



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Obtención de líneas celulares transgénicas  
de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a  
un herbicida (Basta)”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**MAURICIO PÉREZ MUNIVE**



DIRECTOR DE TESIS:  
ING. AGR. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

- 2008 -



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Mauricio  
Pérez  
Munive  
56 31 11 01  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
08335512-3

### 2. Datos del tutor

M en C  
Teresa de Jesús  
Olivera  
Flores

### 3. Datos del sinodal 1

Dra  
Patricia  
Guevara  
Fefer

### 4. Datos del sinodal 2

Dra  
Guillermina  
Murguía  
Sánchez

### 5. Datos del sinodal 3

Dra  
Elpidio  
García  
Ramírez

### 6. Datos del sinodal 4

M en C  
Josefina  
Herrera  
Santoyo

### 7. Datos del trabajo escrito

Obtención de líneas celulares transgénicas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) resistentes a un herbicida (Basta).

103 p  
2008

*Quiero agradecer a mis padres por haberme dado la vida y con ello vivir esta maravillosa experiencia de adquirir mi jerarquía y mi libertad, soy libre de ahora en adelante, aquí y en cualquier parte del mundo tendré el honor y la gloria de ser Biólogo para la humanidad.*

*Gracias mamá Eulalia Munive Pérez por darme todo tu apoyo para ver mis ilusiones realizados, yo soy el reflejo de tu ser y tus buenos pensamientos, gracias a ti además de obtener el conocimiento, también llegué a la sabiduría que no todos alcanzan en el estudio.*

*Gracias papá Pascual Pérez Chapul.*

*Agradezco la armonía que obtuve de mis hermanos: Martín, Eulalio, Pascual y Jose Luis, durante todo este tiempo que hemos compartido nuestra educación y formación profesional, ustedes están en mí y yo en cada uno de ustedes, hemos unificado nuestros conocimientos para ser felices.*

*Aun cuando ya no me veas Abuelita Carmen Chapul Juárez, tú sabes que en mis sueños de vez en cuando nos vemos y que esto es el resultado de tus palabras, difíciles de creer en mi niñez en el ranchito humilde donde me cuidaste, para que yo llegaré a culminar una carrera, pero cumplí lo que deseabas en mi, te quiero mucho.*

*Gracias señor Marcelino por sus atenciones cuando fui niño y hacerme creer que yo era el más inteligente del pueblo, hasta hoy esas palabras se activan constantemente en mi cerebro.*

*Gracias Abuelita Alberta Pérez y abuelo Aurelio Munive por darle la vida a mi madre y hacer de ella todo un ejemplo de trabajo y amor para mi y mis hermanos.*

Quiero agradecer muy en especial a la **M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores** ya que como tutora de mi tesis cumplió sus obligaciones de la manera más atenta y cordial en la supervisión de mi trabajo realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (Lab. 116), del Departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química (UNAM).

Gracias a mi casa de estudios y mi segunda madre: UNAM.

*Este trabajo es una contribución de mis conocimientos a quien lo consulte*

## INDICE

	Pagina
ABREVIACIONES	11
RESUMEN	13
I INTRODUCCIÓN	15
II ANTECEDENTES.	17
2.1 Descripción taxonómica y botánica del fríjol.	17
2.2 Características bioquímicas de la semilla de fríjol.	20
2.3 Producción y condiciones de cultivo.	21
2.4 El cultivo de tejidos vegetales	23
2.4.1 Procesos Morfogenéticos	23
2.4.2 Tipos de cultivos	25
2.4.3 Cultivo <i>in vitro</i> de fríjol.	27
2.5 El mejoramiento genético tradicional del fríjol.	28
2.6 Importancia de las plantas transgénicas	29
2.7 Procesos de transformación	30
2.8 Antecedentes de transformación en leguminosas	37
II OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo general	40
2.2 Objetivos particulares	40
III MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Etapa 1: Establecimiento de cultivos de callos de tres diferentes explantas de fríjol Negro Jamapa en tres distintos medios de cultivo.	42
3.1.1 Preparación de medios de cultivo	42



3.1.2	Esterilización y germinación de la semilla	43
3.1.3	Condiciones de incubación	43
3.1.4	Inducción de callos a través de diferentes explantes y medios de cultivo	43
3.1.5	Cinética de crecimiento	44
3.2	ETAPA 2 Validación del protocolo de inducción de callo con las variedades Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero	45
3.2.1	Esterilización de semillas	45
3.2.2	Cinética de crecimiento sin Basta en peso seco y fresco	45
3.3	ETAPA 3 Transformación genética de callos y obtención de líneas celulares transformadas de Negro Jamapa	45
3.3.1	Cinética de crecimiento con Basta en peso fresco.	45
3.3.2	Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes <i>bar</i> y <i>gus</i> )	46
3.3.3	Transformación y selección del callo de frijol Jamapa en medio líquido.	48
3.3.4	Cinética de crecimiento con Kanamicina en peso fresco	49
3.3.5	Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes <i>nptII</i> y <i>gus</i> )	50
3.3.6	Pruebas de expresión transitoria del gen <i>gus</i> y resistencia a Kanamicina de callos transformados	50
3.3.7	Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.	52
3.3.8	El co-cultivo con <i>Agrobacterium</i> (infección) para la transformación del frijol	52
3.3.9	Prueba de resistencia a Kanamicina de explantes transformados.	52
IV	RESULTADOS	53
4.1	ETAPA 1: Establecimiento de cultivos de callos de tres diferentes explantes de frijol Negro Jamapa en tres distintos medios de cultivo.	53
4.1.1	Esterilización y germinación de la semilla	53

4.1.2	Inducción de callos probando tres distintos medios y diferentes explantes	54
4.2	ETAPA 2 Validación del protocolo de inducción de callo con las variedades Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero	58
4.2.1	Cinética de crecimiento de tres variedades de frijol	58
4.3	ETAPA 3 Transformación genética de callos y obtención de líneas celulares transformados de Negro Jamapa	60
4.3.1	Cinética de crecimiento con Basta en peso fresco	60
4.3.2	Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes <i>bar</i> y <i>gus</i> )	62
4.3.3	Prueba de resistencia a Basta y selección de callos de frijol transformados Jamapa en medio líquido	65
4.3.4	Cinética de crecimiento con Kanamicina en peso fresco	69
4.3.5	Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes <i>nptII</i> y <i>gus</i> ).	71
4.3.6	Prueba de resistencia a Kanamicina de explante transformados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	75
V	DISCUSIÓN	77
5.1	ETAPA 1: Establecimiento de cultivos de callos de tres diferentes explantes de frijol Negro Jamapa en tres distintos medios de cultivo.	77
5.1.1	Esterilización y germinación de la semilla	77
5.1.2	Inducción de callos probando tres distintos medios y diferentes explantes	78
5.2	ETAPA 2 Validación del protocolo de inducción de callo con las variedades Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero	81
5.2.1	Cinética de crecimiento de tres variedades de frijol	81
5.3	ETAPA 3 Transformación genética de callos y obtención de líneas celulares transformados de Negro Jamapa	82

5.3.1	Cinética de crecimiento con Basta en peso fresco	82
5.3.2	Transformación por bombardeo de micropartículas con DNA (genes <i>bar</i> y <i>gus</i> )	83
5.3.3	Prueba de resistencia y selección de callos de frijol Jamapa transformados en medio líquido	84
5.4	Cinética de crecimiento con Kanamicina en peso fresco	85
5.5	Transformación por bombardeo de micropartículas con DNA (genes <i>nptII</i> y <i>gus</i> )	86
5.6	Explantes transformados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con resistencia a Kanamicina	87
VI	CONCLUSIÓN	90
	BIBLIOGRAFIA	91
	ANEXO	99

## ABREVIACIONES

BAP	N6 -bencilaminopurina, formula: $C_{12}H_{11}N_5$ .
Basta	Herbicida Glufosinato de amonio ( $C_5H_{14}N_2O_4P$ ).
<i>cdc2</i>	Gene de ciclo de división celular 2.
<i>CycD3</i>	gene de la ciclina D3.
DMSO	Di Metil Sulfóxido.
Gene <i>bar</i>	Codifica para fosfinotricina acetil transferasa (PAT)
Gene <i>gus</i>	Codifica para $\beta$ –glucuronidasa (un ácido hidrolasa).
Gene <i>nos</i>	Codifica para nopalina sintasa.
Gene <i>nptII</i>	Codifica para aminoglicósido 3'-fosfotransferasa II (APH(3')II).
Kin	6-Furfurilaminopurina, formula: $C_{10}H_9N_5O$ .
M5	Micropartícula de tungsteno con diámetro de 0.4 $\mu$ m.
M10	Micropartícula de tungsteno con diámetro de 0.7 $\mu$ m.
MS	Medio de Murashigue y Skoog, 1962.
$M_i$	Medio modificado de Murashigue y Skoog.
$N_{6p}$	Medio modificado de Chu et al, 1972.

psi	Unidad de medida para la presión: 1.1 kg/cm <sup>2</sup> .
SH	Medio de Shenk y Hildebrandt, 1972.
Ti	Plásmido ("Inductor de tumor") que transfiere genes a las células vegetales.
<i>VirA</i>	Codifica para la proteína <i>vir</i> .
X-Gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil <i>b</i> -D-glucurónico,
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; formula: C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
Vit R <sub>2</sub>	Vitaminas del medio MS modificadas
Vit SH	Vitaminas del medio SH

## RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado como uno de los principales alimentos en África y América, los nutrientes encontrados en la semilla de esta leguminosa indican que es una fuente importante de proteínas, carbohidratos, lípidos, fibras solubles (pectinas), vitaminas del grupo B, Tiamina, Riboflavina, Niacina y minerales como calcio, hierro y fósforo. En cuanto al resto de la planta se puede usar como forraje para el ganado.

Se considera a México como gran consumidor del frijol negro (el más comercial en América) que se desarrolla a temperaturas que van de 20° C a 30° C. Del frijol Negro Jamapa (*Phaseolus vulgaris* L., variedad jamapa) es recomendable su cultivo en regiones templadas o tropicales con lluvias abundantes. Se siembra al inicio de la temporada de lluvias, en regiones semitropicales se siembra en junio, en la costa de Pacífico en noviembre, en los Tuxtlas debe ser de diciembre a Febrero.

En trabajos previos han mostrado que distintas variedades de *Phaseolus vulgaris* han sido transformados por las dos vías: biobalística y por *Agrobacterium*. En este trabajo se investigó la adaptación de un protocolo para la transformación de células de callo de frijol negro Jamapa por biobalística, con el objetivo de determinar el tamaño de la partícula y distancia utilizada en el proceso, y así también, confirmar la permanencia de resistencia a Basta y de expresión del gen *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa) en líneas celulares transformadas por medio de subcultivos en medio sólido y líquido.

La investigación se desarrolló en tres etapas: en la primera se buscó que explante (tallo, hoja y raíz) inducieran mayor producción de callo y en que medio (SH, N6p y MI). Se verificó con la cinética de crecimiento durante cuatro semanas.

En la segunda etapa se realizó la cinética de crecimiento de callo del explante de tallo de tres variedades de frijol: Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero, en medio SH, comparando que variedad induce mayor producción de callo durante cuatro semanas y para determinar la fase logarítmica de crecimiento.

En la tercera etapa se realizó la transformación genética de callos del explante de tallo de Negro Jamapa en medio SH a través de la biobalística con el gen *bar* (resistencia a Basta) y el gen *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa), la prueba de selección y de expresión fue en medio sólido y en medio líquido. También se transformó callos del explante de tallo de Negro

Jamapa en medio SH con el gen nptII (resistencia a Kanamicina) y gen *gus*, la prueba de selección y de expresión fue en medio gelificado. Finalmente solo como observación se transformó callos del explante de tallo, hoja, raíz, cotiledon, nudo y peciolo de Negro Jamapa con *Agrobacterium tumefaciens* para la resistencia a Kanamicina, la prueba de selección fue en medio sólido.

Como resultado de la primera etapa se obtuvo que el explante de tallo de Negro Jamapa en medios SH generó mayor masa de callo durante cuatro semanas.

En la etapa dos se obtuvo que el explante de tallo de Negro Jamapa produjo mayor cantidad de masa de callo (peso fresco) que otras dos variedades (MAR 1 y Ejotero), que la fase log de la cinética de crecimiento se inicia a los ocho días después de la siembra.

Se obtuvo en la tercera etapa, la transformación por biobalística y por *Agrobacterium* de los callos. Se corroboró por medio de los subcultivos (cada cuatro semanas durante 7 meses) la permanencia de la transformación con el gene *bar* y el gene *gus* en células transformadas. Para la prueba de selección se obtuvo mejor evidencia cualitativa en medio líquido que en medio gelificado. En cuanto a los callos transformados con *Agrobacterium* fue menor y solo del explante de tallo, mostrando problemas para controlar la contaminación por la misma bacteria.

Finalmente se concluye que se lograron los objetivos planteados en este trabajo.

# **Obtención de líneas celulares transgénicas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a un herbicida (Basta).**

## **I INTRODUCCIÓN**

El frijol es uno de los principales alimentos de México, también para el resto de América y África; México y Brasil son los principales productores y consumidores de este cultivo. De seis especies cultivadas, el denominado *vulgaris* es el más importante y México se considera el principal consumidor del frijol negro (el más comercial en América).

Sobre las propiedades nutricionales de la semilla de frijol se ha encontrado que es una fuente principal de proteínas, también presenta vitaminas del grupo B y minerales como calcio, hierro y fósforo; puede ser almacenado por años sin embargo no es recomendable.

El mejoramiento del frijol ha sido natural o dirigido por el hombre, en el primer caso implica cientos de años; en el segundo caso la domesticación ha generado variación en el tamaño de semillas y cantidad en cada vaina, las distintas características surgieron al azar y el hombre se ha encargado de conservar a las variedades que mejor le convienen, por ej. las vainas más grandes, con granos de mayor tamaño y mas jugosos, etc, estos cambios genéticos han sido a largo plazo (por años o cientos de años), mientras que las necesidades de mejoramiento son a corto plazo.

La reproducción sexual es la primera vía directa para la transferencia de información genética, esto a través de la domesticación por medio de cruzamientos hasta obtener a una población con la combinación de características deseadas, pero requiere de muchas generaciones necesarias para obtener a una población con las características estables requeridas, tomando en cuenta que el frijol es autógama.

En la transformación genética se toman genes de una especie y se insertan en otro organismo de la misma o distinta especie con la intención de transferir un rasgo o carácter deseado, sin depender de los procesos naturales de reproducción que implica un largo tiempo.

En la transformación genética por bombardeo o de la infección por *Agrobacterium tumefaciens* los factores principales que se estudian son las condiciones de cultivo antes y después, la concentración de micropartículas y de material genético. Al igual se mide la



aceleración y distancia utilizadas en caso de bombardeo, el tipo de explante transformado.

La transformación genética puede ser útil en el frijol que es incompatible para introducir características nuevas y beneficiosas a corto plazo, como puede ser: sabor, testa, color, tamaño, forma, resistencia a insectos, virus y hongos, el tipo de crecimiento para mata: arbustivo o guía, resistencia a plaguicidas, producción de moléculas orgánicas específicas (cantidad de proteínas o portadora de proteínas de interés, carbohidratos, etc.), producción de anticuerpos, vitaminas y de metabolitos secundarios.

En este trabajo se busca aplicar un protocolo como modelo de transformación genética de células de callo de frijol Negro Jamapa resistentes a Basta transformados con biobalística como opción principal. Esto es una propuesta como primer paso, ya que a futuro podría ser utilizado cuando se logre la regeneración en el frijol y se obtengan así plantas modificadas con los genes que se deseen introducir en el frijol Negro Jamapa.

## II ANTECEDENTES

En México las investigaciones científicas sobre el frijol (Fig, 2) las inicia, en 1936, en la Oficina de Campos Experimentales, de la Dirección General de Agricultura de la entonces Secretaría de Agricultura y Fomento, durante el gobierno de Lázaro Cárdenas. El interés que surge sobre este cultivo radica en el hecho de que es uno de los principales alimentos de México, además es una fuente de carbohidratos y proteínas (Engleman, 1979).



Figura 2. Planta de frijol.

([www.bronson.ru/fito/offic/phaseolus.htm](http://www.bronson.ru/fito/offic/phaseolus.htm))

### 2.1 Descripción taxonómica y botánica del frijol.

El nombre frijol viene del leonés "fréjol" (en portugués "frejon") y del latín *phaseolus*; también son conocidos como porotos (Sudamérica), alubias (árabe), judías (español), habas, caraotas o habichuelas ([www.wikipedia.org/wiki/Frijol](http://www.wikipedia.org/wiki/Frijol)).

La clasificación taxonómica del frijol común es la siguiente (ver tabla 2.1.1)

Tabla 2.1.1 Clasificación Taxonómica del frijol.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Papilionoideae
Tribu	Phaseoleae
Subtribu	Phaseolinae
Genero	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>vulgaris</i>

Torres da Silva *et al*, 2003; [www.wikipedia.org/wiki/Frijol](http://www.wikipedia.org/wiki/Frijol).

Actualmente se cultivan seis especies de frijol:

- a) Judía escarlata, frijol ayocote o caraota (*Phaseolus coccineus*).
- b) El escumite o frijol tepary (*P. acutifolius gray*) en América central.
- c) El frijol de Lima (*P. lunatus*).
- d) Frijol común o habichuela (*P. vulgaris*), América central y del sur.
- e) *P. polyanthus* Greeman.
- f) El frijol forrajero y para alimento (*P. angulares*) sólo se cultiva en Japón.

De los seis que se cultivan, el denominado *vulgaris* es el más importante, los otros se les nombra teparios (Langer y Hill, 1987; Robles, 1983; Bayuelo-Jiménez *et al*, 2002; Gaitán-Solís *et al*, 2002; Torres da Silva *et al*, 2003).

Los taxónomos, hasta 1996 reconocen la existencia de 50 especies de *Phaseolus*, de los cuales 30 especies son de origen americano, sin embargo Torres da Silva *et al*, 2003 indica que el número puede variar de 31 a 52 especies (Langer y Hill, 1987; Bayuelo-Jiménez *et al*, 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/genomicDNA>).

El frijol es una planta diploide ( $2n=22$ ) y la variabilidad genética es mínima entre las variedades. La baja variabilidad puede deberse a la existencia de factores de

incompatibilidad genética que detienen la combinación entre germoplasmas de dos distintos centro de origen (Galván *et al*, 2003; Robles, 1983).

Los frutos reciben el nombre de vainas (Fig. 2.1.1) y miden 20 X 1.5 cm aproximadamente, cada vaina presenta de 4 a 12 semillas (Langer y Hill, 1987).



Figura 2.1.1 Vaina de frijol.  
([www.csd.tamu.edu/FLORA/cgi](http://www.csd.tamu.edu/FLORA/cgi))

Las semillas nacen alternativamente sobre los márgenes de las dos placentas ubicadas en la parte ventral de la vaina, están unidos por medio del funículo y éste deja una cicatriz en la semilla que se llama hilio. La semilla presenta un embrión que consta de eje primario y divergencias colaterales (cotiledones que contienen proteínas y carbohidratos) y testa (Robles, 1983).

El frijol germina de 2 a 3 días después de la siembra, la germinación es epigea (Fig. 2.1.2), es decir, las hojas cotiledonarias salen a la superficie. El eje primario consta del tallo joven, hipocótilo y la radícula (Robles, 1983; Parsons, 1991; Langer y Hill, 1987).



Figura 2.1.2 Germinación del frijol  
([www.genres.de/leguminosen/phaseol](http://www.genres.de/leguminosen/phaseol)).

La planta de frijol al crecer puede ser trepadora, arbustiva o intermedia. Sus hojas son alternas trifoliadas con una raíz hasta de 1 m, con un sistema radicular bien desarrollado.

Presenta florescencia axilar en racimo, en donde se destaca una estructura floral que recibe el nombre de “la quilla” que impide la polinización cruzada realizada por algún polinizador, debido a ello se considera al frijol como una planta autógama, las anteras dejan caer el polen sobre el estigma antes de que la flor se abra. La longitud de la planta puede variar, por ejemplo, el frijol ayocote o judía escarlata mide 4 m o más y el frijol tepary 25 cm de altura (Parsons, 1991; Robles, 1983; Langer y Hill. 1987).

## 2.2 Características bioquímicos de la semilla de frijol.

Los estudios sobre las propiedades de la semilla de frijol como nutriente indican que es una fuente principal de proteínas con un 22 a 24% presente en la semilla, carbohidratos con un promedio de 65 a 70% en almidón y de 15 a 20% de celulosa y hemicelulosa, lípidos, fibras solubles (pectinas) los cuales poseen efectos en la prevención de enfermedades del corazón, obesidad y tubo digestivo, también presenta vitaminas del grupo B y minerales como calcio, hierro y fósforo. El resto de la planta se puede usar como forraje para el ganado (Berrios *et al*, 1999; Bayuelo-Jiménez *et al*, 2002; Langer y Hill, 1987; Parsons, 1991; Froese, 2003; [www.monografias.com](http://www.monografias.com); [www.Postcosecha.htm](http://www.Postcosecha.htm)). En la tabla 2.2.1 se presentan los nutrientes que se encuentran en 100 g de semilla de frijol.

Tabla 2.2.1 Nutrientes esenciales en 100 g de frijol.

Calorías	322 Kcal.
Proteínas	21.8 g
Grasas	2.5 g
Carbohidratos	55.4 g
Tiamina	0.63 mg
Riboflavina	0.17 mg
Niacina	1.8 mg
Calcio	183 mg
Hierro	4.7 mg

[www.obesidad.net](http://www.obesidad.net).

El frijol presenta aspectos negativos al tener bajo contenido de metionina y cisteina, presenta inhibidores de tripsinas, factores de flatulencias provocados por los carbohidratos rafinosa y estaquinososa que el organismo no asimila y son aprovechado sólo

por la flora bacterial intestinal produciendo gases como CO<sub>2</sub>, hidrogeno, metano, amoniaco y aminas (estos últimos generan el mal olor y meteorismo). Es baja su digestión, atribuido a varios inhibidores termolábiles de proteasas. La semilla cuando está verde o inmadura presenta hemaglutininas que destruyen glóbulos rojos, y sólo el calor las descompone (Engleman, 1979; Langer y Hill, 1987; FAO, 1990).

Si el frijol no se cuece, permanecen los inhibidores de enzimas que actúan en la digestión, hemaglutininas que reducen la eficiencia de la absorción de los productos en la digestión, antivitaminas E, la fitina la cual disminuye la disponibilidad del calcio, también pueden estar presentes bociógenos que impiden la asimilación del yodo (FAO, 1990).

### **2.3 Producción y condiciones de cultivo.**

El frijol es el principal alimento en África y América, entre ambos (Fig. 2.3.1), se cultivan anualmente 14 millones de hectáreas con 11.6 millones de toneladas (FAO, 1998). En cuanto a los países americanos, México y Brasil son los principales productores y consumidores de frijol (FAO, 1998).



Fig. 2.3.1 Cultivo de frijol  
([www.plantimag.de/dat/0207194.html](http://www.plantimag.de/dat/0207194.html))

México se considera el principal consumidor del frijol negro (el más comercial en América) proveniente de EU, con alrededor de 61 493 ton. en el 2000 y el 2001 se redujo a 24174.2 ton. y Canadá con 1 790 ton. en 2001. Con superficie menos sembrada y con aumento de precios, los principales importadores son: Brasil, Venezuela y México, éste último con 66 mil ton. y 0% de aranceles en el 2002 (Secretaría del Consejo Agropecuario Centroamericano, 2004).

La planta presenta un ciclo de vida de 60 a 100 días, dependiendo de las condiciones climáticas, ya que normalmente se desarrolla a temperaturas que van de 20° C a 30° C en regiones templadas o tropicales con lluvias abundantes, el suelo debe ser limoso-arcillosos con arena, con suficiente fósforo, profundos y bien drenados con un pH de 5.5 a 6.5 (FAO, 1990; Parsons, 1991; Robles, 1983; Gaitán-Solís, 2002; Fisher *et al*, 2002).

Los suelos con alto contenido de humus afectan la producción de semilla, se recomienda utilizar como abono estiércol de animales; en cuanto a los nódulos, si son blancos existe una deficiencia de *Rhizobium* (bacteria fijadora de nitrógeno), cuando están rosados son eficientes en cuanto a la presencia de la bacteria con el que tiene una relación simbiótica y es fundamental para la producción de aminoácidos (Parsons, 1991; Diouf *et al*, 2000). La deficiencia en los suelo en algunos elementos provoca un mal desarrollo en la planta (ver tabla 2.2.1).

Tabla 2.2.1 Síntomas de deficiencias de algunos elementos en la planta de frijol.

DEFICIENCIA	CARACTERÍSTICAS
N	Hoja amarilla
P	Hoja verde oscuro con orillas moradas.
K	Hoja moteada, manchada, amarillo pardo. Raíz débil
Mg	Hojas amarillas
S	Hojas amarillas
Fe	Color amarillo y blanco en hojas jóvenes
Zn	Planta chaparra y hojas nuevas mal formadas

www.fertilidad. mht

El frijol puede ser almacenado por años, sin embargo, no es recomendable que sea más de un año porque los estudios indican que incrementa su tiempo de cocción, también existe una pérdida de la vitamina complejo B, Tiamina, Niacina, y Riboflavina; además se reduce la absorción de agua (Berrios *et al*, 1999; FAO, 1990).

Del frijol negro Jamapa (*Phaseolus vulgaris*, variedad *jamapa*) es recomendable su cultivo en la zona semitropical: Morelos, Guerrero, México y Puebla; también en la costa del Pacífico (Valle del Fuerte y Culiacán) y en la zona tropical del Golfo. Se siembra al inicio de la temporada de lluvias, por ejemplo en el Valle de México y del Mezquital entre el 15

de mayo y 15 de junio. En regiones semitropicales se siembra en Junio, en la costa de Pacífico en noviembre, en los Tuxtlas debe ser de diciembre a Febrero. Las principales plagas son: conchuelas y borreguillos, las chicharritas, el picudo de ejote, minadores de hojas, la doradilla o lorito, la mosca blanca y el gorgojo (FAO, 1990; Robles, 1983; Beaver *et al*, 2004).

## **2.4 El cultivo de tejidos vegetales**

Como es sabido, las plantas responden a un estímulo a través de procesos fisiológicos, y su necesidad es constante de organogénesis; por ello las plantas mantienen células especializadas para esta función a través de los meristemos, que dependen totalmente del ambiente y de las hormonas. Ante un cambio externo la célula tiene dos posibilidades: morir o desdiferenciarse y dividirse. Otro aspecto relevante es que además del cigoto, distintas células somáticas tienen la capacidad de originar un desarrollo embrionario (Feher *et al*, 2003; Svetleva *et al*, 2003). Estos dos fenómenos fisiológicos son aprovechados y potenciados por el cultivo de tejidos *in vitro*; el cual está definido como una serie de técnicas biotecnológicas utilizadas para mantener y crecer células y tejidos vegetales, así como órganos vegetales (tallos, raíces, embriones) en cultivo aséptico (*in vitro*).

El cultivo de tejidos de órganos es la fuente principal de células blanco potenciales para los sistemas de transformación. Su ventaja radica en lo accesible que son las células vegetales para su manipulación, ya que pueden generar células que presenten las mismas características, cada una de ellas de formar una planta completa (totipotencia). El cultivo de tejidos aprovecha la capacidad totipotente celular modulando su expresión a través del medio de cultivo (sales minerales, compuestos orgánicos, hormonas y reguladores de crecimiento, etc.), el medio que lo rodea (pH, temperatura, humedad relativa, luz), así como la información intrínseca del órgano, tejido o célula (Somers *et al*, 2003).

### **2.4.1 Procesos Morfogenéticos**

La obtención de plantas completas se puede lograr por dos vías: embriogénesis u organogénesis, aprovechando la totipotencialidad de las células vegetales, cada una de



ellas tiene la capacidad genética de poder dar origen a toda una planta entera, es decir, a través de una reproducción asexual.

#### a) Embriogenesis somática

Es la producción de las distintas estructuras embrionarias a partir de células somáticas. Normalmente las células de las plantas son totipotenciales y por esa razón células somáticas pueden convertirse en embriones (Ikeda-Iwai *et al*, 2003; Eudes *et al*, 2003; Ajay y Suresh, 2003).

Para activar la embriogénesis en células somáticas se necesita darles estrés, esto ocurre en algunos casos al realizar cultivo de tejidos y exponerlos a condiciones distintas en un medio con minerales, vitaminas y hormonas; durante la etapa de la adaptación se encienden genes que conlleva a cambios fisiológicos y metabólicos (Svetleva *et al*, 2003; Feher *et al*, 2003).

El estrés promueve la desdiferenciación y también la embriogénesis. Otro factor importante para la embriogénesis son los factores de crecimiento (hormonas), una de las auxinas exógenas utilizadas es 2,4-D aunque también se han utilizado citocininas, ABA, etc., en algunos casos la embriogenesis se obtenido con menor proporción de estos reguladores. También se requiere de altas concentraciones de azúcar y alta temperatura. (Feher *et al*, 2003; Popelka *et al*, 2003; Popelka y Altpeter, 2003).

#### b) Organogénesis

La organogénesis *in vitro* se da normalmente en dos fases, la producción y crecimiento de tallos a partir de callo, hojas, cotiledones, hipocótilos, etc. y como segunda fase su posterior enraizamiento. El desarrollo de esta metodología ha dado un mayor impulso y eficiencia a algunas estrategias ya utilizadas en campo, ahorrando tiempo, espacio y dinero. Pueden utilizarse para: inducir variabilidad genética, operación que se puede efectuar a nivel de célula, tejido u órgano; recuperar embriones inmaduros, obtener plantas libres de patógenos, mediante el cultivo de meristemos libre de virus, bacteria, hongos, etc., crear híbridos somáticos entre especies sexualmente incompatibles, micropropagación a partir de yemas preformadas, mediante la fusión de protoplastos; producir líneas homocigas de haploides duplicados, mediante el cultivo de anteras, etc., y

eliminando factores ambientales adversos del cultivo *ex vitro* (Sairam *et al.* 2003; Somers *et al.*, 2003).

#### **2.4.2 Tipos de cultivos**

Los tipos de cultivos pueden ser clasificados según el explante (porción de tejido u órgano que se separa de la planta para iniciar el cultivo de tejidos o micropropagación) que se utilice:

a) Cultivo de embriones.

El cultivo de embriones *in vitro* se refiere al aislamiento de embriones cigóticos y la sustitución de su medio natural, el endospermo, por un medio artificial que propicia su desarrollo como planta. Es útil para estudiar el desarrollo del embrión, como es su germinación, también para la producción de transgénicos. En algunos casos se utiliza como una vía para una mayor germinación cuando la semilla presenta baja viabilidad. También es una opción para mayor rapidez de germinación (Evans, 2003; Ajay y Suresh, 2003).

b) Cultivo de células sexuales (polen y óvulos).

El cultivo de anteras (polen) es recomendable por ser rápido y fácil. El cultivo de óvulos no es bueno para obtener plantas haploides. Se utiliza para obtener plantas haploides que puede convertirse en diploides espontáneamente o por inducción química, por ejemplo, con el uso de la colchicina que inhibe la polimerización de la tubulina evitando la migración de los cromosomas y con ello logrando la duplicación del número cromosómico, dando así células diploides y con ello lograr plantas fértiles diploides y homocigóticas para las características deseadas (Collin, 1998; Gamborg, 1995; Evans, 2003).

c) Cultivo de hojas y/o tallo.

En el crecimiento de una planta los tejidos se mantienen intactos, pero cuando el tejido de interconexión es cortado, cada uno de los segmentos da lugar a un nuevo individuo al que

se le conoce como brote. Un ejemplo de esta técnica es la micropropagación de las violetas, en la cual se forman nuevos individuos a partir de las hojas ([www.omega.ilce.edu.mx](http://www.omega.ilce.edu.mx)). Así mismo las hojas se utilizaban mayormente para la transformación y formación de embriones; y los tallos al presentar mayormente células parenquimáticas, éstas son más flexibles y ante un daño las células se dividen para formar un callo, que en el estado natural de la planta sirve para reparar tejidos. En el caso de las raíces, su cultivo es para obtener principalmente metabolitos secundarios (Collin, 1998; Gamborg, 1995; Evans, 2003).

d) Cultivo de meristemas.

La micropropagación masiva de clones puede obtenerse vía organogénesis directa, es decir, a partir de meristemo o yema (apical y/o axilar) aislada de un vástago. Esta vía aporta estabilidad genética o ausencia de mutaciones, y también plantas libres de virus (saneamiento), mediante el cultivo de ápices meristemáticos del vástago ([www.ciat.cgiar.org](http://www.ciat.cgiar.org)). Se le considera como el método de multiplicación *In Vitro* más fácilmente generalizable y más seguro para obtener clones sin variación, además de que puede ser útil para continuar investigando problemas de morfogénesis que aun no se entienden sus causas (Margara J., 1988).

e) Cultivo de callos.

El callo se forma por la proliferación de células no diferenciadas. La vía indirecta o callo, consiste en regenerar plantas a partir de células desorganizadas y desdiferenciadas, pero siempre que éstas reviertan al estado de meristemoide y/o embrioides ([www.ciat.cgiar.org](http://www.ciat.cgiar.org)). A partir del callo, al diferenciarse a órgano o embrión, ha sido útil para el cultivo *in vitro*. El callo es utilizado como inicio o arranque para varias técnicas de cultivo como es la diferenciación, la formación de órganos y embriones. Es una masa amorfa sin organización celular de células parenquimáticas. Para una mayor proliferación se requiere de auxinas y citocininas que promueven la división y elongación. Cuando se realiza el cultivo *in vitro* de callo, las células diferenciadas se desdiferencian y los cambios metabólicos se dan al desaparecer los productos de almacén de energía y la división celular es rápida. El callo no es homogéneo, al existir regiones con centro de actividad

formadora de embriones, raíces, brotes, etc. Se considera un callo friable aquel que es fácilmente disgregable (es viable para regenerar embriones somáticos), es un callo lignificado si es sólido o seco (es óptimo para formar embriones somáticos, órganos, brotes, hojas). Se utiliza el cultivo de callos para la embriogénesis, organogénesis y transformación (Collin, 1998; Gamborg, 1995; Evans, 2003).

f) Cultivo de células en suspensión.

Cuando se subcultiva en medio líquido un callo es con el objetivo de manejar la individualidad de las células, El contacto celular con el medio es directo, también se estimula un mayor crecimiento de la masa celular y son más fáciles para su manipulación. Son útiles por generar células individuales (alargados) o agregados (de menor tamaño), se puede manipular los factores y compuestos que pueden afectar el crecimiento celular y la diferenciación, para estudios sobre la división celular, ciclo celular, producción de protoplastos y de embriones somáticos, producción de proteínas y derivados químicos, etc. (Collin, 1998; Gamborg, 1995; Evans, 2003).

### **2.4.3 Cultivo *in vitro* de frijol.**

En 1955 Honma desarrolla un sistema para cultivo de embriones de frijol. En 1986 Hammait *et al* y Belivanis *et al* en el mismo año mencionan a las leguminosas como las más recalcitrantes. Según Svetleva *et al*, 2003; mencionan que Angelini *et al* en 1989 confirma que el frijol es recalcitrante, que en ese mismo año McClean *et al* obtienen brotes de organogénesis a partir de nudos en plántulas con ausencia de meristemas y trata de regenerar frijol por la vía directa de organogénesis de tejidos de nudos cotiledonarios sin dar resultados. En 1992 Malik y Saxena utilizaron tidiazuron (TDZ) y N6-bencilaminopurina (BAP) para generar mayor cantidad de brotes de plántulas intactas, en 1995 Herselman y Mienie realizan cultivo de meristemas. En 1997 Aragao y Rech reporta regeneración de frijol por la vía de organogénesis de meristemas apicales transformados por biobalística. Los cultivos mencionados actualmente pueden ser utilizados en análisis del genoma de las plantas y en la transformación (Svetleva *et al*, 2003).

La obtención de plantas completas de fríjol transgénico no se ha dado debido a que la regeneración no ha sido posible a partir de células transformadas (Archana y Paramjit, 2003; Sairam *et al*, 2003).

El cultivo *in vitro* a partir de embriones somáticos o cigóticos, de callos, de explantes, meristemos, etc., ha sido con la finalidad principal de realizar la transformación directa o indirecta. Se cultivan en condiciones ambientales controladas en una serie de medios que contienen nutrimentos y hormonas.

## **2.5 El mejoramiento genético tradicional del fríjol.**

El intercambio de material genético que se ha dado en el fríjol ha sido natural o dirigido por el hombre, en el primer caso Engleman, 1979, menciona cuatro importantes:

1. Aún cuando es autógama, existe entrecruzamiento natural de un 13 % a 48 % entre variedades.
2. Las semillas pueden ser transportadas a otros ambientes por lluvias o por dispersión de faunas silvestres, en donde la lucha por la sobre vivencia da como resultado una modificación en la especie.
3. La mutación como un proceso natural por errores de replicación del DNA, ha dado origen a semillas de color rojo y blanco.
4. La temperatura ha sido un factor importante de selección en la naturaleza para el fríjol.

En el segundo caso, la selección realizada por el hombre durante la domesticación y cultivo ha generado variedad en el tamaño de semillas y cantidad en cada vaina (Robles, 1983; Engleman, 1979). Sin embargo, las distintas características fueron surgiendo al azar y el hombre sólo se ha encargado de preservar a las variedades que mejor le convienen, por ej. se prefieren las vainas más grandes y blandas, con granos de mayor tamaño y más jugosos, además los estudios indican que las semillas contienen menos cantidad de glucósidos cianogénicos (cianuro, que no se elimina con la cocción), estos cambios genéticos han sido a largo plazo (por años o cientos de años), mientras que las necesidades de mejoramiento son a corto plazo (FAO, 1990), En la actualidad, los agricultores todavía utilizan variedades criollas y “acriolladas” (mejoradas con procesos ancestrales) de manera extensiva por su precocidad, buena adaptación y valor comercial del grano (Rosas *et al*, 2003).

La reproducción sexual representa la primera vía directa para la transferencia de información genética, debido a ello el mejoramiento común en plantas a partir de la domesticación ha sido por medio de cruzamientos, hasta obtener a una población con la combinación de características deseadas, tras un proceso que requiere tiempo y selección. Sin embargo el mejoramiento de las plantas por medio de cruza, presenta varios inconvenientes, como son la utilización de muchas generaciones necesarias para obtener a una población con las características estables requeridas, y más aún tomando en cuenta que el frijol es autógama, se requiere de muchas personas para realizar la polinización a mano (Somers, 2003).

## **2.6 Importancia de las plantas transgénicas**

La transformación genética es un proceso donde se toman genes de una especie y se insertan en otro organismo de la misma o distinta especie, con la intención de transferir un rasgo o carácter deseado, sin depender de los procesos naturales de reproducción. Se denomina "transgénico" al organismo portador de un gene extraño, llamado transgene, el cual se supone, le confiere una ventaja ecológica, nutricional o de otro tipo (Somers, 2003; Wisniewski *et al*, 2002).

El desarrollo de la biología molecular ha logrado la caracterización, aislamiento y clonación de genes y a su transferencia entre especies filogenéticamente alejadas como bacterias y plantas. Además de su posible potencialidad biotecnológica, las técnicas de transformación genética han llegado a ser importantes herramientas para estudios básicos en biología vegetal, permitiendo el análisis de procesos de desarrollo en plantas, así como el estudio de la estructura y regulación de genes vegetales (Somers, 2003).

La transformación genética puede ser útil por lo siguiente:

- Es importante para crear poblaciones genéticamente diversas de plantas cultivables.
- Elimina incompatibilidades.
- Características nuevas y beneficiosas a corto plazo.
- Permite introducir en el mercado un producto al que se le supone un valor agregado que lo identifica como mejor, o más limpio, o más barato, o de otra índole que lo hace preferible para el consumidor.

La transformación genética en plantas puede agilizar a corto plazo los procesos de mejoramiento del frijol, al permitir la sobreexpresión de un gene exógeno o la supresión de un gene endógeno con los siguientes objetivos:

1. Rendimiento elevado.
  2. Características de la semilla, sabor, testa, color, tamaño y forma.
  3. Resistencia a insectos, virus y hongos
  4. Tiempo de cocción.
  5. Resistencia a enfermedades como la roya (chahuixtle) provocada por el hongo *Uromyces phaseoli*.
  6. Elegir el tipo de crecimiento para mata, arbustivo o guía. Por ejemplo el tipo mata genera mayor cantidad de vaina y por tanto de semillas.
  7. Modificar el ciclo vegetativo para cambios de temporada, para evitar plagas, heladas, etc.
  8. Acelerar madurez.
  9. Resistencia al calor y sequía.
  10. Resistencia a plaguicidas.
  11. Producción de moléculas orgánicas específicas (cantidad de proteínas o portadora de proteínas de interés, carbohidratos, etc.).
  12. Producción de anticuerpos.
  13. Producción de vitaminas.
  14. Producción de metabolitos secundarios.
- (Mejia, 2002; Svetleva *et al*, 2003; Robles, 1983; Somers *et al*, 2003).

## **2.7 Procesos de transformación**

La construcción de plantas transgénicas se debe a la presencia de ADN extraño en las células (Somers *et al*, 2003). El descubrimiento de las enzimas que participan durante la replicación y transcripción sumado a la identificación de genes en los organismos, ha permitido seleccionar aquellos que pueden ser útiles y aislarlos mediante las enzimas de restricción nuclear (por ej. EcoR1) que reconoce y corta en el ADN en una región específica de éste. Estos genes pueden ser transferidos al ADN de otro organismo receptor que los adhiere a su genoma a través de ligasas que unen los extremos de dos fragmentos de ADN. A partir de estos estudios se inicia la manipulación con el material

genético haciendo construcciones de fragmentos de ADN con distintos genes de organismos no emparentados (Alberts B., 2002; Voet D., 2004).

También se llega a la conclusión que los organismo receptores de genes externos puede actuar como clonador de este gene a través de su proceso de reproducción, como es el caso de las bacterias, principalmente por *Escherichia coli* (Alberts B., 2002; Voet D., 2004).

En su inicio la modificación genética en plantas era por medio de la radiación o utilizando químicos para inducir mutación en el ADN que desafortunadamente eran al azar y con baja frecuencia o del tipo recesivo (Svetleva *et al*, 2003).

A partir de los ochentas del siglo pasado se da inicio al proyecto de los organismos transgénicos, principalmente en las plantas cultivadas. Para ello fue necesario aislar y clonar el gene de interés, posteriormente ser modificado agregándole secuencias o genes que le permita una buena función al ser transferido a una planta (Wisniewski *et al*, 2002).

Un transgene debe presentar las siguientes secuencias de genes (Figura 2.7.1):



Figura 2.7.1 Esquema de un modelo de un transgene.

- **Gen marcador de selección** que mediante pruebas visibles corroboran que el transgene ha sido incorporado al genoma de la planta. Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes normalmente tóxicos para las plantas, como los antibióticos o herbicidas. Como se explica más adelante, sólo las células vegetales que han integrado el gen marcador seleccionable sobrevivirán cuando se las cultive en un medio que



contenga el antibiótico o herbicida pertinente. Existen varios que tienen la misma función de marcadores, por ejemplo el gene *nptII* (resistencia a Kanamicina).

- **Gen reportero** son aquellos que pueden producir una expresión transitoria de tinción o luminosa, por ej. el gene *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa) que tiñe de azul a las células transformadas.
- Secuencia **promotor** para que el gen sea expresado correctamente (es decir, traducido como un producto proteínico). El promotor es la llave de encendido y apagado que controla cuándo y dónde se expresará el gen en la planta. La mayoría de los promotores en las variedades de cultivos transgénicos son "constitutivos", es decir, que permiten la expresión del gen durante todo el ciclo biológico de la planta en la mayoría de los tejidos. El promotor constitutivo usado más comúnmente es CaMV35S, proveniente del virus del mosaico de la coliflor, que generalmente produce un alto grado de expresión en las plantas.
- **Gen de transferencia (de interés)**, el cual se quiere transferir a la planta para su mejoramiento.
- **Secuencia de terminación** que indica a la maquinaria celular que se ha alcanzado el final de la secuencia génica.

(Vain *et al*, 2002; Somers *et al*, 2003 ; Tadesse *et al*, 2003 ; Perret *et al*, 2003; Wisniewski *et al*, 2002).

El transgene se coloca en un anillo de ADN auto replicable o plásmido y posteriormente son transferidos a bacterias clonadoras (Figura 2.7.2).

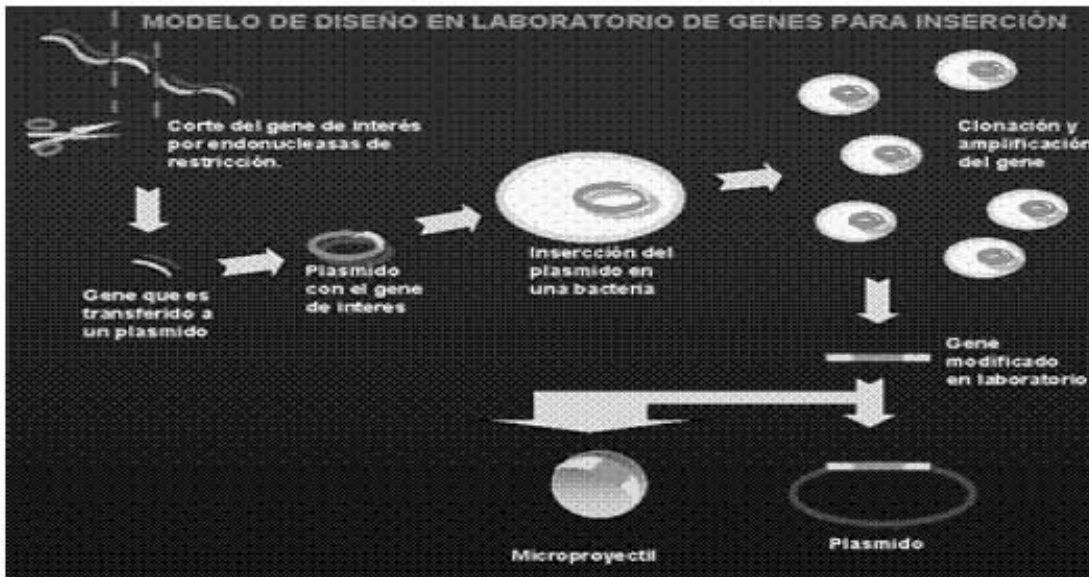


Figura 2.7.2 Esquema que muestra las etapas sobre el diseño de genes de inserción.

Es importante presentar un mapa genético del plásmido donde se indican las posiciones del gene que interesa incorporar, del gen selector, etc. para que puedan ser aislados con enzimas de restricción según sea el objetivo de las investigaciones (Figura 2.7.2). Una vez establecido lo anterior, lo siguiente es la aplicación de métodos para la transferencia del transgene al vegetal y obtener una planta transgénica.

El éxito depende tanto de lograr sistemas eficientes para introducir de manera estable el material genético ajeno en el interior de células, como tener la capacidad de regenerar plantas completas con las características predefinidas (Somers *et al*, 2003; Svetleva *et al*, 2003; Vain *et al*, 2002).

Existen diversos métodos de transformación que se pueden agrupar en dos: Transformación directa e indirecta (Figura 2.7.3).

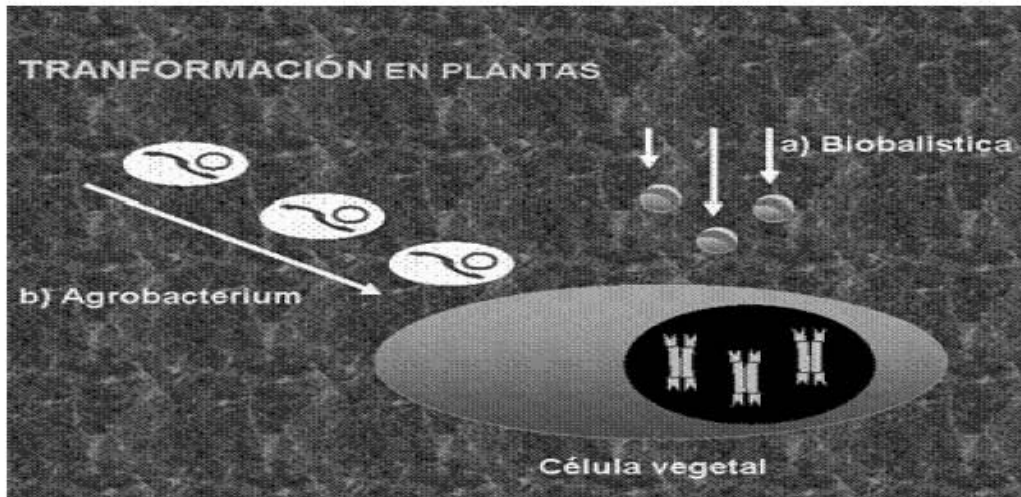


Figura 2.7.3 Muestra los dos modelos de transformación: a) directa, b) indirecta.

- Transformación directa:** en donde varios genes se pueden introducir a células, cloroplastos y mitocondrias mediante las siguientes técnicas: la aceleración de microproyectiles (bombardeo) de oro o tungsteno recubiertos del transgene (Tadesse *et al*, 2003; Wisniewski *et al*, 2002; Newell *et al*, 2003). Otros métodos consisten en la introducción del ADN en protoplastos (células desprovistas de la pared celulósica por medios enzimáticos o químicos), por electroporación (aplicación de un campo eléctrico); también puede ser utilizando polietilenglicol (PEG) con tratamiento químico, sonicación (ULTRA-SON, Modelo T14, 40 kHz. Thornton INPEC Electrónica, Piracicaba/SP), formación de poros con rayos láser y abrasión con fibras de silicio (Vain *et al*, 2002; Tadesse *et al*, 2003; Wisniewski *et al*, 2002; Solange, solange@cpac.embrapa.br.). También puede ser por microinyección.

La biobalística o bombardeo con micropartículas es una técnica utilizada por primera vez por el grupo del Dr. John Sanford, ésta permite introducir ADN a cualquier tipo de célula por medio de partículas microscópicas aceleradas a velocidades muy altas, que atraviesan la pared y la membrana celular. Los microproyectiles son partículas de forma aproximadamente esférica (de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro). Para acelerar los microproyectiles y que adquieran un momentum (masa x velocidad) son impulsados a grandes velocidades por un choque de gas, que puede derivarse de una explosión química, la explosión eléctrica de una gota de agua, o una descarga de un gas inerte (ej. Helio). Las células o tejidos que constituyen el blanco de los proyectiles se disponen de

tal forma que presentan la máxima superficie para el bombardeo, que es cerca de 5 cm. de diámetro aproximadamente (Svetleva *et al*, 2003).

Ejemplos de transformación con biobalística se ha logrado a partir de tejidos vegetales, hojas, meristemo, embriones en desarrollo, embriones maduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, etc. Los logros más connotados en la generación de plantas transgénicas por medio de este método, incluyen especies de gran importancia económica como son el maíz (Guerrero *et al*, 2006; Rosales *et al*, 2006; Gutierrez *et al*, 2005; Saldaña *et al*, 2006; Vain *et al*, 2002; Tadesse *et al*, 2003; Wisniewski *et al*, 2002).

Sus limitaciones consisten en que algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Otro problema es la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran ser transformadas (Vain *et al*, 2002).

- **Transformación indirecta o mediada por agentes biológicos (bacterias o virus):** se trabaja principalmente con *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes* como vector biológico portador del ADN. *A. rhizogenes* es una bacteria que produce raíces adventicias en el sitio de infección a través de la inserción del plásmido Ri que induce la diferenciación de raíces (Carmine y Monticelli, 1998). La bacteria fitopatógena *A. tumefaciens* es la más utilizada, ya que produce de manera natural los tumores o "agallas" en heridas que se originan en las plantas. En el proceso de infección, el plásmido Ti (inductor de transformación) contiene un segmento llamado ADN-T (transferible con ~20 kb de largo) que pasa a las células vegetales, incorporándose a su ADN cromosómico y una serie de genes vir (de la virulencia) que dirigen el proceso de replicación de ADN-T y de la infección abriendo un canal en la membrana celular bacteriana a través del cual pasa ADN-T (Somers *et al*, 2003). Se tiene mejor resultados si se utiliza para la infección explantes de hoja y tallos de dicotiledóneos (Somers *et al*, 2003).

Algunos autores consideran al método con *Agrobacterium* como mejor que la biobalística, ya que es mayor la frecuencia de inserciones en un solo sitio (locus) del ADN de la planta, sin embargo hay muchas especies de plantas en que *Agrobacterium* no funciona (Somers *et al*, 2003; Mejia *et al*, 2002; Liu *et al*, 2003).

Las células transformadas por cualquiera de las dos vías se incuban en un medio que contiene un agente selector pesticida o antibiótico, los que poseen los transgenes con los genes de resistencia al agente selectivo proliferan, mientras que las que no lo contienen mueren (Somers *et al*, 2003; Thanh *et al*, 2003; Romano *et al*, 2003). Utilizando acetosiringona y cadenas binarias con alta virulencia aumenta la eficacia de la transformación de *Agrobacterium* (Somers *et al*, 2003).

Para realizar una transformación óptima es necesario tomar en cuenta los siguientes factores:

- El genotipo específico del tejido.
- El tipo de explante.
- La respuesta al tipo de transformación.
- El tiempo de cultivo.
- La composición del medio de cultivo.
- El tratamiento osmótico en el cultivo de tejidos se utiliza para reducir el daño durante la transformación por biobalística y los parámetros que se deben cuantificar. Permite la inserción de uno o más copias de genes de interés por tamaño y composición deseada (Popelka *et al*, 2003 ; Mejia *et al*, 2002 ; Somers *et al*, 2003).

Las células transgénicas pueden ser inducidas a diferenciarse en órganos y luego en plantas enteras mediante una serie de pasajes *in vitro* utilizando reguladores de crecimiento. La expresión de un gene en una planta transgénica aun es impredecible y existe una variación en los niveles de expresión, esto puede deberse al sistema de transformación utilizado (*Agrobacterium* o biobalística), la construcción del transgene, tipo de promotor, la codificación de secuencias, terminadores, estrategias de selección de explantes; cada uno de estos parámetros o todos influyen en el resultado final. El problema se acrecienta cuando se utiliza la transformación directa por el locus generado según el sitio donde es depositado, ya que es difícil predecir su expresión, debido a cuestiones epigenéticas, supresión y cosupresión, y actuación de genes silenciosos, también es difícil predecir la conducta y flujo que tendrán los transgenes cuando se den las cruces en las plantas por azar en la naturaleza (Vain *et al*, 2002; Romano *et al*, 2002). Cuando la transformación no se realiza de forma óptima en una planta da como resultado fenotipos anormales.

Por otra parte las leguminosas siempre presentan problemas para su transformación debido a que son recalcitrantes para ese proceso, lo mismo sucede con la inducción de embriogenesis somática y la regeneración, aun así, se ha logrado buenos resultados con algunos genotipos (variedades) específicos (Somers *et al*, 2003).

Por los resultados obtenidos se ha propuesto que la biobalística es una mejor opción para la transformación en plantas recalcitrantes que son mayormente las monocotiledóneas que las dicotiledóneas (Tadesse *et al*, 2003; Popelka *et al*, 2003).

## **2.8 Antecedentes de transformación en leguminosas**

El tabaco fue la primera planta modificada con un gen foráneo, utilizando para la transferencia del ADN a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Somers *et al*, 2003).

Entre las leguminosas más investigados para su transformación se encuentra en la soya (*Glicina max*) y el cacahuete (*Arais hipogea*), tomando en cuenta que el promotor utilizado en transgenes CaMV 35S actúa mejor en dicotiledóneas (Somers *et al*, 2003; Thanh *et al*, 2003; Tadesse *et al*, 2003; Mulugeta y Boerboom, 2000).

Hasta hoy la transformación en el frijol ha consistido principalmente en la inserción de genes que confieran resistencia a herbicidas. *Phaseolus vulgaris* presenta dificultades para ser transformado por *Agrobacterium* (Somers *et al*, 2003; Solange, solange@cpac.embrapa.br.).

Lippincott *et al* en 1968 publicaron las observaciones sobre la formación de tumores por *Agrobacterium* en hojas primarias de frijol (Aragão, 2002). Se tiene reportes de transformación con *Agrobacterium* desde 1989 con Mariotti utilizando semillas de frijol, pero no menciona análisis de DNA de las plantas transformadas ni tampoco de que se mantuviera la transformación genética en generaciones posteriores (Russell *et al*, 1993). En una revisión sobre el frijol publicada en 2003 de Svetleva *et al*, mencionan sobre la transformación del frijol por Genga y Ceriotti en 1990 y 1991 que transformaron con los genes *gus* y *npt II* (resistencia a Kanamicina) en hojas y semillas inmaduras, así como cotiledones y ejes embrionarios de semillas inmaduras, pero no se menciona los resultados obtenidos. Mc Clean *et al* en 1991 utilizaron semillas secas para la infección en donde se insertó el gene *npt II* (resistencia a Kanamicina) con *Agrobacterium*, se formaron tumores en brotes nudos cotiledonarios e hipocotiledonarios, se considera que

la transformación solo fue en tejidos pero no en la planta completa. En 1992 Aragão *et al*, utilizaron semillas inmaduras y comprobó con el gene *gus* la transformación en brotes, este mismo autor en 1997 transformaron frijol utilizando brotes de ápices. Nuevamente la revisión de Svetleva *et al* (2003) citan que en 1993 Franklin *et al*, transformaron cultivo de callos y comprueba con Kanamicina y *gus*, no se dan más detalles; también se menciona que Brasileiro *et al* en 1996 utilizaron *A. rhizogenes* para infectar a meristemos apicales, nuevamente no se mencionan resultados. En la misma revisión de Svetleva *et al* (2003) escriben que en 1997 Kapila *et al*, utilizaron para la infección explantes de hojas y prueba la transformación con *gus*, pero no menciona resultados.

Se reporta transformación con *Agrobacterium* utilizando brotes, nudos cotiledonarios e hipocotiledonarios con Eissa *et al*, en el 2000 y 2001. En el 2000 Suresh *et al*, también reportaron transformación con *Agrobacterium* (Svetleva *et al*, 2003; Aragão J. L. F. 2002).

Las transformaciones realizadas de 1989 a 2001 no reportan estabilidad de las plantas transformadas ni de su descendencia (Svetleva *et al*, 2003; Aragão J. L. F. 2002).

Por otra parte, Svetleva *et al* publicaron en 2003 una revisión sobre la transformación del frijol reportando que por vía directa se da a partir de 1993 por Russell D. R. al bombardear meristemos apicales con el gene *gus* y *bar* (resistencia a Basta) en semillas germinadas, obteniendo plantas transformadas con semillas que mostraron la expresión de *gus* y resistencia a Basta, a partir de esta generación se mantuvo la transformación hasta por lo menos en cinco generaciones posteriores, utilizó la aceleración de partículas por descarga eléctrica eléctrica para el bombardeo (tecnología ACCELL™).

En 1995 por Kim y Minamikawa también transformaron con meristemos apicales pero no se reporta ningún análisis de la progenie, sin embargo estos mismos investigadores en 1997 bombardearon brotes de ejes embrionarios y reportaron expresión de *gus* en brotes transformados y posteriormente al madurar en plantas sus semillas mostraron la expresión de *gus* en semillas de las plantas (Svetleva *et al*, 2003; De Clercq *et al*, 2002). Reportaron Svetleva *et al* en 2003 que se realizó transformaciones a través de la aceleración de partículas por descarga eléctrica en ejes embrionarios (tecnología ACCELL™) por Aragão en 1993.

También Aragão en 1996 bombardeo brotes de semillas germinadas, principalmente ejes embrionarios obteniendo plantas transgénicas pero no se reporta análisis de la progenie y en 2002 este mismo investigador reportó que los genes de antisentido *Rep-TrAP-REn* se han manejado para la transformación de *Phaseolus vulgaris* L. resistente a geminivirus BGMV, al afectar la replicación del virus para la infección en plantas, principalmente en tomate, fue clonado en antisentido, para unirse al ARNm virulento y obstruir la reproducción del virus, esto fue utilizado como selección en la transformación del frijol (Aragão *et al*, 1998; Svetleva *et al*, 2003).

León *et al* en 1991 reportaron transformación en protoplastos (Svetleva *et al*, 2003). De todos los trabajos mencionados solo el grupo de Russell (1993) y de Aragão han obtenido plantas transgénicas utilizando meristemo apicales de semillas germinadas (De Clercq *et al*, 2002).

En 2001 Eissa reporta transformación en callos resistentes a higromicina pero se secaron y Vianna *et al* en 2004 reportan una transformación por bombardeo usando un fragmento de DNA remplazando un vector circular de DNA (plásmido), en ejes embrionarios (Svetleva *et al*, 2003; Vianna Giovanni *et al*, 2004).

Se han realizado transformación con semillas maduros de *P. acutifolius*, var. A. Gray, que fueron expuestos con ultrasonido para causarles heridas y se diera la infección con *A. tumefaciens* (Mejia *et al*, 2002; De Clercq *et al*, 2002).



## II OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Determinar las condiciones de transformación genética a través de biobalística y por *Agrobacterium tumefaciens* de líneas celulares provenientes de callos de frijol Negro Jamapa y las condiciones de los medios de selección con Basta o Kanamicina.

### 2.2 Objetivos particulares

- Establecer cultivos de callos a través de diferentes explantes de variedades de frijol y distintos medios.
- Evaluar el crecimiento de los callos a través de cinéticas de peso fresco y seco, con y sin agente selectivo (Basta o Kanamicina).
- Probar diferentes condiciones en cuanto a distancia y tamaño del microproyectil de la transformación biobalística.
- Comparar las condiciones de transformación entre biobalística y por *Agrobacterium tumefaciens*.
- Comparar la selección de callo transformado en medio gel y medio líquido.
- Mantener un agente selectivo en líneas celulares transformadas y verificar periódicamente la expresión permanente.

El presente estudio busca proporcionar un protocolo para obtener células transformadas del frijol Negro Jamapa que puedan ser utilizadas en el futuro en plantas completas modificadas genéticamente en diversos proyectos productivos de alimentos y farmacéutico.

Los conocimientos generados en este trabajo busca contribuir en el ámbito de la modificación genética en vegetales y que sea importante para el ser humano.

### III MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos se siguió el diagrama operativo que se muestra en la figura 3.

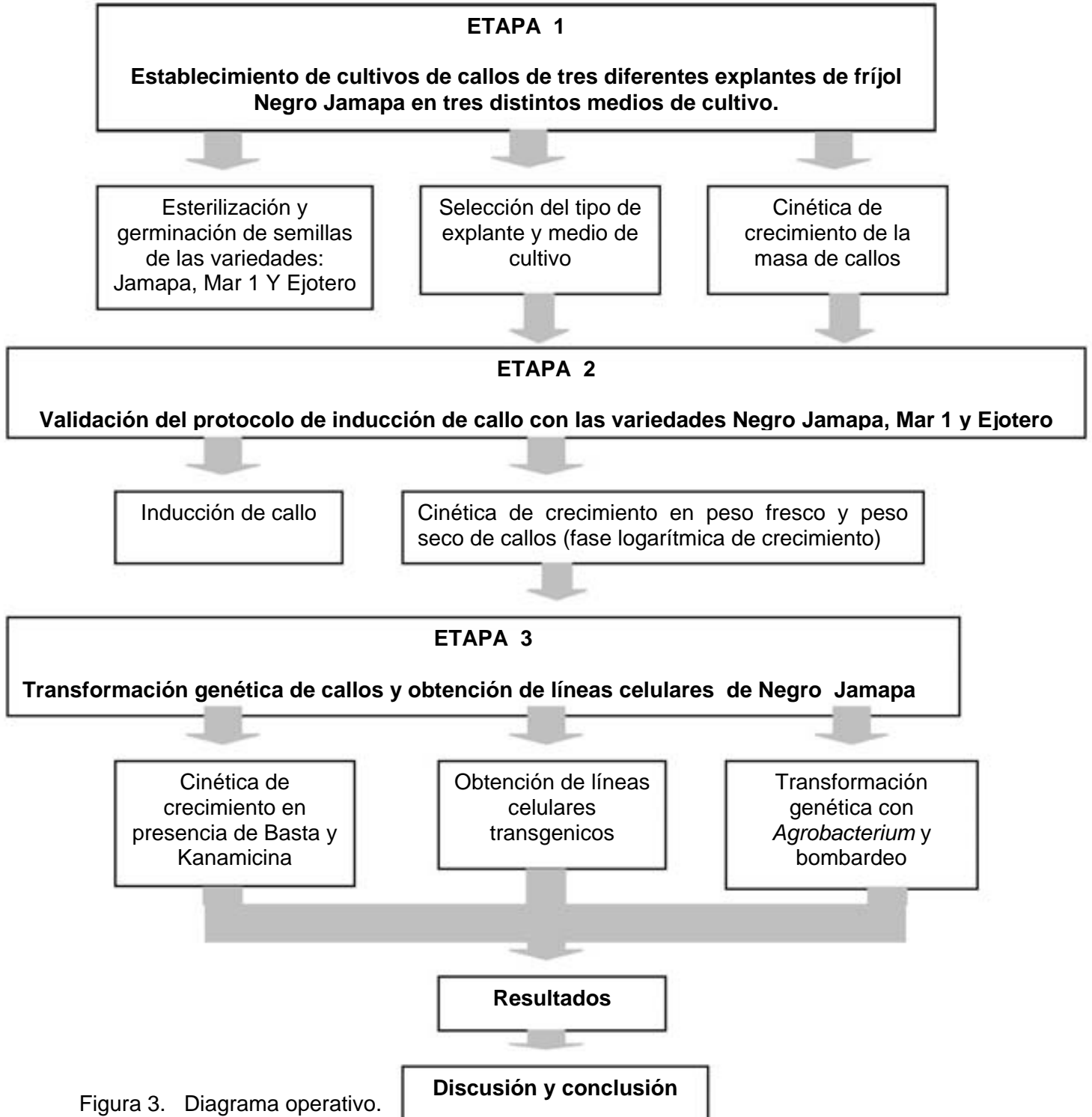


Figura 3. Diagrama operativo.

## Material biológico

Para la etapa 1 se utilizó semilla botánica de *Phaseolus vulgaris* L., variedad Ejotero y Mar 1, ésta última es el producto de varias cruizas de distintas razas (BZ 5845= BAT 85//A 83/XAN 112//'Catu' (W6 9626)//A 442/'Higuerillo' (PI 197683)) (Singh *et al*, 2003). Para la etapa 2 y 3 se utilizó la variedad Jamapa (Fig. 3).



Fig. 3 Imagen de la semilla frijol  
*Phaseolus vulgaris* L., variedad Jamapa.

### 3.1 ETAPA 1: Establecimiento de cultivos de callos de tres diferentes explantes de frijol Negro Jamapa en tres distintos medios de cultivo.

#### 3.1.1 Preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X (ver anexo). Las sales minerales utilizadas fueron de los medios: MS, SH, N<sub>6</sub>p y M<sub>1</sub>. Se les adicionó 3% de sacarosa, reguladores de crecimiento (según cada ensayo), vitaminas y aminoácidos, el pH se ajustó a 5.7 con NaOH 1N o HCl 1N según fuera necesario. Los medios sólidos, se solidificaron con 0.25% de gellan y en algunos ensayos se les adicionó el agente selectivo Basta (glufosinato de sodio) o Kanamicina en diferentes concentraciones. Todos los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una temperatura de 121°C y a una presión de 1.2 Kg/cm<sup>2</sup> (17 p.s.i.) durante 18 minutos.

### **3.1.2 Esterilización y germinación de la semilla**

Se utiliza medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) preparado como se describió anteriormente. El medio se sirvió en tubos de ensayo (14.5 X 2.5 cm) a razón de 20 ml por tubo.

Las semillas se desinfectaron colocándolas primero en alcohol al 70% durante 1 minuto, a continuación se desinfectaron durante 18 minutos en agitación constante en 250 ml de hipoclorito de sodio comercial al 30% + (v/v) 10 ml de una solución coloidal de plata (microdin ®) + 3 ml de tween 20, durante 18 min. con agitación manual. Se enjuagaron las semillas tres veces con H<sub>2</sub>O, cada enjuague tuvo una duración de 2 minutos. Posteriormente las semillas se sembraron en tubos de ensayo con medio MS y se incubaron durante 3 semanas.

En total se sembraron 50 semillas de *Phaseolus vulgaris*, 50 semillas de variedad Jamapa, variedad Mar 1, y 50 semillas para la variedad Ejotero.

### **3.1.3 Condiciones de incubación**

Todos los cultivos se mantuvieron en un cuarto con ambiente controlado a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

En el caso de los cultivos de células en suspensión, éstos se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo y a 100 r.p.m.

### **3.1.4 Inducción de callos a través de diferentes explantes y medios de cultivo**

Se preparó medio SH (Shenk y Hildebrandt, 1972) y se sirvió en frascos de alimento infantil (Gerber ®) a razón de 30 ml por frasco en donde se colocaron los explantes de frijol variedad Jamapa y durante 4 semanas fueron incubados.

Los explantes utilizados fueron: hoja, tallo, raíz, cotiledón, nudo y pecíolo (Fig. 3.1.4.1), de tamaño aproximado de 1 cm<sup>2</sup>.

Los callos obtenidos fueron cultivados en frascos con 30 ml de medio SH (ver anexo) y los subcultivos se realizaron cada 4 semanas.



Fig. 3.1.4.1 Esquema de los explantes utilizados del frijol.

Posteriormente se realizó la selección del mejor explante para la variedad Negro Jamapa y del medio de cultivo óptimo para la mayor inducción de callo comparando tres distintos explantes (tallo, hoja y raíz) sembrados en tres distintos medios de cultivo: SH, N<sub>6</sub>p y M<sub>1</sub>, para lo cual se realizó cinética de crecimiento del callo obtenido por cada explante, durante cuatro semanas, con un peso inicial de 0.5 g,. Nuevamente serían 3 repeticiones por cada explante y por cada medio (30ml/frasco), los subcultivos se realizaron cada 4 semanas.

### 3.1.5 Cinética de crecimiento

Los callos obtenidos del explante de tallo de la variedad Mar 1 se subcultivaron dos veces más y se incubaron bajo las mismas condiciones ambientales ya mencionados en medio SH, durante cuatro semanas. Pasado este tiempo se realiza un subcultivo con las mismas condiciones. Posteriormente se pesaron 1 g de callo y se sembraron en medio SH, realizándose nueve repeticiones, durante cuatro semanas se pesó el callo de cada repetición cada tercer día para obtener la cinética de crecimiento. De igual manera se obtuvo la cinética de crecimiento de la variedad Ejotero.

## **3.2 ETAPA 2 Validación del protocolo de inducción de callo con las variedades Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero**

### **3.2.1 Esterilización de semillas**

Se repitieron los mismo protocolos de la etapa 1 con *Phaseolus vulgaris*, var. Jamapa. Para la siembra de semillas ahora se utilizó frascos esterilizados de 5 X 14 cm en cada uno se sembraron 4 semillas. Por frasco se agregó 30 ml de medio MS sin hormonas. En total fueron 50 semillas sembradas.

### **3.2.2 Cinética de crecimiento sin Basta en peso seco y fresco**

Para la cinética de crecimiento de callo del explante de tallo del frijol Jamapa se utilizaron 10 frascos con medio SH en donde se agregó 1 g de callo de tallo por cada frasco. Se pesó cada 2 días durante 4 semanas. Al mismo tiempo se utilizaron 13 frascos con medio SH en donde se agregó 1 g de callo y cada 2 días se tomó el callo de un frasco y fue colectado en papel aluminio e incubado hasta terminar con los 13 frascos durante todo un mes, se dejó secar y se pesó para determinar la cinética de crecimiento del peso seco.

## **ETAPA 3 Transformación genética de callos y obtención de líneas celulares transformadas de Negro Jamapa**

### **3.3.1 Cinética de crecimiento con Basta en peso fresco**

En la cinética de crecimiento del callo del frijol Jamapa se utilizó el explante de tallo en medio SH con el herbicida Basta (Glufosinato de amonio).

Primero se esterilizó el medio durante 18 minutos y posteriormente se le agregó Basta antes de enfriarse o se gelificara, en condiciones estériles.

Se realizaron 6 tratamientos iniciándose con 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mgL<sup>-1</sup> de Basta, con 13 repeticiones, con un peso de 0.5 g de callo.

El callo se pesó cada 2 días durante 4 semanas.

### 3.3.2 Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes *bar* y *gus*)

La transformación en el callo de frijol fue con el gen *bar* (resistencia a Basta) y el gen *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa).

A 48 cajas petri de plástico nuevas y estériles (60 X 15 mm) se les agregó medio SH (20 ml cada uno). Observación: en cada medio se utilizó 3 gL<sup>-1</sup> de Gellan<sup>MR</sup> (Research Organic).

En cada caja se subcultivó callo de frijol provenientes del tallo. La superficie ocupada en el medio por las células fue aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> del centro, con 3 mm de espesor. Cada caja se selló con una película de plástico.

La preparación de las partículas de tungsteno para el bombardeo fue así:

- Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4  $\mu$ m de diámetro (M 5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 ml. También se preparó de misma forma partículas de tungsteno de 0.7  $\mu$ m de diámetro (M 10).
- A ambos tubos se les añadió 2 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 0.1 M y se sonicaron en hielo durante 20 min.
- Posteriormente se eliminó el ácido nítrico agregándose 1 ml de agua desionizada estéril; la muestra se transfirió a un tubo de 2 ml de capacidad y se sonicaron brevemente ambas soluciones.
- A ambos tubos con micropartículas se centrifugaron de 10-30 segundos a una velocidad de 10,000 r.p.m para cada solución.
- El agua se eliminó, se agregó 1 ml de etanol absoluto (100%) y se sonicó brevemente.
- Se centrifugaron las micropartículas de 10 a 30 segundos a una velocidad de 10,000 r.p.m.
- El etanol se eliminó, se agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se sonicaron brevemente.
- Se tomaron 200  $\mu$ l de la suspensión de cada solución y se colocaron en tubos eppendorf.
- Después, se añadieron 750  $\mu$ l de agua desionizada estéril a cada tubo.

- Los tubos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En un tubo eppendorff se preparó la solución que se utiliza para bombardear los callos de la manera siguiente:

- 50  $\mu\text{l}$  de partículas. Agitación constante.
- 1. DNA 5  $\mu\text{l}$  ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Presenta: 4.5  $\mu\text{l}$  de \*PGHCNS-MARS + 0.5  $\mu\text{l}$  de Pcambia 3201(vector).
- 50  $\mu\text{l}$  de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 2.5 M.
- 20  $\mu\text{l}$  de espermidina (0.1 M).
- Vortexear 5 s.
- Centrifugar 5 s.
- Tomar 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y desechar.
- Los 25  $\mu\text{l}$  restante se resuspenden. Se utiliza para 5 disparos, 5  $\mu\text{l}$ /disparo.

La transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 7.5 cm entre el filtro y el callo, en un vacío presión de 20-22 mm de Hg.

Para el bombardeo se utilizó una cámara de presión del laboratorio de cultivo de tejidos (L-116) en la facultad de Química, UNAM (Fig. 3.3.2.1).



Fig. 3.3.2.1 Conjunto de cámara de bombardeo y el tanque de Helio.



Las cajas Petri de los callos transformados son sellados con klenn- pack<sup>®</sup> y 10 cajas con callo en medio SH fueron utilizados como testigos, los cuales fueron bombardeados con partículas sin materia genético. Se mantienen en incubación a temperatura de 24<sup>o</sup>C a 16 h luz/8 h oscuridad, durante 24 h. Durante este tiempo se prepara el medio X-Gluc para la expresión transitoria. Pasado el tiempo de incubación se seleccionan al azar algunos callos para medir la expresión transitoria del gen *gus*.

La prueba de expresión transitoria se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocaron los callos bombardeados en cajas petri desechables (60 X 15 mm) se les agregó 2 ml de solución de X-Gluc a cada caja y se incubaron a 25<sup>o</sup>C por un periodo de 24 h.
2. Se desechó esta solución y se lavaron los callos 2 veces con Buffer "Z" pH 7.4.
3. Después, se lavaron con etanol al 70% 4 veces.
4. La clorofila se eliminó con una mezcla de acetona-metanol (1:3) lavándose con esta solución los callos el tiempo necesario, haciendo varios cambios de la mezcla.
5. Después de que se observó el color azul, producto de la reacción de los callos se lavaron 4 veces con Buffer "Z".
6. Finalmente, los callos se conservaron en glicerol al 50%,
7. Las cajas petri fueron sellados con klenn- pack y se almacenaron a 4<sup>o</sup>C.

Los callos restantes fueron colocados en medio de selección SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta para obtener células sobrevivientes transformadas durante 4 semanas, posteriormente se realizaría el subcultivo.

Nuevamente se repitió la transformación ahora sólo con callo de explantes del tallo y cultivados en medio SH.

### **3.3.3 Transformación y selección del callo de fríjol jamapa en medio líquido**

La preparación de las partículas de tungsteno fue conforme al Protocolo de Basta (ver inciso 3.3.2), la distancia utilizada fue de 7.5 cm entre el filtro y el callo, y la partícula empleada fue M10. Se transformaron veinte callos de fríjol y cinco fueron utilizados como testigos. Se incubaron una semana y posteriormente las células se suspendieron

en matraces de 125 ml con un volumen de 30 ml de medio líquido de SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta durante dos semanas.

Para el subcultivo de las células en suspensión, fue necesario vaciar en un vaso de precipitado (1 L) estéril tres de los matraces con las células utilizando una coladera para retener grumos de callos y con un agitador se trata de colar todo. Una probeta estéril con 40 ml de SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta se le agrega a la masa celular que aun queda en la coladera para filtrar lo más posible. Se vacían 10 matraces en total en el vaso de precipitado (1 L) esteril y se le agrega 150 ml de medio liquido de SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta. Nuevamente se repite lo mismo hasta terminar con todos los matraces. Posteriormente se agrega 40 ml de células en suspensión en matraces estériles y se incubaron a 100 r.p.m. con 16 h luz/ 8 h oscuridad a 24°C. Cada 2 semanas se realizan los subcultivos y se observó la sobrevivencia de las células transformadas y las no transformadas (control).

Dos meses después se realizó la expresión transitoria de β-glucuronidasa (X-gluc) seleccionando al azar 3 matraces con células transformadas y un matraz con células no transformadas (control). Se vació cada matraz en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron 6 000 rpm/ 5 minutos. Se decantaron los tubos y a cada pellet se le agregó 5 ml de X-Gluc, se resuspendió y se agitó para que todas las células interaccionaran con la solución. Se dejó en incubación a 32°C en oscuridad durante una semana.

#### **3.3.4 Cinética de crecimiento con Kanamicina en peso fresco**

Los callos elegidos fueron transformados con el gen *nptII* (resistencia a Kanamicina) y el gen *gus* (β-glucuronidasa) presentes en el plásmido pBI-121, para reafirmar que las condiciones utilizadas en la transformación con Basta son óptimas (pero además se agregaron cambios).

En la cinética de crecimiento se utilizó callo del explante de tallo del fríjol Jamapa y medio SH con Kanamicina (es un antibiótico).

Kanamicina se preparó haciendo una solución stock (C1V1= C2V2) con la cantidad deseada y H<sub>2</sub>O, que se esterilizó por filtración con membrana milipore 0.22 cm.

Se realizaron 5 tratamientos iniciándose con 0, 25, 50, 75 y 100 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina, con 13 repeticiones, con un peso de 0.5 g de callo.

El callo se pesó cada 2 días durante 4 semanas.

### **3.3.5 Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes *nptII* y *gus*)**

A 48 cajas petri (60 X 15 mm), con medio SH se le agregó 20 ml de medio a cada uno, se gelificó con 3 gL<sup>-1</sup> de Gellan<sup>MR</sup> (Research Organic)/L. 10 cajas se destinaron para testigos.

Se subcultivó callo de frijol provenientes de tallo. La superficie ocupada en el medio por las células fue aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> del centro, con 3 mm de espesor. La preparación de las partículas de tungsteno, de acuerdo al Protocolo de Basta (ver inciso 3.3.2). Se manejó las mismas condiciones, excepto la distancia, en este caso fueron 2: de 7.5 cm y de 12 cm entre el filtro y el callo, 10 cajas con callo en medio SH fueron utilizados como testigos.

Las cajas Petri de los callos transformados fueron incubadas a 24<sup>0</sup>C, 16 h luz/8 h oscuridad, durante 24 h.

### **3.3.6 Pruebas de expresión transitoria del gene *gus* y resistencia a Kanamicina de callos transformados**

Pasado el tiempo de incubación se seleccionan al azar algunos callos para medir la expresión transitoria del gen *gus* siguiendo el mismo protocolo utilizado en la transformación con Basta. Las cajas Petri fueron selladas con klenn- pack® y se almacenaron a 4<sup>0</sup>C. Se tomaron fotos de los callos que mostraron la expresión transitoria.

Los callos restantes fueron colocados en medio de selección SH + 125 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina para la selección de las células transformadas durante 4 semanas, se realizaron subcultivos de los callos resistentes a Kanamicina.

### 3.3.7 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación.

Para este proceso se realizó lo siguiente:

- Se hizo crecer la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* en medio YM (ver concentraciones en anexo) con los antibióticos correspondientes en un tubo de 5 ml aproximadamente durante 24 h. *Agrobacterium* presenta el vector pBin19, con la construcción 3X35S-*hxt2*- NOS (fig. 3.3.7.1) con resistencia a Kanamicina.

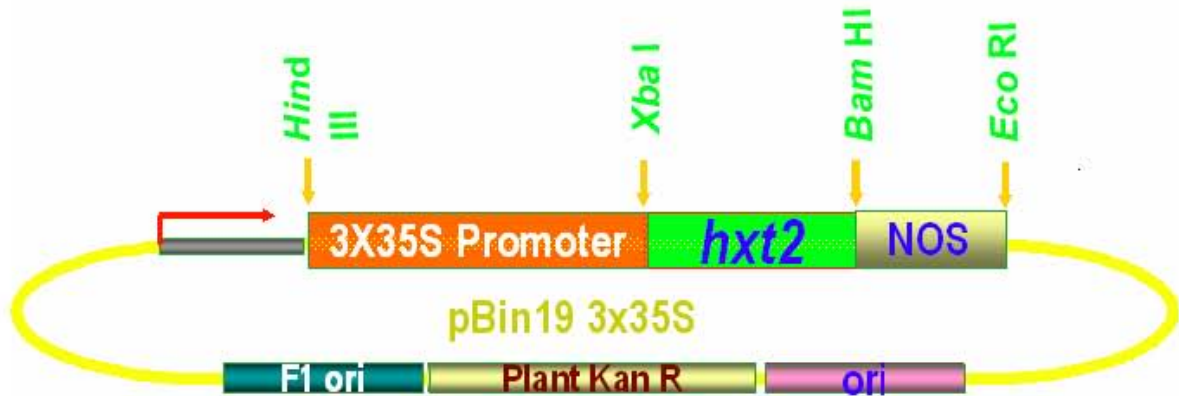


Fig. 3.3.7.1 Diagrama del plasmido pBin19 3x35S hxt-NOS.

- Al día siguiente se hizo crecer en matrás el pre-inóculo (los 5 ml) en 45 ml de YM con los antibióticos correspondientes para llevar a un volumen final de 50 ml. Se dejó en crecimiento toda la noche. Ese mismo día también se preparó medio de inducción de brotes (ver concentraciones en anexo) para cultivar los explantes transformados con *A. tumefaciens*, esterilizado durante 18 min. Posteriormente se le agregó  $500 \text{ mgL}^{-1}$  de Xefotaxime (antibiótico para eliminar el exceso de *A. tumefaciens*) y  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de Kanamicina antes de enfriarse o se gelificara, en condiciones estériles. Finalmente se agregó en cajas petri (100 X 15 mm), con 30 ml de medio en cada una.
- Por la mañana siguiente se cuantificó la absorbancia (D.O.) a 600 nm del medio de cultivo, que debió estar entre 0.5- 0.7.
- Posteriormente se agregó acetociringona, (10mM en DMSO al 100%) con 500  $\mu\text{l}$  por cada 50 ml de *A. tumefaciens*.
- Se agitó de 3 a 4 h hasta alcanzar la absorbancia (D.O.) entre 0.5- 0.7
- Se centrifugó a 8 000 r.p.m. durante 10 min.

- Se decantó y se resuspendió la pastilla suavemente en 50 ml de 0.2% de MS. (MS; Sales MS, 400 ml tiamina (1mg/ml), Mio-Inositol 100 mg, 20 g de sacarosa, ajustando el pH 5.8, por cada litro). Se agregó en un vaso de precipitado de 250 ml, es el medio de co-cultivo.

### **3.3.7 El co-cultivo con *Agrobacterium* (infección) para la transformación del frijol**

Para la transformación se realizó los pasos (todo en condiciones estériles):

1. Se cortaron los explantes: hoja, tallo y cotiledón.
2. Cada explante fue pinchado en varias partes (para estimular mas adelante a *A. tumefaciens* a la infección y transfiera el plásmido que porta a las células vegetales). Estos explantes fueron colocados en H<sub>2</sub>O.
3. A continuación fueron colocados los explantes en el medio de co-cultivo para la infección que presenta *A. tumefaciens*. Se dejó 30 minutos en el medio.
4. Posteriormente en papel esterilizado (en autoclave), se fue colocando cada explante por 30 s para quitar el medio que pudiera portar.
5. Finalmente los explantes fueron colocados en cajas Petri con medio de inducción de brotes. En caso de las hojas la mitad de los explantes fueron colocados con el envés hacia arriba. Se dejó en oscuridad a 20°C durante 2 días. Posteriormente se dejó a 16 h luz/ 8 h oscuridad a 24 ± 2°C.

### **3.3.8 Prueba de resistencia a Kanamicina de explantes transformados.**

Después de una semana, los explantes se subcultivaron en medio MS (sin hormonas) con 100 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina y 500 mgL<sup>-1</sup> de Cefotaxime. Se realizaron 2 subcultivos posteriores, al 3er subcultivo solo se utilizó 100 mgL<sup>-1</sup> Kanamicina, sin cefotaxime en el medio para disminuir la estrés a la que estaban sometidos ante dos antibioticos.

## IV RESULTADOS

### 4.1 ETAPA 1: Establecimiento de cultivos de callos de tres diferentes explantes de frijol Negro Jamapa en tres distintos medios de cultivo

#### 1.1.1 Esterilización y germinación de la semilla

El protocolo utilizado (anexo Tabla 1) para la esterilización fue eficiente ya que no se encontró contaminación durante la germinación, obteniéndose que el porcentaje de germinación de todas las semillas fue de 65 %. Dos días después de sembrar comenzaron a germinar las semillas y a las tres semanas la mayoría había alcanzado un buen desarrollo entre 15 y 20 cm (Fig. 4.1).



Fig. 4.1 Imagen del frijol a una semana de la siembra de la semilla *in vitro*.

### 1.1.2 Inducción de callos probando tres distintos medios y diferentes explantes

La inducción de callo se inició con la variedad Jamapa probando tres diferentes medios de cultivos: SH, M<sub>1</sub> y N<sub>6</sub>p; así como tres explantes distintos: hoja, tallo y raíz (Fig. 4.2).

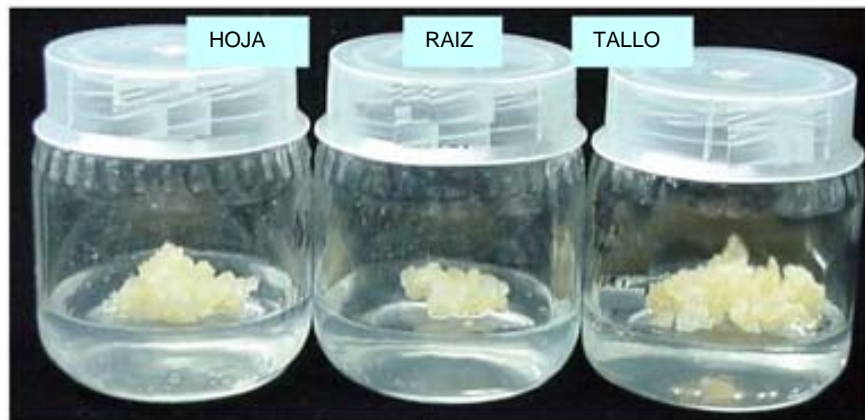
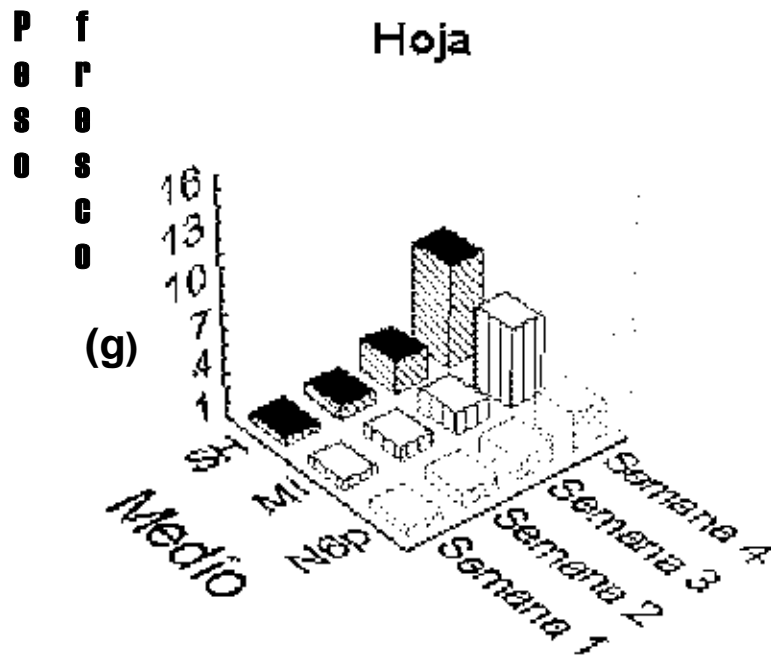


Fig. 4.2 Callos de explantes de frijol Jamapa

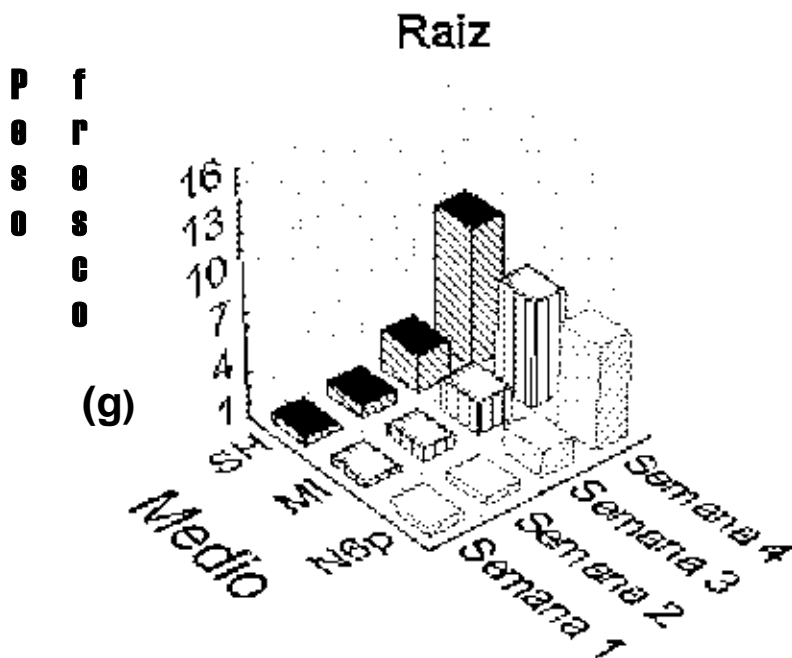
Los resultados obtenidos se compararon entre medios y luego entre explantes, registrando los pesos frescos de cada explante y de cada medio, en forma semanal. Primero fueron graficados comparando la inducción de callo por cada explante en los tres medios.

En la gráfica 4.1 se presenta los pesos frescos durante la inducción de callo a partir de hoja en los tres distintos medios. El peso inicial para cada explante y medio fue de 0.5 g de callo por repetición. El aumento en el peso fresco es mayor en el medio SH en comparación de los otros medios, alcanzando 7 g a la cuarta semana. El medio M<sub>1</sub> indujo callo, sólo que en menor proporción, esto es, en la cuarta semana se registró un peso de 5 g; mientras que en el medio N<sub>6</sub>p indujo menos callo en explante de hoja durante las cuatro semanas, con 2 g al finalizar el experimento.



Gráfica 4.1 Peso fresco de callo de hoja en medios SH, M<sub>1</sub> y N6p

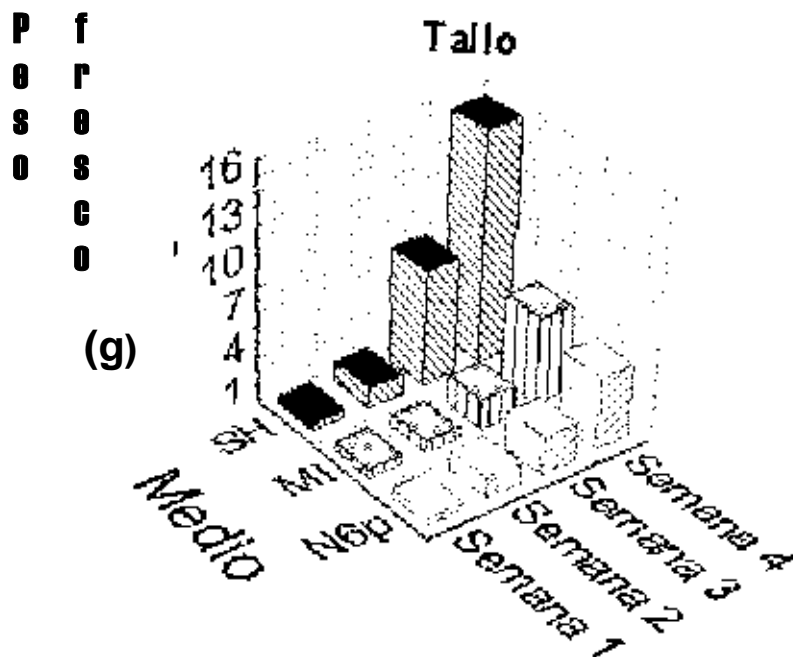
En la gráfica 4.2 se muestran los pesos frescos durante la inducción de callo a partir de raíz en los tres distintos medios, se observa que el aumento en el peso fresco es mayor en el medio SH en comparación de los otros medios, alcanzando 9 g a la cuarta semana, mientras que los medios M<sub>1</sub> y N6p indujeron menor cantidad de callo en explante de raíz durante las cuatro semanas, con 6 g respectivamente.



Gráfica 4.2 Peso fresco de callo de raíz en medios SH, M<sub>1</sub> y N6p



En la gráfica 4.3 se indican los pesos frescos a partir de la inducción de callo de tallo en cada medio, viéndose un mayor aumento en el peso fresco de células en el medio SH comparado con los otros medios, a las dos semanas hubo un incremento notable, a la cuarta semana se cuantificó 15.5 g. En el medio M<sub>I</sub> se alcanzó 5 g en semana cuatro y por otra parte, el medio N6p indujo menor callo con 4 g en el mismo periodo.



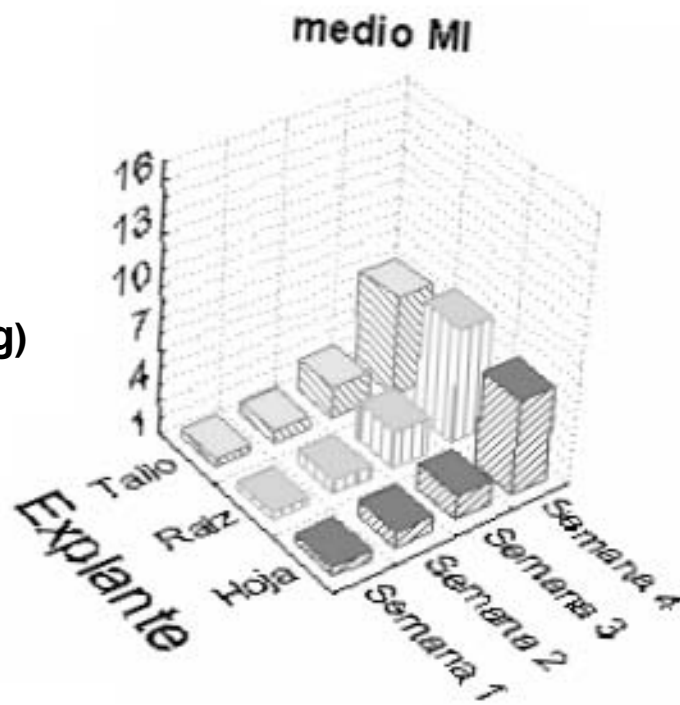
Gráfica 4.3 Peso fresco de callo de tallo en medios SH, M<sub>I</sub> y N6p

Al realizar el análisis por medio, se obtuvieron las graficas 4.4, 4.5 y 4.6 con los siguientes resultados.

En la gráfica 4.4 se indican los pesos frescos en el medio M<sub>I</sub> a partir de la inducción de callo provenientes de tres distintos explantes. Se observa que se obtuvo mayor aumento de callo del explante de raíz con 6.5 g en la cuarta semana del explante de tallo se obtuvo 5.5 g y menor inducción con el explante de hoja, alcanzando 5 g en el mismo tiempo.

**P  
e  
s  
o  
f  
r  
e  
s  
c  
o**

**(g)**

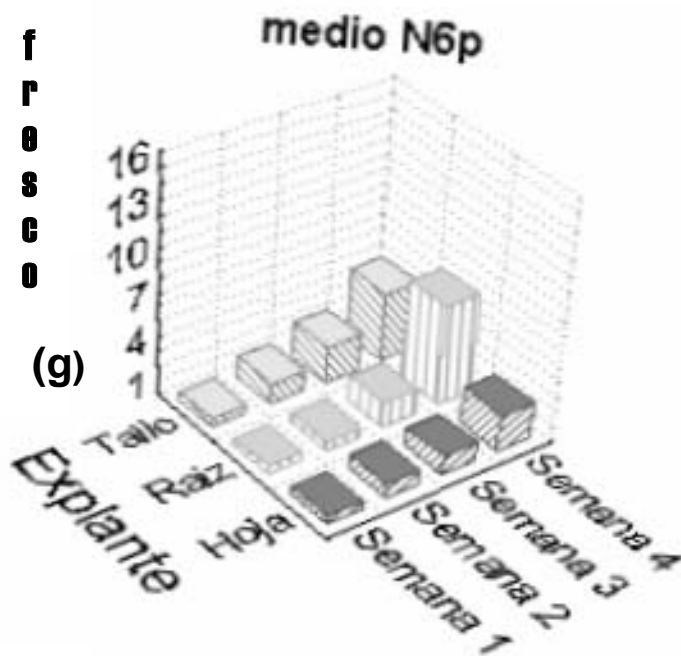


Gráfica 4.4 Peso fresco de callo en medio M<sub>1</sub> con explantes tallo, raíz y hoja

La gráfica 4.5 muestra los pesos frescos de callos inducidos en el medio N6p provenientes de los tres distintos explantes. Se observa mayor aumento de peso fresco de callo del explante de raíz con 6.5 g en la semana cuatro, le sigue el explante de tallo con 4 g y posteriormente el explante de hoja con 2 g en el mismo periodo.

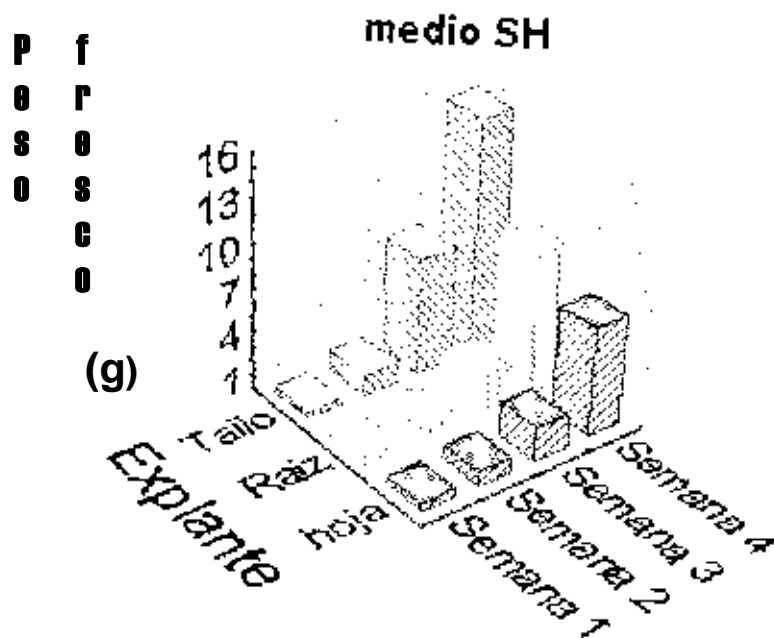
**P  
e  
s  
o  
f  
r  
e  
s  
c  
o**

**(g)**



Gráfica 4.5 Peso fresco de callo en medio N6p con explantes tallo, raíz y hoja

Por ultimo, en la gráfica 4.6 se presentan los pesos frescos en el medio SH a partir de la inducción de callo provenientes de tres distintos explantes. La producción de callo en este medio fue mayor a partir de tallo obteniéndose 15.5 g en la cuarta semana; con el explante de raíz se cuantificó 8 g, mientras que la producción de callo a partir de hoja que apenas alcanza 7 g en el mismo periodo.



Gráfica 4.6 Peso fresco de callo en medio SH con explantes tallo, raíz y hoja

Finalmente, se observó que el explante que más callo indujo fue el tallo en el medio SH.

## 4.2 ETAPA 2 Validación del protocolo de inducción de callo con las variedades Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero

### 4.2.1 Cinética de crecimiento de tres variedades de frijol

Ya elegido el explante y el medio de cultivo, se procedió a probar tres variedades de frijol: Jamapa, Ejotero y Mar 1; y con ello, identificar los posibles efectos de cada variedad para producir callo.

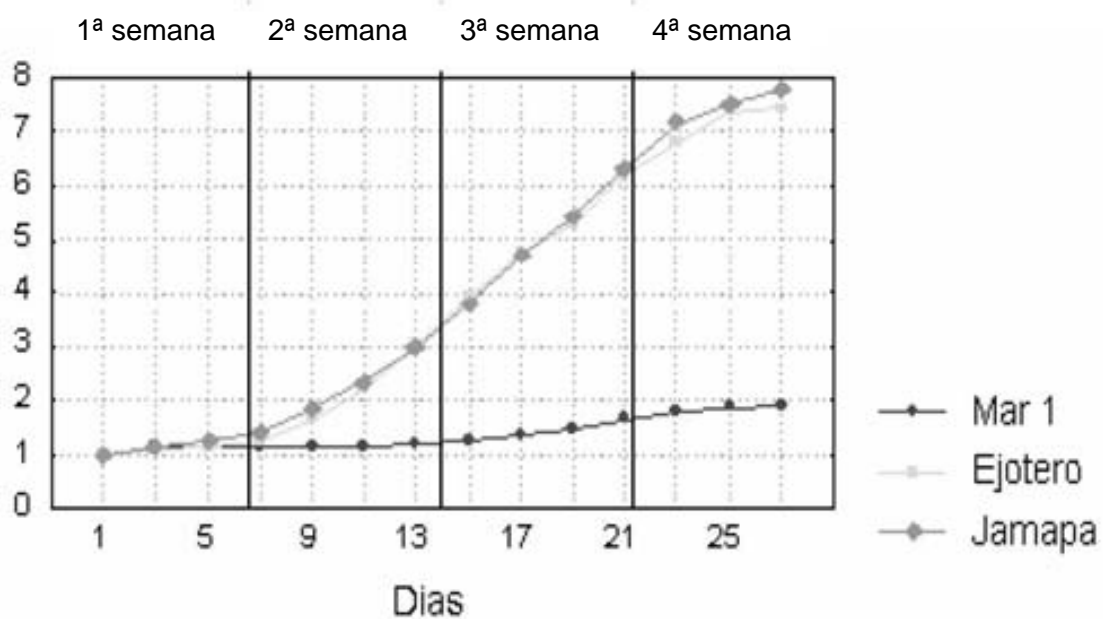
En la gráfica 4.7 se presentan las curvas de crecimiento del peso fresco de células de callo de frijol provenientes de tres variedades: Jamapa, Ejotero y Mar 1. Se utilizó callo

obtenido de tallo iniciando los cultivos con 1 g; el peso se registró cada cuatro días durante cuatro semanas.

En la gráfica se puede observar que a partir del día 7 de cultivo, los callos de las variedades Ejotero y Jamapa inician la etapa logarítmica, mientras que la variedad Mar 1 aumenta muy discretamente el peso a partir del día 15.

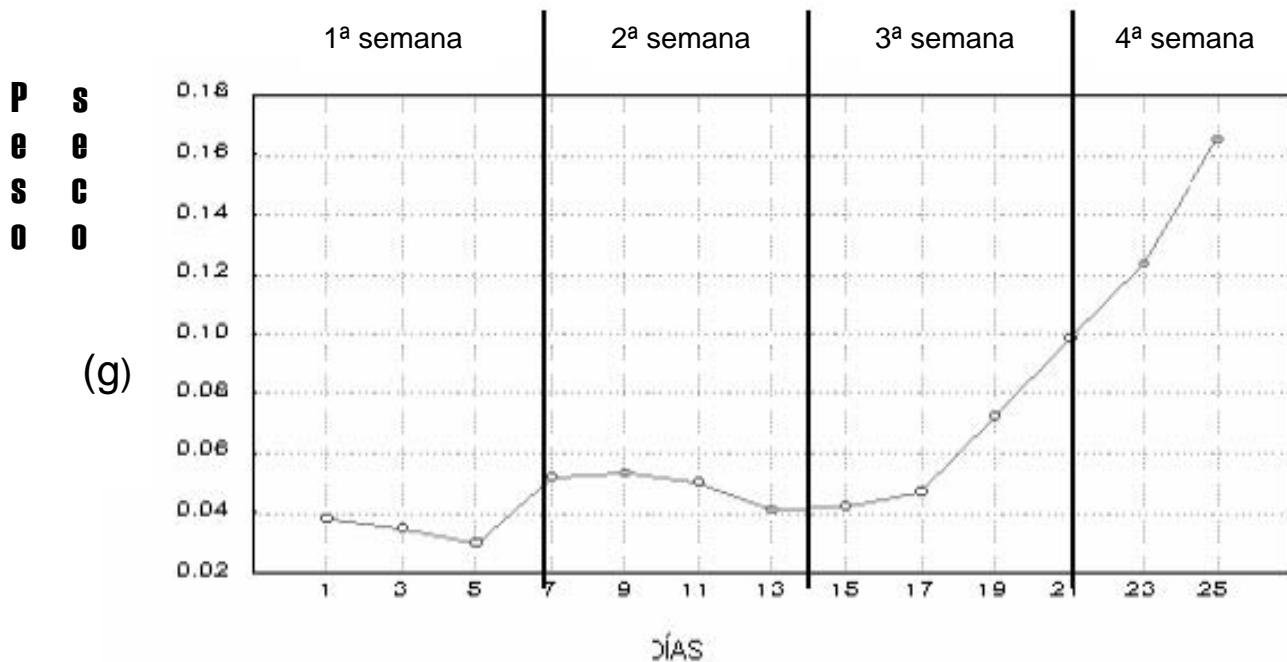
Las variedades Ejotero y Jamapa mantienen la etapa logarítmica hasta el día 25, logrando obtenerse 7.5 g de callo para la variedad Jamapa y 7 g para Ejotero, mientras que la variedad Mar 1 apenas se pudo duplicar el peso en el lapso de cuatro semanas

**P  
f  
e  
s  
e  
c  
o**  
(g)



Gráfica 4.7 Curva comparativa de crecimiento de peso fresco de células callo de frijol Jamapa, Ejotero y Mar 1.

En cuanto al peso seco, también se realizó la curva de crecimiento de callo de frijol sólo de la variedad Jamapa y con el explante de tallo. Se inició con un peso inicial de 1 g, durante cuatro semanas. Se observó en la gráfica 4.8 (Curva ajustada) que en la primera semana hubo una disminución de la masa celular, en la segunda semana se registró un ligero aumento, pero se cuantificó un mayor crecimiento en la 3a y 4a semana.



Gráfica 4.8 Curva de crecimiento de peso seco de células de callo de frijol Jamapa.

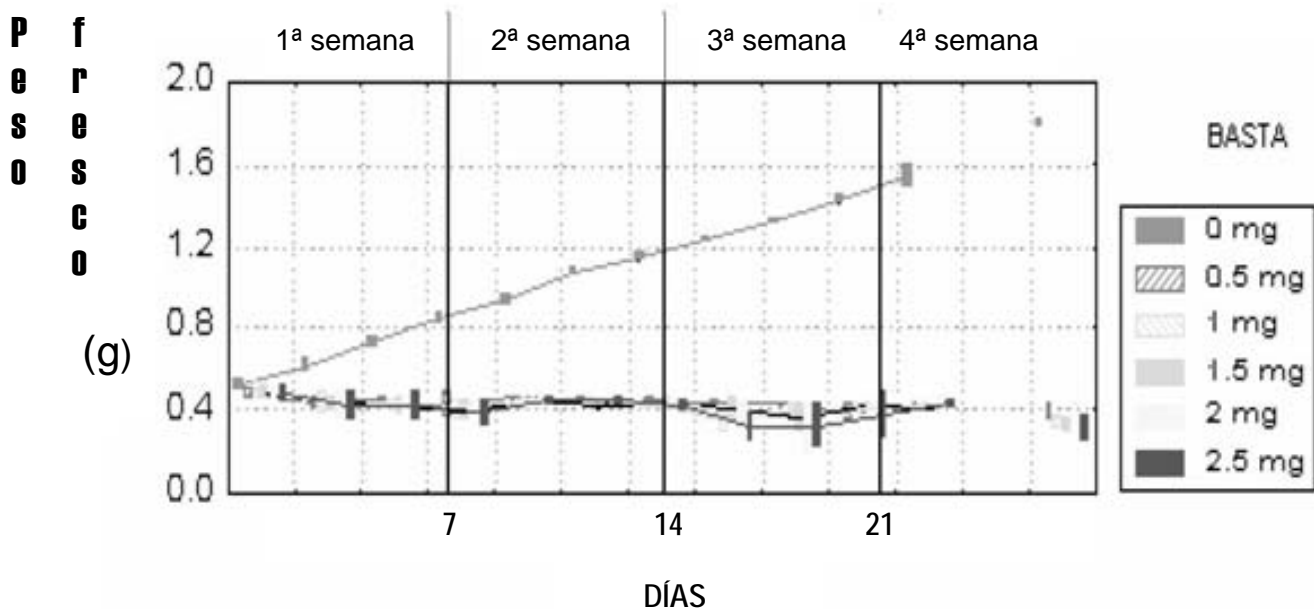
Los resultados demuestran que el callo del frijol Jamapa a partir de explante de tallo sembrado en medio SH, es óptimo y además se obtiene indicios que a partir de la segunda semana (aproximadamente el día 8) los callos entran a su fase logarítmica de crecimiento.

### ETAPA 3 Transformación genética de callos y obtención de líneas celulares transformados de Negro Jamapa

#### 4.3.1 Cinética de crecimiento con Basta en peso fresco

Con el objetivo de determinar la concentración de Basta para seleccionar callo y su transformación, se cultivaron callos en cinco concentraciones diferentes. Se registró el peso fresco del callo de frijol Jamapa obtenido en el medio SH durante cuatro semanas.

Los datos se muestran en la gráfica 4.9 con la curva comparativa de crecimiento de peso fresco. Al igual que los otros ensayos se inicio con 0.5 g por repetición.



Gráfica 4.9 Curva comparativa de crecimiento de peso de fresco del frijol Jamapa con/sin Basta.

En la gráfica se observa que el crecimiento de la masa celular de callo de frijol en medio SH sin Basta creció rápidamente, mientras que los callos tratados con distintas concentraciones de Basta no mostraron crecimiento.

Dado que se hace difícil observar diferencias entre las cuatro concentraciones de Basta, se procedió a presentar los resultados en el cuadro 4.1 en donde se observa que los tratamientos sin Basta en callo de frijol presentaron crecimiento a partir de la primera semana (amarillo). Por otro lado, los callos tratados con Basta fueron sensibles a cualquier concentración del herbicida, se dio un mínimo aumento al tercer día (azul), posterior a ello se perdió peso en cualquier tratamiento por muerte celular (verde) a la cuarta semana, demostrándose que la presencia de Basta, aun en concentraciones bajas, es toxico para el callo de frijol.

Tratamientos: mg de Basta/L	Días												
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25
0	0.5	0.52	0.54	0.6	0.71	0.82	0.89	0.97	1.02	1.06	1.09	1.13	1.6
0.5	0.5	0.51	0.48	0.47	0.46	0.45	0.44	0.44	0.43	0.43	0.42	0.42	0.39
1	0.5	0.53	0.5	0.47	0.45	0.44	0.44	0.44	0.41	0.4	0.39	0.38	0.37
1.5	0.5	0.51	0.48	0.46	0.45	0.44	0.43	0.42	0.42	0.41	0.4	0.39	0.35
2	0.5	0.51	0.48	0.46	0.45	0.44	0.44	0.44	0.43	0.41	0.4	0.39	0.35
2.5	0.5	0.5	0.48	0.46	0.45	0.44	0.44	0.43	0.41	0.39	0.37	0.35	0.27

Cuadro 4.1 Peso fresco de callo de frijol con diferentes concentraciones de Basta en medio SH.

#### 4.3.2 Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes *bar* y *gus*)

Se bombardearon un total de 48 callos provenientes de tallo de frijol Jamapa y cultivados en medio SH una semana después de su cultivo, al entrar en su fase logarítmica (alta actividad mitótica), de los cuales, 10 cajas con callo fueron utilizados como testigos al ser bombardeados con partículas sin material genético. La mitad de callos bombardeados fueron realizados con balas M 5 y la otra mitad con balas M 10, a una distancia de 7.5 cm.

A las 24 h después del bombardeo con tres callos seleccionados al azar, tomando en cuenta también al callo control se realizó la expresión transitoria, a cada caja se le agregó 1 ml de X-Gluc (a una concentración de  $1 \text{ gL}^{-1}$ ).

Una semana después de agregar X-Gluc en los callos, se obtuvieron los siguientes resultados.

La imagen (Fig. 4.3) corresponde a los callos bombardeados con partículas M 5 y a una distancia de 7.5 cm. Las 3 cajas Petri superiores (a) corresponden a los bombardeados con el vector que presenta al gen *gus* en donde se observa una coloración azul. El callo control no mostró la tinción (b).

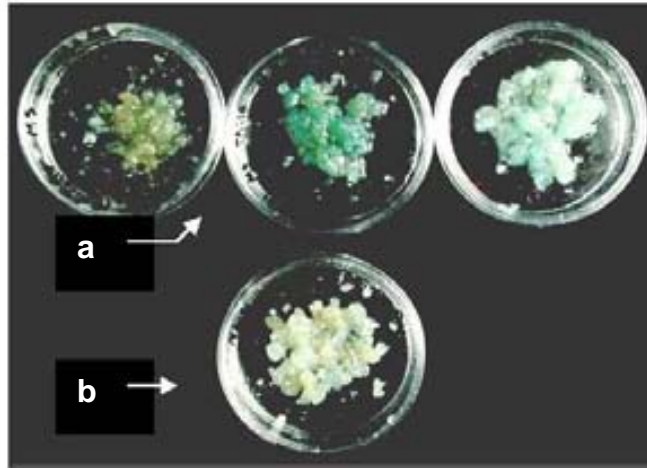


Fig. 4.3 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa:  
(a) callos transformados, (b) callo control.

La siguiente imagen (Fig. 4.4) corresponde a los callos bombardeados con partículas M10. La distancia utilizada fue de 7.5 cm. En esta figura (a) se muestran las cajas Petri de la parte superior que corresponde a los callos bombardeados, los cuales presentan una coloración azul. En la figura (b) se muestra el callo control.

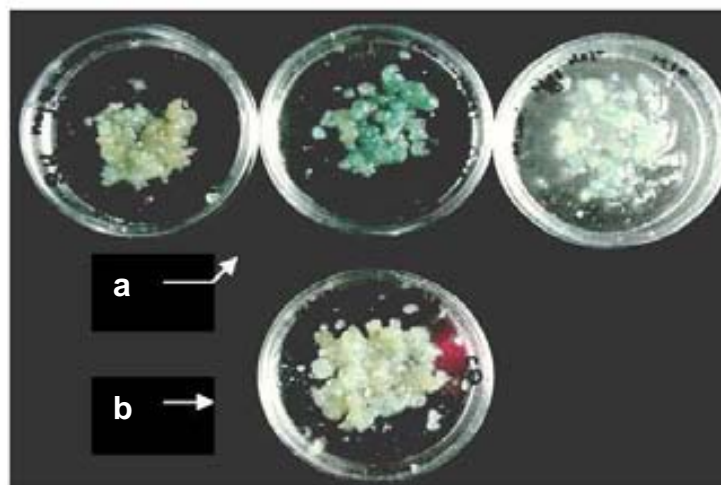


Fig. 4.4 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa:  
(a) callos transformados, (b) callo control



Los callos bombardeados se sometieron a selección subcultivos en medio SH con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Basta, y los callos transformados presentaron resistencia a este pesticida, esto se puede observar en la figura 4.5 que corresponde a los callos incubados durante cuatro semanas de selección.



Fig. 4.5 Resistencia a basta.

En la figura se observa que los callos bombardeados con el gene de resistencia a Basta crecieron sin presentar oxidación, mientras que los callos control se fueron oxidando conforme se mantenían en selección hasta llegar a la muerte celular.

Los siguientes subcultivos fueron con medio SH, pero ahora con  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de Basta.

Al realizarse el cuarto subcultivo (4 meses después del bombardeo) de los callos transformados, siguieron creciendo (Fig. 4.6).



Fig. 4.6 4º subcultivo con callo transformado resistente a Basta.

Al octavo subcultivo (Fig. 4.7), esto es, 7 meses después del bombardeo, los callos sobrevivientes fueron los transformados, los cuales crecieron en medio SH con  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de Basta.

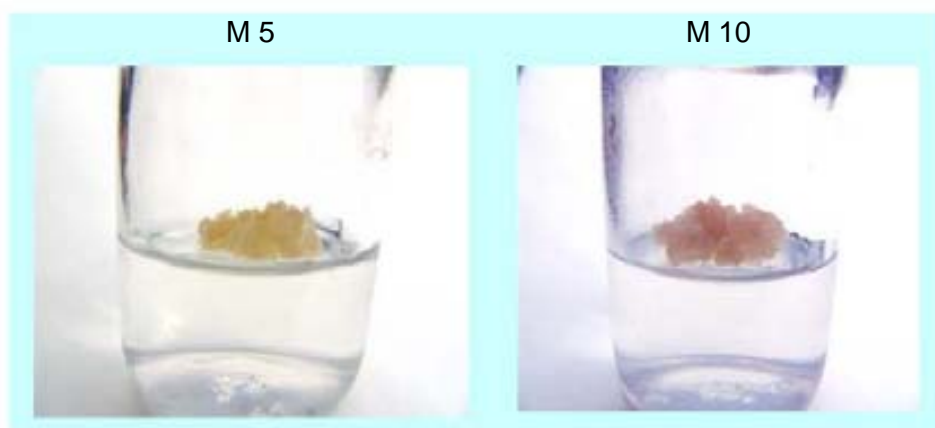


Fig. 4.7 8º subcultivo con callo transformado resistente a Basta.

Como se muestran en las imágenes, la resistencia a Basta perduró hasta la octavo subcultivo, más de medio año (7 meses), indicando que si existió transformación en el callo de frijol Jamapa, utilizando la distancia de 7.5 cm y con partículas de tungsteno M5, tanto como M10 en el bombardeo.

#### 4.3.3 Prueba de resistencia a Basta y selección de callos de frijol Jamapa transformados en medio líquido

La transformación se realizó a una distancia de 7.5 cm y las partículas de tungsteno empleadas fueron M 10. Se transformaron veinte callos de explantes de tallo de frijol y cinco fueron utilizados como testigos. Se incubaron una semana cultivados en medio

SH gelificado y se les aplicó la prueba de expresión transitoria a tres callos seleccionados al azar, tomando en cuenta también al callo control, a cada caja se le agregó 1 ml de X-Gluc (a una concentración de  $1 \text{ gL}^{-1}$ ). Los callos restantes se suspendieron en matraces de 125 ml con un volumen de 30 ml de medio líquido de SH +  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Basta durante dos semanas.

En la imagen de la figura 4.8 se muestra los resultados de la prueba de expresión transitoria en las cajas Petri de la parte superior (a), los callos mostraron la tinción debido a que recibieron el gene *gus* por medio del bombardeo, en la misma imagen, abajo se ubica el callo control sin tinción (b).

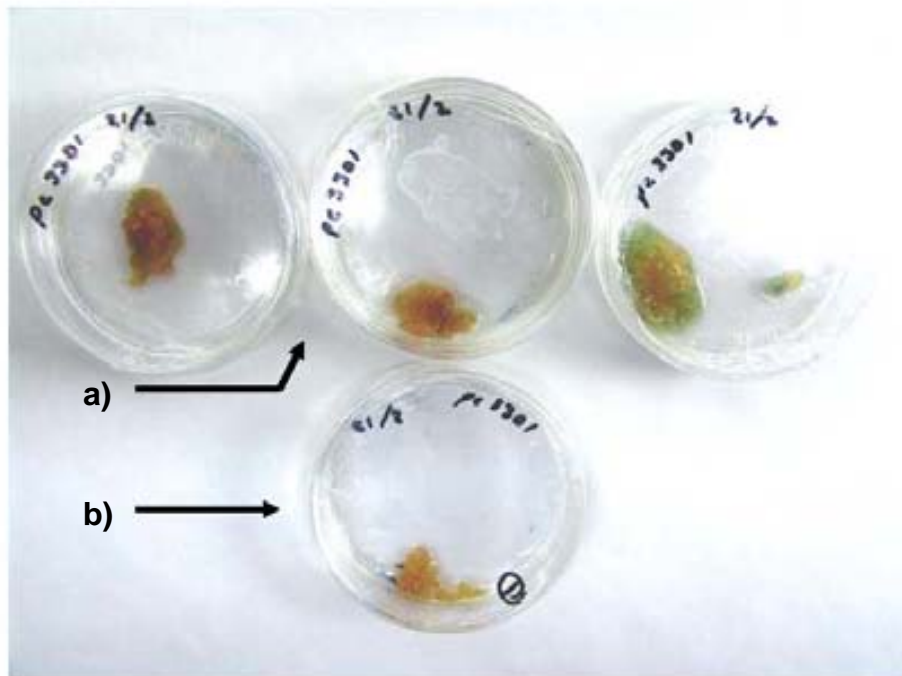


Fig. 4.8 Expresión transitoria X Gluc de callos transformados (a).  
Callo control (b).

Las células transformadas que quedaron en suspensión fueron subcultivados cada dos semanas en matraces de 125 ml con un volumen de 30 ml de medio líquido de SH +  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Basta.

Dos meses después de la transformación, se seleccionaron al azar 3 matraces con células transformadas y un matraz con células no transformadas (control). Se vació cada matraz en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron  $6\ 000 \text{ rpm}/5 \text{ min}$ . Se decantaron

los tubos y a cada pellet se le agregó 5 ml de X-Gluc, se resuspendió y se mantuvieron en agitación en una semana.

En la figura 4.9 se muestra a células transformadas (a) y de control negativo (b) en medio líquido SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta en tubos Falcon.

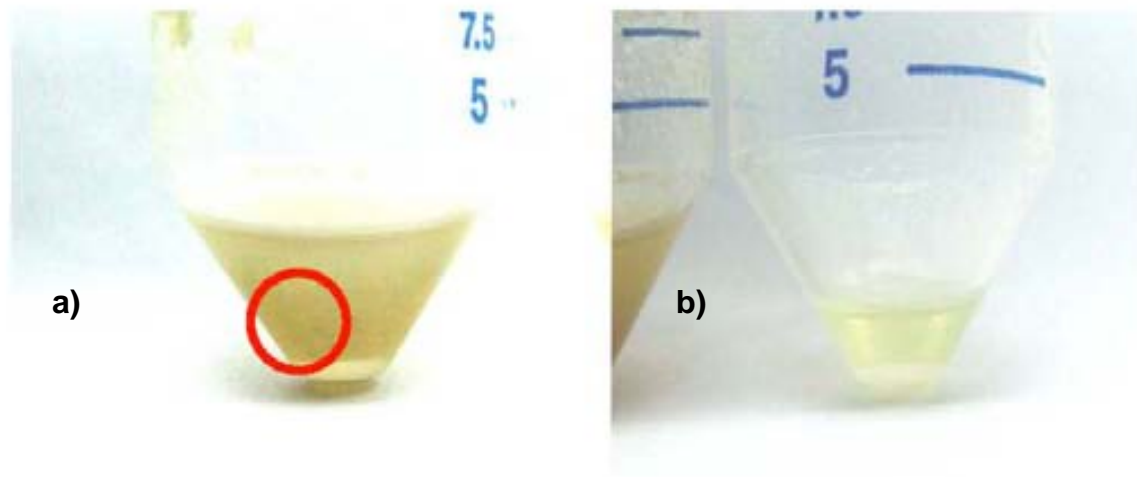


Figura 4.9 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa de células en suspensión (a), marcados con círculo rojo. Células control (b).

En la expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa se observaron en algunas agregaciones celulares con tinción azul, aunque la imagen no muestra con claridad este hecho, mientras que el medio de control negativo no mostraron agregados celulares debido a la alta muerte celular.

En la figura 4.10 se hizo la comparación de células transformadas y de control negativo en suspensión en medio líquido SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta, dos meses después de su transformación.

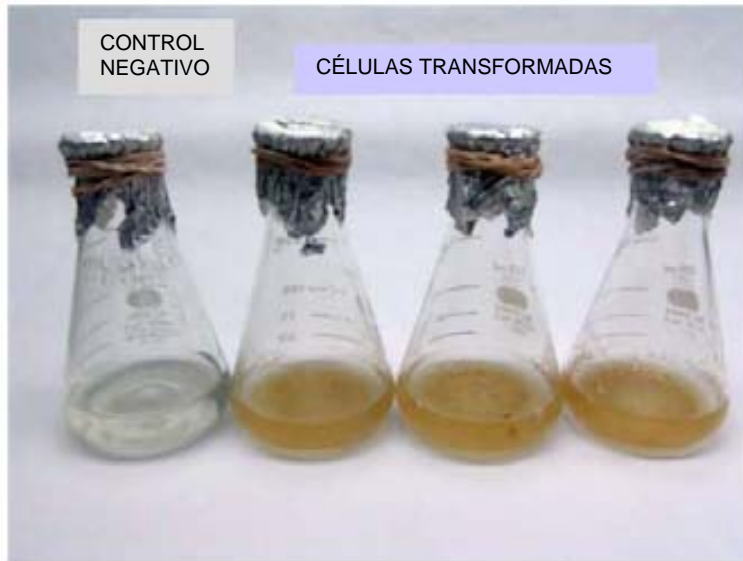


Fig. 4.10 Cultivos de células transformadas y sin transformar crecidas en presencia de Basta.

En este experimento se observó claramente mayor crecimiento de células de los tratamientos transformadas que en células de control negativo, a simple vista sin crecimiento celular.

Finalmente se obtuvieron imágenes de células transformadas vistas desde el microscopio a 40X y a 100X de células transformadas y de control. Las fotografías fueron tomadas a los tres meses después de la transformación.

En las figuras 4.11 (a) y (b) se distingue la expresión de la enzima de  $\beta$ -glucuronidasa en la tinción azul dentro de la célula, esto a 40X de aumento en el microscopio.

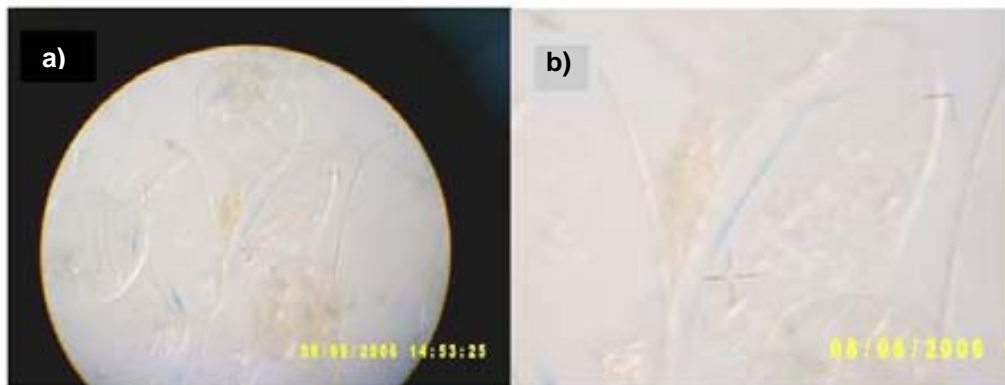


Fig. 4.11 (a) Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa dentro de las células (40X).  
(b) Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa dentro de una célula (40X).

En las figuras 4.12 (a) y (b) se observaron células con la expresión de la enzima glucuronidasa en la tinción azul dentro de la célula, a 100X de aumento en el microscopio.

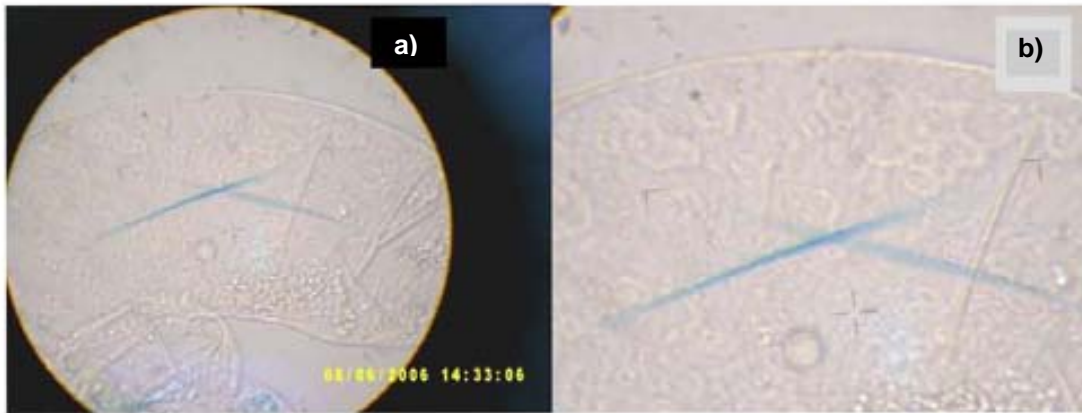


Fig. 4.12 a) Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa dentro de las células (100X).  
b) Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa dentro de las células (100X).

En las figuras 4.13 (a) se vieron las células de control sobrevivientes en medio líquido con Basta y en medio líquido sin Basta (b) a 40X. De menor tamaño se observa la célula de control con Basta y con mayor turgencia la célula en medio sin Basta.

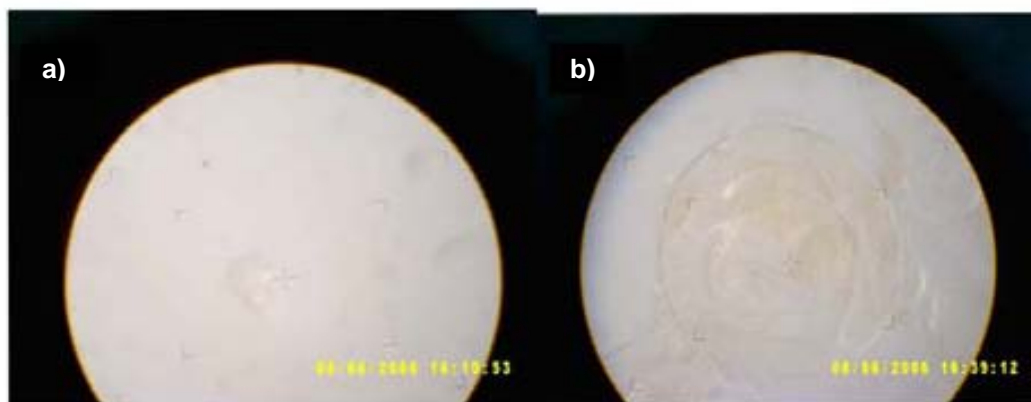


Fig. 4.12 Células control (40 X). Célula no transformada en medio líquido sin basta.

#### 4.3.4 Cinética de crecimiento con Kanamicina en peso fresco

En esta etapa se buscó encontrar la concentración mínima de Kanamicina, que produzca oxidación en el callo de fríjol como medida estándar para que posteriormente fuera utilizada la concentración durante la selección de callo transformado con genes resistentes a este antibiótico sin generar alta estrés.

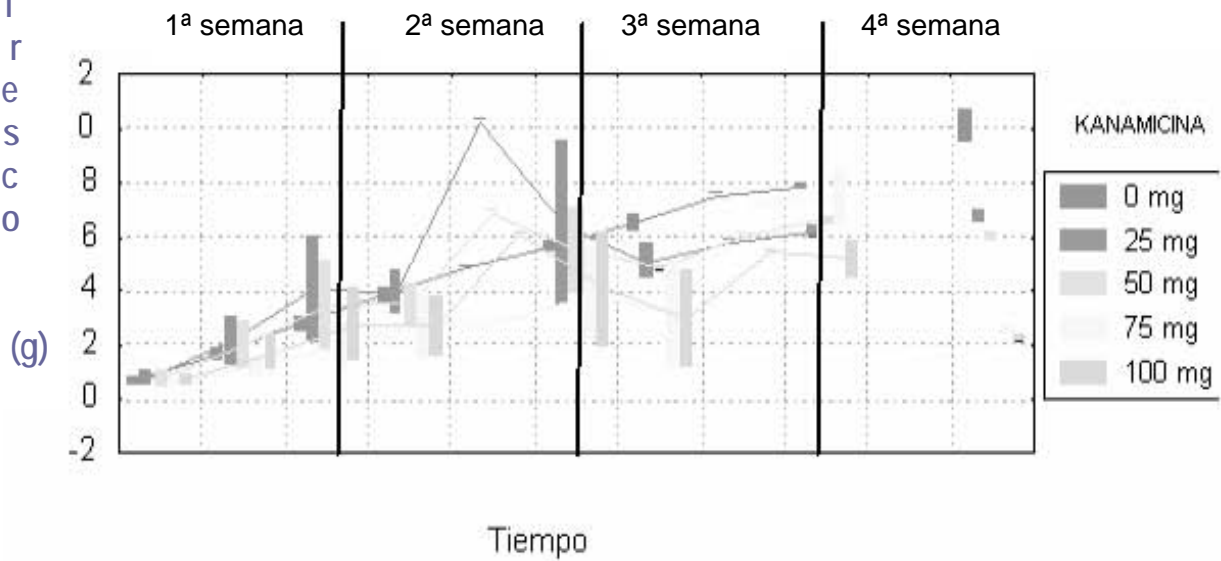
En el cuadro 4.2 se muestran los datos que se obtuvieron de la cinética de crecimiento de peso fresco de callo de frijol (tallo), cultivados con diferentes concentraciones de Kanamicina en medio SH, durante 4 semanas. Los tratamientos sin Kanamicina en callo de frijol presentaron crecimiento a partir de la primera semana (verde). Los callos tratados con Kanamicina (naranja) tuvieron menor crecimiento en comparación con el control.

Tratamientos: mg de Kanamicina/L	Días												
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25
0	0.5	0.6	0.7	0.9	1.3	1.7	2.2	3	4.4	5.1	5.7	6.9	8
25	0.5	0.6	0.7	1	1.5	1.9	2.4	3.3	4.7	5.4	6.3	7.2	7.6
50	0.5	0.6	0.7	1	1.4	1.7	2.1	3	4.3	4.9	5.6	6.2	6.8
75	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8	1.1	1.3	1.9	2.8	3.3	3.9	4.6	5.5
100	0.5	0.6	0.7	0.9	1.2	1.5	1.7	2.3	3.1	3.4	3.8	4.5	4.8

Cuadro 4.2 Peso fresco de callo de frijol con diferentes concentraciones de Kanamicina en medio SH.

Los datos anteriores ahora se muestran en la gráfica 4.10 comparando el crecimiento de peso fresco de células de callo de tallo de frijol Jamapa, en medio SH con distintas concentraciones de Kanamicina, todos los callos iniciaron con 0.5 g.

P  
e  
s  
o



Gráfica 4.10 Curva comparativa de crecimiento de peso de fresco del frijol Jamapa con/sin Kanamicina.

La gráfica muestra que se requirió de mayor concentración de Kanamicina para que las células comenzaran a sentir su efecto tóxico. Al final de la segunda semana sólo el callo control mantuvo su crecimiento, mientras que los callos cultivados a distintas concentraciones disminuyeron su velocidad de crecimiento. A la cuarta semana el callo control presentó 10 g, le sigue el callo cultivado en 25 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina con una masa de 7 g, mientras que el callo cultivado en 50 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina alcanzó 6 g, Los callos cultivados en 75 y 100 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina sólo alcanzaron 2 g.

#### 4.3.5 Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes *nptII* y *gus*)

En la transformación se compararon dos distintos tamaños de balas: M 5 y M 10, por otra parte también se valoraron dos diferentes distancias: 7.5 y 12 cm.

En total se bombardearon 48 callos provenientes de tallo de frijol Jamapa y cultivados en medio SH, una semana después de su cultivo. La expresión transitoria con X-Gluc se realizó a las 24 h después del bombardeo con callos seleccionados al azar, tomando en cuenta también al callo control.



Los callos bombardeados se originaron del tallo y cultivados en medio SH. La primera imagen (Fig. 4.13) corresponde a callos transformados con partículas M 5 y a una distancia de 7.5 cm. Las cajas Petri de las orillas (a) y (c) mostraron la tinción azul debido a que recibieron el gen *gus* por medio del bombardeo. La caja Petri con callo utilizado como control (b), que se encuentra en medio, no dio expresión transitoria a través de la tinción azul.

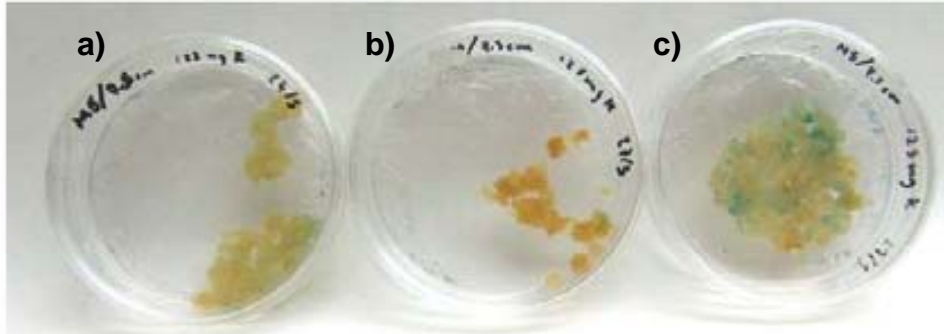


Fig. 4.13 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa en callos transformados (a) y (c), callo control (b). Bombardeados con partícula M5, distancia 7.5 cm.

En la figura 4.14 se observa a callos transformados, que fueron bombardeados con partículas M 10 y la distancia de 7.5 cm mostrando la expresión transitoria (a) y (c). El callo control no presenta la tinción azul (b).

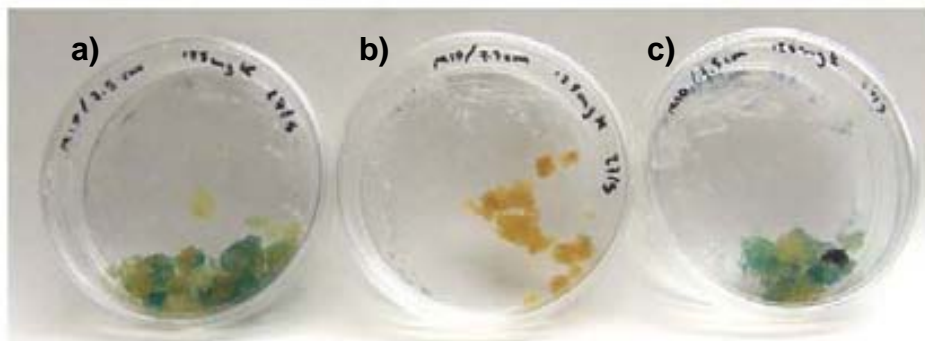


Fig. 4.14 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa en callos transformados (a) y (c), callo control (b). Bombardeados con partícula M10, distancia 7.5 cm.

En la siguiente imagen (Fig. 4.15) se muestra nuevamente la expresión transitoria de callos transformados (a) y (c) con partículas de M 5 y con distancia de 12 cm. En el callo control no se observa la coloración azul (b).

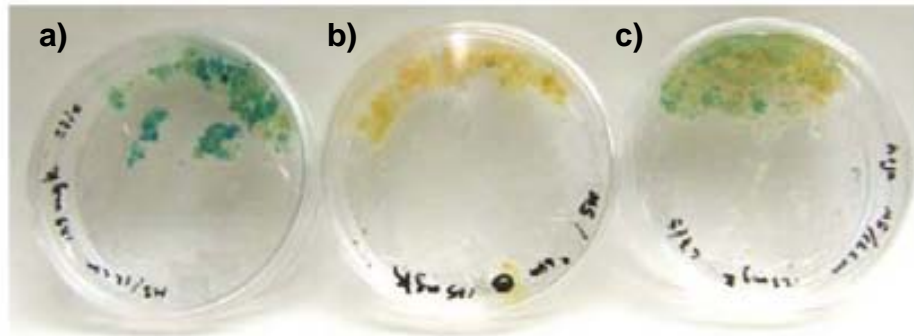


Fig. 4.15 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa en callos transformados (a) y (c), callo control (b). Bombardeados con partícula M5, distancia 12 cm.

En la figura 4.16 se observa nuevamente la expresión transitoria de callos transformados (a) y (c), la partícula utilizada en el bombardeo fue M 10 y la distancia de 12 cm. En este caso también el callo control no muestra tinción (b).

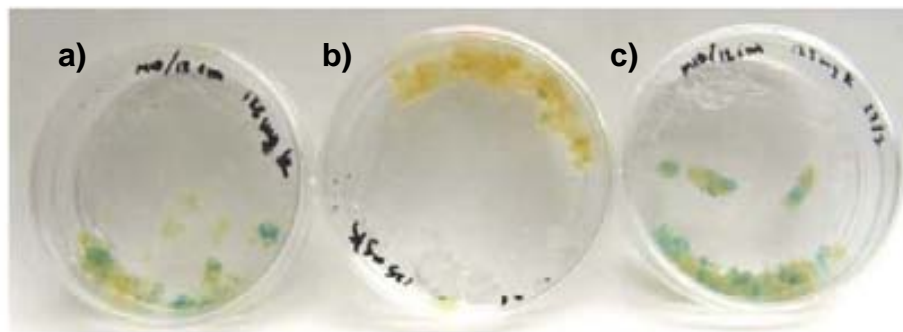


Fig. 4.16 Expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa en callos transformados (a) y (c), callo control (b). Bombardeados con partícula M10, distancia 12 cm.

La prueba de expresión transitoria fue positiva en general, lo cual indica que los callos fueron transformados utilizando partículas M 5 y M 10, así como las distancias de 7.5 y 12 cm.

Posteriormente con una concentración de  $125 \text{ mgL}^{-1}$  de Kanamicina, se realizó la prueba de resistencia de los callos transformados a este antibiótico, obteniéndose los siguientes resultados.

En la figura 4.17 se comparó al callo control (a) con menor masa celular y mayor oxidación, y el callo transformado con el gen de de resistencia a Kanamicina (b) que

mostró crecimiento. La partícula utilizada fue de M 5 y la distancia 7.5 cm. La fotografía fue tomada al tercer subcultivo (3 meses después del bombardeo).

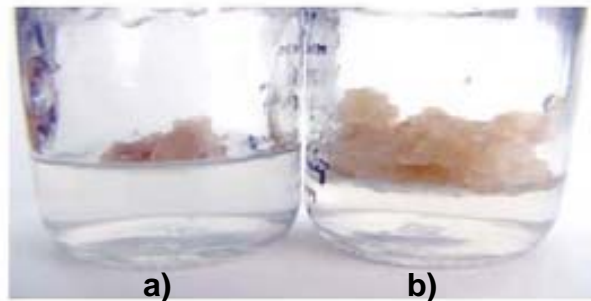


Fig. 4.17 Callo control (a) y callo transformado con resistencia a Kanamicina (b).  
Bombardeados con partícula M5, distancia 7.6 cm.

En la siguiente imagen (Fig. 4.18) se comparó callo control negativo, con el callo transformado con resistencia a Kanamicina. La partícula utilizada fue M 5 y la distancia ahora es de 12 cm. La fotografía fue tomada al tercer subcultivo (3 meses después del bombardeo). El callo de control con mayor oxidación (a). Nuevamente se observa mayor la sobrevivencia de las células en callos transformados (b).

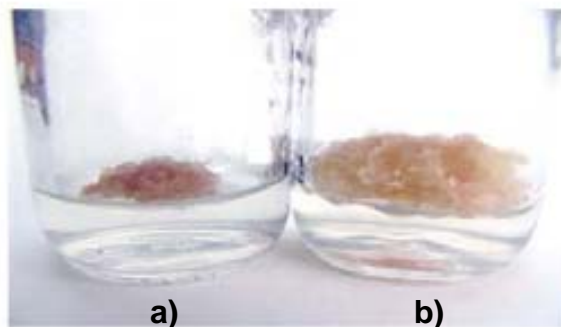


Fig. 4.18 Callo control (a) y callo transformado con resistencia a Kanamicina (b).  
Bombardeados con partícula M5, distancia 12 cm.

En la figura 4.19 que sigue, se comparó el callo control (a) contra el callo bombardeado con el gene de resistencia a Kanamicina (b) que presenta mayor crecimiento, la partícula utilizada fue M10 y la distancia 7.5 cm. La fotografía fue tomada al tercer subcultivo (3 meses después del bombardeo).

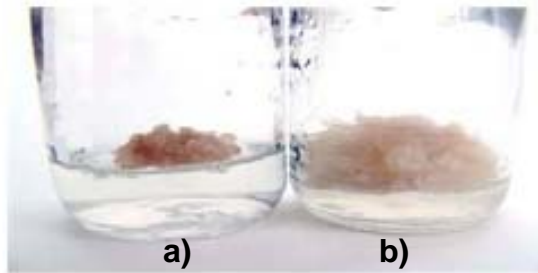


Fig. 4.19 Callo control (a) y callo transformado con resistencia a Kanamicina (b).  
Bombardeados con partícula M10, distancia 7.5 cm.

Las células transformadas continuaron presentando una mayor masa y sobrevivencia que el callo de control negativo que muestra mayor oxidación.

Finalmente en la imagen de la figura 4.20 se comparó el callo control negativo (a) y el callo bombardeado con el gen de resistencia a Kanamicina (b) que presentó menor oxidación a comparación del control, la partícula utilizada fue M 10 y la distancia 12 cm.

La fotografía fue tomada al tercer subcultivo (3 meses después del bombardeo).

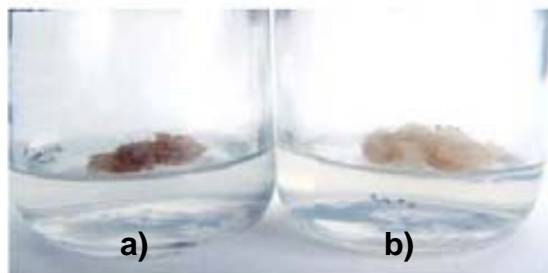


Fig. 4.20 Callo control (a) y callo transformado con resistencia a Kanamicina (b).  
Bombardeados con partícula M 10, distancia 12 cm.

Nuevamente ocurre lo mismo, en donde se observó mayor crecimiento en células de callos transformados que el callo de control negativo que muestra mayor oxidación.

#### **4.3.6 Prueba de resistencia a Kanamicina de explantes transformados con *Agrobacterium tumefaciens*.**

Las siguientes fotografías (Fig. 4.21) correspondieron a los callos sobrevivientes al tercer subcultivo de los explantes que fueron transformados con *Agrobacterium tumefaciens*, realizado 3 meses antes, iniciando con 48 explantes de tallo, 48 de hoja y 48 de cotiledón.

Los explantes fueron utilizados para la transformación tres semanas después de la germinación.

Una semana después de la transformación, los explantes fueron cultivados en medio MS (sin hormonas) con 100 mg de Kanamicina/L y 500 mg de Cefotaxime/L.

Fueron sólo explantes de tallo (a), (b), (c) y (d) que presentaron callo transformado sobreviviente; mientras que de hoja y cotiledón no se obtuvo ningún callo resistente en el medio de selección.

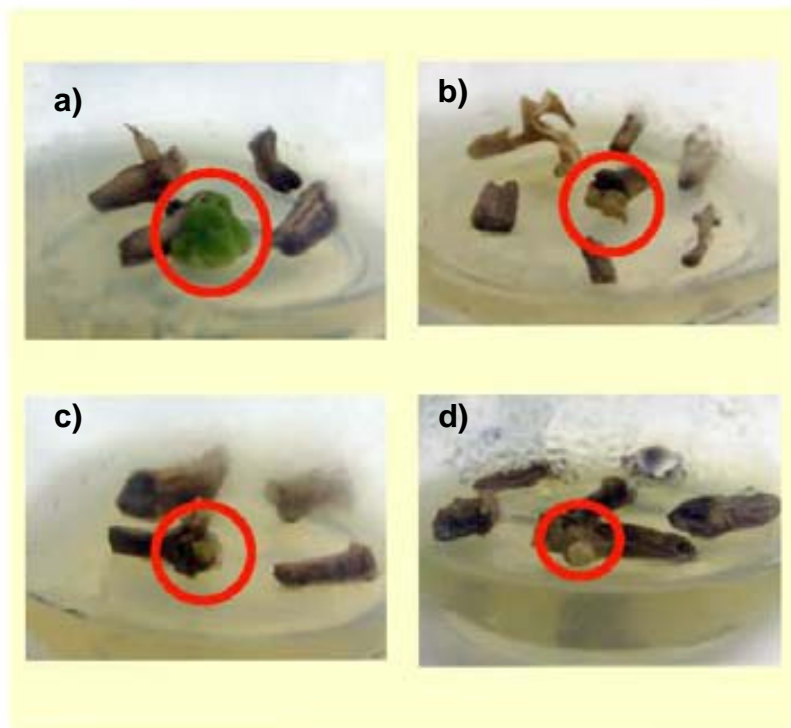


Fig. 4.21 Callos transformados con *Agrobacterium tumefaciens* de explantes de tallo resistente a Kanamicina (circulo rojo): (a), (b), (c) y (d).

Al realizarse el cuarto subcultivo se tomó la decisión de no utilizar Cefotaxime para evitar estrés en los explantes transformados aunque esto podía implicar contaminación con *A. tumefaciens*, lo cual si ocurrió, la mayoría de los explante de tallo, que fueron desechados, excepto los que presentaban callo desarrollado y que fueron fotografiados, en total sobrevivieron para el quinto subcultivo solo 5 explantes con callo transformado.

## V DISCUSIÓN

### 4.2 5.1 ETAPA 1: Establecimiento de cultivos de callos de tres diferentes explantes de frijol Negro Jamapa en tres distintos medios de cultivo.

#### 5.1.1 Esterilización y germinación de la semilla

Trabajar con material vegetal proveniente del campo presenta grandes complicaciones por la gran diversidad de microorganismos que presenta fuera y dentro de los tejidos, por esa razón conviene más trabajar con semillas que son esterilizadas en condiciones asépticas para reducir el riesgo de contaminación al obtener explantes o callos, aún así, siempre existe la posibilidad que la esterilización sea difícil.

En este caso la obtención de explantes para la inducción de callo se obtuvo por germinación de semillas esterilizadas.

El tratamiento químico del protocolo para esterilizar consistió en utilizar hipoclorito de sodio (cloro comercial), Tween 20 y Microdyn®, con resultados positivos al eliminar a los microorganismos presentes en la testa de la semilla, ya que no se presentó contaminación alguna. En el método de esterilización se empleó alcohol, debido a que desnatura las proteínas y disuelve lípidos, dañando las membranas celulares bacterianas, pero no afecta a las esporas; por esa razón se emplea el hipoclorito de sodio que desnatura las proteínas de esporas, bacterias, hongos, y virus, además, inhibe productos tóxicos (enzimas microbianas). Para asegurar la desinfección, también se empleó Tween 20 el cual es un detergente neutro soluble en agua, alcohol, acetato del etilo y en aceites vegetales que disuelve la membrana celular (Maclejko, 1982; Orozco, 2004). Finalmente se agregó Microdyn® (a la mezcla de hipoclorito de sodio) para cambio estructural de proteínas de membrana e inactivar enzimas de todas las células bacteriana, hongos y virus, también afecta a los ácidos nucleicos (García *et al*, 2002; Lantagne, 2001).

El medio MS (Murashige y Skoog) fue utilizado desde el principio para germinar las semillas con resultado positivo, debido a que es un medio rico en nitrógeno, Jacques (1988) menciona que esta presente en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), útil para formación de proteínas y ácidos nucleicos, estrechamente relacionados con la formación de tejidos .

Sin embargo es importante mencionar que la capacidad de germinación fue de 67 % de las semillas sembradas y donde se observó que aquellas que no perdían la testa por el tratamiento de la esterilización eran viables.

### **5.1.2 Inducción de callos probando tres distintos medios y diferentes explantes**

El callo normalmente se obtiene de un tejido vegetal que está sometido a un estrés como una herida, exposición a reguladores de crecimiento, etc., se considera un tejido cicatricial homogéneo o heterogéneo desorganizado, formado por una masa de células vegetales tumorales con actividad mitótica constante debido a que éstas crecen de manera descontrolada (Voet, 2004; Hodson, 2005).

Los explantes recién cultivados para generar callo son muy sensibles, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de su adaptación *in vitro* ante los cambios anatómicos y fisiológicos durante la aclimatación y nueva dependencia a los componentes de los medios de cultivo. La obtención de una mayor cantidad de callo y su velocidad de crecimiento son datos que para Orozco (2004) se deben obtener de una variedad específica a la cual se le va a realizar procesos de transformación vegetal.

Uno de los objetivos planteados es el seleccionar el mejor explante para la inducción de callo, para lo cual se probaron diferentes medios y se evaluó la respuesta de los mismos en base a la producción final de callo.

Se analizó la producción de callo de los explantes tallo, raíz y hoja a través de una cinética de crecimiento que se inició con 0.5 g de callo; se observó que los callos provenientes de tallo presentaron la mejor respuesta en el medio SH para producir la mayor cantidad de callo por explante (15.5 g.) durante cuatro semanas, lo cual es observado en la gráfica 4.3 en los medios N<sub>6</sub>p y M<sub>1</sub>, se produjo 4 y 5 g respectivamente, utilizando callo del mismo explante durante el mismo periodo. En la gráfica 4.7 nuevamente se observó que en las curvas de crecimiento del peso fresco de células de callo de frijol provenientes de tres variedades: Jamapa, Ejotero y Mar 1, el primero nuevamente tuvo mayor crecimiento de masa celular utilizando como explante al tallo y en medio SH.

La efectividad del callo obtenido de explante de tallo para presentar una mayor velocidad de crecimiento durante cuatro semanas, puede deberse principalmente a un alto

contenido de meristemos secundarios presentes en células cambiales (del cambium) que se encuentran en un estado desdiferenciado y que los hace óptimos para la formación de callo, su actividad es regulada primordialmente por las auxinas (Karumanchi, 2001, Brand et al, 2000; Weigel, 2002). También es importante mencionar que el tallo presenta células con actividad meristemática que cambian de comportamiento según el estado de desarrollo, entre ellos se pueden encontrarse meristemos primarios adventicios que participan en el crecimiento. Por otra parte, en las regiones meristemáticas se localizan la más altas concentraciones de auxinas que ayudan en el aumento del volumen celular provocados por absorción de agua debido a que la pared celular disminuye su grosor y resistencia, esto también ayuda para que se de la mitosis, menciona García (2002) que esta auxina como abundante en células de tallo joven. Más tarde, comienzan a aparecer las citocininas, encargadas de la multiplicación de las células que incrementa la capacidad para crecimiento pero sólo la mitad de las células hijas experimentan alargamiento y es entonces que la absorción de agua provoca alargamiento de la célula; cuando esto ocurre, la pared celular se engrosa por el depósito de polisacáridos (Jacques, 1988; Mejía *et al*, 2006; Lee, 2003; Sánchez, 2004, García, 2002).

Otro factor relevante para que el callo tuviera un mejor crecimiento, fue la aportación de reguladores de crecimiento exógenos para la activación meristemática como es mencionado por Jacques (1988) y Sánchez (2004), como fueron la auxina sintética 2,4-D y de la citocinina Kin.

El otro factor observado para el crecimiento de callo, fue encontrar el tipo de medio de cultivo idóneo para el frijol Jamapa. El medio básico empleado normalmente para cultivo *in vitro* ha sido MS (Murashige y Skoog), sin embargo para el crecimiento de callo, se deben hacer cambios graduales en la concentración de los reguladores de crecimiento, minerales, vitaminas, etc., para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia de las células según la especie, debido a ello se buscó el medio de cultivo óptimo para obtener mayor producción de callo a partir de los explantes del frijol Jamapa. En este caso ahora se compararon los tres medios: SH, M<sub>I</sub> y N<sub>6</sub>p, tomando en cuenta que cada callo inició con 0.5 g.

El medio SH ocupó el primer lugar con la producción de la mayor cantidad de callo proveniente del explante de tallo durante las cuatro semanas, con 15.5 g en total, observado en las gráfica 4.6.



En lo general, considera Marinucci (2004) que la formación de callo depende en mayor medida de la concentración de las hormonas endógenas y de la concentración de los factores de crecimiento en los medios de cultivo. Se asegura por Arias (2002) y Sánchez (2006) que el crecimiento de callo se debe principalmente a la actuación de las auxinas exógenas como 2,4-D, apoyados por la interacción de citocininas. Arias (2002) y Sánchez (2006) afirman que factor de crecimiento 2,4-D es considerado como gran inductor de proliferación celular que impide la morfogénesis, actuando sobre la activación de genes que inducen la citocinesis, además, las dicotiledóneas son altamente disponibles a este regulador de crecimiento. Aparentemente 2,4-D involucra un incremento sustancial en la transcripción que puede alterar la estructura de la cromatina, Es responsable de los incrementos en la metilación de la citosina del ADN. Las citosinas metiladas son consideradas puntos calientes de mutación, ya que la desaminación de una 5-metil citocina resulta en un cambio de la base de citocina a timina. Las concentraciones de auxinas naturales y sintéticas tienen una elevada correlación con el porcentaje de 5- metil citosina existente, las citocininas no tienen efecto en este sentido. La metilación en la replicación tardía de la heterocromatina, resulta en eventos de ruptura cromosómica (Xiangqian *et al*, 2002; Mingliang *et al*, 2004; Sánchez, 2006).

Por lo anterior, se demuestra que la variación de los pesos frescos de callos de frijol Jamapa, obtenido durante cuatro semanas en los tres distintos medios se debió principalmente a las diferentes concentraciones de 2,4-D. A bajas concentraciones, como en el caso del medio N<sub>6</sub>p suplementado con 2,4-D (1 mg/L) el crecimiento de callo fue menor, a comparación del medio SH, ya que en este medio se triplicó la concentración de 2,4-D con 3 mg/l. Para el medio M<sub>1</sub> se empleó el doble al utilizado en el medio SH con 6 mg/L de 2,4-D, aumentando probablemente su toxicidad en el callo de frijol (Jacques, 1988).

Por otra parte, la citocinina utilizada fue Kin que se obtiene del esperma del arenque, a bajas concentraciones estimulan la proliferación de tejidos e inhibe la rizogénesis, son hormonas derivadas de la adenina y están relacionados principalmente con los procesos de división celular (mitosis), al activar los genes *cdc2* y *CycD3* que actúan en la mitosis (Pandey y Kumar, 2000; Francis y Sorrell, 2001; D'Agostino, 1999).

En el medio SH se utilizó  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Kin, lo cual ayudó a estimular la proliferación celular más alta a la cuarta semana y así ser el medio óptimo para el crecimiento de callo del frijol Jamapa, mientras que en el medio N<sub>6</sub>p sólo se agregó  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de Kin, lo cual probablemente redujo la estimulación para el aumento celular de callo, sumado también la baja concentración de 2,4-D, dio como resultados que fuera el medio con la menor producción de callo en explantes durante las cuatro semanas.

Se considera a la Kin como potenciador de 2,4-D, siempre y cuando su concentración no exceda la de 2,4-D (Arias, 2002). Esta prueba demostró que el medio SH presenta la concentración correcta de 2,4-D para la inducción de callo de frijol Jamapa.

## **5.2 ETAPA 2 Validación del protocolo de inducción de callo con las variedades Negro Jamapa, Mar 1 y Ejotero**

### **5.2.1 Cinética de crecimiento de tres variedades de frijol**

En esta etapa sólo se buscó observar si existía una variación en la producción de callo de explante de tallo de otras variedades: Ejotero y Mar 1, comparándolas con la variedad Jamapa cultivados en medio SH durante cuatro semanas, todos con un peso inicial de 1 g.

La variedad Jamapa alcanzó una mayor producción de peso fresco de callo en la cuarta semanas con 7.75 g visto en la gráfica 4.7, seguido por la variedad Ejotero con 7.5 g y en tercer lugar quedó Mar 1 con una masa final de 2 g observados en la misma gráfica. En este caso, Ejotero respondió de forma similar a Jamapa porque seguramente las concentraciones de los reguladores de crecimiento, carbohidratos, vitaminas, etc. en el medio SH deben ser los indicados para la formación de callo en el explante de tallo. Caso contrario en la variedad Mar 1 en donde se observó en que los componentes del medio SH no le ayudan para el crecimiento de callo. También es importante destacar, que en esta curva comparativa se observó como la fase logarítmica de las células se inicia a partir de la segunda semana, el cual es un dato importante para la transformación, ya que indicó el tiempo adecuado para insertar genes debido al restablecimiento de la actividad mitótica.

Por otra parte, la cinética obtenida de peso seco de callo de explante de tallo de frijol Jamapa (Gráfica 4.8), el cual inició con 0.4 g, coincidió con la etapa logarítmica del peso

fresco, y fue útil al indicar en que días después del cultivo, se da exclusivamente una mayor división celular.

Queda establecido que el frijol Jamapa es óptimo para generar una mayor cantidad de callo durante cuatro semanas, puede deberse a que se ha adaptado a diferentes suelos y climas para su siembra. Además su crecimiento logaritmico se inició a partir de la primera semana, útil para procesos de transformación.

### **ETAPA 3 Transformación genética de callos y obtención de líneas celulares transformados de Negro Jamapa**

#### **5.3.1 Cinética de crecimiento con Basta en peso fresco**

La exposición de callo de explante de tallo de frijol Jamapa a diferentes concentraciones del herbicida Basta, tuvo como objetivo determinar la concentración adecuada para seleccionar los callos y las células durante la fase de la transformación.

De los cultivos de callo expuestos a cinco diferentes concentraciones de Basta en medio SH (Cuadro 4.1), ninguno mostró un crecimiento real durante las cuatro semanas de exposición, al contrario se dio una disminución de la masa (gráfica 4.9) de 0.5 a 0.39 g en promedio (dato del callo menos afectado, del cuadro 4.1). Durante los dos días posteriores al cultivo mostraron un aumento de la masa celular alcanzando hasta 0.53 g en el medio que presentaba  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Basta, esto puede ser útil para medir procesos metabólicos y genéticos sobre vías de señalización, replicación, transcripción, etc. El herbicida Basta (Glufosinato de amonio) dentro de las células se convierte en un fitotóxico fosfotricina (PPT), afectando la capacidad de la fijación de nitrógeno, interfiere con la enzima Glutamina sintetasa, lo que causa una acumulación de amoníaco letal para la maleza, que por lo observado, las células del callo de frijol son sensibles a la toxicidad de Basta, lo que hace que sea recomendable a este herbicida para usarlo como factor de selección en la transformación del frijol Jamapa (Aragao, et al, 2002; Alvarenga *et al*, 2006).

Por otra parte, los callos control cultivados en medio SH durante cuatro semanas sin el herbicida (gráfica 4.9), crecieron sin ningún problema obteniendo 1.12 g en promedio y además, también se observó que la fase logarítmica de la masa celular se inició

totalmente a partir de la segunda semana, lo que sería utilizado como el tiempo idóneo para realizar la transformación.

### **5.3.2 Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes *bar* y *gus*)**

Debido a que el objetivo principal de este trabajo es obtener líneas celulares de frijol Jamapa transformados genéticamente a través del bombardeo en un callo, es importante manejar un protocolo para seleccionar las células vegetales transformadas.

24 horas después del bombardeo de callos se comprobó si existía la presencia del gene *gus* en las células bombardeadas, al realizarse la prueba de expresión transitoria con 1 ml de X-Gluc, a una concentración de 1 g/L, para cada callo y prácticamente a la semana se obtuvieron los resultados. Se observó que los tres callos seleccionados al azar, que habían sido bombardeados con el gene reportero, sin importar el tipo de bala empleado para el bombardeo (M 5 y M 10), mostraban la expresión transitoria de la tinción azul en la mayoría de las células transformadas en cada callo (Figs. 4.3 y 4.4), comprobándose que las células habían recibido material genético a través del bombardeo, en este caso al gene. Por otra parte, los callos controles utilizados en las pruebas, que sólo fueron bombardeados con micropartículas sin material genético, no mostraron la coloración azul, debido a la carencia del gene *gus*, quien causa esta tinción. La cantidad utilizada de 1 ml X-gluc, a una concentración de 1 g/L, para cada callo, fue eficiente para mostrar la expresión transitoria. El gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa o *gus* (*uidA*) es de uso frecuente para verificar si se han introducido genes en las células que se desean transformar genéticamente. Si la transformación ha tenido éxito, las células presentan el gen *gus* (*uidA*) que produce la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (un ácido hidrolasa), el cual puede ser detectado utilizando como su substrato cromogénico a X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil *b*-D-glucurónico), X-Gluc al unirse a *b*-glucuronidasa se reduce y se precipita generando el color azul (Tadesse et al, 2003, [www.mir.rodriguez.org](http://www.mir.rodriguez.org)).

Para reafirmar que existió transformación genética en los callos bombardeados, estos fueron cultivados en medio de selección con 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta, las células que fueron transformadas, al recibir el gen *bar* durante el bombardeo, pudieron soportar la toxicidad herbicida durante las primeras cuatro semanas, pero además, presentaban crecimiento de la masa celular con mínima oxidación del callo, esto se pudo ver en la figura 4.5 y se mantuvo la misma respuesta en los callos a los subcutivos posteriores, durante siete

meses (Fig. 4.6 y Fig. 4.7), quedando establecido que la nueva característica genética se transmitió de generación en generación a través de la mitosis. Es importante mencionar que el callo control que no había recibido el gen *bar*, continuo con vida pero con un mínimo volumen celular y en constante oxidación, es decir sólo buscaban sobrevivir (Figs. 4.6 y 4.7). El gen *bar* proviene de *Streptomyces hygrosopicus* que codifica para la enzima fosfotricina acetil transferasa (PAT), que acetila los grupos NH<sub>2</sub> libres del fitotoxico fosfotricina (PPT) de Basta (Glufosinato de amonio), evitando su toxicidad (Aragao *et al*, 2002).

La expresión transitoria del gene *gus* en la tinción azul en los callos bombardeados como prueba inicial y la resistencia a Basta que perduró hasta el octavo subcultivo por la existencia del gen *bar*, más de medio año (7 meses), son la prueba del éxito de la transformación en el callo de explante de tallo de frijol Jamapa, utilizando la distancia de 7.5 cm y con partículas de tungsteno M5 ó de M10 en el bombardeo.

### **5.3.2 Prueba de resistencia y selección de callos de frijol transformados Jamapa en medio líquido**

En esta etapa, la transformación se llevó a cabo por bombardeo en callos de explante de tallo de frijol Jamapa con la distancia de 7.5 cm y la partícula de tungsteno 10M. El objetivo fue transferir ADN con el gen marcador de selección *bar* (con resistencia Basta) y el gen reportero *gus*. Los callos bombardeados cultivados en medio gelificado o sólido de SH durante una semana se les aplicaron entonces la prueba con X-Gluc a callos seleccionados al azar y mostraron la tinción azul, prueba de transformación, los callos control no mostraron tinción (Fig. 4.8). Los callos restantes fueron suspendidos en medio líquido de selección de SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de Basta, cada dos semanas se realizó el subcultivo.

Dos meses después de la transformación, se seleccionaron al azar 3 matraces con células transformadas y un matraz con células no transformadas (control) y nuevamente se le aplico la prueba de X-Gluc en medio líquido. Nuevamente se hace visible la coloración azul en las células transformadas, mientras que los cultivos control, no mostraron color azul (Fig. 4.9).

También se realizó la comparación cualitativa entre los matraces de células transformadas y de control negativo en suspensión en medio liquido SH + 1 mgL<sup>-1</sup> de

Basta, dos meses después de su transformación. Las diferencias fueron evidentes, los matraces con células transformadas mostraban una gran acumulación por la actividad mitótica, sin importar la presencia en el medio del herbicida Basta, los recipientes mostraban una alta densidad por la acumulación celular. El matraz con células no transformadas se veía transparente, lo que indicó la carencia de células o con un mínimo de ellas al carecer del gen *bar* y que fueron afectados por el herbicida Basta (Fig. 4.10). Esta prueba aplicada a las células en medio líquido de selección, proporciona una mejor evidencia para probar si existe transformación genética en callos modificados por bombardeo.

Al final, se les aplicó la prueba de X-Gluc a matraces con células transformados y matraces con células control, se tomaron muestras y fueron vistos al microscopio a 40 X y 100 X, para ver el fenotipo de las células que mostraban la expresión del gen *gus* con la tinción azul ante la presencia de X-Gluc. Dentro de las células se observó la formación de cristales azules, al unirse y reaccionar la enzima  $\beta$ -glucuronidasa con el sustrato X-Gluc se precipitaron, esto indicó una solidificación o formación de cristales del producto (Fig. 4.11 y 4.12). También se vieron en el microscopio, muestras que presentaron células silvestres en medio líquido SH sin Basta y células no transformadas en medio líquido de SH con  $\text{mgL}^{-1}$  de Basta, en el primero se miró total turgencia en la célula silvestre debido a que no presentaron ninguna estrés en el medio en que se encontraban, mientras que la célula no transformada en medio líquido SH con Basta se observó con una baja densidad celular y con volúmenes celulares reducidos, casi menor a una décima parte de la célula silvestre (Fig. 4.13 (a) y (b)).

#### **5.4 Cinética de crecimiento con Kanamicina en peso fresco**

En esta etapa se buscó ahora observar como responden los callos de explante de tallo de frijol Jamapa a la exposición de a diferentes concentraciones del antibiótico Kanamicina, para encontrar las dosis que puedan ser toleradas por las células y aplicarlos durante la fase de la transformación con el gene *nptII* por medio de biobalística y por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los callos de explante de tallo de frijol Jamapa (con un inicio de 0.5 g) se expusieron a cuatro diferentes concentraciones del antibiótico Kanamicina en medio SH (cuadro 4.2), mostrando crecimiento de la masa celular durante las cuatro semanas de exposición

(Gráfica 4.10 y Cuadro 4.2), al final el aumento del peso fresco de cada tratamiento fue proporcional a la concentración de Kanamicina utilizada, por ejemplo, los callos expuestos  $25 \text{ mgL}^{-1}$  de Kanamicina tuvieron mayor crecimiento a las cuatro semanas con 7.6 g en promedio debido a que fue la menor concentración del antibiótico, mientras que los callos expuesto a la mayor concentración de Kanamicina con  $100 \text{ mgL}^{-1}$  solo alcanzaron 4.8 g en promedio, tuvieron menos crecimiento (Cuadro 4.2), contrario a lo que ocurrió con los callos expuestos al herbicida Basta, en este caso mostraron una mínima sensibilidad al antibiótico Kanamicina, lo que implica el uso de una mayor concentración de este último para causar efecto en las células del callo del explante de tallo de frijol Jamapa. La Kanamicina es un antibiótico de la familia de los aminoglicósidos que puede interferir con los procesos celulares de traducción mediante enlace con los ribosomas (Christian, 2004).

En cuanto a los callos control cultivados en medio SH durante cuatro semanas sin el antibiótico (gráfica 4.10), crecieron sin ningún problema alcanzando a producir 8 g promedio.

Exponer a los callos de explante de tallo de frijol Jamapa en medio SH con Kanamicina debe ser a una concentración mayor de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  para que se logren ver afectadas las células, aunque Franklin *et al*, 1993, mencionaron que utilizaron  $50 \text{ mgL}^{-1}$  durante la prueba de resistencia a este herbicida en callos transformados con el gen de *npt II*.

### **5.5 Transformación por bombardeo de micropartículas con ADN (genes *nptII* y *gus*)**

En la transformación genética también se han utilizado los genes de resistencia a los antibióticos como marcadores selectivos unidos a el gen reportero *gus* (prueba visual en la tinción azul). Para elegir el mejor agente selectivo se probó otro gen que confiere resistencia a Kanamicina, por lo que se transformaron callos de explante de tallo con el gene marcador unido al gen *gus*.

En este caso se comparó por un lado, si existía alguna diferencia observable en la transformación por utilizar distinto tamaño de las microparticulas, comparando entre la bala M 5 (con diámetro de  $0.4 \mu\text{m}$ ) y la bala M 10 ( $0.7 \mu\text{m}$  de diámetro). Por otra parte, también se comparó la variación de la distancia, entre el filtro del cañón y el callo: 7.5 cm y 12 cm.

La prueba de X-Gluc (con la misma concentración utilizada en la transformación de resistencia a Basta) con la tinción azul fue positivo en los callos seleccionados al azar que habían sido bombardeados (Figs. 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16) y en donde no hubo variación relevante ante la diferencia de tamaño de balas (M5 y M10), ni por cambio en las distancias (7.5 cm y 12 cm).

Los callos controles bombardeados sin material genético, no mostraron la coloración azul como se esperaba, debido a la carencia del gen *gus*.

Los callos bombardeados, fueron cultivados en medio de selección con  $125 \text{ mgL}^{-1}$  de Kanamicina en SH, las células que fueron transformados recibieron el gen *nptII* durante el bombardeo y pudieron inhibir el efecto de la Kanamicina durante tres meses (tres subcultivos); los cultivos presentaron crecimiento de la masa celular con mínima oxidación del callo (Figs. 4.17, 4.18, 4.19 y 4.20) sin importar el tamaño de la bala ni de la distancia. La característica genética insertada se transmitió de generación en generación a través de la mitosis. El callo control que no había recibido el gen *nptII*, continuo sobreviviendo en un mínimo volumen celular y en constante oxidación (Figs. 4.17, 4.18, 4.19 y 4.20). El gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) codifica para la producción de la enzima aminoglicósido 3'-phosphotransferase II (APH(3')II), que fue aislado como un componente del transposon Tn5 de la bacteria *Escherichia coli*, que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP al grupo hidroxilo a los antibióticos aminoglicósidos que presenta la Kanamicina, recordando que este antibiótico afecta la traducción (Jeleni, 2003).

La expresión transitoria del gen *gus* en la tinción azul en los callos bombardeados y la resistencia a Kanamicina que perduró hasta el tercer subcultivo (tres meses al bombardeo) por la existencia del gen *nptII*, son la prueba de la transformación en el callo de explante de tallo de frijol Jamapa, utilizando dos distancias de 7.5 cm y 12 cm y con diferente tamaño de partícula de tungsteno M 5 ó de M 10 en el bombardeo, ambos se pueden utilizar para transformar frijol Jamapa.

## **5.6 Explantes transformados con *Agrobacterium tumefaciens* con resistencia a Kanamicina**

En la búsqueda de un mejor protocolo para transformar callo de frijol Jamapa, también se realizó la transformación utilizando como vector a la bacteria *Agrobacterium*



*tumefaciens*, que a través de un segmento denominado ADN-T (ADN transferido), del plásmido Ti (“Inductor de tumor”) que presenta, transfiere genes a las células vegetales. Para tal caso se utilizan plásmidos contruidos en laboratorios que contiene genes de interés que se desean insertar en el genoma de las plantas. En este caso, se trabajó con el vector pBin19, con la construcción 3X35S-*hxt2*- NOS con resistencia a la higromicina y a la Kanamicina.

Se transformaron explantes de tallo, hoja y cotiledon (48/c.u.) con la bacteria *Agrobacterium*.

Los resultados son discutibles, por un lado se tuvieron callos de explantes de tallo transformados que mostraron resistencia a 100 mgL<sup>-1</sup> de Kanamicina, pero al mismo tiempo se le tuvo que agregar a este medio 500 mgL<sup>-1</sup> de Cefotaxime para eliminar a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, esto implica que realmente no se elimina totalmente a esta bacteria, las más resistentes sobreviven y se reproducen, al no presentar Cefotaxime el medio de cultivo entonces su reproducción es optima. De los 144 explantes utilizados en total para la transformación, se redujo la cantidad por la contaminación generada por colonias de *Agrobacterium*. Cabe destacar que los callos que se formaron por que el ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* contiene genes que codifican para las hormonas vegetales auxina y citocinina, reguladores de crecimiento responsables del fenotipo tumoroso.

Por otra parte, la transferencia del genes de interés que porta el ADN-T de *Agrobacterium* (3X35S-*hxt2*- NOS) al ADN del explante vegetal se llevó cabo por una región grande del plásmido Ti conocida como el locus *vir* (por virulencia). La proteína *virA* detecta los compuestos fenólicos secretados por las células heridas de los explantes y provoca la fosforilación de la proteína *virG*, que su vez provoca una cascada de transcripción de las demás proteínas *vir*, que se encargan de la transferencia e integración del ADN-T (Beaujean *et al*, 1998).

Aun cuando hubo transformación en explantes, la preocupación se centró más por eliminar al *Agrobacterium*. El antibiótico Cefotaxime fue utilizada para elimina a la bacteria y esto debió generar algún tipo de estrés al las células vegetales, aunque se considera que no es toxico para los callos vegetales. El Cefotaxime es un inhibidor de la síntesis de la pared celular en bacterias gram-negativa, como ocurre en *Agrobacterium* y

esto se da por la inhibición en la formación de enlaces de peptidoglicanos debido a que se une e inactiva transpeptidasas ((Cué, 1998; Sánchez *et al*, 2004).

Al quinto subcultivo sólo quedaron cinco explantes con callo transformado libres de colonias y exclusivamente de tallo (Fig. 4.21).

Queda claro, que la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en explantes de tallo de fríjol Jamapa es viable pero que tiene sus inconveniencias, debido a que si la eliminación no es total de la bacteria en explantes transformados, se puede tener contaminación constante por colonias de la misma bacteria y se vuelve en un factor negativo para el experimento ya que causa de reducción de explantes transformados.

## VI CONCLUSIÓN

- El método de desinfección utilizado en la semilla de frijol en las tres variedades probadas fue lo suficientemente eficaz para obtener plántulas sin contaminación de microorganismos y virus.
- La viabilidad de las semillas de las tres variedades fue buena ya que el porcentaje de germinación fue del orden del 65%.
- Los segmentos de tallo de frijol resultaron el mejor explante para producir callo.
- Para las tres variedades, la mayor producción de callo se registró en el explante en tallo de la variedad Jamapa.
- Un factor relevante para la mayor producción del callo es la aportación de los reguladores 2,4-D y de Kin que contenía el medio SH.
- La cinética de crecimiento en medio SH con Basta de peso fresco de callo de frijol Jamapa, a cualquier concentración mayor de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  del herbicida le provoca la muerte.
- Se determinó que la concentración debe ser mayor de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de Kanamicina para llevar a cabo la selección a Kanamicina.
- La transformación por bombardeo para la resistencia a Basta o a Kanamicina en frijol Jamapa, es óptimo a las distancias de 7.5 y 12 cm entre el filtro y las células, con partículas de tungsteno M 5 y M 10.
- Se mantuvo la resistencia en los callos transformados resistentes a Basta y la expresión transitoria durante siete meses, heredándose los nuevos genes a través de la mitosis.
- Se mantuvo la resistencia en los callos transformados resistentes a Kanamicina y la expresión perduró tres meses después del bombardeo.
- La prueba de resistencia y selección de callos de frijol Jamapa en medio líquido con el herbicida Basta fue más eficiente al evidenciarse en menor tiempo la muerte celular y la coloración de la mayoría de las células.
- La transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en explantes de tallo de frijol Jamapa es menos eficiente, debido a que la eliminación de la bacteria en explantes transformados no es total y se vuelve un factor de contaminación, evitando la proliferación de callos transformados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alvarenga C. C. E., Correa M. H. B., Aparecida A. G., Protasio P. L. F., Esteves V. L. G., 2006. Produção de prolina e suscetibilidade ao glufosinato de amônio em plantas transgênicas de citrumele Swingle. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 41(5):747-753.
2. Arias R. A. R., 2002. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón. "Maca". Tesis para Título profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
3. Ajay K. S. and Suresh Ch., 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. *J. Plant Physiol.* 160: 415–421.
4. Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K. y Watson J.D., 2002. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega S.A. España.
5. Aragão F. J. L.; S. G. Ribeiro, L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, D. P. Maxwell, E. L. Rech y Faria J. C., 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* 4: 491–499.
6. Aragão J. L. F., 2002. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. *JIRCAS Working Report*: 35-42.
7. Archana Ch. and Paramjit K., 2003. Regeneration via somatic embryogenesis from leaf basal segments and genetic transformation of bread and emmer wheat by particle bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 151–161.
8. Bayuelo-Jimenez S. J., Debouck G. D. and Lynch P. J., 2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crops Research* 80: 207-222.
9. Beaver S. J. y Rosas S. J. C., 2004. Investigación colaborativa de frijol en Centroamérica y el Caribe. Depto. de Agronomía y Suelos (Universidad de Puerto Rico) y Programa de Investigaciones en Frijol Escuela Agrícola Panamericana (Tegucigalpa, Honduras).
10. Berrios J. J., Swanson G. B., Cheong W. A., 1999. Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Research International* 32: 669-676.

11. Brand U., Fletcher J. C., Hobe M., Meyerowitz E. M. and Rudiger S., 2000. Dependence of Stem Cell Fate in *Arabidopsis* on a Feedback Loop Regulated by *clv3* Activity. *Science* vol. 289: 617- 619.
12. Butcher N. Dennis and Ingram B. David, 1976. *Plant Cell Culture*. Inglaterra.
13. Carmine D. and Simona M., 1998. *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* ISSN Vol.1 No.2: 0717-345.
14. Christian S. R., Goodman M. R. and Handelsman J., 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* 6(9): 981–989.
15. Collin H. A. and Sue E., 1998. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. E.U.
16. Cué B. M. y Morejón G. M., 1998. Antibacterianos de acción sistémica, parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr*; 14(4):347-61.
17. D´agostino I.B. and Kieber J.J., 1999. Molecular mechanisms of cytokinin action. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:359-364.
18. De Clercq J., M. Zambre, M. Dillen W. V. M. and Angenon G., 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Rep.* 21:333–340.
19. Diouf A., Lajudie P., Neyra M., Karel Kersters, Gillis M., Martinez-Romero E. and Gueye M., 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 159–170.
20. Engleman E. M., 1979. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Colegio de Postgraduados, Institución de enseñanza e investigación en ciencia agrícolas.
21. Eudes F., Acharya S., Laroche A., Selinger L.B. and Cheng K.-J., 2003. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 147–157. Netherlands.
22. Evans D. J.; Coleman O. D. and Keans, A., 2003. *Plant cell culture*. Bios Scientific Publishers. 2a Editions. E.U.
23. Feher A., Pasternak T. P. and Dudits D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201–228.

24. Fisher C. T. M., Eissenstat M. D. and Lynch P. J., 2002. Lack of evidence for programmed root senescence in common bean (*Phaseolus vulgaris*) grown at different levels of phosphorus supply. *New Phytologist* 153: 63–71.
25. Francis D. y Sorrell D., 2001. *Plant Growth Regulation*. Springer Netherlands. Volúmen 33, Número 1: 1-12.
26. Franklin C.I., Trieu T.N., Cassidy B.G., Dixon R.A. and Nelson R.S., 1993. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Rep* 12(2): 74–79.
27. Froese D. C., Nowack L., Cholewa E. and Thompson E. J., 2003. Molecular composition and surface properties of storage lipid particles in wax bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Plant Physiol.* 160: 215–225.
28. Gaitan-Solis E., Duque M. C., Edwards K. J. and Tohme J., 2002. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Sci.* 42:2128–2136.
29. Galván M.Z., Bornet B., Balatti P.A. and Branchard M., 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 132: 297–301.
30. Gamborg O.L. and Philips G.C. (editores), 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania.
31. García G. R., Chávez E. J., Mejía C. A., Durán de B. C., 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 44, No. 1. pp. 24 – 30
32. García M. J. J., 2002. Influencia de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la plasticidad fenotípica del *Pinus pseudostrabus* Lindl. (Pinaceae). Universidad de Colima. Doctorado en ciencias: Área de ciencias agrícolas y forestales.
33. Guerrero A. O., Loza R. E., Olivera F. M. T., Fehévári B. T. y Gómez L. M. A., 2006. Expresión of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic Maite and immunological studies. *Transgenic Research*. Aceptado para su publicación.
34. Gutiérrez O. A., Sandoval M. C., Olivera F. M. T., Santos A. L. y Gómez L. M. A., 2005. Expresión of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plant. *Transgenic Research* 14:877-885.
35. Hodson de J. H., 2005. Transformación genética de plantas para resistencia a virus. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29(110): 5-24.

36. Ikeda-Iwai Miho, Umehara M., Satoh S. and Kamada H., 2003. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. The plant Journal 34, 107-114.
37. Jacques M., 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogénesis. Ediciones MUNDI-PRENSA.
38. Jeleni S., 2003. Kanamycin Resistance Marker Gene in Transgenic Plants. Food Technol. Biotechnol. 41 (2) 183–190.
39. Karumanchi S. R. and Rajput S. K., 2001. Relationship between seasonal cambial activity, development of xylem and phenology in *Azadirachta indica* growing in different forests of Gujarat State. Ann. For. Sci. 58: 691–698
40. Kim, J.W. and Minamikawa T., 1997. Stable delivery of a canavalin promoter-beta-glucuronidase gene fusion into French bean by particle bombardment. Plant Cell Physiol. 38(1): 70–75.
41. Langer R. H. M. y Hill G. D., 1987. Plantas de interés agrícola. Edit. Acribia S. A.
42. Lantagne S. D., 2001. Investigation of the Potters for Peace Colloidal Silver Impregnated Ceramic Filter Report 1: Intrinsic Effectiveness. Submitted to Jubilee House Community USAID Purchase Order Number: 524-0-00-01-00014-5362. (daniele@alethia.cc).
43. Lee E. H. E., Cruz C. J. G. y Garcia R. B., 2003. Proliferación de brotes múltiples y aclimatación de anturio (*Anthurium andreaeanum* L.) “Midori” y “Kalapana” cultivados in vitro. Revista Fitotecnia Mexicana, octubre-diciembre, vol. 26, número 004. 301-307 pp.
44. Liu Dawen, Svetlana V. O. and James H. O., 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. Plant Science 165: 743-750.
45. Maclejko J. J. and Mao J. T. S., 1982. Radioimmunoassay of Apolipoprotein A-I. Application of a Non-Ionic Detergent (Tween-20) and Solid-Phase Staphylococcus. Clinical chemistry, Vol. 28, No. 1.
46. 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.
47. Margara J., 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogénesis. Ediciones Mundi-prensa. Madrid.

48. Marinucci L., Ruscitti M. and Abedini W., 2004. Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. Rev. Fac. Agron. 105 (2): 27-36.
49. Mederos-Molina S., Plasencia C. I. del C. y Varela C. C. Biotecnología vegetal: obtención de plantas In Vitro. ([www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo\\_tejidos/capitulo2](http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo2)). España.
50. Mejía A., Galindo L.F., Roca W.M., Jacobsen H.J. y Tohme J., 2002. Transformación genética del frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y transferencia de los transgenes al frijol común a través de cruzamientos sexuales. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT.
51. Mejía M. J. M., González C. S., Mora A. R. y Rodríguez P. J. E., 2006. Propagación *in vitro* de papa ratona (*Oxalis tuberosa* mol.). Revista Chapingo. Serie horticultura, julio-diciembre, vol. 12, número 002: 231-237.
52. Mekbib F., 2003. Yield stability in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. Euphytica 130: 147–153.
53. Mingliang Xu, Li X. and Korban S. S., 2004. DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose ( *Rosa hybrida* L.). Theor Appl Genet 109: 899–910
54. Mulugeta D. and Boerboom M. C., 2000. Critical time of weed removal in glyphosate-resistant Glycine max. Weed Science, 48:35–42.
55. Newell A. Ch., Birch-Machin I., Hibberd M. J. and Gray C. J., 2003. Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. Transgenic Research 12: 631–634, 2003.
56. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1990. Utilización de alimentos tropicales: frijoles tropicales. Roma.
57. Orozco, Carlos. 2004. Situación actual de la Biotecnología en Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Documento Técnico No. 17. Guatemala.
58. Pandey R. S. y Kumar S., 2000. Induced mutation to monocotyledony in periwinkle, *Catharanthus roseus*, and suppression of mutant phenotype by kinetin. Journal of Genetics, Vol. 79, No. 3: 97-104.
59. Parsons B. D., 1991. Frijol y chicharo. Editorial Trillas S.A. 2a edición, 1a reimpresión. Mexico.
60. Perret J. S., Valentine J., Leggett J. M. and Morris P., 2003. Integration, expression and inheritance of transgenes in hexaploid oat ( *Avena sativa*L.). J. Plant Physiol. 160. 931–943.



61. Popelka J. C. and Altpeter F., 2003. Evaluation of rye (*Secale cereale* L.) inbred lines and their crosses for tissue culture response and stable genetic transformation of homozygous rye inbred line L22 by biolistic gene transfer. *Theor. Appl. Genet.* 107:583–590.
62. Popelka J. C., Xu J. y Altpeter F., 2003. Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgenic Research* 12: 587–596.
63. Robles S. R., 1983. Producción de granos y forrajes 4ª edición. Edit Limusa.
64. Romano A., Raemakers K., Bernardi J., Visser R. y Mooibroek H., 2003. Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Research* 12: 461–473.
65. Rosales M. S., Soria G. R., Olivera F. M. T., Lopez R. R., Arguello A. G., Jiménez B. J., Garcia de la Cruz R., Loyola R. J., y Alpuche A., 2006. Expresión of *escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota*). *Plant Cell Report*. Aceptado para su publicación.
66. Rosas J. C., Gallardo O. y Jiménez J., 2003. Mejoramiento genético del frijól común mediante enfoques participativos en Honduras. Programa de Investigaciones en Frijol, Escuela Agrícola Panamericana (jcrossas@zamorano.edu); e investigadores del Proyecto IPCA, Honduras (proyectoipca@caribe.hn).
67. Russell D.R., Wallace K.M., Bathe J.H., Martinell B.J. and McCabe D.E., 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* viaelectric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep.* 12(3): 165–169.
68. Sairam R. V., Parani M., Franklin G., Lifeng Z., Smith B., MacDougall J., Wilber C., Sheikhi H., Kashikar N., Meeker K., Al-Abed D., Berry K., Vierñing R. and Golman S.L., 2003. Shoot meristem: An ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*. ProQuest Medical Library, 46, 2: 323.
69. Saldaña S., Esquivel G. F., Olivera F. M. T., Arias N., López S., Arias C., Ruiz M. R., Mason H., Mor T., Richter L., Arntzen CH. J., y Gómez L. M. G., 2006. Production of Rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP3 and immunological studies. *Viral Immunology*, vol. 19, num. 1: 42-53.
70. Sánchez S. L., Sáenz A. E., Pancorbo M. J., Lanchipa Y. P., y Zegarra del C. R., 2004. Antibióticos sistémicos en Dermatología. Primera parte: Betalactámicos,

- Carbapenems, Aminoglucósidos, Macrólidos. Dermatología peruana vol. 14, Nº 1:7-20.
71. Secretaría del Consejo Agropecuario Centroamericano, 2004. Reporte sobre el mercado mundial del frijol. 1-4 pp.
  72. Singh S. P., Terán H., Gutiérrez J. A., Pastor-Corrales M. A., Schwartz H. F. and Morales F. J., 2003. Registration of A 339, Mar 1, Mar 2, and Mar 3 Angular-Leaf-Spot- and Anthracnose-Resistant Common Bean Germplasm. Crop Sci. 43:1886–1887.
  73. Solange R. M. de Andrade, Danielle G. Gomes, Mônica T. V. Labate, Carlos A. Labate. Transformação de *Phaseolus vulgaris* via SAAT (“Sonication Assisted *Agrobacterium* mediated Transformation). EMBRAPA Cerrados; 2. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Laboratório de Genética Fisiológica. solange@cpac.embrapa.br.
  74. Somers A. D., Samac A. D. and Olhoft M. P., 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiology AGRICOLA. 131, 3:892.
  75. Svetleva D., Velcheva M. and Bhowmik G., 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. Euphyta 131: 189-200.
  76. Tadesse Y., Sagi L., Swennen R. and Jacobs M., 2003. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 1–18.
  77. Thu T. T., Xuan Mai T. T., Dewaele E., Farsi S., Tadesse Y., Angenon G. and Jacobs M., 2003. *In vitro* regeneration and transformation of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp]. Molecular Breeding 11: 159–168.
  78. Torres da Silva H., Oliveira C. A. y de Goiás S. A., 2003. Caracterização Botânica de Espécies Silvestres do Gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae). Documentos 156. Embrapa. 1ª edición.
  79. Vain P., James V. A., Worland B. and Snape J. W., 2002. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. Theor. Appl. Genet. 105:878–889.
  80. Vianna G. R., Albino M. C. M., Dias B. A. B., Silva L. de M., Rech L. E. and Aragão J. F., 2004. Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Scientia Horticulturae (99): 371–378.
  81. Voet D. and Voet G. J., 2004. Biochemistry. 3a edición. Wiley International Edition. E.U.

82. Weigel D. and Jürgens G., 2002. Stem cells that make stems. *Nature*, vol. 415(14): 751-754.
83. Wisniewski J.-P., Nathalie F., Massonneau A., Dumas Ch., 2002. Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie* 84: 1095–1103.
84. Xiangqian Li, Xu M. and Korban S. S., 2002. DNA methylation profiles differ between field- and in vitro-grown leaves of apple. *J. Plant Physiol.* 159:1229-1234.

## ANEXO

### Esterilización de semilla (Tabla 1)

Medios	Observaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alcohol al 70 %.</li> <li>Cloro al 30 % + (Microdyn -7 gotas- + twen 20 -2 gotas-).</li> <li>H<sub>2</sub>Od.</li> </ul>	Tomar las semillas con guantes. <ul style="list-style-type: none"> <li>10 minutos.</li> <li>100 ml /18 minutos, con agitación manual.</li> <li>3 enjuagues/2 minutos.</li> </ul>
Microdin ®	Solución coloidal de plata.
Tween 20	Monopalmitato de polioxietilen sorbitan.

### Preparación de 50 ml de solución de X-Gluc

- 50 mg de X-Glu disuelto en 250 µl DMSO
- Se le adiciona 5 ml de cada de cada uno de las siguientes soluciones:

Reactivos	Peso	volumen	solvente	conc.	Stock
Amortiguador de fosfato de sodio NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.38 g	50 ml	H <sub>2</sub> Od	200 mM.	39 ml
NaHPO <sub>4</sub>	2.84 g	100 ml	H <sub>2</sub> Od	200 mM	61 ml
Ferrocianuro de potasio hidratado KFe(CN) <sub>6</sub> – 3 H <sub>2</sub> O	0.211 g	100 ml	H <sub>2</sub> Od	5 mM	
Ferrocianuro de potasio K <sub>3</sub> Fe(CN)	0.164 g	100 ml	H <sub>2</sub> Od	5mM	
EDTA C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> NCl <sub>2</sub> – 2 H <sub>2</sub> O.	3.72 g	100 ml	H <sub>2</sub> Od	100mM	
Tritón X-100	1 ml	99 ml	H <sub>2</sub> Od		

\*Esterilizados 18 minutos 1.3 kg/ cm<sup>3</sup> o 1.8 lib/pulg.

- Aforar a 50 ml de vol/final con H<sub>2</sub>O.
- Esterilizar por filtración con membrana milipore 0.22 cm.
- La solución final es cubierto con papel aluminio.
- Conservarse a 4 °C.

### “Buffer Z”

Para 50 ml

	Concentración (mM)	Gramo
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	40	2.76
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60	4.26
KCl	10	0.37
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1	0.12
	pH 7.4	

\* Se esteriliza 18 minutos.

### Prueba de expresión transitoria.

1er día

- Los callos bombardeados son bañados con 1 ml de solución X-GLUC y se incuban a 37 °C, por un periodo de 12 a 16 h, los recipientes que portan a los callos deben estar cubiertos con papel aluminio y en el cuarto oscuro.

3er día

- Se desecha la solución X-GLUC y se lavan 2 veces el callo con 1.5 ml de “buffer Z”.
- Se lava en etanol al 70 % (1.5 ml/lavado), 4 veces.
- La clorofila se elimina con 1.5 ml de una mezcla de acetona-metano (1:3).
- Después de observar el color azul producto de la reacción, las células se lavan con “buffer Z”.
- Finalmente para conservar los callos se le agrega 1.5 ml de glicerol al 50 %.

## Solución con ADN para bombardeo

1. 50  $\mu$ l de partículas.
2. DNA 5  $\mu$ l ( $\mu$ g/ $\mu$ l).
3. 50  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  (2.5 M).
4. 20  $\mu$ l de espermidina (0.1 M).
5. Vortexear. (5 s)
6. Centrifugar 5 s.
7. Tomar 100  $\mu$ l del sobrenadante.
8. Resuspender cada vez que se tome la muestra.

## Medio M<sub>1</sub> (para un litro)

Adenina	Cocttel 20	2,4-D	BAP	L-prolina	Caseina hidrolizada
MS (I)					5 ml
MS (II, III, IV, V)					10 ml
Adenina					10 ml
Cocttel 20					10 ml
Antioxidante					2 ml
2,4-D					60 ml
BAP					3 ml
Azucar					30 g
Caseina hidrolizada					200 mg
L-prolina					720 mg
pH 5.7					
Gellan gum					2.5 g

\*Adenina: 6-aminopurina hemisulfato.

## Medio SH/ L

Medio	Observaciones
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sales SH (A,B,C,D,E).</li><li>• Vitamina SH.</li><li>• 2,4 – D (hormona).</li><li>• Kinetina.</li><li>• Antioxidante</li><li>• Inositol (Mioinositol)</li><li>• Azucar</li><li>• pH.</li><li>• Phytigel (Gellam gum).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 ml ( de cada sal).</li><li>• 10 ml.</li><li>• 30 ml</li><li>• 10 ml</li><li>• 5 ml</li><li>• 100 mg</li><li>• 30 g</li><li>• 5.8</li><li>• 2.5 g</li></ul> <p>Se calienta en el horno 3 min/2 veces y 4 min/1 vez. En total 10 minutos.</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Se agrega 30 ml por frasco y se esteriliza 18 minutos (presión 1.2 kg/cm<sup>3</sup> (17 p.s.i.) y temperatura de 120 °C).</li></ul>	

\*En el caso de medios para bombardeo aumenta el gellan 3g/L

Myo-Inositol: Cis-1,2,3,5-trans-4,6-cyclohexanehexol (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>).

## Medio N<sub>6</sub>P (para un litro)

N <sub>6</sub> ( I, II, III, IV, V)	5 ml
Cocttel 20	10 ml
Adenina	10 ml
Kinetina	1 ml
2,4-D	10 ml
BAP	3 ml
Caseina hidrolizada	200 mg
L-prolina	720 mg
pH 5.7	2.3 g

Gellan gum 2.5 g

**Medio MS/L** (sin hormonas)

MS (I, II, III, IV, V) 10 ml

Vit R<sub>2</sub> 10 ml

Glicina 10 ml

Azucar 30 g

pH 5.7

Gellan gum 2.5 g

**Preparación de Basta (Glufosinato de amonio)**

- En la campana de flujo laminar pesar 10 mg del reactivo (lo más exacto).
- Verter el polvo en un recipiente estéril y agregar agua desionizada estéril.
- Agitar hasta disolver totalmente.
- En probeta, aforar el volumen final de 10 ml.
- Esterilizar por filtración con membrana milipore 0.22 cm.
- Tomar la solución con la jeringa, quitar la aguja y colocar el porta filtro.
- Agregar lo filtrado en el tubo Falcon y cubrirlo con aluminio.
- Mantener a 4 °C.

**Medio YM**

0.4 g de extracto de levadura

10 g manitol

0.1 g NaCl

0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O, ó 0.38 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Disolver en 900 ml, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1 L. Autoclavear