM de BAP (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). Lo anterior confirma que las respuestas son dependientes tanto del genotipo como del tipo de citocininas y de la concentración usada. Sin embargo, es importante observar que a mayor concentración de regulador (BAP o TDZ), el explante se

necrosa y los sitios de herida forman mayor cantidad de callo; aun así se inducen los grupos de yemas inicialmente en BAP con baja concentración complementado con auxinas para desarrollar los brotes a partir de éstas, lo cual vuelve el proceso más largo y laborioso.

Las diferencias significativas obtenidas en el presente estudio en algunos casos son similares con lo planteado en otras investigaciones, donde se presentaron 2 a 5 veces más brotes en explantes cultivados en medio con 0.25 o 1.0 μM de forclorfenuron (CPPU) o TDZ que en medio con 5 μM de BAP (Mohamed *et al.*, 1992). Por lo tanto, los resultados mostraron que con bajas concentraciones de BAP el número de brotes es de 2 a 4, pero la eficiencia de inducción de brotes o yemas por explante fue 95 % y esto permitió un aumento en la regeneración, sobre todo con la exposición de los explantes a BAP en la etapa II (desarrollo de yemas o brotes). Lo cual pudo ser debido a una reducción en la inducción de callo y a una menor síntesis de compuestos fenólicos, sustituyendo esta respuesta con la inducción de una respuesta morfogénica (raíz inicial), reducción en la necrosis del sitio y por consiguiente la poca formación de callo y compuestos fenólicos (Kwapata *et al.*, 2010).

La inducción de primordios de tallos (yemas) y brotes en los nudos cotiledonares fue de 1.3 brotes a 4.54 (Cuadro 1) de TDZ en BAY, posiblemente por un efecto de competencia entre la zona del nudo cotiledonar con la zona apical. En este trabajo el TDZ a igual concentración que el BAP, produjo más brotes. Este resultado es similar al obtenido en un trabajo donde se encontró

que BAP y TDZ dentro del medio de germinación realzan la inducción de yemas, sin embargo, la mayor frecuencia de aparición de brotes fue con TDZ (Dang y Wei, 2009).

Etapas I (EI). Inducción de raíz y callo

Los tratamientos inicialmente establecidos presentaron dos tendencias en la zona del hipocótilo, por un lado la formación de raíz cuando la concentración de citocininas en el medio se redujo o hubo ausencia de reguladores, y por el otro, la formación de callo cuando la concentración de citocininas aumentó. La formación de raíz impide la formación de callo y favorece el desarrollo de los brotes, posiblemente por la producción de metabolitos en dicho órgano. Por el contrario, la formación de callo y la producción de fenoles producto de la muerte celular en este tejido limita considerablemente el desarrollo del explante, de brotes y/o primordios de tallo (Kwapata *et al.*, 2010).

La frecuencia de inducción de raíz en FM presentó un máximo de respuesta del 94 % con 0.41 μM de TDZ, Sin embargo no fue estadísticamente distinto al testigo (Medio MS con ausencia de reguladores). La respuesta del resto de los tratamientos presentó una tendencia de disminución en la formación de raíz conforme se aumentó la concentración de TDZ, hasta 47.5 % con 2.72 μM . En la Figura 2 a, se observa claramente una pendiente con un

valor de $R^2 = 0.84$. De forma similar pero con una frecuencia de inducción de raíz menor se presentó en BAY cuyo máximo alcanzó un 44 % con 0.41 de TDZ, y el efecto de los demás tratamientos fue decreciendo hasta 10 % con 4.54 μM , con una pendiente cuyo valor fue de $R^2 = 0.86$. Estos resultados sugieren que la formación de raíz se reduce por cada unidad de regulador (Figura 2 a).

La frecuencia de inducción de raíz en FM presentó una respuesta máxima de 95 % a 2.66 μM con BAP, sin embargo, nuevamente no fue estadísticamente diferente al testigo; se redujo la respuesta a 75 % con 1.68 μM y generó una pendiente con una R^2 de 0.0004. Estos resultados corroboran que en el rango de tratamientos utilizado en el presente estudio no hubo disminución en la inducción de raíz, ya que incluso el testigo la mantuvo. De la misma forma, la inducción de raíz en la variedad BAY fue sólo de 54.5 %, para el testigo. Sin embargo, en los demás tratamientos la frecuencia de inducción aumentó de 70 a 100 %, los datos formaron una pendiente con un valor de $R^2 = 0.0328$. No hubo respuesta a la aplicación del BAP, ya que incluso el testigo pudo formar raíz (Figura 2 b).

La frecuencia de inducción de callos en FM fue de 85 % con 4.54 μM de TDZ. La respuesta fue de incremento conforme aumentó la concentración de regulador, ya que formó una pendiente con un valor de $R^2 = 0.85$. El testigo en ausencia de regulador presentó un mínimo en la frecuencia de inducción de callo. La frecuencia de inducción de callo para BAY fue igual a FM presentó la

misma respuesta, ya que también forma una pendiente con un valor de $R^2 = 0.91$, mayor que en FM, pero en ambos casos la respuesta fue conforme aumentó en una unidad el regulador, la tendencia fue a incrementar la inducción de callo (Figura 2 c).

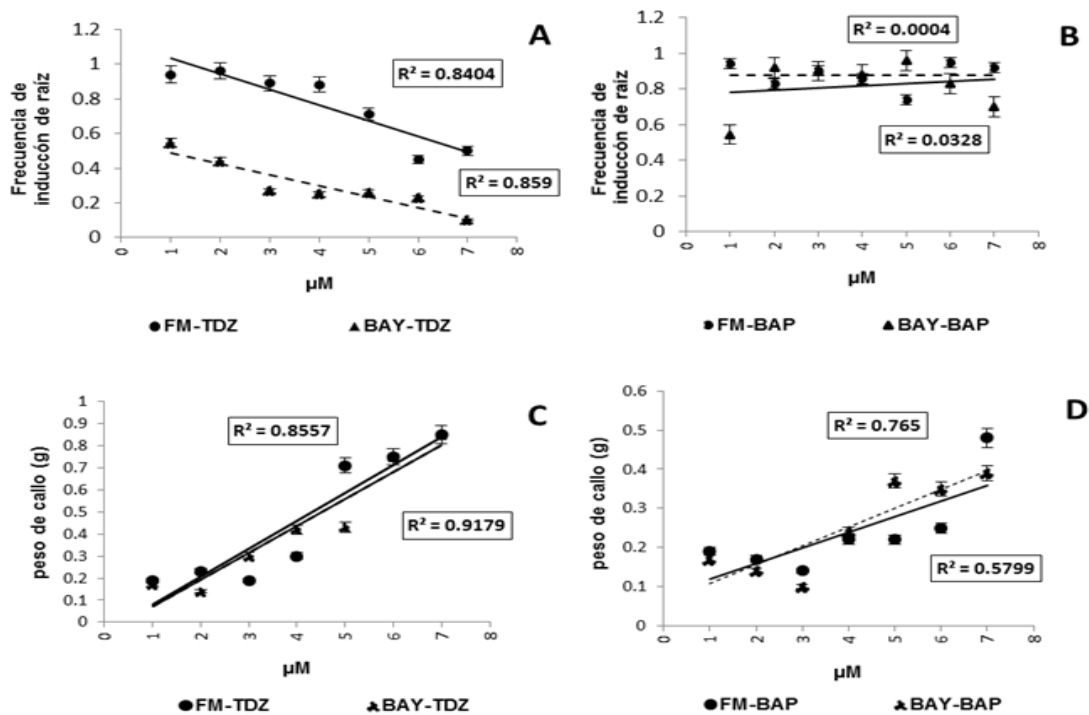


Figura 2. Respuesta de inducción de raíz (a y b) y callo (c y d) en Etapa I a diferentes concentraciones de TDZ y BAP en ejes embrionarias de dos variedades de frijol.

La frecuencia de inducción de callo en FM tuvo un máximo de 48 % con 4.54 μM de BAP, la respuesta fue también de incremento conforme aumentó la concentración del regulador, aunque la pendiente tuvo un valor de $R^2 = 0.76$, lo que sugiere que la respuesta obtenida con BAP no fue tan alta como con TDZ. Para el caso de BAY tuvo un máximo de 39 %, se incrementó la formación de callo conforme aumentó la concentración de BAP, pero la pendiente sólo

presentó un valor de $R^2 = 0.58$. La tendencia de inducción de callo con BAP no fue tan marcada como con el TDZ, que promueve mayor frecuencia de inducción (Figura 2 d).

Los resultados obtenidos de este estudio fueron similares a los encontrados en un trabajo donde los ápices de brotes fueron sembrados en medio B5 adicionado con BAP 0.5 μM , y formó callos como una respuesta al genotipo (Martin y Sondahl, 1984). Adicionalmente, concentraciones de TDZ entre 2.5 y 5 μM estimularon la producción de callo (Mohamed *et al.*, 1992). La mejor respuesta de inducción de callo fue a 4.54 μM (1 $\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$). Sin embargo la inducción de callo con TDZ inicia desde 1 μM en la var BAY. Esto debe tomarse en cuenta ya que a mayor concentración de TDZ la inducción de brotes es directamente proporcional a la inducción de callo, por lo que podría limitar o reducir el desarrollo de los brotes en las siguientes etapas.

Etapas I (EI). Alargamiento del brote

La longitud de la parte apical de los ejes embrionarios para la variedad FM sembrados en el medio sin reguladores (MS0, como testigo) fue de 3.71 cm, se presentaron diferencias significativas a las respuestas de los tratamientos con BAP y TDZ. En la longitud de la parte apical de FM con BAP se presentó una tendencia de reducción de 1.86 cm con 0.40 μM a 1.0 cm con 4.44 μM y la tendencia fue similar con TDZ al promediar 1.85 cm de longitud con 0.41 μM y 0.83 cm con 1.73 μM (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de diferentes tratamientos de BAP y TDZ en el alargamiento promedio del brote de los ejes embrionarios en dos variedades de frijol.

		FM	BAY
		Medias (cm) ^y	Medias (cm) ^y
		(μM)	
BAP	0.0	3.71 ^{a z}	2.14 ^{bc}
	0.40	1.86 ^{bc}	2.52 ^{ab}
	0.66	1.70 ^{bcd}	2.06 ^{bc}
	1.00	1.39 ^{bcd}	1.55 ^{bcd}
	1.68	1.49 ^{bcd}	1.28 ^{bcd}
	2.66	1.95 ^{bc}	1.17 ^{cd}
	4.44	1.00 ^{cd}	0.48 ^d
TDZ	0.41	1.85 ^b	0.72 ^{de}
	9.68	1.45 ^{bc}	0.63 ^{de}
	1.02	1.16 ^{cd}	0.74 ^{de}
	1.73	0.83 ^{cde}	0.48 ^e
	2.72	0.85 ^{cde}	0.48 ^e
	4.54	0.93 ^{cde}	0.36 ^e

^y Comparación de Medias de Tukey (P = 0.05).

^z Medias con la misma letra no son diferentes significativamente.

La longitud de la parte apical de los ejes embrionarios para la variedad BAY sembrados en el medio sin reguladores (MS0, como testigo) fue de 2.14 cm, pero con 0.40 μM de BAP fue de 2.52 cm, aunque no se presentó diferencia significativa con el testigo (MS0). Adicionalmente, para los demás tratamientos se presentó la misma tendencia de reducción de 2.06 cm con 0.66 μM a 0.48 cm con 4.44 μM . De la misma forma, la longitud de la parte apical con TDZ se presentó con un valor de 0.7 cm con 0.41 μM a 0.36 cm con 4.54 μM , tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos, pero fueron los valores más bajos. El efecto de las citocininas como el BAP y el TDZ presentó una tendencia a reducir la longitud conforme la concentración del regulador aumentó.

La tendencia encontrada en el efecto de los reguladores sobre la longitud de la parte apical de los ejes embrionales en la variedad 'Flor de Mayo' concuerda con lo reportado por Mohamed *et al.* (1992), dicha respuesta llegó a ser similar para ambos reguladores. Sin embargo, el efecto encontrado fue una reducción significativa para la variedad BAY con 4.44 μM de BAP y los tratamientos con TDZ 1.73, 2.72 y 4.54 μM , para los cuales se mostró que también existió una respuesta diferencial entre genotipos. De tal forma que cuando se aumentó la concentración de citocininas se redujo la longitud de la zona apical, en general es conocido que el alargamiento se da por efecto del ácido giberélico, y el efecto observado en este trabajo pudo ser debido a la interferencia de BAP y TDZ sobre la giberelina endógena u otro factor que reduzca el alargamiento y la viabilidad de los brotes en las etapas posteriores.

Los resultados anteriores son importantes para etapas posteriores, ya que se requieren medios que promuevan alargamiento del brote, disminuyendo la concentración de citocininas, con la adición de auxinas o GA_3 . Los medios sin reguladores del crecimiento o medios con bajas concentraciones de BAP (2 μM) solo o con adición de GA_3 (2 a 4 μM GA_3) promueven alargamiento de entrenudos (Mohamed *et al.*, 1993). Adicionalmente, el alargamiento de los brotes fue reportado en medios con las sales inorgánicas MS a los cuales se les adicionaron BAP 22.2 μM y AIA 0.057 μM . La recuperación de plantas fue establecida en medio MS con BAP 4.44 μM y GA_3 0.58 μM (Veltcheva y Svetleva, 2005).

También el GA₃ juega un papel importante en el alargamiento, más que en la formación del brote (Dang y Wei, 2009). En este trabajo no fue necesaria la incorporación de auxinas o giberelinas para el alargamiento de los entrenudos en los brotes. Por lo tanto, cuando el efecto de las altas concentraciones de citocininas reduce significativamente la longitud del ápice, este efecto debe ser revertido con la disminución en la concentración de la citocinina en la siguiente etapa del desarrollo o como en otros trabajos donde se suplementó con auxinas (ANA o AIA) o giberelina (GA₃) en los medios para el desarrollo de los brotes.

Etapa II (EII). Desarrollo de los brotes

En los brotes provenientes de la Etapa I, se promovió de manera general una reducción en la longitud de la zona apical cuando se aumentó la concentración del TDZ; sin embargo cuando los brotes de la Etapa I (inducidos con 0.41 y 2.72 µM de TDZ) fueron transferidos a medio con 2.72 µM de TDZ solo 20 % de los brotes sobrevivieron. Por otro lado, cuando los brotes fueron inducidos con 0.41 µM de TDZ y fueron transferidos a medios con BAP, la respuesta de desarrollo de los brotes fue mayor con una sobrevivencia de 60 % en los tratamientos con 1.02 y 1.73 µM, el resto de los tratamientos no redujo el desarrollo de los brotes, pero la sobrevivencia disminuyó. Adicionalmente no se había tenido evidencia directa y sistematizada del efecto del TDZ en la inducción de brotes a bajas concentraciones y su posterior desarrollo, ni si afecta la regeneración de las plántulas obtenidas en etapas posteriores.

La respuesta de regeneración de las plantas *in vitro* fue mejor cuando se usaron las combinaciones TDZ(EI)-TDZ(EII) a bajas concentraciones, TDZ(EI)-BAP(EII) y BAP(EI)-BAP(EII), con ésta última combinación el porcentaje de sobrevivencia es de 90 % (Figura 1, Etapa II).

Estos resultados han sido observados previamente, donde el efecto del TDZ fue mayor en la etapa inicial (germinación y Etapa I), por lo que se ha recomendado el uso de BAP en las etapas EII o EIII (Dang y Wei, 2009). También es posible que la presencia continua de TDZ no resulte necesaria para el desarrollo de los brotes, además pudiera tener efecto negativo en el desarrollo de los brotes después de 7 días de tratamiento con TDZ.

Etapa III (EIII). Enraizamiento

Los brotes obtenidos en las etapas I y II se transfirieron al medio de enraizamiento. El medio MSB5 con 0.62 μM de ANA fue el que mejor resultado dio en la inducción de raíz; sin embargo el medio MSB5 BAP 0.40 μM y el medio MS0 (MSB5 sin la adición de reguladores) también promovieron enraizamiento (Figura 3, Etapa III). La inducción de raíz una vez que están desarrollados los brotes ayuda en forma significativa al proceso de regeneración, sin embargo, es necesario eliminar la raíz o el callo formados en la Etapa I para inducir nuevas raíces conectadas al sistema vascular de los brotes. Esto concuerda con un trabajo preliminar donde brotes individuales

fueron transferidos a medio sin reguladores, en los cuales formaron nuevas raíces y éstas fueron más eficientes. La proliferación de brotes y el alargamiento simultáneo se observaron en medio con 2 μM de BAP y los brotes obtenidos en este medio formaron raíces fácilmente después de 7 a 10 días en medio sin reguladores de crecimiento. Medios con BAP y GA_3 también promueven alargamiento de los entrenudos, pero la formación posterior de raíz fue escasa sobre todo para aquellos brotes sembrados por más de dos semanas (Mohamed *et al.*, 1993).

Por otro lado, de los factores que limitan en mayor medida el enraizamiento de brotes regenerados *in vitro* de *P. vulgaris* es la alta capacidad de producir callo que bloquea la formación de raíz y genera compuestos fenólicos que causan la muerte del tejido debido a la oxidación (Arnaldos *et al.*, 2001). Esto ha sido un reto en algunos estudios ya que la base de los brotes desarrolló compuestos fenólicos *in vitro* que causan ennegrecimiento y muerte celular, y evitó el enraizamiento (Santalla *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 1998; Kwapata *et al.*, 2010). Por lo anterior es muy importante para el caso de frijol, usar medios con reguladores principalmente auxinas con bajas concentraciones, por ejemplo, medio con $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA o AIA promueven el enraizamiento a las 5 semanas, pero fue más efectivo sumergir el explante por 30 segundos en una solución de $1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de Ácido indolbutírico (AIB) previo a la transferencia a medio en ausencia de reguladores (Kwapata *et al.*, 2010). Otro medio inductor de raíz fue con la mitad del contenido de MS con $0.75 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de AIB y $0.02 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de BAP, la frecuencia de enraizamiento

promedio fue de 84.3 % al reducirse significativamente la producción de callo y compuestos fenólicos (Dang y Wei, 2009).

Etapa IV (EIV). Aclimatación

Las plantas jóvenes (plántulas) fueron colocadas en vasos cubiertos por bolsas de plástico (Figura 3, Etapa IV), por un periodo de 15 días, hubo 60 % de sobrevivencia de todo el material obtenido. Posteriormente, las plantas aclimatadas de 3-5 cm de altura con hojas desarrolladas fueron transferidas a macetas, con una mezcla de turba y agrolita, después de cuatro semanas de haber sido transferidas al invernadero se observó la floración y formación de semillas (Figura 3, Etapa IV b). Las plantas obtenidas en el medio con 0.40 μM de BAP en la etapa II de ambas variedades fueron las que presentaron mejor respuesta de aclimatación.

CONCLUSIONES

La inducción de brotes en ejes embrionales es dependiente del genotipo, ya que la variedad 'Bayomex' presentó mayor regeneración que la variedad 'Flor de Mayo'. El TDZ fue más efectivo que BAP al promover un mayor número de brotes por explante en la zona apical donde se observó dicha respuesta.

En la Etapa I, la inducción de raíz en la zona del hipocótilo de ejes embrionales cuando se presentó estuvo acompañada por ausencia de callo, lo cual marca un límite para el desarrollo posterior de los brotes que fueron inducidos en medios con alta concentración de citocininas. La longitud de la zona apical se redujo tanto en TDZ como BAP conforme aumentó la concentración de las citocininas para ambas variedades.

En la Etapa II o desarrollo de los brotes, la mejor respuesta se obtuvo cuando se transfirieron los brotes a MSB5 suplementado con BAP y no con TDZ. En la Etapa III o enraizamiento de brotes la respuesta fue mejor en MS sin reguladores de crecimiento (MS0) y MSB5 con 0.40 μ M de BAP. Las plantas regeneradas adultas lograron formar flores, frutos y semillas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de posgrado. Se reconoce el apoyo económico otorgado por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) a través del proyecto 107PIC0312.

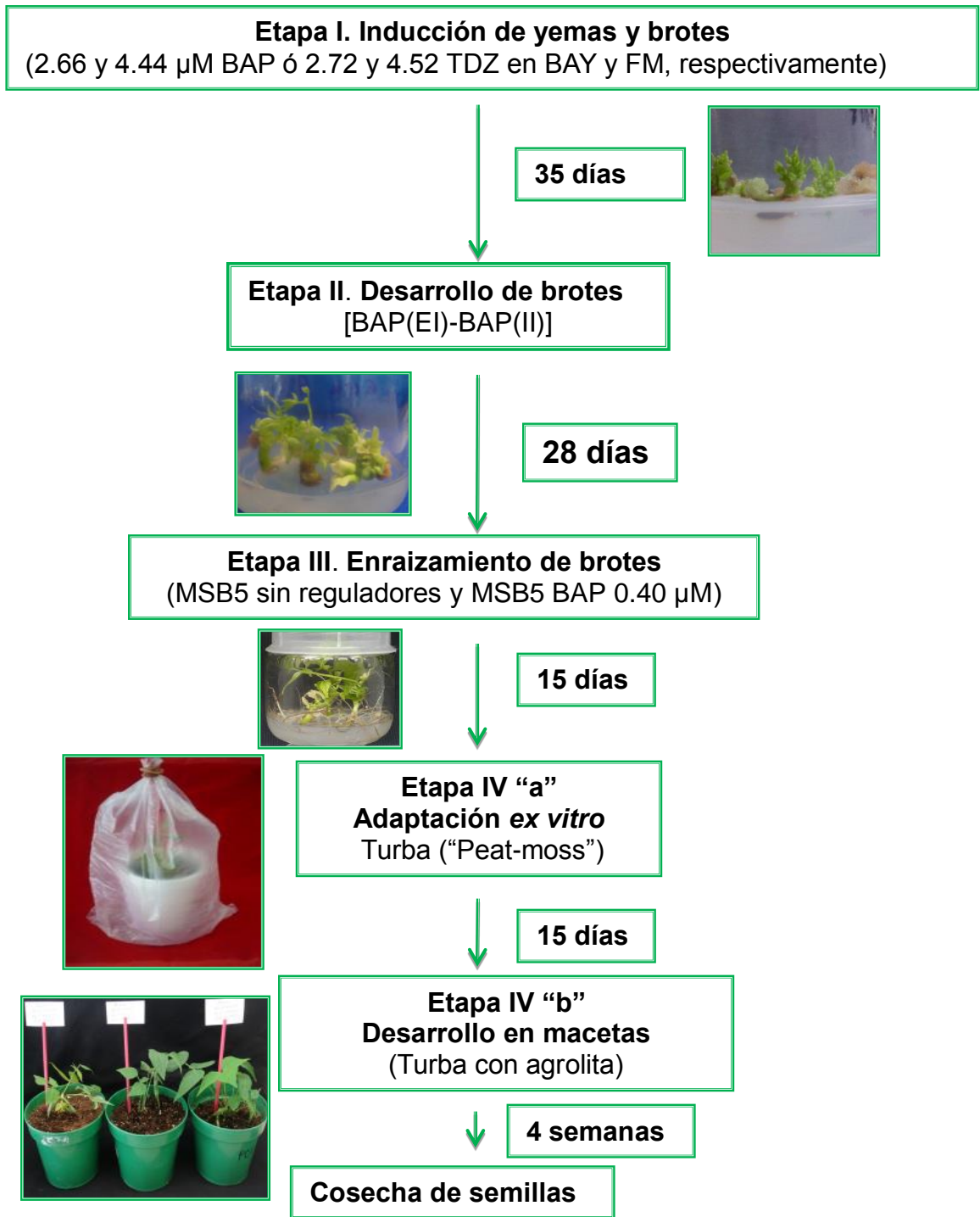


Figura 3. Etapas en la propagación *in vitro* de frijol por organogénesis directa a partir de ejes embrionales de semillas maduras. El proceso completo lleva al menos 120 días para las variedades Flor de Mayo y Bayomex.

BIBLIOGRAFÍA

- ARNALDOS T., L.; MUÑOZ, R; FERRER M., A.; CALDERÓN, A. A. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananasa* cv. Chandler) callus culture. *Physiology Plant* 113: 315–322.
- DANG, W.; WEI, Z. M. 2009. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. *Biologia Plantarum* 53 (2): 312-316.
- CRUZ DE CARVALHO M., H.; VAN-LE, B.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A., T.; THANH-VAN, K. T. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159: 223–232.
- DELGADO-SÁNCHEZ, P.; SAUCEDO-RUIZ, M.; GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; VILLORDO-PINEDA, E.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; FRAIRE-VELÁSQUEZ, S.; ACOSTA-GALLEGOS, J., A., MORA-AVILÉS, A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 170: 822-827.
- GAMBORG O., L.; MILLER, R., A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GEPTS, P.; ARAGÃO, F., J., L.; DE-BARROS, E.; BLAIR, M., W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. 2008. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. P.H., R. MING (eds.), *Genomics of Tropicals Crop Plants*, Springer.113-143.
- KWAPATA, K.; SABZIKAR, R.; STICKLEN, M.B.; KELLY, J. D. 2010. *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 97–105.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D. P. 1992. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *Journal American Society Horticultural Science*. Alexandria, Va. The Society 117 (4): 668-672.

- MOHAMED, M.F.; COYNE, D. P.; READ, P. E. 1993. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal American Society Horticultural Science 118: 158-162.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473–493.
- QUINTERO-JIMÉNEZ, A.; ESPINOSA-HUERTA, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J., A.; GUZMÁN-MALDONADO, H., S.; MORA-ÁVILÉS, M. A. 2010. An improved method for *In vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrociencia 44: 57-64.
- SANTALLA, M.; POWER, J., B.; DAVEY, M. R. 1998. Efficient *in Vitro* regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. Euphytica 102: 195-202.
- VELTCHEVA, M.R.; SVETLEVA, D. L. 2005. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. Journal Central European Agriculture 6: 53-58.
- ZAMBRE, M.A.; DE CLERCQ, J.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G.; DILLEN, W. 1998. Shoot regeneration from callus in wild genotypes of *Phaseolus vulgaris* L. Annual Report Bean Improvement Cooperative 41: 119-120.
- ZAMBRE, M.A.; GEERTS, P.; MAQEUT, A.; VAN MONTAGU, M.; DILLEN, W.; ANGENON, G. 2001. Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year Bean). Annals Botany 88: 371–377.

ARTÍCULO 3

ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) POR BIOBALÍSTICA

RESUMEN

El bombardeo de partículas ha sido propuesto para desarrollar una tecnología de transformación genética de plantas de frijol. Sin embargo, la eficiencia y las posibilidades de regenerar plantas transformadas son reducidas. El objetivo del presente trabajo fue realizar una serie de ensayos para obtener un método de transformación mediante bombardeo de micropartículas sobre ejes embrionarios y regeneración de plantas transformadas. Los ejes embrionarios cultivados en medio MSB5 con 10 μ M de BAP tuvieron su mayor apertura meristemática entre 48 y 72 h, después fueron bombardeados con micropartículas cubiertas con DNA plasmídico (p35S GUS INT). La expresión transitoria (ET) del gen reportero GUS fue evaluada y se obtuvo 87.5 % de los explantes con ET a 900 psi, 6 cm de distancia del blanco y un disparo; también se presentaron 6.97 unidades de expresión transitoria (UET) por epicotilo, 63.7 por hipocótilo y sólo 0.38 UET en el meristemo; se presentó una eficiencia baja. Posteriormente, explantes bombardeados fueron regenerados a una tasa de 68.2 %. Plantas completas (R0) fueron transferidas al invernadero para su aclimatación. Las semillas fueron germinadas *in vitro* y desarrolladas a plantas completas (R1/T0), la ET del gen GUS fue evaluada en hoja y peciolo, y se obtuvo una respuesta positiva de ET del 73.3 %. Finalmente, ADN de 19 plantas adultas fue extraído y evaluado mediante PCR con un inserto del gen

NPTII, se encontró que cuatro plantas presentaron amplificación del fragmento correspondiente, lo que demostró un porcentaje del 21 % de transformación en T0.

Palabras claves: Transferencia de genes, organogénesis directa, expresión transitoria, bombardeo de micropartículas.

**GENETIC TRANSFORMATION OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)
BY BIOBALLISTIC**

ABSTRACT

Particle bombardment transformation method has been developed for genetic transformation of bean plants. However, its efficiency and the possibility of regenerating transformed plants are still low. The aim of this study was to conduct series of tests to obtain a more effective method of transformation through microparticle bombardment of embryonic axes, and a suitable regeneration protocol of transformed plants. When embryonic axes were grown in MSB5 medium with 10 μ M of BAP they showed meristematic opening at 48 to 72 h. Afterwards, they were bombarded with microparticles coated with plasmid DNA (p35S GUS INT). Transient expression (TE) of GUS reporter gene was detected in 87.5 % of the explants when one shoot of 900 psi, at 6 cm from the target was shooted. Average transient expression units (ATEU) were assessed, 6.97 appeared on epicotyl, 63.7 at hypocotyl, and only 0.38 in the meristem,

therefore showing the lowest efficiency. Subsequently, 68.2 % of bombarded explants were fully regenerated. Complete plants (R0) were transferred to the greenhouse. Obtained seeds from transgenic plants were germinated *in vitro* and afterwards grown to adulthood (R1/T0). At this stage, expression of the GUS gene was evaluated in leaf and petiole, with an average ET of 73.3 %. Finally, DNA was extracted from 19 adult transgenic plants for PCR with the NPTII gene. Amplification of the insert was only found in four plants, therefore showing a final transformation efficiency of 21 %.

Keywords: Gene Transfer, direct organogenesis, transient expression, microparticle bombardment.

INTRODUCCIÓN

El frijol es considerado una de las legumbres de grano más importantes para la dieta en Latinoamérica. Aun cuando la productividad ha declinado en los últimos años es considerado una fuente importante de proteínas y calorías para la población (Aragão *et al.*, 2008).

El mejoramiento genético de frijol a través de ingeniería genética fue una realidad de manera efectiva a través de sistemas de transformación basados en bombardeo de micropartículas en la década de los 90's (Russell *et al.*, 1993; Aragón *et al.*, 1996, 1998 y 1999). Debido a las dificultades de regeneración de esta planta vía organogénesis indirecta y a la imposibilidad mediante embriogénesis somática, el bombardeo de micropartículas en meristemas apicales y su factible regeneración (organogénesis directa) ha sido la manera para transformar y regenerar plantas transgénicas fértiles, aunque con baja eficiencia (Aragão *et al.*, 2008).

El bombardeo de los ejes embrionarios se ha usado para establecer ciertas condiciones de transformación. Como criterio de transformación se usó el gen reportero GUS para evaluar la expresión transitoria y la presencia del gen *nptII* (neomicin fosfotransferasa II) mediante pruebas de PCR. Russell *et al.*

(1993) encontraron que la presencia de kanamicina en el medio daña los tejidos de explantes y plántulas de frijol reduciendo la inducción de brotes, por lo que en el presente estudio no se utilizó este antibiótico como marcador de selección.

Aragão *et al.* (1996) transformaron con éxito *P. vulgaris* por bombardeo de partículas de embriones maduros incorporando los genes GUS, neo (neomicin fosfotransferasa), y el de la albúmina 2S de la nuez de Brasil para compensar la deficiencia de metionina en esta leguminosa. Posteriormente, Aragón *et al.* (1996) desarrollaron frijol transgénico con una construcción que contiene el gen *bar* que confiere resistencia al glufosinato de amonio. Dos años más tarde, Aragón *et al.* (1998) obtuvieron frijol transgénico que expresaba el ARN viral en antisentido del geminivirus del mosaico dorado del frijol (BGMV), lo cual provoca un retraso en la infección viral y atenúa los síntomas de esta enfermedad viral.

Otro estudio de transformación por bombardeo de frijol usó el método RNAi (RNA de interferencia) construido para silenciar la región CA₁ del genoma viral de geminivirus del mosaico dorado del grano (VLB). De un total de 2,706 plantas evaluadas sólo detectaron 18 líneas transgénicas putativas, sin embargo sólo una de ellas exhibió resistencia al virus (Bonfim *et al.*, 2007). Los ensayos de campo de las progenies obtenidas a partir de la planta transgénica mostraron resistencia a este virus (Aragão y Faria, 2009; Pinheiro *et al.*, 2009). Por su parte Vianna *et al.* (2004) transfirieron al frijol el conjunto de transgenes

como piezas de fragmentos de ADN, en lugar de todo el plásmido, lo que mejora el sistema de recombinación de transgenes.

Recientemente cinco variedades de frijol fueron transformadas a través del bombardeo de meristemas de los brotes apicales. Los transgenes incluyeron el gen reportero GUS que confirmó visualmente el evento transgénico, el marcador de selección *bar* (resistencia a herbicida) utilizado para la selección *in vitro* de cultivos transgénicos y la proteína abundante de embriogénesis tardía (HVA1) de la cebada (*Hordeum vulgare*), que confiere tolerancia a la sequía con un aumento significativo en la longitud de la raíz de las plantas transgénicas (Kwapata *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue realizar una serie de ensayos para desarrollar un protocolo de transformación genética de frijol, bajo diferentes condiciones de bombardeo como: presión del helio, distancia de la membrana acarreadora a la muestra, número de disparos, concentración de ADN, para obtener plantas transformadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de dos variedades de frijol 'Bayomex' (BAY) y 'Flor de Mayo 199' (FM) se colocaron en etanol 70 % durante un minuto y en NaClO 5 % (Cloro comercial 6 % I.A.) 15 minutos para descontaminar, después fueron

lavadas 3 veces en agua destilada esterilizada y se embebieron por 24 h en un volumen de agua al doble de las semillas.

Las semillas fueron desprovistas de la testa y los ejes embrionarios disectados; los cotiledones, parte de la radícula y las plúmulas hasta la base de los peciolos se eliminaron. Los ejes embrionarios fueron incubados en MS (Murashige y Skoog, 1962), complementado con vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1965) (MSB5) adicionado con 10 μ M 6-benzilaminopurina (BAP), y se colocaron en un cuarto de incubación a 28 °C con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/obscuridad. La parte apical de los explantes fueron fotografiadas a 24, 48 y 120 h posteriores a la siembra para observar el desarrollo de los meristemos previo al bombardeo, y se determinó el tiempo óptimo para observar la máxima exposición del meristemo antes de ser cubierto con los primordios foliares.

Los nuevos ejes embrionales fueron incubación por 24 h antes del bombardeo, fueron colocados con el meristemo apical dirigido hacia arriba. Las micropartículas de oro (Au) fueron mezcladas con 30 ng de ADN del plásmido p35SGUSint (Figura 1), CaCl_2 2.5 M y espermidina 0.1 M (Aragão *et al.*, 2008). Los explantes fueron bombardeados con las micropartículas a 1100 psi por disparo a 6 cm de distancia con equipo de biobalística PDS-1000/He (Bio-Rad). Los explantes se colocaron en *X-gluc* (ácido 5-bromo-4-cloro-1H-indol-3-il β -D-glucopiranosaidurónico) por 24 h posterior al bombardeo; la reacción se detuvo 24 h después, al colocarlos en una mezcla de metanol: acetona (3:1). Para

evaluar la expresión transitoria del gen GUS se cuantificó la presencia de unidades de expresión transitoria (puntos azules).

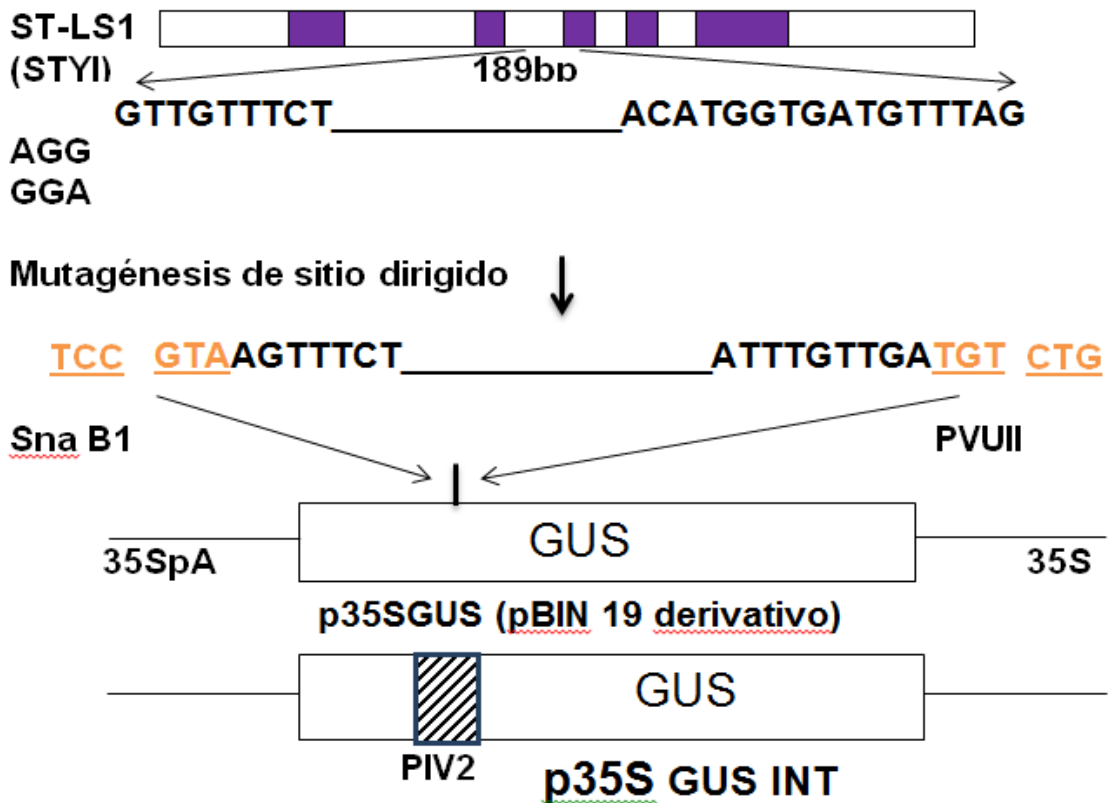


Figura 1. p35S GUS INT. Clonación del intron portátil en el gen fl-glucuronidasa (GUS). El dibujo superior muestra esquemáticamente una parte de la estructura del gen ST-LS1. Cajas representan exones y las líneas continuas intrones; además parte de la secuencia de nucleótidos de la segunda intron (IV2) se muestra. Las secuencias en las cajas confinadas por las líneas de puntos representan el intron de tipo salvaje (IV2) y el mutado intron portátil (PIV2). El dibujo inferior muestra p35S GUS y su intron derivado de p35S GUS INT (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Los ejes embrionales adicionales fueron preincubados por 48 h en MSB5 BAP 10 μM y fueron bombardeados bajo las condiciones descritas en el Cuadro 1, donde se incrementó la concentración del plásmido p35SGUSint a 120 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Russell *et al.*, 1992). Así mismo fueron usadas partículas de oro y se evaluó la ET 24 h después del bombardeo. Los explantes no evaluados para ET, fueron

transferidos a medio de inducción de brotes en MSB5 BAP 10 μ M durante 30 días. Después fueron transferidos a medio MSB5 BAP 5 μ M durante 15 días para desarrollar los brotes. Posteriormente se pasaron a medio de inducción de raíz MSB5 ANA (0.03 mg·litro⁻¹) por 30 días; en todos los medios anteriores no se utilizó el antibiótico kanamicina como agente de selección. Las plantas completas bombardeadas y regeneradas (R0/T0) fueron colocadas en vasos de unicel con turba (esterilizada) durante 30 días y transferidas a macetas con suelo durante 90 días para obtener plantas con semillas.

Cuadro 1. Diferentes condiciones de bombardeo sobre los ejes embrionarios de frijol.

Condiciones de bombardeo					
Tratamiento	Vars.	Disparo (Psi) ^a	Nivel ^b	# de Disparos	
A	FM199	650	2do	3x	
I	B	FM199	650	2do	1x
	C	FM199	900	3ro	1x
	D	FM199	900	3ro	2x
II	E	FM199	1350	3ro	1x
	F	FM199	1550	3ro	1x
	G	BAY	1550	2do	1x
III	H	BAY	1350	4to	1x
	I	BAY	1350	3ro	1x
	J	BAY	1350	2do	1x
	K	Test.	0	0	0

^a Nivel de presión de salida del gas helio; ^b distancia de la malla de retención de membrana acarreadora a los explantes de la pistola de micropartículas: 2^{do} nivel (3 cm); 3^{ro} (6 cm) y 4^{to} (9 cm).

Las semillas de plantas R0/T0 se colocaron en macetas para desarrollar plantas adultas T1, de las cuales se tomaron muestras de hoja y peciolo, para evaluar nuevamente su ET. Adicionalmente, a partir de las plantas que mostraban expresión del gen GUS, se extrajo ADN y se realizó un análisis molecular mediante PCR del gen NPTII, mediante la amplificación con parte de este gen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de la parte apical

En la Figura 2 se muestra el desarrollo del meristemo apical de las variedades FM y BAY durante 24 y 122 h. Los meristemos en ambas variedades presentaron poco desarrollo de los primordios foliares a las 120 h, así mismo se presentó el área meristemática libre durante 12, 24 y 48 h, siendo factible trabajar el bombardeo con estas variedades durante este periodo. Uno de los aspectos importantes que fueron evaluados y que ejercieron influencia para la obtención de plantas de frijol transgénico, fue la morfología de los ápices del brote, donde dependiendo de la variedad, la región del meristemo apical puede ser cubierta parcialmente por primordios foliares. Observaciones similares se realizaron en 17 cultivares de frijol, entre ellos los tipo 'Carioca' y 'Jalo', para determinar que los meristemos están libres de primordios foliares al momento del bombardeo y permitir que las partículas puedan impactar las células meristemáticas (Aragão y Rech, 1997).

Ensayos de expresión transitoria

La expresión transitoria del gen GUS después de 48 h del bombardeo se muestra en el Cuadro 2; se presentó en promedio 87.5 % UET por explante. En general hubo mayor UET en la variedad 'Flor de Mayo' que en 'Bayomex', sin embargo, en la zona apical sólo se observó un promedio de 15 UET (Figura 3). Genga y Ceriotti (1991) obtuvieron un máximo de 50 puntos azules por embrión por bombardeo. En el presente trabajo se obtuvieron hasta 87.5 puntos por embrión. Sin embargo dependiendo del lugar de impacto y de acuerdo a la posición de los ejes embrionarios se observaron hasta 4,522 UET en el hipocótilo de FM.

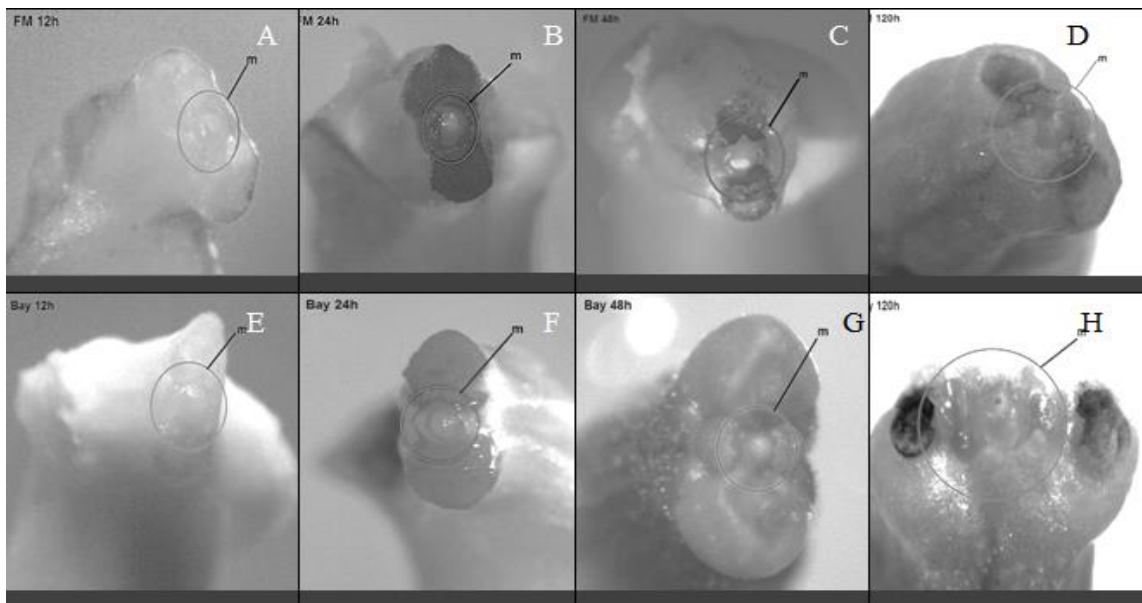


Figura 2. Desarrollo de meristemos de ejes embrionarios de frijol variedad 'Flor de Mayo' (A-D) y 'Bayomex' (E-H) entre 12 a 120 horas después de la disección.

Cuadro 2. Unidades de expresión transitoria en ápice, epicótilo e hipocótilo por ejes embrionarios para dos variedades de frijol bombardeados con micropartículas de oro (Au) cubiertas con p35SGUS/INT, evaluados después de 48 h de incubación.

VARIEDAD	Eficiencia (UET ^a /Explantos)	UET (promedios)		
		Zona apical		
		Meristemo	Epicótilo	Hipocótilo
FM	86	25 (0.5)	344 (6.88)	4522 (90.4)
BAY	89	5 (0.26)	134 (7.05)	703 (37)
PROMEDIO	87.5	15 (0.38)	239 (6.97)	2812 (63.7)

* UET total / # de explantes (± 25).

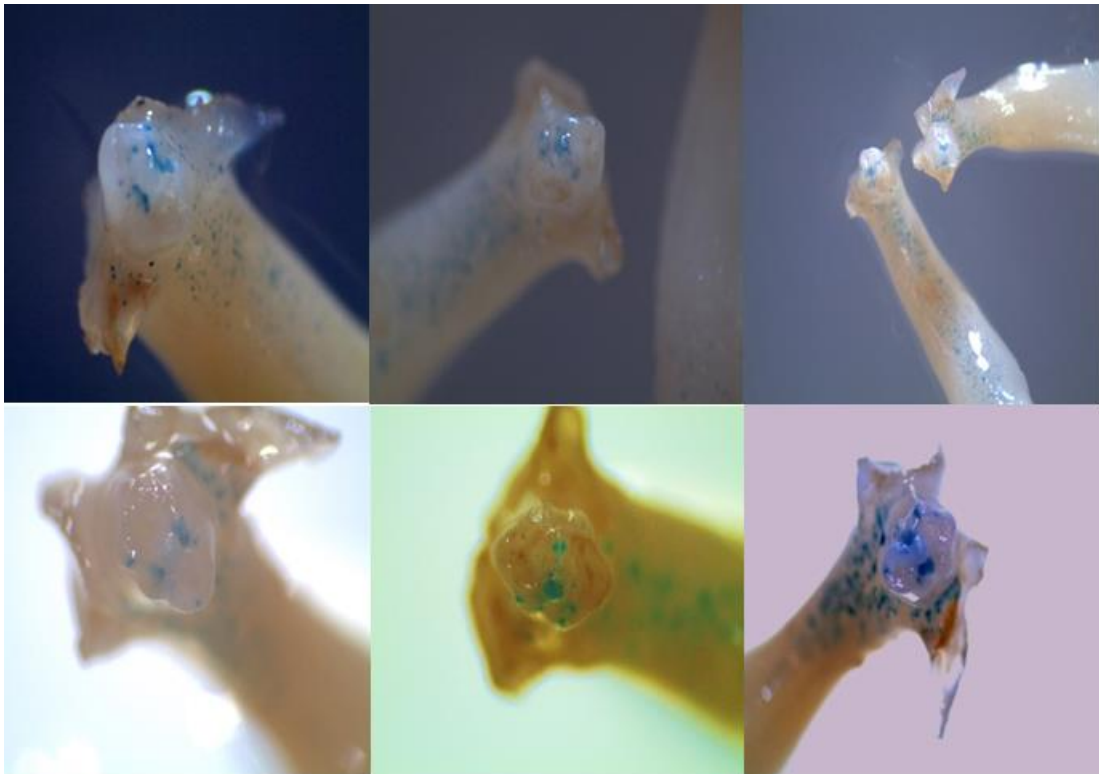
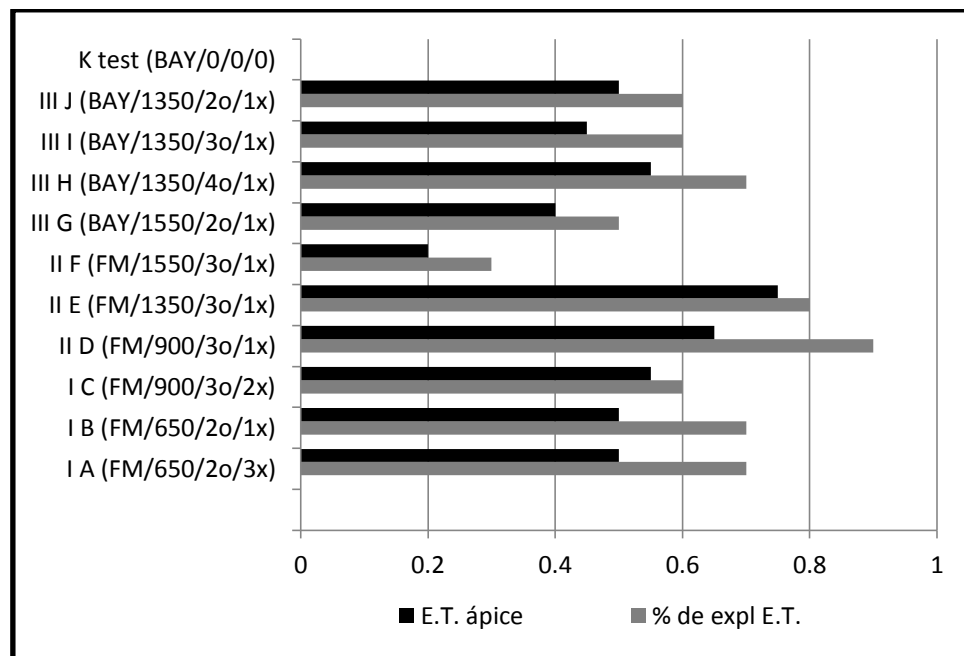


Figura 3. Diferentes explantes con expresión transitoria del gen GUS bombardeados con 1100 psi presión helio, un disparo y a 6 cm de distancia entre la malla de retención y los explantes.

Cuando la concentración de ADN se incrementó cuatro veces (120 µg·µl¹) no fue posible evaluar las UET debido a que se presentaron áreas azules continuas a lo largo del explante (Figura 7, j, k, l). El tratamiento D (900 psi, 3er

nivel, 2 disparos) presentó un 90% de los explantes con ET; los tratamientos A, B y H mostraron arriba del 60 % mientras que para el resto de los tratamientos fue menor, siendo el más bajo para el tratamiento F (1550 psi, 3er nivel, 1 disparo). El tratamiento que presentó mayor porcentaje de explantes con ET en la zona apical y meristemática (75 %) fue el E (1330 psi, 3er nivel, 1 disparo), e igual que los resultados anteriores el tratamiento que tuvo menor expresión en esta zona fue F (1550 psi, 3er nivel, 1disparo).



% de Explantes y ápices con ET por número de explantes totales

Figura 4. Explantes completos y ápices con expresión transitoria, evaluados a las 72 h de incubación.

La expresión transitoria puede ser afectada por la cantidad de partículas y la concentración del DNA, sin embargo no se observó ninguna influencia del tamaño del plásmido en la expresión del gen GUS (La Corte *et al.*, 1997). Por otro lado, cuando la concentración del ADN fue aumentada cuatro veces la

expresión transitoria del gen GUS mejoró considerablemente, mostrando áreas azules y no unidades (puntos). Esto concuerda con lo observado por Genga *et al.* (1991) donde un incremento en la relación DNA/partículas, incrementó el número de UET del gen GUS por zonas amplias de color azul (áreas azules). Las cantidades muy altas de partículas causan agregación y consecuentemente daño a los tejidos.

Allavena y Bernacchia (1991), cuando intentaron transformar genéticamente frijol con microproyectiles a alta velocidad, encontraron en 60 % de los meristemas apicales expresión transitoria del gen GUS. En contraste, en el presente trabajo se encontró un promedio de 90 % de los explantes cuando se usó 900 Psi con dos disparos a 90 mm de distancia.

Estos resultados también contrastan con la sugerencia de que la distancia de 65 mm entre la placa de detención y el blanco es óptima, ya que las distancias más cortas incrementan el daño en el tejido, mientras que distancias más largas reducen la eficiencia de transformación; lo cual va de acuerdo con la idea de que el incremento en la relación DNA/partículas de 1-2 a 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ aumenta el número de UET-GUS por área (Genga y Ceriotti, 1991).

Regeneración de los ejes embrionales bombardeados

En la Figura 5 se muestran los diferentes niveles de regeneración y fertilidad. El porcentaje de regeneración fue de 81 %. En cuanto a la fertilidad,

de 110 plantas sólo 22 produjeron semillas a partir de las cuales se obtuvieron 16 plantas adultas. Sin embargo de éstas sólo 11 mostraron ET del gen GUS en peciolo y hoja, por lo que se obtuvo un porcentaje final de fertilidad del 16 % en plantas T1.

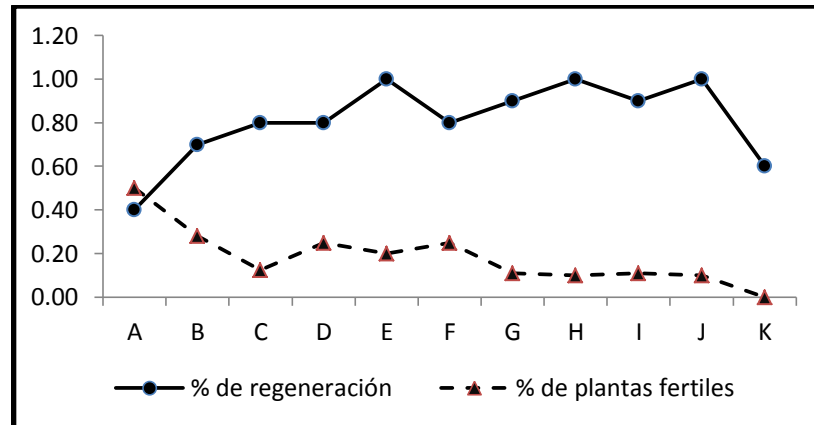
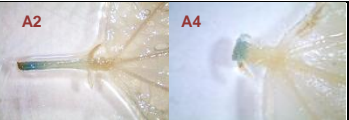
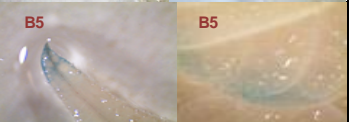

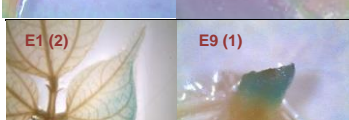
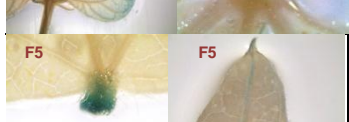

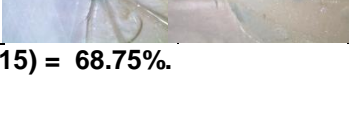


Figura 5. Porcentaje de plantas regeneradas y de plantas R0/T0 que produjeron semillas.

Por otro lado, al realizar la prueba de PCR con el ADN de las plantas adultas sólo cuatro de ellas mostraron amplificación del gen introducido, lo cual representó una eficiencia de transformación del 4 % (Figura 6), y contrasta con los resultados obtenidos por Russell *et al.* (1993) quienes con el uso de un aparato eléctrico de aceleración de partículas, obtuvieron una frecuencia de transformación muy baja (0.03 %). En este trabajo, el protocolo de regeneración consumió mucho tiempo, involucrando tratamientos con temperatura y transferencia de los embriones bombardeados a diferentes medios antes de la recuperación de brotes transgénicos. Por otro lado, Aragão *et al.* (2002) quienes utilizaron el método de bombardeo para la obtención de plantas tolerantes a herbicida sólo consiguieron obtener 0.5 % de plantas transgénicas.

Cuadro 3. Expresión GUS en hojas de plantas de frijol obtenidas de semillas de plantas bombardeadas con ADN plasmídico y regeneradas de las variedades de frijol 'Flor de Mayo' y 'Bayomex'.

LINEA T1	ET en Hoja	ET en Pecilo	Observaciones
A2		(+)	
A4		(+)	
B5	(+)		
B10 (1)			
C2			
D2	(+)	(+)	
D7 (1)	(+)		
D7 (2)		(+)	
E1 (2)			
E9 (1)	(+)	(+)	
E9 (2)		(+)	
E9 (2)			
F4			
F5	(+)	(+)	
H3	(+)	(+)	
I7	(+)	(+)	

Expresión estable de Gen GUS (11/15) = 68.75%.
 (+) respuesta positiva de ET.

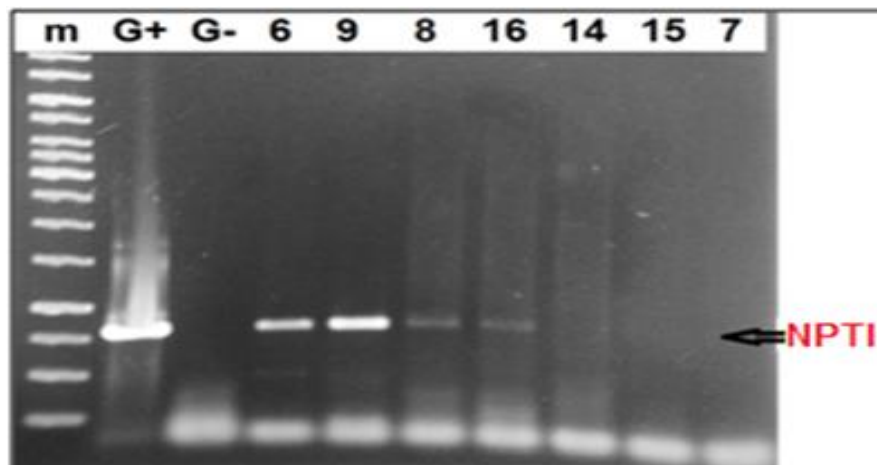


Figura 6. Plantas R0 fértiles que produjeron semilla, obtenidas de explantes bombardeados y regenerados. Análisis PCR de siete líneas de frijol T1. (6) FM-F4.3, (9) BAY-I7, (8) FM-F5, (16) BAY-H3, (14) FM-A2, (15) FM-D7.1, (7) FM-E1.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos en la PCR para el gen *nptII* realizada a siete líneas de frijol T1. En ella se aprecian resultados positivos en las líneas 6, 9, 8 y 16 lo que sirve como evidencia de la integración del transgen al genoma de estas plantas.

Por su parte el equipo de Aragão *et al.* (2008) reportó 2.6 % de eficiencia de transformación en frijol usando como sistema de selección el gen mutado AHAS de *Arabidopsis* y un protocolo de regeneración simple y rápido. Aun cuando este protocolo de regeneración parece eficiente, sería conveniente contrastarlo con protocolos que usen como agentes selectores la resistencia a kanamicina o al glufosinato de amonio.

Aparentemente la eficiencia de transformación obtenida en el presente trabajo ha sido la más alta reportada hasta la fecha, sin embargo es necesario corroborar la estabilidad de la transformación mediante estudios moleculares (Southern blot) y de heredabilidad.

CONCLUSIONES

La transformación genética del frijol es factible aunque con baja eficiencia. Las mejores condiciones encontradas en este trabajo fueron realizar un solo disparo de 900 psi a 6 cm de distancia, a pesar de que estudios previos recomiendan 1100 y 1350 psi. Es necesario realizar estudios posteriores para evaluar la estabilidad de la transformación ya que las evidencias apuntan a que

la mayoría de las plantas regeneradas fueron quiméricas. El uso de un gen marcador de selección aseguraría mayor confiabilidad en la transformación. El protocolo de regeneración desarrollado fue efectivo pues permitió obtener plantas maduras y fértiles, sin embargo sería conveniente realizar trabajos futuros tendientes a simplificarlo.



Figura 7. Explantes disectados (A). Para el bombardeo y evaluación de la expresión transitoria GUS en ejes embrionarios (B). Bajo diferentes condiciones de bombardeo (C-D). Explantes desarrollados (E-F). Regenerados y aclimatados de la primera generación (G-H). Evaluación de la expresión transitoria GUS en peciolo y hoja de R0/T0 (I-J). Obtención de vainas y semillas a partir de plantas R0/T0 (K-L).

BIBLIOGRAFÍA

- ALLAVENA, A.; BERNACCHIA, G. 1991. Attempting genetic transformation of bean by high velocity microprojectiles. *Ann Rep Bean Imp Coop.* 34: 137-138.
- ARAGÃO F., J.L.; GROSSI DE SA M., F.; DAVEY M., R.; BRASILIERO A., C.M.; FARIA J., C.; RECH E., L. 1993. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Rep.* 12: 483–490.
- ARAGÃO F., J.L.; BARROS, L., M., G.; BRASILEIRO A., C.M.; RIBEIRO S., G.; SMITH F.D.; SANFORD J., C.; FARIA J., C.; RECH E., L. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 142-150.
- ARAGÃO F., J.L.; RECH E., L. 1997. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of Carioca cultivar. *Inter J Plant Sci* 158(2): 157–163.
- ARAGÃO F., J.L.; RIBEIRO S., G.; BARROS L., M.G.; BRASILIERO A., C.M.; MAXWELL D., P.; RECH E., L.; FARIA, J. C. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Breed* 4: 491–499.
- ARAGÃO F., J.L.; BARROS L., M.G.; DE SOUSA M., V.; GROSSI DE SA M., F.; ALMEIDA E., R.P.; GANDER E., S.; RECH E., L. 1999. Expression of a methionine-rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K, *lecythidaceae*) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*). *Genet Molec Biol* 22: 445-449.
- ARAGÃO F., J.L.; VIANNA G., R.; ALBINO M., M.C.; RECH E., L. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science* 42 (4): 1298-1302.
- ARAGÃO F., J.L.; VIANNA G., R.; RECH E., L. 2008. High-efficiency transformation by biolistic of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3 (3): 410-418.

- BROUGHTON, W.J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. 2003. Beans (*Phaseolus spp.*)—model food legumes, *Plant Soil* 252: 55–128.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GENGA, A.; CERIOTTI, A.; BOLLINI, R.; BERNACCHIA, G.; ALLAVENA, A. 1991. Transient gene expression in bean tissues by high velocity microprojectiles bombardment *J Genet Breed* 45:129–134.
- LACORTE, C.; ARAGÃO F., J. L.; ALMEIDA E., R.; MANSUR, E.; RECH, E. L. 1997. Transient expression of GUS and 2S albumin gene from Brazil nut in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed explants using particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16: 619–623.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473–493.
- RUSSELL, D.R.; WALLACE, K.M.; BATHE, J.H.; MARTINELL, B.J.; MCCABE, D.E. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep* 12: 165–169.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

La regeneración de frijol vía organogénesis directa ha presentado problemas por lo que es necesario que cada laboratorio desarrolle su protocolo. En el presente trabajo se confirmó que la inducción de brotes en ejes embrionales fue dependiente del genotipo, ya que en la variedad 'Bayomex' se presentó mejor respuesta de inducción de brotes que en 'Flor de Mayo'. Lo anterior, ha sido establecido por varios autores (Delgado Sánchez *et al.*, 2006; Kwapata *et al.*, 2010). Además existen otros factores que deben ser considerados para hacer más eficiente el protocolo de regeneración, por ejemplo: el tipo de regulador y la concentración óptima, el tipo de explante, el medio de cultivo, reducir las etapas de regeneración y las condiciones de incubación.

Con respecto al tipo y concentración de reguladores, se encontró que el TDZ promovió mayor número de brotes por explante que BAP en la zona apical donde se observó dicha respuesta, como ha sido establecido previamente (Mohamed *et al.*, 1992 b; Veltcheva y Svetleva, 2005). Lo cual indica que el TDZ es una citocinina muy activa por lo que ha sido usada para inducir callos embriogénicos usando medios suplementados con este regulador para incubar semillas (preincubación) como fuente de explantes (Mohamed *et al.*, 1992 a).

En la Etapa I, la inducción de raíz en la zona del hipocótilo de ejes embrionales cuando ésta se presenta existe ausencia de callo, lo cual marca un límite para el desarrollo posterior de los brotes que fueron inducidos en medios con alta concentración de citocininas. Esto debido a que altas concentraciones (10-80 μM) de citocininas promueven la formación de callo en la zona de la herida y reducen el tamaño de los brotes, mientras que a bajas concentraciones (1-5 μM) promueven la formación de raíz. La longitud de la zona apical se redujo tanto en TDZ como BAP conforme aumentó la concentración de la citocinina en las dos variedades. Lo anterior también fue establecido por Kwapata *et al.* (2010), usando altas concentraciones de citocininas. Por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue reducir la concentración a un rango que permitiera obtener una presencia reducida de callo y consecuentemente favorecer la formación de primordios de raíz para evitar la formación de compuestos fenólicos que dañen las yemas o brotes en desarrollo.

En la etapa II o desarrollo de los brotes, la mejor respuesta fue cuando se transfirieron los brotes a MSB5 suplementado con BAP y no con TDZ. Sin embargo se ha encontrado que por un periodo de tiempo corto (aproximadamente 10 días) el TDZ promueve una respuesta de inducción de brotes óptima, lo cual concuerda con los resultados donde al transferir los explantes a medios con la misma o más baja concentración de TDZ, los explantes sufrieron daño y no pudieron regenerar plantas. Lo cual indica que el BAP fue mejor que el TDZ en el desarrollo, alargamiento y formación de estructuras.

Más adelante en la Etapa III o enraizamiento de brotes fue mejor inducir raíz en MS sin reguladores de crecimiento (MS0). Algunos autores prefieren suplementar los medios de enraizamiento con auxinas, de preferencia ANA o AIA, así como es recomendado embeber los explantes en AIB (Kwapata *et al.*, 2010). Sin embargo, se sabe que raíces formadas en la primera etapa deben ser eliminadas y permitir la formación de nuevas que estén conectadas con el sistema vascular para mejorar la supervivencia en la aclimatación. Finalmente, las plantas completas lograron formar flores y semillas, con un buen manejo agronómico en el invernadero.

Las variedades elegidas para el trabajo fueron FM199 y BAY por presentar buen porcentaje de respuesta y buen desarrollo de brotes por explantes. Se encontró una relación directa entre la concentración de BAP y el número de brotes por explante, a medida que aumenta la concentración aumenta los brotes inducidos, esto ha sido observado casi en todos los trabajos donde los tratamientos van de baja a alta concentración (McClellan *et al.*, 1989; Franklin *et al.*, 1991; Malik y Saxena, 1991; Mohamed *et al.*, 1993; Zambre *et al.*, 1998; Santalla *et al.*, 1998). Pero la relación es diferente cuando el factor a evaluar es la longitud del entrenudo, el cual a medida que aumenta la concentración de citocininas disminuye la longitud de los explantes. También fue notoria la reversión de los efectos de las citocininas en las primeras etapas cuando la concentración es alta el número de brotes es alto pero el tamaño es pequeño por lo que es importante revertir este efecto disminuyendo la citocininas en algunos genotipos adicionando una auxina a bajas

concentraciones para promover el desarrollo de los brotes. Por otro lado, cuando la concentración es baja hay posibilidades de que en una segunda etapa se induzcan mayor número de brotes, pero sin promover su alargamiento para no afectar su posterior desarrollo. Esto último, no ha sido mencionado en los trabajos previos realizados en organogénesis directa, así mismo los explantes a mayor número de brotes promovido por altas concentraciones de citocininas el tamaño de los mismos es pequeño, por lo que se hace necesario revertir este efecto, separar los brotes y alargarlos.

La transformación genética del frijol fue factible y presentó una eficiencia baja. Las mejores condiciones encontradas en este trabajo fueron 900 psi a 6 cm de distancia con un disparo, sin embargo se recomienda 1100 y 1350 psi para realizar los disparos. Es necesario mejorar la selección de explantes ya que aunque se presentaron eventos de transformación, las evidencias apuntan a que la mayoría de las plantas fueron quiméricas, por lo que el uso del gen bar para la selección del material aseguraría un nivel óptimo de transformación. Por lo que mientras no se tengan genes de selección eficientes, lo recomendable es no usar selección. La regeneración fue exitosa ya que plantas maduras y fértiles fueron obtenidas. Es necesario seguir ajustando los parámetros para el bombardeo de micropartículas, pero se hace imperioso incluir agente de selección y simplificar a pocos pasos el protocolo de regeneración para optimizar el protocolo de transformación genética del frijol común.

Sería conveniente continuar con al menos tres a cinco generaciones para evaluar en primera instancia mediante técnicas moleculares la integración estable del transgen, en segunda instancia integrar en el futuro un procedimiento de cruce con una variedad mejorada adaptada a las condiciones de campo, donde se puedan realizar las pruebas correspondientes a la característica integrada.

En conclusión es factible usar las condiciones establecidas para un programa de regeneración de plantas y de plantas bombardeadas, sin embargo sigue estando presente el problema de la eficiencia en la obtención de brotes transformados y no quiméricos, ya que si el bombardeo no impacta sobre los tejidos que dan origen a las flores poca probabilidad existe de obtener semilla transgénica de plantas transformadas regeneradas, por lo que es necesario seguir buscando condiciones óptimas en todos los factores tanto de regeneración como de transformación ya que esto constituye un reto en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA-GALLEGOS, J.; KELLY, J.A.; GEPTS, P. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm *Crop Science*. **47** (3): 44-59.
- AHMED, E.E.; BISZTRAY, G.; VELICH, I. 1998. Promoting shoot organogenesis on different explant seedlings of common bean. *Zoldsegetermesztes Kutato Intezet Bulletinje* 28: 33–38.
- ALLAVENA, A.; ROSSETTI, L. 1983. Efforts in somatic embryogenesis of *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Horti* 131: 239–246.
- ALLAVENA, A. 1984. Beans (*Phaseolus*). In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol 2. pp. 137-168, Sharp, W.R., Evans, D.A., Ammirato, P.V., Yamada, Y., eds. Macmillan, New York. 644 p
- ARAGÃO F., J.L.; GROSSI DE SA M., F.; DAVEY M., R.; BRASILEIRO A., C.M.; FARIA J., C.; RECH E., L. 1993. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Rep* 12: 483–490.
- ARAGÃO F., J.L.; BARROS L., M.G.; BRASILEIRO A., C.M.; RIBEIRO S., G.; SMITH F., D.; SANFORD J., C.; FARIA J., C.; RECH E., L. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1-2.
- ARAGÃO F., J.L.; RIBEIRO S., G.; BARROS L., M.G.; BRASILEIRO A., C.M.; MAXWELL D., P.; RECH E., L.; FARIA J., C. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Breed* 4: 491–499.
- ARAGÃO F., J.L.; GROSSI DE SA M., F.; ALMEIDA E., R. 1992. Particle bombardment- mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Molecular Biology* 20: 357-359.

- ARAGÃO F., J. L.; RECH E., L. 1997. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of Carioca cultivar. Int. J. Plant Sci 158: 157–163.
- ARAGÃO F., J.L.; BARROS L., M.G.; DE SOUSA M., V.; GROSSI DE SA M., F.; ALMEIDA E., R.P.; GANDER E., S.; RECH E., L. 1999. Expression of a methionine-rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K, lecythidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Genet Molec Biol 22: 445-449.
- ARAGÃO F., J.L.; VIANNA G., R.; RECH E., L. 2008. High-efficiency transformation by biolistic of soybean, common bean and cotton transgenic plants. Nature Protocols 3 (3): 410-418.
- ARAGÃO F., J.L.; FARIA J., C. 2009. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. Nature Biotechnology 27 (12): 1086–1088.
- ARELLANO, J.; FUENTES, S.I.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; HERNÁNDEZ, G. 2009. Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96 (1): 11–18.
- ARNALDOS .L., T; MUÑOZ, R.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananasa* cv. Chandler) callus culture. Physiology Plant 113: 315–322.
- BENEDICIC, D.; RAVNIKAR, M.; GOGALA, N. 1991. The influence of jasmonic acid on the development of *Phaseolus vulgaris* shoot culture. Acta Horti 289: 85–86.
- BENEDICIC, D.; RAVNIKAR, M.; GOGALA, N. 1997. The regeneration of bean plants from meristem culture. Phyton Horn 37: 151–160.
- BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA E., O.P.L.; MENDES, É.A.; ARAGÃO F., J.L. 2007. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). Molecular Plant-Microbe Interactions 20 (6): 717–726.
- BUSTOS, M. 1991. Transgenic gene expression in *Phaseolus vulgaris* by direct gene transfer to protoplasts. Plant Mol Biol Rep 9: 322–332.
- CHANDRA, A.; PENTAL, D. 2003. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview. Curr Sci 84: 381–387.
- CROCOMO, O.J.; PETERS, J.E.; SHARP, W.R. 1976. Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. Turrialba 26: 232–236.

- CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A.; TONIN, G.S.; SACCHI, N. 1979. Development control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. *Energ. Nucl. Agric., Piracicaba* 1: 55–58.
- CRUZ DE CARVALHO M., H.; VAN-LE, B.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI A., T.; THANH-VAN, K. T. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159: 223–232.
- DALE, P. J. 1984. Protoplast culture and regeneration of cereals and other recalcitrant crops. 6th, Int. Protoplast Symposium, Basel, Switzerland 31-41.
- DANG, W.; WEI, Z. M. 2009. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. *Biologia Plantarum* 53 (2): 312-316.
- DELGADO-SÁNCHEZ, P.; SAUCEDO-RUIZ, M.; GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; VILLORDO-PINEDA, E.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; FRAIRE-VELÁSQUEZ, S.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; MORA-AVILÉS, A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 170: 822-827.
- DILLEN, W.; ENGLER, G.; MONTAGU, M.; ANGENON, G.; VAN MONTAGU, M. 1995. Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). *Plant Cell Rep* 15: 119–124.
- DORNELES L., T.; OLIVEIRA A., C.; DE SIEBENEICHLER S., C.; DE OLIVEIRA, A. C. 1994. Plant regeneration of black bean (*Phaseolus vulgaris*) via organogenesis. *Ciencia Rural* 24: 287–290.
- EBIDA, A. I. A. 1996. In vitro shoot proliferation from seedling organs of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Bronco via organogenesis. *Assiut J. Agric. Science* 27: 47–67.
- FERNANDEZ CASO, M.; PELAEZ, M.I.; RUIZ, M.L. 1996. Onset of in vitro morphogenic response and protein pattern changes in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Physiol* 149: 757–761.
- FRANK, M.; SCHMÜLLING, T. 1999. Cytokinin cycles cells. *Trends in Plant Sciences* 4: 243-244.
- FRANKLIN, C.I.; TRIEU, T.N.; GONZALES, R.A.; DIXON, R.A. 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Cult* 24: 199–206.

- FRANKLIN, C.I.; TRIEU, T.N.; CASSIDY, B.G.; DIXON, R.A.; NELSON, R.S. 1993. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Rep* 12: 74–79.
- GEERTS, P.; MERGEAI, G.; BAUDON, J. P. 2000. Succeeded plant regeneration from very immature embryos of *Phaseolus vulgaris*. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop* 43: 206–207.
- GENGA, A.; ALLAVENA, A.; CERIOTTI, A.; BOLLINI, R. 1990. Towards genetic transformation of bean by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort* 280: 527–536.
- GENGA, A.; CERIOTTI, A.; BOLLINI, R.; BERNACCHIA, G.; ALLAVENA, A. 1991. Transient gene expression in bean tissues by high velocity microprojectiles bombardment. *J Genet Breed* 45:129–134.
- GENGA, A.; ALLAVENA, A. 1991. Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell Tissue Org. Cult* 27: 189–196.
- GEPTS, P.; ARAGÃO F., J. L.; DE-BARROS, E.; BLAIR M., W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. 2008. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. P.H., R. MING (eds.), *Genomics of Tropicals Crop Plants*, Springer. 113-143
- GRUM, M.; CAMLOH, M.; RUDOLPH, K.; RAVNIKAR, M.; CASSELS, A. C. 1998. Elimination of bean seed-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture. *Plant Cell Tissue Org. Cult* 52: 79–82.
- GUIDOLIN, A. F. 2003. Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. PIRACICABA, São Paulo, Brazil. 138 p
- HAMMATT, N.; GHOSE T., K.; DAVEY, M. R. 1986. Regeneration in legumes. *In*: Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A., Lawson, R.H. (Eds.), *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops*. Martinus Nijhoff, The Hague, Netherlands. 371 p.
- HERSELMAN, L.; MIENIE, C. M. S. 1995. The production of disease free dry bean seed through meristem tip culture. *In*: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali (Colombia). *Workshop Proceedings, Dar Es Salaam, Tanzania*. CIAT, SACCAR 188–190.

- HILDEBRANDT, A.C.; WILMAR, J.C.; JOHNS, H.; RIKER, A. J. 1963. Growth of edible chlorophyllous plant tissues in vitro. *Amer. J. Bot* 50: 248-254.
- JACOBSEN, H. J. 1991. Somatic embryogenesis in seed legumes, the possible role of soluble auxin receptors. *Isr. J. Bot* 40: 139–143.
- JACOBSEN, H. J. 1999. Genetic transformation, *In*; P. Singh (Ed.), *Common Bean Improvement in the Twenty First Century*, Kluwer Academia Publishers, Dordrecht 125-132.
- KALANTIDIS, K.; GRIGA, M. 1993. Micropropagation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by multiple shoot induction. *Rostinna Vyroba* 39: 115–128.
- KARTHA, K.K.; PAHL, K.; LEUNG, N.L.; MROGINSKI, L.A. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. *Can. J. Bot.* 59: 1671–1679.
- KARTHA, K. K. 1982. Gene pool conservation through tissue culture. *In*: Rao, A.N. (Ed.), *Tissue Culture of Economically Important Plants. Proceedings of International Symposium*. National University, Singapore 213–218.
- KIM, J.W.; MINAMIKAWA, T.; KIM, J.W. 1997. Stable delivery of a canavalin promoter-beta-glucuronidase gene fusion into French bean by particle bombardment. *Plant Cell Physiol* 3: 70–75.
- KIM, J.W.; MINAMIKAWA, T. 1996. Transformation and regeneration of French bean plants by particle bombardment process. *Plant Sci. Limerick* 117: 131–138.
- KLU, G. Y. P. 1997. Induced mutations in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) with low tannin content. *Euphytica* 98: 99–107.
- KUENEMAN, E. A. 1976. Meristem culture in *Phaseolus vulgaris*. *Bean Improv. Coop* 19: 53–55.
- KWAPATA, K.; SABZIKAR, R.; STICKLEN, M., B.; KELLY, J. D. 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 97–105.
- KWAPATA, K.; NGUYEN, T.; STICKLEN, M. 2012 Genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with the *GUS* Color Marker, the *bar* herbicide resistance, and the Barley (*Hordeum vulgare*) *HVA1* drought Tolerance Genes. *International Journal of Agronomy* 1-8.

- LEON, P.; PLANCKAERT, F.; WALBOT, V. 1991. Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. *Plant Physiol* 95: 968–972.
- LEWIS, M.E.; BLISS, F.A. 1994. Tumor formation and glucuronidase expression in *Phaseolus vulgaris* inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 119: 361–366.
- LÓPEZ M., L. 1999. Inducción y propagación *in vitro* de frijol *Phaseolus vulgaris* L. por embriogénesis somática, Tesis de licenciatura, CINVESTAV, Irapuato, Gto., México. 118 p.
- MALIK, K.A.; SAXENA, P.K. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta* 184: 148–150.
- MALIK, K.A.; SAXENA, P.K. 1992a. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedlings of *Phaseolus acutifolius*, A. Gray; *P. aureus* (L.) Wilczek; *P. coccineus* L. and *P. Wrightii*. L. *Plant Cell Reports* 1: 163-168.
- MALIK, K.A.; SAXENA, P.K. 1992b. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. high frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N-6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta* 186: 384-389.
- MALMBERG, R. L. 1979. Regeneration of whole plants from callus cultures of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L. *Planta* 146: 243–244.
- MARTIN, I.S.; SONDAHL, M.R. 1984. Early stages of somatic embryo differentiation from callus cells bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown liquid medium. *J. Plant Physiol* 117: 97-103.
- MCCLEAN, P.; GRAFTON, K. F. 1989. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Sci* 60: 117–122.
- MCCLEAN, P.; CHEE, P.; HELD, B.; SIMENTAL, J.; DRONG, R.F.; SLIGHTOM, J. 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.
- MODA-CIRINO, V.; NICOLODI, C.; CHICHIRICCO, G.; MARIOTTI, D. 1995. In vitro meristematic organogenesis and plant regeneration in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *J. Genet. Breed* 49: 133–137.
- MOHAMED, M. F. 1990. Improved recovery of interspecific hybrid plants in *Phaseolus* on medium supplemented with growth regulators. *Assiat J. Agric. Sci* 21, 373–387.

- MOHAMED, M.F.; COYNE, D.P. 1995. Photoperiod sometimes influences common bacterial blight disease of beans. *HortScience* 30: 551-553.
- MOHAMED, M.F.; COYNE, D.P.; READ, P.E. 1993a. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal America Society Horticultural Science* 118: 158-162.
- MOHAMED, M.F.; COYNE, D.P.; READ, P.E. 1996. Enhancement effect of CPPU on differentiation of somatic embryoids in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regul. Soc. Am* 24: 97–103.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. 1992a. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *Journal American Society Horticultural Science. Alexandria, Va. The Society* 117 (4): 668-672.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. 1992b. Plant regeneration from in vitro culture of embryonic axis explants in common and tepary beans. *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 117: 332–336.
- NADERPOUR, M.; JOHANSEN, I. E. 2011. Visualization of resistance responses in *Phaseolus vulgaris* using reporter tagged clones of Bean common mosaic virus. *Virus Research* 159 (1): 1–8.
- NAGL, W.; IGNACIMUTHU, S.; BECKER, J. 1997. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. *Plant Physiol* 150: 625–644.
- PERALTA L., C.; CASTAÑEDA G., C.; SALCEDA V., M. 1978. Estudio sobre el desarrollo de citocultivos de *Phaseolus vulgaris* L. y *Lycopersicon esculentum* en medios suplementados con aguamiel y agua de coco. *Agrociencia Chapingo, Mex* 31: 75-81.
- PINHEIRO P., V.; DE FARIA J., C.; OLIVEIRA, E.; ARAGÃO F., J.L. 2009. Transgene inheritances and genetic similarities of near isogenic lines of genetically modified common beans. *Pesq. Agropec. Bras* 44 (9): 1168-1176.
- QUINTERO-JIMÉNEZ, A.; ESPINOSA-HUERTA, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; GUZMÁN-MALDONADO, H.S.; MORA-ÁVILES, M.A. 2010. An improved method for *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia* 44: 57-64.
- RAVNIKAR, M.; RODE, J.; GOGALA, N.; BENEDICIC, D. 1990. Regulation of organogenesis with jasmonic acid. *Acta Hort* 280: 169–172.

- RECH E., L.; VIANNA G., R.; ARAGÃO F., J.L. 2008. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3 (3): 410–418.
- RUBLUO, A.; KARTHA, K. K. 1985. In vitro culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars. *Plant Physiol* 119: 425–433.
- RUIZ M., L.; PELAEZ M., I.; RUEDA, J.; ESPINO F., J.; VAZQUEZ A., M.; SCHIEDER, O. 1986. A comparative study of callus formation and plant regeneration from different explants of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. (495–497) *In: Horn, W., Jensen, C.J., Odenbach, W. (Eds.). Genetic Manipulation in Plant Breeding Proceedings of the International Symposium (Eucarpia), 8–15 September, 1985, Berlin (West), Germany* 909 pp.
- RUSSELL, D.R.; WALLACE, K.M.; BATHE, J.H.; MARTINELL, B.J.; MCCABE, D.E. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep* 12: 165–169.
- SAAM, M.M.; HOSFIELD, G.L.; SAUNDERS, J.W. 1987. In vitro propagation of dry bean from seedling shoot tips. *Am. Soc. Hortic. Sci* 112: 852–855.
- SAKER, M.M.; KUHNE, T. 1998. Production of transgenic kidney bean shoots by electroporation of intact cells. *Biologia Plantarum* 40(4): 507–514.
- SANTALLA, M.; POWER, J., B.; DAVEY, M. R. 1998. Efficient *in vitro* regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102: 195-202.
- SIRANUT, L.; TONGUTHAISRI, T.; KUMPAI, S. 1992. Inducing of multiple shoots from cotyledonary node of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Kasetsart J. Nat. Sci. (Thai.)* 26: 227–233.
- STICKLEN, M.B.; ORABY, H.F. 2005. Invited review: shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops, *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 41 (3): 187–200.
- TAMAS, I.A.; SCHLOSSBERG-JACOBS, J.L.; LIM, R.; FRIEDMAN, L.B.; BARONE, C.C. 1989. Effect of plant growth substances on the growth of axillary buds in cultured stem segments of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Regul* 8: 165–183.
- TOLLEFSON, J. 2011. Brazil cooks up transgenic bean. *Nature* 478: 168.
- VAQUERO, F.; ROBLES, C.; RUIZ, M. L. 1993. A method for long-term micropropagation of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell Reports* 12: 395-398.

- VELTCHEVA M., R.; SVETLEVA, D. L. 2005. In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. Journal Central European Agriculture 6: 53-58.
- VIANNA G., R.; ALBINO M., M. C.; DIAS B., B. A.; SILVA L., D. M.; RECH E., L.; ARAGÃO, F. J. L. 2004. Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Scientia Horticulturae 99 (3-4): 371–378.
- YANCHEVA, S.; SVETLEVA, D.; VELTCHEVA, M.; PETKOVA S., P.; ATANASOV, A. 1999. Regeneration possibilities of Bulgarian bean cultivars Plovdiv 11M and Dobrudjanski 7. Biotechnol. Equip 1: 40–43.
- ZAMBRE, M.A.; CLERQ, J.; VRANOVA, E. 1998a. Plant regeneration from embryo derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (“common bean”) and *Phaseolus acutifolius* A. Grey (tepary bean). Plant Cell Rep 17: 626–630.
- ZAMBRE, M.A.; DE CLERCQ, J.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G.; DILLEN, W. 1998b. Shoot regeneration from callus in wild genotypes of *Phaseolus vulgaris* L. Annual Report Bean Improvement Cooperative 41: 119-120.
- ZAMBRE, M.A.; GEERTS, P.; MAQUET, A.; VAN MONTAGU, M.; DILLEN, W.; ANGENON, G. 2001. Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year Bean). Annals Botany 88: 371-377.
- ZHANG-ZHANG, Y.; XING, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell Tissue Organ Cult 56: 37-46.
- ZHANG-ZHANG, Y.; COYNE D., P.; MITRA, A.; ZHANG, Z. Y. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. J. Am. Soc. Hortic. Sci 122: 300-305.

ANEXO I

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG

Constituyente	Solución madre (g/L)	Volumen de S.S por litro de medio
Macros		
NH ₄ NO ₃	16,5	
KNO ₃	19	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	100 ml
Micros		
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0.083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	

CuSO₄.5H₂O

10 ml de solución 25 mg/100ml

CoCl₂.6H₂O

10 ml de solución 25 mg/100ml

10 ml

Fuente de hierro

FeSO₄.7H₂O 0.00556

Na₂EDTA.2H₂O 0.00746

10 ml

Vitaminas

Inositol 10

Nicotínico 0,05

HCl-Piridoxina 0,05

Glicina 0,2

HCl-Tiamina 0,01

10 ml

Adicionar al medio 3 % de sacarosa y 0.7 % de agar.

ANEXO 2

VITAMINAS DEL MEDIO GAMBORG B5

Componente	mg·litro ⁻¹	Peso Molecular	Molaridad (mM)
Myo-inositol	100.00000	180.2	0.55
Niacina	1.00000	123.1	0.00812
Piridoxina HCl	1.00000	205.6	0.0024
Tiamina HCl	10.00000	337.3	0.0296

ANEXO 3

MEZCLA DE REACTIVO PARA REACCIÓN X-GLUC

SOLUCIONES		[] FINAL	MEZCLA ($\mu\text{L}\cdot\text{ml}^{-1}$)
NaPO ₄ (buffer)	pH 7.0 1.0 M	0.1 M	100
EDTA	pH 7.0 0.25 M	10 mM	40
K-ferricianuro	pH 7.0 0.005 M	0.5 mM	100
K-ferrocianuro	pH 7.0 0.005 M	0.5 mM	100
X-Gluc	0.02 M	1.0 mM	50
Triton X-100 (opcional)		0.1%	10
SUBTOTAL			400
H ₂ O DESTILADA			600
TOTAL			1000

SOLUCIÓN DE X-Gluc

0.02 M = MW 521.8

521.8 g/L = 1 M = 10.436 g/L = 0.02 M

10.436 g ---- 1000 ml

0.5218 g = 52.18 mg/5 ml = 0.02 M

X 2.5 ml

BUFFER FOSFATO PH 7.0	Na ₂ HPO ₄	Na ₂ H ₂ PO ₄	
	57.7	42.3	1000 ml
	5.7	4.23	100 ml
	0.577	0.423	10 ml
	0.1444425	0.10575	2.5 ml