

Desarrollo de métodos para la transformación genética de frijol común a través de electroporación

Por
Luwbia Aranda Rocha

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requerimientos para el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

en

AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2007

Aprobado por:

Abner A. Rodríguez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Timothy G. Porch, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

James S. Beaver, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Elide M. Valencia, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Miguel A. Muñoz, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume crop for small farmers worldwide. Weeds, through competition, cause yield reductions in common bean. Through genetic engineering, herbicide resistant lines have been developed in a number of species, e.g. glufosinate (Liberty®) resistance. Common bean transformation has been pursued using biolistic and Agrobacterium methods with little success. The objectives of this study were to develop a more efficient transformation method for common bean. The study utilized two varieties, Tio Canela 75 and Morales. Four pollen germination media were evaluated and both sucrose and calcium concentrations were varied. To determine the optimum voltage for the introduction of the transgene, three dyes (trypan blue, cotton blue, and aniline blue) and the *gfp* gene were evaluated. Two methods of electroporation, direct electroporation with an electrode and using cuvettes, and three methods of pollination ('paper,' 'agarose,' and 'droplet') were evaluated. The putative transformants were evaluated genotypically, with PCR and Southern Blot, and phenotypically, with glufosinate at 100, 500, and 800 g GA/ha. The results indicate that one of the liquid pollen germination media was superior and that the 10% sucrose concentration gave the best results. Variation in calcium concentration did not have a significant effect on germination. The trypan blue dye, used to determine the best electroporation conditions, was optimized at 0.04% concentration. The selected transformation conditions were 4.0 kV/cm, 50 μ F and 350 Ω . In total, 1,108 pollinations were completed, 667 with Morales, and 441 with Tio Canela 75, resulting in 80 and 14 pods, respectively. 'Droplet' was the superior pollination method and the 'cuvette' method was the best electroporation method. After evaluation with PCR, *Southern Blot*, and glufosinate, it was determined that transformation was not achieved.

Key words: Pollen germination, electroporation, genetic engineering, *Phaseolus vulgaris*.

Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa más importante para pequeños agricultores en países en vías de desarrollo y desarrollados. Las malezas provocan competencia y disminución en rendimiento del frijol. Mediante ingeniería genética se han obtenido plantas resistentes a herbicidas en otros cultivos, con el transgen que confiere resistencia a glufosinato (Liberty®). La transformación de frijol se ha experimentado con biobalística y Agrobacteria con poco éxito. Los objetivos de este estudio fue desarrollar un método más eficiente de transformación. El estudio utilizó las variedades de frijol ‘Tío Canela-75’ y ‘Morales’. Se evaluaron cuatro medios de germinación en los que se variaron la sucrosa y el calcio. Para determinar el voltaje adecuado para introducir el ADN, se evaluaron tres tintes (*trypan blue*, *cotton blue* y *aniline blue*) y el gen *gfp*. Se evaluaron dos métodos de electroporación cubeta y electrodo; y tres métodos de polinización ‘papel’, ‘agarosa’ y ‘gota’. Los transformantes putativos se evaluaron genotípicamente (PCR y *Southern Blot*) y fenotípicamente, con aplicación de glufosinato a 100, 500 y 800 g GA/ha. Se encontró que un medio líquido es superior para germinación de polen, con una concentración de sucrosa de 10%. La variación en concentración de calcio no tuvo efecto significativo en la germinación de polen. El tinte trypan blue funcionó adecuadamente a una concentración de 0.04%. Para determinar el voltaje adecuado para electroporación, las condiciones de electroporación seleccionado después de evaluación fueron de 4.0 kV/cm, 50 μ F y 350 Ω . Se realizaron 1,108 polinizaciones, 667 con Morales y 441 con Tío Canela 75, resultando fecundadas 80 de Morales y 14 de Tío Canela 75. El método de polinización mejor fue de ‘gota’ y de electroporación fue de ‘cubeta’. Después de evaluación con PCR, *Southern Blot*, y glufosinato, se determinó que no hubo transformación genética.

Palabras claves: Germinación polen, electroporación, ingeniería genética, *Phaseolus vulgaris*.

A

MI QUERIDA MADRE

Guadalupe Rocha Borda

Agradecimientos

A Dios, por ser mi guía, apoyo y compañía a lo largo de mi carrera profesional. Siendo la fuerza espiritual para seguir adelante en los momentos difíciles de mi vida.

A mis padres, Belisario Aranda y Guadalupe Rocha por su cariño, amor, paciencia, comprensión, confianza y apoyo incondicional, en todas las metas que me propongo en mi vida profesional.

A mis hermanos, Iván, Karina y Paola por su cariño y amor que me han demostrado siempre a lo largo de todos estos años de estudio.

A mis tíos René y Jesús por sus enseñanzas a través del ejemplo que me dieron desde muy temprano cuando era niña.

A Wilfrido Pérez, por su apoyo, cariño y amor a lo largo de mis estudios de maestría en Puerto Rico.

A la Familia Pérez, por ser una familia para mí en Puerto Rico ya que siempre me demostraron mucho apoyo, cariño y afecto.

A mis amigos, Ana Ruth, Henry, José, Saúl, Dorimar, Glenda por su amistad.

A mis asesores, el Dr. James Beaver y el Dr. Timothy Porch por su apoyo, dedicación, colaboración y tiempo en la planificación y desarrollo de los experimentos de proyecto de tesis y por su revisión del documento escrito.

A mis asesores, el Dr. Elide Valencia y Dr. Abner Rodríguez por su tiempo en la revisión del documento escrito de tesis.

A mi profesora, la Dra. Linda Beaver por confiar en mi desempeño y apoyarme a continuar desarrollándome como profesional en el área de fitomejoramiento.

A mis asesores, Dr. Beaver y Dr. Valencia por la ayuda financiera a través de los proyectos de investigación en los que estuve trabajando en estos años. Además, de las ayudantías de cátedra para las cuales me recomendaron.

A mi asesor, Dr. Timothy Porch por su apoyo en diferentes situaciones a lo largo de mi maestría y por su confianza en mi desempeño durante este tiempo.

A los empleados de administración del Departamento de Agronomía, por su amistad y colaboración para impartir los laboratorios a estudiantes de Agronomía e Industrias Pecuarias.

Al Director de la Estación Federal, Dr. Ricardo Goenaga por darme la oportunidad de trabajar en TARS (por sus siglas en inglés *Tropical Agriculture Research Station*) en mi tesis y otros proyectos en el Programa de Frijol.

A los empleados de TARS, por su colaboración en los trabajos realizados para mis ensayos de tesis.

Tabla de Contenido

Contenido	Página
Portada	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Tabla de Contenido	vii
Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras	x
Introducción	1
Objetivos	4
Revisión de Literatura	5
Germinación de polen	20
Sucrosa	21
Calcio	22
pH y Temperatura	23
Transfección y transformación de frijol mediante electroporación de polen	24
Materiales y Métodos	27
Germinación de polen	27
Transfección y transformación de frijol mediante electroporación de polen	34
Resultados	47
Germinación de polen	47
Transfección y transformación de frijol mediante electroporación de polen	58
Discusión	67
Germinación de polen	67
Transfección y transformación de frijol mediante electroporación de polen	69
Literatura citada	72

Lista de Cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1. Superficie relativa de cultivos transgénicos por países (1997 a 2001).	7
Cuadro 2. Análisis de varianza de los efectos de genotipo y sucrosa en la germinación de polen en medio A.	47
Cuadro 3. Análisis de varianza de los efectos de genotipo y sucrosa en la germinación de polen en medio B.	47
Cuadro 4. Promedios del efecto de genotipos con diferentes concentraciones de sucrosa en la germinación de polen en los medios A y B.	49
Cuadro 5. Promedios de germinación de polen de los cinco genotipos de <i>Phaseolus</i> y los cuatro concentraciones de sucrosa en los medios A y B.	50
Cuadro 6. Análisis de varianza de los efectos de genotipos y concentración de calcio en la germinación de polen en el medio A.	52
Cuadro 7. Promedios de germinación de polen de genotipos de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i> con tres niveles de calcio en el medio A.	53
Cuadro 8. Promedios de germinación de polen de los cinco genotipos de frijol y los tres concentraciones de calcio en el medio A.	54
Cuadro 9. Análisis de varianza de los efectos de medios de germinación y día de análisis en la germinación de polen del cultivar Morales.	55
Cuadro 10. Promedios de porcentaje de germinación de polen del cultivar Morales y los efectos de días.	55
Cuadro 11. Promedios de porcentaje de germinación de polen del cultivar Morales en diferentes días y medios.	56
Cuadro 12. Análisis de varianza de los efectos de medio de germinación, tinte, y voltajes en la evaluación de transfección y viabilidad de polen de del cultivar Morales.	60
Cuadro 13. Evaluación de transfección y viabilidad de polen del cultivar Morales.	60
Cuadro 14. Resultados de transformación mediante electroporación de los cultivares Morales y Tío Canela 75.	63

Cuadro 15. Resultados de transformación mediante electroporación de polen del cultivar Morales.	65
---	----

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Superficie mundial de cultivos transgénicos (1995 a 2001).	6
Figura 2. Características de los cultivos transgénicos en el mundo.	7
Figura 3. Estructura del T-ADN.	9
Figura 4. Obtención de planta transgénica mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	10
Figura 5. Microcañón con partículas metálicas rodeadas de ADN	12
Figura 6. a) Flores recolectadas en cámaras húmedas (platos <i>petri</i>), y b) portaobjetos con medio de germinación sólido en microscopio.	30
Figura 7. Diagrama del plásmido PV12bar.	39
Figura 8. Polinización con papel. a) Preparación de papel filtro con polen transformado; b) Flores polinizadas con método de papel.	40
Figura 9. Vainas transformadas identificadas con etiquetas en diferentes etapas.	41
Figura 10. Aplicación del herbicida Finale [®] de los cultivares Morales y Tío Canela 75. a) Aplicación de herbicida Finale [®] con palitos de algodón; y b) Identificación de plantas transformantes y hojas.	43
Figura 11. Promedios de germinación de polen de los genotipos de frijol del medio A.	50
Figura 12. Promedios de germinación de polen de los genotipos de frijol variando sucrosa en la germinación de polen del medio B.	51
Figura 13. Promedios de germinación de polen de los cuatro concentraciones de sucrosa en el medio A.	51
Figura 14. Promedios de los porciento de germinación de polen de los cinco genotipos de frijol en el medio A.	54
Figura 15. Los promedios de porciento de germinación de polen del cultivar Morales.	57

Figura	Página
Figura 16. Polen germinado en medio de germinación líquido visto al microscopio en luz blanca a) Magnitud 10X y b) Magnitud 40X.	57
Figura 17. Vista de polen testigo sin transformar en microscopio de luz (lente 10X). a) Polen en luz blanca; y b) Polen en luz ultravioleta auto-fluórese.	58
Figura 18. Efecto del voltaje de electroporación en la tinción y la viabilidad de polen en el cultivar Morales.	61
Figura 19. Vainas obtenidas después de electroporación en invernadero. a) Vaina pequeña desprendiéndose de la planta; b) Vainas grandes con semilla.	62
Figura 20. Síntomas del herbicida Finale® en plantas transformantes a) 24 horas después de de aplicación (HDA); b) 48 horas después de aplicación (HDA).	64
Figura 21. Cultivo <i>in vitro</i> de vainas de frijol en medio de cultivo de vainas. a) Vainas testigo (2.5 cm); b) Vainas testigo (1.25 cm) y c) Vainas transformantes.	65
Figura 22. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones de frijol en medio de germinación. a) Embriones de vainas testigo (2.5 cm); b) Embriones de vainas testigo (1.25 cm) y c) Embriones de vainas transformantes.	66

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes para agricultores de pequeña escala en América Latina y África (Singh, 1996). El cultivo de frijol es una fuente de proteína de alto nivel de consumo y bajo costo para familias de escasos recursos (CIAT, 1992 y Rodríguez, 1996).

La producción de frijol común es afectada por factores bióticos y abióticos (Rodríguez, 1996). Los factores bióticos incluyen: plagas, enfermedades y malezas. Los factores abióticos incluyen: calor, sequía, suelos ácidos, baja fertilidad de suelo y salinidad. Las pérdidas anuales causadas por las malezas en la agricultura de los países en desarrollo han sido estimadas en 125 millones de toneladas de alimentos, suficiente para alimentar 250 millones de personas (Parker y Fryer, 1975). En los Estados Unidos, los agricultores tienen mayores pérdidas anuales de los cultivos debido a malezas, y el costo para controlarlas es superior al combate de insectos, fitopatógenos y nemátodos (Ennis, 1976). Se ha calculado que alrededor del 50% del mercado mundial de plaguicidas corresponde a herbicidas (Sabbatini *et al.*, 2004).

Las malezas son plantas que crecen en sitios no deseados por el hombre. Las malezas deben ser eliminadas de los cultivos porque su presencia puede causar pérdidas económicas porque disminuyen el rendimiento (Sabbatini *et al.*, 2004). En el mundo vegetal existen 200,000 especies de angiospermas, de las cuales 30,000 son malezas y 250 son problemáticas en actividades humanas (Sabbatini *et al.*, 2004). Entre las especies de malezas más importantes en el cultivo del frijol se encuentran la flor amarilla (*Melampodium divaricatum* Rich), el coquillo (*Cyperus rotundus* L.), el bleo (*Amaranthus* sp.), la hierba de pollo (*Commelina diffusa* Bum), la verdolaga (*Portulaca oleracea*), la lechecilla (*Euphorbia heterophylla*) y el mozote (*Cenchrus incertus*) (Nuñez *et al.*, 1983). Debido a las características climáticas de Puerto Rico de alta

temperatura y humedad ambiental, se favorece el desarrollo rápido de las malezas, lo que provoca competencia con el cultivo y disminución en los rendimientos.

Sabbatini *et al.* (2004) indican que los principales problemas que ocasionan las malezas son: competencia con plantas cultivables por nutrientes del suelo, agua y luz, disminuyendo rendimiento. Además, las malezas sirven de hospederas a insectos y patógenos dañinos a las plantas cultivables. Sus exudados radicales y lixiviados foliares resultan ser tóxicos a las plantas cultivables. Las malezas obstruyen el proceso de cosecha y aumentan el costo de tales operaciones; e interfieren con el manejo del agua en sistemas de agricultura bajo riego.

El control cultural de las malezas genera condiciones favorables o ventajas competitivas que beneficien al cultivo frente a las malezas. La siembra de un cultivo con semillas de adecuada sanidad, valor cultural y vigor, puede generar condiciones para el rápido establecimiento y crecimiento del cultivo en comparación con las malezas (Sabbatini *et al.*, 2004). Otras prácticas utilizadas son: la rotación de cultivos, las densidades de siembra, las distancias adecuadas entre surcos, el uso de leguminosas de cobertura y la fertilización para promover el crecimiento del cultivo (SAG, 1998).

El control manual y mecánico remueve las malezas emergidas directamente por el hombre o mediante la utilización de implementos como: cultivadores, escarificadores, rastras y arados. La topografía, tipo de suelo, profundidad de capa freática, tipo de maleza, estado fenológico del cultivo son factores determinantes para su implementación (Sabbatini *et al.*, 2004). Este control favorece la absorción de agua y fertilizantes por el suelo y es aprovechado por el cultivo. Además, incrementan la aeración y nitrificación del suelo (Rodríguez *et al.*, 1987).

El control biológico de malezas utiliza organismos, agentes biológicos o enemigos naturales que por su interacción (parasitismo, predación o herbivoría, acción patogénica,

alelopatía) afectan negativamente al crecimiento de la maleza. Este control es el mejor en términos ecológicos y de preservación del ambiente. Una condición es la especificidad que debe tener el agente controlador con la maleza, para evitar que afecte a otras especies vegetales. Un ejemplo es el control de yuyo esqueleto (*Chondrilla juncea*) mediante la liberación del ácaro exótico (*Eriophyes chondrillae*), que forma agallas en los tallos de la maleza reduciendo su producción de flores y semillas (Sabbatini *et al.*, 2004).

El control químico es la estrategia más difundida en el manejo de malezas. Los herbicidas son sustancias químicas que ocasionan la muerte de las plantas o que inhiben su normal crecimiento (Sabbatini *et al.*, 2004). Las ventajas son: rápida acción, versatilidad, adaptación a diferentes equipos de aplicación, sistemas de cultivo y potencialidad de aplicación en grandes extensiones. Las desventajas son: contaminación potencial de suelos, acuíferos y alimentos, daño a organismos benéficos, disminuyen biodiversidad, causan cambios en las comunidades de malezas y desencadenan problemas de resistencia (Sabbatini *et al.*, 2004). El uso de herbicidas en algunos cultivos causa toxicidad si son susceptibles o si se aplica cerca de la planta por lo que se requiere obtener variedades resistentes a herbicidas, para asperjar el herbicida sin causar daño al cultivo. El control químico se considera como el último eslabón del manejo integral de malezas. En países donde hay escasez de mano de obra local, el uso de herbicidas es una alternativa viable para el control de malezas. En el cultivo de frijol se usan diferentes tipos de herbicidas tales como los pre-emergentes y post-emergentes para controlar las malezas gramíneas y hoja ancha.

Una alternativa para resistencia a herbicidas sería desarrollar plantas que eliminen malezas en forma natural. Muchas plantas tienen mecanismos para defenderse de otras plantas

vecinas (alelopatía), pero se conoce poco sobre los mecanismos genéticos involucrados (Rosas, 2002).

El mejoramiento genético tradicional se basa en la variabilidad genética natural y la reproducción sexual. La variabilidad se ve restringida por barreras de cruzabilidad, esta limitación se ha superado mediante el desarrollado de métodos no sexuales para transferir genes, como la transformación genética (Díaz *et al.*, 2004).

La transformación genética es una herramienta del mejoramiento genético que permite la introducción de genes específicos a variedades. La transformación genética de frijol ha sido limitada por la inexistencia de protocolos eficientes, rápidos y reproducibles. Además, el frijol es recalcitrante a regeneración y presenta dificultades al momento de transformarlo. Por esta razón, el éxito de esta tecnología es limitado y se está buscando un método de transformación que sea eficiente, rápido y reproducible.

OBJETIVOS

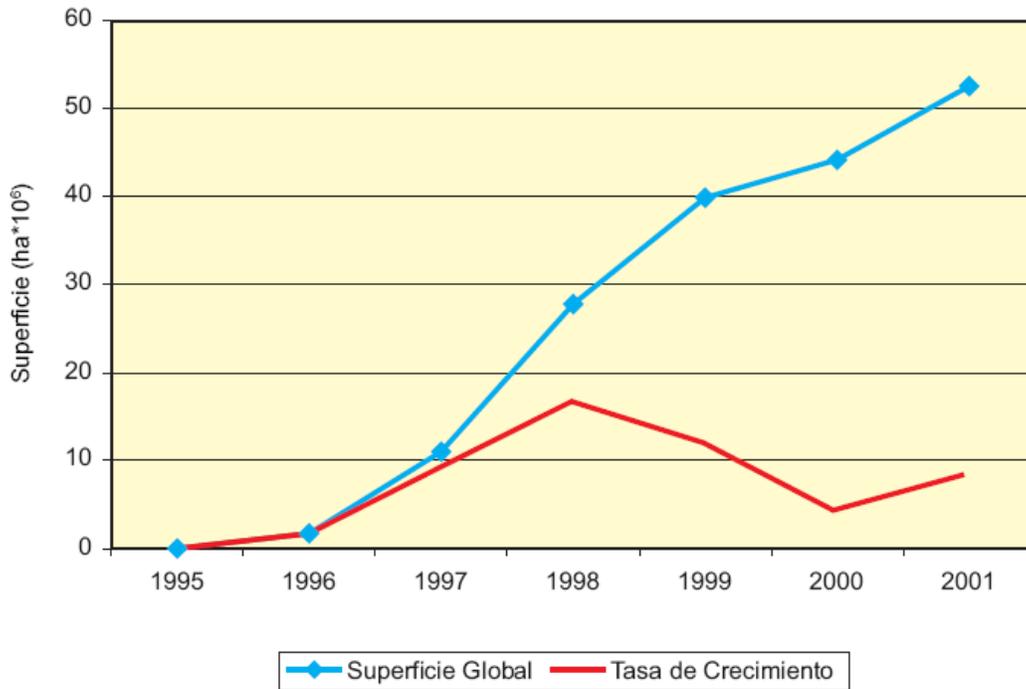
Los dos objetivos principales de esta investigación fueron el desarrollo un medio de germinación de polen óptimo para frijol variando las concentraciones de sucrosa y calcio y el desarrollo de un método de transformación genética mediante electroporación de polen de frijol común. Objetivos secundarios fueron el desarrollo de condiciones adecuadas de electroporación de polen germinado para transformación genética de frijol, la evaluación genotípica de plantas de frijol transformantes mediante PCR y “*Southern blot*” y la evaluación fenotípica de plantas de frijol transformantes mediante aplicaciones de herbicida glufosinato (Finale[®]).

REVISIÓN DE LITERATURA

La ingeniería genética permite manipular genes e introducirlos en la planta, no solo genes procedentes de otras especies vegetales sino también de animales, hongos, virus y bacterias (Carrasco, 1999). La transformación genética es una técnica que aporta variabilidad genética conocida sin alterar el fondo genético. Esto es importante porque la obtención de variedades mejoradas es un proceso acumulativo y se desea incorporar características favorables sin perder las mejoras logradas anteriormente (Díaz *et al.*, 2004).

En los últimos años, a través de la transformación genética, se han desarrollado variedades de varios cultivos resistentes a herbicidas, ellos incluyen transgenes que proveen resistencia a los herbicidas glifosato (nombre comercial: Round-Up®) o glufosinato (Liberty®).

El área global de los cultivos transgénicos incrementó más de 30 veces, de 1.7 a 52.6 millones de hectáreas de 1996 a 2001. La superficie mundial de cultivos transgénicos ha aumentado aceleradamente desde su introducción a nivel comercial en 1996, pero hubo un crecimiento menor a finales de la década pasada (Figura 1) (Uauy, 2002).



Fuente: James, C. 2001.

Figura 1. Superficie mundial de cultivos transgénicos (1995 a 2001).

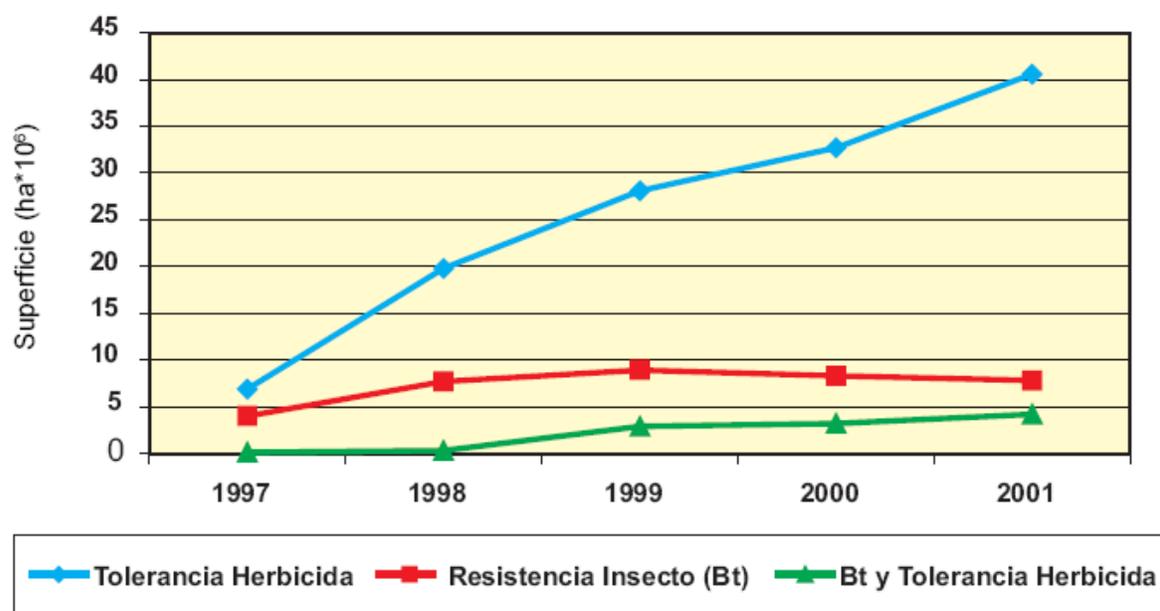
La superficie mundial de cultivos transgénicos se distribuye en 13 países, concentrándose el 99% en cuatro de ellos: Estados Unidos, Argentina, Canadá y China (Cuadro 1). En los últimos años la cantidad de países productores se ha mantenido igual, pero ha aumentado la cantidad de agricultores que han integrado transgénicos en sus rotaciones de 2 millones en 1999 a 5.5 millones en el 2001 (Uauy, 2002).

Cuadro 1. Superficie relativa de cultivos transgénicos por países (1997 a 2001).

Año	Estados Unidos (%)	Argentina (%)	Canadá (%)	China (%)
1997	74	13	12	<1
1998	74	15	10	<1
1999	72	17	10	1
2000	69	23	7	1
2001	68	22	6	3

Fuente: James, C. 2001.

La característica con mayor crecimiento es la tolerancia a herbicidas, seguida por la resistencia a insectos y la combinación de ambos (Figura 2). El cultivo transgénico más importante es la soya (*Glycine max* (L.) Merr) resistente a herbicidas que representa el 63% de la superficie total (Uauy, 2002).



Fuente: James, C. 2001.

Figura 2. Características de los cultivos transgénicos en el mundo.

Las plantas transgénicas tienen múltiples aplicaciones potenciales, como: incremento de rendimiento (al proteger los cultivos contra insectos, enfermedades virales, herbicidas y estrés ambiental). La producción de plantas bioreactoras, producción de medicamentos, retraso de la maduración de los frutos, mejoramiento en la calidad nutritiva, mayor fijación biológica de nitrógeno y mejoramiento con fines ornamentales.

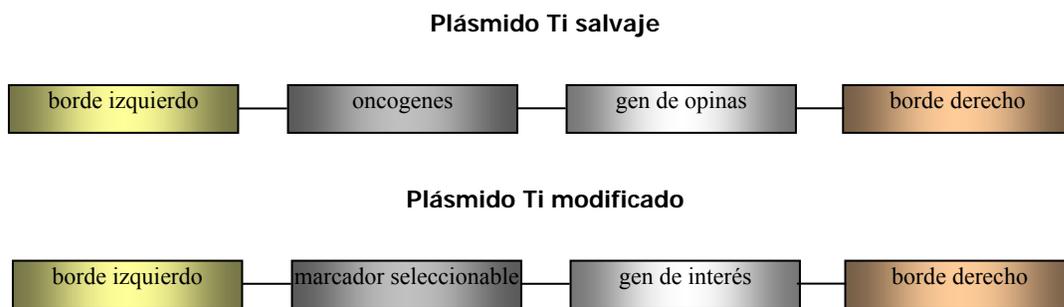
Los elementos básicos necesarios para transformación genética en plantas son cuatro: Un sistema de cultivo de tejidos para regenerar plantas completas y fértiles; Vectores apropiados para clonar el gen de interés y/o transferir al tejido a transformar; Un protocolo de transformación con sistema de transferencia de genes y selección del material transformado; y Herramientas de análisis para detectar la presencia del transgen (Díaz *et al.*, 2004).

La transformación genética requiere la introducción de un fragmento de ADN (gen) en una célula. Sin embargo, la pared celular impide la entrada del ADN en la célula, la cual es superada por métodos de transformación genética (Díaz *et al.*, 2004). Existen dos métodos para desarrollar plantas transgénicas: métodos directos como transformación mediante *Agrobacterium* o métodos físicos como biobalística (bombardeo de partículas), tratamiento con polietilenglicol (PEG), microinyección, electroporación, utilización de láser y abrasión con fibras.

El co-cultivo de células o tejidos con *Agrobacterium tumefaciens* es el procedimiento más utilizado para transformar planta dicotiledóneas (Tecnociencia, 2003). Este método se aplicó con éxito por primera vez en 1984 en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.). Las gramíneas y en general todas las monocotiledóneas presentan gran resistencia a *Agrobacterium* por lo que este método es inviable en un extenso grupo de plantas de gran importancia económica (Carrasco, 1999).

Este método se basa en el mecanismo natural de infección de la bacteria del suelo *A. tumefaciens* que introduce un gen de su plásmido en las células de la planta infectada. Este gen se integra en el genoma de la planta provocándole un tumor o agalla. Un plásmido es un fragmento de ADN circular y extracromosómico que contiene información no vital para la bacteria y su tamaño es del orden del 1 al 3% del cromosoma bacteriano (Carrasco, 1999).

El desarrollo de la patogénesis de la planta por *Agrobacterium* representa una situación única en la naturaleza: la transferencia de un elemento genético (T-ADN) de un organismo procariota a un organismo eucariota superior, con su subsiguiente integración y expresión en el genoma hospedador. Este mecanismo de ingeniería genética natural es aprovechado para la transferencia de genes de interés a las plantas. Para lo cual, en el plásmido los oncogenes y genes de síntesis de opinas, son reemplazados por un marcador seleccionable y el gen a transferir (Figura 3) (Díaz, *et al.* 2004).

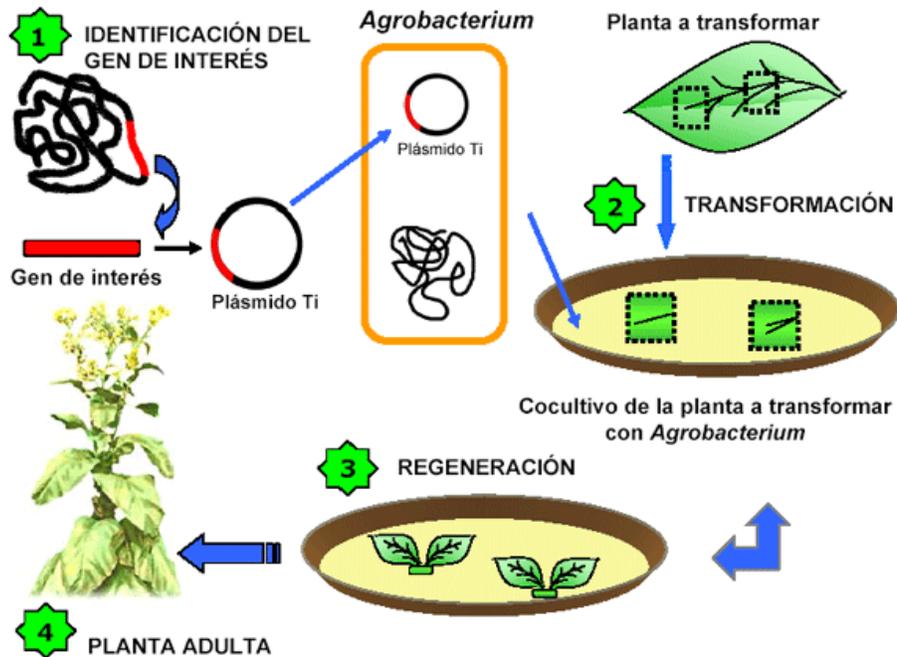


Fuente: Díaz, *et al.* 2004.

Figura 3. Estructura del T-ADN.

Según Díaz *et al.* (2004), la transformación con *Agrobacterium* en explantes consiste en inocular un explante con *A. tumefaciens*, dejar la bacteria con el explante por un tiempo donde ocurre la transferencia del T-DNA que contiene un gen marcador seleccionable y el transgen de

interés. Después, los explantes se transfieren a un medio de cultivo que contiene un antibiótico que actúa como bacteriostático y un agente selectivo que corresponde al gen marcador seleccionable utilizado. Una vez completado el protocolo de cultivo y selección *in vitro*, se recuperan las plantas transgénicas (Figura 4).



Fuente: San Segundo, 2003.

Figura 4. Obtención de planta transgénica mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Un amplio número de especies de leguminosas han sido transformadas genéticamente. El método basado en *Agrobacterium* se ha usado mucho con un amplio número de explantes de tejido produciendo rangos bajos de transformación (0.1-5%), (Atkins y Smith, 1997).

Las leguminosas son plantas recalcitrantes, es decir que son difíciles de regenerar. Diego-García, *et al.* (2001) afirman que las leguminosas y en particular el frijol, han presentado dificultad en organogénesis *in vitro* y embriogénesis somática; y otros procesos de regeneración

usados en otras especies vegetales no han sido posibles en leguminosas. Ellos señalan que siendo una familia de gran interés comercial, varios intentos se han realizado para establecer un proceso de regeneración eficiente en la transformación de algunas variedades. Sin embargo, la modificación genética de frijol presenta dificultades ya que no existe un protocolo eficiente de regeneración.

Nudos cotiledonares de frijol fueron transformados con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con el plásmido pBI121 (Diego-García *et al.*, 2001). Una integración estable de transformantes fue evidenciada por PCR y análisis de *Southern blot*. La evaluación de transformantes mediante PCR indica que la eficiencia del proceso de regeneración para transformación fue de 10%. La expresión del gen *uidA* fue detectado por análisis histoquímica de actividad de β -glucuronidasa (GUS).

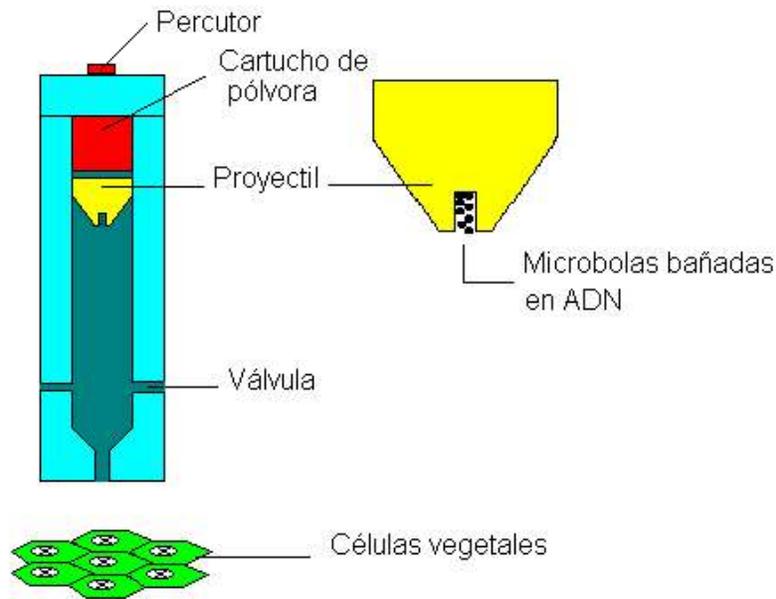
Genga *et al.* (1990) evaluaron dos cultivares de frijol con razas de *Agrobacterium* y fueron susceptibles. Estas razas de *Agrobacterium* con plasmado y resistentes a kanamicina fueron usadas en co-cultivo de discos de hoja en cultivares de frijol. Los tejidos de callo crecieron para subcultivarlos en medios conteniendo antibióticos. La transformación de callos fue confirmada por un análisis de actividad de NPTII (Neomycin phosphotransferase II).

Según Franklin *et al.* (1993) discos de hoja o explantes de hipocotilo de frijol produjeron callos resistentes a kanamicina cultivados en medio con *Agrobacterium* raza EHA101 con un plásmido binario pKYLX71GUS. Mediante un análisis histoquímico y fluorimétrico se confirmó la expresión del gen GUS (β -glucuronidasa). Además se hizo un análisis de *Southern blot* que confirmó la integración del ADN foráneo.

Se ha tratado la transformación directa depositando una solución de ADN a transferir y de polen sobre los estigmas. De esta forma se piensa que el ADN penetraría por el tubo polínico

durante su crecimiento en el estigma. Los éxitos conseguidos son raros y no han superado las pruebas de expresión de los genes en la descendencia (Carrasco, 1999).

La biolística o biobalística es un método físico para la introducción de ADN en células mediante aceleración (disparo) de micropartículas. Los microproyectiles se pueden recubrir de ADN y se pueden acelerar mediante pólvora, una descarga eléctrica, o utilizando gases de presión como helio comprimido (Tecnociencia, 2003). Los microproyectiles son de material inerte oro o tungsteno de 0.5 a 3 mm de tamaño, al ser disparados a altas velocidades atraviesan la pared y membrana celular sin causar daño letal en la célula. Se puede usar cualquier tipo de explante vegetal y éste es sometido a un tratamiento osmótico antes y después del bombardeo para evitar el daño de las células (Figura 5).



Fuente: Carrasco, J.F. 1999.

Figura 5. Microcañón con partículas metálicas rodeadas de ADN

Sin embargo, el proceso tiene una desventaja, la falta de control sobre la integración del gen en el genoma de la planta. El transgen puede romperse durante el proceso y pueden integrarse fragmentos de ADN, o integrarse demasiados transgenes y la planta reaccione silenciándolos (impidiendo que el gen se exprese) (Tecnociencia, 2003).

Este método tiene limitaciones porque algunas especies oponen resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por las cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Pero, la limitación principal es la baja relación entre el número de células sometidas al bombardeo y el número de células transformadas. A pesar del bajo número de transformantes este método ha superado barreras como rango de huéspedes de *Agrobacterium* y las dificultades del cultivo y regeneración de protoplastos (Díaz *et al.*, 2004).

Aragão *et al.* (2002) utilizaron biobalística con los cultivares ‘Olathe’ y ‘Carioca’ de frijol para desarrollar plantas resistentes a glufosinato. Se insertó el gen *bar* y su integración se confirmó con el análisis de PCR y *Southern blot*. Ellos encontraron dos eventos transgénicos, PHV119 y PHV122 del cultivar ‘Olathe’ (de un total de 11607 entre los dos cultivares) que fueron resistentes a 500 g ha⁻¹ de glufosinato, con síntomas no visibles comparado con frijol común no transgénico, bajo condiciones de invernadero. La eficiencia en este estudio fue 0.017 %, el cual resulta muy bajo para transformar frijol común. Genga, *et al.* (1991) obtuvieron expresión del gen GUS en explantes de frijol usando biobalística. Ellos analizaron los equipos y procedimientos para maximizar el rendimiento del método.

Otro método físico es el tratamiento de polietilenglicol (PEG) para transformar protoplastos. Los protoplastos son células vegetales desprovistas de pared celular y se obtienen mediante procesos mecánicos y enzimáticos. Los protoplastos se mantienen en un medio de

cultivo y se adiciona el gen a transferir (Tecnociencia, 2003). El PEG produce poros en la membrana plasmática por donde penetra el ADN foráneo (Díaz *et al.*, 2004).

La microinyección es inyectar solución de ADN en una célula se realiza con microscopio y microcapilares. La microinyección es un método difícil y laborioso (Díaz *et al.*, 2004). Esta técnica resulta poco efectiva porque las puntas de los microcapilares se rompen y se obstruyen con facilidad, además se necesitan inyectar 10,000 células, una a una, para asegurar de que al menos una incorporara el material genético (Carrasco, 1999). Así se consigue que el ADN o ARN se libere en el núcleo de la célula evitando que sea degradado en el citoplasma o por los lisosomas (Sikes *et al.*, 2004). Actualmente esta técnica es utilizada para la creación de plantas y animales transgénicos (Davidson and Sittman, 1995). En protoplastos se ha introducido ADN foráneo mediante el uso de capilares de inyección y manipulador. El cultivo de protoplastos es la técnica más sofisticada de cultivo *in vitro* de plantas, es complejo y está disponible para algunas especies.

Otro método físico son los liposomas para transferir el ADN foráneo a la célula y se ha usado para transformar protoplastos vegetales. Los liposomas es un sistema de membranas celulares descritas por primera vez en 1965. Los liposomas pueden obtener ADN de dos formas: liposomas catiónicos y liposomas pH-sensitivos. Los liposomas catiónicos son lípidos con carga positiva y co-lípidos que son estabilizadores, se les llama también "ayudantes" (*helper*). Estos liposomas interactúan con ADN con carga negativa, con el que forman un complejo estable. Existen variedades de lípidos con carga positiva que son comerciales, como la lipofectina, que interactúa con el ADN, y se usa para liberación de ADN lineal, ADN plasmídico y ARN (Gao and Huang, 1994). Los liposomas pH-sensitivos son lípidos con carga negativa, se desestabilizan por pH bajo. En este caso, más que formar complejos con el ADN, éste es

atrapado, al inicio existe repulsión entre las cargas negativas, pero después el ADN es captado por el centro acuoso del liposoma (Gao and Huang, 1994).

Varios microorganismos se han evaluado por sus propiedades innatas para transferencia de genes. Como los virus, cuya evolución los ha capacitado para que puedan introducir su material genético en células que ellos infectan, e incluso pueden integrarse al genoma del huésped (Espin-Villacres, 2001). En los años ochenta estas técnicas fueron desarrolladas con virus de ADN y ARN. Al principio se buscó remover genes deletéreos virales para reemplazarlos por genes específicos (Anderson, 1992). Actualmente los vectores más utilizados son los retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y herpes virus (Espin-Villacres, 2001).

El método de electroporación es la aplicación controlada de un impulso eléctrico a un sistema biológico. En un sistema biológico con una doble capa de lípidos como una suspensión de células o liposomas, el impulso eléctrico sobrepasa la doble capa y abre temporal (segundos) y reversiblemente poros de 40 a 120 nm (Harvard Apparatus, 1999). Los poros facilitan la entrada de moléculas exógenas como ADN, ARN y proteínas a las células (Prasanna y Panda, 1997), también drogas y tintes (Van Wert y Saunders, 1992).

La electroporación, denominada también como “electropermeabilización” o “electrotransfección” o “electroinyección,” se ha vuelto una técnica popular para introducir plásmidos de ADN o rADN en diferentes tipos de células (Prasanna y Panda, 1997). Ellos indican que esta técnica ofrece ventajas sobre otras, porque es simple, fácil, rápida, reproducible y eficiente; por el control y optimización de parámetros eléctricos; y control de la posición y tamaño de los electroporos.

Weaver (1993) afirma que la técnica de electroporación necesita una suspensión de ADN y células. La mezcla de ambos es colocada entre dos electrodos y se aplica alto voltaje enviado

en impulsos eléctricos controlados, lo que provoca la formación de poros en la membrana celular y penetrará el ADN. Entre los factores de eficacia están: la naturaleza del impulso eléctrico, la carga iónica de la sustancia amortiguadora, el espacio entre los electrodos y la naturaleza de la célula. Morcillo (2004) indica que la técnica utiliza campos entre 200 y 600 V/cm logrando transferir ADN foráneo a células de arroz (*Oriza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.).

El método de transformación mediante electroporación se ha probado bajo diferentes técnicas. La electroporación de plantas fue demostrada mediante expresión de ADN en protoplastos de maíz, zanahoria (*Daucus carota* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Fromm *et al.*, 1985). También electroporación fue demostrado en células intactas transformadas con expresión de los genes GUS y GFP (*green fluorescent protein*) de callos de bambú (*Bambusa vulgaris*), *Nicotiana benthamiana* y *Lilium scales* (Wu y Feng, 1999), en segmentos intactos de hojas en arroz, trigo (*Triticum aestivum*), maíz y cebada (*Hordeum vulgare*) (Dekeyser *et al.*, 1990), y en ejes embrionarios con expresión del gen GUS en frijol (Dillen *et al.*, 1995).

La electroporación de polen demostró ser una técnica eficiente de transformación en estudios realizados con polen germinado de arvejas (*Pisum sativum* L.) (England, 2003) y con polen germinado de tabaco (Abdul *et al.*, 1990). Las condiciones de electroporación se optimizaron para polen de tabaco (dicotiledónea), alfalfa (leguminosa) y maíz (monocotiledónea) (Saunders *et al.*, 1995).

Díaz *et al.* (2004) afirman que luego de la selección *in vitro*, las plantas regeneradas deben ser analizadas por métodos moleculares para identificar aquellas que porten y expresen los transgenes en los niveles deseados. Para esto se usan técnicas como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), hibridación *Southern* o “*Southern blotting*”, RT-PCR (transcriptasa reversa seguida de PCR), ELISA y *Western blotting*.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de iniciadores homólogos a la secuencia del transgen permite la determinación de la presencia del mismo. Esta técnica permite hacer una verificación rápida de las plantas generadas. Sin embargo, la limitación es que un resultado positivo solo indica que en la muestra existe una secuencia que amplifica con los iniciadores utilizados pero no indica si el transgen se encuentra incorporado al genoma de la planta (Díaz *et al.*, 2004).

Hibridación *Southern* o “*Southern blotting*” es una de las herramientas moleculares más utilizadas para caracterizar las plantas transgénicas. Indica la presencia o no de la secuencia de interés, la integración de la misma en el genoma de la célula huésped, número de copias integradas y número de loci en los cuales se produjo la integración (Díaz *et al.*, 2004).

Las plantas regeneradas deben evaluarse también en invernadero y campo para confirmar la expresión del gen deseado. Las pruebas que se realizan para verificar el transgen son inoculaciones para resistencia a enfermedades y plagas, y aplicación de agroquímico para tolerancia a herbicidas. Los experimentos de invernadero y campo se realizan con autorización previa de las entidades oficiales.

En el cultivo de frijol no se ha experimentado con transformación genética a gran escala debido a que su transformación resulta dificultosa. La transformación de frijol se ha experimentado con biobalística y *Agrobacterium* con poco éxito. Actualmente, es difícil obtener plantas transformantes estables de la especie *Phaseolus vulgaris* y no existe un método efectivo de transformación genética.

La transformación genética de frijol es necesaria para permitir la incorporación de características importantes tales como la resistencia a herbicidas. Welin y Vidal (2001) afirman que las características nuevas incorporadas a los cultivos tienen el objetivo de disminuir el costo

de producción mediante la utilización de menos herbicidas. Además, señalan que los países donde se utilizan cultivos transgénicos el rendimiento han aumentado entre un 5 y 10%, y el uso de herbicidas ha disminuido hasta un 40%.

El uso de la ingeniería genética ha permitido el desarrollo de plantas resistentes a ciertos herbicidas, permitiendo a los agricultores asperjar y eliminar malezas sin afectar los cultivos (Rosas, 2002). Miles de plantas transgénicas han sido generadas en varias especies cultivadas, cientos de estas han sido liberadas alrededor del mundo. Durante los años 1986 al 1993 fueron evaluadas 1025 líneas, de 38 especies de plantas cultivadas y fueron liberadas en 31 países. Aunque muchas características han sido transferidas, más del 30% de las 1025 líneas liberadas fueron resistentes a herbicida (Dale, 1995).

Las compañías de agroquímicos que han desarrollado cultivos tolerantes a herbicidas argumentan que quieren ganar mercado para sus herbicidas y no incrementar el uso de ellos. Los científicos de estas compañías, sensibles a las críticas de los movimientos ambientalistas, argumentan que sus investigaciones están concentradas en herbicidas de pequeñas cantidades, baja toxicidad, rápida degradación, y que son lavados fácilmente. Pese a estos argumentos, el uso de herbicidas podría incrementar porque los agricultores aplicarán libre y frecuentemente, sin temor a dañar sus cultivos (Rosas, 2002).

El herbicida Roundup® elimina las plantas al bloquear la acción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS, por sus siglas en inglés), que sintetiza un compuesto químico vital para las células (Rosas, 2002). La soya Roundup-Ready® contiene una enzima EPSPS insensitiva a glifosato por un gen introducido de *Agrobacterium* sp. que le confiere tolerancia al herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1995).

Los científicos experimentaron con genes que confieren resistencia al herbicida glifosato (ingrediente activo de Roundup®) en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*), tabaco, soya, algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz, colza (*Brassica campestris* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.) de los que se tienen variedades transgénicas (Rosas, 2002).

La tolerancia de glufosinato es conferida a plantas por incorporación de los genes *pat* (*phosphinothricin acetyltransferase*) o *bar* (*bialafos resistance*) lo cuales codifican por enzimas que inactivan el glufosinato por acetilación (Mullner *et al.*, 1993). El gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* Jansen que codifica el Acetil Fosfinotricina Transferasa (PAT, por sus siglas en inglés *Phosphinothricin Acetyl Transferase*) confiere resistencia al herbicida Glufosinato de Amonio (GA, por sus siglas en inglés *Glufosinate Ammonium*) (ingrediente activo de Liberty®) (Aragão *et al.*, 2002).

El glufosinato es un compuesto natural, químicamente se parece al aminoácido glutamato y actúa para inhibir una enzima llamada glutamina sintetasa, la cual está envuelta en la síntesis de glutamina. La glutamina sintetasa actúa en la detoxificación de amonía. El glufosinato actúa reduciendo los niveles de glutamina y un incremento en la concentración de amonio en tejidos de plantas resultando en la muerte de la planta (PAN International, 2002).

El glufosinato fue introducido en Japón, y primero se registró en Estados Unidos para uso como herbicida en 1993 por Hoechst Celanese (U.S. EPA 1993). Ahora es registrado en más de cuarenta países y es comercializado como Basta®, Rely®, Finale®, Challenge®, y Liberty® (PAN International, 2002).

Los genes *bar* y *pat* han sido usados exitosamente en transferir resistencia a herbicida glufosinato en un gran número de cultivos. Los cultivos que han sido transformados exitosamente por resistencia a glufosinato incluyen trigo (*Triticum aestivum* L.) (Vasil *et al.*,

1992), arroz (Chrstou *et al.*, 1991), maíz (Gordon-Kamm *et al.*, 1990), alfalfa (Cobb, 1992), papa (De Block *et al.*, 1987) y tomate (De Block *et al.*, 1987).

GERMINACIÓN DE POLEN

La germinación de polen es un área de investigación importante para la transformación de frijol, ya que se utilizará el método de electroporación para transformar polen germinado. La electroporación abre poros en las membranas para que el ADN pueda ingresar a las células. El polen tiene una pared muy resistente, llamada también esporodermis, la cual está compuesta de afuera hacia adentro por la exina y la intina (Universidad Nacional del Nordeste, 2006). La esporodermis es difícil penetrar y se pueden abrir poros mediante electroporación con dificultad. Si el polen está germinado es más fácil penetrar los tubos porque no tienen una pared tan resistente como la esporodermis.

La germinación de polen en medio líquido es afectada por diferentes factores como la fuente y concentración de boro, calcio y osmótico (Taylor y Hepler, 1997, Říhová *et al.*, 1996). Otros factores son la fuente de carbono, potencial de agua, pH, densidad de polen y oxígeno en el medio de cultivo (Říhová *et al.*, 1996), también factores importantes son la temperatura y sucrosa.

Los componentes del medio de germinación pueden afectar dramáticamente el metabolismo del polen. Los protocolos actuales de germinación son basados en el medio líquido de Brewbaker y Swack (1963) y las condiciones óptimas del medio varían de acuerdo a la especie de la que proviene el polen (Říhová *et al.*, 1996). Además podría variar entre genotipos del mismo cultivo debido al clima de crecimiento de la planta, ya que el polen de los genotipos adaptados al clima tendrá ventaja sobre los no adaptados porque se desarrollaran mejor. Así lo

demonstraron Kakani *et al.* (2002) en una evaluación de 21 genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.) donde la germinación de polen estaba en un rango de 35% a 73%.

Schreiber y Dresselhaus (2003) encontraron un medio de germinación de polen adecuado para especies dicotiledóneas como maní, tabaco, frijol, arveja (*Pisum sativum* L.), y haba (*Vicia faba*). Ellos indican que los rangos de germinación promedio observados en estas especies evaluadas fueron de 50 a 100%.

Sucrosa

En el cultivo de frijol diferentes autores usaron varios medios modificados de Brewbacker y Swack (1963) con diferentes genotipos, así con 50% de sucrosa se obtuvo una germinación de polen de 70% (Arndt y Gepts, 1991), con 15% sucrosa una germinación de 80-90% (Farlow *et al.*, 1979), con 40% sucrosa 75% de germinación de polen (Gurusamy, comunicación personal, 2005), con 10% sucrosa y 6% PEG 4000 (*"Polyethylene Glycol"*) se encontró entre 50-60% de germinación de polen (Schreiber y Dresselhaus, 2003).

England (comunicación personal, 2004) afirma que en el cultivo de arbejas (*Pisum sativum* L.) con el medio modificado de Brewbacker y Swack (1963) se obtuvo una germinación de polen promedio del 70% con 10% sucrosa. Además indica que este medio podría utilizarse exitosamente en frijol. Gwata *et al.* (2003) señalan en el cultivo de soya una germinación máxima de 76.3% con 0.5% de sucrosa. Kakani *et al.* (2002) en un estudio realizado de 21 genotipos de maní encontraron un rango de germinación de 35% a 73%, con un promedio de 56% con 10% sucrosa.

En el cultivo de gandúl (*Cajanus cajan* L.), con medios líquidos modificados de Brewbacker y Swack (1963), con 40% sucrosa, se encontró una germinación de polen máxima de 49% (James *et al.*, 1987). Además con 37.5% sucrosa y 15% PEG 4000 la germinación se

incrementó a 90% y el EACA (por sus siglas en inglés, “*ε-amino caproic acid*”) tuvo un efecto positivo en la germinación (Jayaprakash y Sarla, 2001).

En el cultivo de papa se optimizaron las condiciones de germinación y crecimiento del tubo de polen con 15% sucrosa (Říhová, *et al.*, 1996). La lactosa y el reactivo PEG 1000 fueron superiores a sucrosa en la germinación y crecimiento del tubo de polen. Sin embargo, la sustitución de sucrosa por rafinosa, maltosa, glucosa, galactosa, fructosa o manitol no mejoró la germinación de polen.

La concentración de sucrosa en el medio de germinación de frijol varía drásticamente según diferentes investigadores desde 10% (Schreiber y Dresselhaus, 2003), 15% (Farlow *et al.*, 1979), 40% (Gurusamy, comunicación personal, 2005) y 50% (Arndt y Gepts, 1991). Además las concentraciones de sucrosa en otros cultivos varían de 10% en arvejas (England, comunicación personal, 2004); 0.5% en soya (Gwata *et al.*, 2003); 10% en maní (Kakani *et al.*, 2002); 49% (James *et al.*, 1987) y 37.5% sucrosa en gandules (Jayaprakash y Sarla, 2001); y 15% en papa (Říhová, *et al.*, 1996). Esta variación nos indica que sucrosa es un factor que debe ser evaluado mediante un experimento para determinar el porcentaje óptimo de sucrosa para el cultivo de frijol.

Calcio

En el cultivo de frijol con medios modificados de Brewbacker y Swack (1963) y diferentes genotipos se obtuvieron los mejores resultados de germinación de polen con 1200 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (nitrato de calcio), (Farlow *et al.*, 1979). Una germinación de 70% se obtuvo con 300.0 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Arndt y Gepts, 1991). Además, se obtuvieron germinaciones de 50-60% con 584 mg/L CaCl_2 (cloruro de calcio), (Schreiber y Dresselhaus, 2003) y 75% con 600 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Gurusamy, comunicación personal, 2005).

England (comunicación personal, 2004) afirmó que en arbejas con medio modificado de Brewbacker y Swack (1963) se obtuvo una germinación de polen del 70% con 1.15 g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, además indicó que esta concentración puede ser adecuada en frijol. James *et al.* (1987) encontraron en gandul una germinación de polen de 49% con 200 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y Jayaprakash y Sarla (2001) indican que la germinación se incrementó con 30 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. En maní, Kakani *et al.* (2002) modificaron temperaturas en medios de germinación *in vitro* y encontraron una germinación promedio de 56% (rango 35-73%), con 250 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

La concentración de calcio en el medio de germinación de polen de frijol varía según diferentes científicos desde 300 mg/L hasta 1200 mg/L. Debido a esta variación, se considera calcio como otro factor importante a ser evaluado en el presente trabajo.

pH y temperatura

En frijol se obtuvo una germinación de polen de 70% a un pH de 6.5 (Arndt y Gepts, 1991) y una germinación de 75% a un pH de 8.5-8.8 (Gurusamy, comunicación personal, 2005). En otro estudio, encontraron una germinación alta de 80-90%, a un nivel óptimo de pH 7.3 (Farlow *et al.*, 1979). England (comunicación personal, 2004) afirmó que en el cultivo de arbejas la germinación de polen es 70% a un pH de 5.3 a 5.4. James *et al.* (1987) encontraron en gandul una germinación de 49% a un pH de 6.6 a 6.8.

En frijol los medios de germinación de polen deben ser incubados a 20-25 °C para obtener una germinación de polen de 70% (Arndt y Gepts, 1991). Pero, otro estudio de frijol reportó resultados muy distintos, ellos encontraron a temperaturas bajas (6-9°C) una germinación de 75% (Gurusamy, comunicación personal, 2005). Farlow *et al.* (1979) encontraron para los cultivares ‘Tweed Wonder’ y ‘Autumn Crop’ que la germinación de polen de frijol fue cero a 4.5°C y 38.3°C, y fue máxima 79% y 90% respectivamente a 7.2°C; también a temperaturas

mayores de 10 °C la germinación de polen se disminuyó. La longitud de tubo de polen después de 8 horas de incubación fue óptima a 16.7 °C, y disminuyó a temperaturas mayores a 21.6°C o menores a 13.3 °C.

James *et al.* (1987) encontraron en gandul una germinación de polen máxima de 49% en un medio de germinación a una temperatura de 28°C. Kakani *et al.* (2002) en maní señalaron una germinación promedio de 56% a temperaturas promedios de $T_{min}=14.1^{\circ}\text{C}$, $T_{opt}=30.1^{\circ}\text{C}$ y $T_{max}=43.0^{\circ}\text{C}$. Gwata *et al.* (2003) en soya observaron una germinación óptima a una incubación a temperatura ambiente.

El factor de pH no se evaluó en este estudio. Sin embargo, para las evaluaciones de los medios, se utilizó el pH recomendado para cada medio específico. El factor de temperatura no se evaluó debido a que una temperatura de 25°C prevalece en diferentes estudios realizados de germinación de polen. Las evaluaciones de sucrosa y calcio se realizaron a una temperatura de 25°C.

TRANSFECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE FRIJOL MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE POLEN

Rakoczy-Trojanowka (2002) indicó que existen numerosos métodos de transformación genética y se dividen en dos grupos: indirectos y directos. El método indirecto como transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*, y el método directo como transformación mediante infiltración, fibras de carburo de silicio, electroporación, electroforesis, microinyección, el tubo del polen y liposomas.

La búsqueda de métodos de transformación genética más fáciles y más eficientes para transferir genes continúa. Debido a que las eficiencias de los métodos actuales son bajas y la recuperación de plantas transgénicas fértiles es dificultoso (Saunders y Matthews, 1995). Los

métodos directos pueden ser soluciones para la transformación efectiva de especies recalcitrantes, como monocotiledóneas y algunas leguminosas como frijol (Rakoczy-Trojanowka, 2002).

Wu y Feng (1999) afirmaron que el método de electroporación es ampliamente usado para transferir genes en plantas, ya que tiene las ventajas de ser simple, efectiva, aplicable a varias especies de plantas, y puede usarse para integrar ADN a un gran número de células en un tiempo corto. Rakoczy-Trojanowka (2002) indicó que la electroporación de células y tejidos vegetales es similar al método de electroporación de protoplastos. La diferencia se basa en el uso de otros materiales de plantas como polen, microsporas, fragmentos de hoja, embriones, callos, semillas o brotes.

Mediante la electroporación de suspensión de células se han obtenido protocolos eficientes para muchas especies tales como: arroz (De la Peña *et al.*, 1987), tabaco (Abdul *et al.*, 1990), trigo (Zaghmout y Trolinder, 1993) y maíz (Laureen *et al.* 1994). D'Halluin *et al.* (1992) transformaron maíz mediante electroporación de embriones inmaduros y callos embriónicos tipo I. Ellos obtuvieron eficiencias altas de 6.25% para embriones (90 plantas transgénicas regeneradas de 1440 embriones) y 54.6% para callos (31 plantas transgénicas de 55 callos). Contrariamente, Sorokin *et al.* (2000) transformando embriones inmaduros de trigo obtuvieron una eficiencia baja de 0.28%, basado en el número de embriones electroporados.

Muñiz de Pádua *et al.* (2001) obtuvieron plantas transgénicas de arroz mediante electroporación de meristemo de tallos con los genes *bar* y GUS, con una eficiencia de 0.4 a 13.8%. Adicionalmente, Dekeyser *et al.* (1990) desarrollaron un proceso para electroporar ADN en estructuras de hoja de arroz, usando el gen GUS (β -glucuronidasa). Además, ellos probaron que esta técnica fue aplicable también en cultivos como trigo, maíz y cebada.

La transformación genética a través polen es un método con alta eficiencia (Ohta, 1985). Mediante ingeniería genética integrando ADN en el polen y usándolo para fertilizar flores para producir semilla transgénica, es un método conveniente para conseguir plantas transgénicas más rápido y fácil que otras técnicas (Saunders y Matthews, 1995). Este método de transformación podría evitar el uso de otros métodos como *Agrobacterium tumefaciens* que es limitado a algunas especies de plantas y problemas con la regeneración de plantas a partir de tejidos, células o protoplastos (Matthews *et al.*, 1990). La electroporación de polen está tomando importancia porque no es necesario el cultivo de tejidos que requiere una labor intensa y facilidades caras; y evita el tiempo adicional para regenerar plantas completas (Saunders y Matthews, 1995).

El polen es un sistema de transferencia de genes natural y la transformación de polen debería ser una herramienta genética para más plantas cultivadas (Matthews *et al.*, 1990). Según England (2003), en la transformación de polen, el ADN se introduce a través de la pared del polen o por los poros de germinación. Además afirma que el ADN se integra a un cromosoma de la célula generativa, o la célula generativa traspasa el ADN al huevo; y que ocurre durante o poco tiempo después de la fertilización.

Mediante electroporación de polen germinado se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco conteniendo el gen GUS (Matthews *et al.*, 1990); y conteniendo los genes GUS (β -glucuronidasa) y CAT (cloranfenicol acetil transferasa) (Saunders y Matthews, 1995). Saunders *et al.* (1995) optimizaron las condiciones de electroporación de polen en tabaco (dicotiledónea), alfalfa (leguminosa) y maíz (monocotiledónea). En alfalfa la electroporación de polen se optimizó a 7.0-8.5 kV/cm con una viabilidad del 80-95%. Sin embargo, England (2003) indicó que la electroporación de polen en arvejas es óptima a 1.0 kV/cm, lo cual podría ser muy similar para frijol y debería evaluarse.

MATERIALES Y MÉTODOS

GERMINACIÓN DE POLEN

Todos los experimentos se realizaron en los invernaderos y el laboratorio de investigaciones en frijol de USDA-ARS-TARS (de sus siglas en inglés “*United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Tropical Agriculture Research Station,*”) en la ciudad de Mayagüez, Puerto Rico.

Se evaluaron dos cultivares de frijol ‘Tío Canela 75’ y ‘Morales,’ ambas del acervo genético Mesoamericano, Raza Mesoamérica y tres líneas de frijol tepary, (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) ‘Neb-T-1-s’, ‘PI 502217-s’ y ‘GN-605-s’, bajo diferentes medios de germinación y variando las concentraciones de sucrosa y calcio.

El cultivar Tío Canela 75 posee las siguientes características: un hábito de crecimiento indeterminado Tipo II, madurez 72 días después de la siembra, una semilla ovoide con color rojo brillante y un peso de 22 g/100 semillas. Tío Canela 75 fue desarrollado y liberado por la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, Honduras y la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, en junio de 1996 como una variedad resistente a enfermedades y tolerante al calor (Rosas *et al.*, 1997). El cultivar Morales con un hábito de crecimiento indeterminado Tipo II, 80 días a madurez, color de semilla blanco y con un peso de 19 g/100 semillas fue desarrollada y liberada en 1998 por la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en cooperación con USDA-ARS (Beaver y Miklas, 1999).

Las líneas de frijol tepary Neb-T-1-s, PI 502217-s y GN-605-s poseen las siguientes características: un color de semilla blanco, un peso de semilla >10 g/100, alto vigor y potencial de rendimiento, y resistencia a enfermedades, particularmente bacteriosis común causado por [*Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* (Smith) Dye]. Las líneas PI 502217-s y GN-605-s son

resistentes a roya causado por [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*] y las líneas Neb-T-1-s, PI 502217-s son resistentes a mildiu polvoso causado por *Erysiphe polygoni* DC (Miklas, *et al.*, 1994).

La evaluación de medios de germinación de polen pretendía obtener una germinación promedio del 70-80%, nivel necesario para tener éxito en la transformación de polen mediante electroporación. Dos medios de germinación sólidos A (Arndt y Gepts, 1991) y B (England, comunicación personal, 2004), y dos medios de germinación líquidos C y D (Gurusamy, comunicación personal, 2005) fueron evaluados en dos fases. En la primera fase se evaluaron los medios de germinación sólidos A y B bajo diferentes concentraciones de sucrosa y calcio. En esta fase se evaluaron los dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* y las tres líneas de *Phaseolus acutifolius*.

La siembra se realizó en el mes de noviembre de 2004, los genotipos se sembraron individualmente en tiestos redondos (15 cm de diámetro) conteniendo el medio Sunshine Mix #1 (Sun Gro Horticulture, Vancouver, British Columbia). Las plantas se regaron regularmente para evitar estrés de sequía, fueron tratadas con pesticidas según fue necesario, y se fertilizó con Osmocote (14-14-14, N-P-K; Marysville, OH). Se sembraron diez tiestos por genotipo, cada semana durante cuatro semanas en invernadero.

La germinación de polen se evaluó durante la primera semana de floración. El medio A contenía 100.0 mg/L H_3BO_3 , 300.0 mg/L $Ca(NO_3)_2$, 200.0 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, y 50% g sucrosa a un pH de 6.5 (Arndt y Gepts, 1991). El medio B contenía 1855 mg/L H_3BO_3 , 1149.4 mg/L $Ca(NO_3)_2$, 1011 mg/L KNO_3 , 10% sucrosa, 1% agarosa y 20.0 $\mu L/L$ cefataxime (0.1 $\mu g/mL$) a un pH de 5.3 a 5.4 (England, comunicación personal, 2004).

Los medios A y B fueron seleccionados en la primera fase porque son contrastantes. Estos medios difieren en la concentración de H_3BO_3 y $Ca(NO_3)_2$, observándose mayores concentraciones en el medio B. Además, contienen nutrientes diferentes $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en el medio A y KNO_3 en el medio B; y muestran diferencias en pH el medio A un pH de 6.5 y el medio B un pH de 5.3-5.4.

Estos dos medios de germinación se evaluaron bajo cuatro concentraciones de sucrosa: 0, 10, 20 y 50%. El medio A se evaluó bajo tres concentraciones de nitrato de calcio: cero (0.0 g/L), mitad (150.0 g/L) y completo (300.0 mg/L), manteniendo el pH de cada medio y ambos se evaluarán a una temperatura de 25°C.

Se recolectaron flores abiertas y frescas por la mañana de 7:30 a 8:00 AM en cámaras húmedas (platos *petri* con papel toalla húmedo) para mantener las flores túrgidas y el polen fresco (Figura 2.1). Se colocaron 60 μ L de los medios de germinación sólidos en portaobjetos (3"×1"×1 mm), y se dejó gelificar por diez minutos. Luego, se recolectó el polen de la punta de los estigmas de las flores, debido a que en el estigma está el polen y se colocó el polen directamente del estigma en el medio de germinación de los portaobjetos. Se utilizaron dos estigmas por observación.

Los portaobjetos se colocaron en cámaras húmedas (platos *petri* con papel toalla húmedo) a una temperatura de 25°C. Todas las observaciones de germinación de polen fueron tomadas después de 4 a 5 horas de incubación. Posteriormente, los granos de polen se observaron en un microscopio de luz (MICROMASTER®, Fisher Scientific) a una magnitud de 40X para facilitar su conteo. Cien granos de polen fueron contados manualmente con un contador. Esta cantidad de polen es suficiente según Arndt y Gepts (1991) para estimar el porcentaje de germinación

(Figura 6). En el conteo, un grano de polen se consideró que había germinado cuando el largo del tubo del polen germinado fue igual o mayor que el diámetro del polen (Luza *et al.*, 1987).

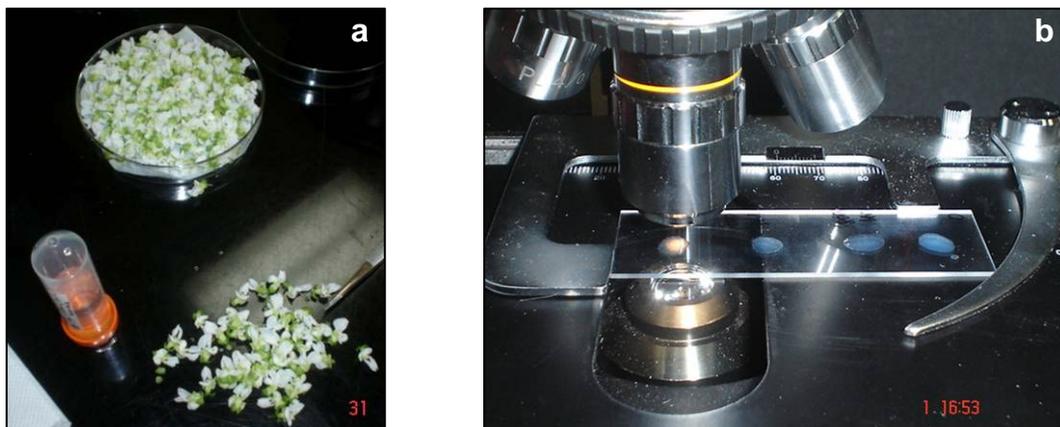


Figura 6. a) Flores recolectadas en cámaras húmedas (platos *petri*), y b) portaobjetos con medio de germinación sólido en microscopio.

La germinación de polen en los medios A y B se analizaron mediante un arreglo factorial de un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con cuatro réplicas (Lyman y Longnecker, 2001). Los factores fueron cinco genotipos de frijol (Tío Canela 75, Morales, Neb-T-1-s, PI 502217-s y GN-605-s) y cuatro concentraciones de sucrosa (0, 10, 20 y 50%). El modelo lineal general de SAS (de sus siglas en ingles, “Statistical Analysis System”) (SAS Institute, 1990) utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \times \beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable dependiente evaluada (germinación de polen)

μ = media general estimada

α_i = efecto de los genotipos de frijol

β_j = efecto de las concentraciones de sucrosa

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = interacción entre los genotipos y las concentraciones de sucrosa

ε_{ij} = error experimental

El estudio de los efectos de genotipo de frijol y concentración de calcio en el medio en la germinación de polen A se analizó mediante un arreglo factorial de un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con cuatro replicas (Lyman y Longnecker, 2001). Los factores fueron cinco genotipos (Tío Canela 75, Morales, Neb-T-1-s, PI 502217-s y GN-605-s) y tres concentraciones de calcio [cero (0.0 g/L), mitad (150.0 g/L) y completo (300.0 g/L)]. El modelo lineal general de SAS (SAS Institute, 1990) utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \times \beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$

Donde:

Y_{ij} = variable dependiente evaluada (germinación de polen)

μ = media general estimada

α_i = efecto de los genotipos de frijol

β_j = efecto de las concentraciones de calcio

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = interacción entre los genotipos y las concentraciones de calcio

ε_{ij} = error experimental

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza ($p < 0.05$) y una separación de medias con la prueba de Tukey, calculada a un nivel de probabilidad $p < 0.05$, en el programa estadístico SAS.

En la segunda fase de investigación se evaluaron dos medios de germinación líquidos, C y D, durante un periodo de tres días. En esta fase se utilizó únicamente el cultivar Morales. En el mes de noviembre de 2005 se sembró como se describe en la primera fase a diferencia de la cantidad de tiestos fueron cincuenta tiestos cada semana durante un periodo de cuatro semanas.

La germinación de polen se evaluó durante la primera semana de floración, las flores se recolectaron por la mañana. El medio C consiste de 40 mg H_3BO_3 (ácido bórico), 600 mg/L $Ca(NO_3)_2$ (nitrato de calcio), 400 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado), 400 mg/L KNO_3 (nitrato de potasio) y 40% sucrosa a un pH 8.5-8.8 (Gurusamy, comunicación personal, 2005). El medio D consiste de 500 mg/L H_3BO_3 , 600 mg/L $Ca(NO_3)_2$, 400 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 mg/L KNO_3 y 40% sucrosa a un pH 8.5-8.8 (Gurusamy, comunicación personal, 2005).

Se recolectaron flores abiertas y frescas por la mañana de 7:30 a 8:00 AM en cámaras húmedas (platos *petri* con papel toalla húmedo) para mantener las flores túrgidas con el polen fresco. Se colocaron 100 μ L de los medios de germinación líquidos en tubos de centrifuga de 1.5 mL. Luego se cortaron los estigmas de las flores, debido a que en el estigma está el polen y se colocaron 10 estigmas en cada tubo de centrifuga con medio. Los tubos fueron agitados en un *vortex* para que el polen se despegue de los estigmas y esté suspendido en el medio. Los estigmas fueron removidos para proveer una mayor área para el polen en el medio de germinación. Los tubos de centrifuga fueron colocados a una temperatura de 25°C aproximadamente. Todas observaciones de germinación de polen fueron tomadas después de 24 horas de incubación.

Después de 24 horas, los tubos se centrifugaron y se extrajo con micropipeta 60 μ L de medio de germinación y se dejó 40 μ L de medio con polen en el tubo. Los 40 μ L de medio con polen fueron colocados en portaobjetos (7.6x2.5x1mm) y cubiertos con cubre objetos. Posteriormente, los granos de polen se observaron en un microscopio de luz (MICROMASTER®, Fisher Scientific) a una magnitud de 40X para facilitar su conteo. Cien granos de polen fueron contados manualmente con un contador, una cantidad suficiente según Arndt and Gepts (1991) para estimar el porcentaje de germinación. En el conteo, un grano de

polen se consideró que había germinado cuando el largo del tubo del polen germinado fue igual o mayor que el diámetro del polen (Luza *et al.*, 1987).

Los datos de germinación para evaluar los factores de días y medios de germinación del cultivar Morales se analizaron mediante un arreglo de parcelas divididas de un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con diez repeticiones (Lyman y Longnecker, 2001). Las parcelas completas fueron los tres días (Día 1, Día 2 y Día 3) y las sub-parcelas fueron los dos medios de germinación (Medio C y Medio D). El experimento se realizó durante tres días porque los datos se pudieron tomar durante un periodo de tres días solamente. El modelo lineal general de SAS (SAS Institute, 1990) utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{k(i)} + (\alpha \times \beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable dependiente evaluada (germinación de polen)

μ = media general estimada

α_i = efecto del día de análisis de germinación

β_j = efecto de los medios de germinación

$\gamma_{k(i)}$ = efecto de repetición dentro de los días

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = interacción entre los días y los medios de germinación

ε_{ijk} = error experimental

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza ($p < 0.05$) y una separación de medias con la prueba de Tukey, calculada a un nivel de probabilidad $p = 0.05$, en el programa estadístico SAS.

TRANSFECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE FRIJOL MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE POLEN

Se evaluaron los cultivares de frijol común Tío Canela-75 y Morales ambas del acervo genético Mesoamericano, Raza Mesoamérica para transfección de polen y transformación de polen.

Transfección de polen

La transfección de polen se evaluó con el gen *gfp* y diferentes tintes incluyendo “*trypan blue*”, “*cotton blue*” y “*aniline blue*”; y la viabilidad de polen se evaluó con el tinte acetocarmine. Los tintes trypan blue, cotton blue y aniline blue fueron usados para determinar el voltaje que permeabiliza la pared celular del polen e introduce el ADN foráneo. El tinte acetocarmine fue usado para determinar la viabilidad del polen después de electroporación, debido a que a medida que sube el voltaje el polen va perdiendo viabilidad. La transfección de polen y viabilidad se realizó en dos fases.

En la primera fase se evaluaron condiciones óptimas para la transfección del polen con el gen *gfp* y con los tintes trypan blue, cotton blue y aniline blue según el método desarrollado por Saunders *et al.* (1995) y para la viabilidad del polen con el tinte aceto-carmine. En esta fase se evaluaron dos cultivares, Tío Canela 75 y Morales. La siembra se realizó en el mes de diciembre de 2004, los genotipos se sembraron individualmente en tiestos redondos (15cm diámetro), conteniendo el medio Sunshine Mix #1 (Sun Gro Horticulture, Vancouver, British Colombia). Las plantas se regaron regularmente para evitar estrés de sequía, fueron tratadas con pesticidas según fue necesario, y se fertilizó con Osmocote (14-14-14, N-P-K; Marysville, OH). Se sembró en invernadero diez tiestos por genotipo, cada semana durante cuatro semanas.

La evaluación de transfección y viabilidad de polen se evaluó durante la floración de los cultivares. Se recolectaron flores abiertas y frescas por la mañana de 7:30 a 8:00 AM en cámaras

húmedas (platos *petri* con papel toalla húmedo) para mantener el polen fresco. Se colocaron 40 μL del medio de germinación B y 20 μL de tinte trypan blue, cotton blue o aniline blue (a diferentes concentraciones en 0.6M manitol) para transfección, o tinte aceto-carmine para viabilidad en una cubeta de electroporación (distancia, 1mm). Después se cortaron los estigmas de las flores y se colocó el polen directamente de la punta de los estigmas a la cubeta de electroporación con tinte, se utilizaron dos estigmas por cubeta, y después se electroporó.

En la electroporación de polen, las cubetas fueron sometidas a un pulso de electroporación, de tipo decaimiento exponencial (en inglés, “*exponential decay*”) en un electroporador modelo ECM 630 (BTX, San Diego, USA). Los parámetros del electroporador utilizados fueron los voltajes evaluados de 0.0 y 4.0 kV/cm, una capacitancia de 50 μF y una resistencia de 350 Ω , en un rango de voltaje bajo (en inglés, “*low voltage*”) de 0.1 a 5.0 kV/cm.

La evaluación de las concentraciones de los tintes trypan blue y aniline blue se realizaron mediante dos experimentos. Las concentraciones en el primer experimento fueron 0.4%, 0.3%, 0.2% y 0.1%; y en el segundo fueron 0.1%, 0.01% y 0.001%. La evaluación de las concentraciones del tinte cotton blue se realizaron mediante tres experimentos. Las concentraciones en el primer experimento fueron 0.5%, 0.05%, 0.005% y 0.0005%; en el segundo fueron 0.25%, 0.20%, 0.1% y 0.05%; y en el tercer experimento fueron 0.5%, 0.3%, 0.25% y 0.2%. El tinte aceto-carmine de la compañía Fisher Scientific (Chicago, Illinois) se utilizó a su concentración original.

La solución con granos de polen fue removida de las cubetas y colocados en tubos y se centrifugaron a 1000 rpm por 1 min. La pelotilla de polen se enjuagó dos veces con medio de germinación de polen y se colocaron en portaobjetos (3"x1"x1mm). Todas observaciones de transfección de polen fueron tomadas después de 15 min. de incubación. Los granos de polen se

observaron en un microscopio de luz (MICROMASTER[®], Fisher Scientific) a una magnitud de 40X para facilitar su conteo. Cien granos de polen fueron contados manualmente con un contador, una cantidad suficiente según Arndt y Gepts (1991) para estimar el porcentaje de germinación. En el conteo de grano de polen se consideró que estaba teñido con trypan blue cuando el color de grano fue azul y con aceto-carmine cuando el color de grano fue rojo.

En la segunda fase se evaluaron condiciones óptimas para la transfección del polen con el tinte trypan blue bajo el método desarrollado por Saunders *et al.* (1995) con algunas modificaciones, y para la viabilidad del polen con el tinte aceto-carmine. En esta fase se evaluó el cultivar Morales y la siembra se realizó en el mes de diciembre de 2005, en invernadero. El cultivar se sembró de la misma forma que en la primera fase, a diferencia de la cantidad de tiestos fueron cincuenta tiestos por genotipo, cada dos semanas durante cuatro semanas.

La transfección de polen se evaluó durante la floración del cultivar Morales. La recolección de flores se realizó como se describe en la primera fase. Se colocaron 60 μ L del medio de germinación D y 20 μ L de tinte trypan blue o aceto-carmine en una cubeta de electroporación (distancia, 1mm). Las concentraciones evaluadas de tinte trypan blue fueron 0.01%, 0.02% y 0.04%, de la cual se seleccionó la concentración de 0.04% para la evaluación de voltajes. El tinte aceto-carmine se utilizó a su concentración original. Los estigmas de las flores se cortaron y se colocó el polen directamente de la punta de los estigmas a la cubeta de electroporación con tinte. Se utilizaron diez estigmas por cubeta, y luego se electroporó. La solución con polen fue removida de las cubetas y colocados en tubos de centrifuga y se siguió el mismo proceso que en la primera fase. En la electroporación de polen, las cubetas fueron sometidas a un pulso de electroporación de 0.0, 1.0, 2.0, 4.0 y 5.0 kV/cm, una capacitancia de 50 μ F y una resistencia de 350 Ω .

La tinción de polen se analizó mediante un arreglo factorial de un Diseño en Bloques Completos Aleatorizados (DBCA) con tres bloques (Lyman y Longnecker, 2001). Los factores fueron dos medios de germinación (medio C y medio D), dos tintes (trypan blue y aceto-carmin) y cinco voltajes (0.0, 1.0, 2.0, 4.0 y 5.0 kV/cm). El modelo lineal general de SAS (de sus siglas en inglés, “Statistical Analysis System”) (SAS Institute, 1990) utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha \times \beta)_{ij} + (\alpha \times \gamma)_{ik} + (\beta + \gamma)_{jk} + (\alpha + \beta + \gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ij} = variable dependiente evaluada (tinción de polen)

μ = media general estimada

α_i = efecto de los medios de germinación

β_j = efecto de los tintes

γ_k = efecto de los voltajes

δ_l = Efecto de los bloques

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = interacción entre los medios de germinación y los tintes

$(\alpha \times \gamma)_{ik}$ = interacción entre los medios de germinación y los voltajes

$(\beta + \gamma)_{jk}$ = interacción entre los tintes y los voltajes

$(\alpha + \beta + \gamma)_{ijk}$ = interacción entre los medios de germinación, tintes y voltajes.

ε_{ijkl} = error experimental

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza ($p < 0.05$) y una separación de medias con la prueba de Tukey, calculada a un nivel de probabilidad $p < 0.05$, en el programa estadístico SAS.

TRANSFORMACIÓN DE POLEN

La transformación de frijol mediante electroporación de polen se realizó en dos fases. En la primera fase se evaluaron los cultivares Morales y Tío Canela. La siembra se realizó en el mes de diciembre de 2004. Los cultivares se sembraron de la misma forma que en la transfección de polen a diferencia de la cantidad de tiestos fueron cien tiestos por genotipo, cada dos semanas, durante cuatro meses.

La transformación de polen se evaluó durante la floración de los cultivares. Se recolectaron flores abiertas y frescas por la mañana de 7:30 a 8:00 AM en cámaras húmedas (platos *petri* con papel toalla húmedo) para mantener el polen fresco. La electroporación de polen se realizó según el método de England (2003). Se colocaron 60.0 μL de medio de electroporación (conteniendo reactivos del medio de germinación sin sucrosa) en tubos de microcentrífuga (1.5 mL). Los estigmas de las flores se cortaron y se recolectó el polen directamente de la punta de los estigmas al tubo de microcentrífuga con medio de electroporación, se utilizaron cinco estigmas por tubo. El medio de electroporación con polen se colocó en una cubeta (distancia, 1.0 mm), se agregó 2.0 μL de ADN (200.0 ng/ μL) de plásmido PV12bar, lipofectin y se electroporó.

En la electroporación de polen, las cubetas fueron sometidas a un pulso de electroporación de 1.0 kV/cm, una capacitancia de 50 μF y una resistencia de 350 Ω . Los pulsos fueron aproximadamente de 8 a 10 milisegundos según lo recomendado para polen de arvejas (England, 2003).

El plásmido utilizado fue PV12bar, el cual contiene el gen *bar*, el promotor PCIS_tV “*Peanut Chlorotic Streak Caulimovirus*” y el gen de resistencia a antibiótico ampicilina (Figura 3.1). El ADN de plásmido se extrajo con el kit QIAprep[®] Miniprep (Qiagen Valencia, California, USA) según el protocolo de extracción Qiaprep Spin Miniprep usando centrifuga (QIAGEN[®], 2004).

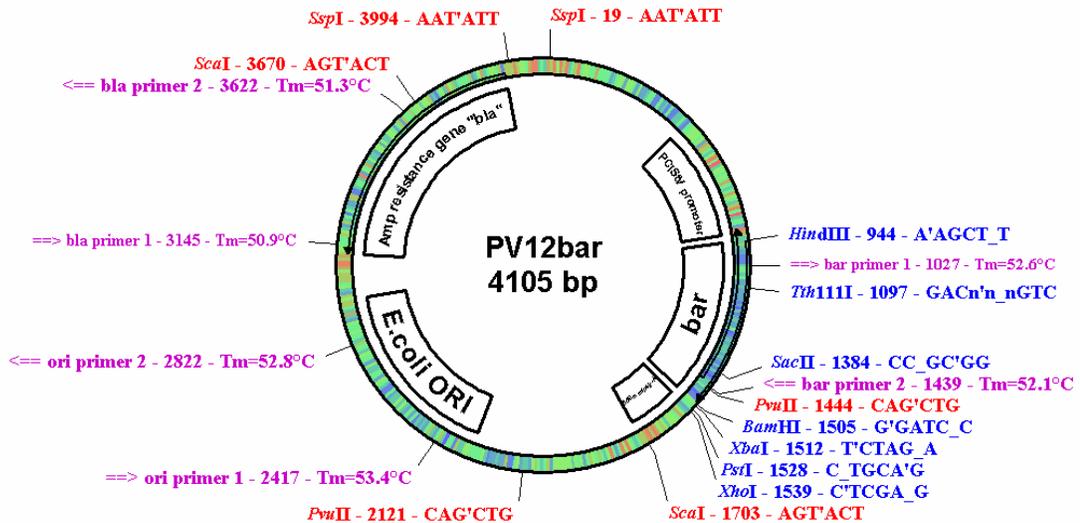


Figura 7. Diagrama del plásmido PV12bar.

La solución con polen fue removida de las cubetas y se transfirió a un tubo de microcentrífuga (1.5 mL), se centrifugó a 1000 rpm durante 1 min., y se virtió el sobrenadante. La pelotilla de polen se enjuagó dos veces con el medio de germinación de polen B (descrito en el capítulo 2 con 10% sucrosa y mitad de calcio), se centrifugó después de los enjuagues. Después de centrifugar, se dejó el polen con aproximadamente 4.0 µL de medio de germinación el cual se utilizó para polinizar flores cerradas de frijol en plantas sembradas en invernadero.

Los métodos de polinización que se evaluaron fueron “papel”, “gota” y “agarosa”. El método de papel consistió en colocar la solución de polen transformado en el doblez de un papel

filtro (1mm × 5mm), y colocar en el doblado el estigma para hacer contacto con el polen y para que pueda polinizar la flor (Figura 8). En el método de gota, la solución de polen transformado se colocó directamente en la punta del estigma de la flor en forma de gota. El método de agarosa consistió en colocar agarosa en la punta del estigma y luego la solución de polen transformado.

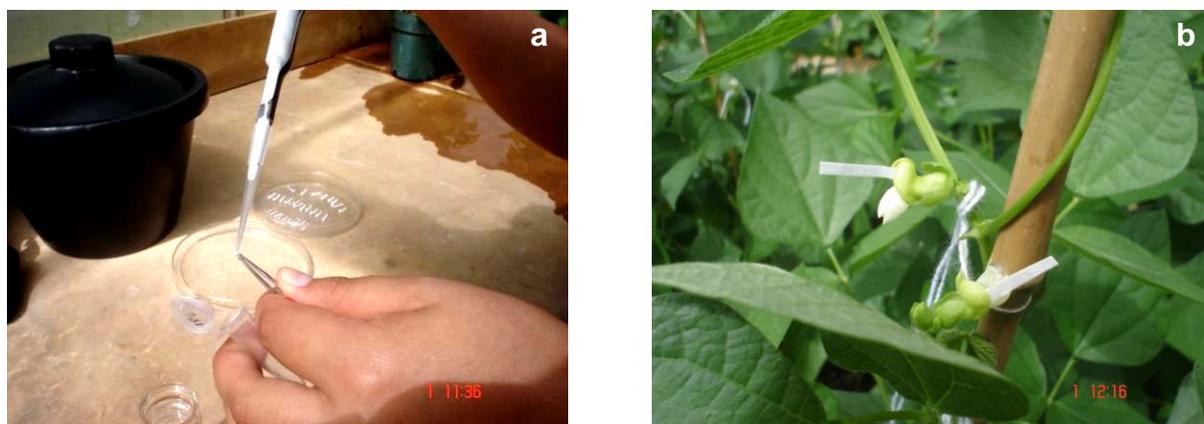


Figura 8. Polinización con papel. a) Preparación de papel filtro con polen transformado; y b) Flores polinizadas con método de papel.

Todas las transformaciones fueron identificadas con etiquetas (2.7 cm × 1.9 cm) llevando la información del cultivar, número de evento de transformación, fecha y nombre de la persona que realizó la polinización para reconocer las vainas transformantes al momento de la cosecha (Figura 9). El proceso completo se realizó por las mañanas, antes que las temperaturas subieran de 32°C en el invernadero.



Figura 9. Vainas transformadas identificadas con etiquetas en diferentes etapas.

El método de electroporación se evaluó con cubetas (distancia, 1.0 mm) y electrodos (distancia, 2.0 mm). La electroporación con electrodos se realizó en el invernadero, se recolectó el polen de estigmas de dos flores enjuagando con 4.0 μL de medio de electroporación y se agregó 1.0 μL de ADN de plásmido diluido (40 ng/ μL). Agrego los dos al estigma, después se electroporó el polen directamente en el estigma de la flor a polinizar, este método de polinización se denominó ‘de gota’.

Mediante los tres métodos de polinización, se realizaron 1108 polinizaciones, 667 del cultivar Morales y 441 del cultivar Tío Canela 75. Estas polinizaciones se realizaron con polen electroporado de frijol que contiene el gen *bar* para obtener vainas transformantes. Las vainas transformantes se evaluaron genótipicamente y fenotípicamente para identificar alguna planta transformada con el gen *bar* que confiera la resistencia al herbicida glufosinato de amonio.

La evaluación genotípica se realizó mediante dos técnicas moleculares: PCR (por sus siglas en inglés “*Polymerase Chain Reaction*”) y *Southern blot*. La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se comenzó con la extracción de ADN con el kit DNeasy[®] 96 Plant

(Qiagen Valencia, California, USA) según el protocolo de extracción de ADN de tejido de hoja de planta (QIAGEN, 2002). El ADN extraído fue diluido a una concentración aproximada de 20 ng/ μ L.

La reacción de PCR se preparó según el protocolo descrito por Aragão *et al.* (2002) de 20.0 μ L de mezcla de reacción conteniendo 2.0 μ L buffer PCR (10X), 0.4 μ L dNTP's (10 mM), 1.6 μ L MgCl₂ (25 mM), 0.2 μ L iniciador Bar-F (10 μ M), 0.2 μ L iniciador Bar-R (10 μ M), 0.2 μ L *Taq* polimerasa (5 U/ μ L), 13.4 μ L de agua purificada y 2.0 μ L de ADN (~20 ng/ μ L ADN genómico). La secuencia de los iniciadores fueron Bar-F 'GCT TGC ACC ATC GTC AAC' y Bar-R 'TGA AGT CCA GCT GCC A', estos amplifican un marcador molecular de 448 pb "pares de bases" para identificar plantas transformantes que posiblemente tengan el gen *bar* en su genoma.

La reacción de PCR se amplificó en un termociclador Touchgene Gradient (Techne, Staffordshire, UK) con un programa de desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización 95°C por 1 minuto, acoplamiento 56°C por 1 minuto y elongación 72°C por 1 minuto) y una elongación final de 72°C por 7 minutos. En un gel de agarosa al 1%, se sembraron 10.0 μ L de la mezcla de reacción de PCR por muestra. La tinción del gel de agarosa se hizo con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador (FBTIV-816[®] Fisher Scientific) con una intensidad variable de 312 nm.

La técnica de *Southern blot* se realizó para confirmar los datos de PCR y determinar el número de copias del gen *bar* en las plantas transformantes. El *Southern blot* se comenzó con la extracción de ADN con el kit QIA Quick (Qiagen Valencia, California, USA) según el protocolo de extracción de ADN (QIAGEN, 2000). La digestión del ADN genómico se preparó mediante una mezcla de 100.0 μ L conteniendo 5.0 μ L de Spermidine (50mM), 10.0 μ L de Buffer (10X),

3.0 μL enzima de restricción *EcoRI* (10.0 U/ μL), 32.0 μL de agua y 50.0 μL de ADN genómico (200.0 ng/ μL).

El proceso de transferencia capilar de ADN a membrana de nylon se realizó según el método descrito previamente por Sambrook *et al.* (1989). La electroforesis de ADN se realizó en un gel de agarosa al 0.9% donde el ADN se separó y se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente. La membrana de nylon con ADN se envió para su análisis al laboratorio de la Universidad de Florida dirigida por Dra. Jane Polston. El análisis del ADN de la membrana se realizó mediante la hibridización con sondas marcadas con fósforo 32 ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$) de 448 pb, que provienen del producto de PCR con iniciadores para identificar el gen *bar* del plasmado PV12bar.

La evaluación fenotípica se realizó aplicando a las plantas transformantes glufosinato de amonio mediante el herbicida Finale[®] para confirmar la presencia del gen *bar*. La aplicación del herbicida Finale[®] se realizó a una concentración de 100, 500 y 800 g/L, en dos hojas de cada planta, rayando la hoja a ambos lados de la nervadura principal con palitos de algodón (Figura 10).

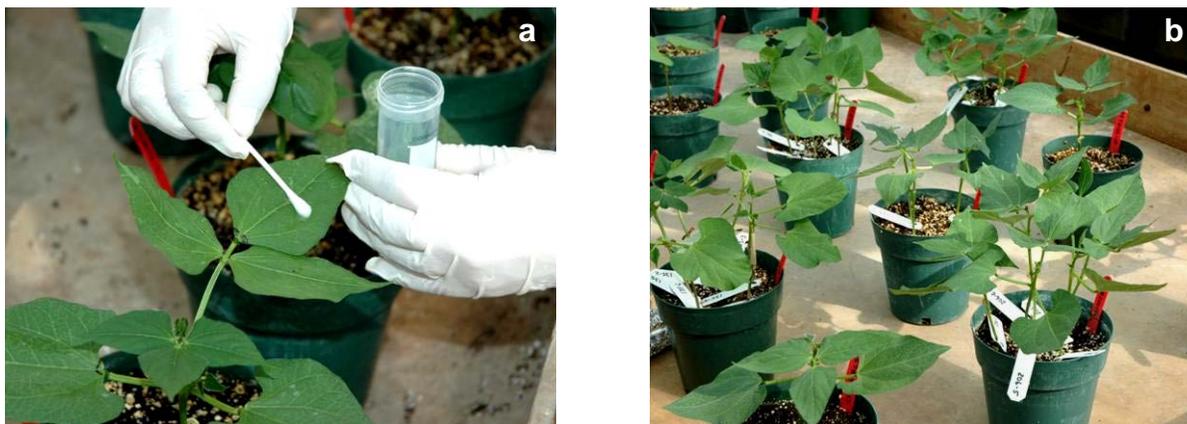


Figura 10. Aplicación del herbicida Finale[®] de los cultivares Morales y Tío Canela 75. a) Aplicación de herbicida Finale[®] con palitos de algodón; y b) Identificación de plantas transformantes.

En la segunda fase se evaluó el cultivar Morales y la siembra se realizó en el mes de diciembre de 2005. El cultivar se sembró de la misma forma que en los experimentos de transfección de polen, a diferencia de la cantidad de tiestos que fueron cincuenta tiestos por genotipo, cada dos semanas durante tres meses. La transformación de polen se evaluó durante la floración de los cultivares. La recolección de flores se realizó como se describe en la primera fase.

La electroporación de polen se realizó según el método modificado de England (2003), ya que tuvo variaciones con respecto a la primera fase. Los estigmas de las flores se recolectaron en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) con 100.0 μ L de medio de germinación D y se utilizaron diez estigmas por tubo. Los tubos se agitaron en el *vortex* para desprender el polen de los estigmas y se dejaron a temperatura ambiente hasta el día siguiente para dejar crecer los tubos del polen.

La siguiente mañana, los estigmas fueron removidos de los tubos con pinzas y se centrifugaron a 1000 rpm por 1 min. Posteriormente, el medio de germinación fue removido y se dejó la pelotilla de polen. Al tubo se agregó 60.0 μ L de medio de germinación y 10.0 μ L de ADN de plásmido PV12bar (10 μ g/ μ L), se agitó y la solución se transfirió a una cubeta (distancia, 1.0 mm) y se electroporó. El ADN de plásmido se extrajo con el kit QIAGEN[®] Plasmid Purification (Qiagen Valencia, California, USA) según los protocolos de purificación de ADN de plásmido (QIAGEN[®], 2003).

En la electroporación de polen, las cubetas fueron sometidas a un pulso de electroporación de 4.0 kV/cm, una capacitancia de 50 μ F y una resistencia 350 Ω . Los pulsos fueron aproximadamente de 8 a 10 milisegundos según lo recomendado para polen de arvejas (England, 2003).

La solución con polen fue removida de las cubetas y se transfirió a un tubo de microcentrífuga (1.5 mL), se centrifugó a 1000 rpm durante 1 min y se vertió el sobrenadante. La pelotilla de polen se enjuagó dos veces con el medio de germinación de polen D (descrito en el capítulo 2) y se centrifugó después de los enjuagues. Después de centrifugar se dejó el polen con aproximadamente 2.0 μ L de medio de germinación el cual se utilizó para polinizar, por medio de una gota, flores cerradas de frijol en plantas sembradas en invernadero. El proceso completo se realizó por las mañanas temprano, antes que las temperaturas subieran mucho en el invernadero.

Se realizaron 612 polinizaciones, de las cuales 444 polinizaciones fueron con polen electroporado de frijol que contiene el gen *bar* para obtener vainas transformantes y 168 polinizaciones testigo con polen fresco y con polen germinado, 84 polinizaciones de cada testigo. En las vainas transformantes se observó abscisión, ya que las vainas se caían antes de madurar, por lo cual se utilizó la técnica de rescate de embriones en tres medios de cultivo *in vitro* según los protocolos descritos previamente por Schryer *et al.* (2005).

Las vainas transformantes recolectadas antes de la caída fueron 50, las cuales se sembraron en medios de cultivo. Las vainas recolectadas fueron de diferentes tamaños que clasificaron en dos grupos, uno de 36 vainas menores a 2.5cm y el otro de 14 vainas mayores a 2.5cm. De las 50 vainas recolectadas, 38 vainas fueron verdes y 12 vainas fueron amarillas. Además, unas vainas testigos que no pasaron por el proceso de electroporación, se sembraron en los medios de cultivo como testigos. Las vainas testigos sembradas fueron de tres tamaños 1.25 cm, 2.5 cm y 3.75 cm de largo. Estas vainas se sembraron en tres platos *petri* para tomar datos de crecimiento y determinar que tamaño de vaina crece mejor en los medios.

El primer medio, denominado medio de cultivo de vainas (PCM, por sus siglas en inglés “*pod culture media*”) estaba compuesto del medio basal descrito por Phillips y Collins (1979)

con sales descrito por Geerts *et al.* (2001). El medio PCM se utilizó para crecimiento de vainas recolectadas antes de caída. Las vainas fueron desinfectadas según el protocolo de Schryer *et al.* (2005) y se colocaron en el medio PCM en platos *petri* bajo condiciones asépticas. Se marcó sobre el plato con un marcador indeleble el tamaño de la vaina para determinar su crecimiento posteriormente. Las vainas fueron cultivadas en una cámara de flujo laminar durante 7 días a una temperatura de $\sim 25^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16/8h (día/noche).

El segundo medio, denominado medio de cultivo de embriones (ECM, por sus siglas en inglés “*embryo culture media*”) se utilizó para el crecimiento de embriones. Los embriones fueron extraídos de las vainas que crecieron en medio PCM, y se colocaron en medio ECM en platos *petri* bajo condiciones asépticas. Los embriones fueron cultivados en oscuridad por 7 días, seguidos por un cultivo en una cámara de flujo laminar a $\sim 25^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16/8h (día/noche) por 7 días.

El tercer medio, denominado medio de germinación (MG, por sus siglas en inglés “*germination media*”) se utilizó para la germinación de embriones. Los embriones se cambiaron de medio ECM a medio MG para que los embriones germinaran y formaran plántulas pequeñas, que después puedan ser sembradas en invernadero para obtener plantas adultas. Los embriones fueron cultivados en una cámara de flujo laminar a un fotoperiodo de 16/8h (día/noche) por 7 días. Después de 7 días, los embriones con tallo y raíz mayor a 1.0 cm fueron transplantados en potes en laboratorio, para evitar estrés por calor.

RESULTADOS

GERMINACIÓN DE POLEN

En el primero estudio, los datos de germinación de polen evaluados mediante un análisis de varianza en el medio A, indican que no hubo interacción entre los genotipos de frijol y la sucrosa. Se encontró diferencias en la germinación de polen entre los genotipos de frijol y las cuatro concentraciones de sucrosa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza de los efectos de genotipo y sucrosa en la germinación de polen en medio A.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Genotipo	4	9431.875	2357.969	11.7	<.0001
Sucrosa	3	4791.650	1597.217	7.9	0.0002
Genotipo × Sucrosa	12	2710.725	225.894	1.1	0.3635
Error	60	12092.160	201.536		

En la evaluación de germinación de polen en el medio B, tampoco hubo interacción entre los genotipos y la sucrosa. Se encontró diferencias en la germinación de polen entre los genotipos. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las cuatro concentraciones de sucrosa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de los efectos de genotipo y sucrosa en la germinación de polen en medio B.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Genotipo	4	25439.175	6359.794	17.0	<.0001
Sucrosa	3	1443.250	481.083	1.3	0.2886
Genotipo × Sucrosa	12	2404.125	200.344	0.5	0.8838
Error	60	22446.360	374.106		

Los promedios de germinación de polen por genotipo de frijol mostraron una germinación mayor para el cultivar Tío Canela 75 en los medios A y B. En el medio B se observan los promedios de germinación de polen más altos con excepción del cultivar Morales el cual presentó un promedio bajo (Cuadro 4).

Los cinco genotipos de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius* evaluados mostraron diferencias significativas en la germinación de polen en ambos medios. Sin embargo, los cultivares de *Phaseolus vulgaris* mostraron diferencias en germinación, mientras que las líneas de *Phaseolus acutifolius* no mostraron diferencias en germinación de polen en los medios A y B (Cuadro 5).

En la evaluación de las cuatro concentraciones de sucrosa se encontraron diferencias en la germinación de polen en el medio A. Sin embargo, no se observaron efectos de concentración de sucrosa en la germinación de polen en el medio B (Cuadro 5). La germinación de polen del cultivar Tío Canela 75 fue superior a los otros genotipos con una germinación de 46.1% en el medio A y 66.5% en el medio B (Figura 11 y 12). La germinación de polen a una concentración de 10% sucrosa fue superior a las otras concentraciones con una germinación de 36% en el medio A (Figura 13.)

Cuadro 4. Promedios del efecto de genotipos con diferentes concentraciones de sucrosa en la germinación de polen en los medios A y B.

Genotipo de frijol ¹	Sucrosa (%)	Germinación (%)	
		Medio A	Medio B
Morales (Pv)	0	10.0	2.5
	10	41.5	8.8
	20	18.0	18.8
	50	18.5	21.3
	Promedio	22.0	12.8
Tío Canela 75 (Pv)	0	41.5	46.5
	10	46.8	75.0
	20	46.3	72.3
	50	50.0	72.3
	Promedio	46.1	66.5
Neb-T-1-s (Pa)	0	6.3	49.0
	10	43.5	51.0
	20	19.0	51.8
	50	8.5	58.8
	Promedio	19.3	52.6
PI 502217-s (Pa)	0	7.5	51.0
	10	22.0	54.5
	20	17.3	56.0
	50	25.8	42.0
	Promedio	18.1	50.9
GN-605-s (Pa)	0	5.5	44.0
	10	26.3	50.5
	20	19.5	46.3
	50	19.0	46.5
	Promedio	17.6	46.8
Promedio general		24.6	45.9
DMS (0.05)		10.1	13.7
CV (%)		57.7	42.2

¹Pv= *Phaseolus vulgaris*, Pa= *Phaseolus acutifolius*, DMS= diferencia mínima significativa y CV= coeficiente de variación.

Cuadro 5. Promedios de germinación de polen de los cinco genotipos de *Phaseolus* y los cuatro concentraciones de sucrosa en los medios A y B.

	Medio	
	A	B
	Germinación (%) ²	
Genotipo de frijol ¹		
Morales (Pv)	22.0 b	12.8 c
Tío Canela-75 (Pv)	46.1 a	66.5 a
Neb-T-1-s (Pa)	19.3 b	52.6 b
PI 502217-s (Pa)	18.1 b	50.9 b
GN-605-s (Pa)	17.6 b	46.8 b
Significancia entre genotipos	**	**
Sucrosa (%)		
0	14.2 c	38.6 a
10	36.0 a	48.0 a
20	24.0 b	49.0 a
50	24.4 b	48.2 a
Significancia	**	n.s.
Genotipo x sucrosa	n.s.	n.s.

¹Pv= *Phaseolus vulgaris*, Pa= *Phaseolus acutifolius*.

²**= <0.001, n.s.= no significativo y letras diferentes indican diferencias significativas (Separación de medias mediante una prueba de Tukey).

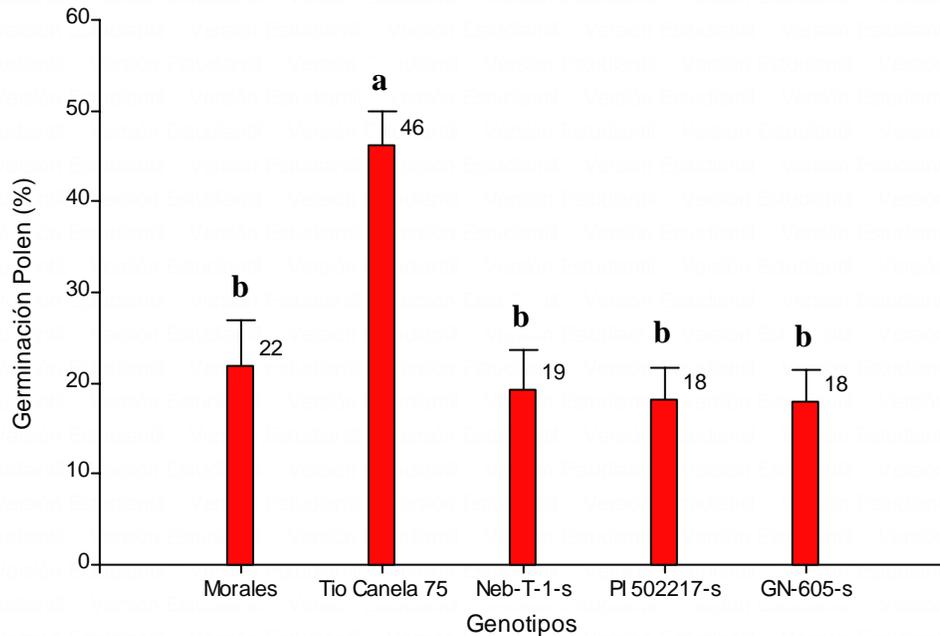


Figura 11. Promedios de germinación de polen de los genotipos de frijol del medio A.

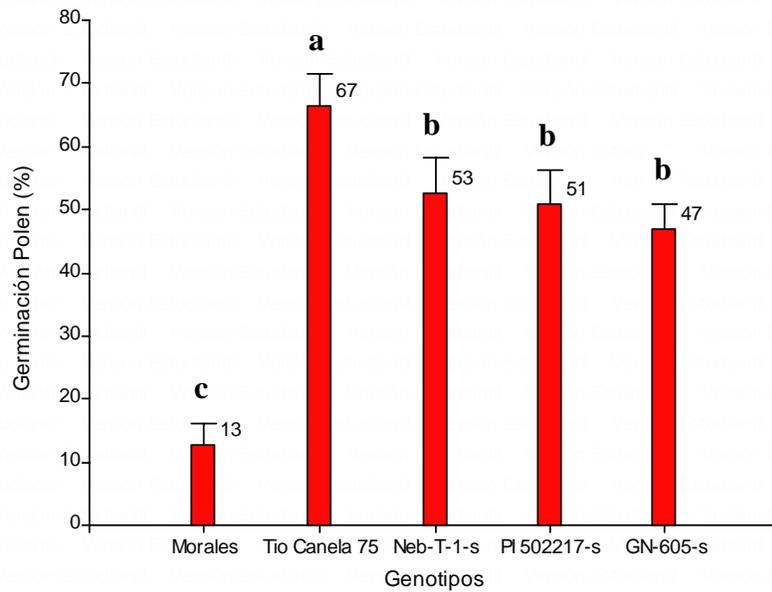


Figura 12. Promedios de germinación de polen de los genotipos de frijol variando sucrosa en la germinación de polen del medio B.

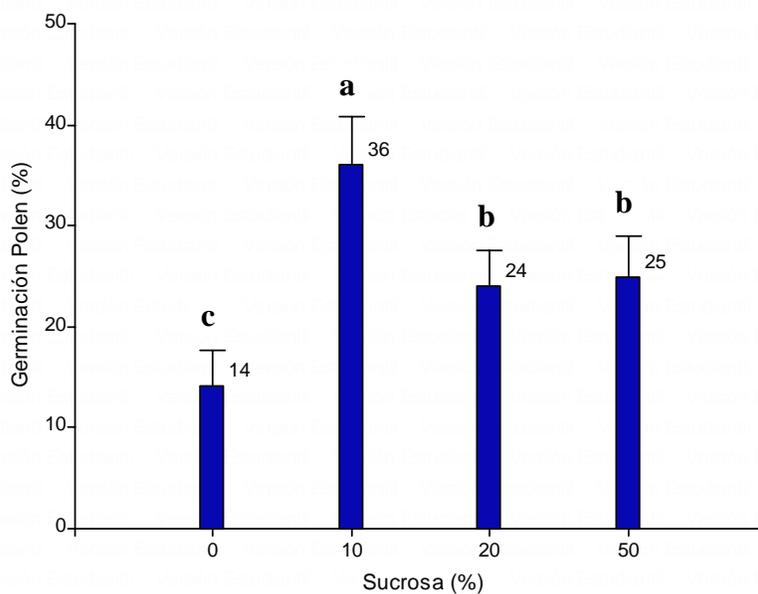


Figura 13. Promedios de germinación de polen de los cuatro concentraciones de sucrosa en el medio A.

Los datos de germinación de polen evaluados mediante un análisis de varianza en el medio A, indican que no hubo interacción entre los genotipos de frijol y el calcio. Se encontró diferencias en la germinación de polen entre los genotipos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de calcio (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de los efectos de genotipos y concentración de calcio en la germinación de polen en el medio A.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Genotipo	4	7236.533	1809.133	4.6	0.0053
Calcio	2	2489.378	1244.689	3.1	0.0577
Genotipo × Calcio	8	3479.733	434.967	1.1	0.3918
Error	45	17698.040	393.290		

Los promedios de germinación de polen por genotipo mostraron una germinación mayor para todos los cultivares con excepción del cultivar Morales en el medio A (Cuadro 7). El análisis muestra un coeficiente de variación del 42.6% y este porcentaje es alto. Sin embargo, tratándose de polen que viene de invernadero puede presentar variación por factores ambientales, como alta temperatura.

Los cultivares de *Phaseolus vulgaris* resultaron diferentes en germinación en el medio A. No se encontraron diferencias en germinación entre las tres líneas de *Phaseolus acutifolius* en el medio A (Cuadro 8 y Figura 14).

Cuadro 7. Promedios de germinación de polen de genotipos de *Phaseolus vulgaris* y *P. acutifolius* con tres niveles de calcio en el medio A.

Genotipo ¹	Calcio (%)	Germinación (%)
Morales (Pv)	Cero	8.0
	Mitad	31.3
	Completo	33.7
	Promedio	24.3
Tío Canela 75 (Pv)	Cero	41.3
	Mitad	68.0
	Completo	64.3
	Promedio	57.9
Neb-T-1-s (Pa)	Cero	39.0
	Mitad	72.7
	Completo	62.0
	Promedio	57.9
PI 502217-s (Pa)	Cero	59.7
	Mitad	57.3
	Completo	39.0
	Promedio	52.0
GN-605-s (Pa)	Cero	44.0
	Mitad	53.0
	Completo	28.0
	Promedio	41.7
Promedio general		46.8
DMS (0.05)		19.2
CV (%)		42.6

¹Pv= *Phaseolus vulgaris*, Pa= *Phaseolus acutifolius*, DMS= diferencia mínima significativa y CV= coeficiente de variación

Cuadro 8. Promedios de germinación de polen de los cinco genotipos de frijol y los tres concentraciones de calcio en el medio A.

Fuente de Variación ¹	Germinación (%) ²
Genotipo	
Morales (Pv)	24.3 b
Tío Canela 75 (Pv)	57.9 a
Neb-T-1-s (Pa)	57.9 a
PI 502217-s (Pa)	52.0 a
GN-605-s (Pa)	41.7 ab
Significancia	*
Calcio	
Cero	38.4
Mitad	56.4
Completo	45.4
Significancia	n.s.
Genotipo x calcio	n.s.

¹Pv= *Phaseolus vulgaris*, Pa= *Phaseolus acutifolius*

²*= <0.01, n.s.= no significativo y letras diferentes indican diferencias significativas (Separación de medias mediante una prueba de Tukey).

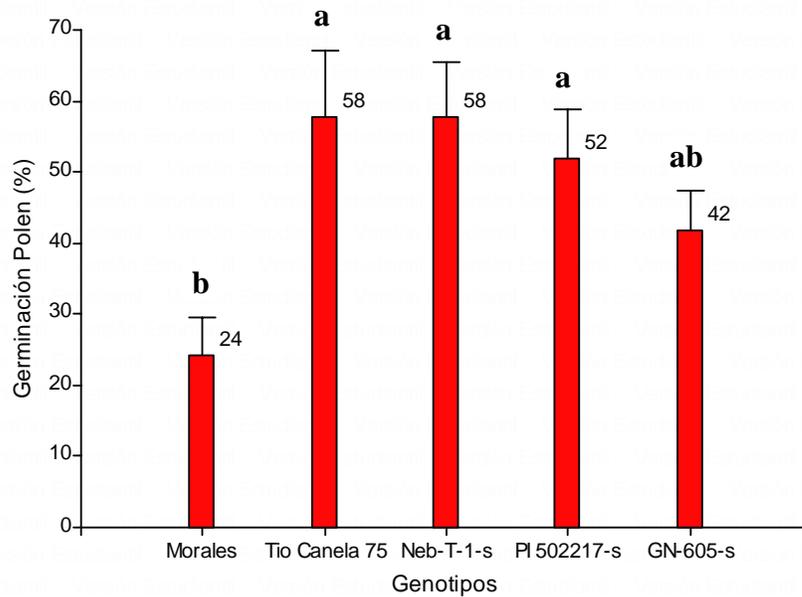


Figura 14. Promedios de los por ciento de germinación de polen de los cinco genotipos de frijol en el medio A.

En la segunda fase de la investigación, en la evaluación de los medios de germinación de polen de Morales, hubo interacción significativa entre los días y medios de germinación. Es decir, la diferencia de germinación entre ambos medios no fue la misma en diferentes días (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza de los efectos de medios de germinación y día de análisis en la germinación de polen del cultivar Morales.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Día	2	8748.133	4374.067	27.9	<.0001
Repetición (Día)	27	3170.350	117.420	0.8	0.7712
Medio germinación	1	11956.817	11956.817	76.3	<.0001
Día × Medio germinación	2	2678.533	1339.267	8.5	0.0013
Error	27	4231.116	156.708		

Los promedios de germinación de polen por días muestran una germinación mayor de 63.2% en el día 3. El coeficiente de variación fue de 24.8%, para obtener un mayor nivel de precisión se incrementaron el número de repeticiones (Cuadro 10).

Cuadro 10. Promedios de porcentaje de germinación de polen del cultivar Morales y los efectos de días.

Día ¹	Calcio (%)	Germinación (%)
Día 1	Medio C	29.4
	Medio D	39.1
	Promedio	34.3
Día 2	Medio C	33.8
	Medio D	74.5
	Promedio	54.2
Día 3	Medio C	46.0
	Medio D	80.3
	Promedio	63.2
Promedio general		50.6
DMS (0.05)		9.8
CV (%)		24.8

¹DMS= diferencia mínima significativa y CV= coeficiente de variación

El análisis de datos de germinación de polen de Morales muestra una interacción entre días y medios de germinación, por lo cual se determina que la diferencia entre ambos medios es diferente en diferentes días (Cuadro 11 y Figura 15). Esta diferencia entre los medios C y D será siempre mayor para el medio de germinación D la cual en el estudio presenta un porcentaje de germinación más alto (64.6%) que el medio C (36.4%) (Cuadro 11). Este porcentaje de germinación es adecuado para transformar polen de frijol, ya que England (comunicación personal, 2004) afirma que 70% es una germinación óptima. Además, este porcentaje es más alto al reportado por Schreiber y Dresselhaus (2003) de 50-60% de germinación en frijol.

Cuadro 11. Promedios de por ciento de germinación de polen del cultivar Morales en diferentes días y medios.

Fuente de Variación	Germinación (%) ¹
Día	
Día 1	34.25 b
Día 2	54.15 a
Día 3	63.15 a
Significancia	***
Medio germinación	
Medio C	36.40 b
Medio D	64.63 a
Significancia	***
Día x Medio germinación	*

¹*=<0.01, ***=<0.0001 y letras diferentes indican diferencias significativas (Separación de medias mediante prueba Tukey)

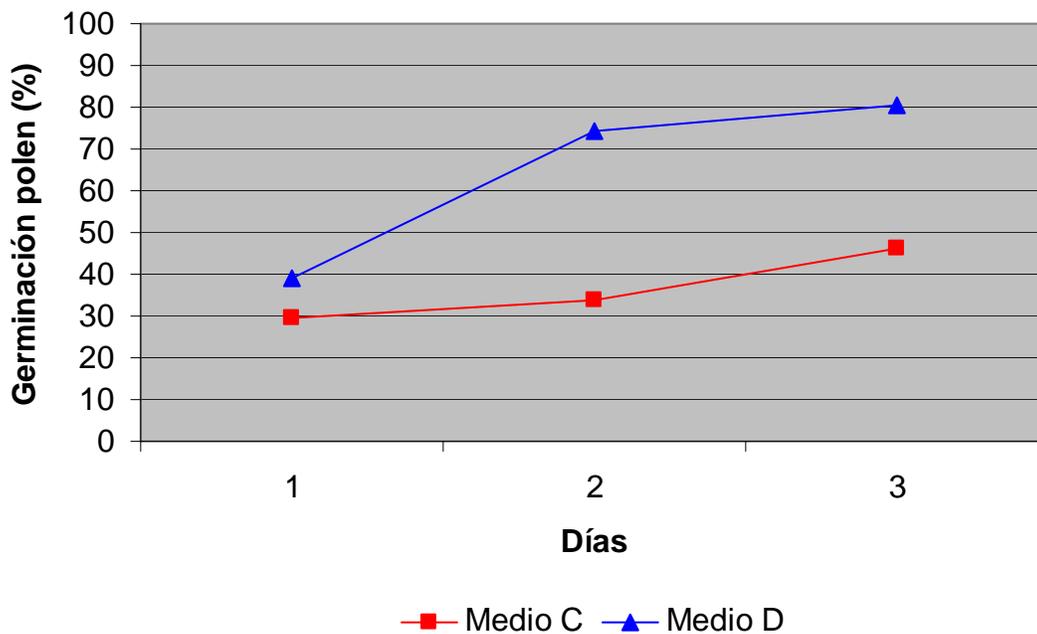


Figura 15. Los promedios de porcentaje de germinación de polen del cultivar Morales.

El polen germinado visto en microscopio de luz resultó muy fácil de ver a magnitudes de 10X y 40X, sin embargo para contar polen germinado resultó mejor la magnitud de 40X porque muestra una vista más amplia de los granos de polen (Figura 16).

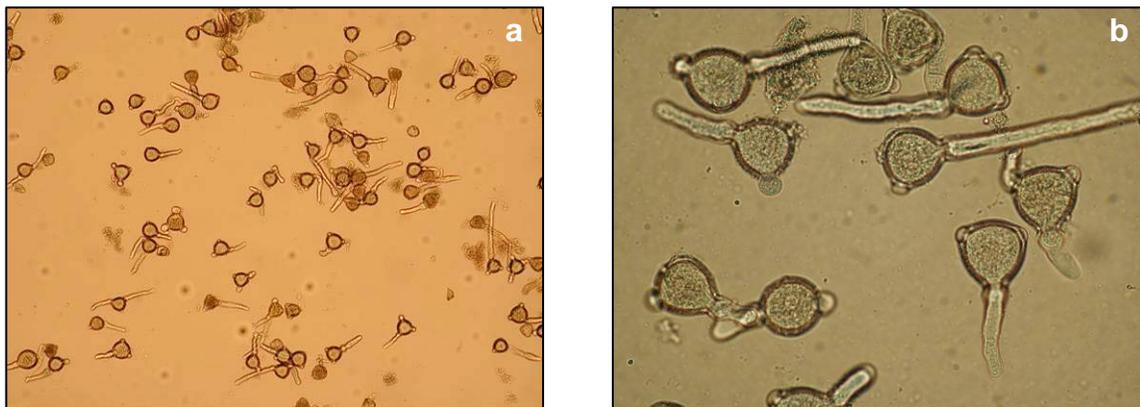


Figura 16. Polen germinado en medio de germinación líquido visto al microscopio en luz blanca a) Magnitud 10X y b) Magnitud 40X.

TRANSFECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE FRIJOL MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE POLEN

Transfección de polen

En la primera fase, la evaluación de transfección de polen con el gen *gfp* no se pudo determinar el voltaje óptimo de electroporación. No se encontraron diferencias de la expresión del gen a voltajes de 0.0 kV/cm y 4.0 kV/cm debido a que el polen testigo a un voltaje de 0.0 kV auto-fluórese bajo el microscopio de luz ultravioleta (Figura 17).

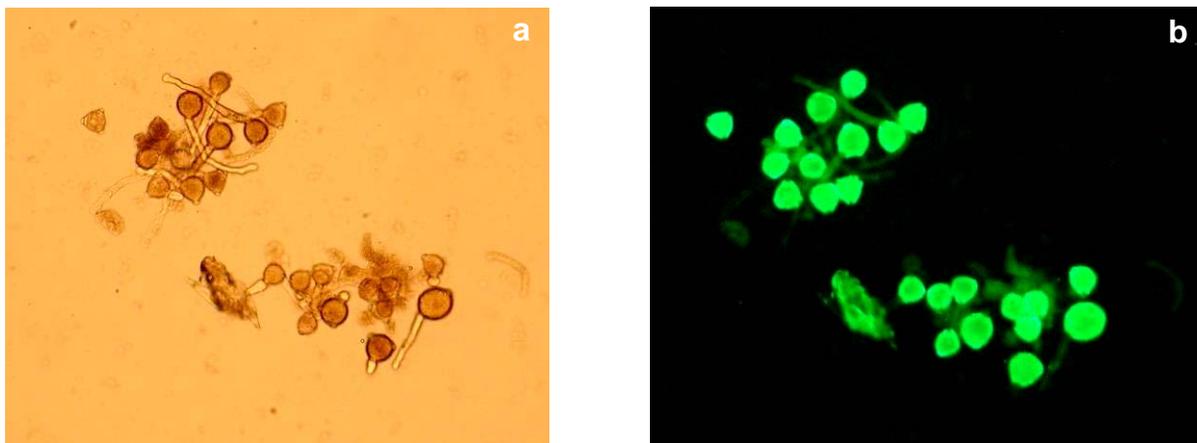


Figura 17. Vista de polen testigo sin transformar en microscopio de luz (lente 10X). a) Polen en luz blanca; y b) Polen en luz ultravioleta auto-fluórese.

La evaluación de la transfección de polen a diferentes concentraciones de trypan blue y aniline blue en el primer experimento a voltajes de 0.0 y 4.0 kV/cm se observó que a concentraciones de 0.4%, 0.3%, 0.2% y 0.1%, se obtuvo una tinción de 100% lo cual no indica que el polen se tiñe por mayor voltaje, ya que el control también se tiñe. En el segundo experimento a voltajes de 0.0 y 4.0 kV/cm se observó que a concentraciones de 0.01% y 0.001%, no hubo tinción (0% tinción), y a concentración de 0.1% en ambos voltajes hay tinción pero en 0.0 kV/cm se observó 90% de tinción y en 4.0 kV/cm 100% de tinción. Estos resultados no nos

facilitó encontrar un voltaje adecuado de tinción porque se necesita encontrar una concentración de tinte que a 0.0 kV/cm la tinción sea 0% y a 4.0 kV/cm la tinción fue superior. Esto indicaría que a medida que sube el voltaje se abren más poros y hay mayor tinción.

En la evaluación de la transfección de polen a diferentes concentraciones de cotton blue en el primer experimento a voltajes de 0.0 y 4.0 kV/cm se observó que a concentraciones de 0.05%, 0.005% y 0.0005%, la tinción fue de 0% y a una concentración de 0.5% hubo tinción. Sin embargo, a un voltaje de 0.0 kV/cm hubo una tinción de polen de 21% y a un voltaje de 4.0 kV/cm una tinción de 41%. En el segundo experimento, a voltajes de 0.0 y 4.0 kV/cm se observó que en concentraciones de 0.25%, 0.2%, 0.1% y 0.05% la tinción de polen fue 0%, ningún grano se tornó de color azul. En el tercer experimento, a voltajes de 0.0 y 4.0 kV/cm se identificó que a concentraciones de 0.3%, 0.25% y 0.2% la tinción de polen era 0%, y a una concentración de 0.5% se observó tinción de polen en ambos voltajes a 0.0 kV/cm y 4.0 kV/cm tinciones de 20% y 27%, respectivamente.

En la segunda fase, en la segunda evaluación de transfección de polen a diferentes concentraciones del tinte trypan blue, uso un voltaje de 0.0 kV/cm y 4.0 kV/cm. Se observó que a concentraciones de 0.02% y 0.01% no hubo tinción de polen y a una concentración de polen de 0.04% hubo tinción de polen en ambos voltajes. A 0.04% de trypan blue, hubo diferencias en tinción entre los voltajes de 0.0 kV/cm y 4.0 kV/cm de aproximadamente 60 puntos porcentuales, lo cual nos ayudaría a definir un voltaje óptimo de electroporación mediante la evaluación de diferentes voltajes con la tinción de trypan blue y aceto-carmin (para viabilidad).

En la evaluación de transfección y viabilidad de polen del cultivar Morales, los datos de tinción de polen evaluados mediante un análisis de varianza, indican que no hubo interacción triple de medios de germinación, tintes y voltajes, ni interacciones dobles entre los medios de

germinación y tintes; tampoco entre los medios de germinación y voltajes. Sin embargo, si hubo interacción significativa entre los tintes y voltajes (Cuadro 12 y 13).

Cuadro 12. Análisis de varianza de los efectos de medio de germinación, tinte, y voltajes en la evaluación de transfección y viabilidad de polen de del cultivar Morales.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	1	783.225	783.225	8.18	0.0068
Medio germinación	1	2.017	2.017	0.02	0.8853
Tinte	1	5821.350	5821.350	60.82	<.0001
Medio germinación × Tinte	1	93.750	93.750	0.98	0.3284
Voltaje	4	3547.933	886.983	9.27	<.0001
Medio germinación × Voltaje	4	177.067	44.267	0.46	0.7628
Tinte × Voltaje	4	5351.400	1337.850	13.98	<.0001
Medio germinación × Tinte × Voltaje	4	360.667	90.167	0.94	0.4499
Error	39	3740.958	95.922		

Cuadro 13. Evaluación de transfección y viabilidad de polen del cultivar Morales.

Fuente de Variación	Tinción (polen viable) (%) ¹
Bloque	*
Medio germinación	n.s.
Tinte	
Trypan Blue	56.87 b
Aceto-carmine	76.57 a
Significancia	***
Voltaje (kV/cm)	***
Medio germinación × tinte	n.s.
Medio germinación × voltaje	n.s.
Tinte × voltaje	***
Medio germinación × tinte × voltaje	n.s.

¹ *=<0.01, ***=<0.0001, n.s.=No significativo

El análisis de datos de tinción de polen muestra una interacción entre tintes y voltajes, por lo cual se determina que a un voltaje aproximado de 4.5 kV/cm se obtiene la mayor cantidad de poros abiertos por la tinción con trypan blue para que ingrese el ADN en el polen y la más alta viabilidad por la tinción con aceto-carmin. Después de este punto, a medida que aumenta el voltaje, la viabilidad del polen disminuyó (Figura 18).

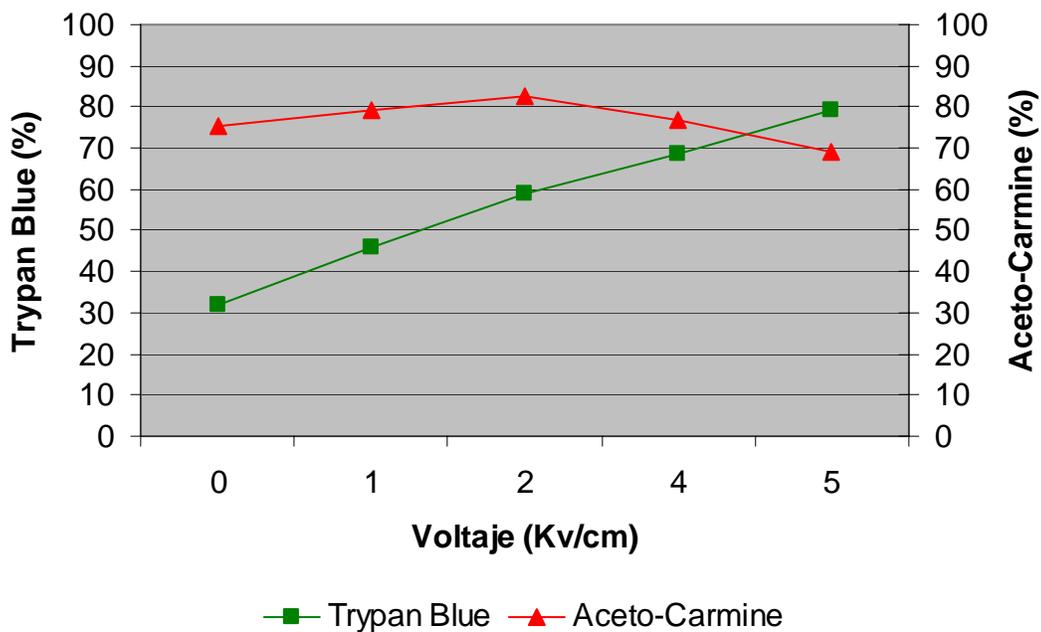


Figura 18. Efecto del voltaje de electroporación en la tinción y la viabilidad de polen en el cultivar Morales.

Transformación de polen

En la primera fase de evaluación estudio la transformación de frijol mediante electroporación de polen. De los cultivares Morales y Tío Canela 75, al momento de recolección de flores, se observó que había mayor cantidad de flores del cultivar Tío Canela 75 que del cultivar Morales. Sin embargo, se realizaron las polinizaciones de ambos cultivares según la cantidad de flores que habían disponibles por día. Inicialmente se observó muchas vainas transformantes, lo cual indicaba que el método podía funcionar en forma óptima. Sin embargo, al

pasar los días las vainas pequeñas verdes se desprendían de la planta, o se tornaban de color amarillo y se desprendían de la planta sin formar granos en la vaina. Otras vainas crecieron y formaron granos de semilla para ser evaluadas genéticamente y fenotípicamente (Figura 19).



Figura 19. Vainas obtenidas después de electroporación en invernadero. a) Vainas pequeñas desprendiéndose de la planta; y b) Vainas grandes con semilla.

De 1108 polinizaciones que se realizaron, 667 fueron de Morales y 441 fueron de Tío Canela 75. De los 1108 polinizaciones, solamente 94 vainas no se desprendieron de la planta y sobrevivieron hasta la madurez dando un total de 373 semillas, 80 vainas de Morales de las cuales se obtuvo 320 semillas y 14 vainas de Tío Canela 75 de las que se obtuvo 53 semillas (Cuadro 14).

Las 373 semillas fueron sembradas en potes en invernadero y evaluadas genotípicamente mediante PCR, de las cuales 12 vainas resultaron ser positivas a la presencia del gen *bar* (16 plantas transformantes), correspondientes a 9 vainas de Morales (12 plantas transformantes) y 3 vainas de Tío Canela 75 (4 plantas transformantes). Las 16 plantas transformantes positivas a la prueba de PCR fueron evaluadas mediante Southern blot y todas salieron negativas a la prueba, o sea ninguna tenía el gen *bar*. Además, las 373 semillas fueron evaluadas fenotípicamente con el

herbicida Finale® donde se observó susceptibilidad en todas las plantas (Cuadro 14). La eficiencia de transformación mediante una evaluación con herbicida y Southern blot fue de 0%, no se obtuvo ninguna planta transformada con el gen *bar*.

Cuadro 14. Resultados de transformación mediante electroporación de los cultivares Morales y Tío Canela 75.

Genotipo	Polinizaciones	Vainas fecundadas (semillas) (T0) ¹	Vainas positivas con PCR <i>bar</i> (semillas) (T0)	Plantas resistentes a herbicida (T1)	<i>Southern blot</i> indicando presencia del gen <i>bar</i> (T1)
Morales	667	80 (320)	9 (12)	0	0
Tío Canela 75	441	14 (53)	3 (4)	0	0
Total	1108	94 (373)	12 (16)	0	0

¹Generación de plantas probadas

La eficiencia en los diferentes procesos de transformación de los cultivares Morales y Tío Canela 75 variaron según el proceso. En la obtención de vainas transformantes después de transformación se obtuvo una eficiencia promedio de 15.16%, en el cultivar Morales se obtuvo una eficiencia (11.99%) mayor que Tío Canela 75 (3.17%).

Los síntomas de susceptibilidad de las plantas al herbicida glufosinato de amonio se observaron en pocas horas y muy claramente a las 24 horas después de la aplicación (HDA), mostrando síntomas de marchites en las hojas que se aplicó el herbicida (Figura 20.a). A las 48 HDA se observó unas marchites mas pronunciadas y en algunos casos las hojas se marchitaron completamente (Figura 20.b.). Al tercer día las hojas marchitas se desprendían de planta y se caían al piso y en algunas plantas se observó síntomas en otras partes de la planta.



Figura 20. Síntomas del herbicida Finale[®] en plantas transformantes a) 24 horas después de de aplicación (HDA); y b) 48 horas después de aplicación (HDA).

En la segunda fase, en la transformación de frijol mediante electroporación de polen del cultivar Morales, se observó que había flores con suficiente polen en la recolección de flores. Al inicio, se observaron muchas vainas, pero las vainas se caían rápidamente en los primeros días de crecimiento.

De 612 polinizaciones que se realizaron del cultivar Morales, 444 fueron con polen transformado, 84 con polen germinado y 84 con polen fresco. De las 612 polinizaciones se obtuvieron 95 vainas solamente, de las cuales 50 fueron vainas transformantes y 45 vainas testigos. De las 45 vainas testigo obtenidas, 44 provenían de polinizaciones con polen fresco y 1 con polen germinado. Las vainas testigo con polen fresco muestran una eficiencia de 52.4% y con polen germinado 1.2%. (Cuadro 15).

No se obtuvo semillas viables de ninguna de las polinizaciones debido a la abscisión de las vainas. Además, mediante la técnica de rescate de embriones por medios de cultivos *in vitro* se trató de rescatar embriones y obtener plantas transformantes. Sin embargo, ninguna vaina fue rescatada eficientemente (Cuadro 15).

Cuadro 15. Resultados de transformación mediante electroporación de polen del cultivar Morales.

Tipo de Polen	Polinizaciones	Vainas	Rescate Embriones	Eficiencia (%)	
				Rescate Vainas	Rescate Embriones
Transformado	444	50	0	12.4	0
Fresco (testigo)	84	44	0	52.4	0
Germinado (testigo)	84	1	0	1.2	0
Total	612	95	0	15.5	0

En el medio de cultivos de vainas se observó crecimiento de las vainas transformantes y testigos. Las vainas testigo crecieron longitudinalmente. Esto se observó visualmente, porque las marcas en los platos petri quedaban más pequeñas. Además, se observó que mostraban un color verde intenso y estaban más abultadas, lo cual indicaba que la semilla estaba creciendo dentro de la vaina (Figura 21.a y 21.b). Las vainas transformantes crecieron longitudinalmente, pero se observó poco abultamiento. (Figura 21.c).



Figura 21. Cultivo *in vitro* de vainas de frijol en medio de cultivo de vainas (PCM). a) Vainas testigo (2.5 cm); b) Vainas testigo (1.25 cm); y c) Vainas transformantes.

En el medio de germinación, los embriones testigo empezaron a tener hojas y raíces. Otros embriones no germinaron y los que germinaron eran muy pequeños, o mostraban una masa de células de color verde que no estaba diferenciada (Figura 22.a y 22.b). En los embriones transformantes no se observaron hojas, ni raíces (Figura 22.c). Sólo se observó un embrión con hoja y raíz pequeña, la cual no duró mucho tiempo viva después de sacarla del medio de germinación.

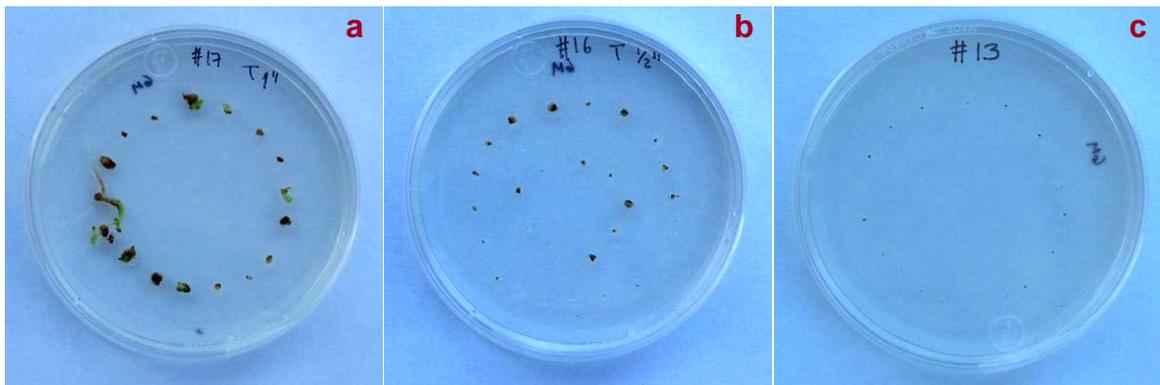


Figura 22. Cultivo *in vitro* de embriones de frijol en medio de germinación (GM). a) Embriones de vainas testigo (2.5 cm); b) Embriones de vainas testigo (1.25 cm); y c) Embriones de vainas transformantes.

En el rescate de embriones de vainas transformantes y controles se obtuvo 4 plántulas muy pequeñas con raíz y hojas. De las 4 plántulas, tres plántulas eran testigos y una transformante. Sin embargo, no se pudo obtener plantas completas en ninguno de los casos. Las plantas murieron a los pocos días de haber sido transplantadas en potes.

DISCUSION

GERMINACIÓN DE POLEN

Los resultados de germinación de polen del cultivar Tío Canela 75 de 46 y 67% en los medios A y B, son inferiores a los encontrados por Gurusamy (2005, comunicación personal) con 75% de germinación. Sin embargo, son superiores a estudios realizados por Schreiber y Dresselhaus (2003) con 50-60% de germinación.

El cultivar Tío Canela 75 obtuvo la mayor germinación de polen de los cinco genotipos evaluados. Esto pudo ser porque el cultivar Tío Canela 75 es tolerante al calor, y como los genotipos crecieron en invernadero, las temperaturas fueron altas y Tío Canela 75 se adaptó mejor a las condiciones de alta temperatura por lo cual el polen pudo tener un mejor desarrollo.

La concentración de sucrosa adecuada de 10% concordó a lo afirmado por England (2004) (comunicación personal) en arvejas y lo reportado por Schreiber y Dresselhaus (2003) en frijol, pero no con lo reportado por Gurusamy (2005, comunicación personal) con 40% de sucrosa y tampoco con estudios realizados por James *et al.* (1987) en gandul. Variación en concentración de calcio no tuvo efecto significativo en la germinación de polen.

Jayaprakash y Sarla (2001) indicaron que el polen de leguminosas es difícil para germinar en medio artificial. Lo cual difiere a resultados obtenidos por Arndt y Gepts (1991), Farlow *et al.* (1979) y Gurusamy (2005, comunicación personal). Aunque con 10% sucrosa se obtuvo la germinación más alta, 36%, este porcentaje es muy bajo en *Phaseolus* basado en otros estudios, y puede ser por la composición del medio de germinación que puede afectar el metabolismo del polen.

Los compuestos químicos como PEG, hormonas y aminoácidos en los medios de germinación podrían incrementar la germinación de polen y deben ser considerados para estudios

posteriores. Según Taylor y Hepler (1997) bajo condiciones de un osmótico como PEG, la germinación se incrementa comparando con sucrosa. Říhová, *et al.* (1996) encontraron en papa una germinación de polen superior con 20% PEG 1000 y 2% sucrosa. Además señalan que el uso de sucrosa, lactosa y PEG en el medio mostró diferencias en la germinación de polen en el orden de $\text{PEG 1000} \geq \text{lactosa} \geq \text{sucrosa}$. Read, *et al.* (1993) afirman que en estudios realizados con tabaco la germinación incrementa a 80-90% en un medio con 10-15% PEG-6000 y previene la explosión de granos y tubos de polen comparado con sucrosa. Subbaiah (1984) afirma que el PEG es un componente inerte que no puede entrar a las células.

La germinación de polen puede presentar porcentajes reducidos debido a varios factores como época de siembra, humedad relativa baja y temperatura altas en el invernadero, hora tardías de recolección de flores, humedad relativa baja y temperatura altas y/o bajas en la incubación del polen y periodo de incubación. En la primera fase se observaron porcentajes bajos de germinación, esto pudo deberse a temperaturas altas en invernadero en algunas horas del día como el medio día donde la temperatura sube mucho y puede afectar el desarrollo del polen.

En el estudio se realizaron experimentos probando temperaturas bajas (4°C) y altas (37°C) en las cuales se observó germinaciones menores al 10%, estos no se mostraron en los resultados. La temperatura del medio podría afectar la germinación de polen según estudios realizados en frijol (Farlow *et al.*, 1979) y maní (Kakani *et al.*, 2002). Esto sugiere que para estudios posteriores se debe evaluar el efecto de diferentes temperaturas del medio en la germinación de polen.

La diferencia de germinación entre los medios de germinación C y D no fue la misma en diferentes días. El medio de germinación D resultó en un porcentaje de germinación de polen

más alto que el medio C en los diferentes días. En este estudio el medio de germinación D sería el más adecuado para usarlo en la transformación de polen germinado.

El estudio realizado indica que se debe recolectar suficientes flores para obtener una cantidad de polen que permita evaluar el porcentaje de germinación de polen en los diferentes medios, ya que con pocas flores se dificultaría su evaluación. En el estudio se observó que las flores de frijol no tienen mucha cantidad de polen como otros cultivos. En la primera y segunda fase de la investigación se usaron 2 y 10 flores/observación, respectivamente. En la segunda fase se incrementaron la cantidad de flores, ya que con 2 flores se llegaba a 100 granos de polen exactamente o quedaban algunos granos demás. England (comunicación personal, 2004) indicó que 10 μg de polen de arvejas es suficiente para evaluar su germinación. Sin embargo, el polen de frijol no se puede pesar porque su recolección se dificulta por la cantidad y tamaño.

Cien granos de polen son suficientes para contar en evaluaciones de germinación de polen debido a que no se encontraron diferencias contando el polen en diferentes lugares del portaobjetos de izquierda a derecha y de arriba abajo. La cantidad de repeticiones, también, debe ser mayor debido a que en la primera fase con cuatro repeticiones por tratamiento se observó un coeficiente de variación alto y en la segunda fase con diez repeticiones se observó que el coeficiente de variación disminuyó.

TRANSFECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE FRIJOL MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE POLEN

La electroporación es una técnica muy eficiente para introducir ADN en diferentes tipos de tejido. En últimos tiempos, la electroporación de polen ha adquirido importancia debido a que es una técnica fácil y reproducible. En el presente estudio se evaluó la transformación de

polen de frijol ya que según estudios realizados por Saunders y Matthews (1995) en tabaco y por England (2003) en arbejas esta técnica podría ser más eficiente que otras para el cultivo de frijol.

En la evaluación de los cultivares de frijol Morales y Tío Canela 75 se presentaron algunas dificultades al momento de la transformación, debido a que la cantidad de polen en las flores no era muy alto, eso se determinó mediante observación visual. En las flores grandes se observó que la cantidad de polen era mayor, porque la punta del estigma estaba cargada de polen y tenía un color más oscuro. En flores pequeñas la cantidad de polen era menor, la punta del estigma no era oscura y no se observaba mucho polen.

La electroporación puede ser afectada por diferentes factores como: voltaje y cantidad de polen. La cantidad de polen de diferentes cultivos como tabaco permite pesar el polen. Sin embargo, el polen de frijol presenta dificultades para pesar, porque el polen es pequeño y en pocas cantidades.

Las polinizaciones deben realizarse en flores cerradas donde no ha ocurrido la polinización, ni la fecundación, para asegurar que al momento de polinizar la flor, éste sea polinizada con polen electroporado. Las polinizaciones deben realizarse temprano en la mañana, aproximadamente 7:30AM, cuando las temperaturas no son altas (25°C), debido a que temperaturas altas pueden causar estrés en las plantas y posteriormente el aborto de flores o vainas. INFOAGRO (2006) indica que temperaturas superiores a 30°C provoca en plantas de frijol no tolerante a las altas temperaturas deformaciones en las vainas y produce el aborto de flores.

Los métodos de polinización realizados en el experimento mostraron algunos problemas al momento de colocar el polen sobre la punta del estigma. El método de papel parecía ser adecuado ya que el polen estaba húmedo y podía adherirse al estigma, sin embargo, si las

temperaturas eran altas o si el papel no era colocado adecuadamente, el papel caía al piso. El método de agarosa presentaba dificultades para que el polen esté en contacto con el polen. En el método de gota, se observó que si se colocaba cantidades pequeñas de solución de polen, menores a 2 μL , el polen hacia contacto con la punta del estigma pero con cantidades superiores a 4 μL , la gota se caía o desviaba por el estigma sin quedar en la punta. De esta forma es recomendable que otros métodos de polinización sean evaluados posteriormente, como: polinizar pistilos cortados y enmasculación.

En el rescate de embriones, no se obtuvo plantas completas debido a diferentes factores como temperatura, humedad relativa y tipo de luz. La temperatura y humedad relativa no fueron controladas en el experimento ya que el crecimiento de vainas y embriones no se realizaron en cámaras de cultivo de tejido, sino en cámaras de flujo laminar en laboratorio. El tipo de luz para crecer vainas y embriones no fue el requerido, ya que la cámara de flujo laminar presenta otro tipo de luz. Otro factor que pudo influenciar es el tamaño de las vainas (~1.0-2.0 cm) y embriones transformantes eran pequeño.

LITERATURA CITADA

- Abdul-Baki, A.A., Saunders, J.A., Matthews, B.F. and Pittarelli, G.M. 1990. DNA uptake during electroporation of germinating pollen grains. *Plant Sci.* 70:181-190.
- Aguilar, E. 2003. Frijol. p. 65-79 *In: Informe de Coyuntura. Enero-Junio 2003.* San Salvador; El Salvador; Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Anderson, W.F. 1992. Human gene therapy. *Science.* 256:808-813.
- Aragão, F.J.L. 2002. Development of transgenic methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. p. 35-42 *In: JIRCAS Working Report.* Brasília, Brazil.
- Aragão, F.J.L., Vianna, G.R., Albino, M.M.C. and Rech, E.L. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide Glufosinate Ammonium. *Crop. Sci.* 42:1298-1302.
- Arndt, G. and Gepts, P. 1991. Germination of bean pollen. *Ann. Rep. of the Bean Improv. Coop.* 34:76-77.
- Atkins, C.A. and Smith, P.M.C. 1997. Genetic transformation and regeneration of legumes. Eds. Legocki, A., Bothe, H., Pühler, A.. Berlin, Alemania, Springer-Verlag. p. 283-304.
- Brewbacker, J.L. and Kwack, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50:859-865.
- Beaver, J.S. and Miklas P.N. 1999. Registration of 'Morales' small white bean. *Crop Sci.* 39:1257.
- Carrasco, J.F. 1999. Plantas transgénicas. *Butlletí del Centre d'Estudis de la Natura del Barcelonès Nord.* Any XV, Vol.IV nº 3, pp. 299-310. Santa Coloma de Gramenet (Barcelona).
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1992. Catálogo de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Ed. Por Hidalgo, R.H., Toro, O. Cali, Colombia, CIAT. 450 p.
- Christou, O.P., Ford, T.L. and Kofro, M. 1991. Production of transgenic rice (*Oriza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties zygotic embryos. *Nat. Biotechnology.* 9:957-962.
- Cobb, A. 1992. The transfer of herbicide to crops. *In: Herbicides and Plants Physiology.* London, New York: Chapman & Hall. P. 145-151.
- D'Halluin, K., Bonne, E., Bossut, M., De Beuckeleer, M. and Leemans, J. 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. *The Plant Cell* 4:1495-1505.
- Dale, P.J. 1995. R&D regulation and field trialing of transgenic crops. *Trends in Biotechnology* 13:398-403.

- Davidson, D. and Sittman, D. 1995. Recombinant DNA. *In: Biochemistry*. 4th Ed. Harwal Publishing. p. 231-51.
- De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N.R., Thompsom, C., van Monagu, M. and Leeman, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6:2513-2518.
- De la Peña, A., Lörz, H. and Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* 235:274-276.
- Dekeyser, R.A., Claes, B., De Rycke, R.M.U., Habets, M.E., Van Montagu, M.C. and Caplan, A.B. 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *The Plant Cell* 2:591-602.
- Díaz, M.L., Zappacosta, D.C., Franzone, P.M y Ríos, R.D. 2004. Transformación genética. p. 109-123 *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Ed. por Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina, INTA.
- Diego-García, E., Avendaño, O., Hernández, G. and Lara, M. 2001. Genetic transformation of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). American Society of Plant Biologists. Abstracts 304. Poster.
- Dillen, W., Engler, G., Montagu, M.V. and Angenon, G. 1995. Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). *Plant Cell Report*. 15:119-124.
- England, R. 2003. Development of transgenic resistance to virus diseases in *Pisum sativum*. University of Idaho, United States, dissertation. 251 p.
- Ennis, W.B. Jr. 1976. World Soybean Research. Interstate Printers and Publisher Inc., Danville, Illinois.
- Espin-Villacres, V.H., Andrade-Vera, H.K. y Espin-Mayorga, V.H. 2001. Terapia Génica en Medicina. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 58(11):808-818.
- Farlow, P.J., Byth, D.E. and Kruger, N.S. 1979. Effect of temperature on seed set and *in vitro* pollen germination in French beans (*Phaseolus vulgaris*). *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 19:725-731.
- Fromm, M., Taylor, L.P and Walbot, V. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5824-5828.
- Gao, X. and Huang, L. 1994. Cationic liposome-mediated transfection gene transfer. *Gene Ther.* 2: 710-722.

- Geerts, P., Toussaint, A., Mergeai, G. and Baudoin, J.P. 2001. Culture of very young *Phaseolus vulgaris* L. pods and plantlet regeneration. *Acta Hort.* 560:411-415.
- Genga, A.M., Allavena, A., Ceriotti, A. and Bollini, R. 1990. Towards genetic transformation of bean by *Agrobacterium tumefaciens*. p. 527-536. *In: I International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding.* Acta Horticulturae 280. Milan, Italy.
- Genga, A.M., Allavena, A., Ceriotti, A. and Bollini, R. 1991. Genetic transformation in *Phaseolus* species by high-velocity microprojectiles. p. 309-313. *In: In Vitro Culture XXIII IHC.* Acta Horticulturae 300. Milan, Italy.
- Gordom-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mngano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brian, J.V., Chambers, S.A., Adams Jr., W.R., Willets, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P. and Lemaux, P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2:603-618.
- Gwata, E.T., Wofford, D.S., Pfahler, P.L. and Boote, K.J. 2003. Pollen morphology and *in vitro* germination characteristics of nodulating and non-nodulating soybean (*Glycine max* L.) genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 106:837-839.
- Harvard Apparatus. 1999. ECM 630 Instruction Manual. 73 p.
- Hodson de Jaramillo, E. 2005. Transformación genética de plantas para resistencia a virus. *Rev. Acad. Coloma. Cienc.* 29(110): 5-24.
- INFOAGRO. 2006. Judías verdes, Judía verde, Habichuelas verdes, Judías de enrame, Frijol, Poroto. <<http://www.infojardin.com/fichas/hortalizas-verduras/judias-verdes-habichuelas-verdes-judias-enrame-frijo-poroto.htm>>
- James, C. 2001. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2001. ISAAA Briefs No. 24: Preview. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, D., Ariyanayagam, R.P. and Duncan, E.J. 1987. Comparative studies of *in vitro* germination of pollen of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and *Atylosia platycarpa* Benth. *Trop. Agric. (Trinidad).* 64(4):343-346.
- Jayaprakash, P. and Sarla, N. 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Pollen *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 52:851-855.
- Kakani, V.G., Prasad, P.V.V., Craufurd, P.Q. and Wheeler, T.R. 2002. Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant, Cell and Environment* 25:1651-1661.
- Labrada, R. y Parker, C. 1996. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. *In: Manejo de Malezas para Países en Desarrollo.* (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120). Rome, Italy.

- Laursen, C.M., Krzyzek, R.A., Flick, C.E. and Anderson, P.C. 1994. Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol. Biol.* 24:51-61.
- Luza, J.G., Polito, V.S. and Weinbaum, S.A. 1987. Staminate bloom date and temperature responses of pollen germination and tube growth in two walnut (*Juglans*) species. *American Journal of Botany* 74:1898-1903.
- Lyman O.R. and Longnecker, M. 2001. An introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 5th Ed. Duxbury, CA, USA. 1152 p.
- Matthews, B.F., Abdul-Baki, A.A. and Saunders, J.A. Expression of a foreign gene in electroporated pollen grains of tobacco. *Sex. Plant Reprod.* (1990) 3:147-151.
- Miklas, P.N., Rosas, J.C., Beaver, J.S., Telek, L. and Freytag, G.F. 1994. Field performance of selected tepary bean germplasm in the tropics. *Crop Sci.* 34:1639-1644.
- Morales, F.J. 1994. El mosaico dorado del frijol: Avances de investigación. Trad. por Francisco J. Morales. Cali, Colombia, PROFIJOL-COSUDE-CIAT. 210 p.
- Morcillo, G. 2004. Plantas transgénicas. *In: Ingeniería Genética. Tema 8.* UNED. Madrid, España. 49 p.
- Mullner, H., Eches, P. and Donn, G. 1993. Engineering crop resistance to the naturally occurring glutamine synthetase inhibitor phosphinothricin in pest control with enhanced environmental safety. Eds. Duke, S.O., Menn, J.J., Plimmer, J.R.. Washington D.C., American Chemical Society. Chap. 3:38-47.
- Muñiz de Pádua, V.L., Ferreira, R.P., Meneses, L., Uchôa, N., Margis-Pinheiro, M. and Mansur, E. 2001. Transformation of Brazilian elite *Indica*-type rice (*Oryza sativa* L.) by electroporation of shoot apex explants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:55-64.
- Nuñez, G.S., Vasquez, G.M.J. y Yoshii, O.K. 1983. Proyecto: Formación de variedades de frijol con alto potencial de rendimiento tolerancia o resistencia al mosaico dorado, mancha angular y roya. 63 p. Documento interno INIA.
- PAN International. 2002. Glufosinate ammonium fact sheet. <<http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/glufosin.htm>>
- Padgett, S.R., Kolacz, X., Delannay, D.B., Re, D.B., LaValle, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. and Kishore, G.M. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35:1451-1461.
- Parker, C. y Fryer, J. 1975. Weed control problems causing major reduction in world food supplies. *FAO Plant Protection Bulletin* 23 (3/4): 83-95.

Phillips, G.C., and Collins, G.B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.* 19:59-64.

Prasanna, G.L. and Panda, T. 1997. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. p. 261-264. *In: Bioprocess Engineering.* Springer-Verlag. Madras, India.

QIAGEN[®]. 2000. DNeasy[®] Plant Mini and DNeasy[®] Plant Maxi Kit Handbook. For DNA isolation from plant tissue. California, USA. 26 p.

QIAGEN[®]. 2002. DNeasy[®] 96 Plant Handbook. For high-throughput DNA isolation from plant tissue. California, USA. 42 p.

QIAGEN[®]. 2003. QIAGEN[®] Plasmid Purification Handbook. For purification of ultrapure plasmid DNA. California, USA. 87 p.

QIAGEN[®]. 2004. QIAprep[®] Miniprep Handbook. For purification of plasmid DNA. California, USA. 51 p.

Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. Alternative methods of plant transformation - A short Review. *Cellular & Molecular Biology Letters.* 7:849-858.

Říhová, L., Hrabětová, E. and Tupý, J. 1996. Optimization of conditions for *in vitro* pollen germination and tube growth in potatoes. *Int. J. Plant Sci.* 157(5):561-566.

Read, S.M., Clarke, A.E. and Basic, A. 1993. Stimulation of growth of cultured *Nicotiana Tabacum* W38 pollen tubes by poly (ethylene glycol) and Cu [sub(II)] salts. *Protoplasma* 177:1-14.

Rodríguez, R. 1996. Problemas, logros y posibilidades para el mejoramiento del frijol negro. p. 294-306. *In: Taller de mejoramiento de frijol para el siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.* Ed. por Singh, S.P. y Voysest, O. Cali, Colombia, CIAT.

Rodríguez, T.E. 1987. Control de malezas en siembras de maíz. *Rev. FONAIAP Divulga.* Maracay, Venezuela. p. 5-7.

Rosas, J.C. 1998. El cultivo de frijol en América tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academia Press. 52 p.

Rosas, J.C. 2002. Principios de Genética y Mejoramiento de Plantas. Notas para el Curso de Genética y Fitomejoramiento. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Ed. Litografía Comayagüela, Tegucigalpa, Honduras. 74 p.

Rosas, J.C., Varela, O.I. and Beaver J.S. 1997. Registration of 'Tio Canela-75' small red bean (Race Mesoamerica). *Crop. Sci.* 37:1391.

Sabbatini, M.R., Irigoyen, J.H. y Vernavá, M.N. 2004. Estrategias para el manejo integrado de malezas: problemática, resistencia a herbicidas y aportes de la biotecnología. p. 343-353 *In*: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed. por Echenique, V., Rubinstein, C., y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina, INTA.

SAG (Secretaria de Agricultura y Ganadería de la República de Honduras). 1998. El cultivo de frijol: Guía para uso de empresas privadas, consultores individuales y productores. Ed. por Rodríguez, F. y Gómez, A.C. Honduras, ZAS. 39 p.

San Segundo, B. 2003. Obtención de plantas transgénicas de arroz resistentes a las plagas y enfermedades. Barcelona, España. <<http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=206>>

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, USA.

SAS Institute. 1990. SAS/STAT® User's Guide (Release 6.12). SAS inst. Inc., Cary, N.C.

Saunders, J.A., Ho Lin, C., Huei Hou, B., Cheng, J., Tsengwa, N., Jhu Lin, J., Smith, C.R., McIntosh, M.S. and Van Wert, S. 1995. Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. *Molecular Biotechnology* 3:181-190.

Saunders, J.A. and Matthews, B.F. 1995. Pollen electrotransformation in tobacco. p. 81-88 *In*: Plant Cell Electroporation And Electrofusion Protocols. Ed. by J.A. Nockoloff Humana Press Inc., Totowa, N.J.

Schreiber, D.N. and Dresselhaus, T. 2003. *In vitro* pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:31-41.

Schryer, P.A., Lu, Q., Vandenberg, A. and Bett, K.E. 2005. Rapid regeneration of *Phaseolus angustissimus* and *P. vulgaris* from very young zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83:67-74.

Sikes, M., O'Malley, B.W, Finegold, M.J. and Ledley, F.D. 1994. *In vivo* gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum. Gene. Ther.* 5:827-33.

Singh, S.P. 1996. Progreso, problemas y el futuro del mejoramiento de frijoles mesoamericanos y la mejora genética integrada. p. 334-350 *In*: Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. Ed. por Singh, S.P. y Voysest, O. Cali, Colombia, CIAT.

Sorokin, A.P., Ke, X.Y., Chen, D.F. and Elliot, M.C. 2000. Production of fertile wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci.* 156:227-233.

Subbaiah, C.C. 1984. A polyethylene glycol based medium for *in vitro* germination of cashew pollen. *Can. J. Bot.* 62:2473-2475.

Taylor, L. and Hepler, P. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:461-491.

Tecnociencia. 2003. Plantas transgénicas.

<<http://www.tecnociencia.es/especiales/transgenicos/4.htm>>

Uauy, V.C. 2002. Tendencias y estadísticas de los cultivos transgénicos en el mundo. Pontificia Universidad Católica de Chile.

<http://www.puc.cl/agronomia/c_extension/Revista/Ediciones/15/informe.pdf>

Universidad Nacional del Nordeste. 2006. Morfología de plantas vasculares.

<<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema22/tema22-9polen.htm>>

Van Wert, S.L. and Saunders, J.A. 1992. Electroporation and electrofusion of plants. *Plant Physiol.* 99:365-367.

Vasil, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E. and Vasil, I.K. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. *Nat. Biotechnology* 10:667-674.

Weaver, J.C. 1993. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem.* 51:426-435.

Welin, B. y Vidal, S. 2001. Los cultivos transgénicos. *Escenario 2 Revista Análisis Político.*

<http://www.escenario2.org.uy/numero4/Welin_vidal.html>

Wu, F.S. and Feng, T.Y. 1999. Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolyzed cells. *Plant Cell Report* 18:381-386.

Zaghmout, O.M.F. and Trolinder, N. 1993. Simple and efficient method for directly electroporating plasmid DNA into wheat callus cells. *Nucl. Acid Res.* 21:1048.