

# Sistemas de regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. y su aplicación en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*

## **Autores principales**

Raúl Collado López<sup>1</sup>, Lourdes García Rodríguez<sup>1</sup>, Idalmis Bermúdez Caraballoso<sup>2</sup>, Novisel Veitía Rodríguez<sup>2</sup>, Dámaris Torres Rodríguez<sup>2</sup>, Carlos Romero Quintana<sup>2</sup>, Amanda Martirena Ramirez<sup>2</sup>, Bárbara Ocaña<sup>2</sup>, Luis Emelio Rojas<sup>2</sup>.

## **Colaboradores**

Prof. Dr. C. Geert Angenon<sup>3</sup>, MSc. Edilio Quintero Fernández<sup>4</sup>, MSc. Jorge Liusver Pérez Pérez<sup>5</sup>.

## **Entidad ejecutora principal**

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas.

## **Entidades participantes**

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias y Bioingenierías. Laboratorio de Genética de Plantas. Universidad Libre de Bruselas. Bruselas, Bélgica.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones de Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba.

<sup>5</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Cuba.

## **Autor para correspondencia**

Dr.C. Raúl Collado López.

Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830.

Fax: 53 (422) 81 329.

E-mail: raulc@ibp.co.cu

## **Resumen**

AEI frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fuente importante de proteínas para las personas, principalmente en los países en desarrollo. Varias enfermedades bacterianas, fungosas y virales afectan la producción de frijol en el mundo, causando importantes pérdidas económicas a los productores de este grano. Para disminuir las pérdidas en este cultivo es necesaria la obtención de variedades mejoradas. Sin embargo, los métodos tradicionales de mejoramiento están limitados por el bajo potencial de recombinación en esta especie, las barreras sexuales y el aborto de embriones en híbridos interespecíficos. La transformación genética puede ayudar a los mejoradores a introducir rasgos nuevos en el frijol y contribuir a mejorar la tolerancia o resistencia a factores bióticos y abióticos que limitan su rentabilidad. El objetivo de este trabajo fue establecer diferentes sistemas de regeneración en *P. vulgaris*, y su aplicación para el desarrollo de un método de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

regeneración vía organogénesis directa de *P. vulgaris* variedades: CIAP7247F, BAT93, BAT304, BAT482 e ICA Pijao, utilizando secciones de tallo como explante. El precultivo de los explantes en medio líquido con TDZ, no descrito para esta especie en la literatura científica consultada, fue un paso determinante para la inducción de yemas múltiples. Se estandarizaron varias fases del cultivo, incluyendo la formación de brotes, enraizamiento, aclimatación de plántulas y el crecimiento de las plantas en casa de cultivos protegidos.

La optimización de varios parámetros que intervienen en la transferencia de ADN en combinación con la organogénesis directa, permitió por vez primera regenerar plantas de *P. vulgaris* a partir de tejido transformado con *A. tumefaciens*. Se logró la formación de embriones somáticos en cotiledones de semillas inmaduras de *P. vulgaris*. Para esta especie por vez primera se obtuvieron a nivel mundial embriones somáticos que alcanzaron la etapa cotiledonal. Se laboró en el establecimiento de un protocolo para la regeneración in vitro de *P. vulgaris* var. CIAP7247F vía organogénesis indirecta.

El uso del nudo cotiledonal con uno o dos cotiledones, que no habían sido descritos como explantes iniciales para la regeneración de frijol común, fue un factor importante para la formación eficiente de callos morfogenéticos. El protocolo establecido para CIAP7247F es reproducible para las variedades comerciales BAT93, BAT304, BAT482 e ICA Pijao. Sobre la base de la regeneración vía organogénesis indirecta, se llevó a cabo la transformación mediada por *A. tumefaciens* en frijol común.

El uso de callos nodulares verdes, que no se habían utilizado antes como explante para la transformación de frijol, jugó un papel importante para obtener plantas transgénicas. Este sistema permitió obtener plantas transgénicas que transmitieron a sus progenies los transgenes con proporción Mendeliana (3:1), lo que demostró su valor para la transformación genética de frijol.

Estos resultados permitieron disponer por vez primera a nivel mundial de un protocolo de transformación genética vía *A. tumefaciens* que puede ser empleado para la obtención de variedades de frijol mejoradas.

### **Comunicación Corta**

Establecer un protocolo de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* eficiente, reproducible, genotipo independiente y rutinario para obtener plantas transgénica de *Phaseolus vulgaris* L., es un propósito de los programas de mejoramiento genético. Los principales requerimientos para lograr este propósito son: desarrollar un sistema de regeneración eficiente, capaz de regenerar plantas fértiles a partir de tejido de *P. vulgaris* transformado y en segundo lugar la optimización de técnicas de transformación mediadas por *A. tumefaciens* que permitan una eficiente transferencia de ADN a las células de frijol. Para contribuir con este objetivo se investigó en diferentes vías de regeneración in vitro de *P. vulgaris*, y los protocolos establecidos fueron aplicados para desarrollar un método de transformación genética basado en *A. tumefaciens*.

### **Regeneración in vitro vía organogénesis directa de frijol común**

Se estableció un procedimiento para la regeneración vía organogénesis directa de plantas fértiles de *P. vulgaris*, var. CIAP7247F. El pre-cultivo de las plántulas en medio de cultivo líquido fue necesario para la formación de yemas múltiples. Las yemas múltiples se diferenciaron en brotes en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. La adición de GA3 (1.4 mg l<sup>-1</sup>) y AgNO<sub>3</sub> (2.12 mg l<sup>-1</sup>) al medio de cultivo favoreció la elongación de los brotes (Biotecnología Vegetal (2009) 9: 47-51). La formación de brotes incrementó cuando se añadió sulfato de adenina al medio de cultivo (Biotecnología Vegetal (2012) 12: 59-62). Los porcentajes de enraizamiento más altos fueron observados con la adición de AIB al medio de cultivo de enraizamiento. La longitud de los brotes influyó en su enraizamiento, el 100% de los brotes mayores de 20 mm enraizaron. Las plantas enraizadas in vitro mayores de 20 mm presentaron una tasa de supervivencia en la casa de cultivos protegidos superior al 95%, donde florecieron y formaron semillas fértiles (Biotecnología Vegetal (2009) 9(3): 177-181). Este sistema de regeneración eficiente desarrollado para frijol común puede ser de gran ayuda para la transformación genética de esta importante especie.

### **Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de frijol común empleando organogénesis directa**

Para lograr la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en frijol común, se utilizó el protocolo de regeneración vía organogénesis directa desarrollado para las variedades comerciales de *P. vulgaris*, CIAP7247F, BAT93, BAT304, BAT482 e ICA Pijao (Biotecnología Vegetal (2012) 12(1): 49-52). Se emplearon como explante blanco secciones de epicotilo de plantas germinadas in vitro de la variedad CIAP7247F. Los explantes fueron inoculados con las cepas de *A. tumefaciens* EHA101 y C58C1RifR(pMP90), conteniendo el vector binario pTJK136 con el gen *gusA*. La temperatura de co-cultivo y el fotoperíodo tuvieron un significativo efecto sobre la transferencia de ADN mediada por *A. tumefaciens*. El tratamiento a los explantes y la adición de acetosiringona al medio de co-cultivo incrementaron la actividad GUS. La

combinación de los mejores tratamientos para cada parámetro estudiado (temperatura 25 °C, oscuridad total, explantes tratados con carborundo y la suplementación del medio de co-cultivo con 200 µM de acetosiringona), permitió el establecimiento de un procedimiento reproducible de transferencia de ADN mediado por *A. tumefaciens*. El método descrito en este estudio incrementó la eficiencia de la inoculación de *A. tumefaciens* y se obtuvieron altos niveles (90%) de expresión GUS transitoria. Este procedimiento de transferencia de ADN combinado con el protocolo de regeneración vía organogénesis directa permitió por vez primera en *P. vulgaris* la obtención de plantas fértiles a partir de tejido transformado con *A. tumefaciens*. Sin embargo, no se observó transmisión de los transgenes a la progenie, lo que demostró que las supuestas plantas transformadas eran quimeras.

### **Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *P. vulgaris* var. CIAP7247F**

Para lograr la formación de embriones somáticos en *P. vulgaris* var. CIAP7247F, se emplearon cotiledones de semillas inmaduras como material vegetal inicial. Se determinó el efecto de cinco concentraciones de 2,4-D (10, 20, 30, 40 y 50 mg l<sup>-1</sup>) y la orientación de los cotiledones en el medio de cultivo sobre la formación de embriones somáticos. Los resultados demostraron que con 40 y 50 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D se presentaron los mayores valores de explantes que formaron embriones somáticos y número de embriones somáticos por explante. Los embriones somáticos se formaron en el lado abaxial de los cotiledones cuando estos fueron colocados con ese lado opuesto al medio de cultivo. Se logró la formación de embriones somáticos en cotiledones de semillas inmaduras de *P. vulgaris* var. CIAP7247F. Se demostró que la adición de 2,4-D al medio de cultivo y la orientación del explante sobre el medio de cultivo tuvieron un efecto determinante en la embriogénesis somática de esta importante leguminosa (Biotecnología Vegetal (2011) 11: 131-135).

### **Regeneración de plantas vía organogénesis indirecta de *P. vulgaris***

Se desarrolló un protocolo para la regeneración de plantas vía organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. en la variedad CIAP7247F. Para la formación de callos se definió el tipo y edad del explante. Se aplicó el protocolo en cultivares de frijol común BAT-93, BAT-304, BAT-482 e Ica Pijao. La mayor formación de callos se logró con el empleo del nudo cotiledonal con uno o dos cotiledones a partir de semillas frescas o almacenadas durante cuatro meses. Los mayores valores de masa fresca de los callos (0.76 y 0.72 g) se observaron en el medio de cultivo con 0.04 y 0.2 mg l<sup>-1</sup> de tidiazuron. Los mayores valores en cuanto al número de brotes por callo (3.12 y 2.91) se obtuvieron cuando se emplearon concentraciones de 2.25 y 4.50 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP en el medio de cultivo de regeneración. Los brotes enraizados presentaron un desarrollo normal en la fase de climatización. Se demostró la reproducibilidad del protocolo en cuatro variedades comerciales de frijol (Biotecnología Vegetal (2012) 12: 143-148; Scientia Horticulturae (2013) 153: 109-116).

### **Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de *P. vulgaris* empleando organogénesis indirecta**

La transformación genética de plantas como complemento de las técnicas de mejoramiento convencionales posibilita la transferencia de genes fuera del acervo genético accesible solo a través de la hibridación sexual. La obtención de plantas transgénicas de frijol es aún un reto debido a la baja respuesta de la especie en el cultivo in vitro y a la ineficiencia en la transferencia de ADN. En este trabajo se estudiaron varios parámetros relacionados con la transferencia de ADN. El método de transferencia de ADN optimizado se combinó con la regeneración vía organogénesis indirecta y un sistema de selección basado en la resistencia al herbicida Finale para obtener plantas transgénicas de frijol. El empleo de callos nodulares verdes, los cuales no habían sido utilizados antes como explante blanco, jugó un papel importante para el establecimiento del protocolo de transformación. La transferencia de ADN fue influenciada por la cepa de *A. tumefaciens*, el fotoperíodo, la concentración de la suspensión bacteriana, el período de co-cultivo y el tipo de callo utilizado como explante blanco. La determinación de la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio basada en la resistencia al herbicida Finale permitió la selección de plantas transformadas de frijol (Bioteología Vegetal (2012) 12: 203-210). Utilizando el protocolo de transformación genética descrito en este trabajo se obtuvieron plantas transgénicas estables que transfirieron los transgenes a la progenie con segregación Mendeliana. Estos resultados permitieron disponer por vez primera de un protocolo de transformación genética vía *A. tumefaciens* que puede ser empleado para la obtención de variedades de frijol mejoradas (Scientia Horticulturae (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.046>)

## **Bibliografía**

- Amugune, N., Anyango, B., Mukiyama, T., 2011. Agrobacterium-mediated transformation of common bean. African Crop Science Journal 19, 137-147.
- Angenon, G., Thu, T.T., 2011. Genetic Transformation, In: Pratap, A., Kumar, J. (Eds.), Biology and Breeding Food Legumes. CABI, Indian Institute of Pulses Research, India pp. 178-190.
- Atif, R., Patat-Ochatt, E., Svabova, L., Ondrej, V., Klenoticova, H., Jacas, L., Griga, M., Ochatt, S., 2013. Gene transfer in legumes, In: Lüttge, U., Beyschlag, W., Francis, D., Cushman, J. (Eds.), Progress in Botany. Springer Verlag, pp. 37-100.
- Bermúdez-Carabaloso, I., Collado, R., García, L.R., Veitía, N., Torres, D., Romero, C., Angenon, G., 2007. Empleo de los agentes selectivos Geneticina G-418 e Higromicina B para la transformación genética en *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP7247F. Bioteología Vegetal 7, 205-210
- Collado, R., Veitía, N., Bermúdez-Carabaloso, I., García, L., Torres, D., Romero, C., Lorenzo, J., Angenon, G., 2013. Efficient in vitro plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. Scientia Horticulturae 153, 109-116.
- García, L.R., Collado, R., Bermúdez-Carabaloso, I., Veitía, N., Torres, D., Romero, C., 2008. Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. Bioteología Vegetal 8, 109-114.

- Hong, H.P., Zhang, H., Olhoft, P., Hill, S., Wiley, H., Toren, E., Hillebrand, H., Jones, T., Cheng, M., 2007. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43, 558-568.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., Angenon, G., 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122, 101-108.
- Mendel, R., Müller, B., Schulze, J., Kolesnikov, V., Zelenin, A., 1989. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 31-34.
- 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, 59-70.
- Rech, E.L., Vianna, G.R., Aragao, F.J.L., 2008. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3, 410-418.
- Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S., Perl, A., 2005. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—Problems and progress. *Scientia Horticulturae* 107, 2-10.
- Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Van Montagu, M., Terry, N., Angenon, G., 2005. A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 914-924.

### **Aporte científico**

Se logró establecer por vez primera a nivel nacional e internacional un protocolo para la transformación genética en *Phaseolus vulgaris* L. vía *Agrobacterium tumefaciens*. El protocolo establecido constituye una herramienta para los estudios genómicos y genéticos básicos aplicados en esta especie. Se dispone por vez primera de un sistema para la obtención de plantas transgénicas de frijol en el cual se integraron la regeneración in vitro vía organogénesis indirecta, la transferencia de ADN vía *A. tumefaciens* y la selección del tejido transformado basados en la resistencia a Glufosinato de Amonio. En la literatura científica consultada hasta la fecha, no existe información sobre la obtención de plantas transgénicas estables en este cultivo con el empleo de *A. tumefaciens* para la transferencia de genes. Por tanto, estos resultados constituyen un aporte valioso para la comunidad científica interesada en el mejoramiento genético de esta importante leguminosa, ya que por vez primera, con el empleo de *A. tumefaciens* como mecanismo de ingeniería genética, se describe la obtención de líneas transgénicas estables de frijol que transmiten los transgenes a sus progenies.

### **Beneficio práctico y social**

El mejoramiento genético convencional en el género *Phaseolus* (frijoles) está limitado por varios factores tales como las barreras sexuales entre las especies, la baja capacidad de cruzamiento y el aborto de embriones en híbridos interespecíficos. El empleo de la transformación genética en los programas de mejoramiento del frijol ayudará a vencer las limitaciones de las técnicas convencionales. Este sistema de transformación genética establecido, se está aplicando para el mejoramiento genético de variedades comerciales de

frijol (Programa Nacional de Alimento humano) en tres vías fundamentales: i) resistencia al virus del mosaico dorado del frijol; ii) incrementar la tolerancia a sequía, salinidad y altas temperaturas; iii) incrementar el contenido de metionina (un aminoácido esencial) en la semilla.

La obtención de variedades mejoradas con resistencia al virus del mosaico dorado del frijol, puede reducir los costos de producción de este cultivo. Además se reducirán las aplicaciones de pesticidas realizadas para controlar los vectores que transmiten las enfermedades virales, lo que disminuirá la carga contaminante nociva para el ambiente y las personas. Lograr que las variedades de frijol cultivadas en Cuba toleren la sequía, la salinidad y las altas temperaturas, permitirá dar una respuesta rápida a las condiciones adversas que se avecinan a causa del cambio climático. En adición permitirá extender el cultivo de este grano a otras estaciones del año, lo que brindará una alternativa para incrementar su producción. La transformación genética puede ser aplicada también para producir alimento biofortificado, como por ejemplo frijoles con mayor contenido de metionina en las semillas. Esto permitirá disponer de un alimento de alta calidad nutricional para los humanos y se contribuirá a la creación de una mayor conciencia en la población con respecto al tema de la transgénesis vegetal que puede incorporar productos agrícolas con altos valores nutritivos al consumo social.

## **Publicaciones**

### **Publicaciones del grupo 1 en la Web of Science**

- ✓ R. Collado, I. Bermúdez-Carabaloso, L.R. García, N. Veitía, D. Torres, C. Romero, A. Martirena-Ramírez, G. Angenon. Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. using indirect organogenesis. Article in press, (Sci. Hortic. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.046>
- ✓ Collado, R., Veitía, N., Bermúdez-Carabaloso, I., García, L.R., Torres, D., Romero, C., Rodríguez Lorenzo, J.L., and Angenon, G. Efficient in vitro plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. Article in press, Sci. Hortic. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.007>

### **Publicaciones del grupo 2 en revistas indexadas en bases de datos internacionales**

- ✓ L. R. García, R. Collado, I. Bermúdez-Carabaloso, N. Veitía, D. Torres, C. Romero. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento y desarrollo de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados in vitro. *Biología Vegetal* (2009) 9(1): 47-51.
- ✓ L. R. García, R. Collado, I. Bermúdez-Carabaloso, N. Veitía, D. Torres, C. Romero. Enraizamiento y aclimatización de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados in vitro. *Biología Vegetal* (2009) 9(3): 177-181.
- ✓ R. Collado, L. R. García, G. Angenon, D. Torres, C. Romero, I. Bermúdez, N. Veitía. Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP7247F. *Biología Vegetal* (2011) 11(4): 131-135.
- ✓ L. R. García, I. Bermúdez-Carabaloso, N. Veitía, R. Collado, D. Torres, C. Romero, A. Martirena. Regeneración de plantas de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. vía organogénesis directa. *Biología Vegetal* (2012) 12(1): 49-52.
- ✓ L. R. García, I. Bermúdez-Carabaloso, N. Veitía, R. Collado, D. Torres, C. Romero. Efecto del sulfato de adenina en la regeneración y elongación de brotes de frijol común. *Biología Vegetal* (2012) 12(1): 59-62.

- ✓ N. Veitía, R. Collado, L. R. García, I. Bermúdez-Caraballoso, D. Torres, C. Romero. Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Biología Vegetal* (2012) 12(3): 143-148.
- ✓ Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Raúl Collado, Lourdes R. García, Novisel Veitía, Amanda Martirena, Damaris Torres, Carlos Romero, Gert Angenon. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* L cv. 'CIAP7247F'. *Biología Vegetal* (2012) 12(4): 203-210.