

Factores que influyen en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L.

Amanda Martirena-Ramírez*, Novisel Veitía. *Autora para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: amanda@ibp.co.cu

RESUMEN

El género *Phaseolus*, así como otras leguminosas, se ha mostrado recalcitrante a la regeneración de plantas *in vitro* y a la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*. La transferencia de genes en esta especie es limitada debido a su condición genotipo dependiente, además de resultar un proceso de baja eficiencia y poco reproducible. Existen evidencias que varios factores influyen en la integración del ADN y la transformación estable de plantas. Esta revisión tuvo como objetivo analizar la influencia de diferentes factores en la eficiencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. tales como: cepa bacteriana, plasmidio, temperatura, condiciones de iluminación, tiempo de cocultivo, concentración bacteriana y marcador de selección.

Palabras clave: ADN, frijol común, leguminosas, plantas transgénicas.

Factors affecting genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* in *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT

Phaseolus genus, as well as other legumes, has proved recalcitrant plant regeneration *in vitro* and mainly to genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Genetic transformation in this species is limited because of their genotype dependent, as well as being a process of low efficiency and poor reproducibility. There are evidences that several factors influence DNA integration and stable transformation of plants. This review aims to analyze the influence of different factors on the efficiency of genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* in *Phaseolus* such as: bacterial strain, plasmid, temperature, lighting conditions, coculture time, bacterial concentration and selection marker.

Keywords: common beans, DNA, legumes, transgenic plants.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA VÍA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EFICIENCIA DE LA TRANSFORMACIÓN

Cepa de *Agrobacterium* y plasmidio

Temperatura

Condiciones de iluminación

Concentración bacteriana y tiempo de cocultivo

Genes marcadores de selección

CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más comercializados y al que se dedica una gran parte del área productiva del planeta. El elevado contenido de proteínas y lípidos de su grano lo convierten en uno de los cultivos de mayor interés para la alimentación humana (Amugune *et al.*, 2011).

En Cuba, el frijol ha sido cultivado tradicionalmente y se encuentra entre los cultivos económicos más importantes, no solamente por su alto valor nutricional, sino por el hábito de consumo por la población. Sin embargo, su producción se ha visto afectada por factores bióticos y abióticos. Los primeros incluyen: plagas, enfermedades y malezas y los segundos: calor, sequía, suelos ácidos, baja

fertilidad del suelo y salinidad (Velcheva *et al.*, 2005). Por tales razones, es de gran interés el desarrollo de nuevos cultivares con características agronómicas mejoradas.

El mejoramiento genético tradicional se basa en la variabilidad genética natural y la reproducción sexual. La variabilidad en *Phaseolus vulgaris* se ve restringida debido al ligamiento genético y a las barreras de hibridación sexual. La transformación genética ha logrado eliminar la incompatibilidad sexual existente entre los individuos, permitiendo la transferencia de genes entre organismos genéticamente distantes (Kwapata *et al.*, 2010). Sin embargo, la transformación genética en el frijol común ha estado limitada por la inexistencia de protocolos eficientes y reproducibles (Angenon y Thu, 2011).

Los elementos básicos necesarios para la aplicación con éxito de métodos de transferencia de genes en el mejoramiento genético de los cultivos son cuatro: 1) establecimiento de un sistema de cultivo de tejidos eficiente y reproducible para regenerar plantas completas y fértiles, 2) contar con vectores apropiados, tanto para el clonaje del gen de interés y el vector para su transferencia al tejido a transformar, 3) un sistema de transferencia de genes y por último, 4) herramientas de análisis para detectar la presencia del transgén (Arellano *et al.*, 2008; Angenon y Thu, 2011).

La transformación genética utiliza básicamente dos estrategias para realizar la transferencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) a las plantas: la primera, que emplea métodos directos como biobalística (bombardeo de partículas), tratamiento con polietilenglicol (PEG), microinyección, electroporación, utilización de láser y abrasión con fibras y una segunda que utiliza métodos indirectos mediante vectores biológicos (Hansen y Wright, 1999).

Varios autores tales como: Aragao *et al.* (2002), Rech *et al.* (2008) y Kawapata *et al.* (2012) describieron la transformación genética mediante el bombardeo de partículas en *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, este método tiene como desventaja un patrón de integración complejo del transgén, de este modo se incrementa la

probabilidad de su silenciamiento (Yang *et al.*, 2005). La transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, resulta un método de mayores ventajas, ya que permite la integración de un segmento de ADN preciso, además de introducir pocas copias en el genoma de la planta (Gelvin, 2000).

Independientemente de la información disponible sobre la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris*, la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* presenta baja eficiencia, debido a que los protocolos existentes se han desarrollado en cultivares específicos, y a la escasa estandarización de parámetros para la transferencia de ADN tales como: genotipo, cepa bacteriana, plasmidio, fotoperíodo, concentración de la bacteria y el agente selectivo. Sobre la base de lo anteriormente descrito, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar la influencia de diferentes factores en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris*.

TRANSFORMACION GENETICA VÍA AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

La transformación genética consiste en incorporar y expresar de manera estable, genes foráneos en el genoma de la planta, pero en este caso por métodos distintos a la fusión de gametos u otras células sin alterar su genotipo y fenotipo (Gelvin *et al.*, 2003a). Un factor crítico en la transformación genética es la selección de las células transformadas, ya que los genes introducidos serán incorporados solo en una fracción de las células expuestas a la transformación. La selección se realiza con la ayuda de genes marcadores de selección que confieren resistencia a agentes químicos, tales como antibióticos, herbicidas, análogos de aminoácidos o azúcares (Opabode, 2006).

En los métodos biológicos o de transferencia indirecta de ADN, se utilizan cepas de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* como vectores, para aprovechar la capacidad natural de estas bacterias para introducir en las células vegetales infectadas un segmento de cadena simple de su propio ADN (Cervera *et al.*, 1998). Este es uno de los ejemplos verificados de transferencia natural de ADN

entre reinos (Ditt *et al.*, 2001) y además constituye un ejemplo de flujo génico horizontal (Pelczar *et al.*, 2004). El ADN es transferido, heredado y expresado de manera estable en las células receptoras (Gelvin *et al.*, 2003b).

A. tumefaciens, es una bacteria fitopatógena Gram negativa, que habita en el suelo y que es causante de la enfermedad denominada 'agalla de corona', que afecta muchas plantas dicotiledóneas (Li *et al.*, 2002).

La naturaleza biológica única de la relación de *Agrobacterium* con su hospedero, y su importancia en el desarrollo de plantas transgénicas, favorece el interés por entender los mecanismos mediante los cuales estas bacterias transfieren el ADN a las células eucarióticas (Chen *et al.*, 2002).

El plásmido Ti tiene una región (*vir*) donde se encuentran varios genes (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* y *virH*) que codifican proteínas involucradas en el proceso de transferencia del ADN-T desde la bacteria hasta el núcleo de la célula vegetal (Tzfira y Citovski, 2000).

Algunos trabajos destacan el papel de los genes *vir* en funciones relacionadas con el proceso de integración y expresión del ADN-T en el genoma de la célula vegetal (Tzfira *et al.*, 2003). Otros autores han descrito el papel que juegan los sitios específicos de inserción de los transgenes en el genoma de las plantas (Tzfira *et al.*, 2004) o la participación de los genes de la propia planta en el proceso de transformación genética con *Agrobacterium* (Li *et al.*, 2005).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Cepa de *Agrobacterium* y plasmidio

La fase inicial del desarrollo de un protocolo de transformación consiste en la búsqueda de las cepas de *Agrobacterium* compatibles y el incremento de la eficiencia de transformación (Jefferson *et al.*, 1987). La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada en la transferencia de ADN puede influir significativamente en la eficiencia de la transformación genética. La virulencia, así

como las diferencias estructurales y organizacionales del ADN-T y los genes *vir* pueden ser distintos entre una cepa y otra lo que afectaría su capacidad de infección (Grant *et al.*, 2003).

En varias investigaciones, el frijol común se ha encontrado que es susceptible a diferentes cepas de *Agrobacterium*. En este sentido, Zhang *et al.* (1997) describieron una interacción no significativa entre las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (A2760 y la EHA105) y 11 genotipos de frijol común. Sin embargo, independientemente del genotipo, la cepa A2760 produjo mayor expresión GUS en los cotiledones inoculados.

Por su parte, Guidolin (2003), evaluaron cuatro cepas de *A. tumefaciens* (GV3101, EHA 105, LBA4404, GV2260) todas con el plasmidio pBECKS20004 y la cepa LBA4404 con el plasmidio pTOK233. Los callos del cultivar de *Phaseolus vulgaris* 'Xan 159' inoculados con la cepa LBA4404 con el plasmidio pTOK233 tuvieron una mayor expresión GUS que con las restantes combinaciones evaluadas. Este autor refirió la importancia de la combinación de la cepa con el plasmidio binario a ser utilizado y relacionó esta respuesta con la presencia de genes de virulencia (*virB*, *virG*; *virC*) y con la expresión constitutiva del plasmidio binario derivado del plasmidio Ti 'supervirulento' pTiBo542 (Jin *et al.*, 1987). En correspondencia con estos resultados Amugune *et al.* (2011) al evaluar las cepas de *A. tumefaciens* (LBA4404 y EHA 105), en la transformación genética de *P. vulgaris*, solamente encontraron expresión GUS con la cepa LBA4404. Estos autores refirieron que quizás la cepa EHA 105 no sería factible en la transformación genética de esta especie. Por el contrario, Mukeshimana *et al.* (2013) emplearon las cepas GV3101, LBA4404 y EHA105 lograron una mayor expresión GUS con la cepa GV3101, seguido de EHA105 y por último LBA4404. Estos autores atribuyeron estos resultados a la susceptibilidad del frijol común al tipo de nopalina presente en esta cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. De igual manera, Collado (2013) alcanzó los mayores valores de área del callo cubierta por la tinción con la cepa EHA 105 en *P. vulgaris* cultivar 'CIAP7247F'.

Las variaciones en la respuesta en *P. vulgaris* ante diferentes cepas de *A. tumefaciens* y

plasmidios, se ha descrito por varios autores (Mc Clean *et al.*, 2002; Mukeshimana *et al.*, 2013). De forma general, se asocia dicha respuesta a la probabilidad de aparición de diferentes números de genes de resistencia en el hospedero susceptible. Es por ello, que se requiere al iniciar los estudios de transformación genética evaluar varias cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y plasmidios para lograr la integración de los genes de interés en el genoma de la planta. No obstante, estos no son los únicos factores que inciden en la eficiencia del proceso.

Temperatura

El efecto de la temperatura sobre la inserción del ADN-T fue primeramente descrito en especies de plantas dicotiledóneas. Sin embargo, en *Phaseolus vulgaris* no se ha evaluado de manera sistemática. Los trabajos realizados en transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en esta especie (Liu *et al.*, 2005; Amugune *et al.*, 2011; Mukeshimana *et al.*, 2013) utilizaron temperaturas entre 25 y 28°C, respectivamente. Este rango de temperaturas se basa en los estudios realizados por Dillen *et al.* (1997) y De Clercq *et al.* (2002) los cuales evaluaron el efecto de este factor en la transformación genética de *Phaseolus acutifolius*. Dichos autores plantearon que la movilización del plasmidio mediado por los genes *vir* en el mecanismo de transferencia del ADN-T a la planta, es altamente dependiente de la temperatura y se ha descrito para los genes *vir B-vir D4* que intervienen en el aparato de transferencia. Además, sugirieron un rango de temperatura de 20 a 25°C ya que fue donde se produjo una mayor expresión de los genes *vir D2* y *vir G* y la inducción del gen *vir B* y este coincidió con el óptimo para la expresión del gen *gus* y la formación del tumor. Según lo anteriormente expresado se debe considerar el factor temperatura en los ensayos de transformación genética, ya que permite incrementar la eficiencia de transformación.

Condiciones de iluminación

Las condiciones de iluminación durante el cocultivo varían considerablemente en diferentes procesos de transformación. Por ejemplo, en *Phaseolus acutifolius* A. Gray,

Zambre *et al.* (2003) plantearon que el efecto promotor de la luz en la transferencia de ADN probablemente no es mediado por un aumento de los inductores de los genes *vir*. Dichos autores señalaron tres razones en relación con esto: los explantes fueron dañados, lo cual libera los inductores del gen *vir*, las bacterias fueron pre-inducidas con acetociringona antes del cocultivo y los medios de cocultivo fueron optimizados para la inducción del gen *vir* en relación con el pH y la concentración de monosacáridos y acetosiringona. Además, refirieron que con mayor probabilidad las frecuencias de transferencia de ADN-T son influidas por la luz, no al nivel de la bacteria, sino desde el punto de vista fisiológico, a través de la competencia de las células de la planta por la fijación de *Agrobacterium* o la toma del ADN-T.

Diferentes condiciones de iluminación pueden afectar factores fisiológicos que a su vez influyen en la competencia por la transferencia de ADN-T e incluyen: el nivel de hormonas de la planta, la proliferación celular y el estadio del ciclo celular (Villemont *et al.*, 1997). En correspondencia con esto, De Clercq *et al.* (2002) obtuvieron los mejores resultados en la transformación genética vía *A. tumefaciens* en callos de *Phaseolus acutifolius* con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad, mientras que en la oscuridad constante se presentaron los menores grados de expresión GUS.

En la literatura científica generalmente se asocia el tipo de explante con las condiciones de iluminación en la etapa del cocultivo. Por ejemplo, Zambre *et al.* (2003) utilizaron callos de *Phaseolus acutifolius* y segmentos de raíz de *Arabidopsis thaliana* en cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* con diferentes condiciones de iluminación como: oscuridad constante, fotoperíodo 16-8h luz/ oscuridad y luz continua y concluyeron que la transferencia del ADN estuvo altamente correlacionada con el período de luz, siendo mayor la actividad *gus* transitoria cuando se utilizó luz continua y lo relacionaron con los dos tipos de explantes utilizados. Por su parte Collado (2013) evaluó dos condiciones de iluminación 16-8h luz/ oscuridad y oscuridad constante y alcanzó los mayores grados de expresión *gus* transitoria con 16-8h luz/ oscuridad en callos organogénicos de *P.*

vulgaris cultivar 'CIAP7247F'. teniendo en cuenta estos elementos en los sistemas de transformación genética de *P. vulgaris*, el factor iluminación debe ser evaluado teniendo en cuenta el tipo de explante y el cultivar.

Concentración bacteriana y el tiempo de cocultivo

La concentración óptima de células de *A. tumefaciens*, es un parámetro importante a tener en cuenta en cualquier protocolo de transformación, puesto que concentraciones pequeñas pueden tener por resultado la reducción de la transferencia de ADN, mientras que concentraciones más altas pueden causar la muerte del explante blanco. Ello depende de la cepa de *Agrobacterium* y del tejido de planta utilizado (Gurlitz *et al.*, 1987). Para la transformación genética tanto en *P. vulgaris* como *P. acutifolius* se han descrito diferentes tiempos de cocultivo y concentraciones de células bacterianas.

Por ejemplo, en *P. acutifolius*, Zhang *et al.* (1997) ajustaron la concentración de células a $DO_{600}=0.8-1.0$ con tres días de cocultivo, De Clercq *et al.* (2002) a $DO_{600}=0.8$ con dos días de cocultivo y Zambre *et al.* (2005) refirieron el ajuste de la suspensión bacteriana a una $DO_{600}=0.05$ y el cocultivo por siete días.

Sin embargo, en *P. vulgaris* se han referido menores valores de DO_{600} y tiempo de cocultivo por por Lui *et al.* (2005) cuando realizaron la transformación genética con el empleo de la sonicación y la infiltración al vacío como tratamientos al explante blanco ($DO_{600}=0.5-0.6$ y 24 horas de tiempo de cocultivo). Por otra parte, Amugune *et al.* (2011) utilizaron de tres a cuatro días de cocultivo, Mukeshimana *et al.* (2013) informaron el uso de *A. tumefaciens* crecido hasta $DO_{600}=0.5$ y ocho días de cocultivo y Collado (2013) utilizó una suspensión bacteriana ajustada a $DO_{600}=0.05-0.5$ y de tres a seis días de cocultivo. Estos autores alcanzaron los mayores valores en el área del callo con expresión GUS cuando emplearon una $DO_{600}=0.5$ y seis días de cocultivo. Lo descrito anteriormente puede estar relacionado con la naturaleza recalcitrante de *P. vulgaris*, por lo que altas densidades de células de *Agrobacterium* son necesarias para incrementar la eficiencia del proceso de transformación. De forma general,

en *P. vulgaris* periodos de cocultivo prolongados favorecen la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Genes marcadores de selección

Los genes de resistencia a antibióticos y herbicidas han sido ampliamente usados para la selección en leguminosas transformadas genéticamente (Miki *et al.*, 2009).

Estos genes marcadores de selección codifican proteínas con actividades enzimáticas que confieren resistencia a las células transformadas a un determinado sustrato, lo que permite que estas se multipliquen en presencia del agente selectivo (Hadi *et al.*, 2002). Un gen marcador ideal debe ser capaz de expresarse en cualquier célula o tejido y en un gran número de especies vegetales. La forma más común de seleccionar dos tejidos transformados es la indirecta, basada en un gen adicional, el cual confiere ventajas selectivas en condiciones específicas. Una excepción es la resistencia a herbicidas. En este caso se puede seleccionar directamente las células, tejidos o plantas transformadas a partir de genes de interés agronómico (Sreeramanan *et al.*, 2006).

La utilización concomitante de dos tipos de genes marcadores es común. Normalmente utilizar los genes que confieren resistencia a antibióticos o a herbicidas, conjuntamente con genes, cuyo grado de expresión puede ser visualizado por técnicas de espectrofotometría o por ensayos histoquímicos.

Los genes marcadores más comúnmente usados son el gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa (*npt II*), el de higromicina fosfotransferasa (*hpt*), los genes de resistencia a herbicidas *bar* y *pat* (que codifican para fosfinotricina acetil transferasa) y que confiere resistencia a biolaphos, fosfinotricina o glufosinato de amonio (Miki *et al.*, 2009).

La utilización de uno u otro marcador de selección en experimentos de transformación genética de *Phaseolus vulgaris* requiere que se determinen las concentraciones adecuadas del agente selectivo y su efecto inhibitorio en el crecimiento de los explantes utilizados en el

proceso de transformación genética (Bermúdez *et al.*, 2007). En *P. acutifolius*, Zambre *et al.* (2005) realizaron la selección en diferentes explantes de dos cultivares con el marcador de selección genética G-418 y determinaron que la mínima concentración inhibitoria de este antibiótico para el eje embriogénico fue de 5 mg l⁻¹ y para el caso de los callos nodulares verdes inhibió totalmente la proliferación de estos en el cultivar 'TB1' a 20 mg l⁻¹ y a 15 mg l⁻¹ para el cultivar 'PI440795'. Estos autores plantearon que la reducción de la presión de selección es un factor que puede mejorar el procedimiento de transformación.

Por su parte, Bermúdez-Carabaloso *et al.* (2007) realizaron la selección en yemas múltiples de *P. vulgaris* cultivar 'CIAP 7247F' con 50 mg l⁻¹ de genética y 20 mg l⁻¹ de higromicina-B, ya que estas concentraciones provocaron necrosis y muerte total de los explantes.

En otros estudios, Amugune *et al.* (2011) utilizaron 50 mg l⁻¹ de kanamicina e higromicina-B, respectivamente. De igual forma, Mukeshimana *et al.* (2013) emplearon 50 mg l⁻¹ de genética (*npt II*) para la selección en eje embrionario, segmentos de tallo y explantes de hojas en *P. vulgaris*. La presencia de este gen en la construcción genética utilizada en los experimentos de transformación le confiere a los tejidos transformados la resistencia a antibióticos aminoglicósidos por fosforilación de un grupo hidroxil específico de este (Screemanan *et al.*, 2006).

Otros autores como Collado (2013) han empleado glufosinato de amonio como agente selectivo en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP7247F' y seleccionaron 0.50 mg l⁻¹ como la concentración mínima inhibitoria, ya que más del 87% de los callos murieron a las ocho semanas de cultivo.

La transferencia de ADN está críticamente influenciada por: la cepa de *Agrobacterium*, condiciones de iluminación, concentración bacteriana, tiempo de cocultivo y los genes marcadores de selección. Existen otros factores que inciden en la transformación genética tales como: el tejido blanco, el sistema de regeneración, los tratamientos

físicos al explante, así como la estrategia de selección.

Los avances más recientes en la transformación genética en *P. vulgaris* forman parte del Programa de mejoramiento genético del cultivo que se desarrolla en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. En este sentido, se ha desarrollado un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta en el que se incrementó la eficiencia de regeneración *in vitro* así como la transformación genética. Lo anterior ha sido probado en cuatro cultivares de *P. vulgaris*. Sin embargo, Collado (2013) refirió que con el empleo de dicho protocolo de regeneración, en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, se produjeron escapes en el proceso de transformación y la presencia de plantas quiméricas. Dicho autor planteó que estos resultados fueron debidos posiblemente al origen multicelular del callo, el marcador de selección que quizás no fue el más apropiado y la estrategia de selección.

Según los resultados hasta el presente, como estrategia para la transformación genética en *P. vulgaris* se requiere tener en cuenta los aspectos descritos y considerar para la transformación el uso de diferentes tipos de explantes antes de formar el callo para reducir el número de escapes y de plantas quiméricas unido a la reducción del número de pasos (selección) en dicho proceso de transformación.

CONCLUSIONES

La literatura científica disponible demuestra que la transformación genética del frijol común no está aún bien desarrollada como en otros cultivos. Es por ello que se hace necesario el estudio de factores de gran importancia tales como: cepa bacteriana, plasmidio, temperatura, condiciones de iluminación, concentración bacteriana, tiempo de cocultivo y marcador de selección asociado al genotipo. Esto permitirá incrementar la eficiencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de *Phaseolus vulgaris*. Además, puede facilitar la aplicación de estos resultados a sistemas de transformación de otras leguminosas para mejorar la eficiencia de muchos de los protocolos publicados.

REFERENCIAS

- Amugune NO, Anyango B, Mukiana TK (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *African Crop Science Journal* 19(3):137-147
- Angenon G, Thu TT (2011) Genetic Transformation. En: Pratap A y Kumar J (Eds.). *Biology and Breeding Food Legumes*, pp. 178-190. CABI, Indian Institute of Pulses Research, India
- Aragao FJ, Vianna GM, Rech EL (2002) Transgenic dry bean tolerant to the herbicide Glufosinate Ammonium. *Crop Sci* 42:1248–1302
- Arellano J, Fuentes SI, Castillo-España P, Hernández G (2008) Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1: 11-18
- Bermúdez-Carabaloso I, Collado R, García LR, Veitía N, Torres D, Romero C, Angenon G (2007) Empleo de los agentes selectivos Genética G-418 e Higromicina B para la transformación genética en *Phaseolus vulgaris* variedad 'CIAP7247F'. *Biotecnología Vegetal* 7: 205-210
- Cervera M, Pina JA, Juárez J, Navarro L, Pena L (1998) *Agrobacterium* mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 18:271–278
- Chen L (2002) New type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 184 (17): 4838-4845
- Collado (2013) *Phaseolus vulgaris* L. regeneration systems and their application for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Tesis en opción el Título de Doctor en Ciencias Bioingenieril, Vrije Universiteit Brussel. Bélgica
- Dillen W, De Clercq J, Goossens A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. *Gray. Theor Appl Genet* 94:151–158
- Ditt RF, Nester EW, Comai L (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10954–10959
- Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 223-256
- Gelvin SB (2003a) Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology* 21(3): 95-98
- Gelvin SB (2003b) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the 'gene-jockeying' tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 16-37
- Grant JE, Thomson LM, Pither-Joyce MD, Dale TM, Cooper PA (2003) Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports* 21(12): 1207-1210
- Gurlitz RH, Lamb PW, Matthyse AG (1987) Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Plant Physiol* 83: 564-568
- Hadi MZ, Kemper E, Wendeler E, Reiss B (2002) Simple and versatile selection of *Arabidopsis* transformants. *Plant Cell Reports* 21: 130-135
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907
- Jin S, Komari TP, Gordon MP, Nester EW (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J Bacteriol* 169: 4417-4425
- Kwapata KP, Sabzikar RS, Sticklen MB, Kelly JD (2010) *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 97–105
- Kwapata K, Nguyen T, Sticklen M (2012) Genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with the Gus color marker, the Bar herbicide resistance, and the Barley (*Hordeum vulgare*) HVA1 drought tolerance genes. *International Journal of Agronomy*, Article ID 198960, 8 pages
- Li, DD, Shi W, Deng XX (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep* 21:153–156
- Li J, Vaidya M, White C, Vainstein A, Citovsky V, Tzfira T (2005) Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:19231-19236
- Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya, T (2005) The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. *Molecular Breeding* 16: 189-197
- Miki BM, Abdeen AS, Manabe AY, MacDonald PS (2009) Selectable marker genes and unintended

- changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnology Journal* 7: 211-218
- Mukeshimana GC, Ma YA, Aaron EW, Guo-qing SP, James DK (2013) Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnology Reports* 7(1): 59-70
- Opabode JT (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1: 12-20
- Pelczar P, Kalck V, Gomez D, Hohn B (2004) *Agrobacterium* proteins VirD2 and VirE2 mediate precise integration of synthetic T-DNA complexes in mammalian cells. *EMBO Rep* 5: 632-637
- Popelka, JC, Gollasch S, Moore A, Molvig L, Higgins TJ (2006) Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Report* 25:304-312
- Rech EL, Vianna GR, Aragao FJL (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3: 410-418
- Sreeramanan S, Maziah M, Abdullah MP, Rosli NM, Xavier R (2006) Potential selectable marker for genetic transformation in banana. *Biotechnology* 5(2): 189-197
- Veltcheva MD, Svetleva SP, Petkova, Pearl A (2005) *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)-problems and progress. *Sci Hortic* 107:2-10
- Villemont E, Dubois R, Sangwan G, Vasseur Y, Sangwan-Norreel BS (1997) Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Petunia: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201: 160-172
- Yang G, Lee YH, Jiang Y, Kumpatla SP, Hall TC (2005) Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice. *Plant Molecular Biology* 58: 351-366
- Zambre MA, Terryn N, De Clercq J, De Buck S, Dillen W, Van Montagu M, Van Der Straeten D, Angenon G (2003) Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* 216, 580-586
- Zambre MA, Cardona C, Van Montagu M, Terryn N, Angenon G (2005) An efficient and reproducible *Agrobacterium* mediated transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepariy bean). *Theoretical and Applied Genetics* 110: 914 – 924
- Zhang Z, Coyne DP, Mitra A (1997) Factors affecting *Agrobacterium*- mediated transformation of common bean. *J Am Soc Hortic Sci* 122: 300-305

Recibido: 3-3-2013

Aceptado: 1-4-2013