

STABLE AND EFFICIENT *Agrobacterium tumefaciens* MEDIATED TRANSFORMATION OF *Phaseolus vulgaris*

TRANSFORMACIÓN ESTABLE Y EFICIENTE DE *Phaseolus vulgaris* MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Elsa Espinosa-Huerta, Anareli Quintero-Jiménez¹, K. Virginia Cabrera-Becerra, M. Alejandra Mora-Avilés*

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Unidad de Biotecnología de Plantas. Km. 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Apartado Postal 112, Celaya, 38110 Guanajuato, México (mora.alejandra@inifap.gob.mx).

ABSTRACT

Common bean breeding requires novel techniques to incorporate genes that may not be available in bean genetic diversity. The objective of the present study was to analyze the main variables involved in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean towards providing an efficient system to introduce new agronomic traits. Bean cultivars Flor de Mayo Anita and Pinto Saltillo were inoculated with different *A. tumefaciens* strains, constructs and selection was done using two selection agents (kanamycin or glufosinate-ammonium herbicide). Five-day old hypocotyls regenerated organogenic buds (cell clusters) 5 d after inoculation. A randomized complete blocks experimental design was used and the experimental unit was a petri dish with at least 10 hypocotyls. Analysis of variance and Tukey test ($p \leq 0.05$) were performed on data. Transformation efficiency was 10-28 % with small variations due to the genetic background of each cultivar, the *Agrobacterium* strain and selection agent used. Transformation efficiency was higher using kanamycin (28.6 %) in relation to glufosinate-ammonium (10.2 %). Similarly, Pinto Saltillo cultivar showed better regeneration response (21-28 %) than that of Flor de Mayo Anita cultivar (10-17 %) and this was consistent when selection agents were compared within each cultivar. Molecular analysis for detection and gene expression quantification by using end point PCR and q-PCR showed evidence of presence and activity at different expression levels through several generations (T0 to T3). Transformed lines of common bean with potential for fungal resistance and drought tolerance were successfully obtained via *Agrobacterium tumefaciens* with evidence of genetic stability.

RESUMEN

El mejoramiento del frijol común requiere técnicas novedosas para incorporar genes que puedan no estar disponibles en la diversidad genética del frijol. El objetivo del presente estudio fue analizar las principales variables involucradas en la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* de frijol con el propósito de proveer un sistema eficiente para introducir nuevas características agronómicas. Los cultivares de frijol Flor de Mayo Anita y Pinto Saltillo fueron inoculados con diferentes cepas de *A. tumefaciens* y construcciones. La selección se realizó usando dos agentes, la kanamicina o el herbicida glufosinato de amonio. Hipocótilos de 5 d regeneraron brotes organogénicos (grupos de células) 5 d después de la inoculación. El diseño experimental fue bloques completos al azar y la unidad experimental fue una placa de petri con al menos 10 hipocótilos. Un análisis de varianza y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se efectuaron con los datos. La eficiencia de transformación fue 10-28 %, con variaciones pequeñas debido a los antecedentes genéticos de cada cultivar, la cepa de *Agrobacterium* y el agente de selección usado. La transformación fue más eficiente usando kanamicina (28.6 %) en relación al glufosinato de amonio (10.2 %). Similarmente, el cv. Pinto Saltillo mostró mejor respuesta de regeneración (21-28 %) que Flor de Mayo Anita (10-17 %) y esto fue consistente al comparar los agentes de selección dentro de cada cultivar. El análisis molecular para la detección y cuantificación de la expresión génica mediante PCR punto final y q-PCR mostró evidencia de su presencia y actividad en los diferentes niveles de expresión a través de varias generaciones (T0 a T3). Líneas de frijol transformadas con potencial para resistir hongos patógenos y tolerancia a sequía se obtuvieron exitosamente mediante *Agrobacterium tumefaciens*, con evidencia de estabilidad genética.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: August, 2012. Approved: April, 2013.

Published as ARTÍCULO in *Agrociencia* 47: 319-333. 2013.

Palabras clave: grupos de brotes, tolerancia a la sequía, resistencia a los hongos, medio Gamborg, hipocótilos, organogénesis.

Key words: bud clusters, drought stress tolerance, fungal resistance, Gamborg medium, hypocotyls, organogenesis.

INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a crop with vast genetic diversity that includes germplasm with superior agronomic traits such as resistance to adverse weather conditions, pest and disease resistance, and high nutritional quality (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). However, some genes that confer specific traits are either not present in common bean germplasm or conventional breeding may result time consuming. Most breeding programs have made significant progress in the development of disease resistant or drought tolerant cultivars; nevertheless, there is need for the incorporation of more efficient genes with low metabolic cost for the plant.

A protocol that provides efficient cell differentiation, shoot development, and whole plant regeneration is an essential requirement for genetic transformation in plants. Originally, only three groups had produced stable and heritable transformation of *P. vulgaris* (Russell *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 1998) and *P. acutifolius* (Dillen *et al.*, 1997). However, there are successful transformation events including the utilization of *Agrobacterium rhizogenes* to generate transformed roots, research oriented towards functional genomics (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), as well as transformation via particle bombardment to develop bean cultivars resistant to the bean golden yellow mosaic virus through the insertion of a mutated *rep* gene (Faria *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007).

Direct organogenic regeneration of common bean for two commercial cultivars with high regeneration efficiency was reported by Delgado-Sánchez *et al.* (2006) and Quintero-Jiménez *et al.* (2010a; 2010b). Some factors need to be taken into consideration for a consistent regeneration of transformed plants. Several types of explants give differential response, as cotyledons (McClean *et al.*, 1991), protoplasts (Leon *et al.*, 1991), mature seed embryos (Aragão *et al.*, 1992), leaf disks and hypocotyls (Franklin *et al.*, 1993), meristems (Russell *et al.*, 1993; Brasileiro *et al.*, 1996), apical shoots (Lewis and Bliss, 1994) and embryonic axes (Kim and Minamikawa, 1996). Seed age, seed size and color as well as culture media

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo con gran diversidad genética que incluye germoplasma con características agronómicas superiores, como resistencia a condiciones climáticas adversas, resistencia a plagas y enfermedades, y alta calidad nutricional (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos genes que confieren características específicas no están presentes en el germoplasma del frijol o el mejoramiento convencional puede tomar mucho tiempo. La mayoría de los programas de mejoramiento han hecho avances significativos en el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades o tolerantes a sequías, pero es necesario incorporar genes más eficientes de bajo costo metabólico para la planta.

Un protocolo que proporcione una diferenciación celular eficiente, desarrollo de brotes, y la regeneración de la planta completa es requisito esencial para la transformación genética de las plantas. Originalmente, sólo tres grupos habían producido una transformación estable y heredable de *P. vulgaris* (Russell *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 1998) y *P. acutifolius* (Dillen *et al.*, 1997). Pero hay eventos de transformación exitosos, incluyendo la utilización de *Agrobacterium rhizogenes* para generar raíces transformadas, investigación orientada hacia la genómica funcional (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), y la transformación vía bombardeo de partículas para desarrollar cultivares de frijol resistentes al virus amarillo del mosaico dorado del frijol a través de la inserción del gen mutante *rep* (Faria *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007).

La regeneración organogénica directa y altamente eficiente del frijol en dos cultivares comerciales fue reportada por Delgado-Sánchez *et al.* (2006) y Quintero-Jiménez *et al.* (2010a; 2010b). Algunos factores se deben considerar para una regeneración consistente de plantas transformadas. Varios tipos de explantes dan diferentes respuestas, como cotiledones (McClean *et al.*, 1991), protoplastos (León *et al.*, 1991), embriones maduros de semillas (Aragão *et al.*, 1992), discos de hojas e hipocótilos (Franklin *et al.*, 1993), meristemo (Russell *et al.*, 1993; Brasileiro *et al.*, 1996), brotes apicales (Lewis y Bliss, 1994) y ejes embrionarios (Kim y Minamikawa, 1996). La edad de las semillas, tamaño y color, así como medios de cultivo son aspectos a considerar. La transformación vía bombardeo de partículas tuvo buenos resultados

are traits to consider. Transformation via particle bombardment was reported with effective results (Russell *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 1996; 1998; 2002; Rech *et al.*, 2008). Moreover, *Agrobacterium* strain can be a qualitative determinant factor for success in the development of common bean lines genetically modified (McClean *et al.*, 1991; Zambre *et al.*, 1998; 2005).

The objective of the present study was to analyze variables involved into a stable and efficient *Agrobacterium* mediated transformation of common bean by introducing two genes of agronomic importance.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seeds of cv. Flor de Mayo Anita (FMA) (Reg. No. 1494-FRI-032-220302/C) (Castellanos-Ramos *et al.*, 2003) and Pinto Saltillo (PS) (Reg. No. FRI-035-161181) (Sánchez-Valdez *et al.*, 2004) of common bean were used in transformation experiments. Both primary transgenic plants T0 and self-pollinated progeny plants (T1 and T3) were used for further experiments.

Constructs

Defensine (*pdf1.2*) and proton pump pyrophosphatase (*avp1*) genes confer resistance to fungal pathogens (Raharjo *et al.*, 2008) and drought tolerance (Gaxiola *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005). The *pdf1.2* cDNA gene (0.439 kb) from *Arabidopsis thaliana* (Penninckx *et al.*, 1996) was inserted into the pKYLX80 binary vector (Scharl *et al.*, 1987). The *pdf1.2* gene was regulated by a double cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the small subunit polypeptide rubisco terminator from pea (*rbcS-E9*). The neomycin phosphotransferase gene (*nptII*) provides kanamycin resistance under control of the nopaline synthase (*nos*) promoter and *nos* terminator from *A. tumefaciens* (Figure 1A). The plasmid was inserted in *Agrobacterium* strain GV2260 by heat shock transformation (Hoisington *et al.*, 1994). The *avp1* open reading frame (2313 bp) from *A. thaliana* was cloned into the XbaI site of a modified pRT103 plasmid (Gaxiola *et al.*, 2001). The *avp1* gene was regulated by a double cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and *A. tumefaciens* *nos* terminator. The phosphinothricin acetyl transferase gene (*pat/bar*) from *Streptomyces hygroscopicus* which confers resistance to glufosinate-ammonium herbicide, under control of *nos* promoter and *nos* terminator, acted as selectable marker (Figure 1B). The plasmid was inserted into *A. tumefaciens* strain GV3101.

(Russell *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 1996; 1998; 2002; Rech *et al.*, 2008). Además la cepa *Agrobacterium* puede ser cualitativamente determinante para un desarrollo satisfactorio de líneas de frijoles genéticamente modificados sea (McClean *et al.*, 1991; Zambre *et al.*, 1998; 2005).

El objetivo del presente estudio fue analizar las variables involucradas en una transformación de frijol estable y eficiente mediante *Agrobacterium* introduciendo dos genes de importancia agronómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de cv. Flor de Mayo Anita (FMA) (Reg. No. 1494-FRI-032-220.302 / C) (Castellanos-Ramos *et al.*, 2003) y Pinto Saltillo (PS) (Reg. No. FRI-035-161181) (Sánchez-Valdez *et al.*, 2004) de frijol se usaron en experimentos de transformación. Ambas plantas transgénicas primarias T0 y plantas de la progenie de auto-polinización (T1 y T3) se usaron para experimentos adicionales.

Construcciones

Los genes defensina (*pdf1.2*) y de la bomba de protones pirófosfatasa (*avp1*) confieren resistencia a los patógenos fúngicos (Raharjo *et al.*, 2008) y tolerancia a la sequía (Gaxiola *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005). El gen de *pdf1.2* ADNc (0.439 kb) de *Arabidopsis thaliana* (Penninckx *et al.*, 1996) se insertó en el vector binario pKYLX80 (Scharl *et al.*, 1987). El gen *pdf1.2* fue regulado por el doble promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV) y la subunidad pequeña polipéptida rubisco terminador del chícharo (*rbcS-E9*). El gen de neomicina fosfo-transferasa (*nptII*) proporcionó resistencia a la kanamicina bajo el control del promotor de nopalina sintasa (*nos*), y el terminador *nos* de *A. tumefaciens* (Figura 1A). El plásmido se insertó en la cepa de *Agrobacterium* GV2260 mediante transformación por choque térmico (Hoisington *et al.*, 1994). El marco de lectura abierto del gen *avp1* (2313 pb) de *A. thaliana* se clonó en el sitio XbaI de un plásmido modificado pRT103 (Gaxiola *et al.*, 2001). El gen *avp1* estuvo regulado por el doble promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S y el terminador *nos* de *A. tumefaciens*. El gen de fosfotricina acetil transferasa (*pat/bar*) de *Streptomyces hygroscopicus*, que proporciona resistencia al herbicida glufosinato de amonio, bajo el control del promotor *nos* y el terminador *nos*, actuó como marcador de selección (Figura 1B). El plásmido se insertó en la cepa *A. tumefaciens* GV3101.

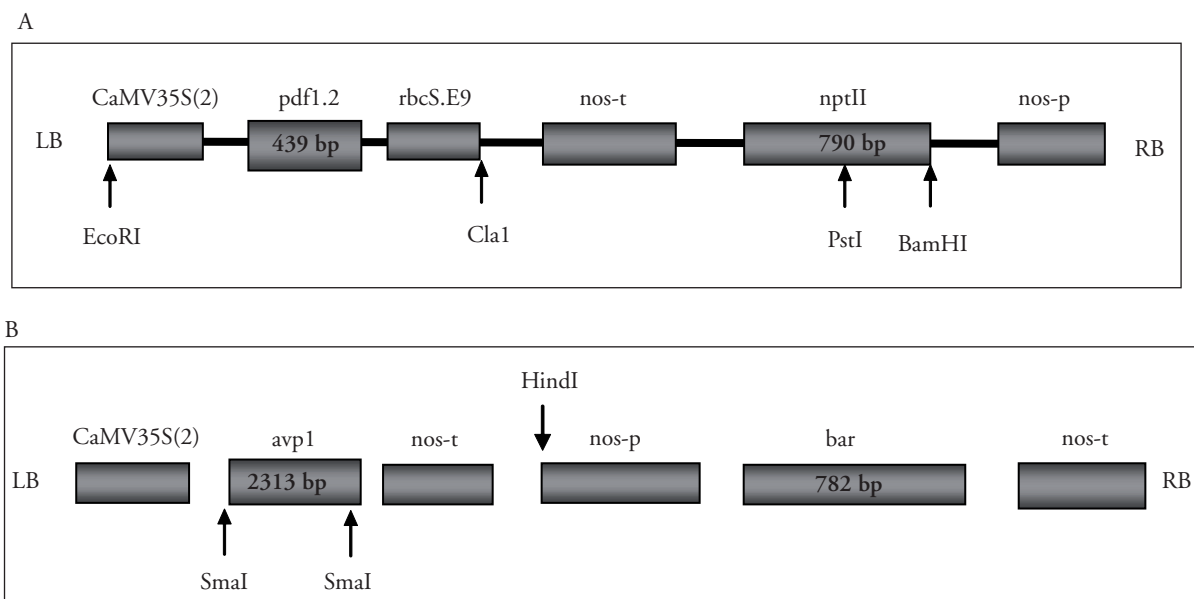


Figure 1. Schematic representation of restriction map of T-DNA. A) pRG522-*avp1* containing vacuolar proton pump H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) and selectable marker phosphinotricin acetyl transferase genes; B) pKYLX80-*pdf1.2* containing *Arabidopsis thaliana* defensin and selectable marker type II neomycin phosphotransferase genes.

Figura 1. Representación esquemática del mapa de restricción del ADN-T. A) pRG522-*avp1* que contiene los genes de la bomba de protones vacuolar H^+ -pirofosfatasa (H^+ -PPasa) y marcador de selección fosfinotricin acetil transferasa; B) pKYLX80-*pdf1.2* que contiene genes defensina de *Arabidopsis thaliana* y marcador de selección neomicin fosfo-transferasa tipo II.

Transformation procedure

Seed germination, hypocotyls dissection and media components were described by Quintero-Jiménez *et al.* (2010a). GM liquid medium (Gamborg *et al.*, 1968) amended with 2 % sucrose, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 1 mg L⁻¹ pyridoxine, 10 mg L⁻¹ thiamine, were added to *A. tumefaciens* strain GV2260 or GV3101 grown to an O.D.₆₀₀=0.8 in a 5:1 (v/v) proportion. Hypocotyls were incubated into this solution for 10 min in soft motion. After this time, liquid was discarded and excess eliminated with sterile paper towels. Explants were placed in co-cultivation medium of induction and multiplication medium (IMM) (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010a) added with 200 μ M acetosyringone. Explants were incubated in cocultivation medium for 5 d at 25 °C 16 h light (45-70 μ mol m⁻² s⁻¹) and 8 h dark.

Agrobacterium-elimination medium consisted of IMM added with 300 mg L⁻¹ timentin (GlaxoSmithKline®). Hypocotyls remained into this medium for 10 d under the same growing conditions. Explants were transferred into selection medium with the same components as *Agrobacterium*-elimination medium amended with 50 mg L⁻¹ kanamycin or 0.2 mg L⁻¹ glufosinate-ammonium.

Procedimiento de transformación

La germinación de semillas, disección de los hipocótilos y componentes de los medios fueron descritos por Quintero-Jiménez *et al.* (2010a). El medio líquido GM (Gamborg *et al.*, 1968), modificado con 2 % sacarosa, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ piridoxina, 10 mg L⁻¹ tiamina, se agregó a las cepas GV2260 o GV3101 de *A. tumefaciens* cultivadas a O.D.₆₀₀ = 0.8 en proporción 5:1 (v/v). Los hipocótilos se incubaron 10 min en esta solución con movimiento suave. Después, el líquido se desechó y el exceso se eliminó con toallas de papel estériles. Los explantes se colocaron en un medio de co-cultivo de inducción y multiplicación (IMM) (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010a) más 200 μ M de acetosiringona. Los explantes se incubaron 5 d en un medio de co-cultivo a 25 °C, 16 h de luz (45-70 μ mol m⁻² s⁻¹) y 8 h oscuridad.

El medio de eliminación *Agrobacterium* contenía IMM más 300 mg L⁻¹ timentina (GlaxoSmithKline®). Los hipocótilos permanecieron en este medio 10 d en las mismas condiciones de crecimiento. Los explantes se transfirieron a un medio de selección con los mismos componentes del medio de eliminación *Agrobacterium* más 50 mg L⁻¹ kanamicina o 0.2 mg L⁻¹ glufosinato de amonio.

Differentiated shoots that remained green in selection medium were separated and grown individually in Magenta® boxes with Elongation and Rooting Medium (ERM) (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010a) amended with 50 mg L⁻¹ kanamycin or 0.2 mg L⁻¹ glufosinate-ammonium herbicide and 300 mg L⁻¹ timentin to promote elongation and root formation. Growth conditions were identical to the previous stage. *In vitro* regenerated plantlets were transferred into pots filled with Sunshine® Universal Mix (Sun Gro Horticulture Canada Ltd.) and acclimatized. New plants were placed under greenhouses at 25-28 °C and light intensity of 170-285 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ until maturity.

End point PCR analysis in *pdf1.2* and *avp1* transformed lines

DNA was isolated according to Murray and Thompson (1980) using 100-200 mg of leaf tissue per sample. The final concentration reactions consisted of template DNA (30 ng), primers (0.2 μM), dNTP's (0.25 mM), Taq DNA Polymerase (1 U), magnesium chloride (2 mM), and Taq buffer (1X). PCR analysis was done using primers to detect 35S promoter *pdf1.2*, *nptII* or *avp1* genes. Primers for detecting the 35S promoter were sense 35S 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3', antisense 35S 5'-GCA CCT ACA AAT GCC ATC A-3', (Invitrogen, Life Technologies). Amplification conditions consisted of 4 min 95 °C for one cycle, 1 min 95 °C, 1 min 54 °C, 1 min 72 °C for 30 cycles and a final extension 7 min 72 °C. The *pdf1.2* primers consisted of sense *pdf1.2* 5'-CAT CAT GGC TAA GTT TGC TTC C-3', antisense *pdf1.2* 3'-CTC ATA GAG TGA CAG AGA CT-5'; the *nptII* primers were sense *nptII* 5'-TCG GCT ATG ACT GGG CAC AAC AGA-3', antisense *nptII* 3'-AAG AAG GCG ATA GAA GGC GAT GCG-5'. Amplification conditions for both *pdf1.2* and *nptII* primers were 3 min 94 °C for one cycle, 1 min 94 °C, 1 min 55 °C, and 2 min 72 °C for 35 cycles. Finally, the *avp1* gene primers consisted of sense *avp1* 5'-ACT GGT TAT GGT CTT GGT GGG T-3', antisense *avp1* 5'-GGC AAC ATC TTG CAC AGG GCT GT-3'. Amplification conditions were 5 min a 95 °C for 1 cycle, 1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 2 min a 72 °C for 40 cycles and a final extension 7 min 72 °C. The expected fragments sizes were 60 bp for *pdf1.2*, 700 bp for *nptII* gene, 195 bp for 35S promoter and 630 bp for *avp1*. Amplified fragments were separated into 2 % agarose gels and stained with ethidium bromide.

Real time quantitative PCR analysis in T3 *pdf1.2* transformed lines

Transgene detection analysis

Primers and probe were designed using the program Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City,

Los brotes diferenciados que permanecieron verdes en el medio de selección se separaron y se cultivaron individualmente en cajas Magenta® en medio de elongación y enraizamiento (ERM) (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010a), más 50 mg L⁻¹ kanamicina ó 0.2 mg L⁻¹ de glufosinato de amonio y 300 mg L⁻¹ timentina para promover alargamiento y formación de raíces. Las condiciones de cultivo fueron idénticas a la etapa anterior. Las plántulas regeneradas *in vitro* se transfirieron a macetas llenas con mezcla Sunshine® Universal Mix (Sun Gro Horticulture Canada Ltd.) y aclimatadas. Las plantas nuevas se colocaron en invernaderos a 25-28 °C e intensidad de la luz 170 a 285 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta la madurez.

Análisis por PCR punto final de líneas transformadas con *pdf1.2* y *avp1*

ADN se aisló de acuerdo con Murray y Thompson (1980), usando 100-200 mg de tejido de hoja por muestra. La concentración final de las reacciones fue un molde de ADN (30 ng), iniciadores (0.2 μM), dNTP's (0.25 mM), Taq ADN polimerasa (1 U), cloruro de magnesio (2 mM) y amortiguador Taq (1X). El análisis PCR se hizo con iniciadores para detectar el promotor 35S y genes *pdf1.2*, *nptII* o *avp1*. Los iniciadores para detectar el promotor 35S fueron sentido 35S 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CA-3', antisentido 35S 5'-GCA CCT ACA AAT GCC ATC A-3', (Invitrogen, Life Technologies). Las condiciones de amplificación fueron 5 min a 95 °C por un ciclo, 1 min a 95 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C por 30 ciclos y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los iniciadores de *pdf1.2* fueron sentido *pdf1.2* 5'-CAT CAT GGC TAA GTT TGC TTC C-3', antisentido *pdf1.2* 3'-CTC ATA GAG TGA CAG AGA CT-5'; los iniciadores de *nptII* fueron sentido *nptII* 5'-TCG GCT ATG ACT GGG CAC AAC AGA-3', antisentido *nptII* 3'-AAG AAG GCG ATA GAA GGC GAT GCG-5'. Las condiciones de amplificación para los iniciadores *pdf1.2* y *nptII* fueron 3 min a 94 °C por un ciclo, 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, y 2 min a 72 °C por 35 ciclos. Por último, los iniciadores del gen *avp1* fueron sentido *avp1* 5'-ACT GGT TAT GGT CTT GGT GGG T-3'; antisentido *avp1* 5'-GGC AAC ATC TTG CAC AGG GCT GT-3'. Las condiciones de amplificación fueron 5 min a 95 °C por 1 ciclo, 1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 2 min 72 °C por 40 ciclos y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los tamaños esperados de los fragmentos fueron 60 pb para el gen *pdf1.2*, 700 pb para el gen *nptII*, 195 pb para el promotor 35S y 630 pb para el gen *avp1*. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 2 % y teñidos con bromuro de etidio.

CA) starting from the sequence of the *pdf1.2* gene (NCBI, NM_123809). Defensin gene specific primers and probe (Assays by design, Applied Biosystems) to detect the *pdf1.2* gene were sense 5'-AGT TGT GCG AGA AGC CAA GT-3', antisense 3'-GCA TGC ATT ACT GTT TCC GCA AA-5' and the TaqMan® probe 5'-CCC TGA CCA TGT CCC-3' with a 6-FAM™ dye label and minor groove binder (MGB) moiety on the 5' end, and non-fluorescent quencher (NFQ) dye on the 3' end. The internal control 18S ribosomal (4319413E, Applied Biosystem) was tagged with the fluorophore VIC.

Gene expression analysis

Total cellular RNA was extracted from leaf tissue using Trizol® (Reagent, Carisbald, CA, USA) following the manufacturer instructions. RNA was quantified by fluorometry (TBS-380 Mini-Fluorometer) using the Ribo-Green kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

First-strand cDNA was synthesized using RT-PCR through One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems; Cat. No.4309169). TaqMan® system was used for gene amplification. The amplification conditions consisted of 48 °C 30 min (Reverse Transcription), 95 °C 10 min (denaturalization), 45 cycles (PCR amplification) at 95 °C, 15 sec and 60 °C, 1 min (ABI PRISM® 7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems).

The relative expression ratio was calculated by normalizing the target *pdf1.2* gene Ct with reference housekeeping gene Ct (18S) to obtain only the efficiency of the *pdf1.2* gene ($DCt = Ct_{pdf1.2} - Ct_{18S}$). Each DCt was compared to a calibrator within replicates ($DDCt = DCt_{sample} - DCt_{calibrator}$). The relative expression was shown as 2^{-DDCt} , unit of measurement of the expression of the gene (Livak and Schmittgen, 2001).

Analysis of progeny of transgenic plants in T3 *pdf1.2* transformed lines

Forty to fifty seeds from selfed common bean transgenic lines were analyzed for *pdf1.2* fragment amplification by PCR. Plants that amplified the *pdf1.2* or *avp1* gene fragments were scored and Chi-square analysis was performed to determine segregation ratios and number of insertional events.

Experimental design

Pinto Saltillo and Flor de Mayo Anita hypocotyls were inoculated with *A. tumefaciens* strain GV2260 containing *pdf1.2* and *nptII* gene or GV3101 containing *avp1* and *bar* gene in a randomized complete blocks experimental design. Three transformation experiments were carried out and each experiment consisted of three replicates. The experimental unit was one petri

Análisis en tiempo real por PCR cuantitativa en líneas transformadas T3 *pdf1.2*

Análisis de detección de transgenes

Los iniciadores y la sonda se diseñaron con el programa Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) a partir de la secuencia del gen *pdf1.2* (NCBI, NM_123809). Los iniciadores y sonda específicos del gen defensina (Assays by design, Applied Biosystems) para detectar el gen *pdf1.2* fueron sentido 5'-AGT TGT GCG AGA AGC CAA GT-3', antisentido 3'-GCA TGC ATT ACT GTT TCC GCA AA-5' y la sonda TaqMan® 5'-CCC TGA CCA TGT CCC-3' con una etiqueta de marcado 6-FAM™ y el enlazante al surco menor (MGB) en el extremo 5', y el extintor no fluorescente (NFQ) en tinte en el extremo 3'. El control interno 18S ribosomal (4319413E, Applied Biosystem) fue etiquetado con el fluoróforo VIC.

Análisis de la expresión de genes

El ARN celular total se extrajo del tejido de hojas utilizando Trizol® (reactivo, Carisbald, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por fluorometría (TBS-380 Mini-Fluorómetro) usando el kit Ribo-Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.).

El cADN de la primera cadena se sintetizó mediante RT-PCR a través de One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems; Cat. No.4309169). El sistema TaqMan® se usó para la amplificación de genes. Las condiciones de amplificación fueron: 48 °C por 30 min (transcripción inversa); 95 °C, 10 min (desnaturalización); 45 ciclos (amplificación por PCR) a 95 °C; 15 seg a 60 °C; 1 min (ABI PRISM® 7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems).

La relación de expresión relativa se calculó normalizando el Ct gen blanco *pdf1.2* con el gen endógeno de referencia Ct (18S) para obtener sólo la eficiencia del gen *pdf1.2* ($DCt = Ct_{pdf1.2} - Ct_{18S}$). Cada DCt se comparó con un calibrador dentro de las repeticiones ($DDCt = DCt_{muestra} - DCt_{calibrador}$). La expresión relativa se mostró como 2^{-DDCt} , unidad de medida de la expresión del gen (Livak y Schmittgen, 2001).

Análisis de la progenie de plantas transgénicas en líneas T3 transformadas con *pdf1.2*

De 40 a 50 semillas de líneas transgénicas de frijol autopolinizadas se analizaron para la amplificación de fragmentos *pdf1.2* por PCR. Las plantas que amplificaron el *pdf1.2* o fragmentos de genes *avp1* fueron registradas y se realizó el análisis de Ji-cuadrada para determinar las proporciones de segregación y el número de eventos de inserción.

dish containing at least 10 hypocotyls. Transformation efficiency was the response trait based on the interaction between cultivars, *Agrobacterium* strains and selection agents. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$) using MINITAB 16 Statistical Software.

RESULTS AND DISCUSSION

Plant transformation

The efficiency for transformation of whole plants depends upon the cells being competent for regeneration (Dong and McHughen, 1991; Nagl *et al.*, 1997), which limited using this technology in common bean. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *P. vulgaris* was developed based on successful regeneration reports previously published (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010a, 2010b). The structure derived from germination and enlargement of the embryo develops in hypocotyl structure (Figure 2a). The complex tissue of organogenic shoots formed near the suspensor cells indicates that the full germinative and regenerative potential is translocated to that spot facilitating and promoting the development of two or three shoots, each of them with full capacity to develop a whole plant (Figure 2b). However, not all *de novo* shoots gave rise to whole plants; in most of the cases only one shoot developed into a full single plant concentrating the morphogenic potential in only one shoot to become a plant (Figure 2c).

Once the organogenic shoots formed, they remained attached to the hypocotyls until full plant development (Figure 2d). In each fresh medium transfer, a thin layer of the hypocotyl was eliminated until the plant was independent. After full stems and leaves formation and development, roots differentiated at the stem base indicating that the new plant is independent from the hypocotyl, this phase took two-months for full elongation and rooting (Figure 2e).

Plants that maintained a healthy condition were transferred into greenhouse for further observation (Figure 2f). All T0 lines showed similar phenological stages compared to non-transformed plants; they flowered and set seeds at the same rate as control plants (Figures 2g and 2h).

Different strains of *A. tumefaciens* for inoculation and co-cultivation, as GV2260 and GV3101, induced differential transformation efficiency. With

Diseño experimental

Los hipocótilos de Pinto Saltillo y Flor de Mayo Anita fueron inoculados con la cepa *A. tumefaciens* GV2260 que contiene *pdf1.2* y el gen *nptII* o GV3101 que contiene *avp1* y el gen *bar*, en un diseño experimental de bloques completos al azar. Se realizaron tres experimentos de transformación y cada experimento tuvo tres réplicas. La unidad experimental fue una caja petri con al menos 10 hipocótilos. La eficiencia de transformación fue la variable de respuesta basada en la interacción entre cultivares, cepas de *Agrobacterium* y agentes de selección. Los datos se analizaron con ANDEVA y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando MINITAB 16 Statistical Software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de plantas

La eficiencia de transformación de plantas enteras depende de si las células son competentes para la regeneración (Dong y McHughen, 1991; Nagl *et al.*, 1997), lo cual limitó el uso de esta tecnología en el frijol. La transformación de *P. vulgaris* a través de *A. tumefaciens* se desarrolló con base en reportes de regeneración exitosa (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010a, 2010b). La estructura derivada de la germinación y crecimiento del embrión se desarrolla en la estructura de hipocótilo (Figura 2a). El tejido complejo de brotes organogénicos formados cerca de las células del suspensor indica que todo el potencial germinativo y regenerador es trasladado a ese lugar, facilitando y promoviendo el desarrollo de dos a tres brotes, cada uno de ellos con plena capacidad para desarrollar una planta completa (Figura 2b). Sin embargo, no todos los brotes *de novo* dieron lugar a plantas enteras; en la mayoría de los casos sólo un brote se desarrolló hasta convertirse en una planta completa, es decir, en ese brote se concentró el potencial morfogénico hasta convertirse en una planta (Figura 2c).

Una vez formados, los brotes organogénicos permanecieron unidos a los hipocótilos hasta el desarrollo total de la planta (Figura 2d). En cada traslado a medio fresco se eliminó una capa delgada del hipocotilo hasta que la planta se hizo independiente. Después de formarse y desarrollarse los tallos y las hojas, las raíces se diferenciaron en la base del tallo, indicando que la nueva planta es independiente del hipocótilo; esta fase requirió dos meses para una completa elongación y enraizamiento (Figura 2e).

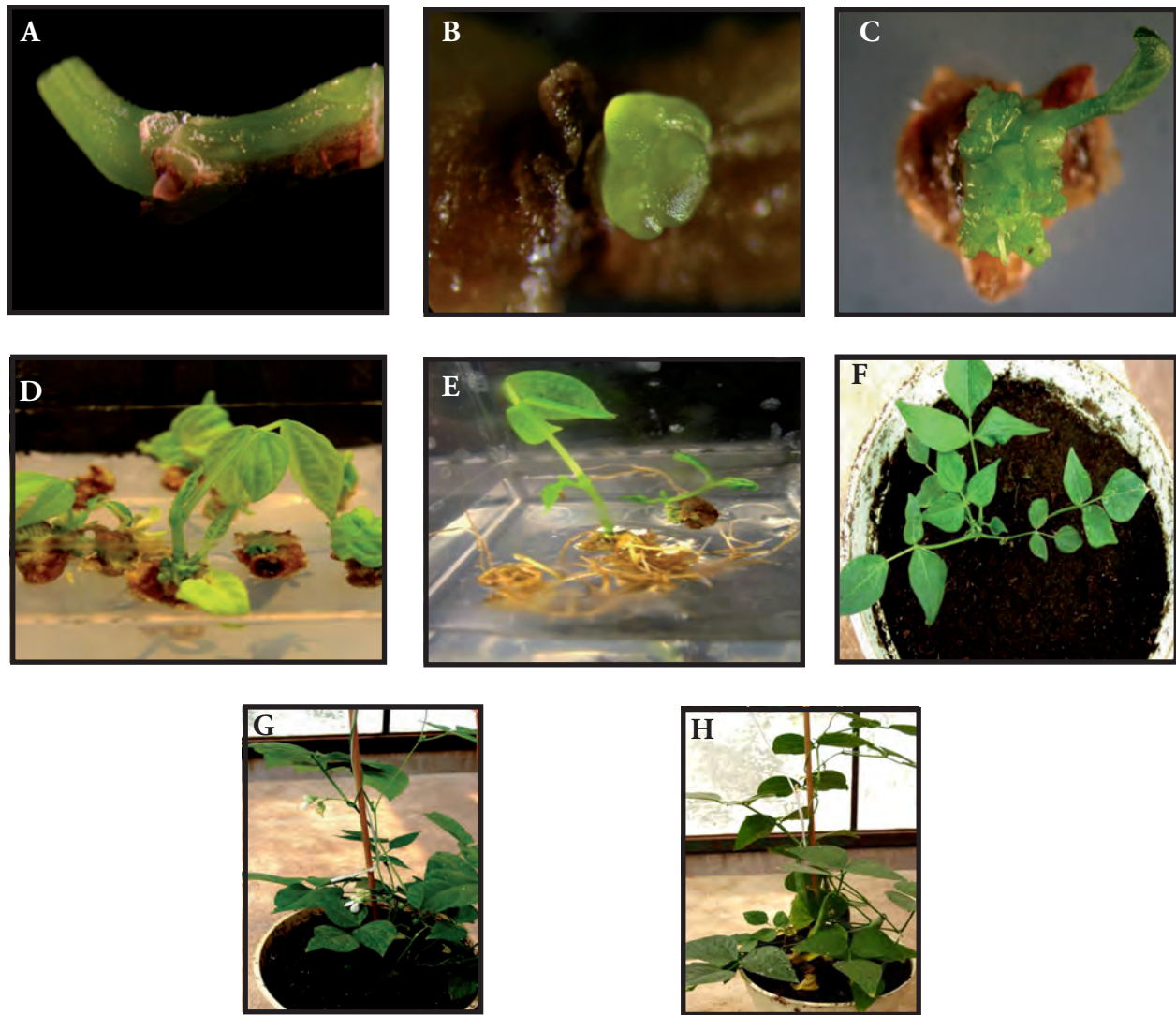


Figure 2. Route of common bean *Agrobacterium*-mediated transformation. A) Hypocotyls used as main explant for transformation. B) Hypocotyl with *de novo* shoots formed at the hypocotyl suspensor area 4 days after inoculation (DAI). C) Differentiated shoots kanamycin resistant 20 DAI (RK). D) Plantlets RK remained on their original explant until root formation. E) Plantlets 5-7 cm height with 1-2 trifoliolate leaves and differentiated root system 60 days in rooting medium. F) T0 common bean plant transferred to soil (20 cm height). G) T0 plant at 50 % flowering, 20 days after transferring to greenhouse. H) Pods formation 18 days after 50 % flowering.

Figura 2. Ruta de la transformación del frijol por medio de *Agrobacterium*. A) Hipocótilos utilizados como explante principal para la transformación. B) Hipocótilo con brotes *de novo* formados en el área del suspensor del hipocótilo 4 días después de la inoculación (DAI). C) Brotes diferenciados resistentes a kanamicina 20 DAI (RK). D) Las plántulas RK se mantuvieron en su explante original hasta la formación de raíces. E) Las plántulas 5-7 cm de altura con 1-2 hojas trifolioladas y un sistema de raíces diferenciado 60 días en un medio de enraizamiento. F) Planta de frijol T0 trasladada al suelo (20 cm de altura). G) Planta T0 a 50 % de su floración, 20 días después de su traslado a un invernadero. H) Formación de vainas 18 días después de 50 % de la floración.

the use of the GV3101 strain some degree of necrosis on the explants and inhibition of full regeneration were observed (Table 1). The *A. tumefaciens* strain effect was more severe for FMA than for PS reducing

Las plantas que mantuvieron una condición saludable fueron transferidas a invernadero para observación posterior (Figura 2f). Todas las líneas T0 mostraron estados fenológicos similares en comparación con

Table 1. Effects of *Agrobacterium tumefaciens* strain and common bean cultivar on transformation efficiency.
Cuadro 1. Efectos de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* y de la variedad de frijol en la eficiencia de transformación.

Cultivar	<i>A. tumefaciens</i> strain	Gene	Number of embryonic axes [†]	Hypocotyls with organogenic buds (%) [‡]	Hypocotyls with shoots	Hypocotyls with resistant plants (Transformation efficiency) [§]	Regeneration efficiency (%)
PS	-	PS control	100	95 (95.0)	95	-	80 (80.0)
	GV2260	<i>pdf1.2+nptII</i>	94.5	80 (84.6)	76	27.0 (28.6) ^{§ a^b}	
	GV3101	<i>avp1 + bar</i>	92.5	76 (82.1)	58.5	19.5 (21.1) b	
FMA	-	FMA control	210	183 (87.1)	179	-	171 (81.4)
	GV2260	<i>pdf1.2+nptII</i>	215	196 (91.0)	49.5	36.5 (17.0) a	
	GV3101	<i>avp1 + bar</i>	200	152 (76.0)	33.5	20.5 (10.25) b	

[†] Values are average of three transformation experiments at different time points; each experiment had three replicates. Each petri dish with at least 10 hypocotyls was the experimental unit ♦ Los valores son el promedio de tres experimentos de transformación en diferentes momentos; cada experimento tuvo tres repeticiones. Cada caja petri con al menos 10 hipocótilos fue la unidad experimental.

[‡] Number of embryos with bud clusters induced/number of embryos × 100 ♦ Número de embriones con grupos de brotes inducidos/número de embriones × 100.

[§] Number of kanamycin resistant (*nptII*) or glufosinate-ammonium herbicide (*bar*) plants/Number of embryonic axes × 100 ♦ Número de plantas resistentes a la kanamicina (*nptII*) o al herbicida glufosinato de amonio (*bar*)/Número de ejes embrionarios × 100.

^b Different letters indicate a significant difference in observed inhibition between lines (Tukey; $p \leq 0.05$); PS: Pinto Saltillo; FMA: Flor de Mayo Anita ♦ Letras diferentes indican una diferencia significativa en la inhibición observada entre líneas (Tukey; $p \leq 0.05$); PS: Pinto Saltillo; FMA: Flor de Mayo Anita.

the regeneration and transformation efficiency up to 30 % within PS and 80 % in FMA in relation to control plants regeneration (Table 1).

Different transformation trials with *A. tumefaciens* on FMA and PS showed direct organogenesis response of hypocotyls. Average transformation efficiency (number of resistant shoots to kanamycin / number of explants X 100) for GV2260 (*pdf1.2+nptII*) was 17 and 28 % for FMA and PS. Transformation efficiency (number of resistant shoots to glufosinate-ammonium herbicide / number of explants X 100) using GV3101 (*avp1+bar*) was 10 and 21 % for FMA and PS, respectively indicating a statistical difference due to the *Agrobacterium* strain used ($p=0.011$) (Table 1).

There was a significant difference ($p=0.001$) in response for both cultivars to the overall transformation process cutting down up to nearly 50 % in FMA compared to PS regardless the *A. tumefaciens* strain used (Table 1). The transformation efficiency close to 30 %, suggests that the system herein utilized is comparable, and in some cases superior, to other transformation systems (Aragão *et al.*, 1996, 2002; Kim and Minamikawa, 1996).

The use of kanamycin or glufosinate-ammonium to detect a functional *nptII* or *bar* gene in the plant

las plantas no transformadas; florecieron y produjeron semillas al mismo ritmo que las plantas testigo (Figuras 2g y 2h).

Cepas diferentes de *A. tumefaciens* para inoculación y co-cultivo, como GV2260 y GV3101, indujeron una eficiencia de transformación diferenciada. Con el uso de la cepa GV3101 se observó cierto grado de necrosis en los explantes e inhibición de la regeneración completa (Cuadro 1). El efecto de la cepa *A. tumefaciens* fue más severo para FMA que para PS, reduciendo la regeneración y la eficiencia de transformación hasta 30 % en PS y 80 % en FMA respecto a la regeneración de las plantas testigo (Cuadro 1).

Los diferentes ensayos de transformación con *A. tumefaciens* en FMA y PS mostraron una respuesta de organogénesis directa de hipocótilos. La eficiencia media de la transformación (número de brotes resistentes a kanamicina / número de explantes X 100) para el GV2260 (*pdf1.2+nptII*) fue 17 y 28 % para FMA y PS. La eficiencia de transformación (número de brotes resistentes a glufosinato de amonio / número de explantes X 100) usando GV3101 (*avp1+bar*) fue 10 y 21 % para FMA y PS, lo que indica una diferencia estadística debido a la cepa de *Agrobacterium* usada ($P=0.011$) (Cuadro 1).

genome was efficient in maintaining the transformed plants in a permanent stage of selection. However, reduced transformation efficiency was reduced (40 %) in both cultivars when using glufosinate-ammonium compared to kanamycin selection (Table 2). Differences in transformation efficiency between cultivars was confirmed using glufosinate-ammonium where FMA showed 3.9 % ($p=0.001$) compared to PS (8.4 %) ($p=0.037$) (Table 2).

A two-way analysis of variance showed that there were no significant interactions ($p>0.05$) between cultivars, *Agrobacterium* strains and selection agents. The difference in mean resistant plants, either kanamycin or glufosinate-ammonium on the two cultivars, appear constant when either of the *Agrobacterium* strains was used. This was confirmed with a three-way interaction analysis ($p>0.05$) (Table 3).

Genomic analysis

A preliminary analysis of the T0 kanamycin-resistant lines population to verify presence of inserts was performed by end point PCR (Figure

Hubo diferencia significativa ($p=0.001$) en la respuesta de ambos cultivares en el proceso global de transformación, bajando hasta casi 50 % en FMA comparado con PS, independientemente de la cepa de *A. tumefaciens* usada (Cuadro 1). La eficiencia de transformación cercana a 30 % sugiere que el sistema usado en este estudio es comparable y, en algunos casos, superior a otros sistemas de transformación (Aragão *et al.*, 1996, 2002; Kim y Minamikawa, 1996).

El uso de kanamicina o glufosinato de amonio para detectar los genes *nptII* o *bar* funcionales en el genoma de la planta fue eficiente para mantener las plantas transformadas en una etapa permanente de selección. Sin embargo, la eficiencia de transformación fue menor (40 %) en ambos cultivares al usar glufosinato de amonio, comparado con kanamicina (Cuadro 2). Las diferencias en la eficiencia de la transformación entre los cultivares se confirmaron al usar glufosinato de amonio, donde FMA tuvo 3.9 % ($p=0.001$) comparado con PS (8.4 %) ($p=0.037$) (Cuadro 2).

Un análisis de varianza de dos vías no mostró interacciones significativas ($p>0.05$) entre los cultivares,

Table 2. *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by using different selection agents for two common bean cultivars.
Tabla 2. Eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium* usando diferentes agentes de selección para dos variedades de frijol.

Cultivar	Selection gene	Embryonic axes [§]	Hypocotyls w/ buds	Hypocotyls with shoots	Number of resistant plants (Average $\pm$ S.E.) ^b Transformation efficiency ^b
PS	<i>bar</i> [†]	250	194	110	21 (7.0 $\pm$ 1) ^b 8.4 ^a a ^{††}
	<i>nptII</i> [‡]	185	152	117	39 (19.5 $\pm$ 1.5) 21.1 c
FMA	<i>bar</i>	180	136	100	7 (2.33 $\pm$ 0.66) 3.9 b
	<i>nptII</i>	400	304	67	41 (20.5 $\pm$ 2.5) 10.3 c

[†] *bar*: phosphinothricin acetyl transferase gene confers glufosinate-ammonium herbicide resistance ♦ *bar*: gen fosfotricin acetil transferasa confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio.

[‡] *nptII*: neomycin phosphotransferase gene confers resistance to kanamycin ♦ *nptII*: gen neomicin fosfotransferasa confiere resistencia a la kanamicina.

[§] Values are average of three transformation experiments at different time points, each experiment had three replicates. Each petri dish with at least 10 hypocotyls was the experimental unit ♦ Los valores son la media de tres experimentos de transformación en diferentes momentos; cada experimento tuvo tres repeticiones. Cada caja de petri con al menos 10 hipocótilos fue la unidad experimental.

^b Average of resistant plants among replications and its standard error ♦ Promedio de plantas resistentes entre las repeticiones y su error estándar.

^a Number of resistant plants (Number of kanamycin or glufosinate-ammonium herbicide resistant plants/Number of embryonic axes x 100) ♦ Número de plantas resistentes (Número de plantas resistentes a la kanamicina o al herbicida glufosinato-amonio / Número de ejes embrionarios x 100)

^{††} Different letters indicate a significant difference in observed inhibition between lines (Tukey; $p\leq 0.05$). PS: Pinto Saltillo; FMA: Flor de Mayo Anita ♦ Letras diferentes indican una diferencia significativa en la inhibición observada entre líneas (Tukey; $p\leq 0.05$). PS: Pinto Saltillo; FMA: Flor de Mayo Anita.

Table 3. Three-way interaction analysis of variance between cultivars, *Agrobacterium* strain and selection agents.**Cuadro 3. Análisis de varianza de tres vías de interacción entre los cultivares, la cepa *Agrobacterium* y los agentes de selección.**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main effects	4	197.153	75.0070	18.7518	6.44	0.002
2-Way interactions	6	12.903	10.3111	1.7185	0.59	0.734 NS
3-Way interactions	4	3.640	3.6402	0.9100	0.31	0.866 NS
4-Way interactions	1	0.102	0.1023	0.1023	0.04	0.853 NS
Residual error	20	58.202	58.2020	2.9101		
Total	35	272.000				

NS: non-significant interaction ♦ NS: interacción no significativa.

3). These results were confirmed by q-PCR showing amplification of the *pdf1.2* gene in the lines that amplified for all the three components mentioned (Figure 4).

The transcriptional expression of the *pdf1.2* gene in nearly homozygous T3 population showed that plants expressed different levels of *pdf1.2* gene (0.61-0.9) which were correlated to levels of tolerance or resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* strains 448 or 1472 (data not shown) (Figure 5).

Segregation analysis

Segregation ratios and χ^2 analysis indicated that all transgenic lines showed a 3:1 segregation, indicating one construct insertion. The genomic analysis of the plants showed preliminarily an integration of the constructs on T0 plants and evidence of stable integration in T3 populations (Data not shown).

CONCLUSIONS

The *Agrobacterium*-mediated transformation protocol reported here is a viable alternative to incorporate genes into common bean plants for their use in breeding programs. Besides, it is a tool for functional genomics in order to integrate valuable genes or regulatory sequences that may provide added value for agronomical performance, nutritional or market value.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Dr. Miguel Gómez Lim from CINVESTAV-Irapuato, México, and Dr. Roberto Gaxiola Ariza

cepas de *Agrobacterium* y agentes de selección. La diferencia promedio en las plantas con resistencia, ya sea a kanamicina o glufosinato de amonio en los dos cultivares, fue constante al utilizar cualquiera de las cepas de *Agrobacterium*. Esto se confirmó con un análisis de interacción de tres vías ($p>0.05$) (Cuadro 3).

Análisis genómico

Se realizó un análisis preliminar de la población T0 de líneas resistentes a kanamicina para verificar la presencia de insertos por medio de PCR de punto final (Figura 3). Estos resultados fueron confirmados por q-PCR que muestra la amplificación del gen *pdf1.2* en las líneas que amplificaron para los tres componentes mencionados (Figura 4).

La expresión transcripcional del gen *pdf1.2* en la población T3 casi homocigota, mostró que las plantas expresan diferentes niveles del gen *pdf1.2* (0.61 a 0.9) que se correlacionaron con los niveles de tolerancia o resistencia a las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* 448 o 1472 (datos no presentados) (Figura 5).

Análisis de segregación

Las proporciones de segregación y el análisis χ^2 indicaron que todas las líneas transgénicas mostraron una segregación 3:1, indicando una inserción del constructo. El análisis genómico de las plantas mostró preliminarmente una integración de las construcciones en las plantas T0 y pruebas de integración estable en las poblaciones de T3 (datos no presentados).

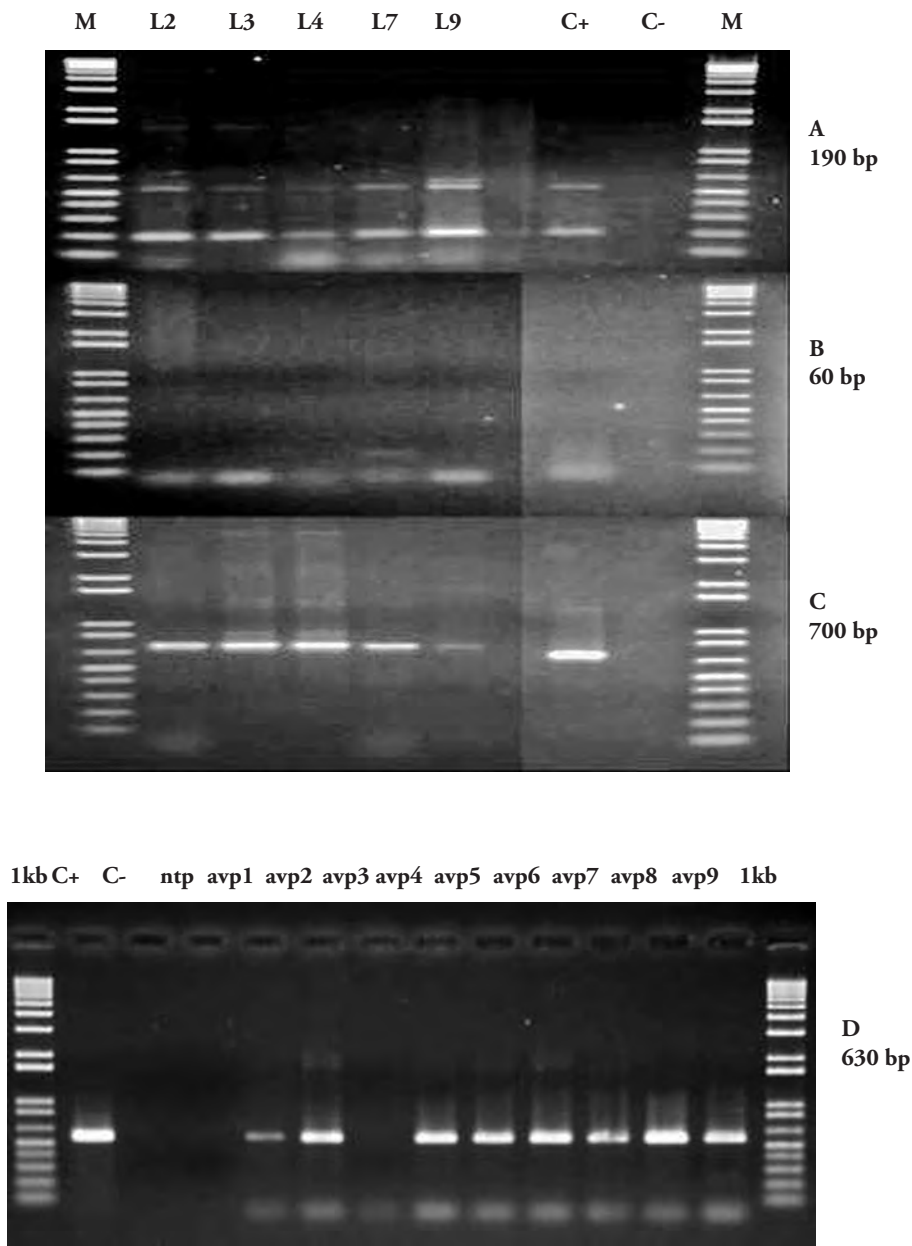


Figure 3. End point PCR gene amplification: A, 35S; B, *pdf1.2* and C, *nptII*. Lanes 1 to 10: T0 kanamycin resistant plants; C+ (A): pGEM-T plasmid with 35-S gene; C+ (B): pKYLX80 plasmid; C+ (C): pCAMBIA 2300 plasmid; C-: water; M: molecular weight marker 1 Kb. D, avp1. Lane C+: plasmid pKYLX80, lane C-: amplification reaction without DNA, lane ntp: non-transformed plant, lanes avp1 to avp9: plants derived from transformation experiments, lane 1 kb: 1 kb ladder.

Figura 3. Amplificación de genes por PCR de punto final: A, 35S; B, *pdf1.2* y C, *nptII*. Carriles 1 a 10: plantas T0 resistentes a la kanamicina; C + (A): plásmido pGEM-T con el gen 35S; C + (B): plásmido pKYLX80; C+ (C): plásmido pCAMBIA 2300; C-: agua; M: marcador de peso molecular 1 Kb. D, avp1. Carril C+: plásmido pKYLX80, carril C-: reacción de amplificación sin ADN, carril ntp: planta no transformada, carriles avp1 a avp9: plantas derivadas de experimentos de transformación, carril 1 kb: marcador de 1 kb.

from Arizona State University for providing the gene constructs. This study was financed in part by CONACYT-SAGARPA (109621) and Consejo de Ciencia y Tecnología de Guanajuato (118814).

CONCLUSIONES

El protocolo de transformación a través de *Agrobacterium* en este estudio es una alternativa viable

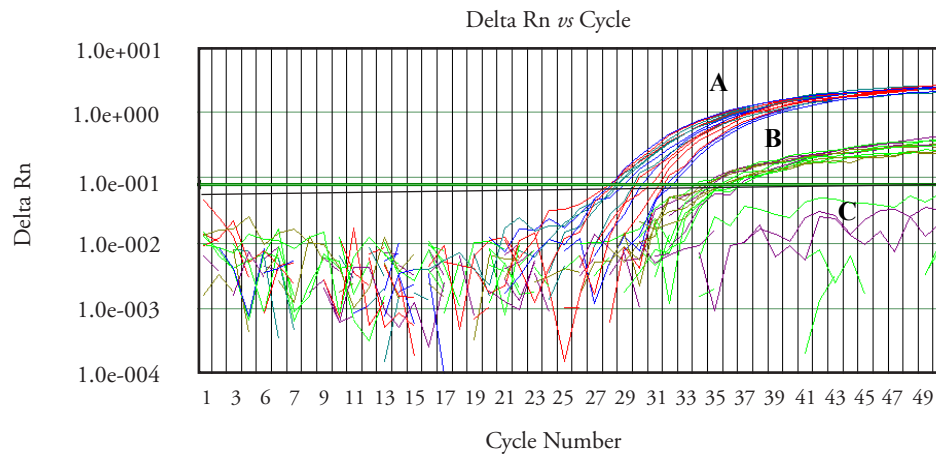


Figure 4. Amplification by q-PCR of T1 transgenic common bean plants. A: amplification of internal control ribosomal 18S; B: amplification of *pdf1.2* gene from transformed lines; C: non amplification from non-transformed lines.

Figura 4. Amplificación por q-PCR de plantas T1 transgénicas de frijol A: amplificación de control interno ribosomal 18S; B: amplificación del gen *pdf1.2* desde las líneas transformadas; C: sin amplificación desde líneas no transformadas.

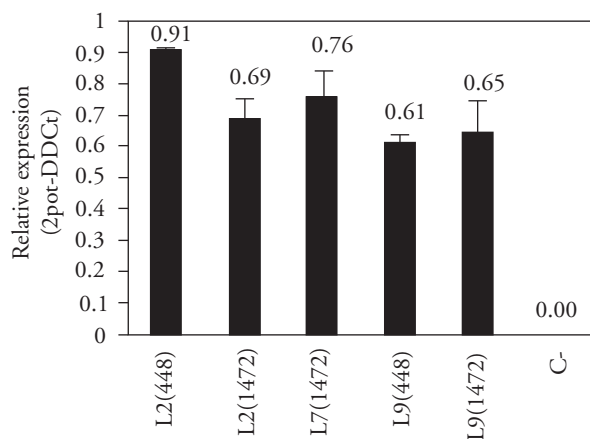


Figure 5. Levels of transcriptional expression of *pdf1.2* gene in resistant T3 common bean transgenic plants inoculated with *Colletotrichum lindemuthianum* strain 448 or 1472.

Figura 5. Niveles de expresión transcripcional del gen *pdf1.2* en plantas transgénicas T3 resistentes de frijol inoculadas con la cepa *Colletotrichum lindemuthianum* 448 o 1472.

LITERATURE CITED

- Aragão, F. J. L., G. R. Vianna, M. M. C. Albino, and E. L. Rech. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Sci.* 42:1298-1302.
- Aragão, F. J. L., S. G. Ribeiro, L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, D. P. Maxwell, E. L. Rech, and J. C. Faria. 1998.

para incorporar genes en plantas de frijol para usar en programas de mejoramiento genético. Además, es una herramienta para la genómica funcional con el fin de integrar genes valiosos o secuencias reguladoras que pueden aportar un valor agregado para el rendimiento agronómico, valor nutricional o mercado.

—Fin de la versión en Español—



- Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Breed.* 4: 491-499.
- Aragão, F. J. L., L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, S. G. Ribeiro, J. C. Smith, J. C. Sanford, J. C. Faria, and E. L. Rech. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 93: 142-150.
- Aragão, F. J. L., M. F. Grossi de Sá, E. R. Almeida, E. S. Gander, and E. L. Rech. 1992. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* 20:357-359.
- Bonfim, K., J. C. Faria, E. O. P. L. Nogueira, E. A. Mendes, and F. J. L. Aragão. 2007. RNAi-mediated resistance to *bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:717-726.
- Brasileiro, A. C. M., F. J. L. Aragão, S. Rossi, D. M. A. Dusi, L. M. G. Barros, and E. L. Rech. 1996. Susceptibility of common and tepary bean to *Agrobacterium* spp. strains and

- improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 121: 810-815.
- Castellanos-Ramos, J. Z., H. Guzmán-Maldonado, J. J. Muñoz-Ramos, and J. A. Acosta-Gallegos. 2003. Flor de Mayo Anita, a new common bean cultivar for the central region of México. Rev. Fitotec. Mex. 26:209-211.
- Cruz de Carvalho M. H., B. Van Le, Y. Zuily-Fodil, A. T. Pham Thi, and K. Tran Thanh Van. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. Plant Sci. 159:223-232.
- Delgado-Sánchez, P., M. Saucedo-Ruiz, S. H. Guzmán-Maldonado, E. Villordo-Pineda, M. González-Chavira, S. Fraire-Velázquez, J. A. Acosta-Gallegos, and M. A. Mora-Avilés. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Sci. 170:822-827.
- Dillen, W., J. De Clercq, A. Goossens, M. Van Montagu, and G. Angenon. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Theor. Appl. Genet. 94:151-158.
- Dong, J. Z., and A. McHughen. 1991. Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 10:555-560.
- Estrada-Navarrete, G., X. Alvarado-Affantranger, J. E. Olivares, C. Díaz-Camino, O. Santana, E. Murillo, G. Guillén, N. Sánchez-Guevara, J. Acosta, C. Quinto, D. Li, P. M. Gresshoff, and F. Sánchez. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. Mol. Plant Microbe Interact. 19:1385-1393.
- Faria, J. C., M. M. C. Albino, B. B. A. Dias, L. J. Cancado, N. B. da Cunha, L. M. Silva, G. R. Vianna, and F. J. L. Aragão. 2006. Partial resistance to Bean Golden Mosaic Virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line expressing a mutated *rep* gene. Plant Sci. 171:565-571.
- Franklin, C.I., T. N. Trieu, B.G. Cassidy, R.A. Dixon, and R.S. Nelson. 1993. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. Plant Cell Rep. 12:74-79.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- Gaxiola, R. A., J. Li, S. Undurraga, L. M. Dang, G. J. Allen, S. L. Alper, and G. R. Fink. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *AVP1* H⁺-pump. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11444-11449.
- Hoisington, D., M. Khairallah, and D. González de León. 1994. Laboratory Protocols. Second Edition. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico, D. F. 62 p.
- Kim, J. W., and T. Minamikawa. 1996. Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process. Plant Sci. 117:131-138.
- Leon, P., F. Planckaert, and V. Walbot. 1991. Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. Plant Physiol. 95:968-972.
- Lewis, M. E., and F. A. Bliss. 1994. Tumor formation and β -glucuronidase expression in *Phaseolus vulgaris* inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 119: 361-366.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCt} method. Methods 25:402-408.
- McClean, P., P. Chee, B. Held, J. Simental, R. F. Drong, and J. Slightom. 1991. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: Transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 24:131-138.
- Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
- Nagl, W., S. Ignacimuthu, and J. Becker. 1997. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. J. Plant Physiol. 150:625-644.
- Park S., J. Li, J. K. Pittman, G. A. Berkowitz, H. Yang, S. Undurraga, J. Morris, K. D. Hirschi, and R. A. Gaxiola. 2005. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:18830-18835.
- Penninckx, I. A. M. A., K. Eggermont, F. R. G. Terras, B. P. H. J. Thomma, G. W. De Samblanx, A. Buchala, J. P. Métraux, J. M. Manners, and W. F. Broekaert. 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. Plant Cell 8:2309-2323.
- Quintero-Jiménez, A., E. Espinosa-Huerta, J. A. Acosta-Gallegos, H. S. Guzmán-Maldonado, and M. A. Mora-Avilés. 2010a. Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 102:381-386.
- Quintero-Jiménez, A., E. Espinosa-Huerta, J. A. Acosta-Gallegos, H. S. Guzmán-Maldonado, and M. A. Mora-Avilés. 2010b. An improved method for *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrocienencia 44: 57-64.
- Raharjo, S. H. T., Witjaksono, M. A. Gomez-Lim, G. Padilla, and R. E. Litz. 2008. Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. In vitro Cell Dev. Biol. Plant 44: 254-262.
- Rech, E.L., G. R. Vianna, and F. J. L. Aragão. 2008. High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. Nature Protocols 3:410-418.
- Russell, D. R., K. M. Wallace, J. H. Bathe, B. J. Martinell, and D. E. McCabe. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. Plant Cell Rep. 12: 165-169.
- Sánchez-Valdez, I., J. A. Acosta-Gallegos, F. J. Ibarra-Pérez, R. Rosales-Serna, and S. P. Singh. 2004. Registration of 'Pinto Saltillo' common bean. Crop Sci. 44:1865-1866.
- Schardl, C. L., A. D. Byrd, G. Benzion, M. A. Altschuler, D. F. Hildebrand, and A. G. Hunt. 1987. Design and construction of a versatile system for the expression of foreign genes in plants. Gene 61:1-11.
- Zambre, M. A., J. De Clercq, E. Vranová, M. Van Montagu, G. Angenon, and W. Dillen. 1998. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) *P. acutifolius* A. Gray (tepari bean). Plant Cell Rep. 17:626-630.
- Zambre, M., A. Goossens, C. Cardona, M. Van Montagu, N. Terry, and G. Angenon. 2005. A reproducible genetic

transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. Theor. Appl. Genet. 110:914-924.