

Establecimiento de una metodología para la inducción de regenerantes de arveja (*Pisum sativum* L.) variedad 'Santa Isabel'

Establishing a methodology for inducing the regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) explants, 'Santa Isabel' variety

Edgar Alexander Sánchez¹ y Teresa Mosquera²

Resumen: Con el fin de establecer una metodología para la obtención de regenerantes de arveja a partir de diferentes tipos de explantes, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2-isopenteniladenina (2-ip) sobre la obtención de regenerantes para uso en transformación genética, como parte del proyecto de introducción de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi, causante de la enfermedad marchitez vascular. Se evaluaron varios tipos de explantes, cotiledones en posición abaxial y adaxial, hipocótilos, epicótilos y embriones cigóticos obtenidos de semillas secas y semillas jóvenes. Estos explantes se evaluaron en interacción con reguladores de crecimiento bajo dos condiciones de luz: la primera, de fotoperíodo con 16 h de luz y 8 h de oscuridad y la segunda, de oscuridad total. De esta forma, se probaron tres reguladores de crecimiento (2,4-D, BAP y 2-ip) en tres combinaciones y diferentes concentraciones. Se obtuvieron regenerantes a partir de embriones cigóticos bajo las dos condiciones de luz, especialmente en la condición de fotoperíodo y con la aplicación de BAP en concentraciones de 1,0 y 2,5 mg·L⁻¹.

Palabras claves adicionales: regeneración directa, hipocótilos, epicótilos, cotiledones

Abstract: The effect of different 2,4-D, BAP and 2-ip concentrations on inducing the regeneration of peas from different types of explants was evaluated for use in genetic transformation as part of a project aimed at introducing resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi which causes vascular wilt disease. Several types of explants were tested: cotyledons in abaxial and adaxial position, hypocotyls, epicotyls and zygotic embryos obtained from dry seeds and young seeds. These explants were evaluated in interaction with growth regulators in two types of light/cultivation conditions, the first being a 16-hour light and 8-hour darkness photoperiod and the second consisting of total darkness. Three growth regulators were tested (2,4-D, BAP and 2-ip) in three combinations and different concentrations. Zygotic embryo regeneration was obtained two light conditions, especially in the photoperiod and when applying BAP at 1 and 2.5 mg·L⁻¹ concentrations.

Additional key words: direct regeneration, hypocotyl, epicotyl, cotyledon

Introducción

LA ARVEJA (*PISUM SATIVUM* L.) es una especie hortícola importante por ser fuente de carbohidratos, vitaminas y proteínas y como leguminosa aportadora de nitrógeno. En Colombia su importancia aumenta día a día y

su producción se extiende a 11 departamentos, concentrándose en Cundinamarca y Boyacá (Lobo et al., 1977). La variedad 'Santa Isabel' es la más cultivada en Colombia, se adapta bien entre 2.200 y 3.000 msnm y se cosecha entre los 115 y 145 d en verde y a los 160 d en seco. Su rendimiento varía entre 1,2 t·ha⁻¹ en seco

Fecha de recepción: 12 de julio de 2005
Aceptado para publicación: 11 de mayo de 2006

* Este trabajo hace parte del proyecto "Introducción de resistencia en arveja (*Pisum sativum* L.) a la enfermedad marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi, empleando métodos de mejoramiento convencional y transformación genética", que se desarrolla en la actualidad en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, cofinanciado por el Instituto Colombiano de para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas (Colciencias).

¹ Ingeniero agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: easanchezt@unal.edu.co

² Profesora asociada, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: tmosquerav@unal.edu.co

y 5 t·ha⁻¹ en verde. De acuerdo con Tamayo (2000), la principal limitante en la producción de arveja en Colombia es la enfermedad denominada marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi.

La transformación genética, en general, se presenta como alternativa para incorporar resistencia a *Fusarium oxysporum*. En este sentido es importante desarrollar metodologías *in vitro* que permitan obtener material fuente para dicha transformación. Christou (1997), citado por Tzitzikas et al. (2004), sostiene que es probable que el mejoramiento de arveja sólo pueda abordarse en su totalidad a través de la modificación genética, ya que la variación natural de la arveja es limitada. La arveja, como otras especies leguminosas, es recalcitrante en ensayos para modificación genética, aunque algunos protocolos se han descrito al respecto (Schroeder et al., 1993; Grant et al., 1995; Bean et al., 1997; Nadolska-Orczyk y Orczyk, 2000; Polowick et al., 2000; citados por Tzitzikas et al., 2004). En los procedimientos descritos por Schroeder et al. (1993) y Polowick et al. (2000), se emplearon segmentos embriogénicos axilares y en los descritos por Bean et al. (1997) y Nadolska-Orczyk y Orczyk (2000), se usaron nudos cotiledonares como material inicial para la inducción de regenerantes.

En arveja, los sistemas de regeneración que se han usado para transformación están basados en la regeneración directa de brotes de meristemas existentes o de inducción *de novo* de meristemas utilizando citoquininas (Schroeder et al., 1993, citado por Tzitzikas et al., 2004). El mayor inconveniente de estos métodos es la baja eficiencia de la selección de la regeneración de brotes y, a menudo, el alto estado quimérico de las plantas transformadas (Tzitzikas et al., 2004). Estos mismos autores evaluaron la regeneración de plántulas de cuatro variedades de arveja a partir de tejido meristemático proveniente de tejido nodal. Como resultado, las cuatro variedades produjeron tejido meristemático genotípicamente independiente al tejido inicial.

En arveja se han reportado las dos formas de embriogénesis somática, directa e indirecta, permitiendo un progreso en el desarrollo de los protocolos de embriogénesis somática en algunas leguminosas importantes (Griga, 1998). Griga y Klenoticova (2001) encontraron que la aplicación de diferentes componentes, como auxinas, carbohidratos (fructosa, maltosa) y reguladores de crecimiento (2,4-D, 2-*ip* y ácido indol butírico), afectan positivamente la consistencia de los callos y su establecimiento en el medio de cultivo. Adicionalmente,

Ochatt et al. (2001) obtuvieron regenerantes de arveja a partir de explantes de hipocótilos, utilizando diferentes concentraciones de BAP.

La embriogénesis somática es el desarrollo, a partir de células somáticas, de estructuras que asemejan embriones cigóticos. Estas estructuras pasan a través de una serie de estados de desarrollo característicos, hasta llegar a la germinación de una plántula; este proceso puede ocurrir directa o indirectamente. En la embriogénesis somática directa, los embriones se desarrollan sobre el tejido cultivado, entanto que la embriogénesis somática indirecta procede de células que requieren rediferenciación, antes que puedan expresar competencia embriogénica y, como consecuencia, la formación de callos precede a la formación del embrión (Vasic et al., 2001).

La regeneración de plántulas completas a partir de tejidos o células cultivadas es un prerrequisito para la aplicación exitosa de técnicas *in vitro* de transferencia de genes, de propagación masiva y estudios de variación somaclonal (Leroy, et al., 2000). La regeneración adventicia procedente de embriogénesis somática es altamente deseable, ya que permite la obtención de plántulas idénticas al tipo original y en forma masiva.

Mahon et al. (2002) estudiaron la frecuencia de cruzamiento de una línea transgénica de arveja con tres cultivares y encontraron que dos características genéticamente dominantes fueron usadas para fijar el potencial de cruzamiento en arvejas. Adicionalmente, las investigaciones realizadas por Polowick et al. (2000) y la aplicación de las diferentes técnicas de regeneración de plantas permiten incorporar nuevas características genéticas, como la tolerancia a herbicidas y la resistencia a plagas y enfermedades, que a menudo pueden ser introducidas únicamente con tecnología de transformación genética. El desarrollo de un sistema *in vitro* que permita la regeneración de plántulas, así como la obtención de haploides, conforman una excelente herramienta para el mejoramiento de arveja.

El objetivo de esta investigación es desarrollar una metodología para la obtención de regenerantes de arveja para ser utilizados posteriormente en transformación genética.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad

Nacional de Colombia, Bogotá. Se emplearon semillas de arveja (*Pisum sativum* L.) comerciales (secas) y semillas jóvenes provenientes de plantas de 120 d de edad, de la variedad 'Santa Isabel'. El medio de cultivo utilizado fue el MS, de Murashige y Skoog (1962), sobre el cual se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, como bencilaminopurina (BAP), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2-isopenteniladenina (2-ip).

Las semillas se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% durante 30 s y con hipoclorito de sodio al 2,5% por 10 min. Finalmente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se germinaron bajo condiciones de asepsia en cámara húmeda en el cuarto de crecimiento, a una temperatura de 22 °C. Luego, se extrajeron los explantes y se sembraron a nivel in vitro.

Experimentos

Se realizaron cuatro experimentos bajo dos condiciones lumínicas: con fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad, normalmente empleada para cultivos in vitro, y bajo condiciones de oscuridad total.

1. Efecto de 2,4-D y BAP en la inducción de regenerantes en varios tipos de explantes

Se utilizaron semillas comerciales de la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (Fenalce), que se germinaron en condiciones asépticas. Luego de una semana se escindieron los cotiledones, hipocótilos y epicótilos. Los cotiledones se sembraron en medio MS, en posición abaxial y adaxial. Se evaluó la interacción del 2,4-D (1 y 2 mg·L⁻¹) con la BAP (0, 1, 2 y 3 mg·L⁻¹); el tratamiento testigo estuvo desprovisto de reguladores de crecimiento. Se establecieron 72 tratamientos y para cada uno se utilizaron 3 repeticiones, cada una de ellas con 5 explantes, para un total de 15 unidades por tratamiento. Este ensayo, bajo las condiciones anteriormente descritas, se repitió en una segunda oportunidad, con la siembra de 25 explantes por tratamiento.

2. Efecto de 2,4-D, BAP y 2-ip en la inducción de regenerantes empleando embriones cigóticos

Se evaluó el potencial de los embriones cigóticos para la inducción de regenerantes. Los embriones utilizados se obtuvieron para un primer experimento con semillas comerciales (secas) y para un segundo experimento con semillas jóvenes provenientes de plantas de 120 d de

edad, con buenas condiciones fitosanitarias, en un cultivo ubicado a 2.900 msnm. Para ambos casos se evaluó la interacción del 2,4-D (0, 1 y 2 mg·L⁻¹) con BAP (0, 0,5 y 1,0 mg·L⁻¹). El efecto de la 2-ip se evaluó independientemente, en concentraciones de 1 y 2 mg·L⁻¹. El tratamiento testigo estuvo desprovisto de reguladores de crecimiento. Se establecieron 22 tratamientos para cada uno de los experimentos y en cada tratamiento se utilizaron 10 repeticiones y 5 explantes por repetición, para un total de 50 unidades por tratamiento.

3. Efecto de BAP y 2-ip en la inducción de regenerantes en embriones cigóticos como explantes

Se sembraron embriones cigóticos de semillas en desarrollo y se evaluó de forma independiente la BAP en concentraciones de 0,5; 0,75; 1,0 y 1,5 mg·L⁻¹ y la 2-ip en concentraciones de 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg·L⁻¹, para un total de 18 tratamientos, cada tratamiento con 10 repeticiones y 5 explantes por repetición, para un total de 50 unidades por tratamiento.

4. Efecto de BAP en la inducción de regenerantes

Con el fin de corroborar la regeneración bajo el efecto de BAP, se sembraron embriones cigóticos provenientes de semillas en desarrollo. Se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (1,0; 1,5; 2,5 y 3,0 mg·L⁻¹) correspondientes a 8 tratamientos con 10 repeticiones y 5 explantes por repetición, para un total de 50 unidades por tratamiento.

Las variables evaluadas en el primer y segundo ensayo fueron: 1) número de callos inducidos y 2) número de regenerantes obtenidos. En los ensayos tercero y cuarto se evaluó únicamente el número de regenerantes obtenidos.

Resultados

El efecto de 2,4-D y BAP sobre la regeneración en varios tipos de explantes se evaluó en dos ensayos. El primer ensayo se evaluó a las 10 semanas y el segundo a las 14 semanas. Únicamente se presentó inducción de callos en los tratamientos que se presentan en la tabla 1. Los tratamientos 41 y 42, correspondientes a las dosis de 1,0 mg·L⁻¹ de 2,4-D + 3,0 mg·L⁻¹ de BAP y de 2,0 mg·L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente, fueron los únicos que presentaron regenerantes. La respuesta que se obtuvo en ambos ensayos fue similar. La tabla 1 muestra únicamente los tratamientos evaluados donde se presentó inducción de callos y/o regenerantes. El mayor número

de callos inducidos se observó en los tratamientos en los que se sembraron hipocótilos, en condición de oscuridad, de tal manera que éstos fueron los explantes con mayor potencial de regeneración. En promedio, el

segundo ensayo presentó menor número de callos que el primero, con relación al número de explantes sembrados; así, este ensayo presentó mayor inducción de callos que de regenerantes (figura 1).

Tabla 1. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la bencilaminopurina (BAP) en la inducción de regenerantes a partir de varios tipos de explantes en arveja (*Pisum sativum* L.).

Tipo de explante	Condición de luz	Tratamiento*	Reguladores de crecimiento (mg·L ⁻¹)		Explantes (n°)		Callos inducidos /explantes		Regenerantes/explantes	
			2,4-D	BAP	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2**
Cotiledones abaxiales	Oscuridad	1	0	0	15	25	0	0	0	0
		6	2	0	15	25	1	0	0	0
	Fotoperíodo	10	0	0	15	25	0	0	0	0
		14	1	3	15	25	0	15	0	0
Cotiledones adaxiales	Oscuridad	19	0	0	15	25	0	0	0	0
		24	2	0	15	25	1	3	0	0
	Fotoperíodo	25	2	1	15	25	0	5	0	0
		28	0	0	15	25	0	0	0	0
Epicótilos	Oscuridad	29	1	0	15	25	6	0	0	0
		37	0	0	15	25	0	0	0	0
		38	1	0	15	25	14	0	0	0
		39	1	1	15	25	0	9	0	0
		41	1	3	15	25	0	3	0	1
		42	2	0	15	25	10	12	0	5
		43	2	1	15	25	5	3	0	0
	Fotoperíodo	44	2	2	15	25	9	11	0	0
		45	2	3	15	25	5	1	0	0
		46	0	0	15	25	0	0	0	0
		47	1	0	15	25	3	0	0	0
		48	1	1	15	25	0	5	0	0
		50	1	3	15	25	0	15	0	0
		51	2	0	15	25	2	0	0	0
Hipocótilos	Oscuridad	52	2	1	15	25	0	5	0	0
		55	0	0	15	25	0	0	0	0
		56	1	0	15	25	12	0	0	0
		57	1	1	15	25	0	25	0	0
		58	1	2	15	25	5	14	0	0
		60	2	0	15	25	9	8	0	0
	Fotoperíodo	61	2	1	15	25	10	10	0	0
		62	2	2	15	25	15	1	0	0
		63	2	3	15	25	5	0	0	0
		64	0	0	15	25	0	0	0	0
Hipocótilos	Fotoperíodo	65	1	0	15	25	12	0	0	0
		66	1	1	15	25	0	2	0	0
		67	1	2	15	25	0	4	0	0
		69	2	0	15	25	9	15	0	0
		70	2	1	15	25	5	0	0	0
		71	2	2	15	25	5	0	0	0
		72	2	3	15	25	10	0	0	0

* Los ensayos 1 y 2 constaron de un total de 72 tratamientos.

** Las casillas sombreadas resaltan tratamientos en que se obtuvieron regenerantes.

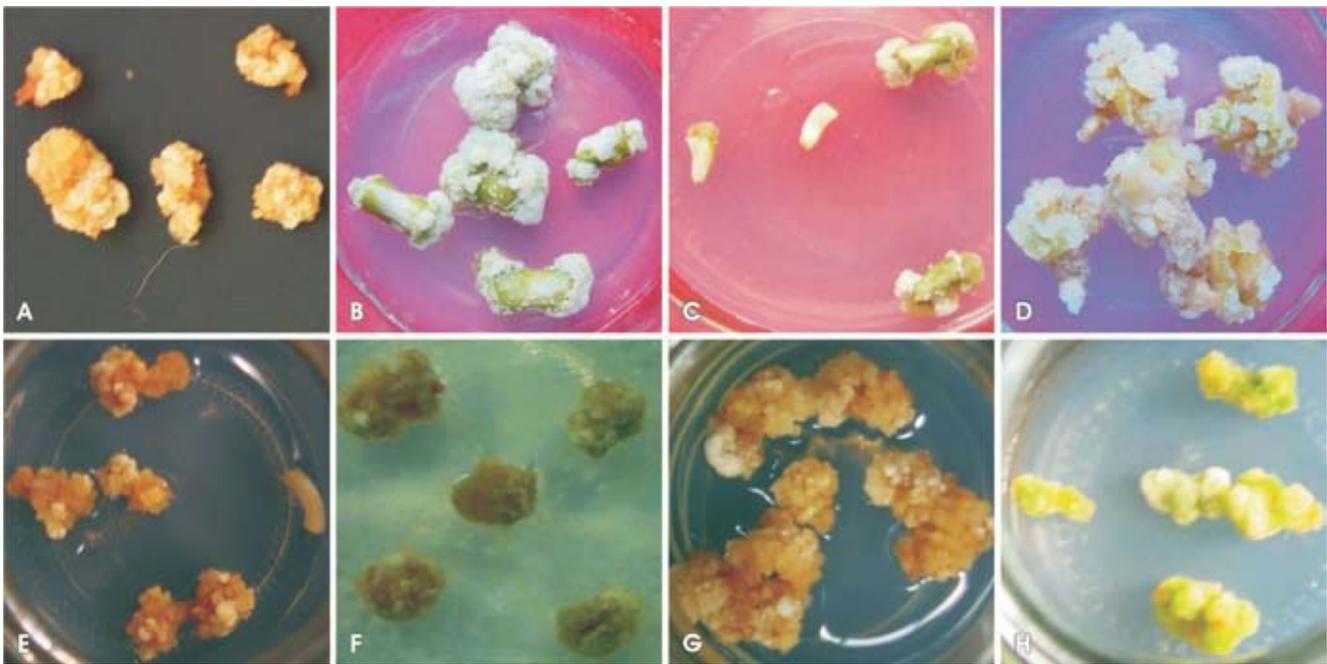


Figura 1. Callos inducidos a partir de diferentes tipos de explantes de semillas secas de arveja (*Pisum sativum* L.) en interacción con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y bencilaminopurina (BAP).

- A. Epicótilos en condición de oscuridad con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D a las 10 semanas de la siembra.
- B. Epicótilos en condición de oscuridad con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP a las 14 semanas de la siembra.
- C. Epicótilos en condición de fotoperíodo con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP a las 14 semanas de la siembra.
- D. Epicótilos en condición de fotoperíodo con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP a las 14 semanas de la siembra.
- E. Hipocótilos en condición de oscuridad con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D a las 10 semanas de la siembra.
- F. Hipocótilos en condición de oscuridad con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP a las 14 semanas de la siembra.
- G. Hipocótilos en condición de oscuridad con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D a las 10 semanas de la siembra.
- H. Hipocótilos en condición de fotoperíodo con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP a las 10 semanas de la siembra.

La evaluación de 2,4-D, BAP y 2-ip se realizó en un primer ensayo empleando semillas secas. La inducción de callos se presentó únicamente en los tratamientos con 2,4-D en concentraciones de $1,0$ y $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (tabla 2). Esto se corroboró en el segundo ensayo que evaluó semillas en desarrollo, en el que se obtuvo también mayor inducción de regenerantes. Los dos ensayos muestran que esta inducción únicamente se realiza si el 2,4-D está ausente. En todas las concentraciones evaluadas de BAP y 2-ip se logró inducir regenerantes, lo mismo que en el tratamiento testigo (figura 2).

Los tratamientos que presentaron respuesta a la inducción de regenerantes bajo condiciones de oscuridad incluyeron concentraciones de $0,5$; $0,75$; $1,0$ y $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. En los tratamientos testigos ($\tau 1$ y $\tau 10$), se indujo una menor cantidad de regenerantes, con relación a los tratamientos con BAP. En el caso del ensayo que evaluó semillas secas para ambos tratamientos testigos, la inducción de regenerantes se dio únicamente en oscuridad. En la evaluación bajo fotoperíodo, el número de regenerantes obteni-

dos fue mayor cuando se emplearon semillas en desarrollo de 120 d. También se obtuvieron regenerantes con 2-ip en condiciones de fotoperíodo y en el tratamiento 8, en el que se evaluó el efecto de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2-ip en oscuridad, lográndose 3 regenerantes de 50 explantes sembrados. La inducción de regenerantes se presentó tanto en condición de oscuridad como de fotoperíodo, siendo mayor la inducción de regenerantes en esta última condición (tabla 3).

Se presentaron resultados similares en todos los tratamientos con las diferentes dosis de BAP, para las dos condiciones de luz evaluadas. Sin embargo, bajo fotoperíodo se presentó el mayor número de regenerantes, con $1,0$ y $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. En este caso, el número de regenerantes obtenidos aumentó en la medida que aumentó la concentración de BAP. En los resultados se observa un límite a partir del cual, aunque se aumente la concentración de BAP, el número de regenerantes se mantiene estable o disminuye (tabla 4, figura 2). En la medida que se aumente la concentración de BAP, el número de regenerantes aumenta, pero con concentraciones entre $1,0$ y $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Tabla 2. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), la bencilaminopurina (BAP) y la isopenteniladenina (2-ip) en la inducción de regenerantes a partir de embriones cigóticos de arveja (*Pisum sativum* L.).

Condición de luz	Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg·L ⁻¹)			Explantos sembrados	Callos inducidos (n°)		Regenerantes (n°)	
		2,4-D	BAP	2-ip		Secas ² 11 semanas	En desarrollo ³ 8 semanas	Secas ³ 11 semanas	En desarrollo ⁴ 8 semanas
Oscuridad	1	0	0	0	50	0	0	6	45
	2	0	0,5	0	50	0	0	32	80
	3	0	1	0	50	0	0	63	120
	4	1	0	0	50	0	50	0	0
	5	1	0,5	0	50	10	40	0	0
	6	1	1	0	50	15	50	0	0
	7	2	0	0	50	20	50	0	0
	8	2	0,5	0	50	20	50	0	0
	9	2	1	0	50	25	47	0	0
	10	0	0	1	50	0	0	46	52
	11	0	0	2	50	0	0	55	53
Fotoperíodo (16 h luz y 8 h oscuridad)	12	0	0	0	50	0	0	0	45
	13	0	0,5	0	50	0	0	44	100
	14	0	1	0	50	0	0	51	100
	15	1	0	0	50	10	50	0	0
	16	1	0,5	0	50	11	45	0	0
	17	1	1	0	50	20	50	0	0
	18	2	0	0	50	21	50	4	0
	19	2	0,5	0	50	20	49	0	0
	20	2	1	0	50	20	49	0	0
	21	0	0	1	50	0	0	47	53
	22	0	0	2	50	0	0	52	48

¹ Semillas comerciales de la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (Fenalce).

² Semillas en desarrollo, provenientes de vainas verdes de plantas 120 d después de la siembra.

³ Las casillas sombreadas resaltan tratamientos en que se obtuvieron regenerantes.

Tabla 3. Efecto de la bencilaminopurina (BAP) y la isopenteniladenina (2-ip) en la inducción de regenerantes, empleando como explantes embriones cigóticos provenientes de arveja (*Pisum sativum* L.).

Condición de luz	Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg·L ⁻¹)		Número de explantes	Número de regenerantes	Número de callos
		BAP	2-ip			
Oscuridad	1	0	0	50	7	0
	2	0,5	0	50	15	0
	3	0,75	0	50	60	0
	4	1	0	50	20	0
	5	1,5	0	50	125	0
	6	0	1	50	0	0
	7	0	1,5	50	0	0
	8	0	2	50	3	0
	9	0	2,5	50	0	0
Fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad)	10	0	0	50	10	0
	11	0,5	0	50	100	0
	12	0,75	0	50	130	0
	13	1	0	50	150	0
	14	1,5	0	50	120	0
	15	0	1	50	10	0
	16	0	1,5	50	25	0
	17	0	2	50	5	0
	18	0	2,5	50	25	0

Las casillas sombreadas resaltan los tratamientos en que se obtuvieron regenerantes.



Figura 2. Callos y regenerantes obtenidos a partir de embriones cigóticos de arveja (*Pisum sativum* L.) de semillas en desarrollo, empleando reguladores de crecimiento: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP) e isopenteniladenina (2-ip). A. $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en condición de oscuridad a las 11 semanas de la siembra. B. $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2-ip en condición de oscuridad a las 11 semanas de la siembra. C. Ausencia de reguladores de crecimiento en condición de fotoperíodo a las 8 semanas de la siembra. D. $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en condición de fotoperíodo a las 8 semanas de la siembra. E. $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en condición de fotoperíodo. F. $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en condición de fotoperíodo. G. $3,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en condición de oscuridad.

los resultados para esta inducción presentan un descenso cuando el cultivo se realiza en presencia de fotoperíodo. En el caso de oscuridad, los resultados no muestran consistencia en la reducción de regenerantes con el aumento de la concentración de la citoquinina BAP. Como lo muestra la tabla 4, en este ensayo se obtuvo el mayor número de regenerantes de toda la investigación.

Discusión

Los resultados reportados en este estudio muestran la obtención de regenerantes a partir de la siembra de

embriones cigóticos de semillas de arveja de plantas de 120 d de edad. La mayor cantidad de plántulas regeneradas por tratamiento se obtuvieron cuando los embriones se cultivaron en medio MS con BAP, entre $1,0$ y $3,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en condiciones de fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, presentando mayor cantidad de regenerantes con la dosis de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Reportes de diferentes investigaciones resaltan la importancia de emplear relaciones auxina/citoquinina para lograr procesos morfogénicos (Vasic et al., 2001). En el primer experimento, en el que se evaluó el efecto

Tabla 4. Efecto de la bencilaminopurina (BAP) en la inducción de regenerantes en arveja (*Pisum sativum* L.).

Condiciones de luz	Tratamiento	BAP ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Explantes	Número de regenerantes	Número decallos
Fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad)	1	1	50	230	0
	2	1,5	50	200	0
	3	2,5	50	220	0
	4	3	50	200	0
Oscuridad	5	1	50	160	0
	6	1,5	50	170	0
	7	2,5	50	180	0
	8	3	50	200	0

Las casillas sombreadas resaltan los tratamientos con inducción de regenerantes.

de 2,4-D y BAP en la inducción de regenerantes a partir de varios tipos de explantes, se presentó alta inducción de callos, mas no se logró obtener regenerantes, excepto en los tratamientos 41 y 42.

Por lo general, se requiere la combinación de dos o más reguladores de crecimiento de diferentes clases, aplicados simultáneamente o secuencialmente, para obtener regeneración (Gaspar et al., 1996). En estudios desarrollados en zanahoria y tabaco, algunas de las citoquininas mostraron alta actividad, pero sólo en presencia de una auxina. La inducción de regenerantes en el tratamiento testigo (sin reguladores de crecimiento), aunque aparezcan en menor cantidad con relación al tratamiento con $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP, obedecen a la totipotencia de la célula vegetal; sin embargo, dicha totipotencia se ve estimulada por la adición de reguladores, que actúan sobre el ciclo celular.

Aunque algunas investigaciones reportan el efecto positivo de la presencia auxina/citoquinina para la regeneración, en esta investigación el 2,4-D se constituye en un fuerte inductor de desdiferenciación celular, y la presencia de BAP en dosis variables estaría contribuyendo, mediante su efecto mitótico, a la inducción de callos y no a la diferenciación celular; lo que concuerda con varios reportes que presentan al 2,4-D como un fuerte inductor de procesos de desdiferenciación celular y posterior regeneración (Krikorian et al., 1990).

Las citoquininas promueven la división celular en los tejidos. Las dos propiedades más importantes de estos reguladores de crecimiento utilizados en cultivo de tejidos son la estimulación de la división celular (a menudo acompañada de auxinas) y la liberación de la dormancia de yemas laterales. La BAP, una citoquinina sintética, es tal vez más usada que la kinetina y la zeatina. La 2-ip también es extensamente utilizada en cultivo de tejidos. Tanto auxinas como citoquininas regulan la división celular, afectando la replicación de DNA y controlando los eventos principales de la mitosis, respectivamente (Gaspar et al., 1996).

Muchos aspectos del crecimiento celular, la diferenciación celular y la organogénesis en cultivo de tejidos y órganos son controlados por la interacción entre citoquininas y auxinas. Cuando el nivel de auxina es relativamente más alto que el de citoquinina, se forman raíces y cuando el nivel de citoquinina es más alto que el de auxina, se forman tallos; cuando las concentraciones son similares, se inducen callos (Krikorian et al., 1990). Al respecto, Salisbury y Ross (1994) afirman que

el modo en que un callo forma una planta nueva es variable. A menudo, con relaciones de citoquinina a auxina relativamente altas, se desarrolla sólo al principio el sistema aéreo y después se forman raíces adventicias espontáneamente de los tallos, mientras todavía están en el callo. La embriogénesis se presenta cuando los callos se hacen embriogénicos y forman un embrión que se transforma en una raíz y un sistema aéreo. Suele ser necesario agregar citoquininas y auxinas al medio para que se presente la embriogénesis.

En el segundo experimento, sobre el efecto de 2,4-D, BAP y 2-ip en la inducción de regenerantes a partir de embriones cigóticos, la aplicación de estos tres reguladores de crecimiento al medio de cultivo MS afectó positivamente la inducción de callos, de forma similar a los estudios realizados por Griga y Klenoticova (2001). Algunos autores han estudiado la influencia de estos reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas, mostrando resultados muy variados, pero, en algunos casos, similares a los obtenidos en esta investigación. Tal es el caso de Hamama et al. (2003), quienes estudiaron la regeneración de plantas de jojoba vía embriogénesis somática y encontraron un bajo porcentaje de germinación de embriones (18%-25%), utilizando una combinación de 2,4-D ($4,52 \mu\text{M}$) y BAP ($4,43 \mu\text{M}$). Por su parte, Ipekci y Gozukirmizi (2003) probaron diferentes concentraciones de BAP y otros reguladores de crecimiento en la inducción de embriogénesis somática directa en *Paulownia elongata* y hallaron que las frecuencias de inducción de embriones somáticos, a partir de explantes de hojas y entrenudos, se redujeron en el medio que contenía BAP, en relación con los demás reguladores.

Varias combinaciones de BAP ($0,2$; $0,5$ y $1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y de 2,4-D ($0,1$; $0,2$; $0,5$ y $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) fueron utilizadas por Wang y Bhalla (2004) para la inducción de embriogénesis somática en *Scaevola aemula* R. Br. Los embriones somáticos fueron inducidos en concentraciones bajas de 2,4-D y la concentración óptima de BAP en el medio para obtener una eficiente regeneración de tallos fue $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. El aumento de la concentración de BAP ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) no tuvo efecto sobre la regeneración de brotes. Adicionalmente, la alta concentración de 2,4-D (más de $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) tuvo efecto negativo, como la ausencia de callos.

Con referencia a BAP, Guohua (1998) y Read y Preece (2003) reportan que este regulador de crecimiento tiene un efecto positivo en la proliferación y alargamiento de

tallos y yemas adventicias y que, por lo general, se presenta una mayor frecuencia de organogénesis cuando se incrementa su concentración. Sin embargo, cuando el incremento es muy alto, se presenta una inducción alta de callos y la frecuencia de organogénesis no aumenta.

Resultados similares fueron obtenidos por Kumar et al. (1998) y George et al. (2000), utilizando BAP en combinación con ácido naftalenacético (ANA) para la regeneración de plantas: el máximo número de tallos se obtuvo con las máximas concentraciones de BAP y las mínimas de ANA. Además, encontraron que existe una relación lineal entre la concentración de BAP y el número de tallos regenerados, el número de nudos por tallo y las frecuencias de regeneración. Sin embargo, altas concentraciones de BAP inhiben la elongación de los tallos.

En el último experimento desarrollado en el presente trabajo, en el que se evaluó el efecto de BAP en la inducción de regenerantes, el mayor número obtenido en él puede atribuirse al efecto individual (independiente) de BAP, al compararlo con los demás ensayos. Esta fitoquinina mostró ser el regulador de crecimiento más importante, seguido por el 2,4-D, confirmándose lo reportado por Ochatt et al. (2001) para la obtención de regenerantes de arveja.

Con relación a estos resultados, Hagen (1995) afirma que el 2,4-D detiene la división celular en el meristemo apical y la elongación celular cuando es aplicado en altas concentraciones, inhibiendo el normal crecimiento de las plántulas. Contrario a estos resultados, en la presente investigación únicamente se indujeron callos en presencia de 2,4-D y el mayor número de callos inducidos se obtuvo con su concentración más alta ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), en combinación con BAP y 2-ip. Los regenerantes se obtuvieron únicamente en ausencia de 2,4-D, lo que corrobora que este regulador actúa como desdiferenciador y no favorece la inducción de regenerantes, aún en presencia de BAP.

A diferencia del 2,4-D y la BAP, la 2-ip no se ha estudiado tan ampliamente. Algunos ensayos demuestran la baja acción de esta citoquinina en la regeneración de plántulas. En diferentes experimentos, Guohua (1998) y Qu et al. (2000) encontraron que el efecto independiente de la 2-ip en la inducción de regenerantes es casi nulo y que es necesario utilizarla en combinación con otros reguladores de crecimiento, especialmente ANA, para que sea un componente potencialmente efectivo en la regeneración de plantas. Estos hallazgos

se pueden corroborar con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en ausencia de 2-ip se obtuvieron regenerantes y en presencia de $1,0 - 2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ se obtuvieron muy pocos.

Tzitzikas et al. (2004) señalan que los sistemas de regeneración a partir de callos (regeneración indirecta) presentan la desventaja de la posibilidad de originar plántulas con variación somaclonal. Además, es factible que las alteraciones que suceden en las células en los eventos de formación de callos, como consecuencia de la desdiferenciación celular, conduzcan a cambios tanto genéticos como epigenéticos, algunos de ellos de carácter aberrante, lo que traería como consecuencia que esas células pierdan capacidad de regeneración.

En cuanto al efecto de la polaridad de la siembra de los explantes en la obtención de regeneración, Fratini y Ruiz (2003) encontraron que segmentos nodales sembrados con orientación invertida (parte apical en el medio) mostraron mayor frecuencia de regeneración que los explantes sembrados con orientación normal (parte basal en el medio). Similares resultados obtuvieron Qu et al. (2000) con respecto a la orientación de los explantes; observaron la emergencia de los tallos adventicios siempre sobre el lado adaxial de las hojas y la regeneración fue mayor cuando la parte abaxial estuvo en contacto con el medio. Chen y Adachi (1998) afirman que la capacidad de formar embriones morfológicamente maduros depende de la posición de los explantes; por esta razón, los embriones somáticos sobre la superficie de los callos orientados hacia la luz tienen mejor desarrollo que los que están orientados hacia la oscuridad. En la presente investigación, contrario a lo obtenido por estos autores, la orientación o polaridad de los explantes (cotiledones) no presentó diferencia en cuanto al número de callos y de regenerantes obtenidos.

Adicionalmente, en el estudio realizado por Chen y Adachi (1998), se reportó que variaciones en la concentración de reguladores de crecimiento no alteraron significativamente la regeneración; efecto que no coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que en todos los experimentos realizados se presentaron diferencias en cuanto al número de regenerantes obtenidos al cambiar las concentraciones de los diferentes reguladores de crecimiento empleados. Al respecto, Ochatt et al. (2001) obtuvieron diferencias en la frecuencia de regeneración dentro de los genotipos, entre brotes regenerados bajo diferentes balances hormonales, lo que respalda el planteamiento de que a

nivel de cultivo in vitro hay una fuerte dependencia del genotipo, el tipo de explante y los reguladores empleados para diferentes objetivos.

La inducción de regenerantes fue diferente en los tratamientos en los que se utilizaron semillas secas y semillas en desarrollo, siendo mayor el número de regenerantes obtenidos de semillas en desarrollo. Al respecto, es posible que el origen y el estado fisiológico del explante inicial afecten la regeneración (Krikorian et al., 1990). La inducción y germinación de embriones somáticos está fuertemente influenciada por la etapa de desarrollo de los explantes (Hama et al., 2003). Los embriones de semillas en desarrollo pueden ser más vulnerables a la acción de los reguladores de crecimiento, ya que las condiciones de humedad, temperatura y oxígeno en las que se encuentran favorecen la germinación y la asimilación de los compuestos del medio de cultivo. Una de las causas por las que el número de regenerantes inducido en las semillas secas es menor al de las semillas en desarrollo puede ser el grado de dormancia que presenten los embriones de las semillas secas y, en consecuencia, la regeneración disminuye.

En general, en las condiciones de fotoperíodo se obtuvieron más regenerantes que en condiciones de oscuridad. La intensidad lumínica, el fotoperíodo y la calidad de luz son factores potencialmente importantes en el ambiente del cultivo, porque pueden influenciar la fotosíntesis, la morfogénesis y otros procesos fisiológicos (Read y Preece, 2003). Condiciones de luz de 12 a 16 h suelen ser lo mejor para el cultivo de muchas especies; ocasionalmente se ha reportado la relación fisiológica directa entre fotoperíodo y la respuesta del cultivo. La respuesta de los explantes a la condición de luz es muy variable y específica de algunas especies.

Es importante destacar en esta investigación el hecho de haber logrado la inducción masiva de regenerantes a partir de embriones cigóticos de semillas en desarrollo de arveja, bajo condiciones de fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y con concentraciones altas de BAP; estos resultados se presentaron de forma consistente.

Finalmente, con base en los resultados de esta investigación, vale la pena recomendar la aplicación de la metodología desarrollada en otras variedades de arveja de interés y evaluarla en otras especies leguminosas, con el fin de incorporar los regenerantes en programas de mejoramiento genético.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por el apoyo en el desarrollo y realización de esta investigación.

Literatura citada

- Chen, L. y T. Adachi. 1998. Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology. *Plant Cell Reports* 17, 508-514.
- Fratini, R. y M. Ruiz. 2003. A rooting procedure for lentil (*Lens culinaris* Medik) and other hypogeus legumes (pea, chickpea and *Lathyrus*) based on explant polarity. *Plant Cell Reports* 21, 726-732.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid, y T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 32, 272-289.
- George, J., H. Bais y G. Ravishankar. 2000. Optimization of media constituents for shoot regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight. & Arn. *Hort Science* 35(2), 296-299.
- Griga, M. 1998. Direct somatic embryogenesis from shoot apical meristems of pea and thidiazuron induce high conversion rate of somatic embryos. *Biology Plant* 41, 481-495.
- Griga, M. y H. Klenoticova. 2001. Development of embryogenic suspension culture in pea. *Agritec Ltd.*
- Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54, 1-7.
- Hagen, G. 1995. The control of gene expression by auxin. pp. 228-245. En: Davies, P. (ed.). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Hamama, L., M. Baaziz y R. Letouzé. 2003. Regeneration of jobo by somatic embryogenesis control of embryo formation, polyamine content and role of the age of explants and growth regulators. *Acta Horticulturae* 616, 313-320.
- Ipekci, Z. y N. Gozukirmizi. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Reports*. 22, 16-24.
- Krikorian, A., K. Kelly y D. Smith. 1990. Hormones in tissue culture and micro-propagation. pp. 593-612. En: Davies, P. (ed.). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Kumar, S., A. Sarkar y C. Kunhikannan. 1998. Regeneration of plants from leaflet explant of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54, 137-143.
- Leroy, X.J., K. Leon, G. Charles y M. Branchard. (2000) Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. *Plant Cell Reports* 19, 1102-1107.
- Lobo, M., F. Higueta y J. Jaramillo. 1977. Curso sobre hortalizas. Compendio N° 21, junio de 1977. Programa de hortalizas, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Bogotá.
- Mahon, J., P. Polowick y A. Vanderber. 2002. Field assessment of outcrossing from transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Transgenic Research* 11, 515-519.
- Ochatt, S., P. Durieu, L. Jacas y C. Pontécaille. 2001. Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 2, 35-38.

- Polowick, P., J. Quandt y J. Mahon. 2000. The ability of pea transformation technology to transfer genes into peas adapted to western Canadian growing conditions. *Plant Science* 153, 161-170.
- Qu, L., J. Polashock y N. Vorsa. 2000. A highly efficient in vitro cranberry regeneration system using leaf explants. *Hort Science* 35(5), 948-952.
- Read, E. y J. Preece. 2003. Environmental management of optimizing micropropagation. *Acta Horticulturae* 616, 49-57
- Salisbury, F. y C. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, México, DF. pp. 426-427.
- Tamayo, P.J. 2000. Enfermedades del cultivo de la arveja en Colombia: guía de reconocimiento y control. Boletín técnico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Regional 4, Rionegro (Colombia). 52 p.
- Tzitzikas, E., M. Bergervoet, K. Raemakers, J. Vincken, A. Lammeren y R. Visser. 2004. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Reports* 23, 453-460.
- Vasic, D., G. Alibert y D. Skoric. 2001. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). *Plant Cell Reports* 20, 121-125.
- Wang, Y. y P. Bhalla. 2004. Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower *Scaevola aemula* R. Br. *Plant Cell Reports* 22, 408-414.