

INTRODUCCION

En frijol, es primordial la obtención de variedades comerciales con resistencia a plagas y enfermedades, al igual que su adaptación a condiciones climáticas adversas como la sequía y las bajas temperaturas. Estas dos últimas características, de gran importancia económica, ha sido difícil introducirlas, mediante el mejoramiento convencional. Existen genes que confieren resistencia a estreses abióticos, pero la incompatibilidad entre especies limita su utilización en frijol. Se hace entonces necesario desarrollar una metodología eficiente de transformación genética que permita usar estos y otros genes para el mejoramiento de la especie. Este poster resume los avances logrados en transformación de frijol en CIAT.

METODOLOGIA

Se transformaron embriones aislados de semilla madura de varios genotipos e híbridos de *Phaseolus sp* (Figura 2-A), los cuales fueron sometidos a un tratamiento con ultrasonido para causar heridas. Para la transformación se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-pTOK233 (Figura 1) con los genes marcadores gus-intrón y *hpt* (Hiei et al., 1994). Los embriones una vez tratados con el ultrasonido, fueron inoculados directamente con la cepa durante una hora en medio de inducción bacteriano (MIB). La bacteria fue retirada y se dejaron los explantes en cocultivo a 22°C durante tres días. Pasado el período de cocultivo, los embriones fueron lavados con Cefotaxina y Vancomicina, para cultivarlos en medio RAS con Tiazurón e inducir callo meristemático (Mejía, 1998). Los callos meristemáticos transgénicos (CMT) fueron seleccionados con Hygromicina (Hyg) 35mg/l por cuatro semanas (Figura 2-B). Los CMT fueron sometidos a 2ip para inducir yemas, microinjetarlas en tallos de otras variedades y producir plantas que se llevaron al invernadero de bioseguridad (Figura 2-C).

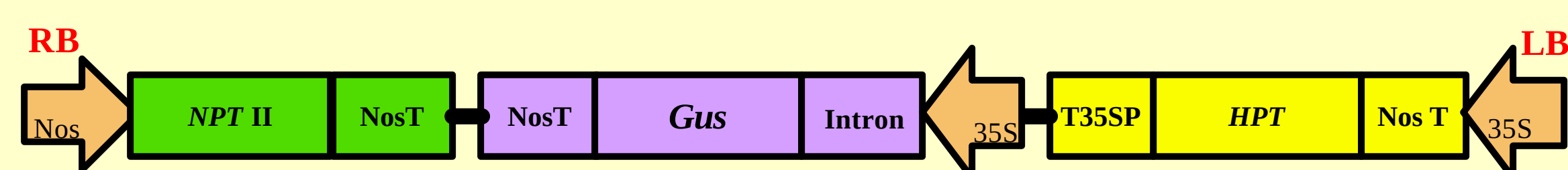


Figura 1. T-DNA del plásmido pTOK233

RESULTADOS

Se obtuvieron líneas de plantas transgénicas de dos híbridos de frijol tepary (*acutifolius*), los cuales involucran el genotipo NI576, ya transformado por Dillen en 1997, utilizado como parental masculino, y los genotipos G40022 y G40065 utilizados como parentales femeninos.

De los cientos de embriones transformados de otros genotipos, tanto *vulgaris* como *acutifolius*, ninguno produjo tejidos transgénicos, pese a los altos niveles de expresión transitoria observados en algunos de ellos (Tabla 1) incluidos los dos genotipos utilizados como madres.

Los dos híbridos transgénicos servirían como genotipos puente para la transferencia convencional de trans-genes hacia variedades de la misma especie *acutifolius*, e incluso hacia variedades cultivadas *vulgaris* (Mejía et al., 1994).

La expresión estable del gen gus, en varios órganos de plantas regeneradas, indicó que la transformación era estable, al igual que la expresión de los genes introducidos y, además, reduce la posibilidad de quimeras (Figura 2-D).

La integración del *hpt* fue confirmada mediante la prueba de Southern de ADN total en algunas de las líneas transformadas (Figura 3). Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores (Russell et al., 1993; Aragao et al., 1996 y 1998) en investigaciones que utilizaron bombardeo de partículas donde de la expresión de los genes no fue óptima.

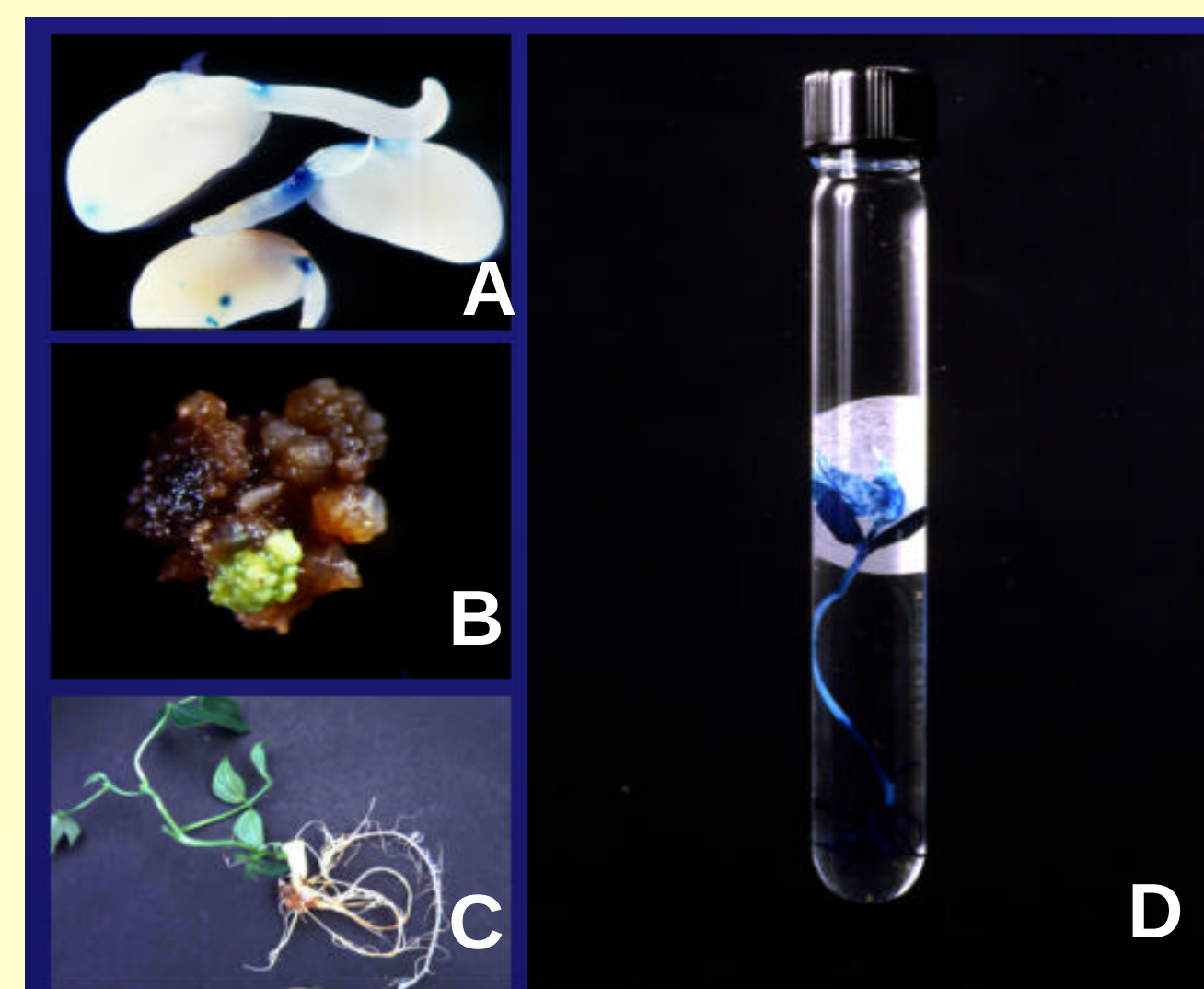


Figura 2.

- A. Expresión transitoria del gen gus en embriones maduros
- B. Callo meristemático resistente a Hygromicina
- C. Planta transgénica regenerada por microinjertación
- D. Expresión del gen gus en diferentes órganos de la planta

Genotipo	Explantos inoculados	Nivel de expresión del gen Gus	Callos resistentes a Hygromicina	Plantas transgénicas regeneradas
G40022	365	+++	0	0
G40065	480	+++	0	0
NI576xG40022	231	+++	6	1
NI576xG40065	270	+++	1	1
C20	53	---	0	0
Ica Pijao	95	+-	0	0
La Victoire	110	+++	0	0
G23429	38	+++	0	0
G23653	83	++-	0	0
G12922	27	+-	0	0

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos con transformación de frijol mediada por *Agrobacterium*. Sólo se obtuvieron plantas transgénicas en los híbridos. (+++) 100% de expresión.

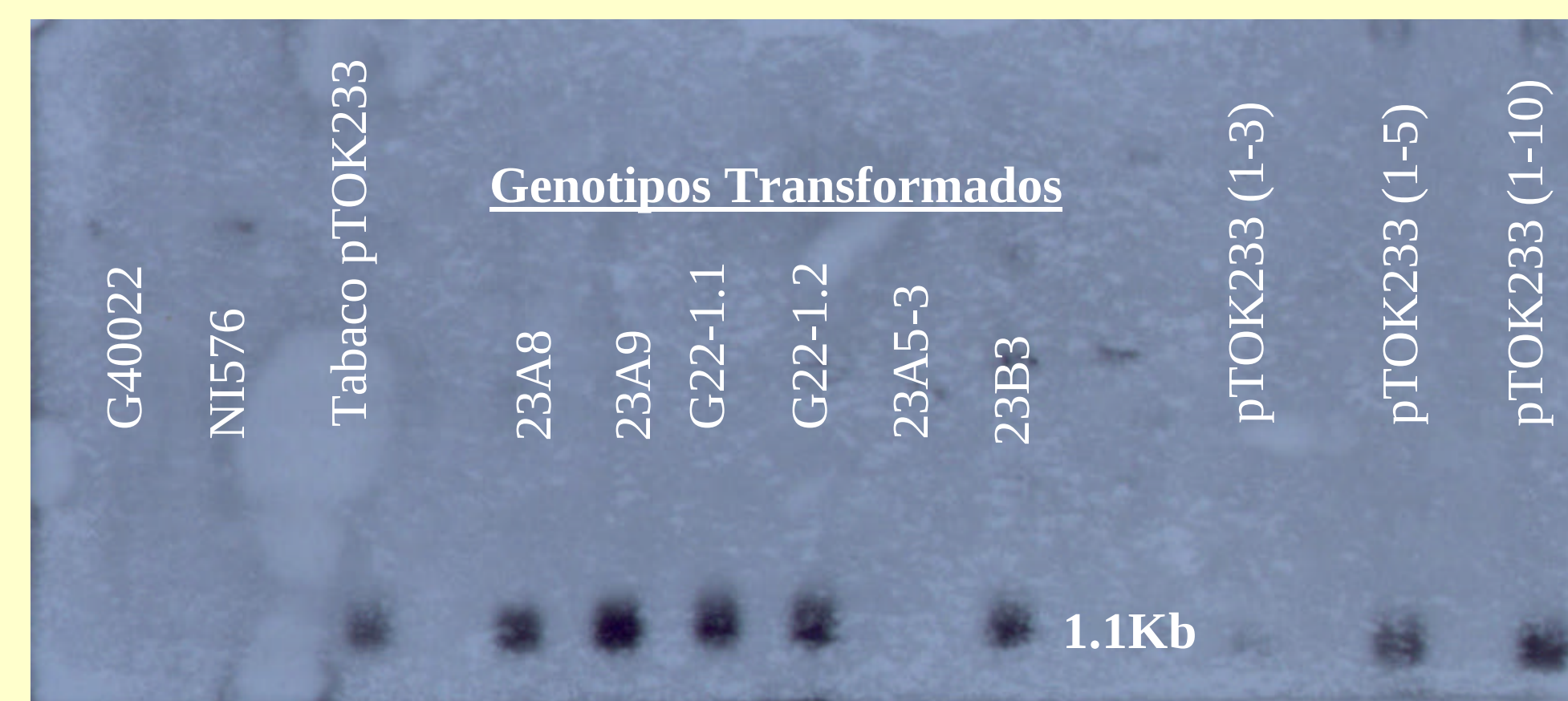


Figura 3. Southern de DNA total digerido con *Bam*HI, usando como sonda el gen *hpt*.

Actualmente se hace transformación de los híbridos con cepas más virulentas (C58C1) y genes de interés agronómico (*bar*, *cry*). También se transforman híbridos más cercanos a *vulgaris* con la cepa LBA4404-pTOK233, como una alternativa de transferencia de trans-genes hacia el frijol cultivado.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que es posible optimizar la transformación genética en especies recalcitrantes como frijol, y que la utilidad de los híbridos transgénicos está en ser utilizados como puente de transferencia de nuevos genes de resistencia y adaptabilidad para el mejoramiento de las variedades preferidas por el agricultor.

REFERENCIAS

- Aragao F, et al (1996) TAG 93:142-150
- Dillen W, et al (1997) TAG 94(2):151-158
- Hiei y, et al (1994) The Plant Journal 6(2):271-282
- Mejía A, et al (1998) EUCARPIA International Symposium on Breeding of Protein and Oil Crops, Pontevedra-Spain 1-4 April
- Mejía A, et al (1994) TAG 88:324-331
- Russell D, et al (1993) Plant Cell Rep. 1993:165-169