



**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* EN
FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)**

JHON JAIRO BARRERA MORENO

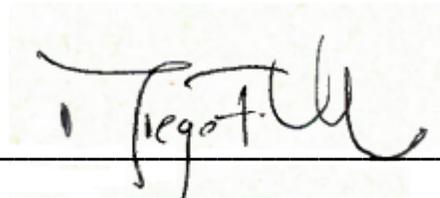
**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

"Aprobado"

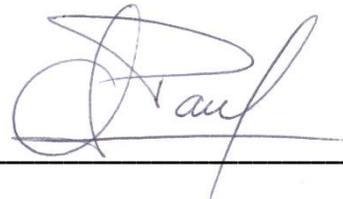
Ph.D., M.Sc., Biólogo. Jaime Alberto Marín Colorado

Jurado



Ph.D., M.Sc., Biólogo. Diego Fernando Villanueva Mejía

Jurado



Ph.D., M.Sc., Biólogo. Paul Chavarriaga Aguirre

Director



M.Sc., Biólogo. Jorge Pachón García

Codirector

Villavicencio, 23 de Abril de 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Paul Chavarriga y a todo el grupo de trabajo de la Plataforma de Transformación del CIAT por todas las enseñanzas y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

Al Doctor Steve Beebe y al programa de frijol del CIAT por haber hecho posible este proyecto.

A la Universidad de los Llanos, especialmente al director del programa de Biología Jorge Pachón y docentes del programa, por haberme brindado las mejores herramientas para mi formación a nivel personal y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. Informe final	6
2 RESUMEN	8
3 LISTA DE FIGURAS.....	10
4 LISTA DE TABLAS.....	12
5 LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	14
6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
7 OBJETIVOS	16
7.1 Objetivo general.....	16
7.2 Objetivos específicos.....	16
8 JUSTIFICACIÓN.....	17
9 MARCO TEÓRICO.....	18
9.1 REGENERACIÓN	18
9.2 TRANSFORMACIÓN	21
10 METODOLOGÍA.....	24
10.1 MATERIAL VEGETAL.....	24
10.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE AGROBACTERIUM	26
10.3 INOCULACIÓN Y COCULTIVO	27
10.4 INDUCCIÓN DE BROTES.....	28
10.5 ENRAIZAMIENTO	28
10.6 ELONGACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE PLANTAS EN SUELO.....	29
10.7 ENSAYO DE MORTALIDAD DE EXPLANTES POR HIGROMICINA.....	29
10.8 ENSAYO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN GUS.....	30
10.9 PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL T-DNA POR PCR	31
11 RESULTADOS	32
11.1 MATERIAL VEGETAL.....	32
11.2 EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN GUS.....	33
11.3 ENSAYO DE MORTALIDAD DE EXPLANTES POR HIGROMICINA.....	34
11.4 INDUCCIÓN DE BROTES.....	36
11.5 ENRAIZAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN SUELO	41
12 DISCUSIÓN.....	45

12.1	ENSAYO DE MORTALIDAD DE EXPLANTES POR HIGROMICINA.....	45
12.2	HIPERHIDRICIDAD.....	45
12.3	EXPRESIÓN DEL GEN GUS EN TRICOMAS	46
12.4	INDUCCIÓN DE BROTES.....	47
12.5	ENRAIZAMIENTO Y ELONGACIÓN	47
12.6	PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL T-DNA POR PCR	48
13	CONCLUSIONES	49
14	REFERENCIAS.....	50
15	ANEXOS	56
15.1	ANEXO 1. Protocolo de extracción de ADN.....	56
15.2	ANEXO 2. Protocolo de PCR	59
CAPÍTULO 2. Artículo científico resultado de investigación		62

CAPÍTULO 1. Informe final

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* EN
FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)**

JHON JAIRO BARRERA MORENO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director: Paul Chavarriaga Aguirre

Ph.D. M.Sc., Biólogo

Codirector: Jorge Pachón García

M.Sc., Biólogo

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

2 RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para el consumo directo humano. Es considerado la principal fuente de proteína para millones de personas a nivel mundial, principalmente en los países en vía de desarrollo. Dentro del contexto de mejoramiento genético con tecnologías no convencionales como la biotecnología, *P. vulgaris* se ha caracterizado por ser recalcitrante tanto al proceso de regeneración *in vitro* como a la transformación genética. Hasta el momento no existen reportes de un protocolo eficiente y reproducible de transformación genética de frijol común. Por esta razón, el propósito de este trabajo fue desarrollar un protocolo de transformación genética mediado por *A. tumefaciens* basado en los protocolos existentes para soya (*Glycine max* L.). La transformación se llevó a cabo a partir de explantes del nudo cotiledonar, con la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 en tres variedades de frijol de interés comercial (Chauchachuga, ICA Quimbaya y Calima). Se realizaron pruebas de expresión transitoria del gen GUS, las cuales dieron positivas en las tres variedades. Adicionalmente, se logró la regeneración vía organogénesis directa de plantas en las tres variedades de frijol evaluadas y se obtuvieron dos plántulas putativamente transgénicas de la variedad ICA Quimbaya, en las cuales se detectó la presencia del gen GUS mediante PCR.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, Transgénesis, Cultivo de tejidos *in vitro*, Nudo cotiledonar.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for direct human consumption. It is considered the main source of protein for millions of people worldwide, mainly in developing countries. Within the context of genetic improvement with unconventional technologies such as biotechnology, *P. vulgaris* has been characterized as being recalcitrant to both the process of in vitro regeneration and genetic transformation. So far there aren't reports of an efficient and reproducible genetic bean transformation protocol. For this reason, the purpose of this work was to develop a genetic transformation protocol mediated by *A. tumefaciens* based on the existing protocols for soybean (*Glycine max* L.). The transformation was carried out from explants of the cotyledonary node, with the strain of *A. tumefaciens* EHA105 in three bean varieties of commercial interest (Chauchachuga, ICA Quimbaya and Calima). Transient expression tests of the GUS gene were performed, which were positive in all three varieties. Additionally, regeneration was achieved via organogenesis of plants in the three bean varieties evaluated and two putatively transgenic seedlings of the ICA Quimbaya variety were obtained, in which the presence of the GUS gene was detected by PCR.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Transgenesis*, *In vitro tissue culture*, *cotyledonary node*.

3 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variedades de frijol utilizadas en los experimentos. (A) Chauchachuga (G19833), (B) Calima e (C) ICA Quimbaya. Las tres variedades utilizadas pertenecen al acervo de frijol común Andino.....23

Figura 2. Representación del fragmento del T-DNA del plásmido pCAMBIA 1305.2. De izquierda a derecha: RB, borde derecho del T-DNA. CaMV35s, promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor controlando el gen GusPlus con terminador Nos. HPTII, gen de resistencia a higromicina con promotor doble 35S (2x35S) y terminador 35S. LB, borde izquierdo del T-DNA.....25

Figura 3. Preparación de explantes para inoculación con *A. tumefaciens*. La línea punteada roja indica los sitios de corte del hipocótilo y el epicótilo para retirar la plúmula. Las líneas azules indican las heridas realizadas en la zona del nodo cotiledonar. C= Cotiledón, P= Plúmula, H= Hipocotilo, R= Radícula, NC= Nodo cotiledonar.....26

Figura 4. Ensayo de mortalidad de explantes por higromicina a los 14 días de inducción. (A) explantes control variedad Calima con crecimiento de brotes en medio SI/b0 sin higromicina. (B) explantes sin crecimiento de brotes y necrosamiento en la zona de contacto con el medio SI/b10 (higromicina [10 mg/L]). Barra: 25 mm.....34

Figura 5. Inducción de brotes de frijol de la variedad Calima a los 14 días de cultivo en medio de selección SI/b1. Barra: 15 mm.....36

Figura 6. Explantes de frijol variedad Calima en medio de inducción de brotes contaminados por bacteria. (A) El crecimiento de la bacteria inicia desde la zona de crecimiento de los brotes contaminando la mayor parte del explante y el medio. (B) el crecimiento de la bacteria se concentra en zonas del cotiledón que sobresalen del medio. La flecha señala el crecimiento de la bacteria sobre la parte superior del cotiledón. Barra en A: 20 mm. B: 8 mm.....37

Figura 7. Inducción de brotes de frijol variedad Chauchachuga (A) y Calima (B) a los 21 días de cultivo de los explantes en medio SI/b5. Barra: 6 mm.....37

- Figura 8.** Explantes con brotes vitrificados de la variedad Ica Quimbaya (A), Chauchachuga (B) y Calima (C). (D) brote con morfología definida creciendo del explante vitrificado. (E) brote observado en la figura D, extraído del explante y enraizado en medio RM. Barra en A: 5 mm. B: 5 mm. C: 2mm. D: 6 mm. E: 10 mm.....38
- Figura 9.** (A) Expresión del gen GUS en los tricomas de un brote de la variedad Chauchachuga. (C) Hoja control sin tinción en los tricomas después de ser expuesta a la prueba GUS. Barras: A y B: 3 mm, C: 5 mm.....39
- Figura 10.** Prueba GUS positiva en callos resistentes a higromicina originados de explantes en la etapa de inducción de brotes en medio SI/b5. Barra: 20 mm.....40
- Figura 11.** Brote de la variedad Chauchachuga con crecimiento de raíz en medio RM. El enraizamiento se llevó a cabo dejando la base del brote en inmersión durante un minuto en una gota de IBA [0.1 mg/ml]. Barra: 20 mm.....41
- Figura 12.** Plántulas de frijol en cámara húmeda al cuarto día de haber sido sembradas en suelo. Las plántulas con el código CH pertenecen a la variedad Chauchachuga; con el código CA, a la variedad Calima y con el código ICA, a la variedad ICA Quimbaya...41
- Figura 13.** Resultados del PCR para las plántulas evaluadas de ICA Quimbaya. En la figura de la derecha, las columnas E14.1.1 y E14.1.2 muestran productos de PCR que coinciden en tamaño con el producto amplificado para el gen GUS. En la foto de la izquierda se amplificó el gen VIR para descartar la posibilidad de que la presencia del gen GUS en las plántulas se debiera a residuos de la bacteria.....42
- Figura 14.** Plantas de frijol variedad Chauchachuga (Izquierda) y variedad Calima (Derecha) regeneradas a partir de nodos cotiledonares.....42

4 LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de medios de cultivo empleados. Definición de siglas: GM= germinación, CC= cocultivo, SI/w= lavado, SI= inducción de brotes, RM= enraizamiento, SE= elongación. Para las sales mayores y menores B5 (Gamborg *et al.*, 1968), las sales mayores y menores MS (Murashige y Skoog, 1962) y las vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), se indica la concentración del stock utilizado.....24

Tabla 2. Escala propuesta para evaluar los grados de expresión transitoria del gen GUS con base en el porcentaje de tinción (color azul) en cada explante.....30

Tabla 3. Resultados de la prueba de esterilización de semillas de las variedades de frijol Chauchachuga, Calima e ICA Quimbaya. El porcentaje de supervivencia se estableció como el número de semillas sin contaminación sobre el número total de semillas sembradas inicialmente en medio GM.....32

Tabla 4. Resultados del ensayo de expresión transitoria del gen GUS y prueba Chi cuadrado para el grado de expresión entre las tres variedades de frijol evaluadas. Grados de expresión GUS transitoria: 1= Menos del 35% de la zona teñida, 2= 35 – 70% de tinción, 3= Más del 70% de tinción. Para cada casilla se muestran tres resultados los cuales corresponden a: frecuencia, esperados y porcentaje, en orden de arriba hacia abajo.....33

Tabla 5. Ensayo de mortalidad de explantes por efecto de la higromicina. Número de explantes de la variedad Chauchachuga con crecimiento de brotes transcurridos 14 días en medio SI con distintas concentraciones de higromicina. SI/b0= [0 mg/L], SI/b1= [1 mg/L], SI/b5= [5 mg/L], SI/b10= [10 mg/L] y SI/b15= [15 mg/L]. El porcentaje de supervivencia se estableció como el número de explantes con al menos un brote a los 14 días de cultivo sobre el número total de explantes sembrados.....34

Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de las variedades Chauchachuga, Calima e ICA Quimbaya a los 14 días de inducción de brotes en medio SI/b1. El porcentaje de sobrevivencia se definió como el número total de explantes que pasaron a la etapa de inducción en SI/b5 sobre el total de explantes sembrados inicialmente en medio SI/b1.....36

Tabla 7. Resultado final de las plantas inicialmente transferidas a suelo, cuántas de ellas resultaron potencialmente transgénicas mediante análisis por PCR (Figura 13) y el número de plantas que lograron establecerse y producir semilla.....43

5 LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BAP: 6-Bencilaminopurina

CaMV35S: promotor 35S del virus del mosaico del coliflor

CC: cocultivo

CN: nodo cotiledonar

DTT: Ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GA3: ácido giberélico

GM: germinación

GUS: β -glucuronidasa

HCL: ácido clorhídrico

IBA: ácido indolbutírico

KOH: hidróxido de potasio

MES: ácido 2-morfolinoetanosulfónico

MS: Murashige & Skoog

Na: sodio

OD: densidad óptica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RM: enraizamiento

SE: elongación de brotes

SI: inducción de brotes

TDZ: Tidiazurón

6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado una de las fuentes principales de proteína para millones de personas en América Latina y África (Dillen *et al.*, 1999; Gepts, 2001). A nivel global, es cultivado en más de 12 millones de hectáreas y su producción anual es de aproximadamente nueve millones de toneladas métricas (Aragao *et al.*, 2010). Tan solo en el continente americano, región donde se presenta la mayor producción, se producen 6,7 millones de toneladas; de las cuales, 2,5 millones proceden de Brasil, quien es el mayor productor y consumidor de frijol común (Miklas y Singh, 2007). Una gran parte de su producción se pierde a causa de estreses que involucran entre otros la baja fertilidad de los suelos, enfermedades, plagas y sequía (Broughton *et al.*, 2003). Adicionalmente, su consumo se ve limitado debido a la presencia de factores antinutricionales en la semilla, que resultan perjudiciales para la salud humana (da Silva-Fialho *et al.*, 2006). Ante este panorama, la ingeniería genética, específicamente la transformación genética, resulta ser una alternativa interesante para que en conjunto con las técnicas de mejoramiento clásico, se puedan mejorar dichas características y así hacer frente a esta problemática (De Clercq *et al.*, 2002). Un incremento en el rendimiento de la producción y el mejoramiento de la calidad nutricional del frijol, tendrían importantes repercusiones en la salud de millones de personas en el mundo, principalmente en los países en desarrollo (Broughton *et al.*, 2003; Beaver y Osorno, 2009). Sin embargo, uno de los principales limitantes para este propósito consiste en que hasta el momento no existe un protocolo *in vitro* eficiente y reproducible que permita transformar de manera estable a *P. vulgaris* (Beaver y Osorno, 2009). Sólo de manera directa a través del bombardeo de partículas se han obtenido plantas transgénicas, no quiméricas, verificadas mediante Southern blot aunque con tasas de transformación relativamente bajas (0,03 y 0,9) (Russell *et al.*, 1993; Aaragão *et al.*, 1996). Por esta razón, se ha insistido en transformar a *P. vulgaris* establemente mediante *Agrobacterium tumefaciens*, debido a que la precisión del mecanismo de integración, la tendencia a generar inserciones únicas y limpias (sin insertos de ADN no deseados), y el menor costo operacional constituyen una considerable ventaja sobre los mecanismos de transferencia directa de genes con biobalística (Broughton *et al.*, 2003).

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Adaptar en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) un protocolo de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, a partir de una metodología eficiente en soya.

7.2 Objetivos específicos

- Probar al menos tres variedades de frijol para su capacidad de respuesta a la transformación transitoria mediante *A. tumefaciens*, con el uso del gen reportero GUSPlus.
- Desarrollar un medio de cultivo de inducción de brotes a partir de nodos cotiledonares de frijol, basado en los protocolos para soya.

8 JUSTIFICACIÓN

Transformar de manera estable a *P. vulgaris* para conferirle defensa contra plagas y enfermedades, o resistencia a diferentes tipos de estreses abióticos podría mejorar la calidad de la semilla e incrementar su rendimiento (Svetleva, Velcheva, & Bhowmik, 2003). Esto sería de gran beneficio para millones de personas, principalmente en los países subdesarrollados, cuyo aporte de proteína en la dieta depende fundamentalmente del frijol. Por otra parte, en la actualidad la edición de genomas se presenta como una herramienta prometedora en el campo del mejoramiento genético de plantas cultivadas. En este sentido, con el uso de la transformación mediada por *A. tumefaciens* como vía para editar el genoma de frijol con CRISPR/Cas9, se podría mejorar su calidad nutricional. Esto debido a que su consumo se ve limitado a causa de la presencia de oligosacáridos del tipo rafinosa, estaquiosa y verbascosa, que actúan como factores antinutricionales causantes de diarrea, flatulencia y desordenes gastrointestinales (da Silva-Fialho *et al.*, 2006). Variedades de frijol mutantes específicamente para las enzimas encargadas de la síntesis de estos oligosacáridos tendrían menores concentraciones de dichos compuestos, como ya ha sido reportado en variedades de soya, lo cual sería de gran beneficio para su consumo (Qiu *et al.*, 2015).

9 MARCO TEÓRICO

9.1 REGENERACIÓN

Mcclean y Grafton (1989), regeneraron plantas de frijol común, cultivares Olathe y Othello, utilizando nodos cotiledonares como explantes. En dicho trabajo se evaluaron diferentes concentraciones de BAP para inducir brotes y yemas. La mejor respuesta se obtuvo con BAP 5 μ M. Adicionalmente, el procedimiento de regeneración fue evaluado en cuatro cultivares adicionales (Pindak, Nodak, Midlan y Bozman), entre los cuales el cultivar Bozman no respondió de manera eficiente al sistema de regeneración.

Santalla *et al.* (1998) , desarrollaron un sistema de regeneración directa a partir de nodos cotiledonares, el cual fue evaluado en 10 líneas elite de mejoramiento de *P. vulgaris* y siete variedades domesticadas de *P. coccineus*, Los investigadores incluyeron a *P. coccineus* en su investigación dado que el cruce de esta especie con *P. vulgaris* es el más común incluyendo las otras especies domesticadas del género Phaseolus, debido básicamente a que solo *P. coccineus* se encuentra en el pool genético secundario de *P. vulgaris*. Dicho sistema de regeneración resultó ser altamente genotipo dependiente para las dos especies evaluadas, encontrándose mejor respuesta a la regeneración en las variedades de *P. coccineus*.

Dang y Wei (2009) regeneraron plantas de frijol común cultivar Hacaidou a partir de nodos cotiledonares, los cuales fueron obtenidos cortando el eje embrionario en dos mitades mientras todavía este estaba unido a los cotiledones, por lo que los explantes contenían un cotiledón con una pequeña porción de eje embrionario dividido unido a ella. La frecuencia de regeneración fue de aproximadamente 10 plantas por explante. En su sistema, la utilización de nitrato de plata en el medio de regeneración incrementó considerablemente la formación de brotes de un 61.3% a un 87.6 %. El nitrato de plata pudo influenciar positivamente la división celular y diferenciación debido a que es un potente inhibidor competitivo del etileno.

Delgado-Sánchez *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo de organogénesis directa en frijol común a partir de ejes embrionarios. Para llevar a cabo el ensayo fueron utilizados

los cultivares Flor de Junio Marcela y Flor de Mayo Anita. Los autores ensayaron diferentes concentraciones de BAP y hemisulfato de adenina (A) en el medio de inducción y multiplicación de brotes. La mejor respuesta para el cultivar Flor de Junio Marcela se obtuvo con 10 mg/l de BAP y 40 mg/l de A, lo cual se tradujo en 10 plantas regeneradas a partir de 30 ejes embrionarios. En cuanto al cultivar Flor de Mayo Anita, la eficiencia del procedimiento fue menor con 5 plantas regeneradas a partir de 30 explantes, obtenidas con el tratamiento de 10 mg/l de BAP y 20 mg/l de A.

Kwapata *et al.* (2010) desarrollaron un sistema de regeneración de múltiples brotes y embriones somáticos a partir de ejes embrionarios en diez variedades de frijol común (Montcalm, Redhawk, Beluga, Condor, Jaguar, Seahawk, Matterhorn, Merlot, Sedona y Olathe). En dicho sistema la suplementación del medio de inducción con antioxidantes (Nitrato de plata y carbón activado) favoreció significativamente la regeneración y producción de nuevos brotes, minimizando el efecto negativo de la producción de compuestos fenólicos. El sistema de regeneración no respondió de manera eficiente para las 10 variedades evaluadas indicando genotipo dependencia.

Quintero-Jiménez *et al.* (2010), regeneraron plantas a partir de ejes embrionarios en cuatro cultivares de frijol común (A-petito, Flor de Mayo Anita, ICA Palmar y Pinto Saltillo). Evaluaron los medios de cultivo MS (Murasnige y Skoog, 1962) y Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) para la respuesta tanto a la inducción de brotes como a la obtención final de plantas. Entre dichos medios el de Gamborg fue el que presentó una mejor respuesta tanto a la inducción de brotes (98–100%) como a la obtención de plantas (93%).

Gatica Arias *et al.* (2010) regeneraron plantas a partir de ejes embrionarios en cinco variedades de frijol común (Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar y Telire). El procedimiento de regeneración resultó altamente genotipo dependiente, no obstante, los autores encontraron que la suplementación del medio de inducción con 5 mg/l de BAP y 20 o 40 mg/l de Sulfato de adenina fue la más favorable para la formación de brotes independientemente del genotipo evaluado.

Cruz de Carvalho *et al.* (2000) regeneraron plantas de frijol común, cultivar Carioca, con el uso del método de capa de células delgadas, el cual consistió en escindir

transversalmente capas de tejido (de 0.3 – 0.5 mm de grueso) a partir de epicótilo hipocótilo, cotiledón y raíces. Dichos autores resaltaron la eficacia del tiazurón (TDZ) sobre la inducción de múltiples brotes en su sistema. Así mismo, destacaron el uso de BAP junto a nitrato de plata (AgNO_3) como inhibidor del etileno para así contrarrestar sus efectos negativos y mejorar el número de nuevos brotes por explante, ya que el 100% de dichos explantes regeneraron brotes mientras que en el control sólo el 42%.

El primer reporte de regeneración indirecta para *Phaseolus vulgaris* fue proporcionado por Mohamed *et al.* (1993). En dicho trabajo los investigadores obtuvieron callo con la capacidad de diferenciarse y regenerar plantas a partir de pedicelos, pero con la limitante de que dicha capacidad dependía de las propiedades específicas del explante utilizado, ya que con el uso de hipocótilos y hojas colideonares no se logró regeneración de plantas. Así mismo, el procedimiento resultó ser genotipo dependiente. En total lograron regenerar dos variedades de las cinco ensayadas, cabe resaltar que las variedades en las que fue posible la regeneración, Xan-159 y Tara, son híbridos producto del cruce entre *P. acutifolius* y *P. vulgaris*. Posteriormente, Zambre *et al.* (1998) regeneraron plantas del cultivar Xan-159 vía organogénesis indirecta a partir de la obtención de callos embriogénicos producidos en cotiledones. No obstante, a pesar del éxito en la regeneración, el procedimiento resultó ser genotipo dependiente, con la restricción de que el cultivar usado es un híbrido entre *P. acutifolius* y *P. vulgaris*.

Arellano *et al.* (2009), desarrollaron un protocolo vía organogénesis indirecta para el cultivar Negro Jamapa a partir de nodos cotiledonares y meristemas apicales. La mejor respuesta para inducir callo morfogénico se obtuvo con la suplementación del medio de cultivo con 2,4-D 1.5 ó 2 μM en combinación con BAP 0.1 μM . Así mismo, la mayor regeneración de brotes fue obtenida con la suplementación del medio de inducción con BAP 22.2 μM . El protocolo fue reproducible para otras nueve variedades, aunque con diferentes resultados en cuanto al número de brotes por callo regenerado (desde 0.16 en el cultivar Flet Wood hasta 0.68 brotes en el cultivar Carioca).

El último reporte hasta la fecha en regeneración indirecta lo proporcionaron Collado *et al.* (2013). En dicho trabajo se obtuvieron plantas vía organogénesis indirecta utilizando como explante nodos cotiledonares con uno o dos cotiledones. Inicialmente el

procedimiento de regeneración se llevó a cabo para el cultivar CIAP7247F. Una vez dicho protocolo fue optimizado se probó en otros cuatro cultivares (ICA Pijao, BAT93, BAT304 y BAT482) en los que se logró regenerar plantas. Sin embargo, la respuesta de cada cultivar al procedimiento fue significativamente diferente en cuanto al porcentaje de callo que produjo al menos un brote (desde un 32.9% en el cultivar BAT93 hasta un 85.3% en ICA Pijao) y el número de brotes por callo (desde 2.35 brotes en el cultivar BAT93 hasta 4.8 brotes en ICA Pijao).

9.2 TRANSFORMACIÓN

Múltiples esfuerzos han sido realizados desde principios de los noventa hasta la fecha para establecer un protocolo de transformación genética eficiente en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Dentro de los avances realizados se han implementado la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, metodología indirecta, así como el bombardeo de partículas o biobalística, metodología directa. Lo cierto, es que a pesar de la importancia de *P. vulgaris* a nivel económico, los esfuerzos realizados no han sido exitosos en establecer protocolos que efectivamente permitan la transformación genética de la especie de manera eficiente.

Mediante transformación directa, específicamente bombardeo de partículas, ha sido posible la obtención de plantas de frijol común transgénicas. No obstante, las frecuencias de transformación para obtener dichas plantas han sido muy bajas y, además, han manifestado menor herencia estable (Collado *et al.*, 2016). El primer aporte fue proporcionado por Russell *et al.* (1993). En dicha investigación se obtuvieron múltiples ápices, a partir de meristemos de semillas, de los cuales se lograron establecer plantas con una tasa del 0.03%. En esta misma línea, Aragão *et al.* (1996) obtuvieron plantas transgénicas de frijol, con una frecuencia de transformación del 0.9%, a partir de ejes embrionarios. Así mismo, mediante el uso de biobalística, también fueron obtenidas plantas de frijol común transgénico con resistencia al virus del mosaico dorado (BGMV) (Aragão *et al.*, 1998) y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (Aragão *et al.*, 2002).

En cuanto a la transformación genética indirecta en frijol común, Mariotti *et al.* (1989) reportaron, por primera vez, la obtención de plantas transgénicas mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. No obstante, dicho reporte no presentó ninguna evidencia molecular que respaldara la transformación y tampoco reproducibilidad. McClean *et al.* (1991) demostraron la susceptibilidad del frijol común a la infección por *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*. Estos autores lograron la obtención de callos transgénicos, a partir de nodos cotiledonares, y raíces transgénicas, a partir de hipocótilos. No obstante, no pudieron regenerar plantas a partir de ninguno de estos dos tejidos. Posteriormente, Franklin *et al.* (1993) obtuvieron callo, a partir de tejido foliar e hipocótilos, resistente al antibiótico kanamicina, positivos para la prueba β -glucuronidasa (GUS). Sin embargo, no se pudieron obtener plantas transgénicas de dicho callo. Con el objetivo de optimizar el procedimiento de transformación mediada por *A. tumefaciens* en frijol común, Zhang *et al.* (1997) estudiaron una serie de factores que afectan el proceso. Entre dichos factores, los autores recomendaron: el uso de genotipos susceptibles, explantes provenientes de semillas maduras y un periodo de 5 a 15 minutos de inoculación con *Agrobacterium* ($OD_{650}=0.8-1.0$). No obstante, este estudio se basó principalmente en pruebas de tinción GUS transitorias, debido a que no se obtuvo ninguna transformación estable.

Dillen *et al.* (1997), lograron la primera transformación genética estable mediada por *Agrobacterium* en el género *Phaseolus*, específicamente en el frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Dicho procedimiento consistió en la obtención de callo nodular capaz de regenerar brotes, de los cuales se obtuvieron plantas transformadas. Posteriormente, Zambre *et al.* (2005), desarrollaron un método, también en frijol tépari, altamente eficiente y reproducible de transformación mediada por *Agrobacterium*. Con base en dichos trabajos, podrían ser realizados cruces interespecíficos con el objetivo de transferir rasgos de interés desde el frijol tépari transformado al frijol común, no obstante, este tipo de procedimientos consumen un tiempo considerable y resultan costosos (Beaver y Osorno, 2009).

Liu *et al.* (2005), con el uso de un sistema de transformación sin cultivo de tejidos *in vitro*, reportaron la obtención de plantas transformadas de frijol común, que manifestaban tolerancia consistente a la sal y a déficit hídrico. Dicho sistema consistió en asistir con infiltración al vacío y sonicación la transformación mediada por *A. tumefaciens*, para posteriormente a la inoculación, transferir la semilla de frijol directamente a suelo. Sin embargo, poco se ha profundizado en esta técnica de transformación y tampoco ha sido reportado, hasta la fecha, ningún estudio donde se replique este procedimiento. Amugune *et al.* (2011) obtuvieron brotes a partir de embriones maduros transformados con la cepa LBA 4404 (Pbi 121) de *A. tumefaciens*. Pasadas 40 semanas bajo selección, estos brotes fueron confirmados positivos para la prueba de tinción GUS, sin embargo, resultaron ser quiméricos y no se pudieron obtener plantas a partir de ellos.

Recientemente, Mukeshimana *et al.* (2013) evaluaron algunos de los factores que influyen en la regeneración y transformación mediada por *Agrobacterium* de *Phaseolus vulgaris*. Aspectos como: la cepa de *A. tumefaciens*, el periodo de cocultivo, el tipo de explante y genotipo de la planta, resultan ser definitivos en la transformación genética en frijol común. Dichos investigadores encontraron que, a pesar de que el eje embrionario resultó ser el explante más adecuado a la hora de regenerar brotes después de la transformación, esta fue ineficiente puesto que los transformantes obtenidos eran quiméricos y no lograron establecerse una vez fueron trasplantados a suelo. Posteriormente, Collado *et al.* (2015), basados en un protocolo de organogénesis indirecta, reportaron la obtención de plantas putativas transgénicas de frijol común con una frecuencia de transformación del 2.8%. Sin embargo, es de resaltar que las plantas obtenidas en esta investigación fueron quiméricas y que, además, las pruebas moleculares para analizar la transgénesis se limitaron sólo a análisis con PCR. Finalmente, Collado *et al.* (2016), desarrollaron un eficiente protocolo de regeneración vía organogénesis directa de tejido no meristemático (epicótilo). Así mismo, evaluaron algunos parámetros involucrados en el proceso de transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* a frijol común. Sin embargo, no lograron ninguna transformación estable mediante este protocolo, puesto que las plantas obtenidas fueron quimeras.

10 METODOLOGÍA

10.1 MATERIAL VEGETAL

Para llevar a cabo el proceso de transformación se utilizaron semillas de frijol de las variedades andinas Chauchachuga, Calima e Ica Quimbaya (Figura 1), proporcionadas por el programa de frijol del CIAT. Dichas semillas fueron esterilizadas superficialmente en platos Petri durante 16 horas con gas cloro, el cual se produjo a partir de la mezcla de 4 ml de HCl 12 N con 100 ml de clorox comercial (Di *et al.*, 1996), con la ayuda de una cabina de extracción de gases. Una vez esterilizadas las semillas fueron colocadas en platos Petri de 100 x 20 mm (10 semillas por plato de cultivo) con medio de germinación (GM) (Tabla 1). Se colocaron de a cinco platos de germinación, uno sobre otro, y se envolvieron en una bolsa plástica, a la cual se le realizaron cuatro cortes de aproximadamente 6 cm para permitir ventilación. Finalmente, los platos Petri con las semillas se dejaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante dos días. Para la preparación de todos los medios de cultivo el respectivo pH se ajustó con KOH 5N o HCL 1N antes de esterilizar a $1 \text{ Kg } 121^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos en la autoclave. Componentes como: vitaminas, hormonas, antibióticos, acetosiringona, aminoácidos, DTT, tiosulfato de sodio y nitrato de plata fueron agregados a los respectivos medios después de ser esterilizados por filtración.



Figura 1. Variedades de frijol utilizadas en los experimentos. (A) Chauchachuga (G19833), (B) Calima e (C) ICA Quimbaya. Las tres variedades utilizadas pertenecen al acervo de frijol común Andino.

Tabla 1. Lista de medios de cultivo empleados. Definición de siglas: GM= germinación, CC= cocultivo, SI/w= lavado, SI= inducción de brotes, RM= enraizamiento, SE= elongación. Para las sales mayores y menores B5 (Gamborg *et al.*, 1968), las sales mayores y menores MS (Murashige y Skoog, 1962) y las vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), se indica la concentración del stock utilizado.

Componentes	GM	CC líquido	CC	SI/w	SI	RM	SE
Sales mayores B5 10X	100 ml	10 ml	10 ml	100 ml	100 ml		
Sales menores B5 1000X	1 ml	0.1 ml	0.1 ml	1 ml	1 ml		
Sales mayores MS 10X						100 ml	100 ml
Sales menores MS 1000X						1 ml	1 ml
Hierro NaEDTA	4.3 g/l	430 mg/l	430 mg/l	4.3 g/l	4.3 g/l	4.3 g/l	4.3 g/l
Sacarosa	20 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
MES		3.9 g/l	3.9 g/l	0.6 g/l	0.6 g/l	0.6 g/l	0.6 g/l
Gelrite	3 g/l				3 g/l	3 g/l	3 g/l
Phytigel			5 g/l				
Vitaminas B5	10 ml	1 ml	1 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Acetosiringona		0.04 g/l	0.04 g/l				
GA3		0.25 mg/l	0.25 mg/l				0.6 g/l
BAP		1.7 mg/l	1.7 mg/l	1.7 mg/l	1.7 mg/l		
L-cisteína			0.4 g/l				
DTT			0.154 g/l				
Na-tiosulfato			0.158 g/l				
Timetin				0.05 g/l	0.05 g/l	0.05 g/l	0.05 g/l
Cefotaxime				0.1 g/l	0.1 g/l	0.1 g/l	0.1 g/l
Higromicina					1 ó 5 mg/l		
Nitrato de plata						3.18 mg/l	3.18 mg/l
pH	5.7	5.4	5.4	5.7	5.7	5.7	5.7

10.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE AGROBACTERIUM

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) portando el plásmido pCAMBIA 1305.2. Dicho plásmido confiere a la bacteria resistencia al antibiótico kanamicina y su T-DNA contiene el gen reportero β -Glucuronidasa (GUSPlus™) interrumpido por un intrón y con un promotor 35S. Como marcador de selección para plantas porta un gen de resistencia al antibiótico higromicina (HPTII) con un doble promotor 35S (Figura 2).



Figura 2. Representación del fragmento del T-DNA del plásmido pCAMBIA 1305.2. De izquierda a derecha: RB, borde derecho del T-DNA. CaMV35s, promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor controlando el gen GusPlus con terminador Nos. HPTII, gen de resistencia a higromicina con promotor doble 35S (2x35S) y terminador 35S. LB, borde izquierdo del T-DNA.

Directamente del cepario, mantenido en la plataforma de mejoramiento avanzado del CIAT, se tomó un stock de glicerol de la bacteria y con una micropipeta se agregaron 100 μ l a un Erlenmeyer con 50 ml de medio YEP líquido, previamente suplementado con los antibióticos kanamicina (50 mg/l) y rifampicina (60 mg/l). La bacteria se incubó en un agitador a 28°C (a 140 rpm toda la noche).

Cumplido el periodo de crecimiento de la bacteria, se midió la densidad óptica (OD) y se transfirió a un tubo Falcon (50 ml) para centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 30-50 ml de medio cocultivo (CC) líquido y se diluyó el pellet mediante vórtex, para finalmente medir el OD de la bacteria resuspendida (OD de 0.5 – 0.8).

10.3 INOCULACIÓN Y COCULTIVO

Los explantes del nodo cotiledonar (CN) fueron obtenidos a partir de semillas germinadas durante dos días. A cada semilla se le removió la radícula y después se realizó un corte a través del micrópilo para separar los dos cotiledones. Obtenidos los dos cotiledones, a cada uno se le retiró la plúmula y se procedieron a realizar de 5 a 7 cortes (0.5 mm de profundidad y 3 a 4 mm de largo) perpendiculares al eje de la unión entre el cotiledón y el hipocótilo (Figura 3). Después, se removió la testa e inmediatamente se introdujo el explante en el inóculo de *A. tumefaciens*. Se agitó manualmente el plato de inoculación aproximadamente cada 20 explantes preparados. Finalizada la inoculación de los explantes se procedió a transferirlos a medio de cocultivo (CC) (Tabla 1) cubierto con papel filtro (Whatman grado 1, 90 mm). Se colocaron máximo diez explantes por plato de cocultivo se sellaron con cinta micropore y se dejaron en cuarto de crecimiento a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante cinco días.

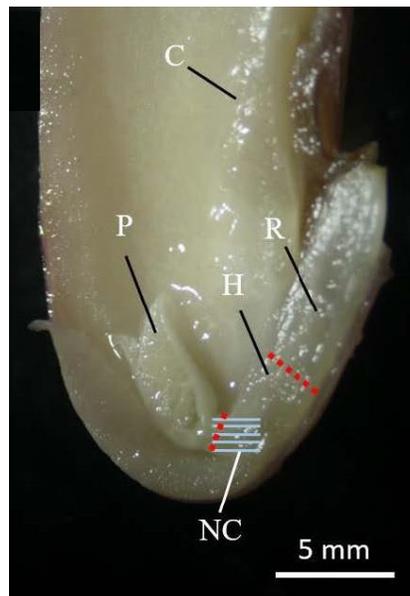


Figura 3. Preparación de explantes para inoculación con *A. tumefaciens*. La línea punteada roja indica los sitios de corte del hipocótilo y el epicótilo para retirar la plúmula. Las líneas azules indican las heridas realizadas en la zona del nodo cotiledonar. C= Cotiledón, P= Plúmula, H= Hipocotilo, R= Radícula, NC= Nodo cotiledonar.

10.4 INDUCCIÓN DE BROTES

Finalizado el periodo de cocultivo se depositaron los explantes en un matraz (250 ml) y se procedió a lavarlos con agua estéril destilada durante un minuto manualmente con agitación fuerte y constante; se descartó el agua y se repitió el mismo procedimiento al menos diez veces, hasta que no fueran visibles partículas en el líquido. Posteriormente se agregó medio de lavado (SI/w) (Tabla 1) y se realizó tres veces más el mismo procedimiento descrito arriba.

Una vez finalizado el lavado, los explantes se dejaron secar sobre platos Petri con papel servilleta estéril durante 20 minutos. Se colocaron de a 5 explantes por plato (100 x 20 mm) en medio de inducción de brotes (SI) (Tabla 1) de manera que la región de regeneración quedara incrustada en el medio con el lado plano hacia arriba aproximadamente en un ángulo de 45°. Cada plato se envolvió con cinta micropore y se dejó en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

10.5 ENRAIZAMIENTO

Para llevar a cabo el enraizamiento se extrajeron los brotes de cada explante que tuvieran un tamaño mayor a 1 cm realizando un corte fino en la base. Después, la zona de corte de cada brote se sumergió en una gota de 20 μl de IBA a una concentración de 0.1 mg/ml sobre un plato Petri estéril durante un minuto. Los brotes sembrados en medio de enraizamiento (RM) (Tabla 1) se dejaron en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

10.6 ELONGACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE PLANTAS EN SUELO

Los brotes que presentaran al menos dos raíces fueron retirados cuidadosamente, sin lastimar las raíces, del medio RM. Se sembraron individualmente en medio de elongación (SE) (Tabla 1) y se dejaron en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Una vez las plántulas crecieron 8 a 10 cm, se retiraron cuidadosamente del medio de cultivo, se lavaron las raíces con agua de grifo para retirar el exceso de medio y se transfirieron a potes con una mezcla de turba y vermiculita 2:1 respectivamente. Las plantas se dejaron en cámara húmeda durante 3 a 5 días, bajo las mismas condiciones en las que permanecieron antes de pasarlas a suelo. Al cuarto día fueron transferidas a una cámara incubadora Percival, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 12/12h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

10.7 ENSAYO DE MORTALIDAD DE EXPLANTES POR HIGROMICINA

Con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria del antibiótico higromicina sobre el crecimiento de las células y tejidos no transformados, se realizó un ensayo de mortalidad de explantes por el efecto de la higromicina. Dicho experimento consistió en evaluar la afectación de los explantes en términos de crecimiento o no de brotes en medio SI con cinco concentraciones diferentes de higromicina: 0, 1, 5, 10 y 15 mg/l. Por cada concentración se sembraron 20 explantes (preparados de igual forma que la mostrada en la figura 3) y se observó el desarrollo de estos a los 7 y 14 días de iniciado el experimento. Los platos de cultivo se dejaron en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 14 días.

10.8 ENSAYO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN GUS

El gen GUS codifica para la enzima β -glucoronidasa (β -D-glucoronide gluconohydrolase) cuya expresión se manifiesta en el tejido vegetal por la coloración azul que adquieren las células transformadas, a causa de la hidrólisis de sustratos colorigénicos como el 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucoronide (X-GLUC) y el p-nitrophenyl-glucoronide (PNPG,X-GLUC) (Naleway, J. 1992). Para evaluar la expresión transitoria del gen GUS en los explantes se desarrolló una escala, basada en el trabajo propuesto por Collado et al. (2015), con distintos grados de expresión según la proporción del área de interés teñida de azul en el cotiledón. Dicha escala consistió en tres grados de expresión, iniciando desde menos del 35% de la zona cotiledonar teñida hasta más del 70% (Tabla 2). Se evaluaron 30 explantes para cada una de las variedades utilizadas. El procedimiento de tinción de los explantes se llevó a cabo sumergiendo los tejidos en X-GLUC vertido en pozos de una placa múltiple Costar® a 37°C durante 5-10 horas (Zhang *et al.*, 1999). Finalizado el procedimiento se registraron los explantes antes y después de lavarlos con etanol al 90% para blanquearlos y visualizar mejor la tinción.

Tabla 2. Escala propuesta para evaluar los grados de expresión transitoria del gen GUS con base en el porcentaje de tinción (color azul) en cada explante.

Grado de expresión transitoria	Descripción	Tinción en el explante
1	Menos del 35% de la zona teñida	
2	35 – 70% de la zona teñida	
3	Más del 70% de la zona teñida	

10.9 PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL T-DNA POR PCR

Se realizaron pruebas de amplificación de DNA de segmentos seleccionados del T-DNA por PCR, para detectar su inserción en el genoma de las plantas regeneradas de frijol. El protocolo de extracción por urea, las condiciones de PCR, el proceso de amplificación y los primers usados se encuentran en el anexo 1 y 2.

11 RESULTADOS

11.1 MATERIAL VEGETAL

Los primeros ensayos de transformación se llevaron a cabo partiendo de seis horas de esterilización de la semilla con gas cloro. En estos experimentos se encontraron algunas semillas contaminadas por bacteria o por hongo una vez se cumplieron los días de germinación. Debido a lo anterior, se realizó un experimento para evaluar el número de semillas que resultaban contaminadas en los platos de germinación después de ser previamente esterilizadas. Dicho experimento consistió en esterilizar las semillas de las tres variedades durante 6, 8 y 16 horas, para posteriormente sembrarlas en medio GM y verificar la contaminación superficial. El porcentaje de semillas sanas, sin aparente contaminación, se estableció como el número de semillas sin contaminación sobre el número total de semillas sembradas inicialmente en medio GM. Con base en lo anterior, el mayor porcentaje de semillas sanas para las tres variedades evaluadas se presentó cuando se realizó la esterilización durante 16 horas (Tabla 3). Por el contrario, con 6 horas de esterilización se encontró el menor porcentaje de semillas sanas, afectadas por contaminación superficial con bacteria u hongo.

Tabla 3. Resultados de la prueba de esterilización de semillas de las variedades de frijol Chauchachuga, Calima e ICA Quimbaya. El porcentaje de supervivencia se estableció como el número de semillas sin contaminación sobre el número total de semillas sembradas inicialmente en medio GM.

Horas de esterilización	Semillas sembradas en medio GM	Semillas contaminadas	Porcentaje de supervivencia (%)
Calima			
6 h	100	17	83
8h	100	13	87
16h	100	6	94
Chauchachuga			
6 h	100	18	82
8h	100	11	89
16h	100	5	95
ICA Quimbaya			
6 h	100	19	81
8h	100	13	87
16h	100	7	93

11.2 EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN GUS

Con base en los resultados obtenidos de expresión transitoria del gen GUS, se encontró que la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 portando el plásmido pCAMBIA 1305.2 transfirió el T-DNA al 100% de los explantes evaluados para este ensayo. Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión transitoria del gen GUS, reflejada en el patrón de tinción en las tres variedades de frijol evaluadas. Para dichas variedades el patrón de tinción fue similar, lo cual se comprobó con la prueba de Chi cuadrado (Tabla 4). Por otro lado, en cuanto al grado de expresión evaluado en los explantes, se encontró que la mayoría de explantes (el 58% del total) presentaron menos del 35% de la zona de interés teñida y aproximadamente sólo el 4% de los explantes exhibieron más del 70% de la zona de interés con tinción GUS (Tabla 4). El análisis estadístico para este ensayo se llevó a cabo con el software SAS® (statistical analysis system) versión 9.3 para Linux.

Tabla 4. Resultados del ensayo de expresión transitoria del gen GUS y prueba Chi cuadrado para el grado de expresión entre las tres variedades de frijol evaluadas. Grados de expresión GUS transitoria: 1= Menos del 35% de la zona teñida, 2= 35 – 70% de tinción, 3= Más del 70% de tinción. Para cada casilla se muestran tres resultados los cuales corresponden a: frecuencia, esperados y porcentaje, en orden de arriba hacia abajo.

Variedad	Grado de expresión GUS transitoria			
	1	2	3	Total
Chauchachuga	17	11	2	30
	17.333	11.333	1.3333	
	18.89	12.22	2.22	33.33
Calima	17	12	1	30
	17.333	11.333	1.3333	
	18.89	13.33	1.11	33.33
ICA Quimbaya	18	11	1	30
	17.333	11.333	1.3333	
	20.00	12.22	1.11	33.33
Total	52	34	4	90
	57.78	37.78	4.44	100.00

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi cuadrado	4	0.5973	0.9634

11.3 ENSAYO DE MORTALIDAD DE EXPLANTES POR HIGROMICINA

Transcurridos los primeros siete días del experimento se revisaron los explantes y se observó que en ninguna de las concentraciones evaluadas, incluyendo el control, se presentaba crecimiento de brotes. Posteriormente en la segunda revisión, a los 14 días, se observó que en la concentración de 5 mg/l (SI/b5) un 20% de los explantes habían generado brotes. Así mismo, en la concentración de 1 mg/l (SI/b1) un 45% de los explantes tenían brotes y en los platos control, sin higromicina (SI/b0), un 65% (Tabla 5).

Por el contrario, en las concentraciones de 10 mg/l (SI/b10) y 15 mg/l (SI/b15) los explantes se observaban necrosados y sin crecimiento de brotes (Figura 4).

Tabla 5. Ensayo de mortalidad de explantes por efecto de la higromicina. Número de explantes de la variedad Chauchachuga con crecimiento de brotes transcurridos 14 días en medio SI con distintas concentraciones de higromicina. SI/b0= [0 mg/L], SI/b1= [1 mg/L], SI/b5= [5 mg/L], SI/b10= [10 mg/L] y SI/b15= [15 mg/L]. El porcentaje de supervivencia se estableció como el número de explantes con al menos un brote a los 14 días de cultivo sobre el número total de explantes sembrados.

	Concentraciones de Higromicina				
	SI/b0	SI/b1	SI/b5	SI/b10	SI/b15
Explantes total	20	20	20	20	20
Explantes con brotes	13	9	4	0	0
% de supervivencia	65%	45%	20%	0%	0%

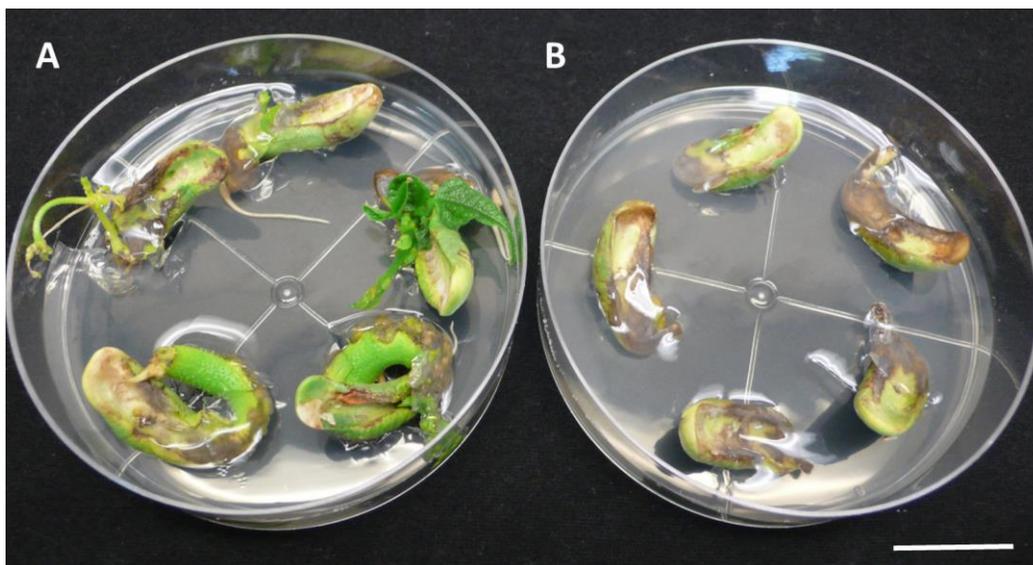


Figura 4. Ensayo de mortalidad de explantes por higromicina a los 14 días de inducción. (A) explantes control variedad Calima con crecimiento de brotes en medio SI/b0 sin higromicina. (B) explantes sin crecimiento de brotes y necrosamiento en la zona de contacto con el medio SI/b10 (higromicina [10 mg/L]). Barra: 25 mm.

11.4 INDUCCIÓN DE BROTES

A los siete días de cultivo en medio SI/b1, se empezó a observar la formación de los primeros brotes. Posteriormente, a los 14 días de inducción ya eran visibles grupos de brotes bien formados con mayor tamaño (Figura 5). Durante esta primera fase de inducción de brotes se presentaron problemas por contaminación con bacteria en los explantes. Se observó que la contaminación empezaba desde la zona del explante que se encuentra inmersa en el medio, contaminando así los nuevos brotes en crecimiento, lo cual ocasionaba el descarte total del explante (Figura 6 (A)). Alternativamente, el crecimiento de la bacteria se originó en la parte del cotiledón que sobresalía del medio (Figura 6 (B)). En este segundo caso resultó más práctico controlar la contaminación realizando cortes a las partes infectadas del cotiledón y así evitando la propagación de la bacteria hasta la zona de crecimiento de brotes y el medio. Durante el proceso de inducción de brotes en medio SI/b1 fue donde se presentó la mayor pérdida de explantes principalmente causada por la contaminación con bacteria, entre un 34 - 54% de explantes sobrevivieron a esta etapa (Tabla 6).

Transcurridos 14 días a los explantes se les retiró el cotiledón y se transfirieron a medio SI/b5 para continuar con el proceso de inducción y desarrollo de brotes (Figura 7). Durante esta etapa los brotes que alcanzaron un tamaño superior a 1cm fueron extraídos del explante para enraizamiento.

El medio de inducción de brotes se continuó refrescando cada 14 días. Sin embargo, a medida que se realizaron los subcultivos en medio SI/b5, se empezaron a generar brotes deformes con apariencia vidriosa translúcida (Figura 8 (A, B, C)). A este tipo de brotes se les realizó el procedimiento de enraizamiento, pero no fue posible la obtención de raíces. Sólo ocasionalmente, durante esta fase, se generaron brotes con morfología definida (Figura 8 (D)), algunos de estos brotes se lograron enraizar (Figura 8 (E)), Sin embargo, no lograron elongarse y finalmente murieron. Se tomaron algunas muestras de este tejido para realizarles prueba GUS y se obtuvo un brote positivo que manifestó la tinción en todos los tricomas de la hoja y el tallo (Figura 9). Posteriormente, con el paso de las semanas los grupos de brotes continuaron creciendo, pero así mismo el

tejido empezó a necrosarse por acción de la higromicina. Adicionalmente, en algunos explantes se presentó el crecimiento de callo junto a los brotes. Algunos de estos callos se extrajeron y se les realizó prueba GUS, la cual dio positiva en gran parte de estos tejidos (Figura 10). Con este tipo de callo no se hicieron ensayos para regeneración de plantas.

Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de las variedades Chauchachuga, Calima e ICA Quimbaya a los 14 días de inducción de brotes en medio SI/b1. El porcentaje de sobrevivencia se definió como el número total de explantes que pasaron a la etapa de inducción en SI/b5 sobre el total de explantes sembrados inicialmente en medio SI/b1.

Variedad	Explantes en SI/b1	Explantes en SI/b5	Porcentaje de supervivencia
Chauchachuga	142	76	54 %
Calima	130	54	42 %
ICA Quimbaya	118	40	34 %



Figura 5. Inducción de brotes de frijol de la variedad Calima a los 14 días de cultivo en medio de selección SI/b1. Barra: 15 mm.

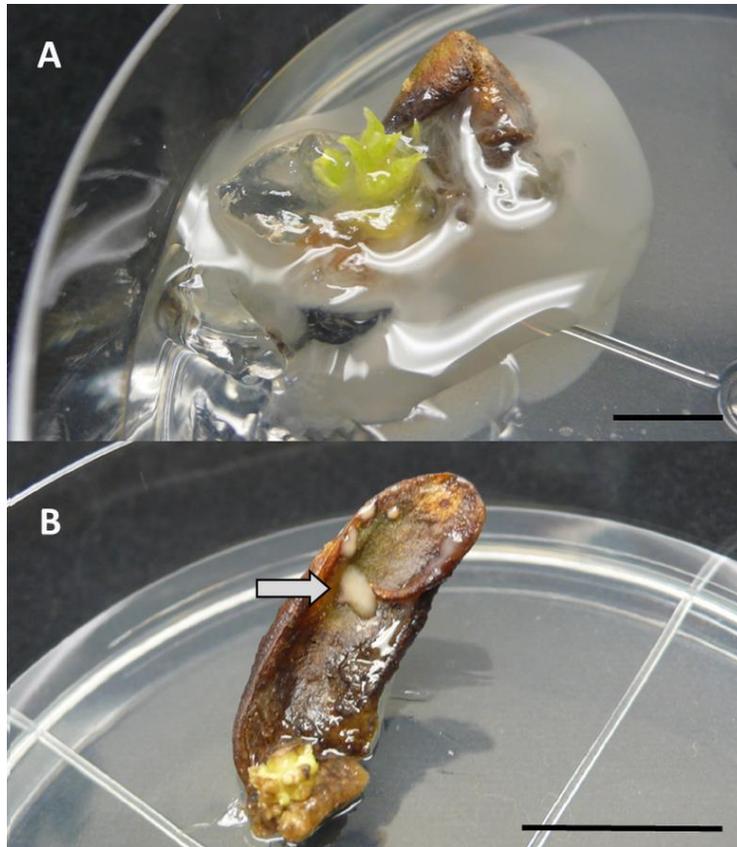


Figura 6. Explantes de frijol variedad Calima en medio de inducción de brotes contaminados por bacteria. (A) El crecimiento de la bacteria inicia desde la zona de crecimiento de los brotes contaminando la mayor parte del explante y el medio. (B) el crecimiento de la bacteria se concentra en zonas del cotiledón que sobresalen del medio. La flecha señala el crecimiento de la bacteria sobre la parte superior del cotiledón. Barra en A: 20 mm. B: 8 mm.

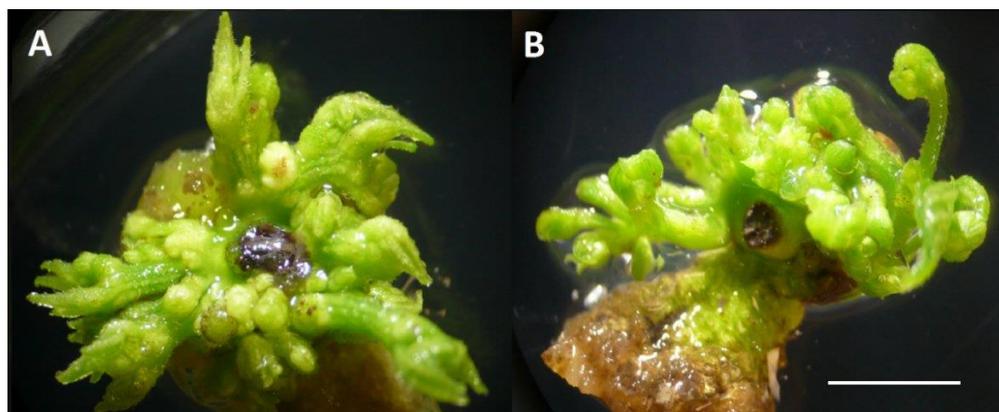


Figura 7. Inducción de brotes de frijol variedad Chauchachuga (A) y Calima (B) a los 21 días de cultivo de los explantes en medio SI/b5. Barra: 6 mm.

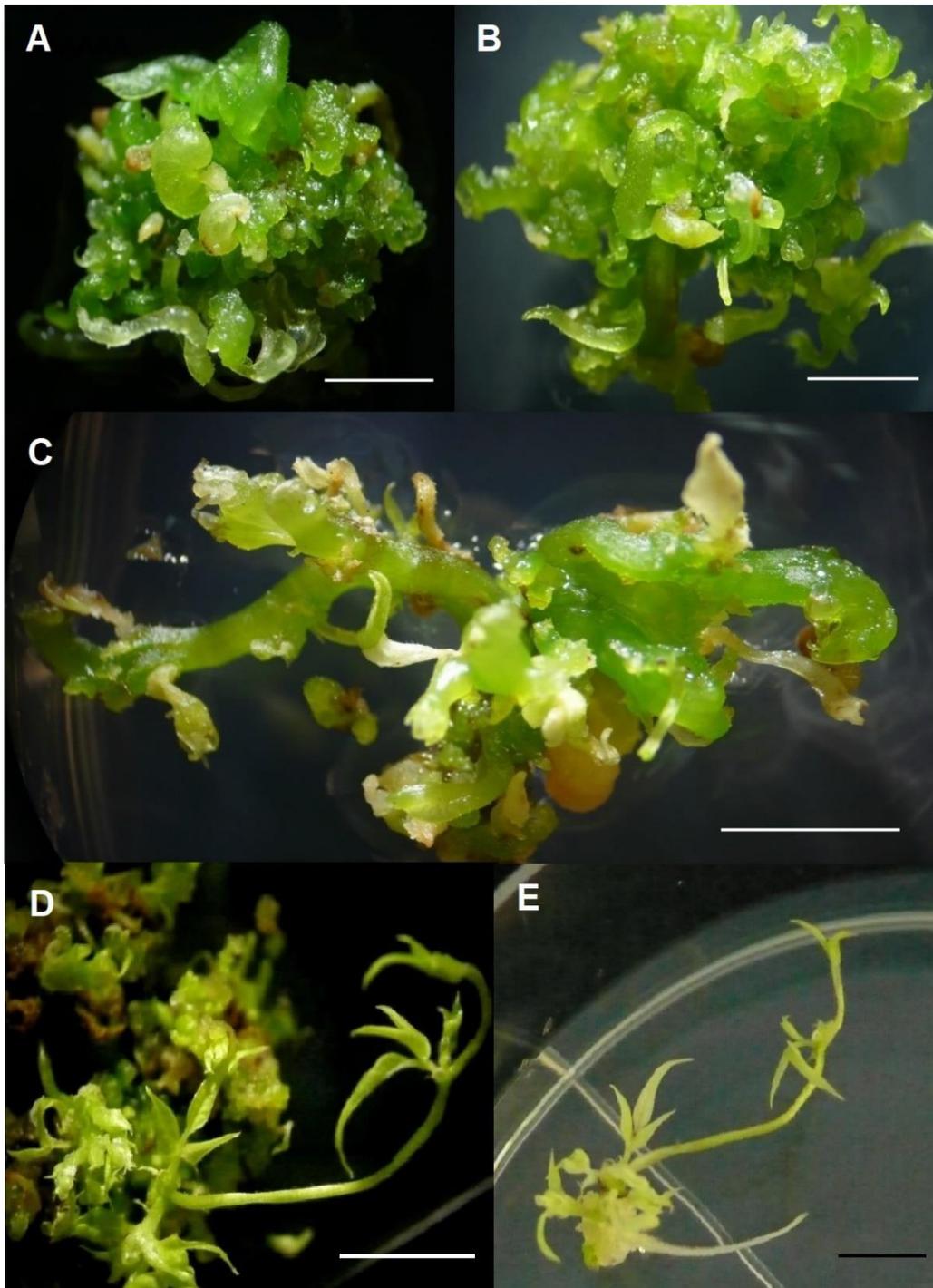


Figura 8. Explantes con brotes vitrificados de la variedad Ica Quimbaya (A), Chauchachuga (B) y Calima (C). (D) brote con morfología definida creciendo del explante vitrificado. (E) brote observado en la figura D, extraído del explante y enraizado en medio RM. Barra en A: 5 mm. B: 5 mm. C: 2mm. D: 6 mm. E: 10 mm.

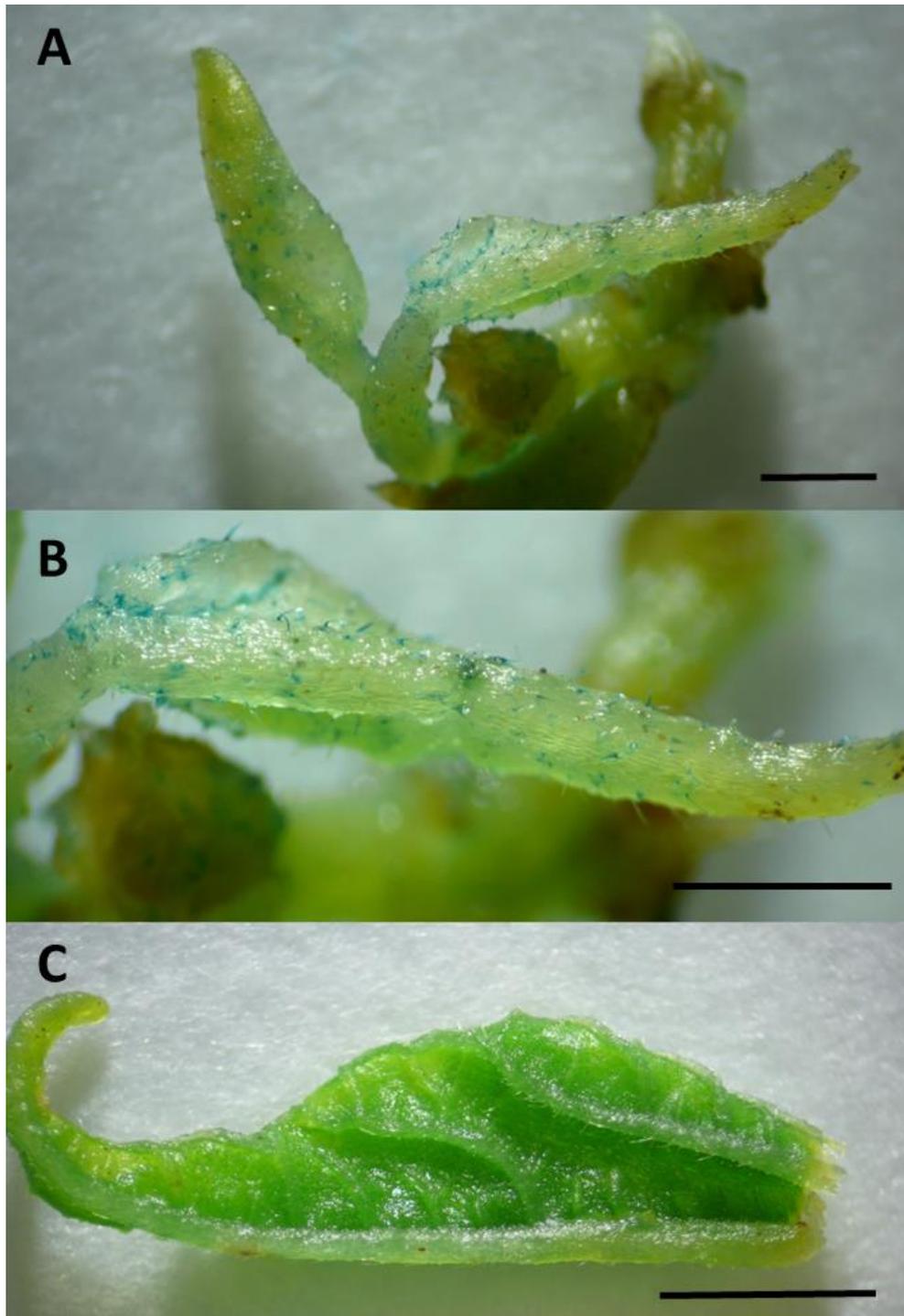


Figura 9. (A) Expresión del gen GUS en los tricomas de un brote de la variedad Chauchachuga. (C) Hoja control sin tinción en los tricomas después de ser expuesta a la prueba GUS. Barras: A y B: 3 mm, C: 5 mm.

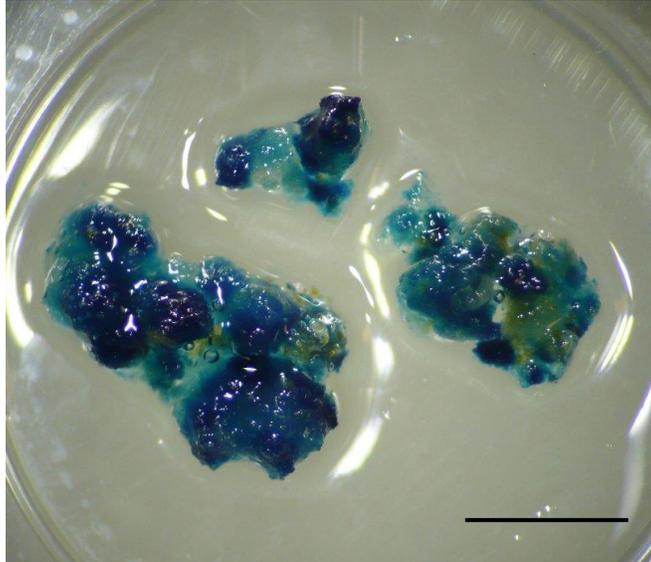


Figura 10. Prueba GUS positiva en callos resistentes a higromicina originados de explantes en la etapa de inducción de brotes en medio SI/b5. Barra: 20 mm.

11.5 ENRAIZAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN SUELO

Los primeros ensayos llevados a cabo para enraizar los brotes se realizaron dejando la base de estos en inmersión, durante un minuto, en una gota de 1 mg/ml de IBA. Con esta concentración se presentaron problemas de exceso de crecimiento de raíces y de callo, lo cual impidió el posterior crecimiento y elongación de los brotes. Ante esta dificultad se ensayaron concentraciones menores. Finalmente, los brotes se lograron enraizar sin exceso de crecimiento de callo para posteriormente elongar con una concentración de 0,1 mg/ml de IBA (Figura 11). Al cabo de 20 días los brotes sembrados en medio RM ya presentaban raíces. Estos brotes fueron transferidos a medio SE para elongación.

Transcurridos 20 días en medio SE algunos de los brotes ya se apreciaban como pequeñas plántulas con un tamaño entre 8 y 10 cm de longitud. Las plántulas que alcanzaron dicho tamaño fueron transferidas a suelo y dejadas en cámara húmeda durante 3 a 5 días (Figura 12). En esta etapa se tomaron muestras de tejido para realizarles pruebas de detección de la transgénesis mediante PCR. De la totalidad de plántulas analizadas, dos de la variedad ICA Quimbaya mostraron la inserción del gen GUS (Figura 13).

En total se transfirieron 21 plantas de la variedad Chauchachuga, 16 plantas de la variedad Calima y 6 plantas de la variedad ICA Quimbaya a suelo (Figura 14). De estas plantas, 10 de la variedad Chauchachuga y 6 de la variedad calima lograron establecerse y producir semilla mientras que las restantes no lograron desarrollarse (Tabla 7).



Figura 11. Brote de la variedad Chauchachuga con crecimiento de raíz en medio RM. El enraizamiento se llevó a cabo dejando la base del brote en inmersión durante un minuto en una gota de IBA [0.1 mg/ml]. Barra: 20 mm.

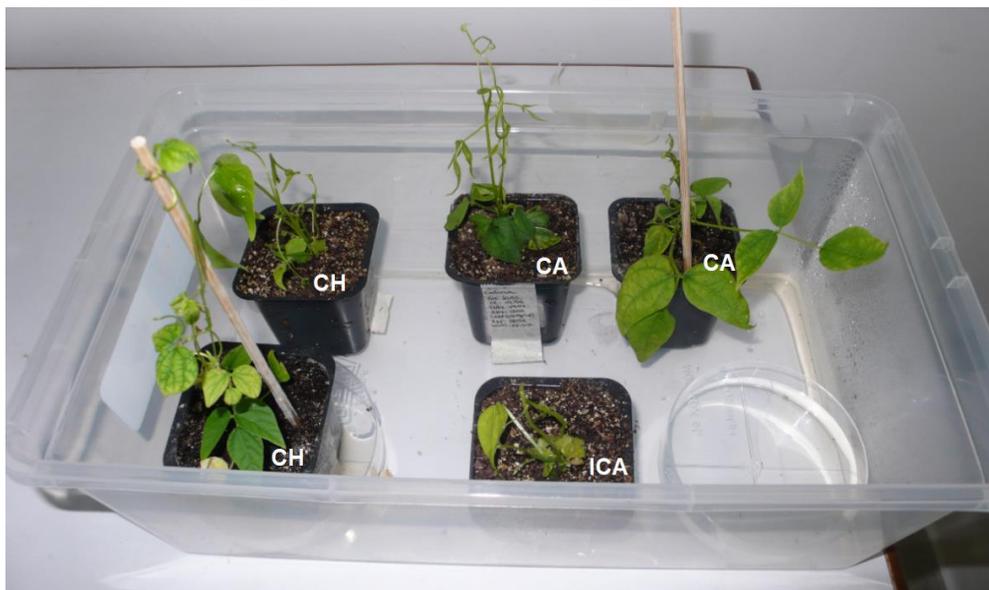


Figura 12. Plántulas de frijol en cámara húmeda al cuarto día de haber sido sembradas en suelo. Las plántulas con el código CH pertenecen a la variedad Chauchachuga; con el código CA, a la variedad Calima y con el código ICA, a la variedad ICA Quimbaya.

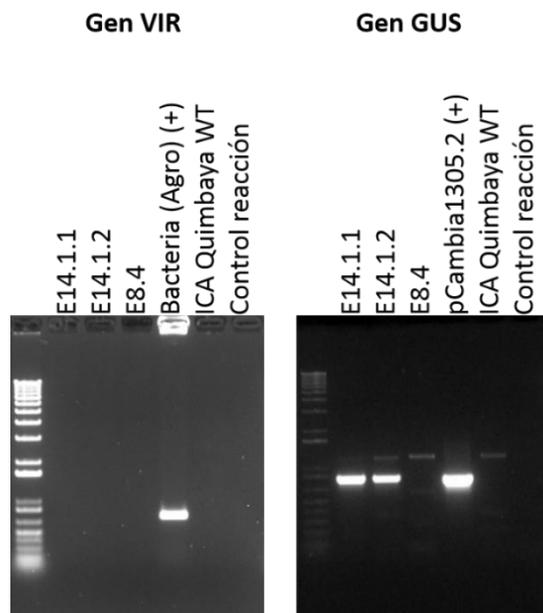


Figura 13. Resultados del PCR para las plántulas evaluadas de ICA Quimbaya. En la figura de la derecha, las columnas E14.1.1 y E14.1.2 muestran productos de PCR que coinciden en tamaño con el producto amplificado para el gen GUS. En la foto de la izquierda se amplificó el gen VIR para descartar la posibilidad de que la presencia del gen GUS en las plántulas se debiera a residuos de la bacteria.



Figura 14. Plantas de frijol variedad Chauchachuga (Izquierda) y variedad Calima (Derecha) regeneradas a partir de nodos cotiledonares.

Tabla 7. Resultado final de las plantas inicialmente transferidas a suelo, cuántas de ellas resultaron potencialmente transgénicas mediante análisis por PCR (Figura 13) y el número de plantas que finalmente lograron establecerse y producir semilla.

Variedad	Plántulas transferidas a suelo	Plantas potencialmente transgénicas	Plantas con producción de semilla
Chauchachuga	21	0	10
Calima	16	0	6
ICA Quimbaya	6	2	0

12 DISCUSIÓN

12.1 ENSAYO DE MORTALIDAD DE EXPLANTES POR HIGROMICINA

La finalidad de este ensayo fue encontrar una concentración mínima de higromicina que retardara el crecimiento de aquellas células no transformadas, pero que simultáneamente no fuera lo suficientemente elevada para impedir el desarrollo de los brotes transformados. Por lo tanto, con base en los resultados observados, se optó por descartar el uso de 10 mg/l y 15 mg/l de higromicina, debido a que estas concentraciones resultaron ser muy elevadas causando la pérdida de todos los explantes. En consecuencia, se decidió utilizar 1 mg/l de higromicina como concentración inicial durante el paso inmediato a medio de inducción de brotes e incrementar la presión de selección con 5 mg/l de higromicina como máxima concentración, a partir del primer refrescamiento del medio a los 14 días de inducción.

12.2 HIPERHIDRICIDAD

El fenómeno observado en el presente trabajo durante la fase de inducción de brotes con el paso de subcultivos (Figura 8 (A, B, C)), puede estar relacionado con la hiperhidricidad o vitrificación. Los brotes afectados por hiperhidricidad presentan problemas de diferenciación, apariencia translúcida, malformación y son fácilmente rompibles; así mismo, generalmente no generan raíces y si las generan son escasas y con crecimiento pobre (Kevers *et al.*, 2004). Brotes con similares características fueron obtenidos por Muñoz (2015) en su investigación en frijol común. En dicho trabajo, durante la fase de regeneración de brotes en medio de inducción con BAP [1 mg/l], se presentó la formación de brotes normales y, en mayor proporción, brotes anormales (translúcidos de color verde claro) en las cuatro variedades de frijol ensayadas. Los brotes normales fueron retirados del explante para continuar con el proceso de desarrollo y enraizamiento. En cuanto a los brotes anormales, los autores optaron por reducir la concentración de BAP a 0.1 mg/l en el medio para solucionar este fenómeno. No obstante, encontraron que se

siguieron formando tanto brotes normales como anormales pero esta vez con menor frecuencia debido a la presencia de mayor necrosis en el explante. Por otro lado, Varisai Mohamed *et al.* (2006) también reportaron la obtención de brotes vitrificados en su trabajo con *Phaseolus angularis*. Los autores encontraron que el uso de concentraciones de TDZ superiores a 5 μM fomentaron la formación de brotes débiles e hiperhidratados según sus resultados. De igual forma que lo realizado por Muñoz (2015), en el presente trabajo se optó por ir separando del explante los brotes con buen desarrollo para así evitar que con el paso entre subcultivos se generara hiperhidricidad en la totalidad de brotes regenerados.

12.3 EXPRESIÓN DEL GEN GUS EN TRICOMAS

El gen GUS empleado en este trabajo se encuentra controlado por el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV35S) (Figura 2). Dicho promotor es considerado un promotor constitutivo. Sin embargo, existen algunos estudios donde se reporta que su actividad puede no ser del todo constitutiva, puesto que, por ejemplo, se ha encontrado que la acumulación del transcrito varía tanto temporal como espacialmente en los tejidos (Williamson *et al.*, 1989). Así mismo, ha sido reportado que el promotor CaMV35S presenta cierta especificidad de expresión en tejidos florales y que dicha expresión difiere entre distintas especies e incluso entre genotipos (Benfey y Chua, 1989; Sunilkumar *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha estudiado el patrón de expresión del gen GUS controlado por el promotor CaMV35S en tejidos de soya transgénica a nivel celular y se ha encontrado que en algunos tipos de células no se presenta ningún tipo de actividad GUS, mientras que en otros tipos se exhiben diferentes niveles de expresión del gen, lo cual sugiere que el promotor es específico del tipo celular (Yang y Christou, 1990). Según lo observado en este trabajo, es probable que el brote con tinción GUS positiva sólo a nivel de los tricomas (Figura 9) fuese completamente transgénico y que dicho patrón de expresión sea debido a que el promotor CaMV35S no se está expresando constitutivamente en todos los tejidos y órganos, como ya ha sido reportado previamente en otros cultivares.

12.4 INDUCCIÓN DE BROTES

En este trabajo se lograron inducir brotes a partir de nodos cotiledonares vía organogénesis en las tres variedades de frijol común ensayadas. La suplementación del medio SI con 1.7 mg/l de BAP estimuló el crecimiento de nuevos brotes que fueron visibles a partir de los siete días de cultivo. Lo encontrado en este trabajo está relacionado con lo reportado en trabajos previos donde ya había sido comprobada la efectividad de usar concentraciones superiores a 1 mg/l de BAP para lograr inducir brotes en frijol. Específicamente utilizando como explante nodo cotiledonar, Dang y Wei (2009) evaluaron diferentes concentraciones de BAP para inducir brotes y encontraron que la mejor respuesta se obtuvo con 1.0 mg/l seguida de 2.0 mg/l. Así mismo, Mcclean y Grafton (1989), también con explantes de nodo cotiledonar, ensayaron diferentes concentraciones de BAP en medio de inducción y encontraron el mayor crecimiento de brotes y yemas con una concentración de 1.12 mg/l.

12.5 ENRAIZAMIENTO Y ELONGACIÓN

En el presente trabajo, la concentración de 1 mg/ml de IBA que se utilizó inicialmente fue un factor limitante en cuanto a la posterior generación de raíces viables. Con este sistema se logró el crecimiento de raíces en algunos brotes, pero así mismo, también se generó el crecimiento de callo que, en la totalidad de casos, superó el crecimiento del brote impidiendo su desarrollo. Aunque en trabajos previos se ha remarcado a la hormona IBA como una potente auxina para lograr enraizamiento *in vitro* en leguminosas (Dewir *et al.*, 2016), la concentración inicialmente utilizada de esta hormona en este estudio pudo resultar más de la necesaria, lo cual se evidenció en la etapa de enraizamiento con el crecimiento excesivo de callo. En estudios con leguminosas ha sido reportado que el uso de una baja concentración de auxinas juega un papel fundamental a la hora de lograr el enraizamiento, mientras que elevadas concentraciones de estas hormonas pueden retardar el enraizamiento o también pueden originar el crecimiento de callo desde la base de los brotes impidiendo la aparición de raíces (Dewir *et al.*, 2016). Bajo esta hipótesis,

Roy *et al.* (1992) evaluaron en *Lathyrus sativus* diferentes concentraciones de IBA para la obtención de raíces y encontraron que el enraizamiento sólo fue posible con el uso de IBA 0.5 μM , las concentraciones ensayadas por encima de esta no permitieron el enraizamiento. Así mismo, Parveen y Shahzad (2010) evaluaron en *Cassia sophera* el uso para enraizamiento de las auxinas IBA y NAA en diferentes concentraciones. Los autores reportaron que, de los tratamientos evaluados, la mejor respuesta al enraizamiento fue obtenida con una concentración de IBA 1 μM .

En este trabajo, la reducción de la concentración de IBA a 0.1 mg/ml (10 veces menos que la concentración inicialmente utilizada) permitió la inducción de sistemas radiculares en los brotes y así mismo impidió el crecimiento de callo desde la base de estos.

En cuanto a la fase de elongación, inicialmente, una vez los explantes pasaban por la etapa de inducción se iban sembrando en medio SE para elongar los brotes individualmente o en grupo. Con el uso de esta metodología no se obtuvieron resultados positivos debido al fenómeno anteriormente discutido de hiperhidricidad, así como también por la dificultad para obtener raíces de dichos brotes. Posteriormente, con el ajuste en la concentración de IBA durante la fase de enraizamiento, aquellos brotes con buenas raíces se sembraron en medio SE y finalmente lograron elongarse para subsecuentemente ser trasplantados a suelo. Lo anterior pudo ser ocasionado por la correcta interacción generada a nivel hormonal entre auxinas y citoquininas, a causa de la reducción en la concentración de la hormona IBA que, a la larga, sumado a la adición de 0.6 g/l de GA3 al medio SE, permitió el desarrollo y elongación de las plántulas.

12.6 PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL T-DNA POR PCR

Las pruebas de PCR realizadas a las dos plántulas de la variedad ICA Quimbaya (Figura 13), evidencian el proceso de transgénesis. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que dichas plántulas fuesen quiméricas, dado que mediante la detección por PCR, no es posible conocer con certeza si hay o no presencia de quimerismo en las plantas evaluadas.

13 CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró la efectividad de la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* para transferir T-DNA a frijol común, independientemente del genotipo de los cultivares Andinos probados. Así mismo, a pesar de la conocida recalcitrancia de frijol común en cuanto a la transformación genética y regeneración *in vitro*, este trabajo permitió regenerar plantas no transgénicas de frijol por organogénesis *in vitro*. Lo cual es una contribución valiosa al establecimiento de un protocolo de transformación para esta especie de tanta importancia económica mundial.

Por otro lado, las pruebas de PCR indicaron que se produjeron pocos eventos de transgénesis aparentemente estables debido principalmente a la efectividad de la selección de tejidos transgénicos con el uso de higromicina (1 a 5 mg/l), lo cual indudablemente no fue la selección óptima y promovió la aparición de escapes. Ante estos resultados, surge la necesidad de evaluar si es conveniente el uso de antibióticos para realizar la selección en frijol o más bien se debe optar por realizar la selección con herbicidas, la cual ha sido usada de manera efectiva en muchos otros cultivos incluyendo a soya.

En cuanto a la adaptación del procedimiento de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* de soya a frijol común, se evidenció la necesidad de realizar ajustes para que el protocolo avanzara, sobre todo en la fase de regeneración, donde se presentaron la mayoría de obstáculos para el desarrollo de este proyecto. No obstante, se demostró que, la aplicación de este protocolo con los ajustes respectivos, hizo posible la obtención de plantas putativamente transgénicas de *P. vulgaris*.

En general, está clara la dificultad que supone trabajar con cultivos recalcitrantes para la aplicación de biotecnologías. Sin embargo, a pesar de su carácter exploratorio, este trabajo dio algunas pautas para seguir adelante con el desarrollo de metodologías de inserción de genes en frijol común.

14 REFERENCIAS

- Amugune, N. O., Anyango, B., & Mukiyama, T. K. (2011). *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *African Crop Science Journal*, 19(3), 137–147.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., & Faria, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, 142–150.
- Aragão, F. J. L., Ribeiro, S. G., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Maxwell, D. R., Rech, E. L., & Faria, J. C. (1998). Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding*, 4(6), 491–499.
- Arellano, J., Fuentes, S. I., Castillo-España, P., & Hernández, G. (2009). Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1), 11–18.
- Beaver, J. S., & Osorno, J. M. (2009). Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica*, 168(2), 145–175.
- Benfey, P.N. and Chua, N.-H. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174–181.
- Brasileiro, A. C. M., Aragao, F. J. L., Rossi, S., Dusi, D. M. A., Barros, L. M. G., & Rech, E. L. (1996). Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 810–815.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128.

- Clercq, D., & Montagu, V. (1998). Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Physiology*, 626–630.
- Collado, R.; Bermúdez-Carabaloso, I.; García, L. R.; Veitía, N.; Torres, D., Romero, C., & Angenon, G. (2016). Epicotyl sections as targets for plant regeneration and transient transformation of common bean using *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(5), 500–511.
- Collado, R., Bermúdez-Carabaloso, I., García, L. R., Veitía, N., Torres, D., Romero, C., & Angenon, G. (2015). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. using indirect organogenesis. *Scientia Horticulturae*, 195, 89–100.
- Collado, R., Veitía, N., Bermúdez-Carabaloso, I., García, L. R., Torres, D., Romero, C., & Angenon, G. (2013). Efficient in vitro plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. *Scientia Horticulturae*, 153, 109–116.
- Cruz de Carvalho MH, Van Le B, Zuily-Fodil, Y., Pham Thi AT, & Tran Thanh Van K. (2000). Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, 159(2), 223–232.
- Da Silva Fialho, L., Guimarães, V. M., De Barros, E. G., Moreira, M. A., Dos Santos Dias, L. A., De Almeida Oliveira, M. G., De Rezende, S. T. (2006). Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(2), 87–89.
- Dang, W., & Wei, Z. M. (2009). High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. *Biologia Plantarum*, 53(2), 312–316.
- De Clercq, J., Zambre, M., Van Montagu, M., Dillen, W., & Angenon, G. (2002). An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Reports*, 21(4), 333–340.

- Delgado-Sánchez, P., Saucedo-Ruiz, M., Guzmán-Maldonado, S. H., Villordo-Pineda, E., González-Chavira, M., Fraire-Velázquez, S., Mora-Avilés, A. (2006). An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 170(4), 822–827.
- Dewir, Y. H., Murthy, H. N., Ammar, M. H., Alghamdi, S. S., Al-Suhaibani, N. A., Alsadon, A. A., & Paek, K. Y. (2016). In vitro rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 57(4), 311–322.
- Di, R., Purcell, V., Collins, G. B., & Ghabrial, S. A. (1996). the Bean Pod Motile Virus Coat Protein Precursor Gene. *Plant Cell*, 746–750.
- Dillen, W., De Clercq, J., Goossens, A., Van Montagu, M., & Angenon, G. (1997). Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(2), 151–158.
- Gamborg, O. L., Miller, R. a., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
- Gatica Arias, A. M., Valverde, J. M., Fonseca, P. R., & Melara, M. V. (2010). In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): Effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 1–8.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2(4), 208–218.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R. J., Dommès, J., & Gaspar, T. (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 181–191.
- Kwapata, K., Sabzikar, R., Sticklen, M. B., & Kelly, J. D. (2010). In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(1), 97–105.

- Liu, Z., Park, B. J., Kanno, A., & Kameya, T. (2005). The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene. *Molecular Breeding*, *16*(3), 189–197.
- Mariotti, D., Fontana, G.S., & Santini, L. (1989). Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *J Genet Breed* *43*: 77-82.
- McClellan, P., Chee, P., Held, B., Simental, J., Drong, R. F., & Slightom, J. (1991). Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: Transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *24*(2), 131–138.
- McClellan, P., & Grafton, K. E. N. F. (1989). Regeneration of Dry Ben (*Phaseolus vulgaris* L.) via Organogenesis. *Plant Science*, *60*, 117–122.
- Miklas, P. N., & Singh, S. P. (2007). 1 Common Bean. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 3 - Pulses, Sugar and Tuber Crops*, *3*, 1–31.
- Mohamed, M. F., Coyne, D. P., & Read, P. E. (1993). Shoot Organogenesis in Callus Induced from Pedicel Explants of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, *118*(1), 158–162.
- Mukeshimana, G., Ma, Y., Walworth, A. E., Song, G., & Kelly, J. D. (2013). Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnology Reports*, *7*(1), 59–70.
- Muñoz Valverde, J. (2015). Regeneración in vitro de variedades de frijol costarricense (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de tejidos morfogénicos: inducción de callo e histología del proceso (Tesis doctoral).
- Murasnige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, *15*(3), 473–497.

- Naleway, J. J. (1992). Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrates, in *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression* (Gallagher, S. R., ed.), Academic Press, San Diego, CA, pp. 61–76.
- Parveen, S., & Shahzad, A. (2010). TDZ-induced high frequency shoot regeneration in *Cassia sophera* Linn. via cotyledonary node explants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(2), 201–206.
- Plant Transformation Core Facility (2015). An improved *Agrobacterium*-mediated soybean transformation procedure. University of Missouri.
<https://plantsciences.missouri.edu/muptcf/protocols/soybean.html>
- Qiu, D., Vuong, T., Valliyodan, B., Shi, H., Guo, B., Shannon, J. G., & Nguyen, H. T. (2015). Identification and characterization of a stachyose synthase gene controlling reduced stachyose content in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2167–2176.
- Quintero-Jiménez, A., Espinosa-Huerta, E., Acosta-Gallegos, J. A., Guzmán-Maldonado, H. S., & Mora-Avilés, M. A. (2010). Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(3), 381–386.
- Roy, P. K., Barat, G. K., & Mehta, S. L. (1992). In vitro plant regeneration from callus derived from root explants of *Lathyrus sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(2), 135–138.
- Russell, D. R., Wallace, K. M., Bathe, J. H., Martinell, B. J., & McCabe, D. E. (1993). Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 12(3), 165–169.
- Santalla, M., Power, B., & Davey, M. (1998) Efficient in vitro shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica*, 102: 195-202.
- Sunilkumar, G., Mohr, L., Lopata-Finch, E., Emani, C., & Rathore, K. S. (2002). Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as

revealed by GFP. *Plant Molecular Biology*, 50(3), 463–474.

Svetleva, D., Velcheva, M., & Bhowmik, G. (2003). Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. *Euphytica*, 131(2), 189–200.

Varisai Mohamed, S., Sung, J. M., Jeng, T. L., & Wang, C. S. (2006). Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: High efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 187–199.

Williamson, J. D., Hirsch-Wyncott, M. E., Larkins, B. a, & Gelvin, S. B. (1989). Differential Accumulation of a Transcript Driven by the CaMV 35S Promoter in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*, 90(4), 1570–1576.

Yang, N.-S., & Christou, P. (1990). Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. *Developmental Genetics*, 11(4), 289–293.

Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Van Montagu, M., Terryn, N., & Angenon, G. (2005). A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepariy bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 914–924.

Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P., & Clemente, T. E. (1999). The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(1), 37–46.

Zhang, Z., Coyne, D., and Mitra, A. (1997). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(3): 300-305.

15 ANEXOS

15.1 ANEXO 1. Protocolo de extracción de ADN

- **Preparación de soluciones**

EDTA 0.5M pH 8.0 Vf 1 lt

EDTA 186.1 g

NaOH 18 g

Ajustar a pH 8.2. Llevar al volumen final y autoclavar

Tris HCl ,1 M, Vol. final 1 lt

Trizma base 121.1 g

Disolver en 800 ml de agua MiliQ y ajustar el pH adicionando HCl concentrado.

Llevar al volumen final y autoclavar.

Na₂SO₄ 1.25M Vf 1 lt

Na₂SO₄ 177.5 g

Disolver en 800 ml de agua MiliQ. Llevar al volumen final y autoclavar

NLS (N-Laurylsarcosin) al 10% Vf 1 lt

N-Laurylsarcosin 100g

Disolver en 800 ml de agua autoclavada en recipiente estéril. Llevar al volumen final.
No autoclavar.

PVP-10 al 1% Vf 1lt

PVP-10 10g

Disolver en 800 ml de agua MiliQ. Llevar a volumen final y autoclavar.

Buffer de Extracción Urea (UEB3). Preparación

Para 650 ml 1% PVP-10, adicionar:

180 g urea (disolver por agitación)

50 ml 1M Tris Buffer, pH 8.0

50 ml 0.5M EDTA, pH 8.0

12.5 ml 1.25M Na₂SO₄

100 ml 10% NLS (N-Laurylsarcosin)

Ajustar volumen final para 1 litro con agua estéril. El buffer de Urea no puede ser autoclavado. Usar soluciones stock pre-esterilizadas para preparar este buffer.

- **Protocolo de extracción**

1. Ordenar placa 96 x 1.2 ml de acuerdo al listado de siembra.
2. Placa + 1 trifolio de hoja mediano cerrado. Almacenar a – 800C.
3. Adicionar 2 balines de acero.
4. Colocar placa en piscina de Nitrógeno líquido por 20 min. Macerar en mezclador de pinturas por 3 min.
5. Quitar tapas de la placa. Colocar placa a -20°C por 5 min.
6. Agregar 500 µL de UEB3 precalentado por 10 min a 650C (no es necesario precalentarlo, puede estar a Tamb).
7. Agitar por inversión (20 veces). Mezclador de pinturas por 1 min o mezclar muy bien manualmente.
8. Incubar a 650C por 20 min.

9. Adicionar 400 μ L de Fenol:Cloroformo:Isoamylalcohol (25: 24:1). Mezclar por inversión (20 veces) hasta que se forme emulsión.
10. Centrifugar a 3000 rpm a Tamb por 15 min. 14000 rpm si es microcentrífuga.
11. Transferir fase acuosa (300 μ L) a una nueva placa de 96 x 1.2 mL (sin tocar la interfase = precipitado proteico).
12. Repetir pasos 9 a 11.
13. Añadir 400 μ L de Isopropanol 100% frío.
14. Mezclar por inversión (5 veces). Se puede dejar 1 hora en isopropanol a -200C o se continúa inmediatamente.
15. Centrifugar a 3000 rpm por 20 min. 14000 rpm si es microcentrífuga.
16. Eliminar sobrenadante.
17. Lavar pellet con 500 μ L de Etanol 80% frío. Mezclar por inversión (5 veces).
18. Centrifugar a 3000 rpm por 20 min. 14000 rpm si es microcentrífuga.
19. Eliminar sobrenadante.
20. Secar pellet a Tamb por 20 min a 1 hora □ colocar tubo invertido sobre una toalla de papel.
21. Resuspender Pellet en 70 -100 μ L de TE 1X +RNAase.

15.2 ANEXO 2. Protocolo de PCR

- **Preparación del mix**

1. Asegurarse de que el material desechable este adecuadamente estéril.
2. Limpiar la superficie de trabajo y los implementos de trabajo con etanol 70%.
3. Adicionar todos los componentes como se listan en la siguiente tabla, excepto el ADN que se debe conservar en un tubo de 1.5 ml.
4. Dispensar 19 μ l a cada tubo de PCR.

Nota: Los reactivos y el ADN deben conservarse siempre en hielo para prevenir degradación.

PCR mix of GUS/VIR transgene

Component	Form	Final concentration	Concentration Stock solution	Amount per 20 μ l
2X GoTaq® Green Master Mix	S	1X	2X	10 μ l
Primer Forward CambiaGusA(int)/ VCF	S	0.25 μ M	10 μ M	0.5 μ l
Primer Reverse Gus_last_Rv2/ VCR	S	0.25 μ M	10 μ M	0.5 μ l
Ultra pure™ Distilled water, DNAse/RNAse- free or MiliQ water	Add			8 μ l
DNA	Add			1 μ l

S: Solución stock

Primers usados para detección de GUS y VIR en frijol

CambiaGusA(int)	Gus	CAACATCCTCGACGATAGCA
Gus_last_Rv2	Gus	CACATCACGACGCTTGGATGGT
VCF	Vir	ATCATTTGTAGCGACT
VCR	Vir	AGCTCAAACCTGCTTC

- **Montaje de PCR**

1. Adicionar 1µl de AND a cada tubo de PCR. Usar micropipeta para mezclar la solución de PCR.
2. Organizar programa de PCR en termociclador con las siguientes condiciones:

Condiciones para GUS y VIR

Step	Temperature	Time	Cycle Number
Initial Denaturation	95°C	2 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 sec	35 cycles
Annealing	54°C	30 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Final elongation	72°C	5 min	1 cycle
Store	16°C	∞	

3. Poner tubos de PCR en termociclador e iniciar el programa.

Electroforésis

1. Preparar gel de agarosa al 1%.
2. Poner 10 μ l de cada producto de PCR en los pozos.
3. Conectar cámara de electroforesis a la fuente y ajustar corriente a 90V
4. Poner gel en transiluminador (UVP Biospectrum) para visualizar las bandas.
5. Tomar fotos usando el software del transiluminador

CAPÍTULO 2. Artículo científico resultado de investigación
Artículo escrito en el formato de la Revista Orinoquia.

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Jhon J. Barrera-Moreno^{1*}

jhon.barrera@unillanos.edu.co

¹ Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para el consumo directo humano. Es considerado la principal fuente de proteína para millones de personas a nivel mundial, principalmente en los países en vías de desarrollo. Dentro del contexto de mejoramiento genético con tecnologías no convencionales como la biotecnología, *P. vulgaris* se ha caracterizado por ser recalcitrante tanto al proceso de regeneración *in vitro* como a la transformación genética. Hasta el momento no existen reportes de un protocolo eficiente y reproducible de transformación genética de frijol común. Por esta razón, el propósito de este trabajo fue desarrollar un protocolo de transformación genética mediado por *A. tumefaciens* basado en los protocolos existentes para soya (*Glycine max*). La transformación se llevó a cabo a partir de explantes del nudo cotiledonar, con la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 en tres variedades de frijol de interés comercial (Chauchachuga, ICA Quimbaya y Calima). Se realizaron pruebas de expresión transitoria del gen GUS, las cuales dieron positivas en las tres variedades. Adicionalmente, se logró la regeneración vía organogénesis directa de plantas en las tres variedades de frijol evaluadas y se obtuvieron dos plántulas putativamente transgénicas de la variedad ICA Quimbaya, en las cuales se detectó la presencia del gen GUS mediante PCR.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, Transgénesis, Cultivo de tejidos in vitro, Nodo cotiledonar.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for direct human consumption. It is considered the main source of protein for millions of people worldwide, mainly in developing countries. Within the context of genetic improvement with unconventional technologies such as biotechnology, *P. vulgaris* has been characterized as being recalcitrant to both the process of in vitro regeneration and genetic transformation. So far there aren't reports of an efficient and reproducible genetic bean transformation protocol. For this reason, the purpose of this work was to develop a genetic transformation protocol mediated by *A. tumefaciens* based on the existing protocols for soybean (*Glycine max* L.). The transformation was carried out from explants of the cotyledonary node, with the strain of *A. tumefaciens* EHA105 in three bean varieties of commercial interest (Chauchachuga, ICA Quimbaya and Calima). Transient expression tests of the GUS gene were performed, which were positive in all three varieties. Additionally, regeneration was achieved via organogenesis of plants in the three bean varieties evaluated and two putatively transgenic seedlings of the ICA Quimbaya variety were obtained, in which the presence of the GUS gene was detected by PCR.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, Transgenesis, In vitro tissue culture, cotyledonary node.

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais importante para o consumo humano direto. É considerada a principal fonte de proteína para milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Dentro do contexto de melhoramento genético com tecnologias não convencionais, como a biotecnologia, a *P. vulgaris* tem sido caracterizada como recalcitrante tanto ao processo de regeneração *in vitro* como à transformação genética. Até o momento não há relatos de um protocolo de transformação do feijoeiro genético eficiente e reprodutível. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de transformação genética mediado por *A. tumefaciens* baseado nos protocolos existentes para soja (*Glycine max*). A transformação foi levada a cabo a partir de explantes de cotilédones *nó* com *A. tumefaciens* estirpe EHA105 em três variedades de feijão de interesse comercial (Chauchachuga, ICA Quimbayas e Calima). Testes de expressão transiente do gene GUS foram realizados, os quais foram positivos em todas as três variedades. Além disso, a regeneração é realizada através de organogénese directa das plantas nas três variedades testadas feijão transgênicos putativamente e duas mudas da variedade ICA Quimbayas, em que a presença do gene GUS foi detectada por PCR foram obtidos.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris*, *Transgenesis*, *Cultura de tecidos in vitro*, *nó cotiledonar*.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado una de las fuentes principales de proteína para millones de personas en América Latina y África (Dillen *et al.*, 1999; Gepts, 2001). A nivel global, es cultivado en más de 12 millones de hectáreas y su producción anual es de aproximadamente nueve millones de toneladas métricas (Aragao *et al.*, 2010). Tan solo en el continente americano, región donde se presenta la mayor producción, se producen 6,7 millones de toneladas; de las cuales, 2,5 millones proceden de Brasil, quien es el mayor productor y consumidor de frijol común (Miklas y Singh, 2007). Una gran parte de su producción se pierde a causa de estreses que involucran entre otros la baja fertilidad de los suelos, enfermedades, plagas y sequía (Broughton *et al.*, 2003). Adicionalmente, su consumo se ve limitado debido a la presencia de factores antinutricionales en la semilla, que resultan perjudiciales para la salud humana (da Silva-Fialho *et al.*, 2006). Ante este panorama, la ingeniería genética, específicamente la transformación genética, resulta ser una alternativa interesante para que en conjunto con las técnicas de mejoramiento clásico, se puedan mejorar dichas características y así hacer frente a esta problemática (De Clercq *et al.*, 2002). Sin embargo, uno de los principales limitantes para este propósito es que hasta el momento no existe un protocolo *in vitro* eficiente y reproducible que permita transformar de manera estable a *P. vulgaris* (Beaver y Osorno, 2009). Sólo de manera directa a través del bombardeo de partículas se han obtenido plantas transgénicas, aunque con tasas de transformación relativamente bajas (0,03 y 0,9) (Russell *et al.*, 1993; Aaragão *et al.*, 1996). A raíz de lo anterior, el objetivo de este trabajo fue Adaptar en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) un protocolo de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, a partir de una metodología eficiente en soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para llevar a cabo el proceso de transformación se utilizaron semillas de frijol de las variedades andinas Chauchachuga, Calima e Ica Quimbaya, proporcionadas por el programa de frijol del CIAT. Dichas semillas fueron esterilizadas superficialmente en platos Petri durante 16 horas con gas cloro, el cual se produjo a partir de la mezcla de 4 ml de HCl 12 N con 100 ml de clorox comercial (Di *et al.*, 1996), con la ayuda de una cabina de extracción de gases. Una vez esterilizadas las semillas fueron colocadas en platos Petri de 100 x 20 mm (10 semillas por plato de cultivo) con medio de germinación (GM) (Tabla 1). Se colocaron de a cinco platos de germinación, uno sobre otro, y se envolvieron en una bolsa plástica, a la cual se le realizaron cuatro cortes de aproximadamente 6 cm para permitir ventilación. Finalmente, los platos Petri con las semillas se dejaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante dos días. Para todos los medios de cultivo el respectivo pH se ajustó con KOH 5N o HCL 1N antes de esterilizar cada medio a 1 Kg 121°C por 20 minutos en la autoclave. Componentes como: vitaminas, hormonas, antibióticos, acetosiringona, aminoácidos, DTT, tiosulfato de sodio y nitrato de plata fueron agregados a los respectivos medios después de ser esterilizados por filtración.

Preparación del inóculo de Agrobacterium

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) portando el plásmido pCAMBIA 1305.2. Dicho plásmido confiere a la bacteria resistencia al antibiótico kanamicina y su T-DNA contiene el gen reportero β -Glucuronidasa (GUSPlus™) interrumpido por un intrón y con un promotor 35S. Como marcador de selección para plantas porta un gen de resistencia al antibiótico higromicina (HPTII) con un doble promotor 35S (Figura 1).

Directamente del cepario, mantenido en la plataforma de mejoramiento avanzado del CIAT, se tomó un stock de glicerol de la bacteria y con una micropipeta se agregaron 100 μ l a un Erlenmeyer con 50 ml de medio YEP líquido, previamente suplementado con los antibióticos kanamicina (50 mg/l) y rifampicina (60 mg/l). La bacteria se incubó en un agitador a 28°C (a 140 rpm toda la noche).

Cumplido el periodo de crecimiento de la bacteria, se midió la densidad óptica (OD) y se transfirió a un tubo Falcon (50 ml) para centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 30-50 ml de medio cocultivo (CC) líquido y se diluyó el pellet mediante vórtex, para finalmente medir el OD de la bacteria resuspendida.

Inoculación y cocultivo

Los explantes del nodo cotiledonar (CN) fueron obtenidos a partir de semillas germinadas durante dos días. A cada semilla se le removió la radícula y después se realizó un corte a través del micrópilo para separar los dos cotiledones. Obtenidos los dos cotiledones, a cada uno se le retiró la plúmula y se procedieron a realizar de 5 a 7 cortes (0.5 mm de profundidad y 3 a 4 mm de largo) perpendiculares al eje de la unión entre el cotiledón y el hipocótilo (Figura 2). Finalmente se removió la testa e inmediatamente se introdujo el explante en el inóculo de *Agrobacterium*. Se agitó manualmente el plato de inoculación aproximadamente cada 20 explantes preparados. Finalizada la inoculación de los explantes se procedió a transferirlos a medio de cocultivo (CC) (Tabla 1) cubierto con papel filtro (Whatman grado 1, 90 mm). Se colocaron máximo diez explantes por plato de cocultivo se sellaron con cinta micropore y se dejaron en cuarto de crecimiento a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante cinco días.

Inducción de brotes

Finalizado el periodo de cocultivo se depositaron los explantes en un matraz (250 ml) y se procedió a lavarlos con agua estéril destilada durante un minuto manualmente con agitación fuerte y constante; se descartó el agua y se repitió el mismo procedimiento al menos diez veces, hasta que no fueran visibles partículas en el líquido. Posteriormente se agregó medio de lavado (SI/w) (Tabla 1) y se realizó tres veces más el mismo procedimiento descrito arriba.

Una vez finalizado el lavado, los explantes se dejaron secar sobre platos Petri con papel servilleta estéril durante 20 minutos. Se colocaron de a 5 explantes por plato (100 x 20 mm) en medio de inducción de brotes (SI) (Tabla 1) de manera que la región de regeneración quedara incrustada en el medio con el lado plano hacia arriba aproximadamente en un ángulo de 45°. Cada plato se envolvió con cinta micropore y se dejó en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Enraizamiento

Para llevar a cabo el enraizamiento se extrajeron los brotes de cada explante que tuvieran un tamaño mayor a 1 cm realizando un corte fino en la base. Después, la zona de corte de cada brote se sumergió en una gota de 20 μl de IBA a una concentración de 0.1 mg/ml sobre un plato Petri estéril durante un minuto. Los brotes sembrados en medio de enraizamiento (RM) (Tabla 1) se dejaron en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Elongación y establecimiento de plantas en suelo

Los brotes que presentaran al menos dos raíces fueron retirados cuidadosamente, sin lastimar las raíces, del medio RM. Se sembraron individualmente en medio de elongación (SE) (Tabla 1) y se dejaron en cuarto de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Una vez las plántulas crecieron 8 a 10 cm, se retiraron cuidadosamente del medio de cultivo, se lavaron las raíces con agua de grifo para retirar el exceso de medio y se transfirieron a potes con una mezcla de turba y vermiculita 2:1 respectivamente. Las plantas se dejaron en cámara húmeda durante 3 a 5 días, bajo las mismas condiciones en las que permanecieron antes de pasarlas a suelo. Al cuarto día fueron transferidas a una cámara incubadora Percival, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 12/12h luz/oscuridad, bajo luz fluorescente con intensidad lumínica de $35\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ensayo de expresión transitoria del gen GUS

El gen GUS codifica para la enzima β -glucoronidasa (β -D-glucoronide gluconohydrolase) cuya expresión se manifiesta en el tejido vegetal por la coloración azul que adquieren las células transformadas, a causa de la hidrólisis de sustratos colorigénicos como el 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucoronide (X-GLUC) y el p-nitrophenyl-glucoronide (PNPG,X-GLUC) (Naleway, J. 1992). Para evaluar la expresión transitoria del gen GUS en los explantes se desarrolló una escala, basada en el trabajo propuesto por Collado et al. (2015), con distintos grados de expresión según la proporción del área de interés teñida de azul en el cotiledón. Dicha escala consistió en tres grados de expresión, iniciando desde menos del 35% de la zona cotiledonar teñida hasta más del 70% (Tabla 2). Se evaluaron 30 explantes para cada una de las variedades utilizadas. El procedimiento de tinción de los explantes se llevó a cabo sumergiendo los tejidos en X-GLUC vertido en pozos de una placa múltiple Costar® a 37°C durante 5-10 horas (Zhang et al., 1999). Finalizado el procedimiento se registraron los explantes antes y después de lavarlos con etanol al 90% para blanquearlos y visualizar mejor la tinción.

Pruebas de detección del T-DNA por PCR

Se realizaron pruebas de amplificación de ADN de segmentos seleccionados del T-DNA por PCR, para detectar su inserción en el genoma de las plantas regeneradas de frijol. El protocolo de extracción por urea, las condiciones de PCR, el proceso de amplificación y los primers usados se encuentran en el anexo 1 y 2 respectivamente.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para el ensayo de expresión GUS transitoria se llevó a cabo con el software SAS® (statistical analysis system) versión 9.3 para Linux.

RESULTADOS

Material vegetal

Los primeros ensayos de transformación se llevaron a cabo partiendo de seis horas de esterilización de la semilla con gas cloro. En estos experimentos se encontraron algunas semillas contaminadas por bacteria o por hongo una vez se cumplieron los días de germinación. Debido a lo anterior, se realizó un experimento para evaluar el número de semillas que resultaban contaminadas en los platos de germinación después de ser previamente esterilizadas. Dicho experimento consistió en esterilizar las semillas de las tres variedades durante 6, 8 y 16 horas, para posteriormente sembrarlas en medio GM y verificar la contaminación superficial. El porcentaje de semillas sanas, sin aparente contaminación, se estableció como el número de semillas sin contaminación sobre el número total de semillas sembradas inicialmente en medio GM. Con base en lo anterior, el mayor porcentaje de semillas sanas para las tres variedades evaluadas se presentó cuando se realizó la esterilización durante 16 horas (Tabla 3). Por el contrario, con 6 horas de esterilización se encontró el menor porcentaje de semillas sanas, afectadas por contaminación superficial con bacteria u hongo.

Expresión transitoria del gen GUS

Con base en los resultados obtenidos de expresión transitoria del gen GUS, se encontró que la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 portando el plásmido pCAMBIA 1305.2 transfirió el T-DNA al 100% de los explantes evaluados para este ensayo. Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión transitoria del gen GUS, reflejada en el patrón de tinción en las tres variedades de frijol evaluadas. Para dichas variedades el patrón de tinción fue similar, lo cual se comprobó con la prueba de Chi cuadrado (Tabla 4). Por otro lado, en cuanto al grado de expresión evaluado en los explantes, se encontró que la mayoría de explantes (el 58% del total) presentaron menos del 35% de la zona de interés teñida y aproximadamente sólo el 4% de los explantes exhibieron más del 70% de la zona de interés con tinción GUS (Tabla 4).

Inducción de brotes

A los siete días de cultivo en medio SI/b1, se empezó a observar la formación de los primeros brotes. Posteriormente, a los 14 días de inducción ya eran visibles grupos de brotes bien formados con mayor tamaño. Durante esta primera fase de inducción de brotes se presentaron problemas por contaminación con bacteria en los explantes. Se observó que la contaminación empezaba desde la zona del explante que se encuentra inmersa en el medio, contaminando así los nuevos brotes en crecimiento, lo cual ocasionaba el descarte total del explante (Figura 3 (A)). Alternativamente, el crecimiento de la bacteria se originó en la parte del cotiledón que sobresalía del medio (Figura 3 (B)). En este segundo caso resultó más práctico controlar la contaminación realizando cortes a las partes infectadas del cotiledón y así evitando la propagación de la bacteria hasta la zona de crecimiento de brotes y el medio. Durante el proceso de inducción de brotes en medio SI/b1 fue donde se presentó la mayor pérdida de explantes principalmente causada por la contaminación con bacteria, entre un 34 - 54% de explantes sobrevivieron a esta etapa (Tabla 5).

Transcurridos 14 días a los explantes se les retiró el cotiledón y se transfirieron a medio SI/b5 para continuar con el proceso de inducción y desarrollo de brotes (Figura 4). Durante esta etapa los brotes que alcanzaron un tamaño superior a 1cm fueron extraídos del explante para enraizamiento.

El medio de inducción de brotes se continuó refrescando cada 14 días. Sin embargo, a medida que se realizaron los subcultivos en medio SI/b5, se empezaron a generar brotes deformes con apariencia vidriosa translúcida (Figura 5 (A, B, C)). A este tipo de brotes se les realizó el procedimiento de enraizamiento, pero no fue posible la obtención de raíces. Sólo ocasionalmente, durante esta fase, se generaron brotes con morfología definida. Algunos de estos brotes se lograron enraizar, sin embargo, no lograron elongarse y finalmente murieron. Se tomaron algunas muestras de este tejido para realizarles prueba GUS y se obtuvo un brote positivo que manifestó la tinción en todos los tricomas de la hoja y el tallo (Figura 6). Posteriormente, con el paso de las semanas los grupos de brotes continuaron creciendo, pero así mismo el tejido empezó a necrosarse por acción de la higromicina. Adicionalmente, en algunos explantes se presentó el crecimiento de callo junto a los brotes. Algunos de estos callos se extrajeron y se les realizó prueba GUS, la cual dio positiva en gran parte de estos tejidos. Con este tipo de callo no se hicieron ensayos para regeneración de plantas.

Enraizamiento y establecimiento de las plantas en suelo

Los primeros ensayos llevados a cabo para enraizar los brotes se realizaron dejando la base de estos en inmersión, durante un minuto, en una gota de 1 mg/ml de IBA. Con esta concentración se presentaron problemas de exceso de crecimiento de raíces y de callo, lo cual impidió el posterior crecimiento y elongación de los brotes. Ante esta dificultad se ensayaron concentraciones menores. Finalmente, los brotes se lograron enraizar sin exceso de crecimiento de callo para posteriormente elongar con una concentración de

0,1 mg/ml de IBA. Al cabo de 20 días los brotes sembrados en medio RM ya presentaban raíces. Estos brotes fueron transferidos a medio SE para elongación.

Transcurridos 20 días en medio SE algunos de los brotes ya se apreciaban como pequeñas plántulas con un tamaño entre 8 y 10 cm de longitud. Las plántulas que alcanzaron dicho tamaño fueron transferidas a suelo y dejadas en cámara húmeda durante 3 a 5 días. En esta etapa se tomaron muestras de tejido para realizarles pruebas de detección de la transgénesis mediante PCR. De la totalidad de plántulas analizadas, dos de la variedad ICA Quimbaya mostraron la inserción del gen GUS (Figura 7).

En total se transfirieron 21 plantas de la variedad Chauchachuga, 16 plantas de la variedad Calima y 6 plantas de la variedad ICA Quimbaya a suelo (Figura 8). De estas plantas, 10 de la variedad Chauchachuga y 6 de la variedad calima lograron establecerse y producir semilla mientras que las restantes no lograron desarrollarse (Tabla 6).

DISCUSIÓN

Inducción de brotes

En este trabajo se lograron inducir brotes a partir de nodos cotiledonares vía organogénesis en las tres variedades de frijol común ensayadas. La suplementación del medio SI con 1.7 mg/l de BAP estimuló el crecimiento de nuevos brotes que fueron visibles a partir de los siete días de cultivo. Lo encontrado en este trabajo está relacionado con lo reportado en trabajos previos donde ya había sido comprobada la efectividad de usar concentraciones superiores a 1 mg/l de BAP para lograr inducir brotes en frijol. Específicamente utilizando como explante nodo cotiledonar, Dang y Wei (2009) evaluaron diferentes concentraciones de BAP para inducir brotes y encontraron que la mejor respuesta se obtuvo con 1.0 mg/l seguida de 2.0 mg/l. Así mismo, Mcclean y Grafton (1989), también con explantes de nodo cotiledonar, ensayaron diferentes concentraciones de BAP en medio de inducción y encontraron el mayor crecimiento de brotes y yemas con una concentración de 1.12 mg/l.

Hiperhidricidad

El fenómeno observado en el presente trabajo durante la fase de inducción de brotes con el paso de subcultivos (Figura 5 (A, B, C)), puede estar relacionado con la hiperhidricidad o vitrificación. Los brotes afectados por hiperhidricidad presentan problemas de diferenciación, apariencia translúcida, malformación y son fácilmente rompibles; así mismo, generalmente no generan raíces y si las generan son escasas y con crecimiento pobre (Kevers *et al.*, 2004). Brotes con similares características fueron obtenidos por Muñoz (2015) en su investigación en frijol común. En dicho trabajo, durante la fase de regeneración de brotes en medio de inducción con BAP [1 mg/l], se presentó la formación de brotes normales y, en mayor proporción, brotes anormales (translúcidos de color verde claro) en las cuatro variedades de frijol ensayadas. Los brotes normales fueron retirados del explante para continuar con el proceso de desarrollo y enraizamiento. En cuanto a los brotes anormales, los autores optaron por reducir la concentración de BAP a 0.1 mg/l en el medio para solucionar este fenómeno. No obstante, encontraron que se siguieron formando tanto brotes normales como anormales pero esta vez con menor frecuencia debido a la presencia de mayor necrosis en el explante. Por otro lado, Varisai Mohamed *et al.* (2006) también reportaron la obtención de brotes vitrificados en su trabajo con *Phaseolus angularis*. Los autores encontraron que el uso de concentraciones de TDZ superiores a 5 μ M fomentaron la formación de brotes débiles e hiperhidratados según sus resultados. De igual forma que lo realizado por Muñoz (2015), en el presente trabajo se optó por ir separando del explante los brotes con buen desarrollo para así evitar que con el paso entre subcultivos se generara hiperhidricidad en la totalidad de brotes regenerados.

Expresión del gen GUS en tricomas

El gen GUS empleado en este trabajo se encuentra controlado por el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV35S) (Figura 1). Dicho promotor es considerado un promotor constitutivo. Sin embargo, existen algunos estudios donde se reporta que su actividad puede no ser del todo constitutiva, puesto que, por ejemplo, se ha encontrado

que la acumulación del transcrito varía tanto temporal como espacialmente en los tejidos (Williamson et al., 1989). Así mismo, ha sido reportado que el promotor CaMV35S presenta cierta especificidad de expresión en tejidos florales y que dicha expresión difiere entre distintas especies e incluso entre genotipos (Benfey y Chua, 1989; Sunilkumar et al., 2002). Adicionalmente, se ha estudiado el patrón de expresión del gen GUS controlado por el promotor CaMV35S en tejidos de soya transgénica a nivel celular y se ha encontrado que en algunos tipos de células no se presenta ningún tipo de actividad GUS, mientras que en otros tipos se exhiben diferentes niveles de expresión del gen, lo cual sugiere que el promotor es específico del tipo celular (Yang y Christou, 1990). Según lo observado en este trabajo, es probable que el brote con tinción GUS positiva sólo a nivel de los tricomas (Figura 6) fuese completamente transgénico y que dicho patrón de expresión sea debido a que el promotor CaMV35S no se está expresando constitutivamente en todos los tejidos y órganos, como ya ha sido reportado previamente en otros cultivares.

Enraizamiento y elongación

En el presente trabajo, la concentración de 1 mg/ml de IBA que se utilizó inicialmente fue un factor limitante en cuanto a la posterior generación de raíces viables. Con este sistema se logró el crecimiento de raíces en algunos brotes, pero así mismo, también se generó el crecimiento de callo que, en la totalidad de casos, superó el crecimiento del brote impidiendo su desarrollo. Aunque en trabajos previos se ha remarcado a la hormona IBA como una potente auxina para lograr enraizamiento *in vitro* en leguminosas (Dewir et al., 2016), la concentración inicialmente utilizada de esta hormona en este estudio pudo resultar más de la necesaria, lo cual se evidenció en la etapa de enraizamiento con el crecimiento excesivo de callo. En estudios con leguminosas ha sido reportado que el uso de una baja concentración de auxinas juega un papel fundamental a la hora de lograr el enraizamiento, mientras que elevadas concentraciones de estas hormonas pueden retardar el enraizamiento o también pueden originar el crecimiento de callo desde la base de los brotes impidiendo la aparición de raíces (Dewir et al., 2016). Bajo esta hipótesis, Roy et al. (1992) evaluaron en *Lathyrus sativus* diferentes concentraciones de IBA para

la obtención de raíces y encontraron que el enraizamiento sólo fue posible con el uso de IBA 0.5 μM , las concentraciones ensayadas por encima de esta no permitieron el enraizamiento. Así mismo, Parveen y Shahzad (2010) evaluaron en *Cassia sophera* el uso para enraizamiento de las auxinas IBA y NAA en diferentes concentraciones. Los autores reportaron que, de los tratamientos evaluados, la mejor respuesta al enraizamiento fue obtenida con una concentración de IBA 1 μM .

En este trabajo, la reducción de la concentración de IBA a 0.1 mg/ml (10 veces menos que la concentración inicialmente utilizada) permitió la inducción de sistemas radiculares en los brotes y así mismo impidió el crecimiento de callo desde la base de estos.

En cuanto a la fase de elongación, inicialmente, una vez los explantes pasaban por la etapa de inducción se iban sembrando en medio SE para elongar los brotes individualmente o en grupo. Con el uso de esta metodología no se obtuvieron resultados positivos debido al fenómeno anteriormente discutido de hiperhidricidad, así como también por la dificultad para obtener raíces de dichos brotes. Posteriormente, con el ajuste en la concentración de IBA durante la fase de enraizamiento, aquellos brotes con buenas raíces se sembraron en medio SE y finalmente lograron elongarse para subsecuentemente ser trasplantados a suelo. Lo anterior pudo ser ocasionado por la correcta interacción generada a nivel hormonal entre auxinas y citoquininas, a causa de la reducción en la concentración de la hormona IBA que, a la larga, sumado a la adición de 0.6 g/l de GA3 al medio SE, permitió el desarrollo y elongación de las plántulas.

Pruebas de detección del T-DNA por PCR

Las pruebas de PCR realizadas a las dos plántulas de la variedad ICA Quimbaya (Figura 7), evidencian el proceso de transgénesis. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que dichas plántulas fuesen quiméricas, dado que mediante la detección por PCR, no es posible conocer con certeza si hay o no presencia de quimerismo en las plantas evaluadas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró la efectividad de la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* para transferir T-DNA a frijol común, independientemente del genotipo de los cultivares Andinos probados. Así mismo, a pesar de la conocida recalcitrancia de frijol común en cuanto a la transformación genética y regeneración *in vitro*, este trabajo permitió regenerar plantas no transgénicas de frijol por organogénesis *in vitro*. Lo cual es una contribución valiosa al establecimiento de un protocolo de transformación para esta especie de tanta importancia económica mundial.

Por otro lado, las pruebas de PCR indicaron que se produjeron pocos eventos de transgénesis aparentemente estables debido principalmente a la efectividad de la selección de tejidos transgénicos con el uso de higromicina (1 a 5 mg/l), lo cual indudablemente no fue la selección óptima y promovió la aparición de escapes. Ante estos resultados, surge la necesidad de evaluar si es conveniente el uso de antibióticos para realizar la selección en frijol o más bien se debe optar por realizar la selección con herbicidas, la cual ha sido usada de manera efectiva en muchos otros cultivos incluyendo a soya.

En cuanto a la adaptación del procedimiento de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* de soya a frijol común, se evidenció la necesidad de realizar ajustes para que el protocolo avanzara, sobre todo en la fase de regeneración, donde se presentaron la mayoría de obstáculos para el desarrollo de este proyecto. No obstante, se demostró que, la aplicación de este protocolo con los ajustes respectivos, hizo posible la obtención de plantas putativamente transgénicas de *P. vulgaris*.

En general, está clara la dificultad que supone trabajar con cultivos recalcitrantes para la aplicación de biotecnologías. Sin embargo, a pesar de su carácter exploratorio, este trabajo dio algunas pautas para seguir adelante con el desarrollo de metodologías de inserción de genes en frijol común.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Doctor Paul Chavarriga y a todo el grupo de trabajo de la Plataforma de Transformación del CIAT por todas las enseñanzas y el apoyo brindado durante el desarrollo del trabajo. Así mismo, agradece al Doctor Steve Beebe y al programa de frijol del CIAT por haber hecho posible este proyecto. Por último, agradece a la Universidad de los Llanos, especialmente a los docentes del programa de Biología, por haberle brindado las mejores herramientas para su formación como persona y como profesional.

REFERENCIAS

- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, a C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., & Faria, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, 142–150.
- Beaver, J. S., & Osorno, J. M. (2009). Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica*, 168(2), 145–175.
- Benfey, P.N. and Chua, N.-H. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174–181.
- Brasileiro, a C. M., Aragao, F. J. L., Rossi, S., Dusi, D. M. a, Barros, L. M. G., & Rech, E. L. (1996). Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 810–815.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) — model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128.
- Collado, R., Bermúdez-Caraballoso, I., García, L. R., Veitía, N., Torres, D., Romero, C.,

- Angenon, G. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. using indirect organogenesis. *Scientia Horticulturae*, 195, 89–100.
- Da Silva Fialho, L., Guimarães, V. M., De Barros, E. G., Moreira, M. A., Dos Santos Dias, L. A., De Almeida Oliveira, M. G., ... De Rezende, S. T. (2006). Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(2), 87–89.
- Dang, W., & Wei, Z. M. (2009). High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. *Biologia Plantarum*, 53(2), 312–316.
- De Clercq, J., Zambre, M., Van Montagu, M., Dillen, W., & Angenon, G. (2002). An optimized Agrobacterium-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Reports*, 21(4), 333–340.
- Dewir, Y. H., Murthy, H. N., Ammar, M. H., Alghamdi, S. S., Al-Suhaibani, N. A., Alsadon, A. A., & Paek, K. Y. (2016). In vitro rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 57(4), 311–322.
- Di, R., Purcell, V., Collins, G. B., & Ghabrial, S. A. (1996). the Bean Pod Motile Virus Coat Protein Precursor Gene. *Plant Cell*, 746–750.
- Dillen, W., De Clercq, J., Goossens, A., Van Montagu, M., & Angenon, G. (1997). Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(2), 151–158.
- Gamborg, O. L., Miller, R. a., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2(4), 208–218.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R. J., Dommes, J., & Gaspar, T. (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 181–191.

- Mcclean, P., & Grafton, K. E. N. F. (1989). Regeneration of Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via Organogenesis. *Plant Science*, 60, 117–122.
- Miklas, P. N., & Singh, S. P. (2007). 1 Common Bean. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 3 - Pulses, Sugar and Tuber Crops*, 3, 1–31.
- Muñoz Valverde, J. (2015). Regeneración in vitro de variedades de frijol costarricense (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de tejidos morfogénicos: inducción de callo e histología del proceso (Tesis doctoral).
- Murasnige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15(3), 473–497.
- Naleway, J. J. (1992). Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrates, in *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression* (Gallagher, S. R., ed.), Academic Press, San Diego, CA, pp. 61–76.
- Parveen, S., & Shahzad, A. (2010). TDZ-induced high frequency shoot regeneration in *Cassia sophera* Linn. via cotyledonary node explants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(2), 201–206.
- Roy, P. K., Barat, G. K., & Mehta, S. L. (1992). In vitro plant regeneration from callus derived from root explants of *Lathyrus sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(2), 135–138.
- Russell, D. R., Wallace, K. M., Bathe, J. H., Martinell, B. J., & McCabe, D. E. (1993). Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 12(3), 165–169.
- Sunilkumar, G., Mohr, L., Lopata-Finch, E., Emani, C., & Rathore, K. S. (2002). Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology*, 50(3), 463–474.
- Varisai Mohamed, S., Sung, J. M., Jeng, T. L., & Wang, C. S. (2006). Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: High efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant*

Cell, Tissue and Organ Culture, 86(2), 187–199.

Williamson, J. D., Hirsch-Wyncott, M. E., Larkins, B. a, & Gelvin, S. B. (1989).
Differential Accumulation of a Transcript Driven by the CaMV 35S Promoter in
Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*, 90(4), 1570–1576.

Yang, N.-S., & Christou, P. (1990). Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS
gene in transgenic soybean plants. *Developmental Genetics*, 11(4), 289–293.

Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P., & Clemente, T. E. (1999). The use of glufosinate as a
selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue
and Organ Culture*, 56(1), 37–46.



Figura 1. Representación del fragmento del T-DNA del plásmido pCAMBIA 1305.2. De izquierda a derecha: RB, borde derecho del T-DNA. CaMV35s, promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor controlando el gen GusPlus con terminador Nos. HPTII, gen de resistencia a higromicina con promotor doble 35S (2x35S) y terminador 35S. LB, borde izquierdo del T-DNA.

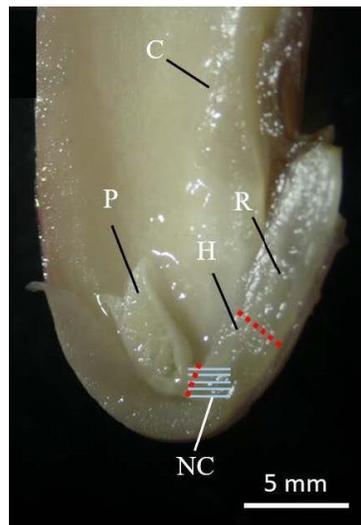


Figura 2. Preparación de explantes para inoculación con *A. tumefaciens*. La línea punteada roja indica los sitios de corte del hipocótilo y el epicótilo para retirar la plúmula. Las líneas azules indican las heridas realizadas en la zona del nodo cotiledonar. C= Cotiledón, P= Plúmula, H= Hipocotilo, R= Radícula, NC= Nodo cotiledonar.

Tabla 1. Lista de medios de cultivo empleados. Definición de siglas: GM= germinación, CC= cocultivo, SI/w= lavado, SI= inducción de brotes, RM= enraizamiento, SE= elongación. Para las sales mayores y menores B5 (Gamborg et al., 1968), las sales

mayores y menores MS (Murashige y Skoog, 1962) y las vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), se indica la concentración del stock utilizado.

Componentes	GM	CC líquido	CC	SI/w	SI	RM	SE
Sales mayores B5 10X	100 ml	10 ml	10 ml	100 ml	100 ml		
Sales menores B5 1000X	1 ml	0.1 ml	0.1 ml	1 ml	1 ml		
Sales mayores MS 10X						100 ml	100 ml
Sales menores MS 1000X						1 ml	1 ml
Hierro NaEDTA	4.3 g/l	430 mg/l	430 mg/l	4.3 g/l	4.3 g/l	4.3 g/l	4.3 g/l
Sacarosa	20 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
MES		3.9 g/l	3.9 g/l	0.6 g/l	0.6 g/l	0.6 g/l	0.6 g/l
Gelrite	3 g/l				3 g/l	3 g/l	3 g/l
Phytigel			5 g/l				
Vitaminas B5	10 ml	1 ml	1 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Acetosiringona		0.04 g/l	0.04 g/l				
GA3		0.25 mg/l	0.25 mg/l				0.6 g/l
BAP		1.7 mg/l	1.7 mg/l	1.7 mg/l	1.7 mg/l		
L-cisteína			0.4 g/l				
DTT			0.154 g/l				
Na-tiosulfato			0.158 g/l				
Timetin				0.05 g/l	0.05 g/l	0.05 g/l	0.05 g/l
Cefotaxime				0.1 g/l	0.1 g/l	0.1 g/l	0.1 g/l
Higromicina					1 mg/l		
Nitrato de plata						3.18 mg/l	3.18 mg/l
pH	5.7	5.4	5.4	5.7	5.7	5.7	5.7

Tabla 2. Escala propuesta para evaluar los grados de expresión transitoria del gen GUS con base en el porcentaje de tinción (color azul) en cada explante.

Grado de expresión transitoria	Descripción	Tinción en el explante
1	Menos del 35% de la zona teñida	
2	35 – 70% de la zona teñida	
3	Más del 70% de la zona teñida	

Tabla 3. Resultados de la prueba de esterilización de semillas de las variedades de frijol Chauchachuga, Calima e ICA Quimbaya. El porcentaje de supervivencia se estableció

como el número de semillas sin contaminación sobre el número total de semillas sembradas inicialmente en medio GM.

Horas de esterilización	Semillas sembradas en medio GM	Semillas contaminadas	Porcentaje de supervivencia (%)
Calima			
6 h	100	17	83
8h	100	13	87
16h	100	6	94
Chauchachuga			
6 h	100	18	82
8h	100	11	89
16h	100	5	95
ICA Quimbaya			
6 h	100	19	81
8h	100	13	87
16h	100	7	93

Tabla 4. Resultados del ensayo de expresión transitoria del gen GUS y prueba Chi cuadrado para el grado de expresión entre las tres variedades de frijol evaluadas. Grados de expresión GUS transitoria: 1= Menos del 35% de la zona teñida, 2= 35 – 70% de tinción, 3= Más del 70% de tinción. Para cada casilla se muestran tres resultados los cuales corresponden a: frecuencia, esperados y porcentaje, en orden de arriba hacia abajo.

Variedad	Grado de expresión GUS transitoria			
	1	2	3	Total
Chauchachuga	17	11	2	30
	17.333	11.333	1.3333	
	18.89	12.22	2.22	33.33
Calima	17	12	1	30
	17.333	11.333	1.3333	
	18.89			

		13.33	1.11	33.33
ICA Quimbaya	18	11	1	30
	17.333	11.333	1.3333	
	20.00	12.22	1.11	33.33
Total	52	34	4	90
	57.78	37.78	4.44	100.00

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi cuadrado	4	0.5973	0.9634

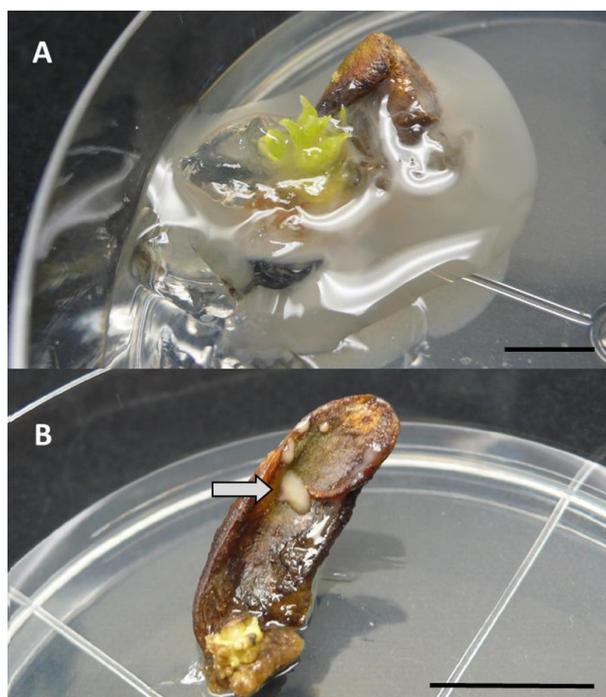


Figura 3. Explantes de frijol variedad Calima en medio de inducción de brotes contaminados por bacteria. (A) El crecimiento de la bacteria inicia desde la zona de crecimiento de los brotes contaminando la mayor parte del explante y el medio. (B) el crecimiento de la bacteria se concentra en zonas del cotiledón que sobresalen del medio. La flecha señala el crecimiento de la bacteria sobre la parte superior del cotiledón. Barra en A: 20 mm. B: 8 mm.

Tabla 5. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de las variedades Chauchachuga, Calima e ICA Quimbaya a los 14 días de inducción de brotes en medio SI/b1. El porcentaje de sobrevivencia se definió como el número total de explantes que pasaron a la etapa de inducción en SI/b5 sobre el total de explantes sembrados inicialmente en medio SI/b1.

Variedad	Explantes en SI/b1	Explantes en SI/b5	Porcentaje de supervivencia
Chauchachuga	142	76	54 %
Calima	130	54	42 %
ICA Quimbaya	118	40	34 %

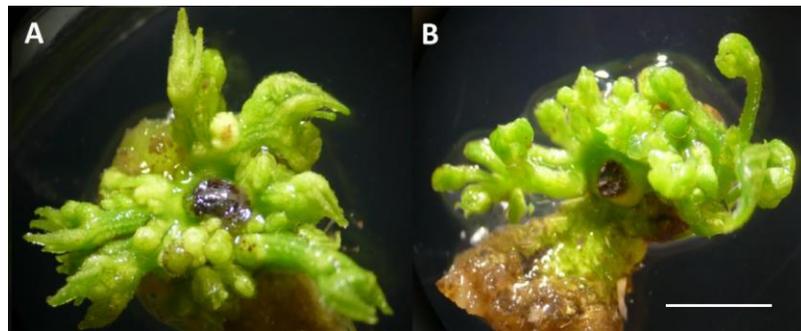


Figura 4. Inducción de brotes de frijol variedad Chauchachuga (A) y Calima (B) a los 21 días de cultivo de los explantes en medio SI/b5. Barra: 6 mm.

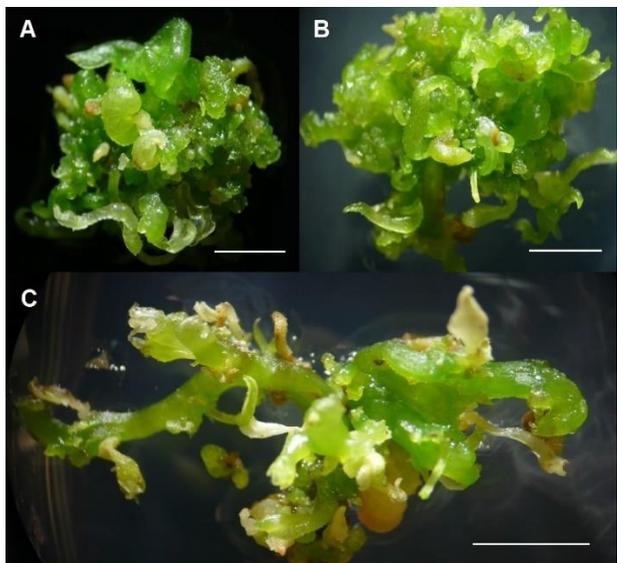


Figura 5. Explantes con brotes vitrificados de la variedad Ica Quimbaya (A), Chauchachuga (B) y Calima (C). Barra en A: 5 mm. B: 5 mm. C: 2mm.

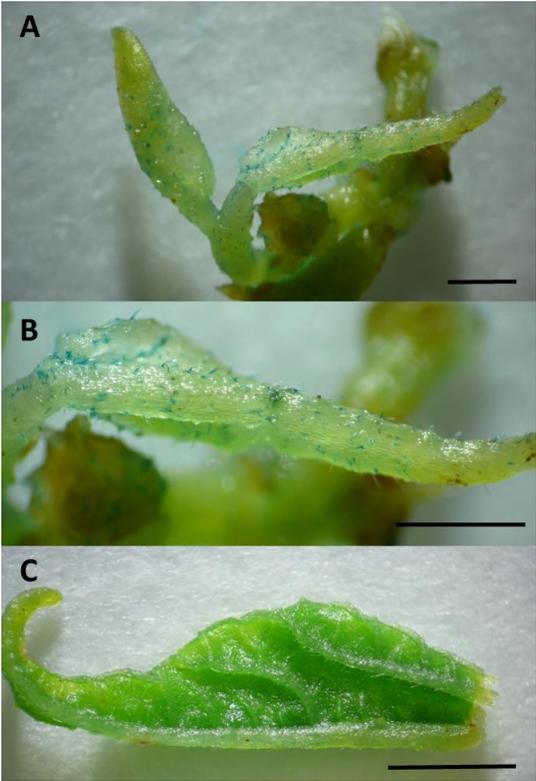


Figura 6. (A) Expresión del gen GUS en los tricomas de un brote de la variedad Chauchachuga. (C) Hoja control sin tinción en los tricomas después de ser expuesta a la prueba GUS. Barras: A y B: 3 mm, C: 5 mm.

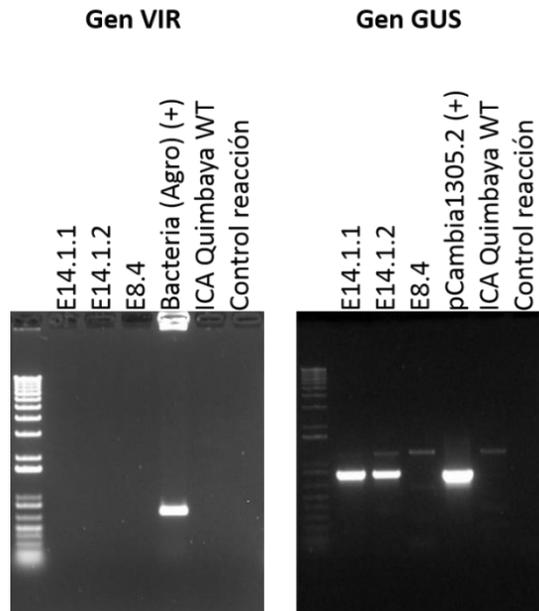


Figura 7. Resultados del PCR para las plántulas evaluadas de ICA Quimbaya. En la figura de la derecha, las columnas E14.1.1 y E14.1.2 muestran productos de PCR que coinciden en tamaño con el producto amplificado para el gen GUS. En la foto de la izquierda se amplificó el gen VIR para descartar la posibilidad de que la presencia del gen GUS en las plántulas se debiera a residuos de la bacteria.



Figura 8. Plantas de frijol variedad Chauchachuga (Izquierda) y variedad Calima (Derecha) regeneradas a partir de nodos cotiledonares vía organogénesis directa.

Tabla 6. Resultado final de las plantas inicialmente transferidas a suelo, cuántas de ellas resultaron potencialmente transgénicas mediante análisis por PCR (Figura 13) y el número de plantas que lograron establecerse y producir semilla.

Variedad	Plántulas transferidas a suelo	Plantas potencialmente transgénicas	Plantas con producción de semilla
Chauchachuga	21	0	10
Calima	16	0	6
ICA Quimbaya	6	2	0

