

00551

3
2Ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Regeneración y transformación genética de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.).**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

ELIA DIEGO GARCIA

Cuernavaca, Morelos

Diciembre de 1998.

268760

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZO BAJO LA DIRECCION DEL DR. MIGUEL LARA FLORES, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. PARTE DE ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. GEORGINA HERNANDEZ DELGADO.

ESTE TRABAJO SE REALIZO BAJO EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA Y LA DIRECCION GENERAL DE ESTUDIANTES DE POSGRADO. AGRADEZCO A AMBAS INSTITUCIONES LAS BECAS OTORGADAS DURANTE EL PROGRAMA DE MAESTRIA.

A mi Mamita

Elva García Ch.

A mis Hermanos

Carol y Andrés

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi tutor, Dr. Miguel Lara Flores y a la Dra. Georgina Hernández, así como a los miembros de mi comite tutorial, integrado por Dr. Marco Villanueva y Dr. Jaime Padilla. Agradezco también las valiosas aportaciones al presente manuscrito de tesis hechas por los miembros del jurado de examen, integrado por: Dra. Gladys Cassab, Dr. Gabriel Iturriaga, Dr. Marco Villanueva, Dra. Georgina Hernández y Dr. Miguel Lara Flores.

A uno de los apoyos más significativos e importantes durante el desarrollo de mi maestría, en toditos los sentidos, especialmente por compartir todo su entusiasmo conmigo, ser apoyo en el trabajo academico, experimental y de manera muy valiosa en el moral, a Vic Rivelino Juárez.

De manera muy especial a todas las personas que me ayudaron y auxiliaron en las grandes dudas que surgieron durante el desarrollo de este proyecto, como lo fueron varias personas que resultaron ser excelentes maestros y muy buenos compañeros: Rive J., Ramón S., Svetla C., Tere M., Jesús A., Elizabeth C., Mario R., Sara F., Sonia S., Alberto C., Paty C., Juan E. y a los Maskas. Además de todos los que me brindaron su tiempo, apoyo o reactivos con los que pude avanzar en mi trabajo.

Como siempre a mis grandes amigos de Morelia que a larga y corta distancia me dieron siempre todo su apoyo: Cony, Eduardo, Gaby y la Dra. María Villaroel.

A todos mis compañeros de maestría y los amigos que compartieron muy gratas experiencias y apoyos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por mi formación y por los buenos maestros que me permitieron conocer.

A todos aquellos interesados en mi trabajo y a los que olvide mencionar, gracias.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
2.1 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> y regeneración	2
2.1.1 Regeneración en <i>Phaseolus vulgaris</i>	4
2.2 Ingeniería genética	6
2.3 Transformación genética de frijol	7
III. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo general	11
3.2 Objetivos específicos	11
IV. MATERIALES Y METODOS	12
4.1 Preparación de medios de cultivo	12
4.2 Germinación de semillas <i>in vitro</i>	12
4.3 Obtención de brotes	12
4.4 Enraizamiento de brotes	13
4.5 Análisis histológico	14
4.6 Transformación genética de frijol (vía co-cultivo con <i>A. tumefaciens</i>).	15
4.7 Sensibilidad del frijol a kanamicina	16
4.8 Obtención de ADN vegetal	16
4.9 PCRs (<i>nptII</i> y <i>uidA</i>)	16
4.10 Análisis tipo Southern blot	17
4.11 Expresión de β -glucuronidasa (GUS)	19
4.12 Transformación genética de tabaco	19
V. RESULTADOS	20
5.1 Proceso de regeneración de frijol	20
5.1.1 Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i> de frijol	20
5.1.2 Regeneración de frijol	20
5.1.3 Enraizamiento de brotes normales	22
5.1.4 Obtención de plantas regeneradas adultas	23
5.1.5 Análisis histológico	24

5.2 Transformación genética	25
5.2.1 Transformación genética de tabaco	25
5.2.2 Sensibilidad de explantes no transformados de frijol a kanamicina	26
5.2.3 Transformación genética de frijol	27
5.2.3.1 Establecimiento de las condiciones de co-cultivo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
5.2.3.2 Generación de brotes transformados de frijol	29
5.2.3.3 Obtención de plantas transgénicas de frijol completas fértiles	35
VI. DISCUSION	36
VII. CONCLUSION	38
VIII. PERSPECTIVAS	40
8.1 Enraizamiento	40
8.2 Análisis histológico	40
8.3 Análisis de la T ₁	40
8.4 Aplicación de nuestro protocolo en otras variedades de frijol	41
8.5 Generación de plantas transgénicas de frijol	41
IX. BIBLIOGRAFIA	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones <i>Agrobacterium</i> -célula vegetal.	8
Figura 2. Esquema representativo del ADN-T del plásmido pBI121, fragmento E-H de 3kb (Jefferson, 1987).	15
Figura 3. Fragmentos amplificados de los genes <i>nptII</i> (neomicina fosfotransferasa) y <i>uidA</i> (β -glucuronidasa) por PCR y los oligonucleótidos utilizados.	18
Figura 4. Esquema representativo de la obtención de explantes a partir de plantas germinadas <i>in vitro</i> de 10 días de edad. A) hojas cotiledonares; B) cotiledón; C) raíz y D) axila de la yema cotiledonar.	20
Figura 5. Secuencia del desarrollo de brotes de frijol (negro Jamapa). A) Brote; B, C y D) diversas etapas durante el desarrollo de brotes.	22
Figura 6. Análisis por microscopía de explantes con brotes múltiples 7 días después de la inducción con BAP. B, brote; M, región meristemática; V, haces vasculares y H, primordios de hoja.	24
Figura 7. Proceso de regeneración y transformación de plantas de tabaco TL y TE. A) plantas donadoras de explantes para el co-cultivo con <i>Agrobacterium</i> ; B) regeneración de plantas control, transgénicas TE y TL (de izq. a der.); C) planta enraizada <i>in vitro</i> y D) planta adulta floreciendo.	25
Figura 8. Brotes transformados. A) brotes no transformados sensibles a Km; B) brotes Km ^R y C) actividad de GUS en tallo y haces vasculares.	26
Figura 9. Protocolo general de regeneración-transformación en frijol.	30
Figura 10. Amplificación de los transgenes y su hibridación con parte del ADN-T de pBI121. a) fragmento de <i>nptII</i> (785 pb); b) hibridación de estos productos con sonda del gen <i>nptII</i> (794 pb) derivada de pBI121; c) fragmentos de <i>uidA</i> (1.2 Kb) y d) hibridación de los productos con la sonda del gen <i>uidA</i> (1808 pb) del pBI121.	32
Figura 11. Southern blot de brotes transgénicos PVLB. A) ADN genómico digerido con <i>EcoRI</i> ; hibridizado con 35S- <i>uidA</i> y B) ADN genómico digerido con <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> e hibridizado con 35S- <i>uidA</i> (fragmento 3 kb).	33
Figura 12. Análisis histoquímico de la actividad de GUS en frijol transgénico. A) Control positivo de tabaco TE13; B y C) brotes completos de frijol; D) control negativo de frijol regenerado no transformado; E y F) hojas de brotes Km ^R .	33

Figura 13. Amplificación por PCR del gen *nptII* en plantas T₁ de la línea PVEH 1. A, carril 1 muestra el marcador de peso molecular; carril 2 control positivo del plásmido pBI121 y los carriles 3 al 6 muestran la amplificación de este gen en las plantas transgénicas T₁ derivadas de una planta transformada y regenerada. B, muestra las 4 plantas T₁ utilizadas en el análisis.

35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Experimento I, uso de auxinas-citocininas para la obtención de brotes.	13
Tabla 2. Variables manejadas en medios para la obtención de raíces en brotes transgénicos.	14
Tabla 3. Medios para inducción de brotes y regeneración de plantas de tabaco.	19
Tabla 4. Uso de auxinas-citocininas en la obtención de brotes (mg/l).	21
Tabla 5. Número de plantas regeneradas en medios suplementados con citocininas, llevadas hasta estadio de floración y obtención de semillas en diferentes concentraciones de citocininas.	23
Tabla 6. Eficiencia de regeneración de frijol y su comparación con trabajos de regeneración en frijol co-cultivado y sin co-cultivo con <i>A. tumefaciens</i> .	28
Tabla 7. Porcentajes de sobrevivencia en brotes de 90 días sometidos al método de cultivo control sin el empleo de <i>Agrobacterium</i>	
Tabla 8. Eficiencia de regeneración de explantes co-cultivados con <i>A. tumefaciens</i> cepa LBA4404/pBI121.	28
Tabla 9. Eficiencia de transformación analizada por la presencia (amplificación por PCR) de los genes marcadores en brotes regenerados.	29
Tabla 10. Sobrevivencia de explantes co-cultivados con <i>A. tumefaciens</i> cepa LBA4404/pBI121, 30 días después del co-cultivo.	34

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADN-T	Acido desoxirribonucleico de transferencia
AIA	Acido indol-3-acético
ANA	Acido naftalenacético
ARN	Acido ribonucleico
BAP	6-Bencil aminopurina
B5	Medio nutritivo de Gamborg
C	Callo
GUS	β -Glucuronidasa
kb	Kilobase
KIN	Kinetina
K _m	Kanamicina
K _m ^R	Resistencia a kanamicina
MIB	Medio inductor de brotes
MIR	Medio inductor de raíces
MDB	Medio para desarrollo de brotes
MS	Medio nutritivo Murashige y Skoog
<i>nptII</i>	Gen de neomicina fosfotransferasa
NPTII	Neomicina fosfotransferasa II
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Picloram
Ri	Plásmido inductor de raíces
T ₁	Progenie de plantas transgénicas regeneradas o denominadas T ₀
Ti	Plásmido inductor de tumores
Tic	Ticarcilina
<i>uidA</i>	Gen de β -Glucuronidasa
X-Gluc	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido

I. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fué el establecimiento de un protocolo eficiente de regeneración y transformación genética de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. negro Jamapa mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Para ello, se desarrolló un método de regeneración de frijol, vía organogénesis directa, a partir de nodos cotiledonares, con una eficiencia del 80%.

Para la obtención de un protocolo acoplado de regeneración-transformación en frijol se transformaron nodos cotiledonares vía co-cultivo con *A. tumefaciens* plásmido pBI121 (*nptII-uidA*). La selección de brotes transgénicos se realizó en kanamicina 200 mg/l adicionada al medio de inducción de brotes. Se observó que el 80% de explantes formaron brotes en kanamicina pero solo un 20% de estos se desarrolló. Estos brotes resistentes a kanamicina fueron denominados Km^R. Se analizó la presencia de los transgenes en estos brotes por PCR. Los resultados indican la integración del gen *nptII* en el 60% de los brotes y en un 30% la integración de los dos genes (*nptII-uidA*). El análisis tipo Southern de los brotes transgénicos con presencia de *nptII-uidA*, muestra una sola copia de los transgenes al utilizar la región *35S-uidA* como sonda. Adicionalmente, se observa la actividad de β-glucuronidasa indicando la expresión del gen reportero *uidA*.

La generación de raíces en brotes transgénicos no es eficiente en comparación con los brotes normales, este es el principal motivo por el que no se ha logrado obtener plantas transgénicas adultas en la serie PVLB que tiene porcentajes de transformación u obtención de brotes transgénicos eficiente (30%).

El protocolo mostrado en este trabajo generó dos plantas transgénicas regeneradas completas con el gen *nptII* de la serie PVEH, al analizar la progenie de estas plantas se mostró por amplificación del gen *nptII* (PCR) que este transgen se transmite a la T₁. Estas plantas transgénicas de frijol son los primeros organismos transgénicos del cultivar.

II. INTRODUCCION

En los últimos años, la investigación en el área de la biología vegetal, ha implementado diversas herramientas para el desarrollo de estudios más completos y específicos que permiten un conocimiento más profundo sobre los sistemas vegetales. Se han utilizado metodologías de cultivo de tejidos vegetales y de ingeniería genética que han permitido el desarrollo acelerado de la investigación básica en biología vegetal y han contribuido en el aprovechamiento y manejo de especies económicamente importantes además de las especies silvestres de importancia ecológica. Esta serie de metodologías han posibilitado la manipulación de organismos vegetales con el propósito de obtener variedades con diversos atributos de interés o bien en el estudio de la regulación genética de dichos organismos.

2.1 Cultivo de tejidos *in vitro* y regeneración

El cultivo de tejidos vegetales, puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten la multiplicación *in vitro* de células vegetales, bajo condiciones relativamente controladas como temperatura, humedad, nutrimentos, pH, fotoperíodo, intensidad luminosa, asepsia, entre otras (Arellano, 1995).

El principio de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, se basa en el concepto de totipotencialidad de las células vegetales. Es decir, de la capacidad para desarrollarse en un organismo completo generalmente de células somáticas si se les provee de las condiciones externas apropiadas, dando lugar a un organismo exactamente igual al del que proviene (Villalobos y Thorpe, 1991).

El cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de tejido u órgano que se extraen de la planta. La micropropagación presenta importantes ventajas con respecto a los sistemas convencionales; entre otras se pueden mencionar: Un incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción en el tiempo de multiplicación, control sobre sanidad del material que se propaga y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos (Villalobos y Thorpe, 1991).

Existen factores que influyen en la propagación y regeneración de plantas. Entre estos se encuentra el estado fisiológico y de diferenciación de los órganos de la planta que da el explante, ya que esto influye en su capacidad morfogénica.

En los últimos años, el cultivo de tejidos vegetales ha cobrado mayor interés debido a sus expectativas para el uso biotecnológico. Existen diversas estrategias para el cultivo *in vitro* de las especies vegetales y que satisfacen diferentes finalidades, como propagación y obtención de metabolitos secundarios de interés, entre otras.

Entre las herramientas de cultivo de tejidos están: cultivo de meristemos, organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática como las más frecuentemente usadas (Krikorian, 1991). Sin embargo, existen otros tipos de cultivo para diversas aplicaciones. El cultivo de meristemos ha utilizado puntas de brotes y meristemos de muchas plantas para obtener, mantener y multiplicar el material genético. Este método ha sido bueno para una rápida multiplicación clonal y en la obtención de plantas libres de virus y patógenos en general (Krikorian, 1991).

En los cultivos de callos se induce una proliferación celular a partir de explantes tomados de varios órganos de la planta para la formación de brotes y raíces (organogénesis indirecta). La organogénesis indirecta implica un método de estimulación del desarrollo de órganos a partir de callos. Existen evidencias que sugieren que en la formación de callos se genera inestabilidad y variación genética, por lo que esta vía de regeneración se recomienda para fomentar la variación somaclonal.

Se conocen sistemas mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de la planta sin la formación de callo, este proceso es denominado organogénesis directa. Un ejemplo claro de propagación por organogénesis directa, es el de la violeta africana (*Saintpaulia sp.*), a partir de explantes del pecíolo o de la base foliar.

El uso de los cultivos de células en suspensión mostró ser ventajoso para la formación de embriones somáticos capaces de desarrollarse hasta planta. Este proceso se denominó embriogénesis somática. La embriogénesis somática permite producir una población de plantas con las características de la planta original de la cual deriva el explante.

En general, el cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que se ha utilizado en los estudios de regeneración y propagación de diversas especies. Estas técnicas han permitido la manipulación genética *in vitro* y su propagación con el uso de reguladores de crecimiento vegetal u hormonas vegetales (auxinas, citocininas y giberelinas) y de la variación de los componentes del medio de cultivo *in vitro*. Los reguladores de crecimiento vegetal, conocidos como fitohormonas,

se definen como compuestos orgánicos distintos de los nutrimentos, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo los procesos fisiológicos en las plantas (Alvarez, 1981). Estos son utilizados a diferentes concentraciones para inducir respuestas diversas en los tejidos al ser cultivados *in vitro*. La aplicación exógena de los reguladores de crecimiento influye en la síntesis de metabolitos secundarios, diferenciación y morfogénesis, por lo que permiten la organogénesis, regeneración y micropropagación *in vitro* de plantas, a partir del explante.

En general un proceso de regeneración consiste en encontrar las condiciones del explante y reguladores de crecimiento para poder desarrollar una dediferenciación del tejido y obtener, debido a la totipotencialidad celular, la regeneración de una planta a partir de una o un grupo de células. Las nuevas plantas presentarán las mismas características que la planta madre como una clona de esta. De esta manera, los reguladores de crecimiento vegetal han ayudado a entender mejor el control del desarrollo y metabolismo de las plantas.

Adicionalmente, la capacidad de transferir DNA exógeno en plantas, ha permitido el estudio de diversos procesos a nivel fisiológico, bioquímico y genético. Esto ha generado una serie de alternativas para el mejoramiento de cultivos, integrando metodologías del cultivo de tejidos vegetales y de ingeniería genética. Con ello ha sido posible regenerar plantas fértiles que contienen información genética adicional (plantas transgénicas o transformadas) que les confiere capacidades o características de importancia agrícola, ecológica o biotecnológica.

2.1.1 Regeneración en *Phaseolus vulgaris*

El interés biológico y económico de las leguminosas es muy diverso; sobresale su importancia alimentaria y su capacidad para asociarse simbióticamente a organismos fijadores de nitrógeno. Por dicha importancia, las leguminosas son modelos de estudio, en donde se busca establecer los procesos de regeneración y transformación para la obtención de plantas transgénicas y en consecuencia el estudio *in planta* de genes homólogos.

El frijol es uno de los cultivares de mayor importancia alimentaria, cultural y económica en nuestro país. Más de una tercera parte de la producción mundial de frijol proviene de América Latina, donde este cultivo es básico en la dieta alimentaria y constituye una de las principales fuentes de proteínas para los sectores rural y urbano de bajos ingresos (Díaz, 1993).

Debido a la importancia antes mencionada del frijol, y a que existen varios factores que

disminuyen su productividad, diversos investigadores han tratado de estudiar sistemas y mecanismos que conlleven a su mejoramiento, resistencia ante sus diversos patógenos y ante el estrés (sequía, altas salinidades, entre otros.). A través de varios estudios se ha tratado de encontrar la forma más adecuada de llegar a dicho fin por lo que se han empleado nuevas técnicas de cultivo de tejidos e ingeniería genética, y se han abierto una gama de nuevas alternativas para su estudio y con ello su mejoramiento como cultivar (Diego-García, 1996).

Aunque se han empleado diversos reguladores de crecimiento vegetal como las auxinas, se ha observado que las citocininas están relacionadas con la regeneración, proliferación de brotes, división celular, crecimiento y desarrollo en los tejidos vegetales.

Previamente se había observado que en leguminosas es difícil la regeneración de plantas a partir de callo; sin embargo, para especies como soya (Barwale *et al.*, 1986; Ghazi *et al.*, 1986), chícharo (Kysely *et al.*, 1987) y alfalfa, se cuenta con procesos de regeneración. Particularmente, el uso de benzil aminopurina (BAP) se ha ligado a la inducción de la regeneración en leguminosas. Algunos trabajos mencionan que el uso de BAP induce la proliferación e incrementa el número de brotes (Xiu-Qing y Demarly, 1996). En algunas leguminosas, como lenteja, se ha utilizado BAP en la regeneración de brotes múltiples en concentraciones de 2.25 a 0.225 mg/l. Existen reportes previos sobre protocolos de regeneración de frijol que incluyen cultivo de meristemos (Kartha *et al.*, 1981), regeneración de peciolo y hoja (Malik y Saxena, 1991), explantes cotiledonares (Mohamed *et al.*, 1991) o cultivo de ejes embrionarios (Mohamed *et al.*, 1992) y organogénesis directa a partir de nodos en presencia (Franklin *et al.*, 1991) o ausencia de meristemos axilares (McClellan y Grafton, 1989; Mohamed *et al.*, 1992b). También se ha reportado la regeneración a partir de callos derivados de pedicelo (Mohamed *et al.*, 1993). Estos trabajos mencionan el uso de BAP en la inducción de brotes; sin embargo, hasta la fecha no se ha obtenido un protocolo que permita el uso de las variables y permita la regeneración eficiente y reproducible.

El frijol *Phaseolus vulgaris* es una de las especies económicamente más importante en México; sin embargo, se ha reportado como una especie recalcitrante a la regeneración ya que no ha sido posible obtener un método de generación de brotes de plantas (explantes) *in vitro*. Establecer este proceso ha sido el principal impedimento para la obtención de plantas transformadas de frijol, ya que se tienen datos sobre la susceptibilidad del frijol al proceso de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* y bombardeo con micropartículas.

2.2 Ingeniería genética vegetal

La transformación genética de plantas se ha llevado a cabo principalmente con dos finalidades necesariamente complementarias: conferir una nueva característica a una especie económicamente importante (mejoramiento genético), y estudiar la expresión y regulación de genes. Bajo esta finalidad, las técnicas de transferencia de genes se han diversificado dando lugar a diversas metodologías; entre ellas, una de las más utilizadas se basa en el sistema del plásmido Ti de *A. tumefaciens*.

El sistema basado en *A.t tumefaciens* fué el primero en establecerse gracias al uso de un patógeno natural como vehículo de transformación de plantas superiores (Herrera *et al.*, 1983). *A. tumefaciens* es una bacteria Gram-, microorganismo del suelo causante de la enfermedad conocida como "agalla de la corona". Esta enfermedad se caracteriza por un fenotipo tumeroso y es particular de las plantas dicotiledóneas (Dessaux *et al.*, 1992). *A. tumefaciens* posee un megaplásmido (Ti, de ~200 kb inductor de tumores), que contiene genes que le confieren la capacidad de transferir DNA bacteriano a la célula vegetal (Sheng y Citovsky, 1996). Se han generado diversos vectores derivados del plásmido Ti en los que se deletaron genes productores de tumores y en su lugar se han introducido marcadores que permiten reconocer y seleccionar plantas transgénicas, como es el caso de los que codifican resistencia a kanamicina (neomicina fosfotransferasa o NPTII) y la expresión de actividades reporteras como β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson *et al.*, 1987). Durante la infección de *A. tumefaciens*, un segmento de ADN es transferido de la bacteria a la planta. Esta región denominada ADN-T (ADN de transferencia) y se caracteriza por tener en sus extremos 25 pares de bases (pb) directas repetidas (Zupan y Zambryski, 1995). El ADN-T en su secuencia codifica las enzimas para la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal tipo auxinas y citocininas que determinan el fenotipo tumeroso de los tejidos vegetales transformados. El procesamiento y transferencia del ADN-T se induce por los productos de los genes *vir* (virulencia), los cuales residen en el plásmido Ti y median la transferencia del ADN-T (Fig. 1). Adicionalmente se lleva a cabo la síntesis de compuestos bacterianos llamados opinas, que sirven como fuente de carbono y nitrógeno para *Agrobacterium* y le permiten su sobrevivencia durante su vida libre (Dessaux *et al.*, 1992). En la actualidad se sabe bastante sobre el reconocimiento inicial de compuestos fenólicos que desencadenan la expresión de genes *vir* y sobre el mecanismo para la transferencia de la hebra del ADN-T a la célula vegetal como cadena sencilla. Sin embargo, aún hay algunas interrogantes sobre lo que pasa durante la integración de la hebra del ADN-T en el ADN vegetal.

La Figura 1 resume la mayoría de las reacciones involucradas en el transporte del T-ADN. Primero se lleva a cabo la unión de *Agrobacterium* a los receptores de la superficie celular vegetal. Existen componentes que residen en el cromosoma de *Agrobacterium* y pertenecen a loci de virulencia cromosomales, *chvA*, *chvB*, *pscA* y *att* requeridos para la síntesis de polisacáridos extracelulares y celulosa, los cuales intervienen en la unión de *Agrobacterium* a los receptores superficiales de la célula huésped. Posteriormente se lleva a cabo el reconocimiento de las señales moleculares de la célula vegetal por el sistema de dos componentes VirA/VirG de la bacteria, estas señales moleculares de la planta son compuestos de tipo fenólicos que son detectados por el sistema de dos componentes mencionado. Con la detección de estos compuestos, se lleva a cabo la activación de los genes bacterianos *vir* después de la fosforilación del activador transcripcional (VirG) y estos actúan en *trans* para transferir el ADN-T. Posteriormente se lleva a cabo la producción de la cadena T de ADN transferible como cadena sencilla, por medio del corte en los bordes del ADN-T donde se involucran las proteínas VirD1, D2 y C1 (D3). La formación del complejo T se lleva a cabo cuando las proteínas VirE2 se unen a la cadena sencilla de ADN; se forma un canal transmembranal donde intervienen proteínas VirB y se exporta el complejo T al citoplasma de la célula vegetal donde finalmente este complejo es transportado a la célula vegetal. La importación del complejo T al núcleo al parecer se lleva a cabo por moléculas que reconocen el complejo y lo guían a través del poro nuclear, posteriormente se lleva a cabo la integración del ADN-T al genoma vegetal (Sheng y Cytovski, 1996).

2.3 Transformación genética de frijol

A partir del sistema de *Agrobacterium* se han generado diversas versiones del vector molecular para la obtención de plantas transgénicas en leguminosas. Esta disponibilidad de vectores nos permitió pensar en la transformación de frijol bajo esta vía.

Estudios relacionados con leguminosas indican la susceptibilidad de transformación en explantes cotiledonares de soya y en tallos de alfalfa mediante *Agrobacterium* (Franklin *et al.*, 1991). Otras leguminosas como *Lotus japonicus* han sido transformadas usando cepas desarmadas de *Agrobacterium* inoculando cotiledones y obteniendo espontáneamente brotes transformados (Oger *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha reportado la transformación de *Medicago truncatula* que también involucra el empleo de *Agrobacterium* utilizando regeneración vía embriogénesis somática y de manera interesante, cotiledones para la obtención de plantas transgénicas vía organogénesis

directa (Trieu y Harrison, 1996). Se ha reportado también la susceptibilidad de *Phaseolus acutifolius* y la obtención de plantas regeneradas completas a partir de callos competentes (Dillen *et al.*, 1997). Recientemente Zambre *et al.*, (1998), reportan que los explantes cotiledonares presentan mejores resultados con respecto a otros explantes para una posible regeneración de brotes, además de reportes hechos en leguminosas como *Cajanus cajan* sobre la formación de brotes múltiples a partir de nodos cotiledonares (Prakash *et al.*, 1994)).

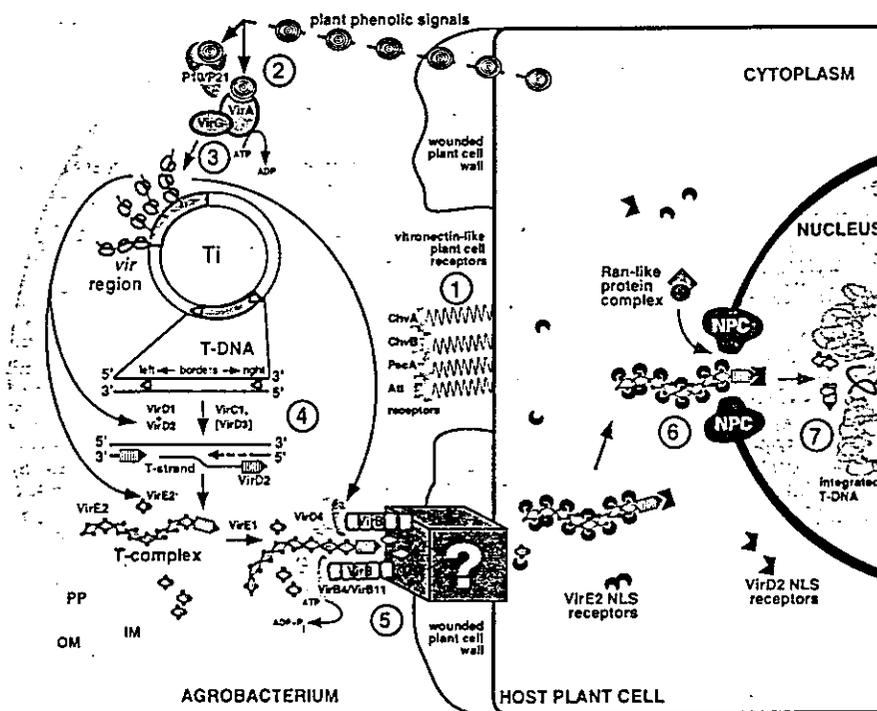


Figura 1. Interacciones *Agrobacterium*-célula vegetal. Este diagrama resume la mayoría de las reacciones involucradas en el transporte del T-ADN. 1, unión de *Agrobacterium* a los receptores de la superficie celular vegetal; 2, reconocimiento de las señales moleculares de la célula vegetal por el sistema de dos componentes VirA/VirG; 3, activación de los genes bacterianos vir; 4, producción de la cadena T transferible; 5, formación del complejo T y su transporte a la célula vegetal; 6, importación del complejo T al núcleo; 7, integración del T-ADN. IM, membrana bacteriana interna; NPC, complejo del poro nuclear; OM, membrana bacteriana externa; PP, periplasma bacteriano (tomado de Sheng y Cytovski, 1996).

Existen trabajos que refieren la susceptibilidad del frijol a la infección y transformación mediante *Agrobacterium* (McClellan *et al.*, 1991), así como la integración estable y expresión de *nptII* en callos después de haber sido co-cultivados con *A. tumefaciens* cepa EHA101 (Franklin *et al.*, 1993). Previamente, McClellan *et al.*, (1991) había observado la susceptibilidad de tejido cotiledonar de frijol a la infección por *Agrobacterium*. Mariotti *et al.*, (1989) intentó transformar frijol con la cepa LBA4404 (Bevan, 1984) utilizando explantes de tallo, con lo que obtuvo algunas plántulas que fueron resistentes a kanamicina y dieron actividad de GUS; sin embargo, no se menciona la eficiencia en la transformación ni reproducibilidad del proceso. Recientemente, se han utilizado otras cepas como la A281, además de EHA101 en donde se observa la susceptibilidad de diferentes variedades de frijol a la infección de *Agrobacterium*. Los mejores resultados se observan en los cultivares Admiras, Hinds Morona, Tendergreen y Wachs Beste von Allen, obteniéndose callo transgénico pero no brotes (Nagl *et al.*, 1997). Por lo anterior se puede considerar que la transformación genética del frijol es un proceso viable; sin embargo, la obtención de plantas transgénicas enfrenta como principal impedimento, un protocolo de regeneración confiable y eficiente.

En general, las técnicas y metodologías anteriores apuntan al uso de formación de brotes múltiples alrededor de meristemas pre-existentes para proveer de sistemas ideales para la transformación y multiplicación de leguminosas (Nagl *et al.*, 1997).

Por otro lado, en la familia de las leguminosas, las plantas transgénicas generadas por otros métodos de transferencia de ADN, como el método de bombardeo con micropartículas incluyen frijol francés y soya, aunque la frecuencia de transformación es baja y usualmente genera plantas quiméricas (Whunw y Minamikawa, 1996).

En frijol se ha reportado la transformación mediante la técnica de bombardeo; sin embargo, esta metodología sólo permite obtener un número limitado de plantas (aproximadamente 0.5%). Algo interesante de este reporte es el empleo temporal de BAP a concentraciones de 2.6 mg/l para estimular la formación de brotes y posteriormente (0.34 mg/l) para la inducción de la regeneración en el meristemo. Estas plantas regeneradas contienen el gen *bar* que les confiere resistencia al herbicida Basta (Russell *et al.*, 1993).

Los protocolos de regeneración mencionados anteriormente no han sido eficientes para el frijol y en particular, en *P.vulgaris* L. cv. negro Jamapa. Usando la información referida a leguminosas y a frijol, así como los estudios de transformación mediante *Agrobacterium*, se planteó una serie de experimentos que hicieran factible la regeneración-transformación de frijol. En este trabajo reportamos un protocolo eficiente de regeneración de frijol y su transformación genética empleando *A. tumefaciens*.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer un protocolo de regeneración *in vitro* de plantas de frijol, que integre el sistema de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 Objetivos específicos

1. Elaboración de un protocolo de regeneración eficiente para *Phaseolus vulgaris*.
2. Integración del sistema de transformación genética de *P. vulgaris* mediante *A. tumefaciens* al protocolo de regeneración.
3. Obtención de brotes Km^R que expresen de manera estable la actividad de neomicina fosfotransferasa (NPTII) y β -glucuronidasa.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios utilizados fueron medio de formulación Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas de medio Gamborg (MS/B5) de Sigma Company M-0404, adicionando reguladores de crecimiento vegetal y sacarosa dependiendo del tipo de medio.

La germinación de semillas se llevó a cabo en medio MS/B5 a la mitad de su concentración normal, adicionando 10 gr/l de sacarosa, agar 8% y pH 5.7. Este medio de germinación fué denominado medio S. Medio inductor de brotes (MIB): MS/B5 suplementado con 5 mg/l de BAP, 30 gr/l sacarosa, agar 8% y pH 5.7; Medio para desarrollo de brotes (MDB): MS/B5 suplementado 50 gr/l sacarosa, agar 8% y pH 5.7; Medio para formación de raíces en brotes normales (MIR): MS/B5, 50 gr/l sacarosa, agar 8% y pH 5.7.

Para la selección de brotes transgénicos se adicionaron al medio MIB 200 mg/l kamicina (Km) y 50 mg/l ticarcilina (Tic). Posteriormente el medio MIR sólo incluyó el uso de Tic en la misma concentración para la eliminación de *Agrobacterium*.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se crecieron en medio Luria (LB) suplementado con 50 mg/l de Km y 50 mg/l de rifampicina a 27°C.

4.2 Germinación de semillas *in vitro*

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con extran al 100% durante un minuto; posteriormente se eliminó el extrán y se adicionó etanol al 70% durante un minuto, se eliminó el etanol y se agregó cloro comercial al 10% durante 10 minutos, finalmente se realizaron lavados con agua estéril durante tres ocasiones para enjuagar restos de cloro. Las semillas fueron colocadas en medio S. Se colocaron 5 semillas en cada frasco Gerber y se crecieron en fotoperíodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, a 25°C durante 10 días para la obtención de los explantes.

4.3 Obtención de brotes

Para la obtención de brotes se probó el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal, evaluando particularmente el efecto de citocininas en la capacidad organogénica de ápices y nodos

cotiledonares de 10 días de edad. Se realizaron 2 experimentos pilotos relacionados con lo anterior, utilizando el diseño de barridos hormonales, que consistió en incubar los explantes en diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento.

En el experimento I se emplearon auxinas; Acido indolacético (AIA) y Picloram (PIC), así como citocininas; Benzilaminopurina (BAP) y Kinetina (KIN) en concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/l , con sus repectivas combinaciones de auxinas/citocininas (Tabla 1). Se utilizaron un total de 36 concentraciones diferentes en tres repeticiones, con un total de 30 explantes por tratamiento. Se colocaron en condiciones de 16 horas luz y 8 oscuridad a 25°C.

El experimento II incluyó el uso exclusivo de citocininas (BAP y KIN) en concentraciones de 5-20 mg/l, incluyendo intervalos de concentración de 2 mg. Los explantes se incubaron en las condiciones ya mencionadas.

Tabla 1. Experimento I, uso de auxinas-citocininas para la obtención de brotes (mg/l).1-36 indican el número de tratamiento designado para cada mezcla con una distinta concentración de auxina y citocinina.

auxinas citocininas	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
0.0	1	2	3	4	5	6
0.1	7	8	9	10	11	12
1.0	13	14	15	16	17	18
2.5	19	20	21	22	23	24
5.0	25	26	27	28	29	30
10	31	32	33	34	35	36

4.4 Enraizamiento de brotes

Básicamente se manejaron tres variables: concentraciones de auxinas, sacarosa y nutrimentos (Tabla 2). Se utilizó el medio MIR sin ningún problema para el enraizamiento de brotes normales. Para el enraizamineto de brotes transgénicos, se emplearon adicionalmente enraizadores comerciales conteniendo ácido indolbutírico (IBA) denominado RADIX. Además de las variantes empleadas en la Tabla 2, los medios incluyeron Acido naftalenacético (ANA), AIA y KIN.

Tabla 2. Variables manejadas en medios para la obtención de raíces en brotes transgénicos.

MEDIO PROBADO	MEDIO MS	MEDIO MS/BS	ANA	AIA	IBA	RADIX	KIN	SACAROSA
1	*		0.1 mg				10 mg	30 g
2	*		0.1 mg					30 g
3	*							30 g
4	*							30 g
5	*						10 mg	30 g
6		* [1/2]						30 g
7		*						50 g
8		*	1 mg					30 g
9		*		1 mg				30 g
10		*			1 μ M			30 g
11		*			1 mg			30 g
12		*				1 mg		30 g

*Tipo de medio empleado; *[1/2] medio utilizado a la mitad de su concentración normal.

4.5 Análisis histológico

Se obtuvieron muestras de los explantes durante 20 días después de la inducción de brotes partiendo del tiempo=0. Las muestras fueron fijadas en una solución de 2% paraformaldehído, 0.5% glutaraldehído y 0.1 M de buffer Sorensen (Fosfato de sodio dibásico 0.03M y fosfato de potasio monobásico 0.06M, pH5.6). Las muestras se fijaron en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas y posteriormente se guardaron a 4°C.

Las muestras se procesaron realizando lavados con buffer Sorensen y posteriormente se realizaron varios períodos de deshidratación con series graduales de etanol de 10% a 100% durante 15 minutos en cada concentración. La inclusión se realizó en parafina y los cortes fueron hechos con un microtomo a 10 μ m. La tinción de los cortes se realizó con azul de toluidina.

4.6 Transformación genética de frijol (vía co-cultivo con *A. tumefaciens*)

Para llevar a cabo las pruebas de transformación genética de frijol se probó la técnica de transformación por co-cultivo vía *A. tumefaciens*. Esta metodología implicó diversos períodos de incubación de *Agrobacterium* en presencia del explante (6, 18, 12 y 24 hrs), para adecuar las metodologías propuestas por Horsch *et al.* (1985) y Guevara-García (1992). Inicialmente se utilizaron 3 cepas y se evaluó con ello la eficiencia de transformación en base a la cepa y al tipo de explante. Las cepas utilizadas para las pruebas de transformación genética fueron: LBA 4404, EHA 105 y A281 con el vector binario pBI121 (Bevan, 1984; Jefferson *et al.*, 1987; Hood *et al.*, 1993). El plásmido pBI121 presenta al gen los genes *nptIII* que codifica para neomicina fosfotransferasa como marcador y *uidA* codifica β -glucuronidasa como reportero (Fig. 2). Después de la infección de *Agrobacterium* los explantes se colocaron en el medio MIB con kanamicina 200 mg/l.

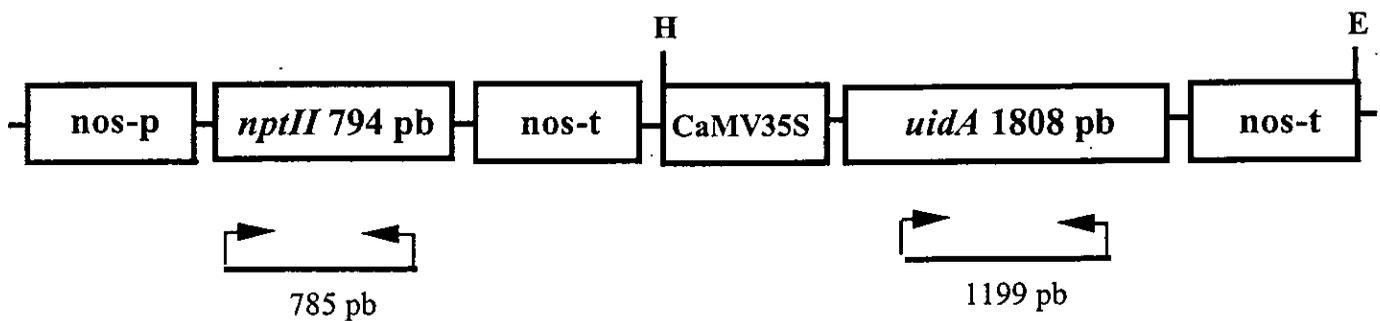


Figura 2. Esquema representativo del ADN-T del plásmido pBI121 con el fragmento E-H de 3kb (Jefferson *et al.*, 1987). H, sitio de restricción HindIII; E, sitio de restricción EcoRI; nos-p, promotor de nopalina sintasa; *nptIII*, gen de neomicina fosfotransferasa; nos-t, sitio de poliadenilación de nopalina sintasa; CaMV35S, promotor constitutivo del virus mosaico de la coliflor; *uidA*, gen de β -glucuronidasa. Las regiones amplificadas para los genes *nptIII* y *uidA* por PCR se muestran entre flechas.

Adicionalmente, para la evaluación de la disminución del porcentaje de brotación por efecto del proceso de co-cultivo, se utilizó un “co-cultivo” denominado cultivo control que consistió en implementar las condiciones de este método y la incubación de los explantes en las condiciones de co-cultivo probadas sin la adición de células de *Agrobacterium*. En este solo se adicionó el medio donde se crecieron previamente las células bacterianas después de una centrifugación.

4.7 Sensibilidad del frijol a kanamicina

Para determinar la resistencia del frijol a kanamicina se realizó una cinética de crecimiento con los explantes en diferentes concentraciones del antibiótico. Se utilizaron 10 diferentes concentraciones en un rango de 0 a 450 mg/l en intervalos de 50 mg adicionados a los medios de cultivo MIB.

4.8 Obtención de ADN vegetal

El ADN fue extraído de hojas de brotes resistentes a kanamicina de tres semanas a partir de la infección con *Agrobacterium*. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de hojas con el Kit D55000 de PureGene. La purificación del ADN genómico de plantas bajo el protocolo mencionado anteriormente se llevo a cabo de la siguiente manera: la lisis celular implicó la colecta de 20-60 mg de tejido el cual se colocó en hielo y se le adicionó nitrógeno líquido en 2 o 3 ocasiones hasta que dejó de efervescer el tejido y se trituró en un tubo eppendorf. Se agregaron 600µl de la solución de lisis Cell Lysis Solution y se agitó en el vortex suavemente incubándose después a 60-65°C por 1 hora. Se centrifugó por 1 minuto y se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf nuevo. Posteriormente se realizó un tratamiento con RNAsa Adicionando 3µl de RNAsa (10mg/ml) e incubando a 37°C por 15 minutos. Se dejó enfriar el tubo a temperatura ambiente para la adición de 200µl de solución para precipitación de proteínas, se agitó en el vortex vigorosamente por 20 segundos y se centrifugó en microfuga durante 3 minutos.

La precipitación del ADN se llevó a cabo tomando el sobrenadante y se agregó 600µl de isopropanol al 100%, se agitó vigorosamente y luego se centrifugó por un minuto, se decantó el sobrenadante y se colocó el tubo sobre una toalla de papel para que escurra, finalmente se agregaron 600µl de etanol al 70% agitándose y centrifugando como anteriormente se mencionó. Se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos o al vacío con centrifugación (Savant) durante 5 minutos. La hidratación de ADN se llevó a cabo adicionando 100 µl de DNA hydration solution (o se adicionó agua o TE), y se dejó hidratando 1 hora a 65°C. El ADN se guardó a 2-8°C de temperatura. El ADN se limpió con fenol:cloroformo, se precipitó con acetato de potasio (3M), se lavó con isopropanol absoluto. Para eliminar sales se utilizó etanol al 70%; finalmente, para secado del ADN se colocó en el Savant y se resuspendió en un volumen de 50 µl de agua.

4.9 PCRs (*nptII* y *uidA*)

Para el análisis de *nptII* y *uidA* por PCR se exploraron diversas temperaturas de alineamiento para establecer la temperatura óptima que permitiera amplificar el producto esperado.

Posteriormente, para ambos genes (*nptII* y *uidA*), se utilizó el siguiente programa: 94°C 10' 1 ciclo; 94°C 1', 57°C 1.5' y 72°C 2' 35 ciclos; 72°C 2' 1 ciclo. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Figura 3.

4.10 Análisis tipo Southern blot

Se digirieron 10 µg de ADN vegetal con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Posteriormente se recobró el ADN con fenol:cloroformo (1:1) y se precipitó con acetato de potasio, se lavó la pastilla con etanol y se corrió en un gel de 0.8% agarosa. El gel fue tratado para la transferencia del ADN a una membrana de nitrocelulosa. Previo a la hibridación, la membrana se trató durante dos horas con la solución de hibridación del kit New Megaprime (Amersham) a 65°C (pre-hibridación). La membrana fue hibridada con el fragmento *EcoRI-HindIII* del ADN-T de pBI121 (3kb) previamente marcado con 50µCi de ($\alpha^{32}P$) dCTP, la hibridación se realizó a 65°C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron lavados de la membrana en las siguientes soluciones: a) SSC 2x, SDS 0.1% por 20' en dos ocasiones a 37°C; b) SSC 1x, SDS 0.1% 20'; y c) SSC 0.1x, SDS 0.1% 20' dos veces, los lavados b y c se realizaron a 65°C.

La preparación de gel para transferencia de ADN se realizó de la siguiente manera: El gel fue colocado en una solución 0.25 M HCl durante 30 minutos y posteriormente se enjuagó con agua destilada. El gel se colocó en solución de desnaturalización (NaOH 0.5M y NaCl 1.5M) por 20 minutos, esta solución fue remplazada por solución nueva y se dejó 20 minutos más. Posteriormente se enjuagó con agua destilada y se le adicionó solución de neutralización (NaCl 1.5M y Tris 0.5M) por un período de 20 minutos, se reemplazó por solución nueva y se dejó 20 minutos más.

La transferencia de ADN a la membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo colocando una pirámide de papel tipo servitoallas de aproximadamente 5cm, se cortó papel Whatman 3MM colocándolo sobre las servitoallas, la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel se expuso a la superficie del gel tratado, posterior a la membrana se colocó nuevamente una pieza de papel Whatman que sirvió de puente entre el recipiente con la solución para transferencia (SSC 20x pH 7) y la pirámide de papel con el gel. El gel se transfirió por varias horas o durante toda la noche para posteriormente enjuagar la membrana en una solución SSC 2x por 30 segundos. El ADN transferido a la membrana se fijó con UV y posteriormente se realizó el protocolo de hibridación mencionado por el kit New Megaprime para el marcaje radioactivo.

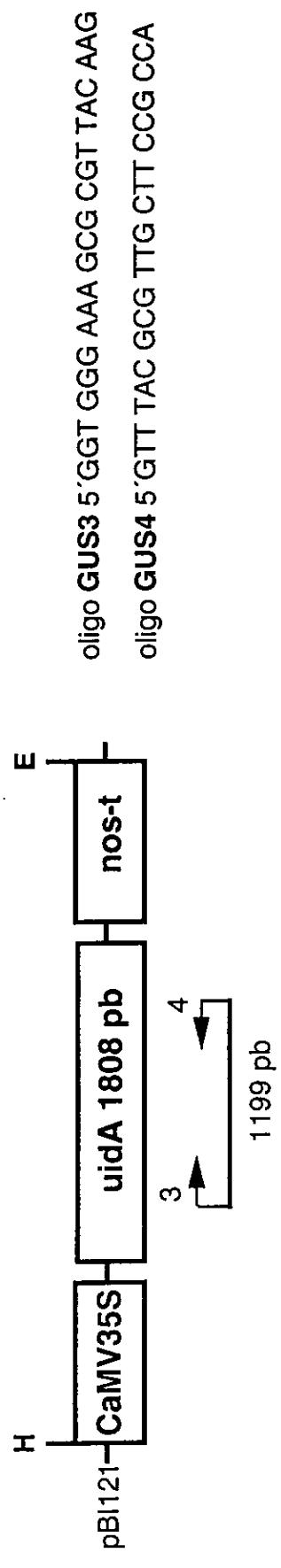
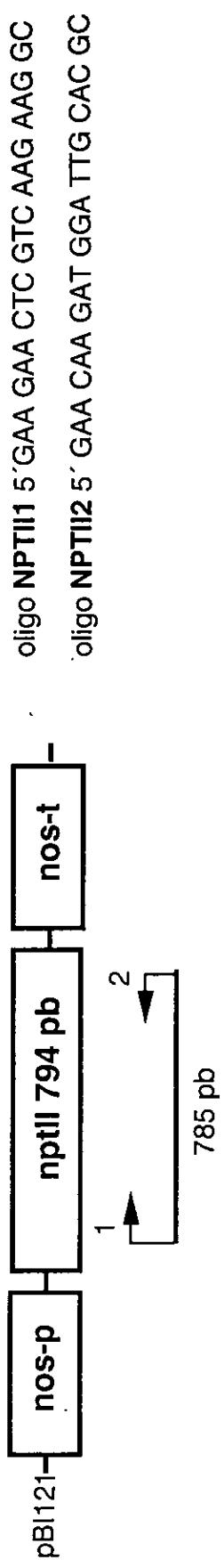


Figura 3. Fragmentos amplificados de los genes *nptII* (neomicina fosfotransferasa) y *uidA* (β -glucuronidasa) por PCR y los oligonucleótidos utilizados.

4.11 Expresión β -glucuronidasa (GUS)

La actividad de GUS fué localizada de manera histoquímica de acuerdo con Jefferson *et al* (1987). Los tejidos fueron incubados en buffer en presencia del sustrato X-Gluc (Sigma) por un período de 12 horas. El buffer utilizado para el sustrato incluyó EDTA 10mM, ferricianuro de potasio 0.5mM, ferrocianuro de potasio 0.5mM, Tritón X-100 0.5mM, amortiguador de fosfato de sodio 100mM y X-Gluc en DMSO 1mg/ml. Posteriormente el material fué aclarado con una solución metanol:acetona (3:1) o etanol al 70%. Para su conservación se colocó en una solución de glicerol al 50% y se almacenó a 4°C.

4.12 Transformación genética de tabaco

Con la finalidad de obtener plantas transgénicas como control de transformación de las cepas de *Agrobacterium* a utilizar y para la obtención de controles positivos de referencia en la generación de plantas transgénicas de frijol, se llevó a cabo la transformación de tabaco cultivar Xanthi, mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, con las cepas EHA105 y LBA4404, plásmido pBI121.

Se co-cultivaron discos de hojas como explantes bajo el método descrito previamente en frijol. Posteriormente, los explantes se colocaron en los medios de selección. El medio de selección I se empleó por un lapso de 10 días. Los explantes se colocaron en el medio II por un período de un mes y finalmente los brotes generados se desarrollaron en el medio III (Tabla 3).

Tabla 3. Medios para inducción de brotes y regeneración de plantas de tabaco

		mg/l				g/l		
	MS/B5	ANA	BAP	Km	Tic	Sacarosa	Agar	pH
Medio I	*	0.1	1	50	500	20	8	5.7
Medio II	*	-	1	-	500	20	8	5.7
Medio III	*[1/2]	-	-	-	-	10	8	5.7

*[1/2] medio MS/B5 a la mitad de su concentración normal de nutrientes.

V. RESULTADOS

5.1 Proceso de Regeneración en Frijol

5.1.1 Establecimiento de los cultivos *in vitro* de frijol

La germinación de semillas de frijol *in vitro* se llevó a cabo satisfactoriamente con porcentajes de germinación de más del 95% en medios para germinación (S). Las plantas obtenidas *in vitro* fueron adecuadas como donadoras de explantes ya que no provocaron contaminación en medios inductores de brotes.

Los experimentos iniciales con ápices y nodos cotiledonares como explantes, permitieron encontrar las condiciones y uso específico de ciertos reguladores de crecimiento en la regeneración de brotes (Fig. 4).

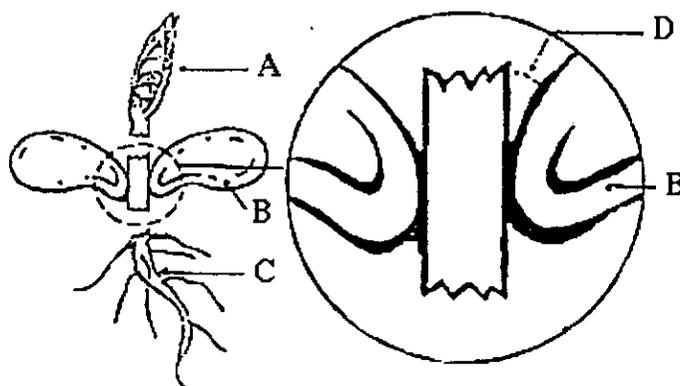


Figura 4. Esquema representativo de la obtención de explantes a partir de plantas germinadas *in vitro* de 10 días de edad. A) hojas cotiledonares; B) cotiledones; C) raíz y D) axila de la yema cotiledonar.

5.1.2 Regeneración de frijol

La obtención de brotes se basó en el efecto de auxinas y citocininas por lo que se buscaron las concentraciones más idóneas de reguladores de crecimiento adicionados exógenamente a los medios de cultivo. Como se observa en la Tabla 4, de manera exclusiva las citocininas (BAP y KIN) en concentraciones de 5 y 10 mg/l inducen la proliferación de brotes a diferencia del resto de las concentraciones probadas que solo inducen callogénesis.

Durante la formación de brotes se observó que el número de estos variaba por explante en los medios con cada una de las citocininas. En medios suplementados con BAP se observó una buena inducción de brotes múltiples mientras en medios con KIN no se observaron brotes múltiples, solo se desarrollaron brotes únicos.

Tabla 4. Uso de auxinas-citocininas para la obtención de brotes (mg/l).

<u>auxinas</u> <u>citocininas</u>	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
0.0	<i>control</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
0.1	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
1.0	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
2.5	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
5.0	<i>Brotes</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
10	<i>Brotes</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>

c = formación de callo

Después de haber analizado los resultados obtenidos con el uso de explantes apicales y cotiledonares, así como con el empleo de reguladores de crecimiento, se limitó el protocolo básico de regeneración de frijol al uso de explantes cotiledonares debido a la formación de brotes múltiples en presencia de BAP 5 mg/l, como medio inductor de brotes (MIB). Este medio permite la inducción de brotes y el desarrollo posterior de los mismos. En la Figura 5 se muestra una secuencia del desarrollo de brotes hasta su paso al medio inductor de raíces (MIR). En la Figura 5A, se observa la proliferación de estructuras globulares o yemas que se diferencian en brotes. El desarrollo de brotes y la proliferación de callo en la parte basal sobre el explante se ve en la Figura 5B. La figura 5C muestra el desarrollo de los brotes a las 3 semanas. Los brotes posteriormente se subcultivan en medios de inducción de raíces como se observa en la Figura 5D.

Es importante mencionar que la orientación del explante influyó en la generación de brotes. Se observó que el explante debe tener orientación semejante a la de su posición en la planta (vertical) ya que si es colocado de manera horizontal solo se induce la proliferación de callo verduoso.

La inducción de brotes múltiples (en MIB) dió en promedio 3-4 primordios viables por explante. La separación de los brotes se produjo a los 20 días con porcentajes de sobrevivencia del 97% en BAP. El medio MIR fué empleado en brotes ya separados, derivados de BAP y se observó la proliferación de raíces como se mencionará en los resultados de enraizamiento.

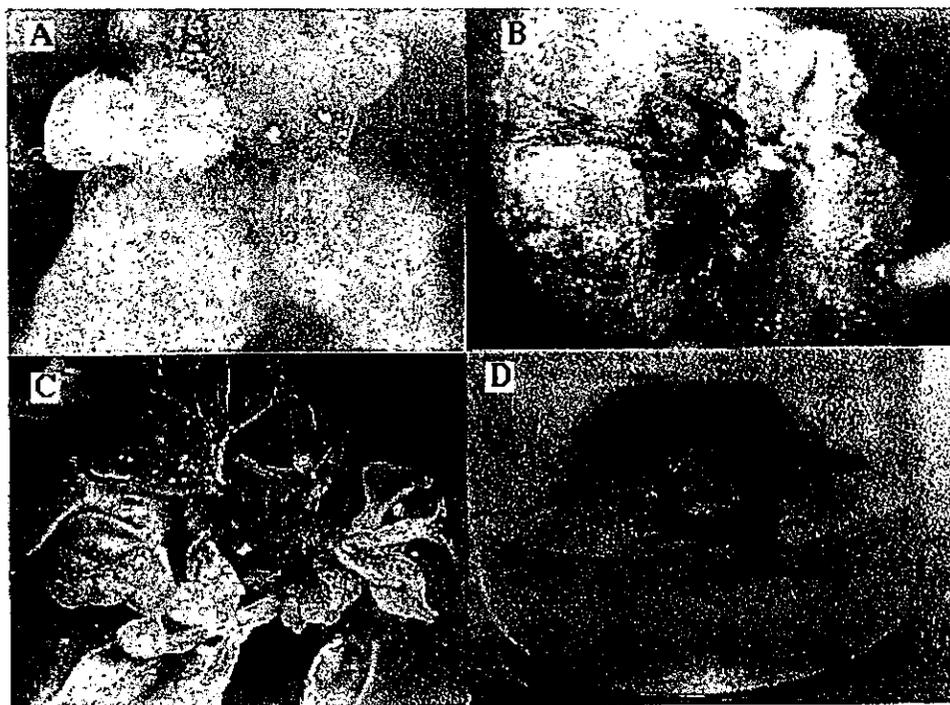


Figura 5. Secuencia del desarrollo de brotes de frijol (negro Jamapa). A) Brote; B, C y D) diversas etapas durante el desarrollo de brotes.

5.1.3 Enraizamiento de brotes normales

Experimentos iniciales de enraizamiento realizados en brotes derivados de KIN, presentaron un porcentaje de enraizamiento de alrededor del 86% en los medios probados. Sin embargo, sólo se usó un número mínimo de 10 explantes por tratamiento. De estas pruebas, en el medio MS/B5 con 50 mg/l de sacarosa (MIR) se obtiene la más alta eficiencia con el 40%, siguiéndole el medio MS/B5 a la mitad de su concentración normal con 20%. Ambos medios fueron probados para enraizamiento de brotes derivados de BAP donde se pudo observar que el medio MIR induce un enraizamiento en el 80% de los brotes.

5.1.4 Obtención de plantas regeneradas adultas

Las plantas regeneradas en nuestros experimentos con las dos citocininas, se mantuvieron hasta el estadio de plantas adultas enraizadas *in vitro*. Posteriormente, para la obtención de semillas de la F₀ se dejó un lote de plantas en donde se observó la floración y se obtuvo semilla.

Como se observa en la Tabla 5, el mayor número de plantas regeneradas se obtiene en medio suplementado con BAP, este número representa el 72% del total de plantas regeneradas en todas las condiciones y concentraciones de los medios de regeneración. En consecuencia la mayor cantidad de semillas, se obtuvo de plantas regeneradas con BAP. Del 72% de plantas regeneradas con BAP, 44% se obtienen con una concentración de 5mg/l, lo que sustenta la utilización de BAP a estas concentraciones (Tabla 5).

Tabla 5. Número de plantas regeneradas en medios suplementados con citocininas, llevadas hasta estadio de floración y obtención de semillas en diferentes concentraciones de citocinina.

	mg/l de citocinina						
	5	8	10	11	12	14	16
No. de plantas en medios MS/B5 suplementados con							
BAP	11	2	-	-	1	3	1
KIN	3	-	-	1	1	1	1
No. de plantas regeneradas en medios suplementados con	Porcentaje con respecto al total %						
BAP ¹	7				28		
KIN ²	7				28		
BAP 5mg/l	11				44		

¹ En concentraciones de 8 a 16 mg/l. ² En concentraciones de 5 a 16 mg/l

Como se mencionó, el enraizamiento de brotes derivados del MIB no presenta problemas y se obtienen plantas regeneradas adultas con una eficiencia del 80%. Por los resultados obtenidos, este protocolo de formación de brotes y regeneración de brotes a partir de nodos cotiledonares demuestra ser altamente eficiente si se compara con otros datos de frijol reportados en la literatura (Tabla 6).

Tabla 6. Eficiencia de regeneración de frijol y su comparación con trabajos de regeneración en frijol co-cultivado y sin co-cultivo con *A. tumefaciens*.

Co-cultivo con <i>Agrobacterium</i>	Regeneración de brotes (%)	Fuente
NO	78	Franklin <i>et al.</i> , 1991
NO	82	McClellan y Grafton, 1989
NO	80-85	Malik y Saxena, 1991
NO	97	Este trabajo
SI	72	Este trabajo

5.1.5 Análisis histológico

El análisis histológico del proceso de regeneración por microscopía óptica indica preliminarmente un proceso de organogénesis directa. En nuestras preparaciones se observa la formación de brotes y regiones parecidas a primordios o zonas meristemáticas junto a estos (Fig. 6). Sin embargo, se continuará con los estudios histológicos para determinar el origen de las plantas regeneradas.

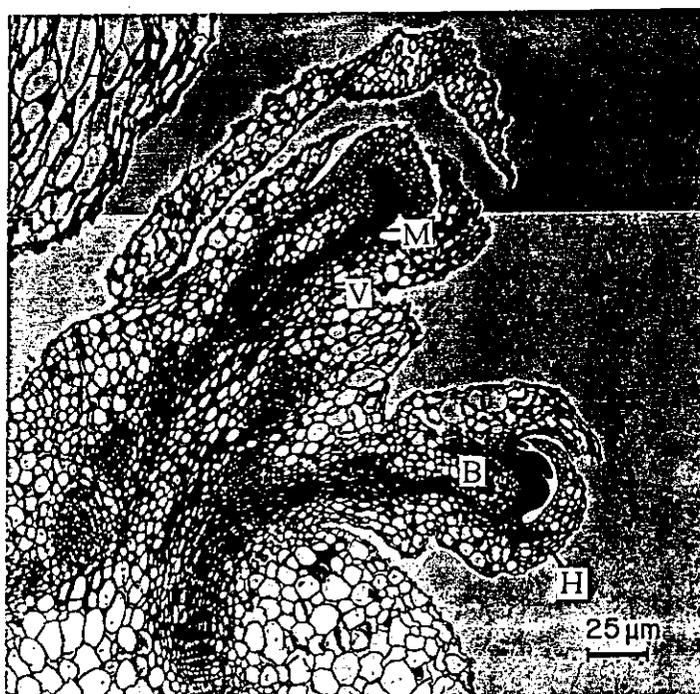


Figura 6. Análisis por microscopía óptica de explantes con brotes múltiples 7 días después de la inducción con BAP. B, brote; M, región meristemática; V, haces vasculares y H, primordios de hoja.

5.2 Transformación Genética

5.2.1 Transformación genética de tabaco

Se llevó a cabo la transformación genética de tabaco como control de transformación de nuestras cepas de *A. tumefaciens* para la obtención de plantas transgénicas y controles positivos con la integración del ADN-T de pBI121. Se obtuvieron dos líneas de plantas transgénicas en base a la cepa utilizada durante el co-cultivo (Fig. 7). Las líneas fueron denominadas TL (Tabaco/LBA4404) y TE (Tabaco/EHA105). Se obtuvieron plantas con los transgenes del ADN-T del plásmido pBI121 que presentaron actividad de GUS (*uidA*). Estas plantas fueron utilizadas como controles durante el análisis molecular de brotes transgénicos de frijol (Fig. 12A). Adicionalmente se obtuvo la T₁ de las líneas TL y TE, así como la F₁ de tabaco normal utilizado como control.

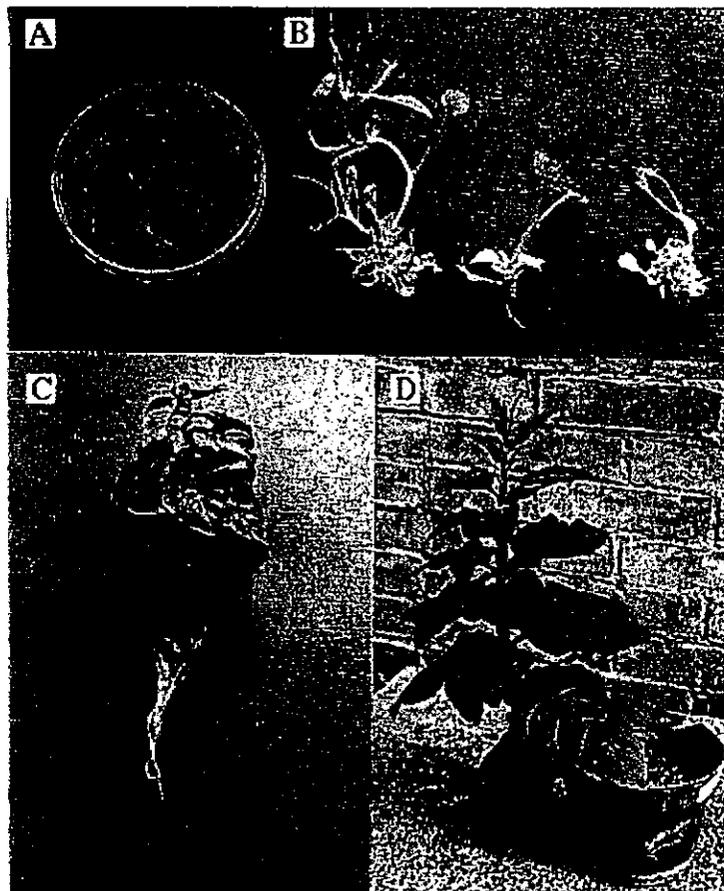


Figura 7. Proceso de regeneración y transformación de plantas de tabaco TL y TE. A) plantas donadoras de explantes para el co-cultivo con *Agrobacterium* ; B) regeneración de plantas control, transgénicas TE y TL (de izq. a der.) ; C) planta enraizada *in vitro* y D) planta adulta floreciendo.

5.2.2 Sensibilidad de explantes no transformados de frijol a kanamicina

Para poder obtener un método de selección de brotes transgénicos generados con nuestro protocolo, se sometieron varios explantes en proceso de inducción de brotes a diferentes concentraciones de kanamicina para observar la resistencia de frijol a este antibiótico. Los resultados indican que la concentración de 50 mg/l evita un desarrollo normal del brote con respecto a los controles; sin embargo, en esta concentración crecen y se desarrollan lentamente por lo que no muere el tejido normal. Los brotes en la concentración de 200 mg/l no se desarrollan y mueren (Fig. 8A). Esta concentración muestra claramente la muerte total del tejido normal no transformado, por eso se eligió esta concentración para seleccionar los brotes transformados con la resistencia a kanamicina.

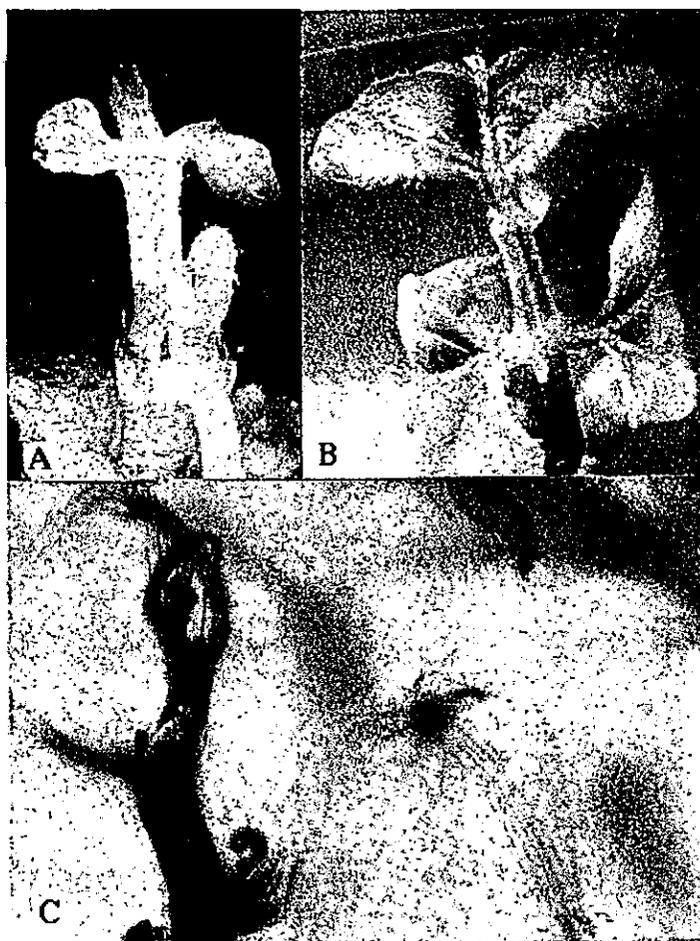


Figura 8. Brotes de frijol transformados con *A. tumefaciens*. A) brotes no transformados sensibles a Km; B) brotes Km^R y C) actividad de GUS en tallo y haces vasculares.

5.2.3 Transformación genética de frijol

En base al método de regeneración que se desarrolló en este trabajo, se acopló la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*. Experimentos preliminares mostraron la factibilidad de la transformación genética de frijol negro vía co-cultivo con *A. tumefaciens*. Los brotes generados en estos experimentos presentaron resistencia a kanamicina (200 mg/l), se desarrollaron durante tres semanas y fueron denominados Km^R (Fig. 8B). Estos brotes fueron sacrificados para pruebas de actividad de GUS (Fig. 8C).

Estos experimentos iniciales indicaron que el protocolo desarrollado era adecuado para transformar frijol negro. Sin embargo, en estas condiciones, los porcentajes de formación de brotes y de sobrevivencia disminuyeron por problemas de contaminación, generación de brotes en medios de selección y condiciones de co-cultivo. Esto llevó a optimizar las condiciones de transformación y con ello variables del método de co-cultivo.

Adicionalmente, como se mencionó, se utilizaron plantas transgénicas de tabaco transformado con nuestras cepas de *A. tumefaciens* como referencia en control positivo para el análisis posterior de las plantas transgénicas de frijol.

5.2.3.1 Establecimiento de las condiciones de co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*

Nuestros experimentos se centraron en establecer las condiciones para alcanzar una mayor eficiencia del proceso regeneración-transformación a través de *Agrobacterium*.

Para evaluar el efecto del co-cultivo entre el explante y *A.t tumefaciens* en la disminución del porcentaje de formación de brotes, se tomaron en cuenta los porcentajes de sobrevivencia de los brotes en condiciones control (sin *A. tumefaciens*) y con *A. tumefaciens* (cepas, EHA105 y LBA4404 con el plásmido pBII21). Esta evaluación se hizo empleando diferentes tiempos de co-cultivo (6, 12, 18 y 24 hrs), y al final se realizó una comparación de estas condiciones. Los resultados muestran un 80% de regeneración de brotes en condiciones control y 70% en presencia de *Agrobacterium* (Tabla 7 y 8). El método de co-cultivo causa una disminución del 10% por el tratamiento al que es sometido el brote sin la presencia de la bacteria (cultivo control) y un 10% adicional con la presencia de *Agrobacterium* cepa LBA4404. Lo anterior indica que aún en estas condiciones el porcentaje de formación de brotes de nuestros explantes es eficiente y permite la obtención de brotes transformados con esta cepa. Los valores obtenidos al utilizar la cepa EHA105

son bastante bajos, la formación de brotes disminuye drásticamente por la proliferación de la bacteria en el tejido vegetal que impide el desarrollo adecuado del brote aún en altas concentraciones de Tic para eliminación de la bacteria. Este hecho posiblemente se atribuye a que esta cepa se deriva de una cepa reportada como muy virulenta (Hood *et al.*, 1986). Por este motivo también se descarto el empleo de la cepa A281 de *Agrobacterium* en la transformación

Tabla 7. Porcentajes de sobrevivencia en brotes de 90 días sometidos al método de cultivo control sin el empleo de *Agrobacterium*.

Horas de co-cultivo	% brotación en los explantes
6 hrs control	82.8
12 hrs control	92.6
18 hrs control	77.7
24 hrs control	82.3
Promedio de sobrevivencia (%)	83.8

Tabla 8. Eficiencia de regeneración de explantes co-cultivados 24 horas con *A. tumefaciens* cepa LBA4404/pBI121

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
No. de explantes	111	64	67
Explantes con regeneración (%)	64	72	79
Promedio de sobrevivencia en los co-cultivos de 24 hrs (%)		72	

Se seleccionó el período de 24 horas de co-cultivo para la generación de brotes transgénicos y se acopló con las condiciones de formación de brotes normal ya generadas. Con esta estrategia de regeneración-transformación de frijol, se logró la generación de brotes transgénicos.

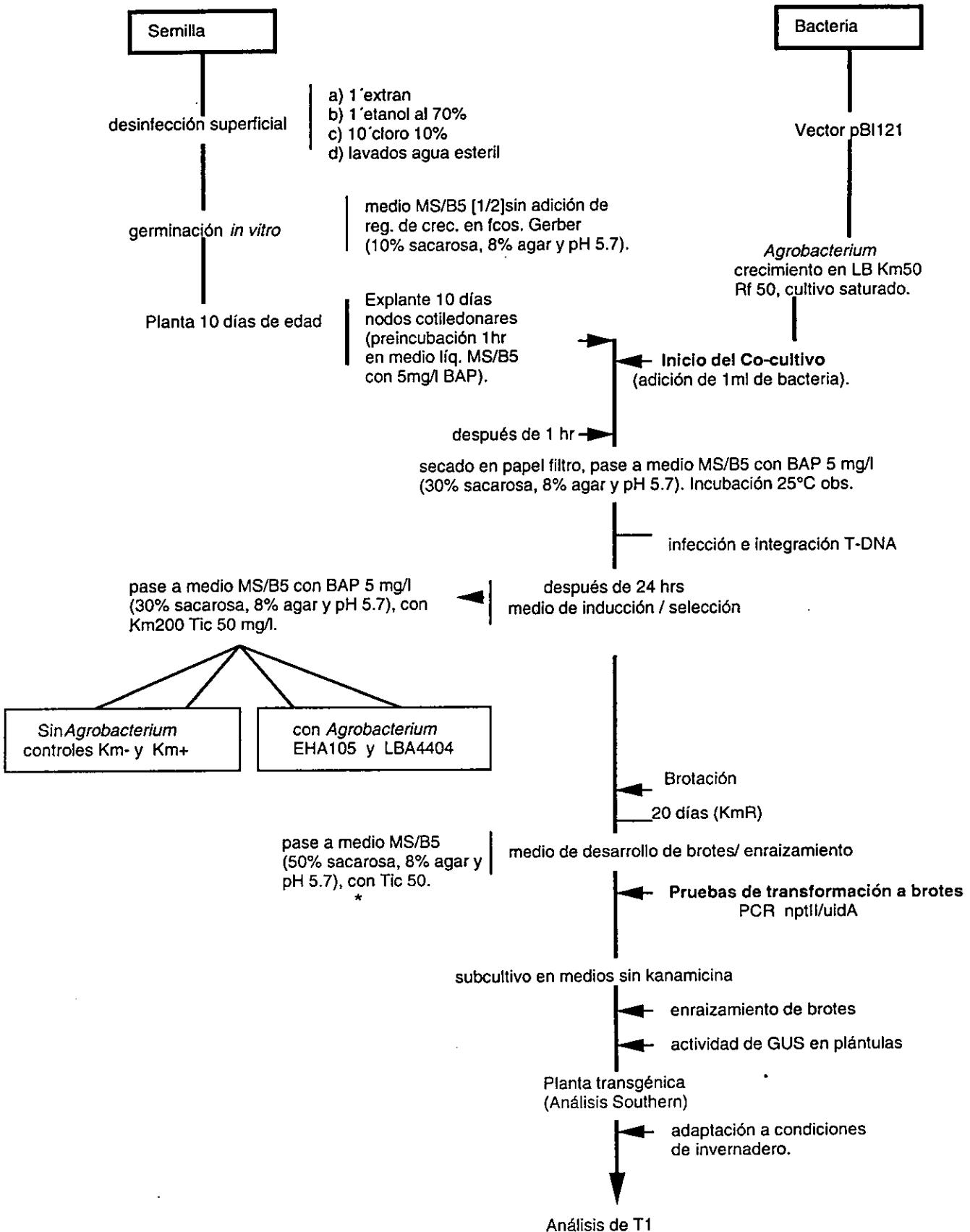
5.2.3.2 Generación de brotes transformados de frijol

Las pruebas de transformación de frijol se llevaron a cabo en las condiciones mencionadas previamente, realizándose un protocolo general que acopla ambos procesos; regeneración-transformación (Fig. 9). La selección de brotes transgénicos de frijol se llevó a cabo en medio MIB adicionado con 200 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de ticarcilina. Bajo estas condiciones, se generaron brotes transgénicos resistentes a kanamicina, en dos series denominadas PVLB y PVEH en base a la cepa de *Agrobacterium* empleada en la transformación.

Se realizó el análisis de los brotes transgénicos Km^R por medio de la amplificación por PCR de los genes reporteros a partir de ADN genómico, en la denominada línea PVLB (*Phaseolus vulgaris*: cv. negro Jamapa/ LBA4404). Nuestros resultados muestran que en 64 brotes generados, el 61% presentó la integración del gen *nptII* y en un 31% se incorporaron ambos genes *nptII-uidA* (Tabla 9), por lo tanto el 92% de los brotes generados fueron transgénicos. La Tabla 9 muestra la eficiencia de transformación en 64 brotes resistentes a kanamicina, crecidos en medios MIB con 50 mg/l de kanamicina. Estos brotes se regeneraron con una eficiencia de sobrevivencia aproximada al 30%; los 64 brotes obtenidos mostraron que nuestras condiciones de selección permiten obtener un porcentaje de 8% de escapes o brotes no transformados; el resto de los brotes Km^R presentaron condición transformada en dos eventos de integración de ADN-T, uno con la región correspondiente al gen *nptII* y otro con el ADN-T o región *nptII-uidA* en porcentajes de 61 y 31%, respectivamente.

Tabla 9. Eficiencia de transformación analizada por la presencia (amplificación por PCR) de los genes marcadores en brotes regenerados.
No. total de brotes 64

	Evento de transformación generado		
	Falsos positivos	<i>nptII</i>	<i>nptII + uidA</i>
No. de brotes	5	39	20
Porcentaje de brotes respecto al total (%)	8	61	31
Porcentaje de brotes transgénicos (%)		92	



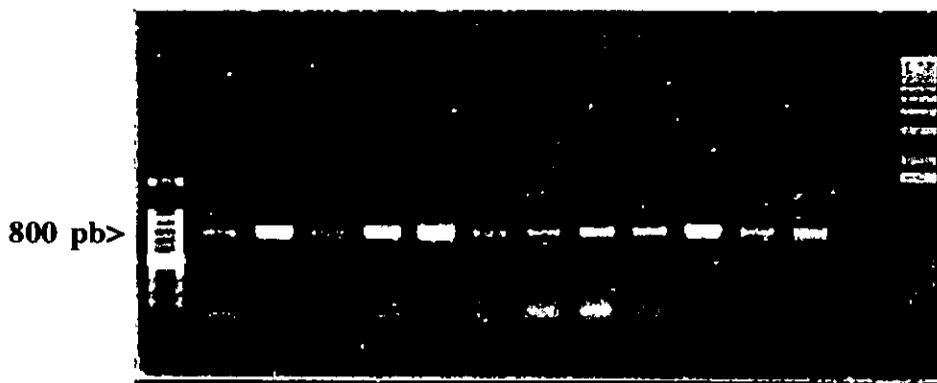
* El medio de enraizamiento para brotes transgénicos no fué optimizado, por lo que se menciona el medio para enraizamiento de brotes normales.

Figura 9. Protocolo general de regeneración-transformación en frijol.

Para corroborar que efectivamente se amplificaban los genes marcadores (*nptII* y *uidA*) y descartar la idea de amplificación inespecífica, se realizó la hibridación de los productos amplificados de PCR a partir de ADN genómico vegetal con una sonda específica clonada en bacteria. Con la hibridación se pudo confirmar la presencia de los dos genes en los brotes y se eliminó la idea de contaminación o amplificación no específica de *nptII* y *uidA* (Fig. 10). La Figura 10 muestra amplificación por PCR de los transgenes *nptII* y *uidA* los cuadros a y c respectivamente, así como la hibridación de estos productos con el gen correspondiente en la parte b y d. La figura 10 a y b, muestra en los carriles 1 (MW) y 15 (kb) los marcadores de peso molecular de 100 y 1000 pb respectivamente; el carril 14 (C-) muestra ADN de una planta regenerada no transformada como control negativo; el resto de los carriles muestran amplificación del gen *nptII* a partir del ADN de brotes transgénicos Km^R. La Figura 10 c y d, muestra en el carril 1 (MW) el marcador de peso molecular de 100 pb; los carriles del 2 al 12 muestran el ADN de los brotes transgénicos que anteriormente amplificaron el gen *nptII* y de los cuales solo 6 de los carriles indican la amplificación del gen *uidA*; el carril 13 (C-) pertenece a una planta control no transformada; los últimos dos carriles muestran el control positivo (C+). En la Figura 10 d, los carriles 13 y 14 en posición invertida con respecto al gel; por lo tanto el carril 13 corresponde a C+ y el 14 a C- respectivamente.

El análisis tipo Southern con ADN genómico de algunos de los brotes de frijol Km^R, mostró que existe un reconocimiento de la región 35S-*uidA* de pBI121. Esta región fue utilizada como sonda y mostró aparentemente una sola copia del ADN-T (Fig.11). La Figura 11A muestra 6 brotes transgénicos con resistencia a kanamicina denominados PVLB 35, 36, 37, 61, 63 y 68, así como un control no transformado de frijol (C-) digeridos con la enzima EcoRI, esta enzima corta en la región terminal del segmento del ADN-T en un solo corte, con este fragmento se trató de determinar el número de copias del ADN-T integradas al genoma vegetal; con esta digestión las líneas 35, 37 y 68 muestran reconocimiento con nuestra sonda por contener la región 35S-*uidA* y por lo tanto el ADN-T completo a diferencia de los que no presentan señal al ser hibridados (36, 61 y 63). La Figura 11B muestra los mismos brotes transgénicos pero incluye otra línea denominada PVLB 26, estos ADNs fueron digeridos con las enzimas EcoRI y HindIII donde se esperó un fragmento de 3kb (*35S-uidA-nosp*) y con ello el reconocimiento de la región ADN-T sin ser certeros en el número de copias de la misma, solo en su integración al genoma vegetal; con esta restricción se observó que solo los brotes con *nptII-uidA* (26,37 y 68) muestran señal a diferencia del control negativo (C-) y de los brotes que solo tienen el gen *nptII* (36 y 61).

a MW C+ 68 39 26 24 22• 22 19 16 11 10 9 C- 1Kb

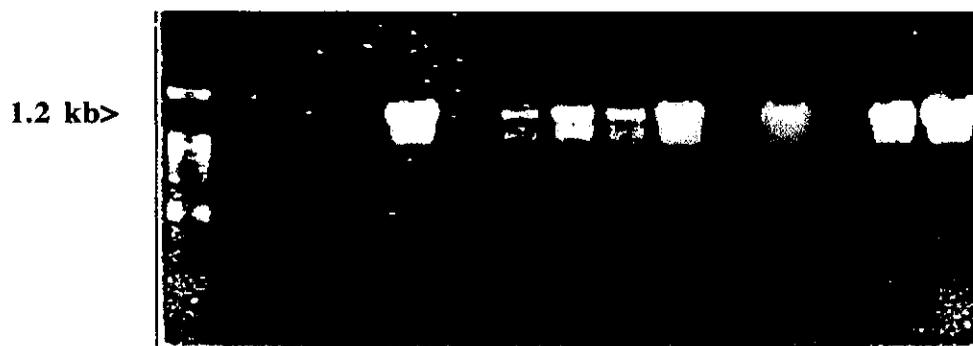


b



c

MW 9 10 11 16 19 22 22• 24 26 39 68 C- C+ C+



d

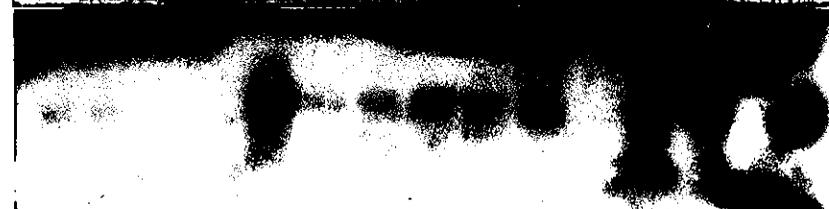


Figura 10. Amplificación de los transgenes y su hibridación con parte del ADN-T de pBI121. a) fragmento de *nptII* (785 pb); b) hibridación de estos productos con sonda del gen *nptII* (794 pb) derivada de pBI121; c) fragmentos de *uidA* (1.2 kb) y d) hibridación de los productos con la sonda del gen *uidA* (1808 pb) del pBI121.

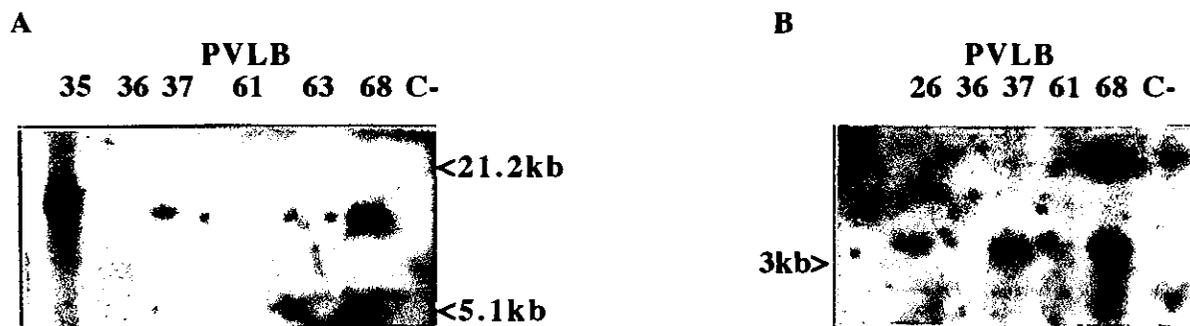


Figura 11. Southern blot de brotes transgénicos PVLB. A) DNA genómico digerido con *EcoRI*, hibridizado con 35S-*uidA* y B) DNA genómico digerido con *EcoRI/HindIII* e hibridizado con 35S-*uidA* (fragmento 3Kb).

Se realizó el análisis de actividad de GUS en algunos de estos brotes con lo que se confirmó la integración de este gen y su expresión en los brotes regenerados (Fig. 12). En la Figura 12A, se observa la expresión de GUS en hoja de tabaco transformado tomado como control positivo; La Figura 12D muestra una hoja de frijol regenerado sin transformar como control negativo; El resto de los cuadros en la Figura 12 muestran diferentes patrones de expresión de la actividad de GUS en brotes completos y hojas de brotes transformados.

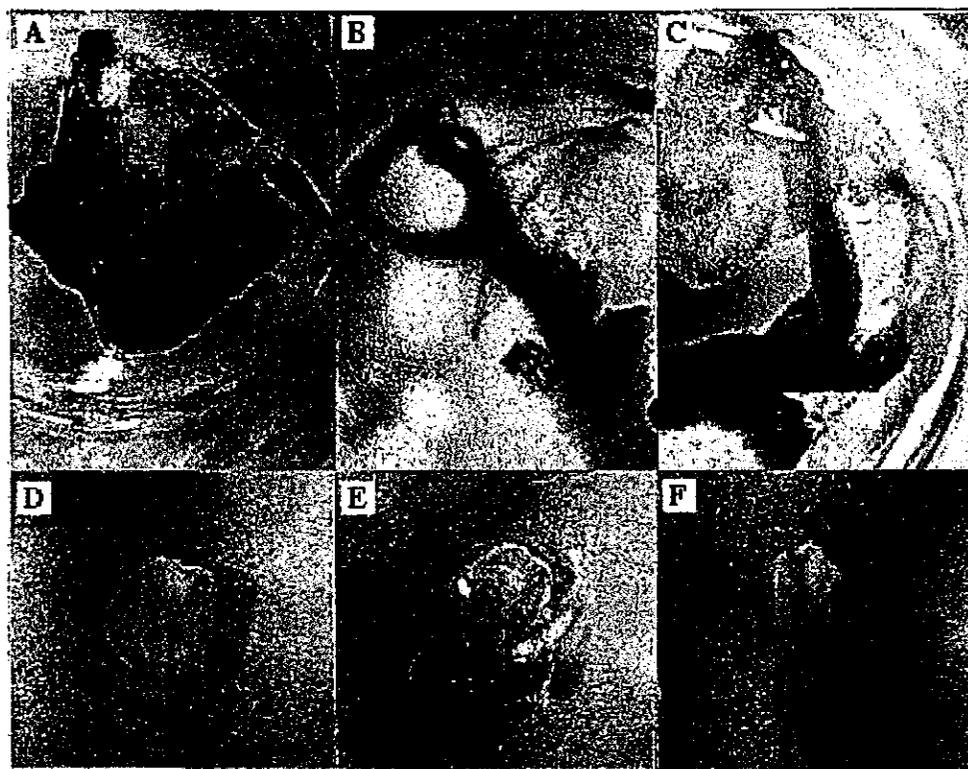


Figura 12. Análisis histoquímico de la actividad de GUS en frijol transgénico. A) Control positivo de tabaco TE13; B y C) brotes completos de frijol; D) control negativo de frijol regenerado no transformado; E y F) hojas de brotes Km^R.

Los resultados indican que nuestro sistema acoplado de regeneración-transformación permite obtener una eficiencia en promedio de más del 20% de brotes transgénicos (Tabla 10). La Tabla 10 muestra tres experimentos de transformación utilizando la cepa LBA4404 donde se obtienen porcentajes de brotación del 80% y, como se mencionó anteriormente, solo sobreviven y se desarrollan un porcentaje menor (25%) por la condición transgénica de resistencia a kanamicina.

Tabla 10. Supervivencia de explantes co-cultivados con *A. tumefaciens* cepa LBA4404/pBI121, 30 días después del co-cultivo.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Promedio
Sobrevivencia %	36	13	25	25
Formación de brotes %	75	81	87	81

La serie PVEH (*Phaseolus vulgaris* cv. negro Jamapa/ EHA105) generó un número muy bajo de brotes Km^R. En brotes obtenidos de esta serie, se observó la integración única del gen *nptIII* por análisis de PCR. Cabe mencionar que aunque no se presentaron los dos transgenes (*nptIII-uidA*). El gen *uidA* no fue observado por amplificación con PCR ni por análisis tipo Southern.

Es un hecho que se requiere optimizar el proceso completo de regeneración-transformación, puesto que el desarrollo de raíces en brotes de 9 semanas no fue eficiente por lo que no se logró obtener plantas transgénicas adultas en la serie PVLB. Como resultado, el principal impedimento para la obtención de plantas de frijol transformadas, la obtención de la T₁ y su evaluación fue el enraizamiento de brotes transgénicos.

5.2.3.3 Obtención de plantas transgénicas de frijol completas fértiles

La obtención de plantas completas se llevó a cabo con la generación de brotes en la serie PVEH en donde se obtuvieron dos plantas transgénicas enraizadas y se cultivaron en condiciones de invernadero hasta estadio de floración y obtención de progenie. A partir de éstas, se obtuvieron semillas y se analizó la T₁. Se realizó la germinación de cuatro semillas en condiciones de invernadero con vermiculita y riegos de solución nutritiva; estas plantas fueron analizadas por PCR y se observó la amplificación de *nptII* a partir del ADN genómico en todas las plantas transformadas (Fig. 13). Este análisis de la T₁ en la progenie de una planta regenerada hasta estadio adulto PVEH, indica la transferencia de uno de los transgenes (*nptII*) como se mostró anteriormente. La segunda planta transgénica generada en esta serie dio un total de 10 vainas con 45 semillas, donde solo se examinaron 8 plantas derivadas de estas semillas.

Se obtuvieron las correspondientes T₂ de ambas series pero no fueron analizadas.

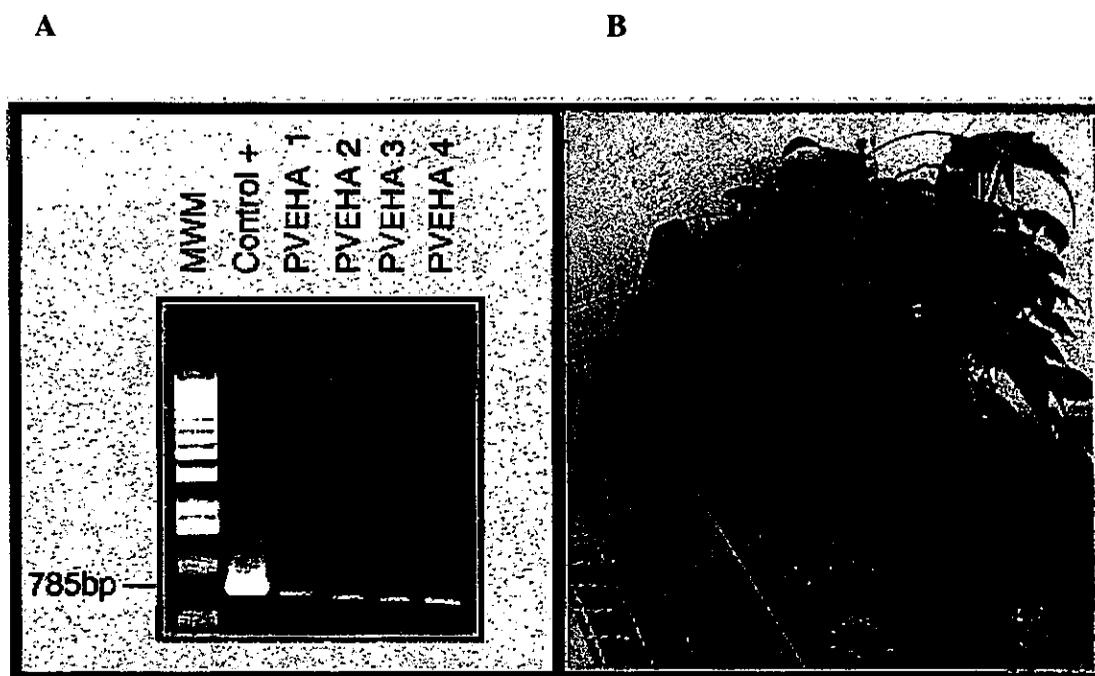


Figura 13. Amplificación por PCR del gen *nptII* en plantas T₁ de la línea PVEH1. A, carril 1 muestra el marcador de peso molecular, el carril 2 muestra el control positivo de plásmido pBI121 y los carriles 3 al 6 muestran la amplificación de este gen en las plantas transgénicas T₁ derivadas de una planta transformada y regenerada. B, muestra las 4 plantas T₁ utilizadas en el análisis.

VI. DISCUSION

La información generada en nuestro trabajo nos proporciona un protocolo sobre la regeneración de frijol cv. negro Jamapa, lo que permitió acoplar la transformación genética de frijol vía *Agrobacterium*. Este resultado es de gran importancia y de avance ante la factibilidad de la transformación genética de frijol con genes que le confieran diversas características o que han sido estudiados en las otras líneas de nuestro grupo y de otros centros de investigación. Esto permitirá un avance significativo en el estudio de la regulación genética en esta planta. De manera particular, permitirá el estudio de la expresión de genes involucrados en el metabolismo nitrogenado y de carbono, además de fenómenos relacionados a la productividad de frijol.

Durante el desarrollo de este proyecto hemos podido regenerar plantas de frijol a partir de explantes de nodos cotiledonares hasta alcanzar la maduración, con una eficiencia del 80%. El proceso anterior permite eliminar el principal impedimento en la obtención de plantas transgénicas de frijol al permitir la regeneración de esta especie considerada como recalcitrante.

La presencia de BAP en los cultivos confirma el papel morforegulador de citocininas en la regeneración de *Phaseolus vulgaris*, como se había observado anteriormente (Malik y Saxena, 1991; Mohamed 1992). Los explantes en medios con BAP muestran formación temprana de brotes y multiplicación irregular de yemas. Por otra parte, se observó claramente que en este sistema, la kinetina no puede inducir la formación de brotes múltiples como se había reportado por McClean y Grafton (1989).

Se ha reportado que la presencia de meristemos favorece la formación de callos regenerables (Zambre *et al.*, 1998). En frijol negro se observó una situación parecida, incluso al realizar una segunda decapitación de la región meristemática, se produjo la brotación en esta condición y estos brotes se desarrollaron y florecieron.

La diferenciación de brotes es influenciada por el tipo de explantes, genotipo y concentración de BAP. Por otra parte, hemos observado que la orientación en nuestros explantes influye sobre la respuesta de generación de brotes como también se observó en chícharo (Polisetty *et al.*, 1997). Estudios histológicos realizados por Franklin *et al.* (1991), indican la presencia de células del anillo meristemático y la diferenciación de yemas a partir de este tejido. Esto sugiere que las células de la periferia pueden ser fácilmente infectadas vía *Agrobacterium*. De esta manera el proceso de regeneración involucra una fase de formación de callo que puede ser susceptible a *Agrobacterium*

y con ello dar plantas transgénicas (Dillen *et al.*, 1997). El sistema de regeneración implementado en este trabajo nos sugiere esta posibilidad; sin embargo, los nuevos meristemas que surgen de células subepidérmicas que pueden no estar expuestas a *Agrobacterium* durante el co-cultivo, reduce la posibilidad de transformación.

Estudios con *Phaseolus acutifolius* reportan la regeneración y transformación vía *Agrobacterium* (Dillen, *et al.*, 1997). Como se mencionó, existen evidencias de la transformación del frijol y de la obtención de transgénicas a partir de nodos y cotiledones en otras leguminosas como soya (Hichee *et al.*, 1988) y alfalfa (Shahin *et al.*, 1986).

Nuestros resultados indican que hay regeneración de brotes transgénicos mediante el uso de *Agrobacterium* en nuestros explantes utilizados a partir de nodos. Este sistema coincide con los resultados observados en soya y frijol ya mencionados.

Durante el proceso de selección de plantas transgénicas se ha observado que en las condiciones selectivas, se impide o retrasa el proceso de regeneración de los tejidos no transformados por lo que la selección en 200 mg/l de Km produce un mínimo de escapes no transformados (alrededor del 5%) y un porcentaje de brotes transgénicos de 90% a partir de los explantes que presentaron regeneración.

En los brotes Km^R generados durante nuestros experimentos, se observó que un 60% solo presentan el gen *nptII* y el 30% contienen los dos transgenes (*nptII* y *uidA*). Esto se puede observar en la tabla 12, así como por la amplificación de los genes reporteros, a partir de estos brotes (Fig. 9). Otro punto que confirma la condición transformada de nuestros brotes, es el análisis tipo Southern blot (Fig. 10). Cabe mencionar que no se mostraron todos los ADN genómicos de los 20 brotes con *nptII-uidA*, porque no fue suficiente la cantidad de ADN para las dos digestiones con enzimas de restricción y además, los brotes se perdieron por la falta de enraizamiento. Adicionalmente, no se pudo probar un número mayor de enzimas de restricción en el análisis tipo Southern para obtener certeramente el número de copias de ADN-T en los brotes transgénicos con región *nptII-uidA* mostrados en la Figura 11.

Como se mencionó, el principal impedimento en la generación de plantas transgénicas adultas de frijol es el desarrollo de raíces. En chícharo, se observó que una alta concentración de BAP inhibe subsecuentemente el enraizamiento de los brotes, mientras que en bajas concentraciones el 80% de las regenerantes se desarrollan morfológicamente normales y son

fértiles (Polisetty *et al.*, 1997). Estos datos nos indican la posibilidad de que en nuestro sistema de regeneración de frijol, la respuesta de enraizamiento se vea impedida por las altas concentraciones de BAP en períodos prolongados. Sin embargo, nuestros resultados en el sistema de generación de brotes normales sin co-cultivar y sin kanamicina como agente selectivo, presentan un enraizamiento satisfactorio. De la misma manera, en nuestros brotes control de co-cultivos sin Km y con Tic para eliminación de la bacteria, los brotes se desarrollan y forman raíces. Por otra parte, estudios *in vivo* sobre el crecimiento de raíz en lenteja demuestran un fuerte efecto inhibitorio de BAP en el crecimiento de raíces, lo que se refleja drásticamente en la reducción del índice mitótico del meristemo de raíz (Polanco y Ruiz, 1997). Nosotros proponemos que el efecto inhibitorio del enraizamiento que se presenta en brotes transformados derivados de BAP, sea un efecto en conjunto de la citocinina y la presencia de la kanamicina en los medios de selección, recayendo el efecto principal en el antibiótico.

VII. CONCLUSION

El interés principal de este trabajo consistió en implementar un protocolo de regeneración y transformación, que estableciera las bases para un sistema de expresión estable en estudios de regulación genética de *Phaseolus vulgaris* L.

La elaboración de un protocolo de regeneración eficiente para *Phaseolus vulgaris* L. se llevó a cabo con éxito. Se obtuvo un método de regeneración (obtención de brotes), considerado como eficiente (80%) en donde se obtienen plantas regeneradas adultas y su progenie. La generación de este sistema fué por largo tiempo la principal barrera para la transformación genética de frijol negro, por lo que los resultados de este trabajo representan un avance significativo en el campo de estudio relacionado con este cultivo. El sistema aquí descrito puede ser la base para la regeneración de otros cultivares de frijol; sin embargo, es un hecho que frijol es una especie recalcitrante y que sus variedades presentan respuestas alternas a los reguladores de crecimiento en la inducción de callogénesis u otros procesos relacionados a su regeneración.

La integración del sistema de transformación genética de *Phaseolus vulgaris* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens* al protocolo de regeneración que generamos, se llevó a cabo satisfactoriamente, obteniéndose brotes Km^R que expresaron de manera estable la actividad de neomicina fosfotransferasa (NPTII) y β -glucuronidasa. Además la T₁ de brotes PVEH, mostró por análisis de PCR la transmisión del gen *nptII* a la progenie.

Aunque nuestro protocolo mostró avances significativos en regeneración de brotes transgénicos, la generación de plantas transformadas se vió afectada por problemas en la formación de raíces de los brotes Km^R. Por lo anterior, no se pudo continuar con los estudios de expresión de la actividad de GUS y con el análisis de la T₁. El principal impedimento en la generación de plantas transgénicas de frijol negro es el enraizamiento de los brotes transformados y regenerados siguiendo el protocolo descrito en este trabajo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VIII. PERSPECTIVAS

8.1 Enraizamiento

- La opción más prometedora para la inducción de enraizamiento la enfocamos en el uso de períodos cortos de selección en presencia de kanamicina. Con ello se pretende aumentar el porcentaje de enraizamiento en los brotes transformados aunque el porcentaje de escapes se incremente. Pensamos que períodos de 8 o 10 días en presencia de Km serán suficientes para darle continuidad al desarrollo y enraizamiento del brote, asegurando plantas adultas enraizadas.

- Otra alternativa de enraizamiento, se basa en el aumento en la concentración de auxinas en el medio de inducción de raíz. Aunque las concentraciones de ANA que nosotros utilizamos son altas con respecto a las reportadas (10x más), pensamos que ANA en concentraciones de 2.5 o 5mg/l pueden dar el efecto de enraizamiento que esperamos. Este dato esta basado en los medios utilizados recientemente para lenteja, en donde se reporta un exitoso enraizamiento con 2 mg/l de AIA. Lo anterior nos sugiere incrementar el uso de auxinas para la inducción de raíces en brotes transgénicos.

- Hemos comenzado la exploración de enraizamiento en brotes Km^R empleando *Agrobacterium rhizogenes* (cepa silvestre) como inductor de rizogénesis. Aunque por este proceso se obtendrá un organismo quimérico, la progenie será de utilidad y se podrá analizar.

8.2 Análisis histológico

Es importante realizar el estudio histológico para conocer la ontogenia de los brotes regenerados de manera más completa y específica.

8.3 Análisis de la T₁

Para el análisis molecular completo en plantas transgénicas de frijol, es necesario que se analice la T₁ una vez eliminado el problema de enraizamiento.

8.4 Aplicación de nuestro protocolo en otras variedades de frijol

En base al protocolo desarrollado, se trabajará en otras variedades de frijol comercialmente importantes para impulsar su estudio y el desarrollo de sistemas regenerativos propios de cada variedad.

8.5 Generación de plantas transgénicas de frijol

Se iniciarán los trabajos de transformación de frijol, con genes relacionados al metabolismo de carbono y nitrógeno.

IX. BIBLIOGRAFIA

Alvarez B., 1981. Reguladores de crecimiento vegetal. En: Cultivo de tejidos vegetales. Hurtado V.D. y Merino M.E., Editorial Trillas, México pp48-66.

Arellano G.J.J., 1995. Establecimiento de sistemas de cultivo de raíces transformadas para la producción de metabolitos de importancia económica. Tesis doctoral, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

Barwale U.B., Kerns H.R. and Wildholm J.M., 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.

Bevan M.W., 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12:8711-8721

Desaux Y., Petit A. and Tempé J., 1992. Opines in *Agrobacterium* biology. En: Molecular signals in plant-microbe communications. Editor Desh Pal S. Verma. CRC Press

Díaz F.A., 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Edit. Trillas. México D.F.

Diego-García E., 1996. Establecimiento, optimización y estudios de organogénesis del cultivo de raíces *in vitro* (normales y transformadas) de *Phaseolus vulgaris* (var. flor de mayo). Tesis de licenciatura, Fac. de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

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

Franklin C.I., Trieu T.N., Gonzales R.A. and Dixon R.A., 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 24:199-206.

Franklin I.C., Trieu N.T., Cassidy G.B., Dixon A.R. and Nelson S.R., 1993. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Reports*, 12:74-79.

Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K., 1968. Nutrient requirements for suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158.

Ghazi T.D., Cheema H.V. and Nabors M.W., 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. *Plant Cell Rep.* 5:452-456. 1986

Guevara-García A.A., 1992. Identificación de elementos cis-reguladores en el promotor divergente de manopina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis Mestría, CINVESTAV Unidad Irapuato, México.

Herrera- Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens J-P., Van Montagu M. and Schell J., 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cell. *EMBO J.*, 2:987-995.

Hichee M.A.W., Connor-Ward D.V., Newell C.A., McDonnell R.E., Sato S.J., Gasser C.S. Fischhoff D.A., ReD.B., Fraley R.T. and Horsch R.B., 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/technology* 6:915-922.

Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L. and Hoekema A., 1993. New *Agrobacterium* helper plasmid for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2:208-218.

Hood E.E., Helmer G.L., Fraley R. T. y Chilton M., 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-ADN. *J.Bacteriology* 168:1291-1301.

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.C., Eicholtz D., Roger S.G. and Fraley T., 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227:1229-1231

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

Kartha K.K., Pahl K., Leung N.L. and Mroginski L.A., 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes soybean, cowpeas, peanut, chickpea and bean. *Can J. Bot.* 59:1671-1679.

Krikorian A.D., 1991. Propagación clonal *in vitro*. En Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca W.M. y Mroginski L.A., Edit. CIAT, Cali Colombia. 969pp.

Kysely W., Myers J.R., Lazzeri P.A., Collins G.B. and Jacobsen H.J., 1987. Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.) Plant Cell Rep. 6:305-308.

Malik K.A. and Saxena P.K., 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186:384-389.

Mariotti D., Fontana G.S. and Santini L., 1989. Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. J. Genet. Breed. 43:77-82.

Martins I.S. and Sondahl M.R., 1984. Early stages of somatic embryo differentiation from callus cell of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in liquid medium. J. Plant Physiol. 117:97-103.

McClellan P., Chee P., Held B, Simental J., Drong R.F. and Slightom J. 1991. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: Transformation of cotyledonary hypocotyl tissues. Plant Cell Tissue Organ culture, 24:131-138.

McClellan P. and Grafton K.P., 1989. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. Plant Sci. 60:117-122.

Mohamed F.M, Coyne D.P. and Read P.E., 1993. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explant of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Amer.Soc.Hort.Sci. 118(1):158-162.

Mohamed M.F., Read P.E. and Coyne D.P., 1991. In vitro response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cotyledonary explants to benzyladenine in the medium. Plant Growth. Regulat. Soc. Amer. Quart. 19:19-26.

Mohamed M.F., Paul E.R. and Dermot P.C., 1992. Plant regeneration from *in vitro* culture of embrionic axis explant in common and tepary beans. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:332-336.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479.

Nagl W., Ignacimuthu S. and Becker J. 1997. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. *J.Plant Physiol.* 150:625-644.

Oger P., Petit A. and Dessaux Y. 1996. A simple technique for direct transformation and regeneration of the diploid legume species *Lotus japonicus*. *Plant Science* 116:159-168.

Polanco M.C. and Ruiz M.L. 1997. Effect of benzylaminopurine on *in vitro* and *in vivo* root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. *Plant Cell Reports* 17:22-26.

Polisetty R., Paul V., Deveshwar J.J., Khetarpal S., Suresh K. and Chandra R., 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine an complete plant regeneration from seed explant of chickpea (*Cicer arietinu* L.). *Plant Cell Rep.* 16:565-571.

Prakash S.N., Pental D. and Bhalla-Sarin N., 1994. Regeneration of pigeonpea (*Cajanus cajan*) from cotyledonary node via multiple shoot formation. *Plant Cell Rep.* 13:623-627.

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

Shahin E.A., Spielmann A., Dukhapinda K. Simpson R.B. and Yashar M., 1986. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop. Sci.* 26:1235-1239.

Sheng J. and Citovsky V., 1996. *Agrobacterium*-Plant Cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell*, vol. 8:1699-1710.

Trieu A.T. and Harrison M.J. 1996. Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 16:6-11.

Villalobos V.M. and Thorpe T.A., 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca W.M. y Mroginski L.A., Edit. CIAT, Cali Colombia. 969pp.

Whunw K.J. and Minamikawa T. 1996. Transformation and regeneration of french bean plants by the particle bombardment process. *Plant Science* 117:131-138.

Xiu-Qing L. and Demarly Y., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago suffruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44:79-81.

Zambre M.A., De Clercq J., Vranová E., Van Montagu M. Angenon G. and Dillen W. 1998. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Cell Rep.* 17:626-630.

Zupan J.R. and Zambryski P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107:1042-1047.