

Estudios de transformación genética en arveja voluble cultivar Santa Isabel

Genetic transformation study in climbing pea Santa Isabel cultivar

*María Isabel Peñaranda**, *Gustavo Adolfo Ligarreto***, *Víctor Manuel Nuñez****

Resumen

Se probaron diferentes alternativas de transformación genética en arveja cultivar "Santa Isabel" con el fin de estudiar los factores que afectan el proceso. Se emplearon los métodos de infiltración mediante vacío, infección directa de explantes, transformación de polen, y microinyección de ovarios. La prueba histoquímica de expresión *gus* fue escogida como método de análisis en la determinación de transformantes positivos. Con las metodologías empleadas se detectaron puntos azules en el tejido vegetal, lo cual indica la expresión transitoria del transgen en los explantes utilizados. Los resultados obtenidos sugieren que la transformación genética en arveja cultivada en Colombia puede ser utilizada para la introducción de genes de interés como apoyo a los procesos de mejoramiento genético.

Palabras clave: genotipos, expresión *gus*, fitomejoramiento.

Abstract

Different genetic transformation alternatives were tested in pea, "Santa Isabel" cultivar, with the purpose of studying the factors that affect the process. The methods of infiltration with vacuum, direct infection of the explants, pollen transformation and ovary microinjection were used. The histochemical test of the *gus* expression was chosen as analysis method in the determination of positive transformants. With the used methodologies, blue spots in the plant tissue were detected, which indicates transient expression of the transgene in utilized explants. The obtained results suggest that the genetic transformation in pea genotypes planted in Colombia can be utilized for the introduction of genes of interest as support to genetic improvement.

Key words: genotypes, *gus* expressions, plant breeding.

Recibido: septiembre 15 de 2012

Aprobado: noviembre de 2013

* Sys Technologies Ltda., departamento de investigación y desarrollo, isabella1125c@yahoo.com

** Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Sede Bogotá, galigarretom@unal.edu.co

*** Corporación Colombiana de investigación agropecuaria, Corpoica, Programa Nacional de Biotecnología, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Colombia. vnunez@corpoica.org.co

Introducción

La arveja es una leguminosa de especial importancia considerada alimento básico en la canasta familiar, por ser fuente de carbohidratos, vitaminas y proteínas (Klein y Kurilich, 2001). También es fuente de antioxidantes naturales los cuales se asocian a la prevención de desordenes de salud tales como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardíacas (Shewfelty Rosario, 2000). El cultivar Santa Isabel domina el mercado nacional de arveja y corresponde a un material que los agricultores producen a nivel regional con aceptación comercial, pero este cultivar presenta susceptibilidad al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* que causa la enfermedad del "amarillamiento" siendo uno de los mayores limitantes del cultivo en los departamentos de Cundinamarca, Nariño y Boyacá, causando pérdidas que fluctúan entre el 50 y el 100% de las plantas en producción. En el contexto mundial y de manera reciente un gran número de publicaciones científicas mencionan la aparición de nuevas razas, formas especiales y nuevas especies de *F. oxysporum* como un agente patogénico causante de fuertes implicaciones en la economía agrícola moderna (Sharma, 2011).

En aspectos relacionados con la producción del cultivo de arveja se presentan deficiencias en la oferta de nuevas variedades mejoradas por la carencia de casas proveedoras de semillas, lo cual conlleva a la falta de semillas certificadas por pureza genética, alta germinación y buen vigor de las plántulas. En consecuencia el insumo semilla para los cultivos es adquirido por los agricultores de la cosecha anterior en su finca o la compran en los mercados locales de los municipios de las zonas de producción de clima frío (Pacheco et al., 2010).

Con el fin de contribuir con la solución de limitantes bióticos y reducir el uso fungicidas sintéticos, el mejoramiento genético convencional es la alternativa más razonable para obtención de resistencia a ciertos patógenos, siempre y cuando en la especie cultivada o en especies relacionadas, se encuentre la fuente genética de resistencia. En caso contrario, la transformación genética surge como alternativa que complementa los métodos convencionales de control de enfermedades, causadas por patógenos como *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp. y *Ascochyta* sp. entre otros. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar una metodología de transformación genética de arveja que permita una eficiente regeneración de plantas y contribuir al mejoramiento genético de la especie en Colombia.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en los laboratorios de biotecnología de la Unidad de Biotecnología y Recursos Genéticos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Centro de Investigación Tibaitatá en Mosquera (Cundinamarca) y de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El material vegetal se propagó en condiciones de agricultura protegida en los invernaderos de la Facultad de Agronomía de la misma universidad con temperatura promedio diaria de 20 °C y humedad relativa de 74%.

Infeción directa con *A. tumefaciens* en cortes transversales de embriones maduros

Material vegetal: se utilizaron embriones maduros de semillas de arveja cultivar Santa Isabel después de cinco días de imbibición en agua, en condiciones de asepsia y con la ayuda de un escalpelo se hicieron cortes transversales a embriones para obtener 32 segmentos de 2 mm de espesor por cepa de *A. tumefaciens* a los cuales se colocaron sobre papel filtro humedecido hasta el momento de la infección.

Cepas y vectores: se emplearon las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 y EAH105 conteniendo los vectores pCAMBIA1201 y pCAMBIA1303, respectivamente, provenientes de los laboratorios de biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y de CORPOICA. Cada uno de estos vectores contiene una región codificadora del gen reportero *gusA* y el gen de selección higromicina, *hptII*. Los ensayos se planearon con base en protocolos descritos para transformación de arveja y otros cultivos vía *A. tumefaciens*, de acuerdo con Ko et al. (2003); Beschtoold et al. (2000); Bean et al. (1997) y Hartmut et al. (1993).

Cultivo de tejidos y transformación: en un erlenmeyer con 20 ml del medio de cultivo yeast extract peptone (YEP) con kanamicina, se inocularon las cepas de *A. tumefaciens*, se incubaron a 28°C y agitación constante a 130 rpm durante la noche. La suspensión fue centrifugada a 4°C, a 3000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se re-suspendieron en 20 ml de medio Murashige y Skoog (MS) con adición de acetosirringona (AS) en dos concentraciones 100 µM y 200 µM, para activar la bacteria y se dejó crecer hasta alcanzar un OD_{600nm} de 0,2.

La infección se realizó en un tiempo de 15 minutos a 110 rpm en oscuridad y a 25°C. El cocultivo fue realizado en medio MS sólido con pH 5,8 por 72 horas,

22°C y un fotoperiodo de 16 horas luz, su expresión transitoria se evaluó a las 2 y 96 horas.

Infiltración mediante vacío

Material vegetal: se emplearon semillas frescas de arveja embebidas en agua durante dos días sobre toallas de papel absorbente estériles. A las plántulas se les eliminó el epicótilo e hipocótilo, dejando el segmento correspondiente al nudo cotiledonario, al cual se le causó heridas con un escalpelo, en un total de 32 unidades experimentales por cepa de *A. tumefaciens* transformada.

Cepas y vectores: para este ensayo se utilizó la cepa LBA4404 transformada con los plásmidos pCAMBIA 1201 y pCAMBIA 1302 las cuales fueron crecidas a $OD_{600\text{nm}}$: 0,8, para comparar la eficiencia de transformación de los constructos.

Cultivo de tejidos y transformación: los nudos cotiledonarios utilizados como explantes para la transformación vía *A. tumefaciens* fueron infectados de acuerdo con los protocolos de Mahmoudian *et al.*, 2002; Tjokrokusumo *et al.*, 2000 y Bouchez *et al.*, 1998. Los explantes se expusieron en medio de infección en una solución de *A. tumefaciens* en cajas petri, utilizando una campana para la infiltración conectada a una bomba de vacío, con la cual se aplicó una presión de 80 PA, durante 5 y 15 minutos, según lo propuesto por Mahmoudian *et al.*, 2002; después del tratamiento los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada y luego en una solución de cefotaxima 100 mg.l⁻¹. Los explantes se sembraron en medio de cocultivo con cefotaxima 200 mg.l⁻¹ y se llevaron a cuarto de crecimiento en oscuridad por cuatro días. Se evaluó la expresión del gen *gus* y se pasó a medio de selección con higromicina 50 mg.l⁻¹ y cefotaxima 200 mg.l⁻¹ durante ocho días.

Inoculación directa en solución con *A. tumefaciens*

Material vegetal: como explante para el proceso de transformación se tomaron 100 segmentos cotiledonarios de arveja a los cuatro días de germinación.

Cepas y vectores: la cepa LBA 4404 conteniendo el vector pCAMBIA 1305.1 fue empleada de acuerdo a los protocolos para transformación de arveja de Grant *et al.* (1995) y Schroeder *et al.* (1993).

Transformación: el proceso empleado se describe a continuación: Día uno: esterilización de semillas de arveja usando etanol al 70% durante 30 segundos, se-

guido por hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos con agitación en un vortex; seis enjuagues con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron 25 semillas por erlenmeyers de 250 ml en 25 ml de agua, dejando en agitación a 80 rpm y 24°C durante una noche.

Día dos: las semillas fueron transferidas a placas de petri, con papel filtro y tres ml de agua, las cuales se incubaron a 20°C por dos días. La cepa de *A. tumefaciens* se cultivó en 10 ml de medio y se colocó en agitación por una noche.

Día 3: se tomaron 100 µl de cultivo de *A. tumefaciens* de la solución obtenida el día 2 y se inocularon en 10 ml de medio fresco sin antibióticos llevando a incubación a una temperatura de 28°C en agitación durante una noche.

Día 4: la concentración de *A. tumefaciens* se ajustó a un $OD_{600\text{nm}}$ de 0,6 mediante la adición de medio líquido MS. Se procedió a la separación de la testa, la radícula y los brotes de la semilla y se realizó la infección sobre meristemos cotiledonarios haciendo heridas con un escalpelo, humedecido con cultivo de *A. tumefaciens*. Los cotiledones inoculados con la bacteria fueron colocados en cocultivo en cajas petri con papel filtro y tres ml de agua destilada por cuatro días a 20°C.

Día 8: se eliminó el tejido cotiledonario necrosado y los brotes individualizados se establecieron en medio de Gamborg suplementado con 4,5 mg.l⁻¹ de BAP, 0,1 mg.l⁻¹ de AIB, 500 mg.l⁻¹ cefotaxima y el agente de selección higromicina a concentración de 25 mg.l⁻¹.

Día 20: se hizo el subcultivo de los explantes a medio fresco, el nivel de agente de selección fue incrementado a 50 mg.l⁻¹, y los brotes verdes más vigorosos fueron eliminados.

Transformación vía micro inyección de flores

Material vegetal: se utilizaron 50 botones florales de arveja colectados después de la emergencia del botón hasta la antesis con el fin de inyectar los ovarios con la solución de *A. tumefaciens*

Cepas y vectores: para realizar este experimento, se utilizó la cepa LBA 4404 conteniendo el vector pCAMBIA 1201.

Transformación: el procedimiento empleado fue diseñado con base en el protocolo de transformación *in vivo* de flores y ápices de *Arabidopsis thaliana* según Bouchez y Bechtold, (1998). El procedimiento consistió en preparar una solución de *A. tumefaciens* a una

densidad óptica de OD_{600nm} de 0,6, empleándose una jeringa Hamilton, para inyectar las flores *in vivo* en condiciones de invernadero. Se probaron volúmenes de 15 y 30 µl de la suspensión de *A. tumefaciens* para inyectarlos en el ovario de 50 flores, las cuales se etiquetaron y posteriormente se cosecharon las semillas para la evaluación de la presencia del transgen, mediante el análisis de la expresión del gen *gus*.

Transformación de polen

Material vegetal: se colectaron 50 botones florales después de la emergencia hasta la antesis y se les retiraron los pétalos para desprender y colectar las anteras en una placa petri.

Cepas y vectores: Para realizar este experimento, se utilizó la cepa LBA 4404 conteniendo el vector pCAMBIA 1201.

Transformación: las anteras se dejaron a temperatura y humedad ambiente por dos horas y luego el polen fue liberado con ayuda del escalpelo. Se utilizó un medio preparado con agarosa, sacarosa, MnSO₄ y H₃BO₃ para inducir la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en presencia de *A. tumefaciens*, siguiendo el procedimiento de Burke *et al.* (1999). Primero, se probó la viabilidad del polen por germinación y luego se procedió a hacer la transformación aplicando la solución de *A. tumefaciens* con una OD_{600nm} de 0,6. Los granos de polen permanecieron en contacto con la solución bacteriana durante 20 minutos. Luego los granos de polen se extrajeron de la solución y fueron evaluados a las 2 y 96 horas, y se verificó la expresión del gen *gus*.

Evaluación transitoria de la actividad *gus*

Para esta actividad, el tejido a evaluar se depositó en una solución de fijación y se infiltró al vacío durante 1 a 5 minutos, se incubó el tejido en la solución de fijación durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después del tratamiento, se realizaron tres lavados en una solución de fosfato de sodio (NaPO₄) de 50 mM y pH 5,0. El tejido se transfirió a una solución del agente histoquímico 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-glucoronido (X-Gluc.) y se incubó a 37°C durante la noche. Después de la incubación, se retiró el agente histoquímico, se decoloró el tejido vegetal con etanol al 70% haciendo varios cambios durante tres horas o con hipoclorito de sodio al 2,5% durante 20 minutos. La presencia de color azul en el tejido fue evaluada como indicador de la expresión del gen de la β-glucoronidasa (*gus*). Como control positivo se emplearon hojas de plántulas de tabaco transformadas, procedentes del Instituto

de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) y como control negativo, se utilizó tejido de arveja sin transformar.

En el procesamiento de los datos de los ensayos se aplicó la prueba *Chi*-Cuadrado mediante el software SAS® versión 9.1, debido a que los resultados de las variables se trataron como frecuencias relativas.

Resultados y discusión

Infección directa de cortes transversales de embriones maduros

De un total de 64 explantes transformados se presentó diferencia altamente significativa (0.0118**) según la prueba de *Chi*-cuadrado entre la expresión *gus* en ocho (12,5%) explantes cuando se usó la cepa LBA4404, mientras que con la cepa EHA105 se detectó un explante (1,6%) con la coloración azul. Este resultado difiere con los reportes realizados en soya (Meurer *et al.*, 1998), arveja (Nadolska *et al.*, 2000) y *Galega oritalis* Lam (Collén y Jarl, 1999), en los que se encontró que la cepa EHA105 fue más efectiva en transformación que LBA 4404/GV 2260 y C58C1. No se pudo establecer cual fue el factor de la baja capacidad de la cepa EHA 105, pero puede ser por factores como la falta de interacción de la cepa con el genotipo, el plásmido utilizado, la estabilidad del vector en la cepa, la pérdida de viabilidad de la cepa, o posibles mutaciones que pueden influir en la incorporación del gen al genoma y en la expresión del mismo (Gheysen *et al.*, 1998). Por la respuesta anterior de la expresión del gen *gus* se determinó emplear la cepa LBA 4404 en los ensayos posteriores de transformación.

Se conoce que la acetosiringona induce el operon *Vir* de *A. tumefaciens* (Hiei *et al.*, 1994) y como lo describen Wydro *et al.* (2006), su concentración puede afectar el proceso de transformación. Al evaluar este aspecto en el estudio se encontró una respuesta de expresión en cinco explantes, cuando se usó una concentración de 100 µM, y en cuatro explantes, con una concentración de 200 µM. La prueba de *Chi*-cuadrado mostró no dependencia entre los dos criterios de clasificación y por ende la respuesta no se asocia con la concentración de acetosiringona para el caso de arveja variedad Santa Isabel

Según Pineda (1998) en células de plátano Dominicano hartón el uso de 200 µM de acetosiringona fue más eficiente para la obtención de resultados de expresión transitoria *gus* y Mahmoudian *et al.* (2002), empleando la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 con el vector binario pGUSINT y la acetosiringona a una concentración

de 200 μM registraron resultados con altos niveles de expresión transitoria del gen *gus* en nudos cotiledonarios de lenteja. Esos resultados fueron comparados con los obtenidos por Warkentin y McHugen (1993), quienes usaron acetosiringona en concentración de 100 μM para inducción de los genes de expresión *vir*. Grant *et al.* (1995), informan sobre resultados positivos empleando 200 μM de acetosiringona en cotiledones inmaduros de arveja.

Para la variable tiempo de evaluación, se encontró una diferencia estadística significativa (0.011*), entre la respuesta de expresión *gus* para un rango entre 2 y 96 horas. La respuesta de la expresión transitoria del gen *gus*, no se mantuvo en el tiempo mostrando un pico alto a las dos horas de evaluación, con un descenso a las 96 horas. La expresión temprana de los genes del T-DNA es usualmente observada como un pico alto, que con el transcurso de las horas declina progresivamente (Yoshioka *et al.*, 1996). Es probable que el pico alto de expresión procedente de T-DNAs transferidos a la célula, no sean el resultado de la integración al DNA cromosómico. Las moléculas de T-DNA no integradas pueden ser eventualmente eliminadas, lo cual explica la naturaleza del fenómeno de expresión transitoria (Gheysen *et al.*, 1998). Lo que podría ocurrir con la expresión transitoria del gen *gus*, es que corresponde a la expresión del gen contenido en el T-DNA que ha sido transferido a la célula vegetal.

Para determinar la transformación estable, con resultados confiables, debe haber proliferación celular, de tal manera, que las nuevas células también presenten la expresión (Gheysen *et al.*, 1998). Algunos estudios como los de Kapila *et al.* (1997), documentan que la expresión de genes del T-DNA ocurre dentro de las 48 horas siguientes al proceso de transformación, durante la fase de cocultivo de las células vegetales con *A. tumefaciens*, y Narasimhulu *et al.* (1996), detectaron la transcripción del gen *gus* a las 18 horas después del cocultivo. La expresión transitoria no siempre se puede correlacionar con la transformación estable. Una integración inadecuada en el genoma celular implicaría que un incremento en los niveles de expresión transitoria no necesariamente se traduce en una transformación estable (Maximova *et al.*, 1998).

Infiltración mediante vacío

Los resultados obtenidos en embriones cigóticos mostraron expresión transitoria del gen *gus* en brotes inducidos a partir de regiones cotiledonarias, lo cual indica que hubo transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* al tejido vegetal. Petri (2005) en experimentos de transformación con albaricoque, encontró que la infiltra-

ción mediante vacío, no incrementó significativamente el porcentaje de explantes transformados, comparado con el control sin vacío y estos fueron afectados por el tratamiento causando necrosis severa y muerte.

En este estudio se encontró que el plásmido pCAMBIA 1201 presentó mejores resultados que con el plásmido pCAMBIA 1302, lo cual se corrobora por los niveles de expresión encontrados. Para el plásmido pCAMBIA 1201 se encontró una expresión *gus* en nueve de 32 explantes evaluados, comparado con el plásmido pCAMBIA 1302 con expresión en un explante. Surekha *et al.* (2005), obtuvieron transformación eficiente de segmentos embrionales del guandul (*Cajanus cajan*) usando *A. tumefaciens* cepa GV2260 conteniendo un vector binario modificado pPK202, con marcador gen neomicina fosfotransferasa II (*npt II*) y un gen sintético *cry I E-C*, bajo un promotor constitutivo 35 S.

Peters *et al.* (1999), señalan que las condiciones para transformación con plásmidos binarios deben ser optimizadas porque los transgenes algunas veces son truncados durante el proceso de transformación, lo cual afecta la expresión de los genes. Con la prueba de dependencia *Chi-cuadrado*, se encontró diferencia significativa para la variable plásmido, obteniéndose mejores resultados con la cepa LBA 4404 y el plásmido pCAMBIA 1201, por lo tanto, se determinó usar esta cepa en posteriores ensayos. Varios factores podrían estar asociados con estos resultados. Es posible que la baja expresión obtenida no obedezca a problemas del constructo "per se", si no al proceso de transformación relacionado con el reconocimiento entre la bacteria y el explante. Otros factores como la replicación de la cepa, medio de conservación, subcultivo e incorporación del vector en la cepa pueden influir en la transferencia del T-DNA a las células de la planta (Gheysen *et al.*, 1998).

De otra parte, se encontró un mayor porcentaje de expresión transitoria con la aplicación de vacío durante 15 minutos, comparado con la expresión encontrada al aplicar vacío durante cinco minutos, con porcentajes de 11,0% y 4,8% respectivamente. Es posible que la técnica de vacío aplicada para este caso de estudio este causando laceración al tejido durante la infiltración, lo cual no permite una adecuada recuperación del explante. El daño causado puede ser proporcional al tiempo que dura el proceso de infiltración. Aún cuando, numéricamente se observan diferencias en la respuesta, la prueba de *Chi-cuadrado*, no muestra diferencia significativa (0,16 ns) entre los dos tiempos de infiltración de 5 y 15 minutos.

Transformación de meristemas laterales mediante inoculación de solución de *A. tumefaciens*

El ensayo consistió en la inoculación de meristemas laterales de arveja con escalpelo humedecido en solución de *A. tumefaciens* y fue repetido dos veces en el tiempo, en el primer ensayo se encontró expresión positiva de *gus* en 2 de 45 explantes (4,4%), en tanto, en el segundo ensayo se encontró mayor respuesta en la expresión de *gus*, con 8 de 55 explantes (14,5%), lo cual indica que aunque el protocolo funciona, no es reproducible y debe ser ajustado para poder lograr mejores resultados. La alternativa de transformación probada en este estudio confirma la facilidad del proceso y la rápida recuperación de brotes putativamente transformados, lo cual reduce el tiempo de regeneración *in vitro*, gracias a que los meristemas laterales contienen células meristemáticas que se multiplican con el progresivo desarrollo de la plántula.

Existen diversos métodos para incrementar la eficiencia de transformación de meristemas, estos usualmente consisten en tratamientos para favorecer la transformación de grandes sectores en el transformante primario, combinado con el uso de marcadores de selección para visualizar o detectar el tejido transgénico. Tratamientos mecánicos y hormonales han sido usados para favorecer la recuperación y desarrollo de sectores transgénicos en tejido quimérico (Gheysen *et al.*, 1998). Otra opción para obtener brotes con alta porción de células transformadas procedentes de meristemas, es la inducción de brotes axilares o adventicios (Burrus *et al.*, 1996). Sharma *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2004 y Thu *et al.*, 2003 reportaron transformación genética y regeneración de guandul empleando nudos cotiledonarios vía bombardeo de micropartículas.

Otros trabajos como el realizado por Davies *et al.* (1993), mostraron resultados positivos de transformación, inoculando meristemas laterales cotiledonarios presentes en semillas de arveja germinadas con solución de *A. tumefaciens*. Igualmente Bean *et al.* (1997), transformaron meristemas laterales cotiledonarios del cultivar de arveja Puget y reportaron resultados positivos de transformación al causar heridas con escalpelo humedecido en solución de *A. tumefaciens*. La transformación tiene como ventaja la obtención de linajes celulares que forman parte de un brote organizado, pueden ser obtenidos sin involucrar la vía de regeneración de *novo*. Plantas que puedan ser originadas a partir del cultivo de meristemas apicales o axiales pueden o no mostrar variabilidad somaclonal o mosaicos (Karp, 1991). Como los meristemas son tejidos multicelulares, los transformantes primarios se espera sean

quiméricos, lo cual tiene como consecuencia que la línea germinal de transformación y transmisión de los transgenes de estos transformantes primarios no es necesariamente conservada (Lowe *et al.*, 1995).

Bean *et al.* (1997), en arveja cultivar Puget, desarrollaron un protocolo de transformación reproducible y con alta regeneración de brotes a partir de meristemas cotiledonarios con injertación en patrones, lo cual es una ventaja en tiempo. En el proceso de transformación obtuvieron transformantes clonales con patrones de herencia mendeliana del gen introducido (gen Bar); confirmaron que por esta vía es factible la formación de quimeras, las cuales muestran reducida frecuencia del gen en la progenie y su herencia no obedece al patrón mendeliano. Ellos sugieren que para una efectiva selección de brotes putativamente transformados, es necesario aislarlos del explante y colocarlos directamente sobre medio de selección.

Microinyección de ovarios *in vivo*

En el ensayo inicial de 50 flores microinyectadas, solo 15 vainas fueron recuperadas debido a la frecuente caída de la flor pos-inyección, siete de las vainas recuperadas mostraron semillas inviables (vanas) en su interior, por lo cual solo un total de 32 semillas procedentes de ocho vainas fueron recuperadas y evaluadas. De estas, 14 semillas correspondieron a transformación con 15 μ l de solución *A. tumefaciens* (cepa LBA 4404 pCAMBIA 1201), de las cuales solo cuatro mostraron expresión *gus* y 18 semillas correspondieron a transformación con 30 μ l de solución de *A. tumefaciens* de las cuales solo seis mostraron expresión *gus*. La evaluación fue realizada sobre las semillas de arveja recuperadas, las cuales mostraron expresión positiva para el gen *gus*, a nivel de testa, pero no a nivel de cotiledón y de embrión cigótico.

Según los resultados, la respuesta *gus* positiva fue reproducible en el tiempo. En un primer ensayo se alcanzó expresión positiva en 10 de 22 testas de semillas de arveja y para el segundo ensayo, la expresión fue positiva en ocho de 10 semillas evaluadas, aunque la expresión fue estable solo a nivel de cubierta de la semilla y no se expresó en el cotiledón, ni en el embrión. La reproducibilidad puede ser explorada evaluando su eficiencia y recuperando las semillas para obtener plántulas y evaluarlas para *gus* y de ser posible establecer datos moleculares de presencia del gen *gus* en genotipos de interés.

Según Desfeux *et al.* (2000), el descubrimiento del óvulo como el sitio de la transformación productiva en *A. thaliana* motivó esfuerzos para estudiar la trans-

formación de ovarios en otras especies. Davies *et al.* (1993), obtuvieron plantas transgénicas por inyección de *A. tumefaciens* en nudos cotiledonarios del cultivar Puget. Para Surekha *et al.* (2007), basándose en la expresión del gen *gus* en tejido infectado de guandul, la eficiencia de transformación fue altamente influenciada por el genotipo y la cepa de *A. tumefaciens*.

Estudios realizados en flores (Bechtold *et al.*, 2000; Desfeux *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 1999;), indican que al poner en contacto flores en la solución de *A. tumefaciens*, las anteras y el polen están expuestos. Sin embargo, se ha encontrado que la línea germinal femenina es el blanco primario de la transformación, los mismos autores informan que la transformación de flores con *A. tumefaciens* ha sido posible en *A. thaliana* y *Medicago truncatula*, estos resultados abrieron la posibilidad de adaptar estos métodos en otras especies de plantas. Los beneficios son claros, puesto que la transformación sin cultivo de tejidos puede proporcionar rendimiento del proceso que requiere mínima labor, costo y experiencia, además los índices de mutagénesis involuntaria se reducen (Gheysen *et al.*, 1998).

Con los resultados obtenidos en este estudio, se plantea ésta alternativa como una posibilidad viable para arveja, dada la reproducibilidad de la transformación y que no implica la etapa de cultivo de tejidos. Sin embargo, debe ser explorada evaluando la eficiencia en la transformación para que la expresión sea alcanzada en el embrión cigótico y no solo en la testa de la semilla, para que se permita la recuperación de semilla transformada con características de viabilidad que permita la obtención de plántulas transformadas. Las evaluaciones futuras deben encaminarse a la evaluación de la expresión de los genes y establecer la correspondencia con datos moleculares que corroboren la presencia de los genes de interés, de acuerdo con parámetros establecidos que permitan ver resultados reproducibles, al menos para el genotipo evaluado.

Transformación de polen

La respuesta en la expresión *gus* en polen de arveja fue reproducible en el tiempo y aunque la expresión del gen *gus* fue consistente en los granos de polen, estos perdieron viabilidad por el proceso mismo de infección con *A. tumefaciens*, por lo cual no se realizaron polinizaciones. El porcentaje de granos de polen con respuesta positiva de expresión *gus* fue alto en los dos ensayos, en el primer ensayo de la muestra de 101 granos, el 83,17% de los mismos alcanzó expresión positiva y para el segundo, la expresión fue positiva en el 80% de los 100 granos de polen evaluados.

Se encontró que el polen sometido al proceso de infección no fue apto para polinización, puesto que al someterlo a prueba de germinación no formó el tubo germinal; por lo tanto, no se es apto para realizar polinizaciones. Debe tenerse en cuenta que la infección con *A. tumefaciens* le resta viabilidad a los granos de polen e impide su germinación y con ello la posibilidad de polinizar flores. Este es un punto importante para avanzar en el estudio de esta metodología; según Guerrero (2005), para que un polen se considere adecuado para una eficiente polinización debe tener un porcentaje de germinación mínimo del 70%, incrementándose su calidad conforme se acerque al 100%.

En los ensayos de transformación de explantes, donde se realizó evaluación de la expresión transitoria y estable del gen reportero *gus*, no se encontró relación directa entre las dos variables de respuesta. La expresión transitoria generalmente alcanzó el mayor nivel de expresión hasta los dos días posteriores a la transformación, después de lo cual el nivel de la expresión disminuye. Esta observación puede ser explicada porque se acciona un silenciamiento de RNA local que bloquea la expresión de transgenes (Johansen Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2000).

En este estudio en arveja se utilizaron vectores con el gen *gus A* o el gen *gus plus* que contenía un intrón en la región codificadora, el cual no se expresa en células bacterianas, debido a que en la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* y sobre todo cuando se realizan estudios de expresión transitoria, es necesario diferenciar claramente la expresión del segmento de ADN por transferencia del T-DNA al tejido vegetal, de la expresión debida a contaminación bacteriana. Krishna *et al.* (2010), señalan que se deben enfocar esfuerzos en la optimización de los factores que influyen en la transformación genética y regeneración *in vitro* lo cual puede mejorar la precisión y reproducibilidad del proceso. Así mismo, la reacción positiva de la coloración histoquímica en los explantes infectados (azul) y negativa en los controles (incolores), en tejido de arveja demostró la funcionalidad de los plásmidos utilizados, y la ausencia de expresión endógena. Estos resultados coinciden con los resultados de expresión *gus* reportados por Pineda (1998), en células embriogénicas de plátano dominico Hartón. Además de los factores estudiados en las diferentes alternativas de transformación probadas, se deben estudiar otros factores que promuevan el incremento en la eficiencia de transformación, tales como el tiempo de cocultivo y las condiciones de cultivo de tejidos.

Conclusiones

Mediante prueba histoquímica se logró comprobar la expresión transitoria del gen *gus* en explantes de arveja, variedad Santa Isabel, resultados que son un avance en la estandarización del proceso de transformación genética en este genotipo.

Todas las técnicas de transformación y los diferentes explantes empleados de la arveja cultivar Santa Isabel, mostraron respuesta positiva, de acuerdo con la prueba de expresión transitoria del gen *gus*. Factores como la cepa empleada, la calidad de la misma y su concentración y calidad de *A. tumefaciens* como de su plasmido y la presencia de acetosiringona en el medio de infección, fueron factores favorables en el proceso.

Mediante las alternativas de transformación de microinyección de flores y transformación de polen, se logró obtener patrones consistentes de expresión *gus* a nivel de la testa de la semilla y granos de polen, respectivamente, estas alternativas son novedosas en arveja y factibles de aplicar. La rapidez, facilidad y bajo costo de estas técnicas son una posibilidad de explorar estas alternativas de transformación en el mejoramiento genético de arveja, dirigida al desarrollo de resistencia a enfermedades de expresión monogénica como *Fusarium*.

Los diferentes métodos de transformación evaluados en esta investigación son un primer aporte que pueden ser aplicado en el programa de fitomejoramiento de arveja en el país, tendiente a disminuir en tiempo la obtención de nuevos cultivares y a promover la introducción de resistencia a los problemas sanitarios causados por el complejo ascochyta o "pecoseo" y al amarillamiento por *Fusarium*, factores que limitan la producción nacional en la especie.

A futuro podría explorarse la manipulación *in vitro* de los granos de polen inmaduros, para inhibir la formación de gametofitos e inducir el desarrollo esporofítico que permita la obtención de plántulas doble-haploides a partir de granos de polen transformado, las cuales serían totalmente homocigotas en todos los loci. La obtención de doble-haploides ofrece múltiples ventajas para el mejoramiento genético de plantas. La más importante radica en la posibilidad de alcanzar rápidamente una completa homocigosis pudiendo de esta manera reducir el tiempo y el costo en desarrollar nuevos potenciales cultivares.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá y a Colciencias por el soporte financiero.

Referencias bibliográficas

- Bean, S.J.; Gooding, P.; Mullineaux P. 1997. A simple system for pea transformation. *Plant Cell Rep.* 16: 513-519.
- Bechtold, N.; Jaudeau, B.; Jolivet, S.; Maba, B.; Vezon, D.; Voisin, R.; Pelletier G. 2000. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the plant transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 155: 1875-1887.
- Bouchez, D.; Bechtold, N. 1998. Protocol for vacuum infiltration transformation of *Arabidopsis thaliana*. Laboratorio de Biología Celular. NIRA. Francia. 31 p.
- Burke, J.; Oliver, M.J.; Velten, J. 1999. Pollen based transformation system using solid medium. Disponible en http://www.biotech-info.net/patent_abstract.html.
- Burrus, M.; Molinier, J.; Himber, C.; Hunold, R.; Bronner, R.; Rousset, P.; Hahne, G. 1996. Agrobacterium mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: transformation patterns. *Mol. Breed.* 2: 329-338.
- Collén, AMC; Jarl, CI. 1999. Comparison of different methods for plant regeneration and transformation of the legume *Galega orientalis* Lam. (goat's rue). *Plant Cell Rep.* 19: 13-19.
- Davies, D.R.; Hamilton, J.; Mullineaux P.M.; 1993. Transformation of pea. *Plant cell Rep.*, 12: 180-183.
- Desfeux, C.; Clough, S.J.; Bent, A.F. 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium* mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol.* 123: 895-904.
- Gheysen, G.; Angenon, G.; Montagu, V. 1998. *Agrobacterium* mediated plant transformation: a scientifically intriguing store with significant application. *Transgenic Plant Research.* 7: 1-33.
- Grant, J. E.; Cooper, P.A.; McAra, A.E.; Few, T.J. 1995. Transformation of peas (*Pisum sativum* L.) using immature cotyledons. *Plant Cell Rep.* 15: 254-258.
- Guerrero, V. 2005. Polinización y otros aspectos de la misma en manzano. CIAD, A.C. En: www.ciad.mx/boletin/marabr05/articulo.pdf
- Hiei, Y.S.; Ohta, T.; Komari, H.; Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.* 6: 271-282.
- Johansen, L.K.; Carrington, J.C. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126: 930-938.
- Kapila, J.; De Rycke, R.; Van Montagu, M.; Angenon G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science.* 122: 101-108.
- Karp, A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology.* 7:1-58.
- Krishna, G.; Reddy, S.; Ramteke P.W.; Bhattacharya P.S. 2010. Review: Progress of tissue culture and genetic transformation research in pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) *Plant Cell Rep.* 29: 1079-1095.
- Klein, B.P.; Kurilich, A.C. 2001. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience.* 35(4): 580-584.
- Ko, T.; Lee, S.; Hrasnyanski. 2003. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor. Appl. Genet.* 107: 439-447.

- Kumar, S.M.; Kumar, B.K.; Sharma, K.K.; Devi, P. 2004 Genetic transformation of pigeon pea with rice chitinase gene. *Plant Breed.* 123: 485-489.
- Lowe, K.; Bowen, B.; Hoerster, G.; Ross, M.; Bond, D.; Pierce, D.; Gordon-Kamm, B. 1995. Germline transformation of maize following manipulation of chimeric shoot meristemos. *Biotechnology.* 13: 677-682.
- Mahmoudian, M.; Yucel, M.; Avni, H. 2002. Transformation of lentil (*Lens culinaris* M.) Cotyledonary Nodes by Vacuum Infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter.* 20: 251-257.
- Maximova, S.N., Dandekar, A.M.; Gultinan, M.J. 1998. Investigation of *Agrobacterium* mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Molecular Biology.* 37: 549-559.
- Meurer, CA.; Dinkins, R.D.; Collins, G.B. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep.* 18: 180-186.
- Nadolska, O.; Waclaw, O. 2000. Study of the factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.) *Molecular breeding.* 6: 185-194.
- Narasimhulu, S.; Deng, X.; Sarria, R.; Gelvin, S. 1996. Early transcription of *Agrobacterium* TDNA genes in tobacco and maize. *The Plant Cell.* 8: 873-886.
- Pacheco, C.A.; Vergara, M.C.; Ligarreto, G.A. 2010. Clasificación de 42 líneas mejoradas de arveja (*Pisum sativum* L.) por caracteres morfológicos y comportamiento agronómico. *Revista Facultad Agronomía Medellín.* 6 (2): 5543-5553.
- Peters, N.; Ackerman, S.; Davis, E. 1999. A modular vector for *Agrobacterium* mediated transformation of wheat. *Plant Molecular Biology Reporter.* 17: 323-331.
- Petri, C. 2005. Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediado por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Departamento de Biología Vegetal. Murcia. 194 p.
- Pineda, R. 1998. Evaluación de la expresión B-glucoronidasa (GUS) en células embriónicas en suspensión (CES) de *Musa* spp. Var. Dominico Harton, transformadas vía *Agrobacterium*. Pontificia Universidad Javeriana, Tesis de Maestría. 122 p.
- Sharma, K.K.; Lavanya, M.; Anjaiah, V. 2006. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Mill sp.) expressing the synthetic Bt Cry1AB gene. *In vitro Cell and Dev. Biol. Plant.* 42: 165-173.
- Sharma, P. 2011. Alarming occurrence of *Fusarium* wilt disease in pea (*Pisum sativum* L.) cultivations of Jabalpur district in Central India revealed by an array of pathogenicity tests. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2(6): 981-994.
- Shewfelt, D.L.; Rosario, B.A. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortScience.* 35(4): 575-579.
- Schroeder, H.E.; Schotz, A.H.; Wardley-Richardson, T.; Spencer, D.; Higgins, T.J.V. 1993. Transformation and regeneration of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 101: 751-757.
- Surekha, C.; Beena, M.R.; Arundhati, A.; Singh, P.K.; Tuli, R.; Dutta-Gupta, A.; Kirti, P.B. 2005. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) using embryonal segments and development of transgenic plants for resistance against *Spodoptera*. *Plant Science.* 169: 1074-1080.
- Surekha, C.; Arundhati, A.; Rao, S. 2007. Differential response of *Cajanus cajan* varieties to transformation different strains of *Agrobacterium*. *J. Biol. Sci.* 7: 176-181
- Thu, T.T.; Mai, T.T.X.; Dewaele, E.; Farsi, S.; Tadesse, Y.; Angenon, G.; Jacobs, M. 2003. *In vitro* regeneration and transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.). *Mol. Breed.* 11:159-168.
- Tjokrokusumo, D.; Heinrich, T.; Wylie, S. 2000. Vacuum infiltration of petunia hybrida pollen whit *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 792- 797.
- Voinnet, O.; Lederer, C.; Baulcombe, D.C. 2000. A viral movement protein prevents systemic spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell.* 103:157-167.
- Warkentin, T.D.; McHugen, A. 1993. Regeneration from lentil cotyledonary nodes and potential of this explant for transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Newsletter.* 20: 26-28.
- Wydro, M.; Kozubek, E.; Lehmann, P. 2003. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim Pol.* 53: 289-298.
- Ye, G.N.; Stone, D.; Pang, S.Z.; Creely, W.; Gonzalez, K.; Hinchee, M. 1999. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in plant vacuum infiltration transformation. *Plant J.* 19: 249-257.
- Yoshioka, Y.; Takahashi, Y.; Matsuoka, K.; Nakamura, K.; Koizumi, J.; Kojima, M.; Machida, Y. 1996. Transient gene expression in plant cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Application for the analysis of virulence loci. *Plant Cell Physiol.* 37: 782-789.