

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Susceptibilidad de tres variedades de frijol a la transformación por *Agrobacterium*  
*rhizogenes*

Por:

**CÉSAR ADOLFO MORALES TORRES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Susceptibilidad de tres variedades de frijol a la transformación por *Agrobacterium*  
*rhizogenes*

Por:

**CÉSAR ADOLFO MORALES TORRES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por el Jurado Examinador:



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Presidente



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Vocal



Dr. Antonio Flores Naveda

Vocal



Dra. Aida Isabel Leal Robles

Suplente Vocal



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2025.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Susceptibilidad de tres variedades de frijol a la transformación por *Agrobacterium*

Por:

**CÉSAR ADOLFO MORALES TORRES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por Comité de Asesoría:



---

**Dr. Marco Adán Juárez Verdayes**

Asesor principal



---

**Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo**

Co-Asesor



---

**Dr. Antonio Flores Naveda**

Co-Asesor

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2025.

## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos de la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.



---

**CÉSAR ADOLFO MORALES TORRES**

Autor principal

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de estudiar una carrera.

Agradezco al **Laboratorio de Bioinformática y Bioingeniería Molecular**, por permitirme desarrollar un proyecto de tesis dentro de sus instalaciones.

Agradezco al **Dr. Marco Adán Juárez Verdayes**, por apoyarme a desarrollar el proyecto de tesis y aportarme con sus conocimientos.

Agradezco a **mi madre y hermanos**, por bríndame su apoyo incondicional durante toda la vida.

## ÍNDICE

|                                                                                         |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| DECLARACIÓN DE NO PLAGIO .....                                                          | VII  |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                   | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....                                                        | XI   |
| RESUMEN.....                                                                            | XII  |
| INTRODUCCIÓN .....                                                                      | 1    |
| Justificación.....                                                                      | 3    |
| Hipótesis.....                                                                          | 4    |
| Objetivo general .....                                                                  | 4    |
| Objetivos específicos .....                                                             | 4    |
| REVISIÓN DE LITERATURA.....                                                             | 5    |
| <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....                                                   | 5    |
| Métodos de transformación genética .....                                                | 6    |
| Desafíos en la transformación y regeneración in vitro del frijol.....                   | 8    |
| Establecimiento de raíces pilosas.....                                                  | 9    |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                              | 11   |
| Material vegetal.....                                                                   | 11   |
| <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....                                                   | 11   |
| Preparación del material.....                                                           | 11   |
| Protocolo para transformación de las plantas de frijol con <i>A. rhizogenes</i> . ..... | 12   |
| Lavado de semillas.....                                                                 | 12   |
| Germinación de semillas .....                                                           | 12   |
| Infección de las plantas .....                                                          | 13   |
| Mantenimiento de las plantas y observación del proceso de transformación .....          | 14   |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Determinación de la eficiencia de transformación.....                    | 14 |
| Visualización de las raíces transformadas.....                           | 14 |
| Detección del ADN-T en las raíces transformadas por PCR.....             | 14 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                             | 16 |
| Susceptibilidad y determinación de la eficiencia de transformación ..... | 16 |
| Visualización de las raíces transformadas.....                           | 18 |
| Detección del ADN-T en las raíces transformadas por PCR.....             | 19 |
| CONCLUSIÓN .....                                                         | 21 |
| REFERENCIAS.....                                                         | 22 |

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Determinación de la eficiencia de transformación.....                                                                    | 18 |
| Figura 1. Plásmido Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . ....                                                                   | 6  |
| Figura 2. Proceso de infección de <i>Agrobacterium</i> a la célula vegetal. ....                                                  | 10 |
| Figura 3. Germinación de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....                                                              | 13 |
| Figura 4. Inoculación de frijol, con <i>A. rhizogenes</i> . ....                                                                  | 13 |
| Figura 5. Desarrollo de las hairy roots en frijol. ....                                                                           | 17 |
| Figura 6. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces transgénicos de las variedades de <i>P. vulgaris</i> . .... | 19 |
| Figura 7. Análisis de los productos de la PCR realizada a las raíces que mostraron actividad GFP.....                             | 20 |

## RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las principales legumbres cultivadas a nivel mundial, y se considera una fuente fundamental de proteínas, fibra, vitaminas y minerales en la dieta humana. Su importancia agrícola y económica es significativa, especialmente en regiones de América Latina, África y Asia, donde constituye un alimento básico. Sin embargo, la productividad del frijol se ve limitada por factores bióticos y abióticos. En contraparte, las herramientas de transformación genética ofrecen una alternativa eficiente para la mejora de este cultivo, permitiendo la introducción de genes de interés. La transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* es una de las metodologías más utilizadas para la transformación genética de plantas, esta consiste en la transferencia e integración del ADN-T en el genoma de células vegetales, lo que conduce a la inducción de raíces adventicias.

En este estudio, evaluamos la eficiencia de transformación de tres variedades de *Phaseolus vulgaris* (Negro LEF-UA-03, Mostaza LEF-UA-01 y Pinto Saltillo) mediada por la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599 y una cepa que porta el vector pH35GUSGFP. Se empleo el protocolo de inoculación por punción en los hipocótilos de las plántulas; los resultados indicaron que las tres variedades fueron susceptibles a la transformación y tienen una eficiencia de 69% al 76%, demostrando la viabilidad de estas variedades en futuras aplicaciones como: estudios genéticos, producción de compuestos y mejoramiento genético del frijol.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, *Agrobacterium rhizogenes*, raíces pilosas, Transformación, pH35GUSGFP, Fluorescencia.

## INTRODUCCIÓN

*Phaseolus vulgaris*, también conocido como frijol común, es una planta herbácea que se comenzó a utilizar como fuente de alimento durante el periodo de 8000-3000 a. C., cuando las primeras sociedades humanas sedentarias iniciaban con la domesticación de algunas especies de plantas y animales mediante la selección natural y la selección empírica.

Debido a sus propiedades nutritivas, se ha considerado como una de las plantas que mayormente son cultivadas para consumo humano, las personas que se alimentan con esta semilla adquieren hasta el 83% del aporte proteico. Además, es una fuente rica en vitaminas del complejo B, minerales como es el hierro, calcio, potasio, fósforo, y bajo en sodio.

El consumo y cultivo de esta legumbre se encuentra en constante crecimiento. Sin embargo, la producción de frijol se encuentra vulnerable a diversas situaciones que la ponen en riesgo, tales como condiciones climáticas adversas como suelen ser sequías, heladas, suelos ácidos, baja fertilidad de suelo y/o salinidad. Por otro lado, se encuentra el riesgo biológico relacionado directamente con plagas, enfermedades y malezas. Estas situaciones, han orillado a los agricultores a optar por el uso de variedades mejoradas que les confieran resistencia a las mismas, así también que tengan mayores rendimientos de producción.

Las especies vegetales de interés agrícola, se han venido modificando inconscientemente desde inicio de la selección vegetal, ya que, las mejores plantas, con mayores producciones y las que han resultado más resistentes a plagas y enfermedades se han conservado mediante la colecta de semilla y la siembra de estas posteriormente. Esto permite que las características más favorables se conserven y mejoren mediante la reproducción de las especies. A este proceso para mejorar las especies en la agricultura, se le ha dado el termino de selección artificial.

La cruce de dos plantas seleccionadas artificialmente, involucra la transferencia de información entre los dos genomas, con lo que se adquieren tanto las características deseables como las no deseables de las especies progenitoras. Sin embargo, a partir del descubrimiento del material genético en la segunda mitad del siglo XX, se dio inicio al estudio de una nueva ciencia conocida como ingeniería genética, la cual permite extraer el material genético de una célula, manipularlo e introducirlo de nuevo en otra célula por medio de un conjunto metodologías. Dentro de estas metodologías se encuentra la transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, la cual se basa en la capacidad de esta bacteria para transferir material genético a las plantas, induciendo la formación de raíces pilosas. Este proceso ocurre cuando la bacteria introduce un fragmento de su plásmido Ri (*root inducing*) en la planta denominado ADN-T el cual porta la información genética.

Muchas plantas han resultado susceptibles a la transformación mediante *Agrobacterium rhizogenes*, entre ellas encontramos a las pertenecientes a la familia de las leguminosas. Sin embargo, el frijol, aunque forma parte de esta familia, anteriormente había demostrado un potencial recalcitrante a la transformación genética por diferentes metodologías incluida *Agrobacterium*. En este trabajo se evalúa la capacidad de transformación genética de *Agrobacterium rhizogenes* en las variedades de frijol generadas en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

## **Justificación**

La Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) es un referente del mejoramiento genético en México, destacándose por su capacidad en la producción de nuevas variedades de plantas con interés agrícola. Sus investigaciones enfocadas en generar plantas de calidad mediante técnicas de hibridación y de transformación genética, permite avanzar en la mejora de características agronómicas esenciales para la seguridad alimentaria y la sustentabilidad agrícola.

Sin embargo, aunque las variedades de frijol Negro (LEF-UA-03) y Mostaza (LEF-UA-01) son variedades desarrolladas en la UAAAN. Aún no se han reportado eventos de transformación genética. Por lo que, el presente estudio de susceptibilidad de las dos variedades de frijol a la transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* K599, presenta la posibilidad ser utilizadas como modelos en el desarrollo de futuras investigaciones.

## **Hipótesis**

*Agrobacterium rhizogenes* ha sido ampliamente utilizado para la transformación genética en diferentes plantas en las que se incluyen algunas variedades de *Phaseolus vulgaris*. Por lo que se espera que las dos variedades de frijol generadas en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro serán susceptibles a la transformación por *Agrobacterium rhizogenes*.

## **Objetivo general**

Determinar la susceptibilidad de tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), a ser transformadas por la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599

## **Objetivos específicos**

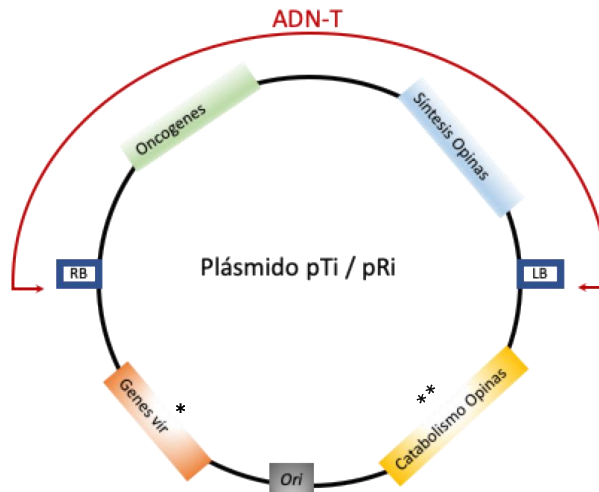
1. Realizar tres eventos independientes de transformación, utilizando tres variedades de frijol y la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599
2. Realizar tres eventos de transformación, utilizando tres variedades de frijol y la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599 (pH35GUSGFP)
3. Analizar las raíces de las plantas transformadas por fluorescencia
4. Detectar por PCR la presencia de la secuencia de GFP en las raíces pilosas

## REVISIÓN DE LITERATURA

### *Agrobacterium rhizogenes*

Las Agrobacterias presentan las siguientes características microscópicas: son bacterias Gram negativas de forma bacilar alargada y con extremos redondeados, tienen un tamaño aproximado de 0.6-1µm de ancho y 1.5-3 µm de largo (Veena & Taylor, 2007). Estas bacterias se encuentran de forma natural en el suelo, donde actúan como organismos saprófitos, alimentándose de materia orgánica en descomposición. Sin embargo, también pueden comportarse como parásitos cuando infectan plantas vivas, ya que además de su cromosoma, poseen un plásmido circular de aproximadamente 200 kb que les otorga una capacidad para infectar a otras células, este elemento genético se ha denominado como plásmido Ti o plásmido Ri (Guo *et al.*, 2017).

El plásmido (pRi/pTi) de las agrobacterias cuenta con varias regiones importantes que permiten su funcionamiento como: son la región de virulencia, donde se encuentran los genes *vir* que permiten la transferencia del material genético y estos genes son activados a través de señales químicas de la planta, como los compuestos fenólicos que se liberan en respuesta a una herida (Bahramnejad *et al.*, 2019). La región de los bordes LB y RB, que son los encargados de delimitar la información genética (ADN-T), así mismo propician la región donde se producirá el corte del material genético que será transferido a la célula esta es la sección del plásmido que se transfiere e integra al genoma de la célula hospedera (White F F *et al.*, 1985). En una secuencia diferente se encuentra la región de síntesis de opinas, estos genes son los responsables de hacer que las células hospederas (células infectadas), comiencen a sintetizar (opinas) sustancias que le son una fuente de carbono y nitrógeno al *Agrobacterium* (ver Figura 1 ) (Manzanero *et al.*, 2004).



**Figura 1. Plásmido pTi/pRi de *Agrobacterium*.** Se muestran las regiones más importantes del plásmido pTi/pRi; El **ADN-T**, secuencia que se transfiere a la célula vegetal, donde se encuentran los oncogenes y los genes para la síntesis de opinas, este se encuentra entre los bordes **RB y LB**, que son las regiones donde se produce el corte del ADN-T; Los **genes vir**, secuencias que codifican las proteínas necesarias para la transferencia del ADN-T a la célula vegetal; El **Ori**, secuencia en donde se inicia la replicación de del plásmido dentro de la bacteria; El **catabolismo de opinas**, región integrada con los genes para la producción de opinas. Obtenido de: (Arredondo *et al.*, 2024)

## Métodos de transformación genética

La mejora genética en plantas es una disciplina la cual ha sufrido de cambios a lo largo de la historia desde la domesticación de cultivos hace más de 10 000 años, hasta las técnicas de biotecnología moderna (Cabrera-Ponce & Irapuato, 2009). A partir de los descubrimientos de Mendel con las leyes de la herencia, los mejoradores de plantas han usado estos conocimientos como bases para inducir el mejoramiento genético de variedades usadas en el campo agrícola, con lo que se busca obtener cultivos con mejores propiedades, que permitan cumplir con mayor calidad y tener un aumento en el rendimiento en cuanto a producción. Por otro lado, se han enfocado en que los cultivos tengan resistencia a factores ambientales, que puedan poner en riesgo la integridad de los cultivos, así como a diversas plagas y enfermedades (Morales-Soto & Lamz-Piedra, 2020).

Las técnicas de mejoramiento genético tradicional, son realizadas a partir de cruza genéticas y han sido durante mucho tiempo eficientes. Sin embargo, algunos de los inconvenientes que se han visto en sus aplicaciones es que, para obtener una variedad o un individuo, el tiempo de espera puede ser de más de una generación, aunado a esto, solo se pueden cruzar individuos de la misma especie o especies cercanas, por lo que la variabilidad genética se ve muy limitada, además los rasgos genéticos no siempre son predecibles, ya que, las cruza implican que todo el material genético sea heredado al nuevo individuo (Corona, 2011; de Jaramillo, 2005).

Con el propósito de mitigar estos inconvenientes y hacer más eficiente la transferencia de material genético de un individuo a otro, la biotecnología moderna ha trabajado en el desarrollo de métodos de transformación genética, con los que se busca integrar en el genoma de una célula un casete en el que se incluyen de genes que le confieren una característica o adaptación específica y de manera general estas secuencias incluye un promotor y un terminador (Cabrera-Ponce & Irapuato, 2009).

Estas metodologías de transformación en plantas pueden ser clasificadas en métodos directos e indirectos. En los métodos directos se incluyen técnicas como biobalística, electroporación y la microinyección. De manera, general el objetivo de estos métodos es introducir el ADN de interés directamente en el núcleo de la célula para que se integre en el genoma y este pueda ser expresado, mientras que los métodos indirectos se basan en el uso de agentes biológicos para introducir el material genético en las células. Estos métodos aprovechan la capacidad infecciosa de algunos microorganismos y virus, para insertar ADN en el genoma de células. Los organismos más destacados que se emplean en esta técnica son las bacterias *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, así como algunos vectores virales (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

## Desafíos en la transformación y regeneración in vitro del frijol

El método de transformación por *Agrobacterium*, fue uno de los primeros en desarrollarse y este método ha sido ampliamente usado para transformar una gran variedad de plantas alrededor de 463 especies, incluidas en 109 familias. Entre las familias que más susceptibles son a la transformación mediante *Agrobacterium*, se encuentran las *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Crasulaceae*, *Caesalpinaceae*, *Brassicaceae*, *Polygonaceae*, *Asteraceae* y *Fabaceae*; a esta última pertenece el frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Porter & Flores, 1991). Sin embargo, ha sido difícil de transformarlo y durante décadas se ha considerado como una planta recalcitrante tanto a la regeneración *in vitro*, como a la transformación genética estable (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2014). Dada esta condición, es que existe muy poca información acerca de los elementos genéticos en frijol, que definen las características de resistencia a factores bióticos y abióticos (Flores, 2015). Y por lo tanto aún no se cuenta con protocolos estables de transformación genética para frijol (Morales-Soto & Lamz-Piedra, 2020).

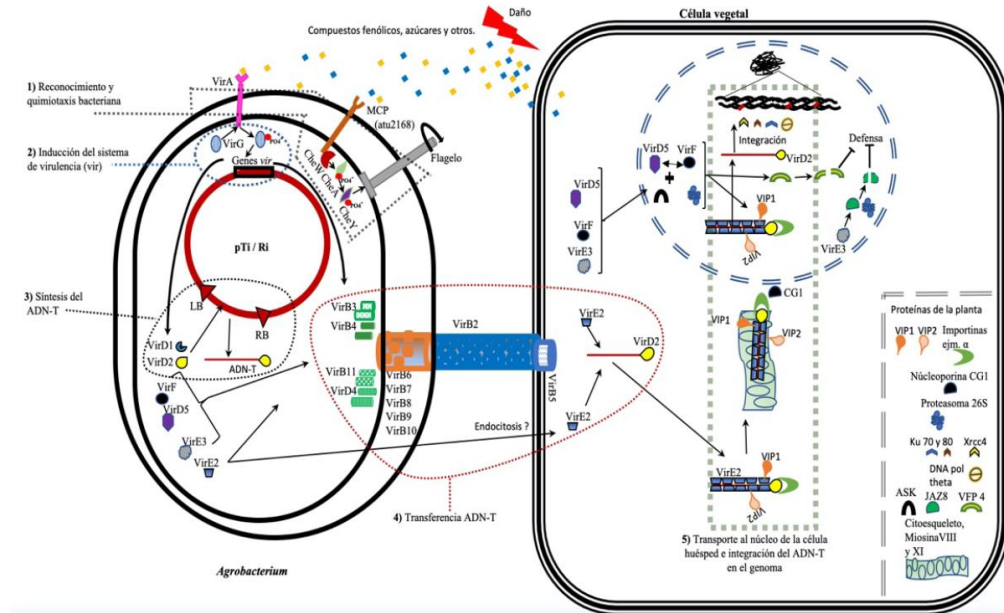
A partir del desarrollo de protocolos de transformación genética para algunas plantas de interés agrícola y comercial, la utilización de estos métodos se extendieron al frijol. La literatura reporta, en diferentes ocasiones la transformación estable de frijol, utilizando aceleración de partículas mediada por descarga eléctrica, se reporta que solo alrededor de 0.5% fue transformado establemente ya que en las próximas cinco generaciones, los genes transferido seguían presentes (Russell *et al.*, 1993). En otro intento de transformación se utilizó la técnica de bombardeo de micropartículas, en meristemos apicales, y se regeneró por vía organogénesis directa; de esta manera se logró obtener plantas transformadas fértiles, aunque con un nivel bajo en cuanto a la eficiencia de transformación (Martínez Castillo, 2014). Por otra parte, el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, se obtuvo transformación estable en frijol, con un mayor porcentaje de transformación que varía entre 10% y 28%, esta variación el autor la atribuye a la susceptibilidad de cada variedad de frijol, así como a la cepa de *Agrobacterium* utilizada (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

La mejora constante en los métodos de transformación genética y el desarrollo de la ciencia, cambiara la baja susceptibilidad que tiene el frijol de transformación y de regenerarse con métodos *in vitro* (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2014).

### **Establecimiento de raíces pilosas**

La metodología de raíces pilosas, se enfoca en la producción de raíces mediante la infección de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* de las plantas (Tepfer, 1984), que inicia cuando las células vegetales sufren una herida y se liberan compuestos fenólicos (acetosiringona principalmente, aunque se menciona que no es el único), estos compuestos son reconocidos como señales químicas por la bacteria, lo que permite que la proteína VirA sea fosforilada intracelularmente y posteriormente le transfiera el grupo fosfato a VirG que promueve la expresión de los genes *vir*. La proteína VirD2 corta y se une en el extremo 5' del ADN-T, mientras que, la VirD1 actúa como topoisomerasa desenrollando del ADN-T, para obtener finalmente un ADN-T de cadena sencilla y recubierto por las proteínas VirE2.

El complejo es transferido a la célula vegetal mediante un sistema similar al pilus bacteriano, conformado por las proteínas VirB2, VirB4, VirB5, VirB6, VirB7, VirB9 y VirB11. Dentro de la célula vegetal, el ADN-T se dirige al núcleo con la participación de las proteínas VirD2 y VirE2 y proteínas de la célula vegetal. Sin embargo, la integración en el genoma vegetal aún no se ha definido del todo, pero se menciona que puede estar relacionado con la actividad ligasa de la proteína VirD2 y los procesos de reparación del ADN de la célula vegetal entre otras (ver Figura 2).



**Figura 2. Proceso de infección de *Agrobacterium* a la célula vegetal.** Etapas del proceso de transformación entre *Agrobacterium* y la célula vegetal. (1) después de sufrir un daño físico la célula vegetal libera compuestos fenólicos, que atraen a la bacteria. (2) el sistema de virulencia bacteriano se activa a través del mecanismo de VirA y VirG. (3), las proteínas VirD1 y VirD2 llevan a cabo la síntesis del ADN-T. (4) el ADN-T es transferido por medio del sistema de secreción tipo IV (T4SS). (5), el ADN-T es transportado al núcleo de la célula huésped e integrado en su genoma (Arredondo *et al.*, 2024).

A partir de la década de 1980, los investigadores se centraron en su aplicación para la producción de metabolitos secundarios inducidos en las raíces; ya que, se tiene mayor producción de raíces, en menor tiempo y los metabolitos pueden ser específicos mediante la transformación (Garro-Monge *et al.*, 2018). Por otro lado, esta metodología ha demostrado importancia aplicándose a procesos de fitorremediación, para estudios de las vías metabólicas y para el desarrollo de plantas transgénicas (Shanks & Morgan, 1999).

Actualmente, se han desarrollado protocolos que permiten la producción de raíces transformadas en algunas plantas de interés, a través de la infección mediante *Agrobacterium rhizogenes*, de las gramíneas en las que se han reportado trabajos de transformación se incluyen algunas como maíz, arroz, cebada y trigo (Gelvin, 2003), en otras plantas de interés agrícola en las cuales ya se ha reportado transformación mediante *Agrobacterium rhizogenes* se incluyen algunas como tomate (*Solanum Lycopersicum*) (Ron *et al.*, 2014), papa (*Solanum tuberosum*) (Visser *et al.*, 1989), soja (*Glycine max*) (Kereszt *et al.*, 2007) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Li *et al.*, 2022), entre otros tantos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las variedades de frijol nombradas como: Negro (LEF-UA-03) y Mostaza (LEF-UA-01), son líneas experimentales pertenecientes al Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS) del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) y fueron facilitadas por Dr. Antonio Flores Naveda. Comercialmente se adquirió la variedad Pinto Saltillo (Valdez *et al.*, 2001)

### *Agrobacterium rhizogenes*

Para la infección de los hipocótilos de las plántulas de frijol, se utilizó la cepa de *A. rhizogenes* K599 y *A. rhizogenes* K599 (pH35GUSGFP). Las cepas se cultivaron en placas de medio Luria Bertani (LB) (Dibico, Cuautitlán Izcalli, México), Para la cepa *A. rhizogenes* K599 sin antibiótico y para *A. rhizogenes* K599 (pH35GUSGFP) se utilizó espectinomicina (Sp) a 50 µg/mL (GoldBio, USA). Las placas LB se incubaron durante 18 horas a una temperatura de 30°C. La biomasa que se desarrolló en cada placa, fue tomada y resuspendida en agua estéril y ajustada a una concentración de 0.6 de absorbancia a 600 nm.

### Preparación del material

1. Se uso una charola de acero inoxidable, a la cual se le cubrió la superficie con tres capas de papel absorbente, posteriormente se cubrió con papel aluminio y se esterilizó en autoclave a 120° C, y presión de 15 psi, durante 15 minutos.
2. Se usaron tubos de ensaye de 15 x 200 mm con tapa, en el interior de estos, se colocó un tubo falcón de 15 mL con una tapa de aluminio, en la cual se realizaron dos perforaciones de 3 mm de diámetro, este material se llevó a esterilizar en autoclave a 120° C, y una presión de 20 psi, durante 15 minutos.

## **Protocolo para transformación de las plantas de frijol con *A. rhizogenes*.**

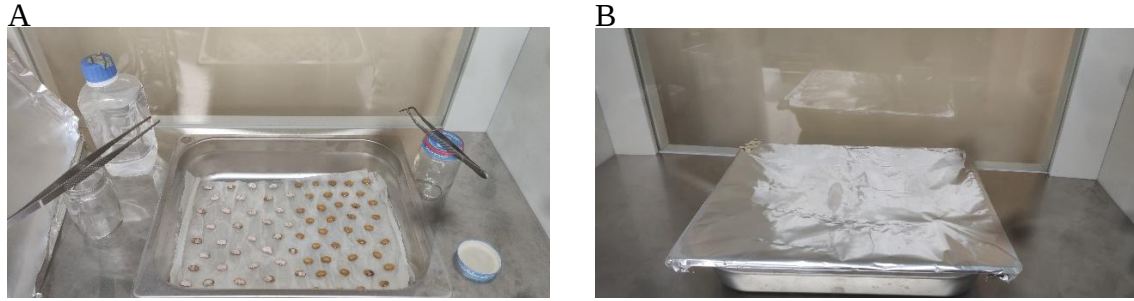
Para transformar las plantas de frijol, se siguió la metodología propuesta por (Estrada *et al.*, 2007), realizando algunas modificaciones.

### **Lavado de semillas**

- 1) Las semillas se lavaron con agua corriente, hasta que se removieron por completo las impurezas (suelo, materia orgánica).
- 2) Posteriormente, en una campana de flujo laminar, usando un vaso de precipitado estéril, se realizaron lavados con agua destilada estéril e hipoclorito de sodio, de la siguiente manera.
- 3) Se agregaron 100 mL de solución de hipoclorito de sodio (20%) con agua estéril, en el vaso de precipitado con las semillas, estas se mantuvieron sumergidas y en agitación constante por 10 minutos.
- 4) Se retiró la solución de hipoclorito de sodio, y se realizaron lavados con agua destilada estéril, esto se repitió hasta que la presencia de cloro en las semillas fue nula.
- 5) Las semillas se dejaron secar en una bandeja con papel absorbente, previamente esterilizado, todo el procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar.

### **Germinación de semillas**

El papel de la charola se humedeció con agua estéril, una vez que la humedad fue uniforme en el papel, se colocaron las semillas sobre este, en forma de tresbolillo, posteriormente se cubrió nuevamente con el aluminio, y se llevó a incubación a una temperatura de 28° C, por aproximadamente tres días (ver Figura 3).



**Figura 3. Germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris*.** En (A) se observan las semillas lavadas y colocas en la charola en forma de tresbolillo. En (B) la charola de acero inoxidable cubierta con una tapa de aluminio, después de que se han colocado las semillas, y que posteriormente se incubó a 28°C por tres días.

### Infección de las plantas

- 1) Cuando el hipocótilo de la plántula tenía 3 cm aproximadamente, se realizaron heridas en la zona que esta próxima a los cotiledones, tratando que solo sea superficial, es decir, sin llegar a perforar en ambas paredes del hipocótilo. Sobre las heridas se inyectaron aproximadamente 10 uL de la suspensión del cultivo de *A. rhizogenes* en cada evento (ver Figura 4).
- 2) Las plántulas que han sido infectadas, se colocan en los tubos falcón previamente llenados con medio Fahraeus, introduciendo la raíz en uno de los hoyos de la tapa (ver Figura 4).



**Figura 4. Inoculación de frijol, con *A. rhizogenes*.** Para infectar el frijol, se realizan pequeñas heridas y se inyecta la bacteria como se muestra en el círculo rojo. Posteriormente se introduce en uno de los orificios de la tapa del tubo falcón, y este se coloca en el interior de un tubo de ensaye con tapa.

## **Mantenimiento de las plantas y observación del proceso de transformación**

Una vez establecidas las plantas en los tubos, se mantuvieron a 28° C, durante 21 días, cada tres días se realizaron observaciones periódicas del desarrollo de las plantas y los cambios que se tienen. Los tubos se deben mantener llenos de medio de cultivo Fahraeus, por lo que se requiere rellenar cada que sea necesario.

## **Determinación de la eficiencia de transformación**

Para evaluar la eficiencia de transformación, se llevaron a cabo tres eventos independientes para cada cepa con cada una de las variedades. Se consideraron 14 plantas por evento, alcanzando un total de 42 plantas de cada una de las tres variedades al final de los tres eventos.

Se llevaron a cabo observaciones cada tres días para asegurar el volumen del medio de cultivo durante el proceso de transformación. No obstante, el desarrollo de las raíces transgénicas se evaluó específicamente en los días 7 y 14 días posteriores a la infección (dpi). La determinación de la eficiencia de transformación se realizó a los 14 dpi, empleando para ello la siguiente formula.

$$\% \text{ transformación} = (\# \text{ plantas con raíces transformadas} / \# \text{ de plantas}) \times 100$$

## **Visualización de las raíces transformadas**

La identificación de las raíces transformadas, se llevó a cabo mediante la observación en un microscopio de fluorescencia, a los 21 días postinfección (dpi). Se identificaron las plantas que presentaron fluorescencia en las raíces debido a la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), presente en el ADN-T.

## **Detección del ADN-T en las raíces transformadas por PCR**

Para confirmar la presencia del transgén en el genoma de la célula vegetal, se procedió a la extracción de ADN genómico a partir de 500 mg de tejido de raíz, empleando el detergente CTAB; las raíces utilizadas fueron las que previamente mostraron una fluorescencia en el microscopio para la GFP (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

El ADN extraído de las raíces fue sometido a una reacción de PCR, que se llevó a cabo de la siguiente manera: para la detección de la secuencia del gen que codifica la proteína verde fluorescente, se utilizaron los oligonucleótidos FwEGFP 5'-GTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3' y RvEGFP 5'-CCCGGGTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'. La mezcla para la reacción de amplificación contenía 50 ng de ADN, 3.0 µL de tampón Taq 10×, 1.0 µL de MgCl<sub>2</sub> al 50 mM, 1.0 µL de dNTPs, 1.0 unidad de ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y 1.0 µL (10 pmol) de cebador, con un volumen total final de 30 µL.

La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que consistieron en 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C en el termociclador Techgene (TechneUK).

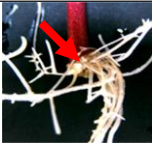
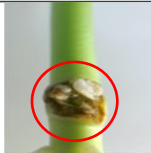
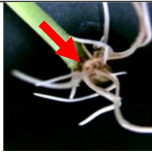
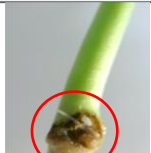
Finalmente, los productos de la reacción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, los cuales fueron teñidos con el colorante Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, NSW, AUS) y visualizados usando un fotodocumentador Biotop (Biotech Co. Ltd., Shanghai, China).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Susceptibilidad y determinación de la eficiencia de transformación

La bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, al reconocer las señales químicas emitidas por la liberación de compuestos fenólicos generados por las heridas en las células vegetales, es capaz de llevar a cabo una serie de procesos que le permiten transferir un fragmento de información genética conocido como ADN-T, el cual se encuentra en el plásmido Ri. Esta transferencia de material genético involucra genes que son responsables de la producción de auxinas y citoquininas, lo que culmina en la formación de callosidades en las plantas, y posteriormente la formación de raíces pilosas (Blanco *et al.*, 2003).

En las observaciones que se realizaron durante el proceso de la infección, mostraron que la formación de los callos inicio a partir del tercer día y termino de formarse al sexto día después de inocular la planta. Posteriormente, la emergencia de raíces transformadas se identificó a partir del séptimo día, indicando una respuesta temprana al proceso de transformación. A medida que continuo el desarrollo de las raíces, se observó que a los 14 días después de la inoculación, éstas alcanzaron una longitud aproximada de 3 cm (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 5). El tiempo que demora la formación de las raíces transformadas en este trabajo, es considerablemente menor al reportado por Cuong *et al.*, (2023); Pacheco *et al.*, (2024), donde las raíces transformadas emergieron a los 10 días y la formación de la radícula completa se estableció en 28 días, mientras que, en Khandual & Reddy, (2014) utilizaron tres protocolos diferentes para la producción de raíces transformadas en frijol, iniciando el desarrollo a partir del día 14 y la radícula completa a los 28 días mediante los protocolos: soporte de lana de roca e inyección en el nodo del cotiledón. Mientras que, con explantes a partir de plántula de frijol común con la radícula cortada lograron un tiempo similar al obtenido en este estudio, con tan sólo 8 días para iniciar el crecimiento de raíces y se completó a los 15 días. Sin embargo, hay evidencia que la eficiencia de transformación en una planta de frijol, puede estar influenciada por la cepa bacteriana, el vector, la genética de la planta e incluso el manejo que reciben durante el proceso de transformación (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2024).

| <i>A. rhizogenes</i> K599 |                                                                                   |                                                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Variedad                  | 7 dpi                                                                             | 14 dpi                                                                              |
| Negro (LEF-UA-03)         |  |  |
| Pinto Saltillo            |  |  |
| Mostaza (LEF-UA-01)       |  |  |

**Figura 5. Desarrollo de las raíces pilosas en frijol.** En la columna 7 dpi se muestra el inicio del proceso tumoral en la zona de infección en las tres variedades (señalado con círculos rojos). En la columna de 14 dpi se muestra el corte de la raíz principal en las plantas, para favorecer el desarrollo de las raíces pilosas (señaladas con las flechas rojas) que surgen de la zona de infección.

La evaluación de la eficiencia de transformación determinada a los 14 dpi, muestra que la variedad mostaza con la cepa *A. rhizogenes* K599 tuvo la menor susceptibilidad con un porcentaje de 69.048 %. Sin embargo, con la cepa *A. rhizogenes* K599 (pH35GUSGFP) tuvo la mayor susceptibilidad con un 76.190 %. Las variedades Pinto y Negro (LEF-UA-03) se comportaron de manera muy similar con un porcentaje de susceptibilidad de 76.190% para la cepa *A. rhizogenes* K599 y 71.190% para la cepa de *A. rhizogenes* K599 (pH35GUSGFP) (ver Tabla 1). La eficiencia de transformación que se obtuvo en las tres variedades, fue similar a la reportada por (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; Khandual & Reddy, 2014) con un porcentaje de alrededor de 70%. Sin embargo, es menor al reportado por (Cuong *et al.*, 2023), ya que obtuvo un eficiencia del 100% usando el protocolo de plántulas miniatura con la radícula cortada y portadoras de cotiledones.

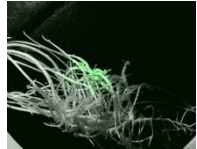
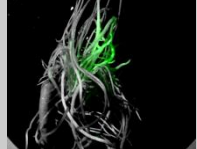
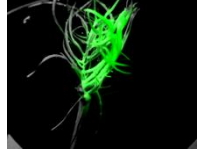
**Tabla 1. Determinación de la eficiencia de transformación**

| <i>A. rhizogenes</i> K599 (14 dpi)              |                    |                            |                    |
|-------------------------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| Variedad                                        | Plantas inoculadas | Plantas con raíces pilosas | Transformación (%) |
| <b>Negro (LEF-UA-03)</b>                        | 42                 | 32                         | 76.190             |
| <b>Pinto Saltillo</b>                           | 42                 | 32                         | 76.190             |
| <b>Mostaza (LEF-UA-01)</b>                      | 42                 | 29                         | 69.048             |
| <i>A. rhizogenes</i> K599 (pH35GUSGFP) (14 dpi) |                    |                            |                    |
| <b>Negro (LEF-UA-03)</b>                        | 42                 | 30                         | 71.429             |
| <b>Pinto Saltillo</b>                           | 42                 | 30                         | 71.429             |
| <b>Mostaza (LEF-UA-01)</b>                      | 42                 | 32                         | 76.190             |

### Visualización de las raíces transformadas

Los marcadores genéticos permiten identificar diferencias genéticas entre individuos, generalmente se muestran como señales o características distintivas. En individuos modificados genéticamente es común que estos marcadores se encuentren próximos a genes de interés (Gill-Langarica & Mayek-Pérez, 2008). En estudios de transformación genética, generalmente se integran marcadores genéticos en los transgenes, ya que, la detección de la presencia o ausencia del gen marcador permite identificar si la transformación se ha realizado exitosamente o ha fracasado. El gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), que es usado por la capacidad de bioluminiscencia cuando se utiliza como gen reportero (Pérez Millán & Becú-Villalobos, 2009).

A los 21 dpi se realizó la observación de las raíces bajo un microscopio de fluorescencia para identificar aquellas que expresaban la proteína GFP (ver Figura 6). De la radícula formada por las raíces que surgen de la zona de infección, se identificaron y separaron, solo las raíces que presentan el transgén (GFP). Estas posteriormente fueron disectadas y usadas para realizar la detección de la secuencia de la proteína GFP en el ADN de las plantas analizadas utilizando la PCR (ver Figura 7).

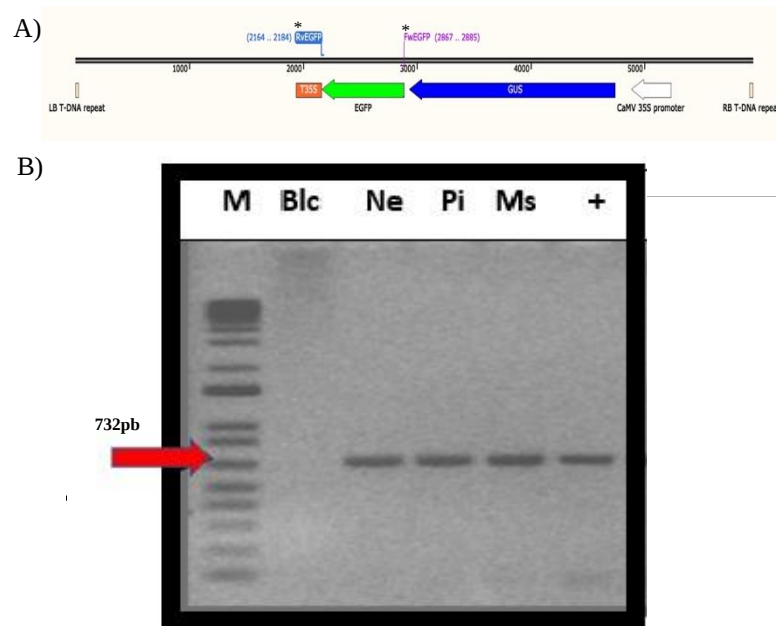
| <i>A. rhizogenes</i> K599 (pH35GUSGFP) 21 dpi |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Variedad                                      | Campo claro (Cc)                                                                  | Campo fluorescencia (Cf)                                                           | Cc + Cf                                                                             |
| Negro (LEF-UA-03)                             |  |  |  |
| Pinto Saltillo                                |  |  |  |
| Mostaza (LEF-UA-01)                           |  |  |  |

**Figura 6. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces transgénicas en las variedades de *P. vulgaris*.** La observación de la fluorescencia en el nuevo sistema radicular, permite identificar las raíces que han recibido y expresado el transgén (GFP). En la primera columna (Campo claro, Cc), se observan todas las raíces que emergen de la zona de infección. Sin embargo, no todas tienen el transgén GFP, lo que se puede observar en la segunda columna (Campo fluorescencia, Cf), en donde solo las raíces que expresan GFP son visibles. En la tercera columna (Cc + Cf), se combinan ambas imágenes, mostrando tanto las raíces que emergen del sitio de infección como aquellas que han expresado la proteína GFP

### Detección del ADN-T en las raíces transformadas por PCR

A partir de la década de 1980, después del desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), comenzó a implementarse en diferentes áreas como la genética, la medicina forense, microbiología y biotecnología (Tamay de Dios *et al.*, 2013). La importancia de esta técnica se basa en su capacidad para multiplicar secuencias específicas de ADN mediante el diseño de cebadores (primers) y a través de ciclos repetidos de Desnaturalización, Alineamiento y Extensión (Pérez de Castro, 2011). Los productos que se obtienen de la reacción de PCR, se someten a análisis por diferentes métodos como secuenciación o electroforesis, en esta última técnica se espera que los fragmentos obtenidos, coincidan con el tamaño de la secuencia esperada.

La determinación de la presencia de la secuencia codificante de la GFP en el genoma de las raíces que fueron previamente disecadas se muestra en la Figura 7, donde se observa en las tres variedades evaluadas, la presencia de una banda de 732 pb que es fragmento esperado de secuencia de la proteína GFP. Con lo que se corrobora que el transgén se integro al genoma de las raíces.



**Figura 7. Análisis de los productos de la PCR realizada a las raíces que mostraron la fluorescencia para GFP.** En (A) se muestra la representación del ADN-T incluido en el vector pH35GUSGFP de la cepa de *A. rhizogenes* K599, los cebadores empleados para la PCR se indican con asteriscos negros. En la representación de la secuencia se muestra la ubicación del cebador Forward (FwEGFP) a partir la posición 2865 a la 2885, y para el cebador Reverse (RvEGFP) de la 2164 a la 2184, lo que indica un tamaño de la secuencia de 732 pb. En (B), se observa el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2% en el que se aprecia la amplificación de los fragmentos de 732 pb de cada muestra tomada de raíces que fueron procesadas a los 21 días en cada variedad, el fragmento se señala con una flecha roja. En la columna marcada con M, se indica la corrida del marcador de tamaño molecular 1kbplus (Invitrogen); en la columna Blc, se corrió una muestra de los reactivos de a PCR (Master mix) sin gADN; en la columna Ne, se colocó la muestra de la variedad Negro ID-30; en la columna Pi, se corrió la muestra de la variedad Pinto Saltillo F.C nov 2022; en la columna Ms, se colocó la muestra de la variedad Mostaza (Campo exp bajo); en la columna +, se colocó el control positivo que consta de 50 ng/ $\mu$ L del plásmido pH35GUSGFP purificado.

## CONCLUSIÓN

El presente estudio se muestra que las tres variedades mejoradas de frijol evaluadas, generadas en la UAAAN, presentan una alta susceptibilidad (69–76%) a la formación de raíces pilosas mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* K599. Esta característica las convierte en candidatas viables para su uso en análisis funcionales y biotecnológicos entre ellos: el análisis funcional de genes; la producción de metabolitos de interés (como compuestos farmacéuticos) utilizando las raíces transformadas como biorreactores; en estudios de interacción planta-microorganismo, permitiendo evaluar la respuesta molecular y fisiológica del frijol frente a bacterias benéficas o patógenas y la valuación de genes candidatos para mejora genética, lo cual puede acelerar programas de mejoramiento asistido por biotecnología. En conjunto, estos resultados posicionan al frijol generado en la UAAN no solo como un cultivo de relevancia económica, sino también como un modelo prometedor para estudios de transformación genética mediada por *A. rhizogenes* dentro de la familia Fabaceae.

## REFERENCIAS

- Arredondo, J. M., Martínez, E. N. R., Robles, A. I. L., & Verdayes, M. A. J. (2024). *Agrobacterium*: Cuatro décadas colaborando con la biotecnología. *Universitas Agri*, 3(2), 13–28.
- Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107405.
- Blanco, M., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomia costarricense*, 27(1), 19–28.
- Cabrera-Ponce, J. L., & Irapuato, G. C.-I. C. G. (2009). *TRANSFORMACION GENETICA DE PLANTAS*.
- Corona, M. (2011). Historia de la Biotecnología y sus aplicaciones. *Obtenido de: <http://siladin.cch>*.
- Cuong, N. X., Loan, T. T., Linh, C. K., Dong, T. T., & Thao, B. P. (2023). Highly efficient *Rhizobium rhizogenes*-mediated hairy root transformation for gene functional study in mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Vietnam Journal of Biotechnology*, 21(2), 375–384.
- de Jaramillo, E. H. (2005). Transformación genética de plantas para resistencia a virus. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 29(110).
- Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49–61.
- Espinosa-Huerta, E., Quintero-Jiménez, A., Cabrera-Becerra, K., & Mora-Avilés, M. A. (2013). Stable and efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Phaseolus vulgaris*. *Agrociencia*, 47(4), 319–333.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., & Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* By *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature protocols*, 2(7), 1819–1824.

- Flores, M. L. (2015). El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria*, 16(2).
- Garro-Monge, G., Jiménez-Quesada, K., & Pérez Méndez, R. (2018). Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro de raíces pilosas de *Phyllanthus acumminatus*, para la producción de compuestos con actividad biológica. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(3), 66–73.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16–37.
- Gill-Langarica, H. R., & Mayek-Pérez, N. (2008). Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 164–176.
- Guo, M., Huang, Z., & Yang, J. (2017). Is there any crosstalk between the chemotaxis and virulence induction signaling in Agrobacterium tumefaciens? *Biotechnology Advances*, 35(4), 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.008>
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). *Phaseolus vulgaris*—Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1205–1215. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.06.001>
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C. D., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., & Gresshoff, P. M. (2007). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature protocols*, 2(4), 948–952.
- Khandual, S., & Reddy, P. M. (2014). Rapid, efficient and high-performance protocol for Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root transformation of the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(04), 333–339.
- Li, H. L., Fang, P. P., Hu, Y. N., Li, X. F., Xia, W. J., & Xu, P. (2022). An Agrobacterium rhizogenes strain R1000-mediated efficient hairy root transformation protocol for common bean. *Legume Research-An International Journal*, 45(10), 1247–1251.
- Manzanero, B. H. C., Echeverría, S. E., Kay, A. J., Escoffíé, P. Ó. A., & Zapata, L. C. R. (2004). *La bacteria Agrobacterium tumefaciens*.

- Martínez Castillo, B. (2014). *Regeneración por organogénesis directa y transformación genética de frijol (Phaseolus vulgaris L.) Mediante bombardeo de micropartículas*.
- Morales-Soto, A., & Lamz-Piedra, A. (2020). Genetic improvement methods in the cultivation of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) against the Bean Yellow Golden mosaic Virus (BGYMV). *Cultivos Tropicales*, 41(4), e10.
- Pacheco, R., Estrada-Navarrete, G., Solis-Miranda, J., Nava, N., Juárez-Verdayes, M., Ortega-Ortega, Y., & Quinto, C. (2024). A comprehensive, improved protocol for generating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) transgenic hairy roots and their use in reverse-genetics studies. *Plos one*, 19(2), e0294425.
- Perez de Castro, A. M. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*.
- Pérez Millán, M. I., & Becú-Villalobos, D. (2009). La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 69(3), 370–374.
- Porter, J. R., & Flores, H. (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(4), 387–421.
- Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K., Garcha, J., Winte, S., Masson, H., & Inagaki, S. (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant physiology*, 166(2), 455–469.
- Russell, D., Wallace, K., Bathe, J., Martinell, B., & McCabe, D. (1993). Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 12(3), 165–169.
- Shanks, J. V., & Morgan, J. (1999). Plant ‘hairy root’ culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 151–155.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70–78.

Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by agrobacterium rhizogenes: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959–967. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90430-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90430-6)

Valdez, I. S., Pérez, F. J. I., Serna, R. R., Singh, S. P., & Gallegos, J. A. A. (2001). Pintillo Saltillo: Nueva variedad de frijol para el Altiplano de México. *Agricultura Técnica en México*, 27(1), 73–75.

Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). Agrobacterium rhizogenes: Recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383–403.

Visser, R., Jacobsen, E., Witholt, B., & Feenstra, W. (1989). Efficient transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *Theoretical and Applied Genetics*, 78, 594–600.

White F F, Taylor B H, Huffman G A, Gordon M P, & Nester E W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 164(1), 33–44. <https://doi.org/10.1128/jb.164.1.33-44.1985>