

## Regeneración y transformación de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) para conferir tolerancia a sequía

Regeneration and transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to confer drought tolerance

Jesús Tadeo Montoya Ortega<sup>1</sup>, Reyna Nallely Sánchez González<sup>1</sup> y \*Anareli Quintero Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Programa de Ingeniería en Biotecnología, Av. Mutualismo Esq. Prolongación Río Lerma S/N, Celaya, Gto. C.P. 38060,

\*quintero.a@ugto.mx

### Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una legumbre de gran importancia nutricional en México, con un consumo anual de 7 a 8 kg por habitante. Entre las variedades más destacadas están el Pinto Saltillo y Negro Jamapa. Sin embargo, su producción enfrenta retos debido al cambio climático, como sequías y temperaturas extremas. Una alternativa para mejorar la tolerancia del frijol ante el estrés abiótico es el uso de biotecnología, específicamente la transferencia de genes que confieran tolerancia, como el gen TPS1-TPS2 que interviene en la síntesis de trehalosa, un disacárido que protege contra el estrés ambiental.

El experimento describe el proceso de extracción de la construcción genética TPS1-TPS2 bajo el control del promotor CaMV35S y su inserción en el frijol mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Para lograr esto, se aislaron colonias bacterianas competentes y se desarrollaron protocolos para la desinfección, activación de semillas y extracción de embriones. Se optimizó el medio de multiplicación, logrando aumentar la tasa de germinación de 45% a 98%. Sin embargo, durante la transformación y regeneración, aunque los ejes embrionarios mostraron un desarrollo adecuado, aún no se puede concluir el éxito total del proceso.

Los resultados preliminares indican que, si bien se logró una buena germinación y transformación parcial, el proceso requiere más pruebas y ajustes para asegurar una eficiencia óptima en las variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa.

### Abstract

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is a legume of great nutritional importance in Mexico, with an annual consumption of 7 to 8 kg per inhabitant. Among the most notable varieties are the Pinto Saltillo and Negro Jamapa. However, its production faces challenges due to climate change, such as droughts and extreme temperatures. An alternative to improve bean tolerance to abiotic stress is the use of biotechnology, specifically the transfer of genes that confer tolerance, such as the TPS1-TPS2 gene that takes part in the synthesis of trehalose, a disaccharide that protects against environmental stress.

The experiment describes the process of extraction of the TPS1-TPS2 genetic construct under the control of the CaMV35S promoter and its insertion into the bean by *Agrobacterium tumefaciens*. To accomplish this, competent bacterial colonies were isolated, and protocols were developed for disinfection, seed activation and embryo extraction. The multiplication medium was optimized, managing to increase the germination rate from 45% to 98%. However, during transformation and regeneration, although the embryonic axes showed adequate development, it still cannot be concluded the total success of the process.

Preliminary results indicate that, although good germination and partial transformation were achieved, the process requires more testing and adjustments to ensure optimal efficiency in the Pinto Saltillo and Negro Jamapa varieties.

**Palabras clave:** Frijol; Células competentes; Tolerancia; Trehalosa; Regeneración.

## Introducción

El frijol común o *Phaseolus vulgaris* es una legumbre que es cultivada en gran parte del mundo, esto debido a su gran aporte nutricional debido a su alto contenido de proteínas, minerales y vitaminas tales como lo son el hierro, zinc y folato.

Según datos del SIAP (2021) el consumo anual de frijol en México oscila entre los 7 a 8 kg de frijol por habitante, por lo anterior esta legumbre se cultiva a lo largo de todo el país. Dentro de las variedades existentes de frijol destacan el Pinto Saltillo y el Negro Jamapa, siendo producidos en Saltillo Coahuila y Jamapa Veracruz respectivamente. Esta especie vegetal enfrenta un problema para su producción en el país debido a las condiciones que genera el cambio climático. Tales como, altas temperaturas, heladas o sequías, lo cual representa un riesgo para la seguridad alimentaria. Por esta razón, se han comenzado a buscar alternativas como lo son el mejoramiento genético con herramientas biotecnológicas que permitan la transferencia de genes que confieran tolerancia al estrés abiótico.

El estrés abiótico es aquel que incluye factores ambientales tales como la salinidad, la sequía y las temperaturas extremas, lo cual causa pérdidas inmensas tanto en la producción agrícola y económica a nivel mundial. (Mittler & Blumwald, 2010).

La trehalosa es un disacárido no reductor presente en una gran cantidad de organismos entre ellos bacterias y plantas que tienen una gran tolerancia al estrés por sequías, heladas y salinidad (Villalobos-López *et al.*, 2022). La síntesis de este disacárido principalmente se produce por la acción de un complejo multienzimático que consta de la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) la cual es codificada por el gen TPS1 y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) que es codificada por el gen TPS2 (Iturriaga *et al.*, 2009).

Por otro lado, el promotor CaMV35S fue aislado a comienzo de los años 80 del virus del mosaico de la coliflor y usado ampliamente en sistemas transgénicos (Amack & Antunes, 2020). Este promotor es de tipo constitutivo, ya que este induce la expresión de genes en la mayoría de los tejidos del organismo, independientemente de factores ambientales o del estadio de desarrollo. Justamente, la principal ventaja de estos promotores es que generalmente promueven altos niveles de expresión transgénica independiente del tejido o estadio de desarrollo, por lo que han sido ampliamente utilizados en la transformación de mono y dicotiledóneas, especialmente para la detección y/o selección de células o plantas transformadas (Park *et al.*, 2010).

## Metodología

### Aislamiento de la construcción TPS1-TPS2::35S

El plásmido pBIN19 que contiene la construcción 35S::TPS1-TPS2 (Miranda *et al.*, 2007) se obtuvo a partir del cultivo en cajas Petri de *E. coli* en medio selectivo LB adicionado con kanamicina (50 mg/L), incubando las cajas durante 24 hr a 37 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la selección de colonias aisladas con ayuda de hisopos estériles los cuales se colocaran en tubos Falcon con 25 ml de medio LB líquido con kanamicina (50 mg/L) incubando durante 24 hr a 37 °C y en agitación constante a 180 rpm, para después tomar 1.5 ml del cultivo obtenido tras el paso anterior y realizar un proceso de extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina. Por último, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio para comprobar que se haya tenido una adecuada extracción de la construcción de interés.

### Obtención de células competentes de *A. tumefaciens*

La obtención de células competentes se llevó a cabo por medio del proceso resuspensión de las bacterias en cloruro de calcio a 4 °C antes de aplicar un choque térmico a 42 °C, para posteriormente realizar el platingo de cajas Petri con medio selectivo que consta en medio LB adicionado con kanamicina y rifampicina en concentración 50 mg/L para ambos y realizando la incubación de estas placas por 24-72 hr y una temperatura de 28 °C.

### Incubación de *A. tumefaciens*

Las colonias obtenidas son aquellas que cumplen con la característica de ser grandes y aisladas, con ayuda de un hisopo estéril y posteriormente se colocaron en tubos Falcon con 25 ml de medio para crecimiento que



consta de medio LB adicionado con kanamicina y rifampicina (50 mg/L para cada antibiótico), siendo incubados en agitación constante a 180 rpm durante 24-48 hr y a 28 °C.

#### Preparación de stock de *A. tumefaciens*

Estos se realizan en tubos ependorf colocando glicerol al 15% como crioprotector y el cultivo bacteriano (1 ml), posteriormente se colocó en agitación con vortex durante 1 min y se refrigeró a 4 °C para su conservación.

#### Preparación de medio de multiplicación

El medio de multiplicación se preparó según lo descrito por Quintero-Jiménez *et al.* (2010).

#### Selección de frijol

Se seleccionaron semillas de frijol de las variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa con un tamaño homogéneo libre de deformidades y sin presencia de rupturas en las semillas colocándolas en cajas Petri de vidrio (Figura 6, a).

#### Desinfección de semillas

Se lleva a cabo con el uso de 80 ml de cloro (Cloralex) el cual se coloca en un frasco dentro de desecador y colocando las cajas Petri a su alrededor sin la tapa puesta, para posteriormente adicionar 2.7 ml de HCl y cerrar el desecador por 16 hr.

#### Activación de semillas

Tras finalizar la desinfección se colocan las semillas de frijol en vasos de precipitado estériles adicionando 200 ml de agua destilada estéril permaneciendo en ella durante 24 hr.

#### Extracción de embriones y germinación

Se lleva a cabo en ambiente estéril (campana de flujo laminar) buscando obtener los embriones de la semilla sin generar daños en su estructura y evitando mantenerlos expuestos al ambiente para no producir oxidación, estos se colocan en el medio de multiplicación manteniéndolos por 5 días con un fotoperiodo de 8 hr en oscuridad y 16 hr de luz a una temperatura de 25 °C

#### Proceso de transformación y regeneración

El proceso de transformación consta en la incubación de la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 transformada usando medio líquido descrito por Espinosa-Huerta *et al.* (2013) hasta obtener una densidad óptica de 0.8. Se realizó la eliminación de brotes meristemáticos y raíces para solamente obtener ejes embrionarios, los cuales fueron colocados en el cultivo líquido generado realizando una agitación suave durante 10 min, posteriormente desechando el líquido y eliminando el exceso del mismo en los ejes embrionarios utilizando una toalla de papel estéril. En seguida, los ejes embrionarios fueron colocados en medio de co-cultivo descrito por Quintero-Jiménez *et al.* (2010) adicionado con 40 mg/L de acetosiringona, siendo incubados por 5 días bajo las mismas condiciones de crecimiento en la etapa de germinación. Posteriormente los explantes se colocaron en medio de eliminación que consta del mismo medio de multiplicación adicionado con 300 mg/L de timentina, siendo incubados durante 10 días bajo las mismas condiciones de crecimiento.

## Resultados y Discusión

### Aislamiento de la construcción 35S::TPS1-TPS2

Se obtuvo la construcción de interés siendo corroborado al realizar un análisis de electroforesis obteniendo una banda nítida de ADN después de cortar el plásmido pBIN19 de 10 Kb (banda que corrió en la parte superior del gel) con las enzimas HindIII y EcoRI, conteniendo el inserto de la construcción (Figura 1), teniendo un tamaño de 3.7 kb que corresponden a 0.8 kb al promotor constitutivo 35S y 2.9 kb a la fusión bifuncional TPS1-TPS2.





Figura 1. Fragmento obtenido tras extracción de DNA plasmídico en gel de agarosa.

### Obtención de células competentes de *A. tumefaciens*

Se obtuvieron colonias grandes (Figura 2) con características aceptables para la realización de stocks para su posterior uso y conservación.

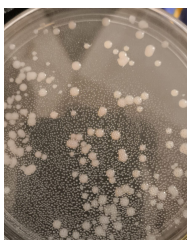


Figura 2. Colonias de *A. tumefaciens* obtenidas tras transformación bacteriana

### Extracción de embriones y germinación

En la extracción de embriones de frijol de las variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa, se obtuvieron embriones en correcto estado fisiológico (Figura 3), con daño por oxidación (Figura 4) o con daño físico (Figura 5), esto causando la disminución en la tasa de germinación que fue del 45% de los embriones. Este porcentaje germinado demostró en un 20% defectos de crecimiento tales como vitrificación (Figura 6, c), por lo cual se modificó el medio de multiplicación utilizando solamente BAP (benzil aminopurina) en concentración de 6 mg/L, dando como resultado la obtención de un aumento en el porcentaje de germinación del 75%. Por lo que se consideró que probablemente la concentración de HCl en el proceso de desinfección de las semillas pudo generar efectos negativos en el proceso de germinación. Debido a lo anterior, se optó por la utilización de 1.7 ml de HCL por 80 ml de Cloro (Cloralex). Tras realizar este cambio hubo un aumento en la germinación de embriones obteniéndose un 98% de germinación de los embriones.



Fig. 3 Embriones de *Phaseolus vulgaris* (Negro Jamapa) sin daño en su estructura viable para germinación



Fig. 4 Embriones de *Phaseolus vulgaris* (Negro Jamapa) que presenta oxidación en el tejido y no viable para germinación



Fig. 5 Embriones de *Phaseolus vulgaris* (Negro Jamapa) con daño físico en su estructura y no viable para su germinación

### Proceso de Transformación y Regeneración

Se obtuvieron ejes embrionarios de un color verde intenso sin señales de necrosamiento (Figura 6, d), los cuales permanecieron en medio de eliminación de *Agrobacterium* adicionado timentina. Al cabo de 20 días, se comenzó a mostrar regeneración en ambas variedades de frijol, aunque mostrando un desarrollo más rápido en la variedad Pinto Saltillo (Figura 6, e) que en la Negro Jamapa (Figura 6, f), mostrando brotes de mayor tamaño en los 20 días que permanecieron en medio de selección. En este periodo se presentó una coloración marrón en el eje embrionario, sin embargo, el brote desarrollado muestra un color verde intenso, sin señales de daño o deterioro mostrando un desarrollo apto para su posterior crecimiento.



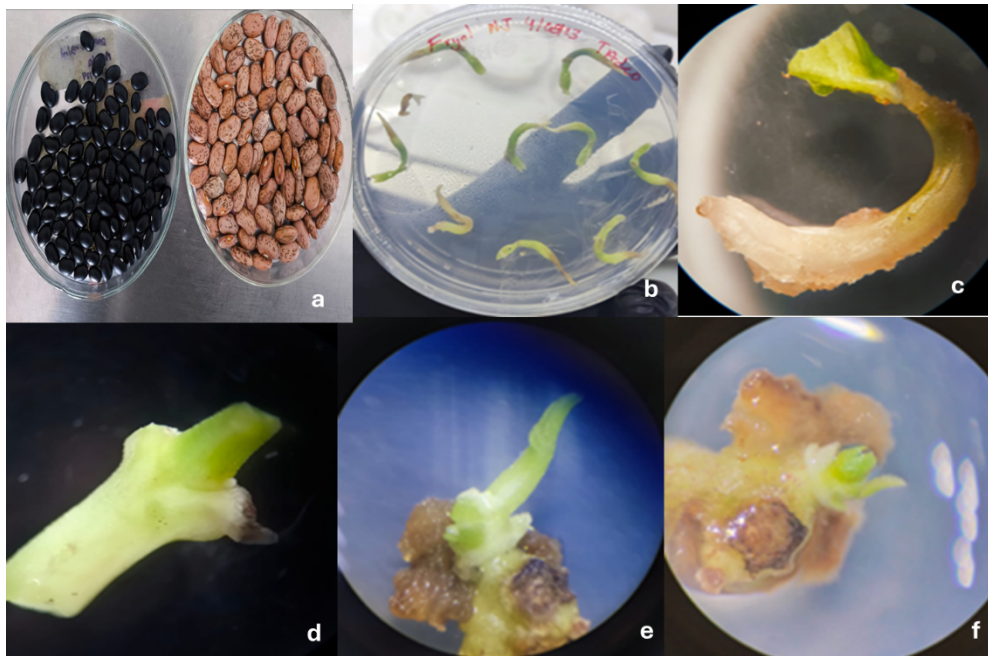


Figura 6. Vía de regeneración transformación de frijol común; a) Semillas de frijol variedad negro Jamapa y pinto saltillo; b) Germinación de embriones de frijol en medio Gamborg; c) Embrión que presenta vitrificación y no es apto para la transformación genética; d) eje embrionario usado como explante; e) Brote en explante de pinto Saltillo después de la inoculación con *A. tumefaciens* en medio de selección con kanamicina; f) Brote en explante de Negro Jamapa después de la inoculación con *A. tumefaciens* en medio de selección con kanamicina.

## Conclusión

En este trabajo se establecieron las condiciones adecuadas para el correcto desarrollo de embriones de frijol de las variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa, lográndose inhibir los defectos en el desarrollo del embrión y el aumento en porcentaje de germinación. Asimismo, se montaron los procedimientos para la obtención de células competentes y análisis del ADN en gel. Por último, el proceso de transformación y regeneración para estas variedades aun no se ha logrado ya que aun existen diversas pruebas por realizar para comprobar la eficiencia de estos procesos.

## Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Anareli Quintero por ser un pilar muy importante en el desarrollo de este trabajo por otorgarme su confianza en el desarrollo de este proyecto, así como por todos sus consejos proporcionados no solo académicamente si no también como una persona más de confianza, también a la Dra. Reyna Sánchez por su apoyo y permitirme usar sus instalaciones, además a mis amigos por su apoyo y acompañamiento en el trabajo especialmente a Mariela Acevedo por siempre estar ante los momentos de dificultad y estrés y por último pero no menos importante a mi familia que siempre demuestran su apoyo y me motivan a seguir esforzándome en el cumplimiento de mis sueños en mi dedicación por la ciencia.

## Referencias

- Amack, S.C. & Antunes, M.S. (2020). CaMV35S promoter-A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology* 24, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179>
- Espinosa-Huerta, E., Quintero-Jiménez, A., Cabrera-Becerra, K. V., & Mora-Avilés, M. A. (2013). Stable and efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Phaseolus vulgaris*. *Agrociencia*, 47(4), 319-333. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n4/v47n4a2.pdf>
- Iturriaga, G., Suárez, R. & Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3793-3810. <https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Miranda, J. A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., & Iturriaga, G. (2007). A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226(6), 1411-1421. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0579-y>
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic Engineering for Modern agriculture: Challenges and Perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 443-462. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112116>
- Park, S, Yi, N, Kim, Y, Jeong, M, Bang, S, Do, Y, & Kim, J. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot.*, 61 (9), 2459-2467.
- Quintero-Jiménez, A., Espinosa-Huerta, E., Acosta-Gallegos, J. A., Guzmán-Maldonado, H. S., & Mora-Avilés, M. A. (2010). Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(3), 381-386. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9744-2>
- Villalobos-López, M.A., Arroyo-Becerra, A., Quintero-Jiménez, A. & Iturriaga, G. (2022). Biotechnological advances to improve abiotic stress tolerance in crops. *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 12053. <https://doi.org/10.3390/ijms231912053>.

