

TRANSFORMACION GENETICA DE FRIJOL TEPARY (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) MEDIANTE EL USO DE *Agrobacterium tumefaciens* Y TRANSFERENCIA DE LOS TRANSGENES AL FRIJOL COMUN A TRAVES DE CRUZAMIENTOS SEXUALES*

A. Mejía¹, L.F. Galindo¹, W.M. Roca², H.J. Jacobsen³ y J. Tohme¹

¹Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, A.A 6713, Cali Colombia; ²Centro Internacional de la Papa, A.A 1558, Lima 12, Perú; ³L.G. Molekulargenetik; University of Hannover, Germany

INTRODUCCION

En el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es primordial la obtención de variedades comerciales con resistencia a plagas, enfermedades y a condiciones edafoclimáticas adversas. En este sentido la transformación genética podría contribuir agilizar los procesos de mejoramiento.

Entre las diferentes metodologías existentes para la transformación genética de plantas, la que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* como vector, es la única que permite la inserción de una o pocas copias de los fragmentos de ADN portadores del gen de interés, del tamaño y la composición deseados, en el genoma de la planta. *Agrobacterium* permite además aplicar eficientemente la metodología conocida como cotransformación, para la producción de plantas transgénicas libres de genes de resistencia a antibióticos. Esto tiene implicaciones no solo en la correcta expresión del transgen en la planta, sino también en la aceptación de las variedades transgénicas por las autoridades y por el consumidor.

A pesar de que en numerosas ocasiones se ha intentado, la transformación genética del frijol común mediante el uso de *Agrobacterium* no ha sido posible.

Este poster resume los avances logrados en este campo durante los últimos años en el CIAT.

METODOLOGIA

Se transformaron semillas maduras de varios genotipos e híbridos de *P. acutifolius* A. Gray (Tabla 1), los cuales fueron sometidos a un tratamiento con ultrasonido para causar heridas en el tejido. Para la transformación se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404-pTOK233 (Figura 1) con los genes marcadores *gus*-intrón, *npII* y *hpt* (Hiei et al., 1994). Los embriones fueron inoculados durante una hora en medio de inducción bacteriana (MIB). La suspensión bacteriana fue retirada y se dejaron los explantes en cocultivo a 22°C durante tres días. Pasado este período, los embriones fueron lavados y cultivados en medios con los antibióticos cefotaxima y vancomicina, para eliminar la bacteria. Luego fueron cultivados en medio RAS con Tiazidazurón para inducir un callo meristemático (Mejía, 1998). Callos meristemáticos resistentes a la higromicina (30mg/l) fueron seleccionados después de 8 semanas en medio selectivo (Figura 2-B). Luego estos fueron cultivados en medio RAS con Zip para inducir la diferenciación de yemas (Figura 2-C). Estas fueron microinjertadas sobre fragmentos de hipocotilos de la variedad G40022 para producir plantas, las cuales fueron sembradas en un invernadero de bioseguridad (Figura 2-D).

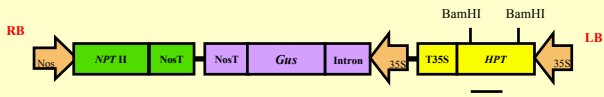


Figura 1. T-DNA del plásmido pTOK233

RESULTADOS

Se obtuvieron 3 plantas transgénicas de dos híbridos del frijol tepari (*P. acutifolius*), los cuales involucran los genotipos G40022 y G40065 como parentales femeninos y el genotipo NI576 como parental masculino (Tabla 1). Los dos primeros genotipos fueron previamente seleccionados como los mejores en la producción de callos meristemáticos entre 26 accesiones de frijol tepari evaluadas. El genotipo NI576 ya había sido transformado por Dillen et al. en 1997. El hecho que solo se hubieran obtenido callos transformados y plantas transgénicas de las semillas provenientes de los híbridos y no de otros genotipos de frijol tepari, sugiere que la capacidad de transformación por medio de la metodología desarrollada, es aportada a los híbridos por genes nucleares del genotipo NI576.

La expresión del gen *gus* pudo ser detectada en diversos órganos de plantas regeneradas (Figura 2-E). La integración del gen *hpt* (resistencia a higromicina) fue confirmada mediante la prueba de Southern de ADN total en la progenie T₂ de 2 de las líneas transformadas (Figura 3).

La metodología desarrollada es diferente a la publicada por Dillen et al. (1997) quienes utilizaron callos nodulares como explante, los cuales tuvieron que ser inducidos varios meses antes de la transformación. El uso de semillas maduras como explante facilita el proceso de transformación, acorta el tiempo necesario para la obtención de las plantas transgénicas y permite la evaluación simultánea de poblaciones de híbridos. Esta última característica ha sido de singular importancia en nuestros intentos de transferir la competencia a la transformación genética con *Agrobacterium* del frijol tepari al común por medio de cruces interespecíficos (ver abajo).

La metodología de transformación genética desarrollada fue aplicada igualmente a 35 accesiones silvestres y cultivadas del frijol común sin éxito en la obtención de callos meristemáticos o plantas transgénicas (datos no mostrados).

Actualmente (Junio 2002) se están evaluando dos estrategias para la producción plantas de transgénicas del frijol común:

- La transferencia de los transgenes del frijol tepari al frijol común por medio de cruzamientos interespecíficos (Fig. 4).
- El desarrollo de híbridos del frijol común x tepari con la capacidad de ser transformados por *A. tumefaciens* y el uso de estos como puente para la producción de variedades transgénicas del frijol común por medio de cruzamientos sexuales.

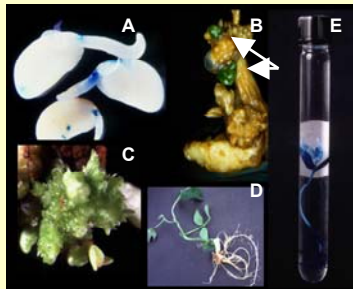


Figura 2. Proceso de transformación

A. Expresión transitoria del gen *gus* en embriones maduros de híbridos F₂-G40022 x NI576 tres días después de inoculados.

B. Callos meristemáticos resistentes a la higromicina (30 mg/l; flechas) en la región apical del explante, después de 2 meses de cultivo en medio selectivo.

C. Callo meristemático seleccionado, produciendo yemas después de varias semanas de cultivo en medio de diferenciación.

D. Planta transgénica T₀ regenerada por microinjertación.

E. Expresión estable del transgen *gus* en diferentes órganos de la planta T₁

GENOTIPO	SEMILLAS INOCULADAS	EXPRESSION TRANSITORIA DEL GEN GUS	CALLOS RESISTENTES A HIGROMICINA	CALLOS QUE EXPRESAN GUS	PLANTAS TRANSGENICAS REGENERADAS
G40022	365	+++	36	0	0
G40025	139	+++	4	0	0
G40035	70	+++	0	0	0
G40065	678	+++	0	0	0
G40022xNI576	231	+++	35	8	2
G40065xNI576	40	+++	36	1	1

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en la transformación de genotipos e híbridos del frijol tepari. Sólo se obtuvieron plantas transgénicas en los híbridos que involucran al genotipo NI576. (+++) 100% de expresión transitoria (3 días después de la inoculación en la región del nudo cotiledonar o la yema apical (vease Fig. 2a).

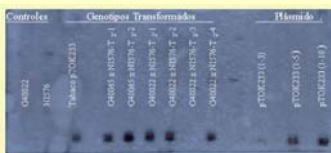
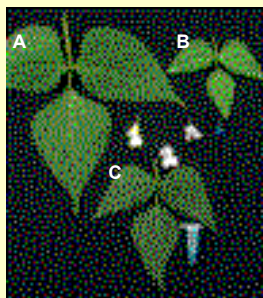


Figura 3.

Southern Blot del ADN total digerido con *Bam*HI, e hibridizado con la sonda del gen *hpt* (resistencia a higromicina; Fig. 1). Flecha: fragmento de 1.1KB del transgen *hpt* detectado en 5 de las 6 líneas transgénicas T₂ evaluadas

Figura 4.



A. Híbrido doble congruente *P. vulgaris* x *P. acutifolius* (con citoplasma de *P. vulgaris*).

B. Híbrido doble congruente *P. acutifolius* x *P. vulgaris* (con citoplasma de *P. acutifolius*) al cual el transgen *GUS* ha sido transferido por cruzamientos sexuales.

C. Híbrido resultante del cruce de A x B (con citoplasma de *P. vulgaris*) expresando el transgen *GUS*. Una vez se obtiene un híbrido fértil de este tipo, el transgen puede ser transferido a variedades comerciales del frijol común con dos o tres retrocruzamientos.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una nueva metodología para la transformación genética estable de híbridos del frijol tepari por medio de *A. tumefaciens*. Esta metodología puede ser utilizada para la producción de plantas transgénicas de variedades de importancia económica del frijol común de dos maneras: a través de cruzamientos sexuales (1) con genotipos transgénicos del frijol tepari o (2) con híbridos *P. vulgaris* x *P. acutifolius* competentes a la transformación genética por medio de *A. tumefaciens*, los cuales están siendo desarrollados.

REFERENCIAS

- Aragao F, et al (1996) TAG 93:142-150
- Dillen W, et al (1997) TAG 94(2):151-158
- Hiei et al (1994) The Plant Journal 6(2):271-282
- Mejía A, et al (1998) EUCARPIA International Symposium on Breeding of Protein and Oil Crops, Pontevedra-Spain 1-4 April
- Mejía A, et al (1994) TAG 88:324-331
- Russell D, et al (1993) Plant Cell Rep. 1993:165-169
- * Esta investigación ha contado con la financiación del Bundesministerium fuer wirtschaftliche Zusammenarbeit - BMZ, Alemania