

## Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común transgénico, expresando el gen defensina de *Arabidopsis thaliana*\*

### Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in transgenic common bean expressing an *Arabidopsis thaliana* defensin gene

Elsa Espinosa-Huerta<sup>1</sup>, Anareli Quintero-Jiménez<sup>1</sup>, Bertha María Sánchez-García<sup>2</sup>, Jorge Alberto Acosta-Gallegos<sup>3</sup> y María Alejandra Mora-Avilés<sup>4§</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Bajío- INIFAP. Programa de Biotecnología. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5. C. P. 38110, A. P. 112, Celaya, Guanajuato, México. Tel +52 461 6115323. Ext. 121. (espinosa.elsa@inifap.gob.mx). <sup>2</sup>Programa de Sanidad Vegetal Tel +52 461 6115323. Ext 172, (sanchez.bertha@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Programa de frijol. Tel +52 461 6115323. Ext. 112 (acosta.jorge@inifap.gob.mx). <sup>4</sup>Programa de Biotecnología +52 461 6115323. Ext. 186. §Autora para correspondencia: mora.alejandra@inifap.gob.mx.

#### Resumen

El gen defensina de *Arabidopsis thaliana* es un péptido antimicrobiano que proporciona protección a una amplia gama de agentes patógenos. Las líneas transgénicas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Flor de Mayo Anita expresan constitutivamente el gen defensina *pdf1.2* siendo generados por la transformación de hipocotilos mediada por *Agrobacterium* sp. vía organogénesis directa. El gen *pdf1.2* es expresado bajo el control del promotor CaMV-35S en las plantas de frijol transformando a estas en resistentes al hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. La respuesta fue una reducción significativa en la formación de lesiones y la proliferación en masa de esporas en las líneas T0, T1 y T3 en comparación con las plantas no transformadas. Veinte plantas transgénicas T3 de frijol común fueron generadas a partir de 5 líneas independientes que expresaron el gen *pdf1.2*, mostrando resistencia a razas 448 y 1472 de *C. lindemuthianum* en comparación con las plantas no transformadas. Un análisis del nivel de la expresión génica del gen *pdf1.2* por Q-PCR mostro que todas las plantas que fueron consideradas resistentes o tolerantes, tuvieron niveles similares de expresión transcripcional en oposición a las plantas susceptibles, las cuales no mostraron presencia de la transcripción *pdf1.2*.

#### Abstract

The defensin gene from *Arabidopsis thaliana* is an antimicrobial peptide that provides protection to a wide array of pathogens. Transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants of cv. Flor de Mayo Anita constitutively expressing the defensin *pdf1.2* gene were generated by *Agrobacterium*-mediated transformation via hypocotyls direct organogenic regeneration. The *pdf1.2* gene under the control of promoter CaMV-35S was expressed in transformed common bean plants challenged with *Colletotrichum lindemuthianum*. The observed response was a significant reduction in the formation of lesions and spore mass proliferation in T0, T1 and T3 lines as compared to non-transformed plants. Twenty-seven T3 common bean transgenic plants from 5 independent lines expressing *pdf1.2* gene showed resistance to *C. lindemuthianum* races 448 and 1472 compared to non-transformed plants. Analysis of the level of *pdf1.2* gene expression by Q-PCR indicated that all plants considered resistant or tolerant had similar levels of transcriptional expression as opposed to susceptible plants, which did not have detectable levels of gene expression.

\* Recibido: enero de 2013  
Aceptado: junio de 2013

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L., *Agrobacterium tumefaciens*, defensina, gen *pdf1.2*, regeneración.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris* L., *Agrobacterium tumefaciens*, antimicrobial peptide, transformation, *pdf1.2* gene, regeneration.

## Introducción

La transferencia de genes, aunado a los métodos de mejoramiento convencional pueden acelerar el desarrollo de nuevos cultivos con características específicas tales como resistencia a sequía, adaptación a suelos acidificados, tolerancia a temperaturas extremas, arquitectura de plantas eficaz, mayor vida de anaquel, calidad nutricional y resistencia a enfermedades. Un componente principal en la mayoría de los enfoques genómicos, es el tener un sistema de transformación consistente para desarrollar varias estrategias de identificación de genes, como la sobre expresión de genes, supresión de genes, análisis de promotores, T-DNA tagging y expresión de genes para el mejoramiento de cultivos.

Frijol común es un cultivo con gran diversidad genética que incluye germoplasma con características agronómicas superiores, como la resistencia a condiciones climáticas adversas, resistencia a plagas y enfermedades y una alta calidad nutricional (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000); sin embargo, algunos genes que confieren características específicas pueden estar o no presentes en el germoplasma del frijol común y el mejoramiento convencional puede llevar mucho tiempo.

La necesidad de contar con un protocolo que de cómo resultado una generación eficiente de plantas, es un requisito esencial para la transformación genética de plantas. La regeneración directa organogénica de frijol común para dos cultivos comerciales, fue reportada con una alta eficiencia de regeneración (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Sin embargo, últimamente se han reportado eventos de transformación exitosa a través del bombardeo con partículas (Faria *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007).

Debido a la diversidad agroecológica donde el frijol común es cultivado, las poblaciones de patógenos relacionados son muy diversos y su importancia económica es diferente entre regiones. Las enfermedades causadas por hongos son frecuentes y muy devastadoras sobre el cultivo del frijol común. Entre estas enfermedades encontramos rolla, antracnosis, mancha angular de la hoja y pudrición de raíces y muchas especies de *Fusarium* pueden causar hasta 80% de pérdidas en el rendimiento de semilla (Schwartz *et al.*, 2005).

## Introduction

Gene transfer, together with conventional plant breeding methods, can accelerate the development of new cultivars with specific characteristics such as drought resistance, acidic soil adaptation, extreme temperatures, efficient plant architecture, long shelf life, nutritional quality and disease resistance. A key component in most functional genomic approaches is to have a consistent transformation system for developing various gene identification strategies such as gene over expression, gene suppression, promoter analysis, T-DNA tagging, and expression of genes for crop improvement.

Common bean is a crop with vast genetic resources that include 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.

The need for a protocol that results in efficient plant regeneration is an essential requirement for genetic transformation in plants. Direct organogenic regeneration of common bean for two commercial cultivars was reported with high regeneration efficiency (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Nevertheless, lately successful transformation events have been reported, including the utilization of *Agrobacterium rhizogenes* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), transformation via particle bombardment (Faria *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007).

Due to the agroecological diversity where common bean is grown, the populations of related pathogens are highly diverse and its economic importance different across regions. Diseases caused by fungus are frequent and highly devastating on the common bean crop. Among those diseases, rust, anthracnose, angular leaf spot, and root-rots and several *Fusarium* species can cause up to 80% losses in seed yield (Schwartz *et al.*, 2005).

Muchas proteínas antimicrobianas han sido identificadas y probado su actividad antimicrobiana ante hongos y bacterias. En algunas especies de plantas, las plantas transgénicas que expresan genes de proteínas antimicrobianas ajenos, en realidad adquirieron resistencia a los patógenos (Gao *et al.*, 2000; Kanzaki *et al.*, 2002; Kawata *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2006; Sjahril *et al.*, 2006; Sridevi *et al.*, 2006; Vijayan *et al.*, 2008). Las defensinas son péptidos antimicrobianos con amplio espectro contra microorganismos como las bacterias patógenas de las plantas (Bohlmann, 1994) y hongos (Thevissen *et al.*, 1996; 1999). Las defensinas son pequeños péptidos catiónicos básicos (de 45 a 54 aminoácidos) ricos en cisteína y 5 kDa de tamaño (Lay y Anderson, 2005). Las defensinas tienen la capacidad de actuar sobre las membranas de microorganismo específicos, interactuando bajo sitios específicos, con alta afinidad de unión en células de hongos que inducen los flujos de iones a través de las membranas plasmáticas de las hifas de los hongos vivos y por lo tanto la muerte del hongo (Thevissen *et al.*, 1999).

El gen *pdf1.2* es una defensina específica de hoja que se expresa ante la presencia de patógenos (Thoma y Broekaert, 1998). Este gen fue aislado de *Arabidopsis thaliana* y posee una alta homología (> 85%) con los genes que codifican para proteínas antifúngicas. Se sugirió que la función principal de las defensinas en la planta es antifúngica, que actúa, ya sea en el sitio de inoculación o en regiones remotas no inoculadas del tejido (Brown *et al.*, 2003).

El objetivo del presente estudio fue desarrollar plantas genéticamente modificadas de frijol común mediante la transformación mediada por *Agrobacterium*, que contiene el gen defensina *pdf1.2* proveniente de *A. thaliana* para conferir resistencia a hongos patógenos como *C. lindemuthianum*.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las semillas de frijol común variedad Flor de Mayo Anita (FMA) (1494-FRI-032-220302/C) (Castellanos *et al.*, 2003) fueron utilizados para los experimentos de transformación. Ambos transgénicos primarios T0 y plántulas resistentes a kanamicina a partir de plantas auto polinizadas (T1 y T3) que fueron usadas para experimentos adicionales. Generaciones T0 a T3 fueron genotipados para ver la presencia del gen *pdf1.2*, después de que mostraron resistencia a la kanamicina, rociando las plantas con 50 mg / l durante 4 días seguidos.

Many antimicrobial proteins have been identified and their antimicrobial activity tested against fungi or bacteria. In some plant species, transgenic plants expressing foreign antimicrobial protein genes actually acquired resistance to pathogens (Gao *et al.*, 2000; Kanzaki *et al.*, 2002; Kawata *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2006; Sjahril *et al.*, 2006; Sridevi *et al.*, 2006; Vijayan *et al.*, 2008). Defensins are antimicrobial peptides with wide spectrum against microorganisms like plant pathogenic bacteria (Bohlmann, 1994) and fungi (Thevissen *et al.*, 1996; 1999). Defensins are small basic cationic peptides (45 to 54 aminoacid) rich in cistein and 5 kDa in size (Lay and Anderson, 2005). Defensins have the capacity to act upon membranes of target microorganism, acting under specific, high-affinity binding sites in fungal cells inducing ion fluxes across the plasma membranes of living fungal hyphae (Thevissen *et al.*, 1999).

The *pdf1.2* gene is a leaf-specific defensin that expresses upon pathogen challenge (Thoma and Broekaert, 1998). This gene was isolated from *Arabidopsis thaliana* and possesses high homology (> 85%) with genes that code for antifungal proteins. It was suggested that plant defensins role is mainly antifungal acting either in the inoculation site or in non-inoculated remote regions of the tissue (Brown *et al.*, 2003).

The objective of the present study was to develop genetically modified common bean plants by *Agrobacterium*-mediated transformation, containing the *pdf1.2* defensin gene from *A. thaliana* to confer resistance to fungal pathogens such as *C. lindemuthianum*.

## Materials and methods

### Plant material

Seeds of common bean cultivar Flor de Mayo Anita (FMA) (1494-FRI-032-220302/C) (Castellanos *et al.*, 2003) were used in transformation experiments. Both primary transgenic plants T0 and self-pollinated progeny plants (T1 and T3) were used for further experiments.

### Defensin construct

The pKYLX80-*pdf1.2* construct contains the defensin cDNA gene (*pdf1.2*) (0.438 kb) from *Arabidopsis thaliana* (Penninckx *et al.*, 1996). The *pdf1.2* gene was regulated by

## Construcción de defensiva

El constructo pKYLX80-*pdf1.2* contiene el gen defensiva ADNc (*pdf1.2*) (0,438 kb) de *Arabidopsis thaliana* (Penninckx *et al.*, 1996). El gen *pdf1.2* fue regulada por un virus del mosaico de la coliflor (CaMV) doble, el promotor 35S y el terminador rubisco del guisante. El gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) fue seleccionado como marcador que proporciona resistencia a la kanamicina bajo el control del promotor *nopalina sintasa* (*nos*) y el terminador *nos* de *A. tumefaciens* (Figura 1). El plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium* GV2260 mediante transformación de choque térmico (Hoisington *et al.*, 1994).

## Procedimiento de transformación

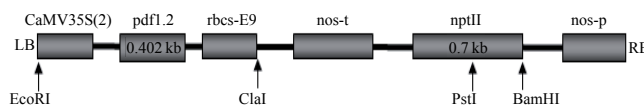
La inducción y medio de multiplicación (IMM) para la germinación de la semilla, la disección de hipocótilos y componentes de los medios fueron descritas anteriormente (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Este medio líquido se añadió a la cepa *A. tumefaciens* GV2260 crecido hasta una  $DO_{600} = 0.8$  en una proporción 5:1 (v/v), respectivamente. Los hipocótilos se incubaron en esta solución durante 10 min; el líquido se descartó y el exceso eliminado. Los explantes se colocaron en un medio de co-cultivo, que consistía en IMM (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) adicionado con 200  $\mu$ M acetosiringona.

El medio de eliminación para *Agrobacterium* consistía de IMM adicionado con 300 mg/L de Timentin (GlaxoSmithKline®). Los hipocótilos se mantuvieron en este medio durante 10 días en las mismas condiciones de cultivo. Los explantes se transfirieron a medio de selección, en los mismos componentes del medio de eliminación de *Agrobacterium* modificado con 50 mg/l de kanamicina.

Una vez regenerados los brotes via organogénica, hipocótilos con grupos de yemas se transfirieron a un medio de selección fresco cada semana y se mantuvieron en los hipocótilos hasta que una planta completa estuviera formada. En todos los pasos las placas Petri fueron selladas e incubadas a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h. La intensidad de luz fue 45-70  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/seg.

Los brotes diferenciados que permanecieron verdes en el medio de selección se separaron y cultivaron individualmente en cajas Magenta® con medio MTC (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) modificado con 50 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de Timentin. Las condiciones

a double cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and rubisco terminator from pea. The gene neomycin phosphotransferase gene (*nptII*) as selectable marker that provides kanamycin resistance under control of the *nopalina synthase* promoter (*nos*) and *nos* terminator from *A. tumefaciens* (Figure 1). The plasmid was inserted in *Agrobacterium* strain GV2260 by heat shock transformation (Hoisington *et al.*, 1994).



**Figura 1. Constructo AND-T en el vector pKYLX80.** LB= límite izquierdo; P352S= promotor CaMV35S; *pdf1.2*= gen defensiva *A. thaliana*; rbcS-E9= terminador del guisante ribulosa-1,5- bifosfato carboxilasa; nos-t= terminador nopalina sintasa; *nptII*= marcador seleccionable tipo II neomicina fosfotransferasa; nos-p= promotor nopalina sintasa; y RB= límite derecho.

**Figure 1. T-DNA Construct in pKYLX80 vector.** LB: left border; P352S: CaMV35S promoter; *pdf1.2*: *A. thaliana* defensin gene; rbcS-E9: pea ribulose-1,5-biphosphate carboxylase terminator; nos-t: nopalina synthase terminator; *nptII*: selectable marker type II neomycin phosphotransferase gene; nos-p: nopalina synthase promoter; RB: Right border.

## Transformation procedure

Induction and multiplication medium (IMM) for seed germination, hypocotyls dissection and media components were previously described (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). This liquid medium was added to *A. tumefaciens* strain GV2260 grown to an  $O.D_{600} = 0.8$  in a 5:1 proportion (v/v), respectively. Hypocotyls were incubated in this solution for 10 minutes. Liquid was discarded and excess eliminated. Explants were placed on cocultivation medium, which consisted on IMM (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) added with 200  $\mu$ M acetosyringone.

*Agrobacterium*-elimination medium consisted on IMM added with 300 mg/L Timentin (GlaxoSmithKline®). Hypocotyls remained in this medium for 10 days at the same growing conditions. Explants were transferred to selection medium, on the same components as *Agrobacterium*-elimination medium amended with 50 mg/L kanamycin.

Once *de novo* organogenic shoots regenerated, hypocotyls with bud clusters were transferred to fresh selection medium every week and remained on the hypocotyls



de cultivo fueron idénticas a la etapa anterior. Plántulas regeneradas se transfirieron a macetas llenas de Sunshine® Universal Mix (Sun Gro Horticulture Canada Ltd.) y climatizada *ex vitro*. Las nuevas plantas se colocaron en invernadero a 25-28 °C y 170-285  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$  hasta producción de semilla madura.

### Analisis por PCR punto final

Se aisló el ADN de acuerdo con Murray y Thompson (1980) usando 200 mg de tejido de la hoja por muestra. Las reacciones consistieron en la muestra de ADN (30 ng), iniciadores (0,2 mM), dNTP (0,25 mM), polimerasa Taq (1 U), cloruro de magnesio (2 mM), y amortiguador Taq (1X). El análisis por PCR se hizo utilizando iniciadores *nptII*, *pdf1.2* y promotor 35S. Los iniciadores *pdf1.2* (pGV2260-PDF 1.2) y *nptII* consistieron en sentido defensiva 5'-CAT CAT GGC TAA GTT TGC TTC C-3'; defensas antisentido 3'-CTC ATA GAG TGA CAG AGACT-5'; sentido *nptII* 5'-TCG TCG ATG ACT GGG CAC AACAGA-3'; antisentido *nptII* 3'-AAGAAG GCG ATAGAA GGC GAT GCG-5'. Los iniciadores para detectar el promotor 35S fue en sentido 35S 5' GAT AGT GGG ATT GTG CTG CA 3', antisentido 35S 5' GCA CCT ACA AAT GCC ATC A 3'. Las condiciones de amplificación para todos los conjuntos de iniciadores fueron 3 min 94 °C durante un ciclo, 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C (iniciadores *pdf1.2* y *nptII*) o 54 °C (iniciadores 35S), y 2 min a 72 °C durante 35 ciclos y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los fragmentos esperados eran 60 pb para *pdf1.2*, 700 pb para *nptII* y 195 pb para el promotor 35S.

### Análisis en tiempo real por PCR cuantitativa

#### Analisis de detección de transgen

Los iniciadores y la sonda fueron diseñados utilizando el programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) a partir de la secuencia del gen *pdf1.2* (NCBI, NM\_123809). El gen defensiva, iniciadores específicos y sondas para detectar el gen *pdf1.2* son sentido 5'-AGT TGT GCG AGA AGC CAA GT-3', antisentido 3'-GCA TGC ATT ACT GTT TCC GCAA-5' y la sonda TaqMan® 5'-CCCTGA CCA TGT CCC -3' con una etiqueta colorante FAM™ y el enlazante al surco menor (MGB) en el extremo 5', y el colorante desactivador de fluorescencia (NFQ) en el extremo 3'. El control interno 18S ribosomal (4319413E, Applied Biosystem) fue marcado con fluoroforo VIC. Las condiciones de amplificación consistieron en 95 °C, 10 min (desnaturalización), 45 ciclos (amplificación PCR), 95 °C, 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C, 1 min (extensión) (ABI PRISM®7000 Sequence).

until a full plant was completely formed. In all steps petri dishes were sealed and incubated at 25 °C with a 16 h photoperiod. Light intensity was 45-70  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ .

Differentiated shoots that remained green in selection medium were separated and grown individually in Magenta® boxes with ERM medium (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010) amended with 50 mg/L kanamycin and 300 mg/L Timentin. Growth conditions were identical to the previous stage. *in vitro* regenerated plantlets were transferred to pots filled with Sunshine® Universal Mix (Sun Gro Horticulture Canada Ltd.) and acclimatized. New plants were placed in greenhouses at 25-28 °C and 170-285  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$  until maturity.

### End point PCR analysis

DNA was isolated according to Murray and Thompson (1980) using 200 mg of leaf tissue per sample. Reactions consisted on DNA sample (30 ng), primers (0.2  $\mu\text{M}$ ), dNTP's (0.25 mM), Taq polimerase (1 U), magnesium chloride (2 mM), and Taq buffer (1X). PCR analysis was done using *nptII*, *pdf1.2* and 35S promoter primers. The *pdf1.2* primers (pGV2260-pdf1.2) and *nptII* consisted on sense defensin 5'-CAT CAT GGC TAA GTT TGC TTC C-3', antisense defensin 3'-CTC ATA GAG TGA CAG AGA CT-5'; sense *nptII* 5'-TCG GCT ATG ACT GGG CAC AACAGA-3', antisense *nptII* 3'-AAGAAG GCG ATA GAA GGC GAT GCG-5'. Primers for detecting 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'. Amplification conditions for all sets of primers were 3 min 94 °C for one cycle, 1 min 94 °C, 1 min 55 °C (*pdf1.2* and *nptII* primers) or 54 °C (35S primers), and 2 min 72 °C for 35 cycles and a final extension 7 min 72 °C. The expected fragments were 60 bp for *pdf1.2*, 700 bp for *nptII* gene and 195 bp for 35S promoter.

### Real time quantitative PCR analysis

#### Transgene detection analysis

Primers and probe were designed using the program Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) starting from the sequence of *pdf1.2* gene (NCBI, NM\_123809). Defensin gene specific primers and probe to detect the *pdf1.2* gene were sense 5'-AGT TGT GCG AGA AGC CAA GT-3',

## Análisis de la expresión de genes

El ARN celular total se extrajo del tejido de las hojas utilizando Trizol<sup>®</sup> (Reagent, Carisbald, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se sintetizó usando RT-PCR mediante One-Step RT-PCR Master Mix de Applied Biosystems (Catalago N° 4309169). El sistema TaqMan<sup>®</sup> mencionado anteriormente se utilizó para la amplificación de genes. Las condiciones de amplificación consistieron en 48°C por 30 min (transcripción inversa), 95°C por 10 min (desnaturalización), 45 ciclos (amplificación por PCR), 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min (extensión) (ABI PRISM<sup>®</sup>, Sistemas de detección de secuencias 7000, Applied Biosystems).

La proporción de la expresión relativa se calculó mediante la normalización del gen objetivo Ct (*pdf1.2*) con referencia al gen control Ct (18S) para obtener sólo la eficiencia del gen defensiva ( $\Delta Ct = Ct_{pdf1.2} - Ct_{18S}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001).

## Ensayos de plantas transgénicas para resistencia a hongos

### Condiciones de crecimiento para *Colletotrichum lindemuthianum*

Los patotipos 448 y 1472 (ATCC MYA-2277) de *C. lindemuthianum* (Pastor-Corrales, 1991) fueron cultivados en agar (Difco<sup>®</sup>), harina de maíz durante diez días. Las esporas fueron recuperadas mediante la adición de 1-2 ml de agua estéril y añadiendo 0.5% de Tween 20 y se cuantificaron ajustando la concentración del medio de inoculación a  $1.5 \times 10^6$  conidios / ml (IM).

### Inoculación de hojas tomadas de plantas T0 y plántulas T1 con *C. lindemuthianum*

Tres hojas trifoliadas fueron tomadas de tres líneas T0 transformadas y plantas FMA no transformadas 60 días después de la transferencia al invernadero. Los trifolios fueron colocados en cámaras húmedas e inoculadas mediante el rociado de IM con patotipo 1472 de *C. lindemuthianum*.

Plántulas T1 resistentes a kanamicina fueron germinadas en macetas planas con Sunshine<sup>®</sup> Growing Mix #6, (Canadá) en un invernadero a 22-25°C. Cincuenta plantas fueron inoculadas con homocigotos y heterocigotos a 17 días después de que germinaran con IM patotipo 1472 de *C. lindemuthianum*. El desarrollo de la enfermedad se evaluó 10 días después de la inoculación sobre la superficie de la hoja cubiertos con lesiones en T0 y plantas T1 (Garrido-Ramírez y Romero-Cova, 1989).

antisense 3'-GCATGCATTACTGTTTCCGCAA-5' and the TaqMan<sup>®</sup> probe 5'-CCC TGA CCA TGT CCC-3' with a FAM<sup>™</sup> 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 of the plants using Trizol<sup>®</sup> (Reagent, Carisbald, CA, USA) following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized using RT-PCR throughout One-Step RT-PCR Master Mix from Applied Biosystems (Cat. No.4309169). TaqMan<sup>®</sup> system mentioned above 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), 95°C, 15 sec and 60°C, 1 min (ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems).

The relative expression ratio was calculated by normalizing the target gene Ct (*pdf1.2*) with reference housekeeping gene Ct (*18S*) to obtain only the efficiency of the defensin gene ( $\Delta Ct = Ct_{pdf1.2} - Ct_{18S}$ ) (Livak and Schmittgen, 2001).

## Assays of transgenic plants for fungal resistance

### Growth conditions for *Colletotrichum lindemuthianum*

*C. lindemuthianum* pathotypes 448 y 1472 (ATCC MYA-2277) (Pastor-Corrales, 1991) were growth on Agar (Difco<sup>®</sup>) corn flour during ten days. Spores were recuperated by adding 1-2 mL of sterile water and added with 0.5% Tween 20 and were quantified adjusting the concentration of the inoculation media to  $1.5 \times 10^6$  conidia/ mL (IM).

### Inoculation of detached leaves of T0 plants and T1 seedlings with *C. lindemuthianum*

Three trifoliolate leaves were detached from three T0 transformed lines and non-transformed FMA plants 60 day after transfer to greenhouse. Trifolia were placed in humid chambers and inoculated by IM spraying with *C. lindemuthianum* pathotype 1472.

T1 seedlings were germinated in flat pots with Growing Mix #6, Sunshine<sup>®</sup> (Canada) in a greenhouse at 22-25°C. Fifty plants were inoculated at 17 days after germinating

### **Inoculación de plantulas T3 con *C. lindemuthianum***

Cien semillas de cada línea T3 transformada y los genotipos control FMA, Victoire (susceptible) (Dufresne et al., 2000.), y Pinto Saltillo (tolerantes) (PV - Reg. Núm. FRI-052-140890) (Acosta-Gallegos et al., 1995) fueron germinadas en macetas planas con Sunshine® Growing Mix # 6 (Canadá) en un invernadero a 22-25 °C. Cincuenta plantas fueron inoculadas a los 17 días después de la germinación con la cepa 448 de *C. lindemuthianum* y cincuenta con la cepa 1472. Las plantas fueron inoculadas rociando 2 ml de IM en la parte de atrás de las hojas simples. Las plantas inoculadas se incubaron en una cámara de crecimiento húmeda por 72 h con una humedad relativa de 90% y una intensidad luz de 45 nmol/m<sup>2</sup>/sec. Una vez transcurrido este tiempo, las plantas se mantuvieron durante diez días bajo condiciones normales de invernadero hasta la evaluación de la enfermedad.

La enfermedad se evaluó con una escala de 0 a 3, donde 0: es una planta resistente y sin síntomas visibles de la enfermedad; 1 corresponde a una planta tolerante con unos pequeños puntos necróticos en la parte posterior de la hoja; 2 corresponde a una planta con daños moderada como círculos necróticos en ambos lados de la hoja y lesiones en el peciolo o tallo; y 3 corresponde a plantas atacadas severamente con decoloración y pérdida de hojas, abundantes lesiones necróticas en el tallo y peciolos (Garrido Ramírez y Romero-Cova, 1989).

### **Análisis de la progenie de plantas transgénicas**

Después de esto, de 40 a 50 semillas de 5 líneas endogámicas de frijol común transgénicos fueron analizadas por PCR de amplificación fragmentada para el gen *pdf1.2*. Las plantas que amplifican el fragmento del gen *pdf1.2* fueron evaluadas y el análisis estadístico Chi-cuadrado se realizó para determinar las proporciones de segregación y el número de eventos de inserción.

## **Resultados y discusión**

### **Transformación de plantas**

La transformación mediada por *A. tumefaciens* de *P. vulgaris* fue desarrollado en base a los reportes publicados anteriormente sobre regeneración exitosa (Delgado-Sánchez et al., 2006; Quintero-Jiménez et al., 2010). Nos referiremos al explante

with IM *C. lindemuthianum* pathotype 1472. Disease development was scored 10 days after inoculation based on leaf surface covered with lesions in T0 and T1 transformed lines (Garrido-Ramírez and Romero-Cova, 1989).

### **Inoculation of T3 seedlings with *C. lindemuthianum***

One hundred seeds from each transformed T3 line and control genotypes FMA, Victoire (susceptible) (Dufresne et al., 2000), and Pinto Saltillo (tolerant) (PV - Reg. Núm. FRI-052-140890) (Acosta-Gallegos et al., 1995) were germinated in flat pots with Growing Mix #6, Sunshine® (Canada) in a greenhouse at 22-25 °C. Fifty plants were inoculated at 17 days after germinating with strain 448 of *C. lindemuthianum* and fifty with strain 1472. Plants were inoculated spraying 2 mL of IM on the back side of simple leaves. Inoculated plants were incubated in a humid growth chamber by 72 h under 90% relative humidity and a light intensity of 45 nmol/m<sup>2</sup>/s-1. Once this time elapsed, plants were maintained for ten days under normal greenhouse conditions until disease readings were taken.

Disease score was conducted with a 0 to 3 scale, where 0: is a resistant plant without visible symptoms of the disease; 1 corresponds to a tolerant plant with few small necrotic points on the back of the leaf; 2 corresponds to a plant with moderate damage as necrotic circles on both sides of the leaf and lesions on the petiole or stem; and 3 corresponds to plants severely attacked with discoloration and leaf loss, abundant necrotic lesions on stem and petioles (Garrido-Ramírez and Romero-Cova, 1989).

### **Analysis of progeny of transgenic plants**

Forty to 50 seeds from 5 selfed common bean transgenic lines were analyzed for *pdf1.2* gene fragment amplification by PCR. The plants that amplified the *pdf1.2* gene fragment were scored and Chi-square statistical analysis was performed to determine segregation ratios and number of insertional events.

## **Results and discussion**

### **Plant transformation**

*A. tumefaciens*-mediated transformation of *P. vulgaris* was developed based on successful regeneration reports previously published (Delgado-Sánchez et al., 2006; Quintero-Jiménez

principal como hipocotíleo en lugar del eje del embrión como se informó anteriormente, debido a que las estructuras derivadas de la germinación y la ampliación del embrión deriva en la estructura del hipocotíleo (Figura 2a). A partir de los cuatro diferentes ensayos de transformación con *A. tumefaciens* en var. Flor de Mayo Anita, se observó una respuesta positiva de la organogénesis directa de los hipocotíleos. El complejo de tejido de brotes organogénicos formados cerca de las células suspensoras indica que el potencial germinativo y regenerador es trasladado a ese lugar facilitando y promoviendo el desarrollo de 2-3 brotes, cada brote tiene plena capacidad para el desarrollo de una planta entera (Figura 2b). Sin embargo, no todos los nuevos brotes se desarrollan con éxito en una planta completa, de hecho la mayoría de los casos el potencial morfogénico fue concentrado en un solo brote (Figura 2c).

Una vez formados los brotes organogénicos, estos permanecieron en los hipocotíleos hasta el desarrollo de la planta completa (Figura 2d). En cada transferencia de medio fresco, una capa delgada del hipocotíleo fue eliminado hasta que la planta era independiente del hipocotíleo. Después de la una formación completa de la planta, las raíces formadas en la base del tallo indica que la nueva planta es independiente del hipocotíleo, esta fase tomo 2 meses para elongación y enraizamiento completo (Figura 2e). Todas las líneas T0 mostraron estados fenológicos similares (Figura 2f) en comparación con las plantas no transformadas, estas florecieron y produjeron semillas al mismo ritmo que las plantas testigo (Figura 2g y 2h).

De acuerdo con nuestras observaciones, algunos de los factores que deben ser tomados en consideración para una regeneración constante de plantas transformadas son edad de la semilla (semillas cosechadas el año previo a los experimentos no son adecuados para una regeneración razonable, generalmente las poblaciones de frijol común cosechadas dos a tres años anteriores al experimento tienen mejor capacidad fisiológica para la regeneración), y el tamaño y color de la semilla tiene que ser homogénea dentro de la población a utilizar.

### Análisis genómico

Líneas T0 a T3 resistentes a la kanamicina fueron analizadas por PCR punto final para verificar la inserción de los principales genes en el genoma de la planta (*nptII*, 700 pb; *35S*, 190 pb, y *pdf1.2*, 60 pb) (Figura 3). Estos resultados fueron confirmados por Q-PCR que muestra la amplificación del gen *pdf1.2* en plantas T1 a T3 amplificadas para todos los componentes del árbol previamente (L2, L3, L4, L7 y L9) (Figura 4).

*et al.*, 2010). We will refer to the main explant as hypocotyl instead of the previously reported embryo axis, because the structures derived from germination and enlargement of the embryo derives in hypocotyl structure (Figure 2a). From four different transformation trials with *A. tumefaciens* on cv. Flor de Mayo Anita, a positive direct organogenesis response of hypocotyls was observed. 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 2-3 shoots, each of them with full capacity to develop a whole plant (Figure 2b). However, not all *di novo* shoots gave rise to whole plants, most of the cases only one shoot developed in a full single plant concentrating the morphogenic potential in only one shoot to become a plant (Figure 2c).

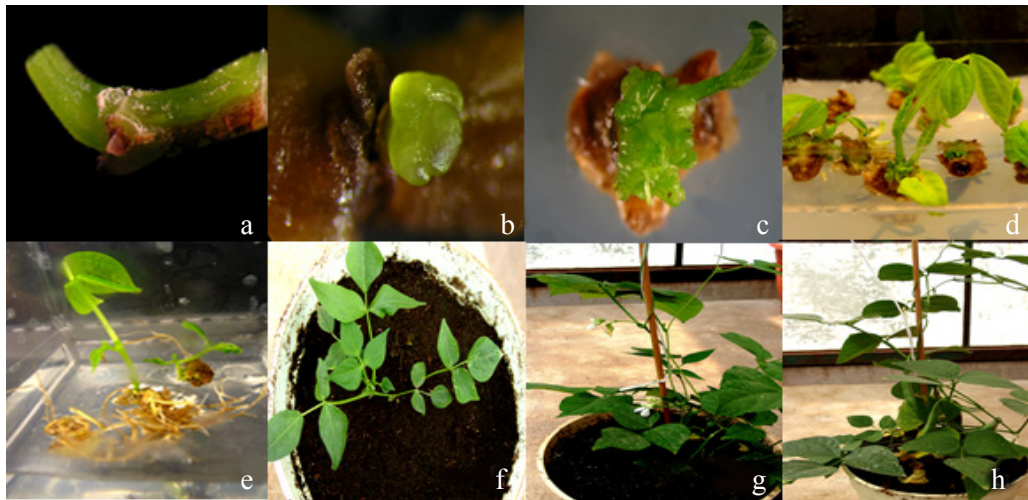
Once the organogenic shoots formed, they remained in the hypocotyls until full plant development (Figure 2d). In each fresh medium transfer, a thin layer of the hypocotyl was eliminated until the plant was independent from the hypocotyl. After full plant formation, roots formed at the stem base indicating that the new plant is independent from the hypocotyl, this phase took 2 months for full elongation and rooting (Figure 2e). All T0 lines showed similar phenological stages (Figure 2f) compared to non-transformed plants, they flowered and set seeds at the same rate as control plants (Figure 2g and 2h).

According to our observations, some factors that need to be taken into consideration for a consistent regeneration of transformed plants are seed age (seeds harvested the year before to the experiments are not suitable for a reasonable regeneration, usually common bean populations harvested two to three years previous to the experiment have better physiological ability for regeneration), and seed size and color have to be homogeneous within the population to use.

### Genomic analysis

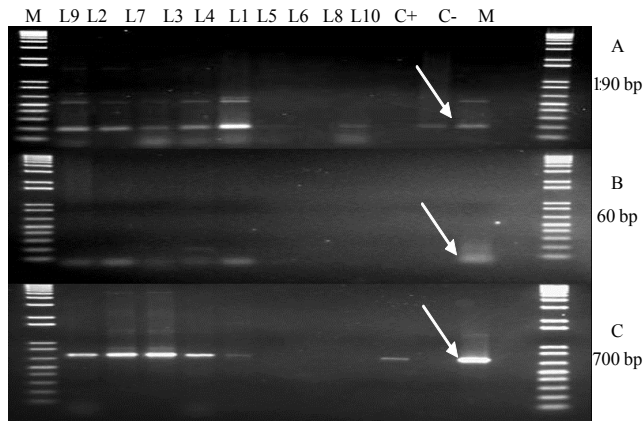
The T0 kanamycin-resistant lines were analyzed by end point PCR to verify the insertion of the main genes in the plant genome (*nptII*, 700 bp; *35S*, 190 bp; and *pdf1.2*, 60 bp) (Figure 3). These results were confirmed by Q-PCR showing amplification of *pdf1.2* gene in the T1 lines that amplified for all tree components previously (L2, L3, L4, L7 and L9) (Figure 4).





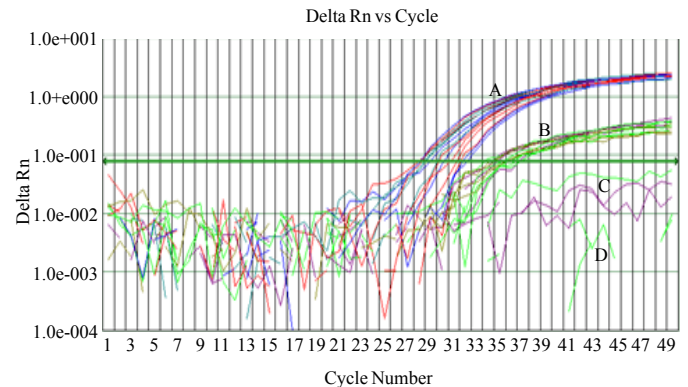
**Figura 2.** Ruta transformación mediada por *Agrobacterium* para frijol común. a) hipocótilos usados como explante principal para la transformación; b) hipocótilo con brotes nuevos formados en la zona del hipocótilo suspensor, 4 días después de la inoculación (DAI); c) brotes diferenciados resistentes a kanamicina 20DAI ( $R^k$ ); d) plántulas  $R^k$  que permanecieron en su explante original hasta la formación de raíces; e) las plántulas de 5-7 cm de altura con 1-2 hojas trifoliadas y sistema radicular diferenciado con 60 días en medio para enraizamiento; f) planta de frijol común T0 transferida al suelo (20 cm de altura); g) plantas T0 a 50% de floración, 20 días después de transferida a invernadero; y h) la formación de vainas 18 días después de 50% de floración.

**Figure 2.** Route of common bean *Agrobacterium*-mediated transformation. a) hypocotyls used as main explant for transformation; b) hypocotyl with di novo shoots formed at the hypocotyl suspensor area 4 days after inoculation (DAI); c) differentiated shoots kanamycin resistant 20DAI ( $R^k$ ); d) plantlets  $R^k$  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; and h) pods formation 18 days after 50% flowering.



**Figura 3.** Amplificación de genes por PCR punto final: a) 35S; b) pdf1.2; y c) nptII. Los carriles 1 a 10= T0 plantas resistentes a kanamicina; C+ (A)= plásmido pGEM-T con el gen 35S; C+ (B): plásmido pKYLX80; C+ (C)= plásmido pCAMBIA 2300; C-= agua; M= peso del marcador molecular 1 Kb.

**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 35S gene; C+ (B): pKYLX80 plasmid; C+ (C): pCAMBIA 2300 plasmid; C-: water; M: molecular weight marker 1 Kb.



**Figura 4.** Amplificación por Q-PCR de plantas T1 de frijol transgénico; A. La amplificación del control interno 18S ribosomal; B. La amplificación del gen pdf1.2 a partir de líneas transformadas (L2, 3, 4, 7 y L9); C. No amplificación de las líneas transformadas (L1, 5, 6, 8 y L10); y D. líneas no transformadas.

**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 (L2, 3, 4, 7 and L9); C. Non amplification from transformed lines (L1, 5, 6, 8 and L10); and D. Non-transformed lines.

## Inoculación de plantas y detección de resistencia a antracnosis

### T0 y T1 líneas transformadas

Diez días después de la inoculación de T0 se desprendieron hojas de frijol común con hongos patógenos de *C. lindemuthianum* con la cepa 1472, las líneas L3, L4 y L9 tuvieron menor superficie de hoja dañada con bajos niveles de resistencia (14, 50 y 33%, respectivamente), en comparación con las plantas no transformadas (Tabla 1). Sin embargo, una prueba adicional de tolerancia fue el hecho de que había 80% menos de masas de esporas en los pecíolos de la línea L3 que en el control, que muestran 100% de la superficie cubierta con esporas (Figura 5a y 5b). El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre las medias de las evaluaciones de la enfermedad ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 1. Superficie promedio de la de hoja cubierta con lesiones de T0 y T1 de plantas de frijol común resistentes a kanamicina, 10 días después de la inoculación con la cepa 1472 de *C. lindemuthianum*.**

**Table 1. Average leaf surface covered with lesions of T0 and T1 common bean plants 10 days after inoculation with *C. lindemuthianum* strain 1472.**

Line	T0		T1	
C-	61.1 <sup>a</sup> (0) <sup>b</sup>	a <sup>c</sup>	80.0±13.5 (0) <sup>b</sup>	a
CT	-		82.0±12.1 (0)	a
L2	-		50.0±9.0 (37.5)	b
L3	52.0 (14.8)	b	82.5±13.5 (0)	a
L4	30.0 (50.0)	d	67.5±13.5 (15.6)	b
L7	-		36.8±7.8 (54.0)	c
L9	40.0 (33.0)	cd	33.3±7.8 (58.4)	c

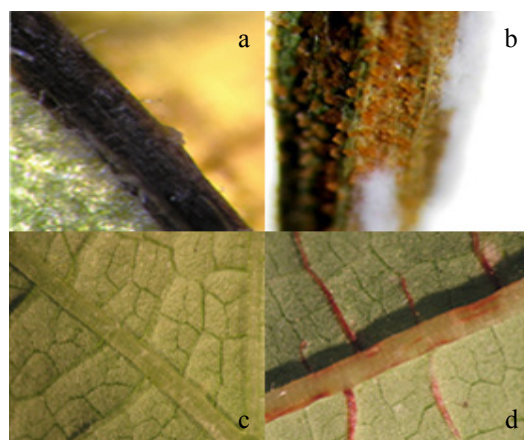
<sup>a</sup>Numbers represent average of 3 experimental replicates; <sup>b</sup> percentage of level of resistance; <sup>c</sup>different letters indicate significant difference at  $\alpha = 0.05$  by Tukey's standardized range test.

Plantas inoculadas T1 L3 y L4 con la cepa 1472 mostraron una alta susceptibilidad, similar a las plantas control transformadas (no *pdf1.2*), y a las plantas no transformadas, indicando diferencias en la respuesta entre los dos bioensayos para T0 y T1 (Tabla 1). Las líneas L2, L7 y L9 mostraron evidencia de menor lesión de antracnosis (37 a 58% menos daños que las plantas no transformadas) (Tabla 1, Figura 5c y 5d). Comparación por pares de Tukey mostró que las líneas transgénicas L2, L4, L7 y L9 tenían evaluaciones de enfermedad más bajas que las plantas control y que estas evaluaciones diferían entre líneas transgénicas aumentando los niveles de protección en líneas L7 y L9 (Tabla 1).

## Plant inoculation and screening for anthracnose resistance

### T0 and T1 transformed lines

Ten days after the inoculation of T0 common bean detached leaves with fungal pathogen *C. lindemuthianum* strain 1472, lines L3, L4 and L9 were less leaf-surface damaged with modest levels of resistance (14, 50 and 33%, respectively), compared to non-transformed plants (Table 1). However, further evidence of tolerance was the fact that there was 80% less spore masses on petioles of line L3 than on the control, which displayed a 100% of the area covered with spores (Figure 5a and 5b). The analysis of variance indicated significant differences among mean disease scores ( $p < 0.001$ ).



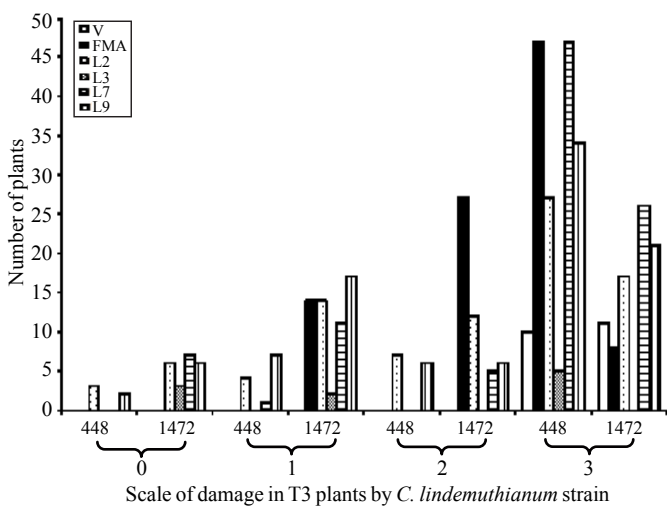
**Figura 5. Ensayo de plantas de frijol común T0 y T1 para resistencia a la cepa 1472 de *C. lindemuthianum* 10 días después de la inoculación. a) hoja desprendida de T0 L3 línea transgénica que muestra pocas esporas en los pecíolos 7 días después de la inoculación; b) hojas desprendidas no transformada, las flechas indican las esporas de masas en pecíolos; c) la planta transgénica T1 L9, 10 días después de la inoculación, sin signos de antracnosis; y d) planta no transformada con lesiones profundas por antracnosis en las principales venas de la hoja.**

**Figure 5. Assay of T0 and T1 common bean plants for resistance to *C. lindemuthianum* strain 1472 10 days after inoculation. a) detached leaf of T0 L3 transgenic line showing few spores on the petiole 7 days after inoculation; b) non transformed detached leaf, arrows indicate mass spores in petioles; c) transgenic T1 L9 plant 10 days after inoculation with no signs of anthracnose; and d) non transformed plant showing deep lesions by anthracnose in main leaf veins.**

T1 L3 and L4 plants inoculated with strain 1472 showed high susceptibility similar to the transformed control plants (no *pdf1.2*), and non-transformed plants, indicating differences

### Expresión transcripcional del gen *pdf1.2* y el análisis del bioensayo para hongos en plantas T1

El análisis de la expresión génica de *pdf1.2* en líneas T1 mostraron que la línea transgénica L9 (0.90) tuvieron mayor expresión relativa del gen *pdf1.2* que las otras cuatro líneas T1; L7 (0.66), L2 (0.53), L4 (0.50) y L3 (0.41) ( $p < 0.001$ ) (Figura 6). Cuando se compararon los valores de expresión relativa con el promedio de la superficie de la hoja cubierta con las lesiones en las plantas T1 resistentes a kanamicina, se encontró que eran inversamente proporcional, por la disminución de la superficie cubierta con lesiones conforme la expresión relativa del gen *pdf1.2* incrementaba (Tabla 1).



**Figura 6.** Los niveles de resistencia del T3 de frijol líneas transgénicas a *C. lindemuthianum* cepa 448 ó 1472; 15 días después de la inoculación. 0= resistente; 1= tolerante; 2= susceptibles; 3= extremadamente susceptibles ( $p < 0.001$ ).

**Figure 6.** Levels of resistance of T3 common bean transgenic lines to *C. lindemuthianum* strain 448 or 1472 15 days after inoculation. 0= resistant; 1= tolerant; 2= susceptible; 3= extremely susceptible ( $p < 0.001$ ).

Otros parámetros no cuantitativos, tales como las colonias que cubren el pecíolo o el nivel de infestación sobre las venas principales, son elementos que deben ser tomadas en consideración en la medición de la resistencia debido al gen *pdf1.2*. Observaciones similares fueron hechas por Kanzaki *et al.* (2002) en líneas de arroz transformadas con el gen *defensina* de wasabi, que mostró resistencia al añublo del arroz en diferentes niveles, no necesariamente asociado con el nivel de la expresión génica.

En contraste con los resultados de Vijayan *et al.* (2008) observaron la inhibición de la elongación de las raíces de plantas de *A. thaliana*, disminuyendo la posterior

in response between the two bioassays for T0 and T1 (Table 1). L2, L7 and L9 lines showed evidence of less anthracnose lesions (37 to 58% less damage than non-transformed plants) (Table 1; Figure 5c and 5d). Tukey's pairwise comparison showed that transgenic lines L2, L4, L7 and L9 had lower disease scores than control plants and that these scores differed among transgenic lines increasing the levels of protection in lines L7 and L9 (Table 1).

### T3 transformed lines

The analysis of T3 plants inoculated with *C. lindemuthianum* strains 448 or 1472 identified 27 resistant plants. Three plants of line L2 and two of L9 were resistant to strain 448, whereas six L2, three L3, seven L7 and six L9 plants were resistant to strain 1472. The rest of the plants in the population were tolerant or susceptible, including non-transformed FMA plants (Figures 6 and 7).



**Figura 7.** Los niveles de respuesta del frijol inoculados con *Colletotrichum lindemuthianum*. 0 = plantas resistentes sin lesiones; 1 = planta= tolerante con algunos puntos necróticos en la parte posterior de la hoja; 2= planta susceptible con lesiones necróticas en ambos lados de la hoja, y 3= planta susceptible con daños graves, incluso la pérdida de hojas, necrótico manchas, decoloración o clorosis y la decadencia hoja.

**Figure 7.** Levels of response of common bean inoculated with *Colletotrichum lindemuthianum*. 0= resistant plants without lesions; 1= tolerant plant with some necrotic dots at the back of the leaf; 2= susceptible plant with necrotic lesions on both sides of the leaf; and 3= susceptible plant with severe damage including loss of leaves, necrotic spots; discoloration or chlorosis and leaf decay.



ampliación de pelos radicales, lo que indica el potencial de la defensina para afectar el crecimiento vegetal de las plantas transformadas, en la investigación reportada en este documento, no hay evidencia de alteraciones fenotípicas derivados de la expresión del gen *pdf1.2* en plantas de frijol transformadas.

### Expresión transcripcional del gen PDF 1.2 y el análisis de bioensayo por hongos en plantas T3

La expresión transcripcional del gen PDF 1.2 en plantas tolerantes y resistentes a T3 *C. lindemuthianum* mostró que las plantas L2 resistentes a la cepa 448 expresaron el nivel más alto de gen *pdf1.2* (0.91), mientras que las plantas de las líneas L2 (1 472), L7 (1 472) y L9 (448 ó 1 472) tenían niveles más bajos de expresión, ya sea una respuesta de resistencia o tolerancia (0.61 - 0.76) (Figura 7). Por otra parte, no hubo diferencia estadística en los niveles de expresión entre las plantas resistentes y tolerantes.

El análisis de plantas T3 inoculadas con cepas 448 ó 1 472 de *C. lindemuthianum* identificó 27 plantas resistentes. Tres plantas de la línea L2 y dos L9 de fueron resistentes a la cepa 448, mientras que seis L2, tres L3, siete L7 y seis plantas L9 fueron resistentes a la cepa 1 472. Se observó un análisis de la interacción de dos vías de la varianza entre las líneas transgénicas y cepas *C. lindemuthianum* ( $p < 0.028$ ), donde las plantas de las líneas L2, L3, L7 y L9 fueron resistentes a la cepa 1472 y las plantas de las líneas L2 y L9 fueron resistentes a la cepa 448 en comparación con el control FMA y Victoire (Figura 8 y 9). El resto de las plantas de la población fueron tolerantes o susceptibles, incluyendo las plantas FMA no transformadas.

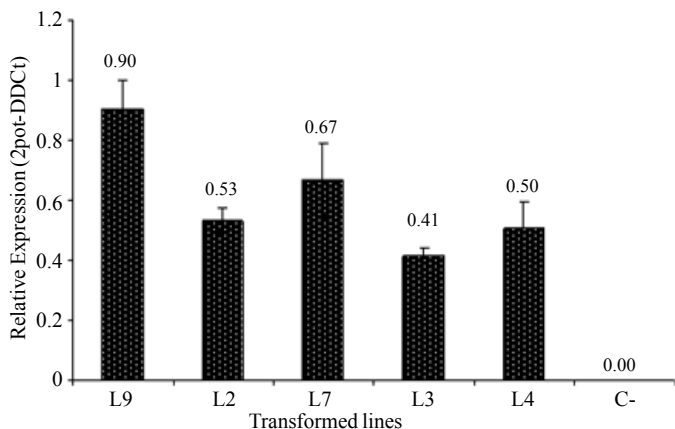


Figura 8. *pdf1.2* análisis de la expresión génica mediante PCR Q de líneas T1.

Figure 8. *pdf1.2* gene expression analysis by Q PCR of T1 lines.

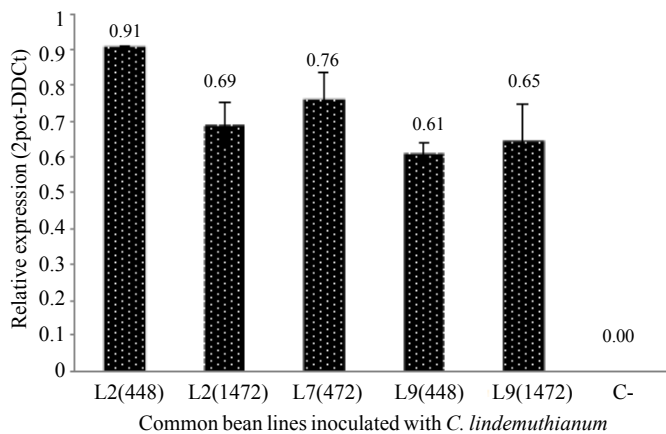
Results from different transformation experiments with the *defensin* gene have been published and the assays for resistance had shown different results, for example, two reports claim that plants showed tolerance to the pathogens. Wang *et al.* (1999) transformed canola with the *DDR 206 defensin* gene from pea and obtained plants with tolerance to *Leptosphaeria maculans* with reaction values significantly lower from those of non-transformed plants. The other report by Kanzaki *et al.* (2002) indicates that transformed rice with the *wasabi* defensin gene (WT) showed up to 50% reduction of lesion size when T2 lines were inoculated with the fungus *Magnaporthe grisea* which causes the rice blast disease. Other research papers reported a more consistent and exceptional levels of resistance.

Terras *et al.* (1995) transformed tobacco with the *AFP2* defensin gene isolated from raphanus which conferred resistance against *Alternaria longipes*, diminishing the area covered with lesions of T2 plants between 7 and 8 times less than heterozygote and non-transformed plants, respectively. In the same way, Sjahril *et al.* (2006) inserted the *WjAMP-1* defensin gene isolated from wasabi into the genome of *Phalaenopsis* Watoboushi '#6.13' conferring strong resistance against *Erwinia carotovora*, transformed plants were symptomless one week after inoculating the bacteria on the leaf surface while the inoculated control plants died in the same time period.

Gao *et al.* (2000) worked with a *alfAFP* defensin gene from alfalfa (*Medicago sativa*) that was inserted into potato giving strong resistance to *Verticillium dahliae* with values of the AUDCP (area under the disease progress curve) lower that resistant control plants. Furthermore, Koike *et al.* (2002) transformed tomato with *Rs-AFP2* which provided resistance to a wide spectrum of pathogens such as *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia Solani* and *Verticillium dahliae*.

*In vitro* assays performed by Terras *et al.* (1995) who studied the *in vitro* activity of *Rs-AFP2* on the growth of the fungus *Alternaria longipes*, reports fragmentation and reduction in fungus growth rate. In other *in vitro* assay Gao *et al.* (2000) demonstrated that the *alfAFP* gene at a concentration of 5 µg/mL reduced the number of germinated spores of *V. dahliae* by 50%. In the same way, Sjahril *et al.* (2006) directly inoculated *E. carotovora* on four points in the leaf of *Phalaenopsis* transformed with the *WjAMP* gene obtaining high resistance against these bacteria, whereas the control plants were highly susceptible to the disease.





**Figura 9.** Los niveles de expresión transcripcional del gen *pdfl.2* en T3 plantas transgénicas de frijol resistentes inoculados con la cepa de *C. lindemuthianum* 448 ó 1472.

**Figure 9.** Levels of transcriptional expression of *pdfl.2* gene in resistant T3 common bean transgenic plants inoculated with *C. lindemuthianum* strain 448 or 1472.

Los resultados de diferentes experimentos de transformación con el gen defensiva se han publicado y los ensayos para resistencia mostraron resultados diferentes, por ejemplo, dos informes afirman que las plantas mostraron tolerancia a los patógenos. Wang *et al.* (1999) en canola transformada con el gen defensiva *DDR 206* del guisante y obtuvo plantas con la tolerancia a *Leptosphaeria maculans* con valores de reacción significativamente más bajos que los de las plantas no transformadas. Otro reporte de Kanzaki *et al.* (2002) indica que arroz transformado con el gen defensiva *wasabi* (WT) mostro una reducción de hasta 50% del tamaño de la lesión cuando se inocularon líneas T2 con el hongo *Magnaporthe grisea* que causa la enfermedad del añublo del arroz.

Terras *et al.* (1995) transformaron tabaco con el gen defensiva *AFP2* aislado de *Raphanus* que confiere resistencia contra *Alternaria longipes*, reduciendo el área cubierta con lesiones de las plantas T2 entre 7 y 8 veces menos que las plantas heterocigotas y no transformada, respectivamente. De la misma manera, Sjahril *et al.* (2006) insertaron el gen defensiva *WjAMP-1* aislado de wasabi en el genoma de *Phalaenopsis* Watoboushi '# 6.13' que confiere una alta resistencia contra *Erwinia carotovora*; plantas transformadas fueron asintomáticas una semana después de la inoculación de las bacterias en la superficie de la hoja, mientras que las plantas control, no inoculadas murieron en el mismo período de tiempo. Gao *et al.* (2000) trabajó con un gen defensiva *alfAFP* de alfalfa (*Medicago sativa*), que se insertó en papa otorgándole una fuerte resistencia contra *Verticillium dahliae* con

In all those papers, as well as in this research, the importance of the *defensin* genes against pathogens, mainly fungus, is highlighted. The reduction in leaf damage and lower formation of spores in *in vitro* assays of T0 L3, L4 and L9 lines derived from the activity of *pdfl.2* gene against *C. lindemuthianum*, inhibiting germination and spore growth, similarly to previous reports in other crops transformed with the defensin gene (Terras *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Parashina *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000; Swathi *et al.*, 2008).

Even though the *in vitro* assays could show reasonable information on the levels of tolerance or resistance provided by *pdfl.2* gene, in our experience the bioassays performed on plantlets were clearer and consistent. The reduction in the area covered with lesions and spores of the transformed Flor de Mayo Anita lines is believed to be related to the activity of the *pdfl.2* gene, possibly throughout two different mechanisms, one is the role of the antimicrobial peptide coded by the gene directly against the pathogen enhancing the permeability of membranes and, by inducing other *in situ* AMPs throughout the activation of its defense mechanisms. Thevissen *et al.* (1999) established that in raphanus (*Rs-AFP2*) and dahlia (*Dm-AMP1*) defensins could induce Ca<sup>2+</sup> influx and K<sup>+</sup> efflux when they stick on to fungal hyphae, suggesting the inhibition of growth due to gradient dissipation.

### Transcriptional expression of the *pdfl.2* gene in T1 and T3 plants

The analysis of *pdfl.2* gene expression in T1 lines showed that L9 transgenic line (0.90) had higher *pdfl.2* gene relative expression than the other four T1 lines; L7 (0.66), L2 (0.53), L4 (0.50) and L3 (0.41) ( $p < 0.001$ ) (Figure 7). All T1 plants, transformed and non-transformed, amplified the 18S ribosomal gene, indicating that the analysis on the level of expression is restricted by the presence of the *pdfl.2* gene (Figure 4).

The transcriptional expression of the *pdfl.2* gene in T3 tolerant and resistant plants to *C. lindemuthianum* showed that L2 plants resistant to strain 448 expressed the highest level of *pdfl.2* gene (0.91), whereas plants from lines L2 (1472), L7 (1472) and L9 (448 or 1472) had lower levels of expression at either resistant or tolerant response (0.61-0.76) (Figure 9). On the other hand, there was no statistical difference in levels of expression among resistant and tolerant plants (data not shown).

valores de ABCPE (área bajo la curva de progreso de la enfermedad) menores que las plantas control resistentes. Además, Koike *et al.* (2002) transformaron tomate con *Rs-AFP2* que proporciona resistencia a un amplio espectro de patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*.

En los ensayos *in vitro* realizados por Terras *et al.* (1995) quien estudió la actividad *in vitro* de *Rs-AFP2* en el crecimiento del hongo *Alternaria longipes*, informes de fragmentación y reducción en la tasa de crecimiento de hongos. En otro ensayo *in vitro* de Gao *et al.* (2000) demostró que el gen *alfAFP* a una concentración de 5 µg/ml redujo el número de esporas germinadas de *V. dahliae* en un 50%. De la misma manera, Sjahril *et al.* (2006) inoculó *E. carotovora* directamente en cuatro puntos en la hoja de *Phalaenopsis* transformada con el gen *WjAMP* obteniendo una alta resistencia contra éstas bacterias, mientras que las plantas control fueron altamente susceptibles a la enfermedad.

En todos estos reportes, así como en esta investigación, se resalta la importancia de los genes *defensina* contra patógenos, principalmente hongos. La reducción en el daño de la hoja y menor formación de esporas en ensayos *in vitro* de T0, líneas L3, L4 y L9 derivadas de la actividad de gen *pdf 1.2* contra *C. lindemuthianum*, inhibiendo la germinación y el crecimiento de esporas, de manera similar a los informes anteriores en otras plantas transformadas con el gen *defensina* (Terras *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Parashina *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000; Swathi *et al.*, 2008).

A pesar de que los ensayos *in vitro* podrían mostrar información razonable sobre los niveles de tolerancia o resistencia proporcionada por el gen *pdf 1.2*, en nuestra experiencia, los bioensayos realizados en plántulas fueron reproducibles y consistentes. Se cree que la reducción en el área cubierta con lesiones y esporas de las líneas transformadas de Flor de Mayo Anita, está relacionado con la actividad del gen *pdf 1.2*, posiblemente a través de dos mecanismos diferentes, uno es el papel del péptido antimicrobiano codificado por el gen directamente contra el patógeno potenciando la permeabilidad de las membranas, alterando su crecimiento y por la inducción de otras AMP *in situ* a través de la activación de sus mecanismos de defensa

sistémicos (Yedidia *et al.*, 1999; Mora-Avilés y Earle, 2004). Thevissen *et al.* (1999) establecieron que en defensinas de *Raphanus* (*Rs-AFP2*) y dalia (*Dm-AMPI*) podrían inducir

The levels of resistance found among the different common bean plants transformed with *pdf1.2* seem not to be correlated to the transcriptional levels detected by Q-PCR, we found that transcriptional levels are consistently similar among plants, however, the area affected (level of damage) differed considerably, from line L3 (susceptible) to lines L2, L4, L7 and L9 (resistant). Nevertheless, other non-quantitative parameters such as the colonies covering the petiole or level of infestation on main veins are elements that should be taken into consideration in the measurement of the resistance due to the *pdf1.2* gene. Similar observations by Kanzaki *et al.* (2002) on rice lines transformed with the *defensin* gene from wasabi that showed resistance to rice blast in different levels, no necessarily associated with the level of gene expression.

In contrast with results from Vijayan *et al.* (2008) who found the inhibition of root elongation of *A. thaliana* plants, diminishing the subsequent extension of root hairs, thus indicating potential of *defensin* to affect plant growth of transformed plants, in the research herein reported, no evidence on phenotypic alterations derived from the expression of the *pdf1.2* gene was observed in transformed bean plants.

### Segregation analysis

Segregation ratios and X<sup>2</sup> analysis indicated that all 5 transgenic lines tested showed a 3:1 segregation indicating one gene insertion (<0.05).

### Conclusion

The level of protection from the expression of the *pdf1.2* gene was variable among lines and within lines, however, evidence of resistant plants without any lesions caused by strain 1 472 or 448 provides evidence of the *pdf1.2* gene effect on the plant protection. The reduction in leaf damage and lower formation of spores in *in vitro* assays of T0 L3, L4 and L9 lines derived from the activity of *pdf 1.2* gene against *C. lindemuthianum*, inhibiting germination and spore growth, shown the importance of the *defensin* genes against pathogens, mainly fungus, is highlighted.

Advances related to the use of genes that can provide resistance of wide spectrum have been developed, these advances and the fact that common bean can be readily

la afluencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y emanación de  $\text{K}^{+}$  cuando se pegan sobre las hifas de los hongos, lo que sugiere la inhibición del crecimiento, lo cual se debe a una disipación del gradiente de protones a partir de la célula fúngica hacia el apoplasto provocando una alteración general y la muerte celular.

### Análisis de segregación

Las proporciones de segregación y el análisis  $\chi^2$  indicaron que las 5 líneas transgénicas evaluadas mostraron una segregación 3:1 indicando una inserción de genes (<0.05).

### Conclusiones

El nivel de protección a partir de la expresión del gen *pdf* 1.2 fue variable entre y dentro de las líneas; sin embargo, hay evidencia de plantas resistentes sin ningún tipo de lesiones causadas por la cepa 1 472 ó 448, proporcionando evidencia del efecto del gen *pdf* 1.2 en la protección de las plantas. La reducción en el daño de la hoja y menor formación de esporas en ensayos *in vitro* de T0, líneas L3, L4 y L9 derivadas de la actividad de gen *pdf* 1.2 contra *C. lindemuthianum*, inhibiendo la germinación y el crecimiento de las esporas, mostrando la importancia de los genes defensina contra los patógenos, principalmente hongos.

Los avances relacionados con el uso de genes que pueden proporcionar resistencia a un amplio espectro se han desarrollado, estos avances y el hecho de que el frijol común puede ser modificado fácilmente; por lo tanto los requisitos están en su lugar para proporcionar una herramienta de transformación que podría estar integrada en el proceso de mejoramiento de frijol común.

### Acknowledgements

This project was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (CONACYT-SAGARPA 2003 002 Núm. 080).

modified; therefore requisites are in place to provide a tool on transformation that could be integrated in the process of common bean breeding.

*End of the English version*



### Literatura citada

- Acosta-Gallegos J. A.; Ochoa-Márquez R.; Arrieta-Montiel M. P.; Ibarra Pérez F. A.; Pajarito-Ravelero A. and Sánchez-Valdez I. 1995. Registration of "Pinto Villa" common bean. *Crop Sci* 35:1211.
- Bohlmann, H, Broekaert, W. 1994. The role of thionins in plant protection. *Crit Rev Plant Sci* 13:1-16.
- Bonfim, K.; Faria, J. C.; Nogueira, E. O. P. L.; Mendes, E. A. and Aragão, F. J. L. 2007. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *MPMI*. 20:717-726.
- Brown, R. L.; Kazan, K.; McGrath, K. C.; Maclean, D. J. and Manners, J. M. 2003. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132:1020-1032.
- Castellanos-Ramos, J. Z.; Guzmán-Maldonado, S. H.; Muñoz-Ramos, J. J. and Acosta-Gallegos, J. A. 2003. Flor de Mayo Anita, a new common bean cultivar for the central region of Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 26:209-211.
- Cruz de Carvalho, M. H.; Van Le, B.; Zuily-Fodil, Y.; Pham, Thi A. T. and Thanh, Van K. T. 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.; Saucedo-Ruiz, M.; Guzmán-Maldonado, S. H.; Villordo-Pineda, E.; González-Chavira, M.; Fraire-Velázquez, S.; Acosta-Gallegos, J. A. and Mora-Avilés, A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 170:822-827.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A-L.; Bailey, J. A. and Langin, T. A. 2000. GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Plant Cell.* 12:1579-1590.
- Estrada-Navarrete, G.; Alvarado-Affantranger, X.; Olivares, J. E.; Díaz-Camino, C.; Santana, O.; Murillo, E.; Guillén, G.; Sánchez-Guevara, N.; Acosta, G. J. A.; Quinto, C.; Li, D.; Gresshoff, P. M. and Sánchez F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *MPMI* 19:1385-1393.
- Faria, J. C.; Albino, M. M. C.; Dias, B. B. A.; Cancado, L. J.; da Cunha, N. B.; Silva, L. M.; Vianna, G. R. and Aragão, F. J. L. 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.
- Gao, A. G.; Hakimi, S. M.; Mittanck, C. A.; Wu, Y.; Woerner, B. M.; Stark, D. M.; Shah, D. M.; Liang, J. and Rommens, C. M. T. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol.* 18:1307-1310.

- Garrido-Ramírez, E. R. and Romero-Cova, S. 1989. Identificación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. en México y búsqueda de resistencia genética a este hongo. *Agrociencia* 77:139-156.
- Hoisington, D.; Khairallah, M. and González, de L. D. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2<sup>th</sup> Edition. Mexico, D. F.
- Kanzaki, H.; Nirasawa, S.; Saitoh, H.; Ito, M.; Nishihara, M.; Terauchi, R. and Nakamura, I. 2002. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.* 105:809-814.
- Kawata, M.; Nakajima, T.; Yamamoto, T.; Mori, K.; Oikawa, T.; Fukumoto, F. and Kuroda, S. 2003. Genetic engineering for disease resistance in rice (*Oryza sativa* L.) using antimicrobial peptides. *JARQ.* 37:71-76.
- Koike, M.; Okamoto, T.; Tsuda, S. and Imai, R. 2002. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Bioch. Biophys Res. Commun.* 298:46-53.
- Lay, F. T. and Anderson, M. A. 2005. Defensins-components of the innate immune system in plants. *Curr Prot Pept. Sci.* 6:85-101.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res.* 8:4321-4326.
- Parashina, E. V.; Serdobinskii, L. A.; Kalle, E. G.; Lavrova, N. V.; Avetisov, V. A.; Lunin, V. G. and Naroditskii, B. S. 2000. Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Rus. J. Plant Physiol.* 47:417-423.
- Pastor-Corrales, M. A. 1991. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology* 81:694.
- Penninckx I, A. M. A.; Eggermont, K.; Terras, F. R. G.; Thomma, B. P. H. J.; De Samblanx, G. W.; Buchala, A.; Metraux, J. P.; Manners, J. M. and Broekaert, W. F. 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.; Espinosa-Huerta, E.; Acosta-Gallegos, J. A.; Guzmán-Maldonado, H. S. and Mora-Avilés, M. A. 2010. Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 102:381-386.
- Schwartz, H. F.; Steadman, J. R.; Hall, R. and Forster, R. L. 2005. Compendium of bean diseases. ISBN 0-89054-327-5 viii+109 pp.
- Sjahril, R.; Chin, P. D.; Khan, R. S.; Yamamura, S.; Nakamura, I.; Amemiya, Y. and Mii, M. 2006. Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method. *Plant Biotech.* 23:191-194.
- Sridevi, G.; Parameswari, C.; Rajamuni, P. and Veluthambi, K. 2006. Identification of hemizygous and homozygous transgenic rice plants in T1 generation by DNA blot analysis. *Plant Biotechnol.* 23:531-534.
- Swathi, A. T.; Divya, K.; Jami, S. K. and Kirti, P. B. 2008. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens *Plant Cell. Rep.* 27:1777-1786.
- Terras, F. R. G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A.; Rees, S. B.; Torreken, S.; Van Leuven, F.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell.* 7:573-588.
- Thevissen K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W. and Broekaert, W. F. 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* 271:15018-15025.
- Thevissen, K.; Terras, F. R. G. and Broekaert, W. F. 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5451-5458.
- Thomma, B. P. H. J. and Broekaert, W. F. 1998. Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 36:533-537.
- Vijayan, S.; Guruprasad, L. and Kirti, P. B. 2008. Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:1023-1032.
- Wang, Y.; Nowak, G.; Culley, D.; Hadwiger, L. A. and Fristensky, B. 1999. Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *MPMI* 12:410-418.