

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación del comportamiento *in vitro* de genotipos de soya durante la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Edna Yadira Rodríguez Abril

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, Ciencias Agrarias
Medellín, Colombia
2021

Edna Yadira Rodríguez Abril

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al
título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D Alejandro Chaparro Giraldo (QEPD)

Directora encargada

Ph.D Johana Carolina Soto Sedano

Línea de Investigación:

Genética y Fitomejoramiento

Grupo de Investigación:

Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2021

*La belleza de la vida no hace referencia
a los átomos que la componen, sino a la
forma en que estos átomos se juntan.*

Carl Sagan

Agradecimientos

A mi profe Alejandro Chaparro Giraldo (QEPD), lamento no haber tenido más tiempo para expresarte mi aprecio, gratitud y admiración. Gracias por tu entrega y apoyo incondicional en lo personal, académico y profesional.

A mi Leo y mi familia por apoyarme en todo momento.

A Jenny Jiménez, Daniela Portela, Meike Estrada, Luisa Galindo, Julián Mora y demás compañeros del grupo de investigación de Ingeniería Genética de Plantas (IGP), gracias por siempre estar ahí, gracias por hacer del grupo un excelente equipo de trabajo, gracias por las enseñanzas y correcciones, gracias por los lazos de amistad.

A la profesora Johana Carolina Soto Sedano, gracias por recibirme, por el apoyo, por la orientación recibida, por todas las sugerencias y correcciones. Muchas gracias profe.

A la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas FENALCE y al fondo nacional de la soya, por la financiación de este proyecto.

A la facultad de Ciencias Agrarias sede Medellín, gracias por la formación recibida.

Resumen

En esta investigación se estudiaron cuatro genotipos de soya colombiana (Brasilera 1, Brasilera 2, FNS01 y Soy SK-7), bajo un sistema de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL0, induciendo organogénesis directa a partir de nodo cotiledonar y realizando selección con el herbicida glifosato. Los genotipos fueron evaluados durante las fases *in vitro* de inducción de brote (IB), elongación de brote (EB) y enraizamiento. Además, se evaluó la etapa de endurecimiento y se determinó la eficiencia de transformación. No se encontraron diferencias significativas entre las cuatro variedades durante la fase *in vitro* ni durante el endurecimiento. Se obtuvieron transformantes de las cuatro variedades y la variedad Brasilera 1 presentó la mayor eficiencia de transformación con 3.7%.

Palabras clave: Genotipos, regeneración, transformación, glifosato.

Evaluation of the *in vitro* behavior of soybean genotypes during genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

In this research, four Colombian soybean genotypes (Brasilera 1, Brasilera 2, FNS01 y Soy SK-7) were studied under a system of genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, strain AGL0, inducing direct organogenesis from the cotyledonary node and performing selection with the herbicide glyphosate. Genotypes were evaluated during the *in vitro* sprout induction (IB), sprout elongation (BE) and rooting phases. In addition, the hardening stage was evaluated, and transformation efficiency was determined. No significant differences were found between the four varieties during the *in vitro* phases or during hardening. Transformants of the four varieties were obtained, and Brasilera 1 presented the highest transformation efficiency at 3.7%.

Keywords: Genotype, regeneration, transformation, glyphosate.

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
1. Objetivos	5
1.1 Objetivo general	5
1.2 Objetivos específicos	5
2. Marco teórico	7
2.1 Soya.....	7
2.1.1 Cultivo de soya en Colombia	8
2.1.2 Fitomejoramiento de soya en Colombia	8
2.2 Transformación genética de plantas.....	9
2.2.1 Métodos de transformación	10
2.2.3 Métodos de selección	13
2.3 Soya genéticamente modificada.....	14
3. Metodología	17
3.1 Materiales	17
3.1.1 Material vegetal	17
3.1.2 Casete de expresión.....	17
3.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
3.3 Transformación de soya.....	21
3.3.1 Desinfección y germinación	21
3.3.2 Preparación del inoculo	21
3.3.3 Inoculación	22
3.3.4 Lavados	23

XII Evaluación del comportamiento *in vitro* de genotipos de soya durante la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

3.3.5	Inducción de brotes (IB).....	23
3.3.6	Elongación de brotes (EB)	24
3.3.7	Enraizamiento.....	24
3.4	Endurecimiento	25
3.5	Determinación de presencia/ausencia del transgén	25
3.6	Análisis estadístico.....	26
4.	Resultados.....	27
4.1	Germinación.....	27
4.2	Inducción de brote.....	27
4.3	Elongación de brote (EB)	30
4.4	Enraizamiento	32
4.5	Endurecimiento	34
4.6	Detección del transgén mediante PCR.....	35
5.	Discusión.....	37
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	43
6.1	Conclusiones.....	43
6.2	Recomendaciones.....	43

Lista de figuras

Figura 3-1: Casete de expresión.....	18
Figura 3-2: Vector de transformación.	18
Figura 3-3: Electroforesis del miniprep en	19
Figura 3-4: Gel de electroforesis de PCR de colonia	20
Figura 4-1: Germinación.	27
Figura 4-2: Fin de etapa de IB.....	28
Figura 4-3: Porcentajes de IB.	29
Figura 4-4: Brotes obtenidos finalizada la etapa de EB.....	30
Figura 4-5: Elongación en etapa de IB.....	31
Figura 4-6: Porcentajes de elongación.	31
Figura 4-7: Fin de etapa de enraizamiento.	32
Figura 4-8: Gel de electroforesis de PCR para detección del transgén en las variedades Brasileira2, soySK7 y FNS01.....	35

Figura 4-9: Gel de electroforesis de PCR para detección del transgén en la variedad Brasileira1 35

Lista de tablas

Tabla 2.1 Producción de soya en Colombia.	8
Tabla 3-2: Distribución de explantes de cada variedad vegetal.....	22
Tabla 4-1. ANOVA etapa IB.	30
Tabla 4-1: Porcentaje de plántulas enraizadas.....	33
Tabla 4-2: Porcentaje de endurecimiento.	34

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
°C	Grados centígrados
CO ₂	Dióxido de carbono
cm	Centímetros
g	Gramos
μM	Micro molar
HCl	Ácido clorhídrico
pb	Pares de bases
kb	Kilo pares de bases
kg	Kilogramo
kg/ha/año	Kilogramos por hectárea por año
kV	Kilovoltios
V	Voltios
M	Molar (concentración de un soluto en una solución)
μg	Microgramos
mg/L	Miligramos por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
mM	Milimolar
μM	Micromolar

mm Hg	Milímetros de mercurio
N	Normal (concentración de un soluto en una solución)
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

Superíndice**Término**

TM	Marca comercial
®	Marca registrada

Abreviatura**Término**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Banco de cepas American Type Culture Collection
BAP	Bencil amino purina
Carbe	Carbenicilina
Cefo	Cefotaxima
C.I	Centro de investigación
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
Dir	Primer directo (sentido)
EB	Elongación de brote
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EE.UU	Estados Unidos de América Contenido XIX
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
GA	Ácido giberélico
GM	Genéticamente modificado
IAA	Ácido indol acético
IB	Inducción de brote
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario

LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MEB	Medio de elongación de brote
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
MIB	Medio de inducción de brote
MS	Medio de cultivo Murashige Skoog
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rev	Primer reverso (antisentido)
RR	Roundup Ready
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T-DNA	ADN de transferencia
TE	Buffer Tris – EDTA
Timen	Timentina
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride
Vanco	Vancomicina

Introducción

La soja (*Glycine max*) es uno de los cultivos oleaginosos más importantes y una de las principales fuentes de proteínas para alimentos y piensos en el mundo (S. Li et al., 2017). Las semillas de soja son ricas en aminoácidos esenciales, minerales dietéticos, vitaminas, ácidos grasos insaturados e isoflavonas, que son considerados como alimentos benéficos para la salud humana (L. Han, Gai, & Zhang, 2003). La demanda de soja va en aumento debido al crecimiento de la población mundial y al aumento del consumo de carne. (T. Lee, Tran, & Hansen, 2016), dado que es fundamental en la industria de concentrados para consumo animal.

Para el 2018 el área total de soja sembrada a nivel mundial fue de 124,921,956 ha, con una producción de 348,712,311 toneladas (Ton). La producción la lideró Estados Unidos con 123,7 millones de Ton, seguido de Brasil y Argentina con 117,8 millones de Ton y 37,7 millones de Ton respectivamente (FAOSTAT, 2020). Colombia para este mismo año tuvo una producción de 62.058 Ton. Pese a que el país cuenta con tierras aptas para el cultivo y con variedades disponibles adaptadas principalmente a la altillanura colombiana, el cultivo no logra cubrir la demanda interna lo que obliga a importar más del 80% de la soja y sus productos derivados.

Según el último informe de ISAAA del total de la soja sembrada a nivel mundial se estima que el 74% corresponde a soja genéticamente modificada (GM). Los rasgos que han sido incorporados a la soja incluyen: tolerancia a diferentes herbicidas, resistencia a insectos, aumento en la producción de ácido oleico y más recientemente tolerancia a sequía. El uso de esta tecnología ha llevado a países como Estados Unidos, Brasil y Argentina a liderar la producción de esta leguminosa, con áreas sembradas de soja genéticamente modificada (GM) superiores al 90%,

para 2019 la soya representó el 49% del área total sembrada de cultivos biotecnológicos (ISAAA, 2019).

En Colombia a la fecha no hay cifras oficiales de siembra de soya GM. Sin embargo, se cuenta con variedades de soya adaptadas a las condiciones agroecológicas del país que presentan rendimientos superiores a 2.5 ton/ha (FENALCE, 2020). Estas podrían ser utilizadas dentro de programas de mejoramiento genético a través de herramientas biotecnológicas con miras al desarrollo de variedades de soya colombianas GM que potencialmente contribuyan al fortalecimiento del cultivo en el país.

El desarrollo de líneas transgénicas implica contar con un método de transformación y un método eficiente de regeneración y selección. La transformación genética de soya se ha desarrollado con éxito utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium*, y la regeneración por la vía de la organogénesis con diferentes tipos de explantes (Pareddy et al., 2020; Paz, Martinez, Kalvig, Fonger, & Wang, 2006). Sin embargo estas etapas son genotipo-dependientes (Song et al., 2013). Por lo tanto, se requiere la utilización de genotipos que sean susceptibles a la infección por *Agrobacterium* y que sean capaces de regenerar *in vitro* bajo las condiciones de transformación. No todas las variedades disponibles comercialmente pueden ser transformados lo que hace obligatorio un estudio de su comportamiento bajo transformación *in vitro*.

En este estudio fueron evaluados cuatro genotipos colombianos de soya (Brasilera 1, Brasilera 2, FNS01 y soy SK7) bajo un sistema de transformación mediada por *Agrobacterium* cepa AGL0 (Derivada de EHA 101). Se utilizó como explante el nodo cotiledonar, se indujo regeneración por la vía de la organogénesis directa y se utilizó el herbicida glifosato como agente de selección. Lo anterior buscando proporcionar información preliminar del comportamiento de genotipos colombianos de soya bajo un sistema de transformación que oriente la toma de decisiones para futuros trabajos que busquen realizar proyectos de mejoramiento genético de soya colombiana a través de herramientas biotecnológicas.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento de cuatro genotipos de soya durante la fase *in vitro* de transformación genética mediada por *Agrobacterium*, para conferir tolerancia a glifosato.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar el comportamiento de cuatro genotipos de soya durante la regeneración, elongación y enraizamiento *in vitro* de explantes sometidos a transformación genética mediada por *Agrobacterium*.
- Establecer la eficiencia de transformación genética mediada por *Agrobacterium* de cuatro genotipos de soya para conferir tolerancia a glifosato.

2. Marco teórico

2.1 Soya

La soya (*Glycine max*) es una leguminosa, perteneciente a la familia Fabaceae, cuyas semillas han sido ampliamente utilizadas en alimentación humana y animal (Cober, Cianzio, Pantalone, & Rajcan, 2009). Es originaria del continente asiático, su lugar de domesticación ha sido ampliamente estudiado y discutido. Históricamente se consideró que fue domesticada en el Nordeste Asiático, posteriormente con base en análisis filogenéticos y de agrupamiento se sugirió que su origen fue la Cuenca Yangtze en el sur de China, sin embargo no hay evidencia arqueológica que respalde este origen (G. A. Lee, Crawford, Liu, Sasaki, & Chen, 2011). Finalmente, datos de diversidad genética (Y. H. Li et al., 2010) y hallazgos arqueológicos (G. A. Lee et al., 2011) indican que la domesticación de la soya se dio en la cuenca del Río Amarillo en China. Este origen central fue apoyado por los resultados obtenidos de la secuenciación e identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), de más de 500 accesiones de soya (Y. Han et al., 2016). Este es a la fecha, el origen de domesticación más aceptado. Se estima que esta leguminosa llegó a la India en 1735 y al continente Europeo a través de su siembra en Francia en 1740, posteriormente se introdujo a Estados Unidos en 1765 (Ridner, 2006).

La semilla de soya es ampliamente utilizada como materia prima tanto en la industria como en la producción de alimentos de consumo humano y animal, gracias a que es una de las principales fuentes de proteína de origen vegetal, conteniendo aproximadamente un 40% de proteína (Ridner, 2006). La soya proporciona el 29.7% del aceite vegetal procesado en el mundo (Graham H & Vance P, 2003). A nivel alimenticio la soya se consume como semilla cocida, leche de soya y harina de soya, a nivel industrial es utilizada en la fabricación de productos que requieren aceites como jabones, velas, entre otros (Ridner, 2006).

2.1.1 Cultivo de soya en Colombia

Colombia para 2018 tuvo una producción de 62.058 Ton (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., 2019). La producción de soya en Colombia está concentrada en los departamentos del Meta y Valle del Cauca (Tabla 2.1).

Región	Área (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/ha)
Meta-Altillanura	22.500	48.750	2.17
Meta-Piedemonte	3.600	7.200	2.00
Valle del Cauca	2.290	6.108	2.67
TOTAL	28.390	62.058	2.19

Tabla 2.1 Producción de soya en Colombia. Se muestran datos de área sembrada, producción y rendimiento para 2018. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., 2019)

Según datos de la FAO en 2018 la torta de soya, la soya y el aceite de soya se ubicaron dentro de los 10 productos básicos de mayor importación en Colombia, lo que demuestra que la producción nacional no cubre la demanda interna. Lo anterior obliga a Colombia a importar aproximadamente el 80% de la soya y sus derivados que se requieren para consumo interno.

2.1.2 Fitomejoramiento de soya en Colombia

La soya ha sido considerada como sensible al fotoperiodo y adaptada a latitudes templadas (14-16 h de luz). Sin embargo, el mejoramiento genético ha permitido superar esta limitante logrado así su adaptación al trópico y por lo tanto el aumento en el área sembrada (Valencia R. & Ligarreto M., 2010). La soya ingresó a Colombia de forma experimental en 1929 pero

su mejoramiento genético en el país inició 30 años después en 1960 por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y continuó a partir de 1993 por CORPOICA actualmente, Agrosavia (Valencia R., Carmen C, Vargas, & Arrieta, 2006).

Inicialmente, el mejoramiento de soya se concentró en el Valle del Cauca, con la introducción de variedades como Missoy, Davis, Mamoth, Aksarben, Yellow, Acadian, Hale 3, Biloxi, Hill (Valencia R. et al., 2006), dando así origen a las variedades Júpiter, Pelican SM-ICA, ICA Tunia y Soyica P31, P32, P33 y P34 (Caicedo Guerrero, Tibocha Ardila, Campuzano Duque, Flórez Gómez, & Arguelles Cardenas, 2020) con mejor productividad y adaptabilidad. Posteriormente, se adelantaron estudios para la tolerancia al aluminio, incremento de la producción del grano, adaptación específica, precocidad, resistencia a *Cercospora* y calidad del grano apropiada para la industria de alimentos balanceados, orientado al Piedemonte y Altillanura (Caicedo Guerrero et al., 2020) En 1994 se liberó (Soyica Atillanura 2) la primera variedad para oxisoles (Valencia R. et al., 2006).

Pese a la disponibilidad de diferentes genotipos, para 2006 el 95% de la soya sembrada en el país correspondía a la variedad Soyica P-34 (Valencia R. et al., 2006). Con miras a disminuir la dependencia de Soyica P-34 el antiguo CORPOICA (actualmente Agrosavia) desarrolló y liberó variedades como: Orinoquía 3 (precoz), Corpoica Libertad 4 (tolerante a aluminio) y Corpoica Taluma 5 (forraje o grano) (Valencia R. et al., 2006; Valencia R. & Ligarreto M., 2010) y Corpoica Superior 6, precoz, con adaptación específica a suelos ácidos del Piedemonte (Valencia R. et al., 2006). Sin embargo, para 2010 aún predominaba la variedad Soyica P-34 en el 80% del área sembrada en Colombia (Valencia R. & Ligarreto M., 2010). Para 2010, el ICA aprueba las variedades de soya SSK, Soy SK-7 y Soy SK-5 desarrolladas por la empresa Semillas Kamerun y para 2019 la misma entidad aprueba las variedades Brasileira1, Brasileira2 y FNS01 las cuales presentan adaptación a suelos de la subregión natural de la Orinoquia colombiana. Estas tres últimas fueron desarrolladas por la Federación nacional de cultivadores de cereales y leguminosas (FENALCE, 2020).

2.2 Transformación genética de plantas

La transformación genética en plantas ha sido ampliamente utilizada en diferentes especies para conferir nuevas características, permitiendo romper la barrera entre especies. Este proceso incluye la entrega e integración del ADN foráneo con el material genético vegetal (método de transformación), la regeneración de plantas a partir del tejido sometido a transformación y la selección de posibles transformantes (Anami, Njuguna, Coussens, Aesaert, & Van Lijsebettens, 2013). Estos tres procesos son dependientes tanto de la especie como del genotipo (Paz et al., 2004; Somers, Samac, & Olhoft, 2003).

2.2.1 Métodos de transformación

Los métodos de transformación genética más utilizados en plantas son biobalística y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Shou, Frame, Whitham, & Wang, 2004). Algunos autores han propuesto el uso simultáneo de ambos métodos (Paes de Melo et al., 2020).

- **Biobalística**

Con este método, el ADN de interés se bombardea directamente sobre el tejido vegetal, atravesando las células y posteriormente integrándose al genoma (Reddy, Dinkins, & Collins, 2003). Puede ser usado en diferentes especies y el genotipo no es una limitante. Sin embargo se reporta mayor número de copias del transgén (Dai et al., 2001) (Travella et al., 2005), lo que en ocasiones resulta en silenciamiento génico (Reddy et al., 2003). Por biobalística no es posible insertar fragmentos de ADN de gran tamaño (Li et al., 2017).

- **Transformación mediada por *Agrobacterium***

En la transformación genética mediada por *Agrobacterium*, la bacteria es utilizada como vehículo biológico para la transferencia de genes foráneos hacia las células vegetales, en este proceso participan proteínas derivadas de *Agrobacterium* y proteínas de la célula vegetal huésped. (Gelvin, 2012). *Agrobacterium* es un fitopatógeno, su mecanismo de virulencia está dado por el plásmido denominado Ti (inductor de tumores), dentro de este plásmido se encuentra un segmento denominado

T-DNA, el cual contiene genes inductores de tumores. Durante la infección este segmento se transfiere e integra de manera estable al genoma de la planta causando el desarrollo de tumores (Gelvin, 2003). Este mecanismo natural de transferencia de genes (T-DNA) fue adoptado por la ingeniería genética, reemplazando los genes tumorales por los genes de interés y genes de selección, permitiendo así la integración de genes foráneos en el genoma de la planta (Anami et al., 2013).

La transformación mediada por *Agrobacterium* en comparación con la biobalística es de menor costo y mayor facilidad de manipulación, con este método se obtiene un menor número de copias y una integración más estable del transgén (Travella et al., 2005). A pesar de sus ventajas, este método presenta limitantes como el genotipo vegetal, puesto que la transformación exitosa depende entre otros, de la susceptibilidad del genotipo a la infección por *Agrobacterium* (Song et al., 2013). Este método ha sido utilizado para la obtención de cultivos genéticamente modificados como algodón, soya, canola, maíz, arroz, entre otros. (Gelvin, 2003).

Con cualquiera de estos dos métodos se logra una inserción estable del transgén en el genoma vegetal, el cual segrega mendelianamente y se hereda en las generaciones siguientes (Anami et al., 2013).

2.2.2 Regeneración *in vitro*

En cultivo de tejidos vegetales, la regeneración se refiere a la capacidad fisiológica que tiene una célula somática para regenerar órganos, tejidos o individuos completos (Rocha, Vieira, Koehler, & Otoni, 2018). Esta puede darse a través de dos vías la embriogénesis somática (ES) y la organogénesis.

- **Embriogénesis somática**

La ES consiste en dar origen a un embrión a partir de una célula somática. Este proceso inicia con la formación de una estructura bipolar la cual contiene, en un polo meristemas apicales de brotes y en el otro meristemas apicales de raíces (Anami et al., 2013). Steward y colaboradores demostraron por primera vez en (1958) la ES a partir de células en suspensión de zanahoria. Posteriormente se demostró en gran variedad de especies vegetales con diferentes modificaciones de protocolos (Droste, Pasquali, & Bodanese-Zanettini, 2002). El protocolo general por esta vía incluye las etapas de inducción, multiplicación, maduración y conversión (Heringer, Santa-Catarina, & Silveira, 2018). La composición del medio de cultivo respecto a los reguladores de crecimiento es decisiva en la progresión de los embriones y específica para las diferentes etapas de desarrollo, además de los requerimientos de temperatura y fotoperiodo (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok, & Filonova, 2002). Dentro de las fases iniciales de inducción y multiplicación es indispensable la presencia de auxinas en el medio y la oscuridad. Para las fases posteriores de maduración y conversión se requiere un medio libre de auxinas suplementado con agentes como el ácido abscísico, además presencia de luz (Heringer et al., 2018). La embriogénesis somática en soya se reportó por primera vez en 1983 (Christianson, Warnick, & Carlson, 1983). A la fecha diversos estudios la han reportado como un método eficiente para la obtención de líneas transgénicas (Droste et al., 2002; Raza, Singh, & Bhalla, 2020). El éxito de la regeneración por esta vía, depende entre otros, del genotipo vegetal y del tipo de explante (Rose, 2019).

- **Organogénesis**

Este proceso se da por la formación de meristemas apicales y posteriormente el desarrollo de brotes y raíces en un patrón monopolar (Rocha et al., 2018). Dentro del proceso de organogénesis se diferencian tres etapas, la competencia, la determinación y la organogénesis (Sugiyama, 2002). En la fase de competencia, las células son capaces de “desdiferenciarse” y de responder a señales extracelulares, posteriormente en la fase de determinación las células competentes se orientan a la formación de órganos específicos, dando así inicio a la formación de órganos de *novo* (Sugiyama, 2002).

El primer reporte de regeneración de soya por organogénesis fue realizado por Kiball y Bingham en 1973. Desde entonces se han obtenido plantas de diferentes tipos de explantes como cotiledones, epicotilos, nodo cotiledonar, semilla madura, semilla inmadura, cotiledones inmaduros, nodo primario de hoja, entre otros (Salammal, Ramesh, Jiang, Ganapathi, & Ramachandr, 2013). Este método de regeneración es comúnmente utilizado en la transformación genética de soya y pese al reporte de uso exitoso en diversidad de explantes, el nodo cotiledonar es uno de los explantes preferidos para la regeneración de soya por esta vía (Raza, Singh, & Bhalla, 2017),

Al igual que ocurre con la embriogénesis somática, la organogénesis es genotipo dependiente (Song et al., 2013), lo que dificulta la introducción de nuevos genotipos a los programas de transformación genética, puesto que se requiere ajustar los protocolos. Además, la soya es una especie recalcitrante (Salammal et al., 2013) por lo tanto, el genotipo vegetal es crucial. Se han reportado que algunos genotipos de soya son altamente regenerativos y otros por el contrario son recalcitrantes y no se logra su regeneración lo que impide su transformación (Anami et al., 2010). A pesar de los avances en transformación genética de soya esta continúa siendo una de las especies con bajo porcentaje de regeneración (Ma & Wu, 2008) y transformación (Raza et al., 2020).

En el cultivo de tejidos vegetales, para garantizar el éxito de la regeneración además del método utilizado, influyen la elección apropiada de explante, la formulación de los medios, los reguladores de crecimiento, el genotipo, la fuente de carbohidratos, el agente gelificante seleccionado y factores físicos como régimen de luz, temperatura, humedad entre otros (Kothari et al., 2010).

2.2.3 Métodos de selección

Dentro del proceso de transformación genética de plantas la selección es un paso clave puesto que permite la identificación de aquellas plántulas que se han regenerado a partir de células transformadas (Sundar & Sakthivel, 2008). El gen de selección se incluye dentro del casete de transformación y generalmente codifica una proteína con actividad enzimática que permite identificar células transformadas de células no transformadas (Miki & McHugh,

2004). Los genes marcadores permiten que las células transformadas sobrevivan en un medio que contiene el agente de selección (Sundar & Sakthivel, 2008). Comúnmente se han utilizado genes de resistencia a antibióticos o herbicidas los cuales son expresados por tejidos y brotes regenerados, por lo que se infiere que dichos regenerantes contienen el gen de interés (Goodwin, Pastori, Davey, & Jones, 2004). Por lo tanto, el sistema de selección consiste en un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a un sustrato que es letal para las células vegetales (Sundar & Sakthivel, 2008). El uso de un marcador de selección eficiente evita la regeneración de quimeras y aumenta la eficiencia de transformación (Miki & McHugh, 2004).

Dentro de los antibióticos más utilizados para selección se encuentran la higromicina y la Kanamicina (Goodwin et al., 2004; Miki & McHugh, 2004; Sundar & Sakthivel, 2008). Respecto a herbicidas se ha utilizado fosfinotricina, sulfunilurea, 5 amino-etil, imidazolinoles, gabaculina, entre otros (Goodwin et al., 2004; Sundar & Sakthivel, 2008)). El glufosinato de amonio es a la fecha el agente de selección más utilizado en transformación genética de plantas (S. Li et al., 2017; Pareddy et al., 2020). El glifosato también ha sido utilizado como agente de selección (Clemente et al., 2000). Para conferir tolerancia a este herbicida se han utilizado genes como *EPSPS sintasa*, *Aro A*, *Gax* y *Cp4EPSS* extraídos de distintos organismos (Sundar & Sakthivel, 2008). Si bien la selección *in vitro* con glifosato ha resultado exitosa, no es comúnmente utilizada por las dificultades que se presentan para la selección sobre material endurecido (Soto et al., 2017).

2.3 Soya genéticamente modificada

La soya GM fue uno de los primeros cultivos biotecnológicos en comercializarse (Barry, Kishore, Padgett, & Talling, 1997). La soya RR (Roundup Ready™), tolerante a glifosato salió al mercado Estadounidense en 1996, fue obtenida por biobalística y desarrollada por la multinacional Monsanto (Barry et al., 1997). Para 2005 la misma compañía desarrollo la Genuity® Roundup Ready 2 Yield™, esta nueva versión de soya fue obtenida por transformación mediada por *Agrobacterium*, contiene el mismo gen *CP4 EPSPS* pero en este caso la secuencia presenta modificación de uso codónico para soya. Además el casete

presenta diferentes elementos regulatorios respecto a la versión anterior (Meyer, Horak, Rosenbaum, & Schneider, 2006).

A la fecha, según la base de datos de ISAAA se han desarrollado 42 eventos en soya a nivel mundial. Los rasgos que han sido incorporados a la soya incluyen: tolerancia a herbicidas como glifosato (Barry et al 1997), glufosinato de amonio, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (EFSA, 2020), sulfonilureas (ISAAA, 2021), inhibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) como mesotriona, isoxaflutol y tembotriona (Siehl et al., 2014); resistencia a insectos (Yu et al., 2013; Fast et al., 2015), aumento en la producción de ácido oleico (Buhre et al 2002) y tolerancia a sequia (Ribichich *et al.*, 2020).

Para el 2018 en el mundo se sembraron 191.7 millones de hectáreas de cultivos genéticamente modificados, de las cuales 95.9 millones correspondieron a soya representando el 50% del total del área sembrado de cultivos biotecnológicos a nivel mundial (ISAAA, 2019).

En Colombia a la fecha se han aprobado 108 eventos de cultivos GM, de los cuales 21 corresponden a soya (ICA, 2021). Sin embargo, la mayoría de estas aprobaciones corresponden a autorizaciones para uso como materia prima en la elaboración de productos alimenticios para consumo animal y autorizaciones para importación. Respecto a la soya RR para el 2007 mediante Resolución 2942, el ICA autoriza el uso de soya RR como materia prima en la elaboración de productos de consumo animal. Para 2009, a través de la Resolución 1035, esta misma entidad autoriza importación de semilla de soya RR para adelantar estudios de bioseguridad y pruebas de evaluación agronómica, en 2010 se aprueba su uso como alimento o como materia prima en la producción de alimento para animales domésticos (Resolución N°1256) y finalmente la Resolución 2402 del 19 de julio de 2010, autoriza la siembra comercial de soya RR. Por lo tanto, la soya con tolerancia a glifosato es la única soya GM que cuenta con autorización para siembra comercial y estudios de bioseguridad en el país. Sin embargo, a la fecha no hay cifras oficiales que soporten la siembra de soya RR en el país.

En Colombia, el interés por parte de los agricultores en apoyar proyectos de investigación con miras al desarrollo de variedades colombianas de soya GM principalmente con

tolerancia a herbicidas, llevó a la creación de un convenio entre la federación nacional de cultivadores de cereales y leguminosas FENALCE y el grupo de investigación en ingeniería genética de plantas de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. En el marco de dicho convenio se ha venido trabajando en el proyecto titulado “Líneas de soya GM”, el cual se orienta al desarrollo de Agrobiogenericos y off patent (Jefferson, Graff, Chi-Ham & Bennett, 2015; Rüdelsheim, Dumont, Freyssinet, Pertry, & Heijde, 2018).

Dentro de este proyecto se han realizado estudios de la regeneración *in vitro* de soya a partir de semilla (Gómez, 2014), el diseño y validación de casetes de expresión para conferir tolerancia al glifosato y al glufosinato (Jimenez, 2014), análisis de libertad de operación para Colombia de la soya tolerante al glifosato (Rojas et al., 2017), evaluación de la interacción entre el genotipo vegetal, cepa de *Agrobacterium* y casete de expresión (Rojas et al., 2018) y evaluación de estrategias de selección *in vitro* con glifosato (Rodriguez, 2017; Galindo, 2018). Los resultados arrojados por estos trabajos aportaron la metodología trabajada en el presente estudio.

3. Metodología

3.1 Materiales

3.1.1 Material vegetal

Se utilizaron cuatro variedades de soya, *Glycine max*, adaptadas a la altillanura colombiana desarrolladas por las empresas colombianas: Semillas Kamerun y FENALCE: Soy SK-7, Brasileira 1, Brasileira 2 y FNS 01, (Anexo A).

Todos los procedimientos de este estudio se desarrollaron en los laboratorios de Biología Molecular del Departamento de Biología y en los cuartos de crecimiento del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. En el marco del proyecto “Líneas de soya GM” desarrollado a través del convenio entre el grupo de investigación de Ingeniería Genética de plantas y la Federación Nacional de cultivadores de cereales y leguminosas FENALCE.

3.1.2 Casete de expresión

El casete de expresión utilizado fue desarrollado previamente dentro del grupo de investigación (Jiménez, 2014) (Figura 3-1). Consta de un promotor de la poliubiquitina de soya (pGmubi), seguido de un péptido de tránsito a cloroplasto de petunia (*Petunia hybrida*) (CTP), seguido de una secuencia codificante de la CP4 EPSPS con optimización de uso

codónico para soya y finalizado con el terminador de la nopalina sintetasa (T-nos) de *Agrobacterium tumefaciens*. Este casete se denomina E-IGP y se encuentra incluido dentro de un vector pCAMBIA1301 (Figura 3-2). A este vector se le retiro el marcador de selección del gen de la higromicina y el gen reportero Gus. El vector confiere tolerancia a kanamicina a las bacterias transformadas, característica que fue usada en ensayos posteriores para hacer la selección bacteriana.

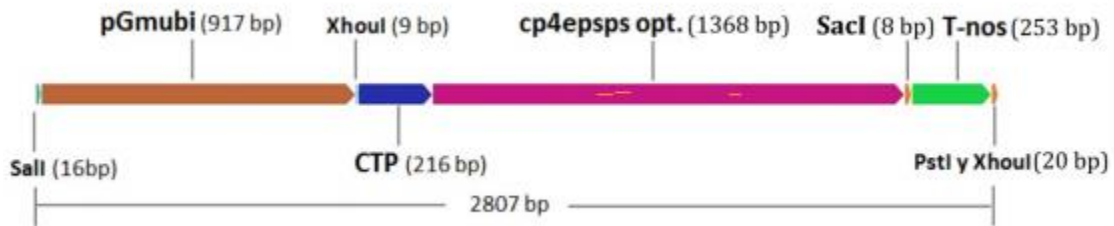


Figura 3-1: Casete de expresión. Secuencias que componen el casete con sus tamaños en pares de bases.

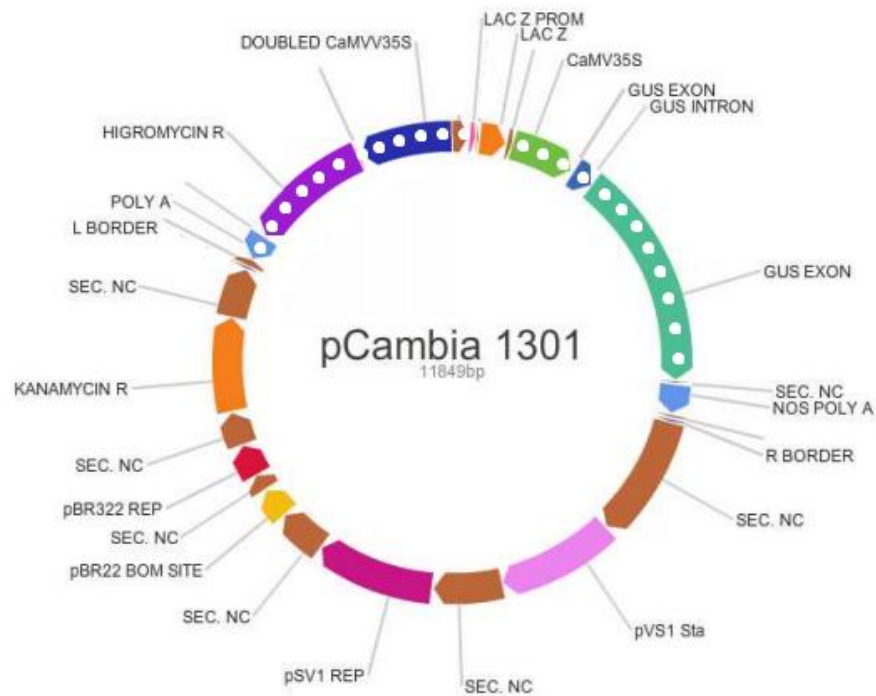


Figura 3-2: Vector de transformación. Vector pCambia 1301, las zonas punteadas corresponden al marcador de selección y gen reportero que fueron retirados del vector. Modificada de (Jimenez, 2014).

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada corresponde a la denominada AGL0, derivada de la cepa EHA101. Esta cepa se obtuvo por compra directa al banco internacional de cepas American Type Culture Collection (ATCC), bajo la denominación de ATCC®BAA-100TM.

3.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Previo a la transformación, se prepararon células electro competentes de la cepa AGL0 mediante lavados en glicerol estéril al 10% en frío, se hicieron alícuotas de 50µL y se conservaron a -80°C. Se realizó extracción de DNA plasmídico a partir de la cepa de *Escherichia coli* DHA5α que contenía el vector E-IGP, utilizando el kit Gene JET Plasmid.Miniprep Kit® (Thermo Scientific). Se verificó la extracción mediante electroforesis. (Figura 3.3).

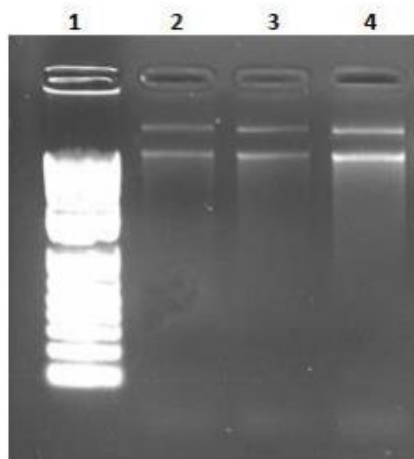


Figura 3-3: Electroforesis del miniprep en gel de agarosa al 0,7%. Carril 1 corresponde al marcador de peso GeneRuler 1 kb DNA Ladder®; los carriles 2, 3 y 4 corresponden a carga de 4, 5 y 6 µl del miniprep obtenido.

Para la transformación de *A. tumefaciens* se tomó una alícuota de 50µl de -80°C de bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa AGL0 y sobre esta se adicionaron 2µl del plásmido, se mezcló por pipeteo y se pasó la mezcla a la cubeta de electroporación. Inmediatamente después se introdujo en el electroporador y se realizó la descarga. Se utilizó el electroporador MicroPulser™ (BioRad) en el programa transformación

Agrobacterium (Ag) (1 pulso de 2,20 kV). Se retiró la cubeta y dentro de cabina se le adiciono 1ml del medio de cultivo LB, se mezcló por pipeteo y se transfirió a un eppendorf estéril de 2 ml. Posteriormente se incubo a 28°C con agitación a 150 rpm durante 3 horas. Transcurrida la incubación se tomó una caja de medio Luria Bertani (LB) (triptona o peptona 10g/l; NaCl 10g/L; extracto de levadura 5 g/l; pH 7.0) y 2 cajas de medio LB con kanamicina (50 mg/l) y en cada una se sembraron 50µl del cultivo líquido, con ayuda de un asa de vidrio estéril se cubrió toda la superficie de la caja. Las cajas se incubaron a 28°C durante 3 días, el eppendorf se almaceno a 4°C. Finalizado el periodo de incubación las cajas se llevaron a cabina de flujo laminar, se tomaron colonias individuales y se sembraron por agotamiento en medio LB, con Kanamicina (1 colonia por caja), se llevaron a incubar a 28°C durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se retiraron las cajas de incubación y se realizó PCR de colonia con los primers PF (5'CTTTGCTGAAGGAGCTACCG3') PR (5'GTGATCGAGATGCGTAGCAA3'). El programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, hibridación a 56°C por 15 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Al final se hizo una extra-extensión a 72°C durante 5 min. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% y se corrió a 110v durante 35 min Se seleccionó una de las cepas que resultaron positivas en la prueba de PCR y ésta fue propagada en caldo LB adicionado con kanamicina y posteriormente conservado a -80°C con glicerol al 20%.

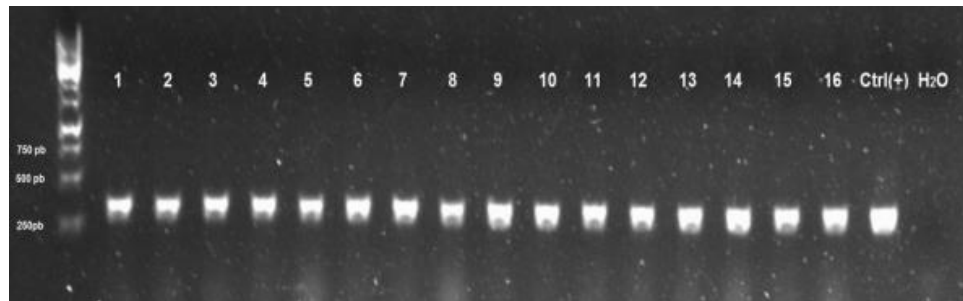


Figura 3-4: Gel de electroforesis de PCR de colonia. Verificación de incorporación del plásmido vector en la cepa AGL0 de *A tumefaciens*, el carril 1 corresponde al marcador de peso GeneRuler 1 kb DNA Ladder® (Thermo Scientific). Se observan bandas de 421pb en

16 muestras de diferentes colonias de la cepa AGL0 transformada con el casete EIGP. También se presenta el control positivo y control de agua.

3.3 Transformación de soya

3.3.1 Desinfección y germinación

Se seleccionaron 50 semillas de cada una de las cuatro variedades evaluadas, semillas de tamaño homogéneo que tuvieran la cubierta intacta, que no presentaran manchas ni alteraciones morfológicas. Se utilizaron cajas de Petri pequeñas y se distribuyeron 10 semillas en cada caja. Se prepararon 100 ml de NaClO al 5,0% y se pusieron en un vaso dentro de una jarra desecadora, en la misma jarra se acomodaron destapadas las cajas de Petri que contenían las semillas. Sobre el NaClO se adicionaron 4,1 ml de HCl 10 y se tapó la jarra desecadora, esto se realizó en cabina de extracción. Allí se dejó durante 16 h. Transcurridas las 16h, se retiraron las cajas de Petri tapadas con las semillas manteniendo estricta asepsia. Se retiró el vaso de la jarra y se descartó la solución como residuo de riesgo químico. La jarra se mantuvo dentro de la cámara con el extractor encendido para eliminar el gas residual. Las cajas de Petri con las semillas se llevaron a la cabina de flujo laminar y allí se destaparon y se dejaron ventilar por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, las cajas se taparon nuevamente y se conservaron así hasta su uso. Para la germinación, las semillas desinfectadas se sembraron en medio agar-agar 7g/L y llevaron a cuarto de crecimiento durante 5 días a 28°C y fotoperiodo 16h/8h (luz/oscuridad).

3.3.2 Preparación del inóculo

Las bacterias transformadas de *A. tumefaciens* mantenidas a -80°C conservadas en glicerol se utilizaron para la inoculación de 14 tubos Falcon que contenían 30 ml de medio LB con Kanamicina (50mg/L), inoculando 100 µl de bacterias en cada tubo. Los tubos se llevaron a incubación 28°C con agitación a 200rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,6. Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 4min a 8000rpm. Se descartó el sobrenadante y se mantuvo el pellet. Posteriormente el pellet se resuspendió en 25ml de caldo de cocultivo (Sales B5 0.1X, vitaminas Gamborg

1X, sacarosa 30 g/l, ácido giberélico (GA) 0,25 mg/l, benzil amino purina (BAP) 1,67 mg/l, ácido 2-(N- morfolino) etanosulfónico (MES) 20 mM, acetosiringona 200 uM, pH 5,7).

3.3.3 Inoculación

Se retiraron del cuarto de crecimiento los frascos con las semillas germinadas y se llevaron a cabina de flujo laminar. Allí con ayuda de pinzas, bisturí y con estricta asepsia, se tomaron semillas con apariencia verde y sana, y se colocaron en cajas de Petri grandes estériles. Se retiró la testa de cada semilla y se realizó un corte transversal al hipocótilo, dejando 5mm unidos al cotiledón. Se separaron los dos cotiledones mediante corte longitudinal, tomando cada cotiledón como un explante. A cada uno se le retiró por completo el eje embrionario y se le realizaron cortes verticales de aproximadamente 3mm de longitud sobre la cara interna en la zona donde se retiró el eje embrionario. Se prepararon 80 explantes de cada variedad (Tabla 3-2). Los explantes cocultivados se distribuyeron en 2 cajas de Petri estériles y a cada caja se le vertió el contenido de uno de los tubos Falcon que contenía la bacteria resuspendida en medio de cocultivo líquido. Se dejó incubar a temperatura ambiente en agitación durante 30 min.

Tratamiento	Descripción	Número de explantes
Cocultivo	Explantes sometidos a transformación (cocultivados).	48
Control relativo	Explantes NO sometidos a transformación, SI expuestos a glifosato.	16
Control absoluto	Explantes NO sometidos a transformación, NO expuestos a glifosato.	16

Tabla 3-2: Distribución de explantes de cada variedad vegetal. Se indica el tratamiento, descripción y número de explantes, de las variedades brasilera1, brasilera2, FNS01 y soy SK7 en cada ensayo.

Finalizado el tiempo de incubación los explantes fueron dispuestos en cajas de Petri que contenían medio de cocultivo sólido con papel filtro. Se usaron 8 explantes por caja con la cara adaxial hacia abajo. Se agruparon por variedad y se rotularon. Se dejaron incubar a 28°C durante 3 días. Esto mismo se realizó con los explantes control.

3.3.4 Lavados

Transcurrido el periodo de incubación en cocultivo, las cajas de Petri con los explantes se llevaron a cabina de flujo laminar y allí con ayuda de pinzas los explantes se pasaron a frascos estériles y se les adicionó 250ml de agua estéril con carbenicilina (400mg/l) y se llevaron a agitación en agitador mecánico a 410 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el lavado los frascos se regresaron a la cabina de flujo laminar, y con ayuda de pinzas los explantes se pasaron a cajas de Petri estériles con papel absorbente, para retirar el exceso de humedad.

3.3.5 Inducción de brotes (IB)

Con ayuda de pinzas se tomaron los explantes y se sembraron en el medio de inducción de brote (MIB) (Sales B5 1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/l, BAP 1,67 mg/l, MES 3mM, cefotaxime 350 mg/l, timentina 100 mg/l, agar 7 g/l, pH 5,7) ubicándolos en diagonal con la cara adaxial hacia arriba dejando el hipocótilo en contacto con el medio. En cada frasco de medio se colocaron 8 explantes y se llevaron al cuarto de crecimiento a 28°C, fotoperiodo 16h/8h (luz/oscuridad) durante 15 días. Posteriormente los explantes se llevaron nuevamente a cabina. Los explantes cocultivados y los explantes del control relativo se pasaron a MIB con glifosato 100uM, y los explantes del control absoluto se pasaron a MIB sin glifosato. Se mantuvieron durante 15 días más en las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo. La eficiencia en la inducción de brote para cada una de las variedades se calculó como:

$$\text{Eficiencia de IB} = \frac{\# \text{ de explantes con brote}}{\# \text{ de explantes cocultivados}}$$

3.3.6 Elongación de brotes (EB)

Finalizada la etapa de IB se retiraron los frascos del cuarto de crecimiento y se llevaron a cabina de flujo laminar. Allí los explantes que no generaron brote fueron descartados. Los explantes que generaron brotes se pasaron a cajas de Petri grandes estériles con papel kraf y con ayuda de pinzas y bisturí se retiraron los brotes del cotiledón, descartando el cotiledón. Los brotes provenientes de los explantes cocultivados y de los explantes del control relativo se sembraron en medio de elongación (Sales B5 1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/l, GA 0,5 mg/l, ácido indol acético (IAA) 0,1 mg/l, BAP 0,7 mg/l, glutamina 50 mg/l, asparragina 50 mg/l, MES 3mM, cefotaxime 350 mg/l, vancomicina 70 mg/l, glifosato 24uM, agar 7 g/l, pH 5,7) y los brotes provenientes del control absoluto se sembraron en medio de elongación sin glifosato. Todos los brotes se sembraron dejando el corte de la base del nudo de diferenciación en contacto con el medio. Se llevaron al cuarto de crecimiento y allí se mantuvieron durante 45 días, realizando cambio a medio fresco cada dos semanas hasta observar plántulas con mínimo 2cm de altura. La eficiencia de EB para cada variedad se calculó como.

$$\text{Eficiencia de EB} = \frac{\# \text{ de plantulas elongadas}}{\# \text{ de explantes cocultivados}}$$

3.3.7 Enraizamiento

Plántulas de mínimo 2cm de altura obtenidas durante la elongación se retiraron cuidadosamente con ayuda del bisturí y se pusieron en medio de enraizamiento (Sales MS 0.66X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 15g/L, agar 7g/, pH 5.7). Se llevaron al cuarto de crecimiento a 28°C, fotoperiodo 16h/8h (luz/oscuridad), allí se mantuvieron entre 3 a 7 semanas hasta que desarrollaron raíz. La eficiencia de enraizamiento para cada una de las variedades se calculó como:

$$\text{Eficiencia de Enraizamiento} = \frac{\# \text{ de plantulas que desarrollaron raiz}}{\# \text{ de explantes cocultivados}}$$

3.4 Endurecimiento

Se tomaron los frascos que contenían las plántulas que desarrollaron raíz y se les realizó un pequeño orificio en la tapa para permitir el intercambio gaseoso durante 2 días, posteriormente se amplió el orificio y se dejaron un día más. Las plántulas, se retiraron del medio y se lavaron las raíces con agua tibia. Cada plántula se sembró en un vaso desechable transparente que contenía una mezcla esterilizada de tierra 20%, turba 40% y arena 40% humedecida con solución fertilizante, cada vaso se tapó con otro vaso de igual tamaño, el cual tenía de 3 a 5 pequeños orificios, para permitir el intercambio de oxígeno, inicialmente se regaron con fertilizante de micronutrientes, posteriormente se regaron a diario con agua del grifo. Una vez las plántulas alcanzaron su altura máxima dentro de los vasos, se destaparon paulatinamente hasta quedar destapadas por completo, regando a diario de manera estricta.

Se determinó el porcentaje de endurecimiento absoluto y el porcentaje de endurecimiento relativo de cada una de las variedades, a través de las siguientes formulas.

$$\text{Endurecimiento absoluto} = \frac{\# \text{ de plantas endurecidas}}{\# \text{ de explantes cocultivados}} \times 100$$

$$\text{Endurecimiento relativo} = \frac{\# \text{ de plantas endurecidas}}{\# \text{ de plantas cocultivadas enraizadas}} \times 100$$

3.5 Determinación de presencia/ausencia del transgén

Se realizó extracción de ADN a partir de hoja de plántulas endurecidas, utilizando el kit de extracción Invisorb® Spin plant mini kit. El ADN se cuantificó por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y su software asociado. El ADN se ajustó a una concentración de 10ng/ul.

Inicialmente se realizó PCR con el juego de primers TiBo542 PF (5'CCCGCTGAGAATGACGCCAA3') y PR (5' CCTGCGACACATCGTTGCTGA3'), para descartar la presencia de *A. Tumefaciens* cepa EHA101 en las muestras y así descartar posibles falsos positivos. Posteriormente se realizó PCR utilizando los primers PF

(5'CTTTGCTGAAGGAGCTACCG3') y PR (5'GTGATCGAGATGCGTAGCAA3') para la detección del transgen mediante la amplificación de un segmento de la secuencia del gen cp4EPSPS de 205pb. El programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, hibridación a 54°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Al final se hizo una extra-extensión a 72°C durante 10 min.

Con el número de plantas PCR positivas para el gen cp4EPSPS se determinó la eficiencia de transformación de cada variedad mediante la fórmula.

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\# \text{ de plantas pcr positiva}}{\# \text{ de explantes cocultivados}} \times 100$$

3.6 Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk, posteriormente se realizó análisis de varianza (ANOVA) en las etapas de IB, EB, enraizamiento y endurecimiento para determinar si se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro variedades evaluadas.

4. Resultados

4.1 Germinación

Los porcentajes de germinación en las variedades evaluadas variaron de 95 a 100%. Siendo la variedad Brasileira1 la que mayor porcentaje de germinación presentó, seguida de Brasileira 2 con 99%, soySK7 con 97% y por último la variedad FNS 01 con 95%. (Figura 4-1).

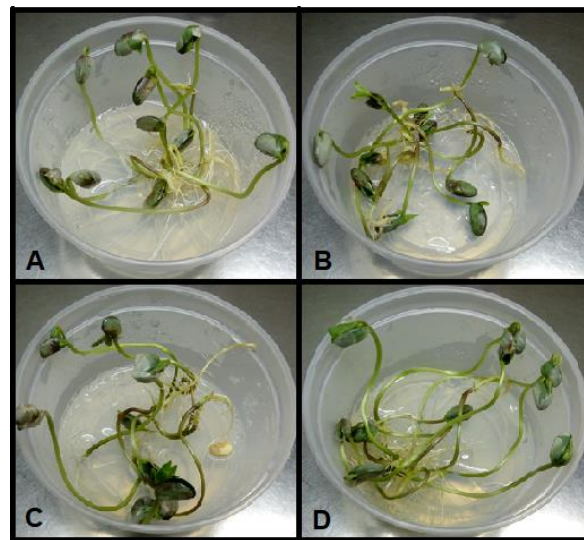


Figura 4-1: Germinación en agua-agar. En la figura se observan semillas de 5 días de germinación a 28°C de las cuatro variedades evaluadas. (A) Brasileira1; (B) Brasileira2; (C) SoySK7 y (D) FNS 01.

4.2 Inducción de brote

En esta etapa se observó desarrollo de brote en más del 60% de los explantes de cada variedad. Figura 4-2.



Figura 4-2: Fin de etapa de IB. Se observan explantes (cotiledones) de la variedad brasilera1. (A) Explante con brote; (B) Explantes sin desarrollo de brote.

Los resultados obtenidos de porcentaje de IB se observan en la (Figura 4-3). De un total de 133 explantes cocultivados de la variedad “Brasilera1” el 75% (100) generaron brote, de FNS se cocultivaron 125 explantes y se obtuvo brote del 66% (82) de estos, de la variedad “Brasilera 2” el 76% (91) explantes desarrollaron brote de 119 que fueron sometidos a cocultivo y de la variedad SOYSK7 se cocultivaron 140 explantes obteniendo brote en el 68% (95) de ellos. Durante la regeneración los explantes del control relativo fueron expuestos durante 15 días al herbicida, sin embargo, en este control se observó regeneración superior al 20% en las cuatro variedades. Los datos observados en el control absoluto muestran que el medio de IB, permiten una regeneración superior al 60% en las variedades evaluadas variedades.

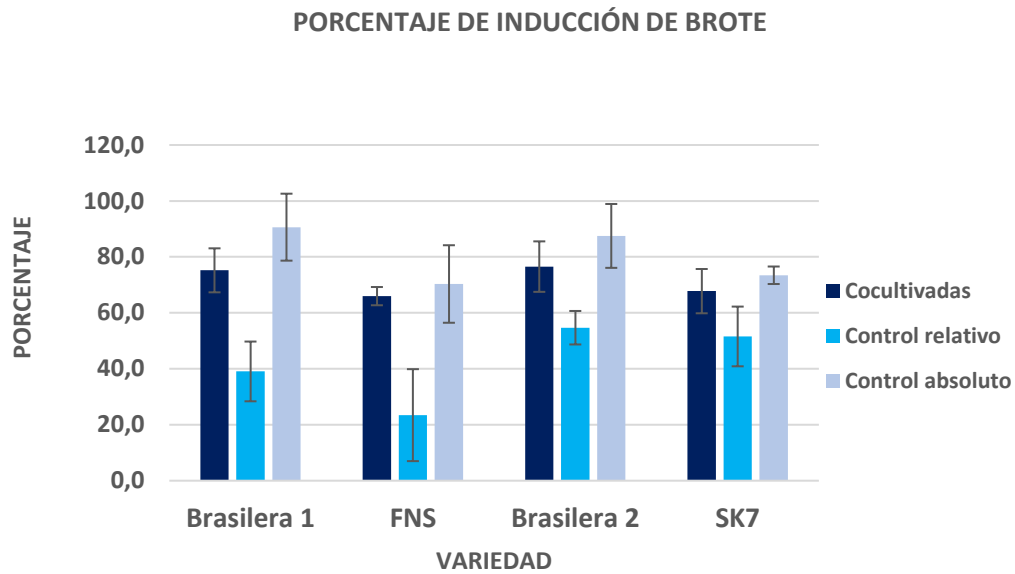


Figura 4-3: Diagrama de porcentajes de IB. Se observa el porcentaje de explantes que desarrollaron brote de cada una de las cuatro variedades (brasileira1, brasileira2, FNS01 y soy SK7) en cada tratamiento (Cocultivo, control relativo y control absoluto).

El ANOVA, indica que no hay diferencias significativas entre las 4 variedades cocultivadas respecto a la IB con un nivel de significancia superior a 0.05 ($p= 0.16$). La IB en las cuatro variedades cocultivadas se mantuvo entre el $66 \pm 3,25\%$ y $76 \pm 8,74\%$.

			F	Valor P	Valor crítico para F	
	333,7995823	3	111,2665274	2,0553551	0,1598266	3,490294
	649,6192888	12	54,13494074			
	983,4188712	15				

Tabla 4-1. ANOVA etapa IB. Tabla de Análisis de varianza de la etapa de IB con las cuatro variedades (brasileira1, brasileira2, FNS01 y soy SK7) cocultivadas.

4.3 Elongación de brote (EB)

En la etapa de elongación se observan brotes aún verdes que no elongaron, brotes secos y brotes elongados (Figura 4.4), en las cuatro variedades evaluadas cocultivadas.

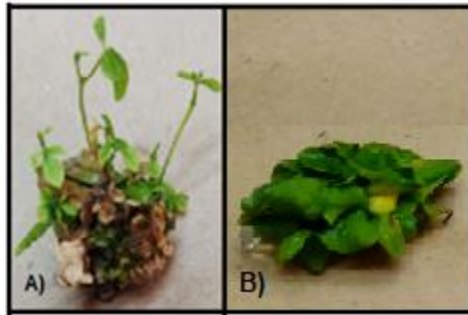


Figura 4-4: Brotes obtenidos finalizada la etapa de EB. Se observan brotes de la variedad brasileira 1 obtenidos al final de la fase de elongación de brote. (A) Brotes elongados y (B) Brotes no elongados.

Se observaron brotes elongados en la etapa de IB (Figura 4-5), estos fueron incluidos en los datos de elongación.



Figura 4-5: Elongación en etapa de IB. Se observan explantes (cotiledones) de la variedad brasilera 2 finalizada la fase de inducción de brote, la flecha señala un brote elongado.

El ANOVA indica que no hay diferencias significativas en la etapa de inducción de brote con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, se observa que las variedades Brasileira 1 y Brasileira 2, presentaron mejor desempeño en esta etapa con valores promedio similares en número de brotes elongados de $43.47 \pm 10,41\%$ y $43.00 \pm 7.3\%$ respectivamente, seguido por SK7 con $39.07 \pm 2.34\%$ y FNS con $31.19 \pm 2,17\%$ (Figura 4.6).

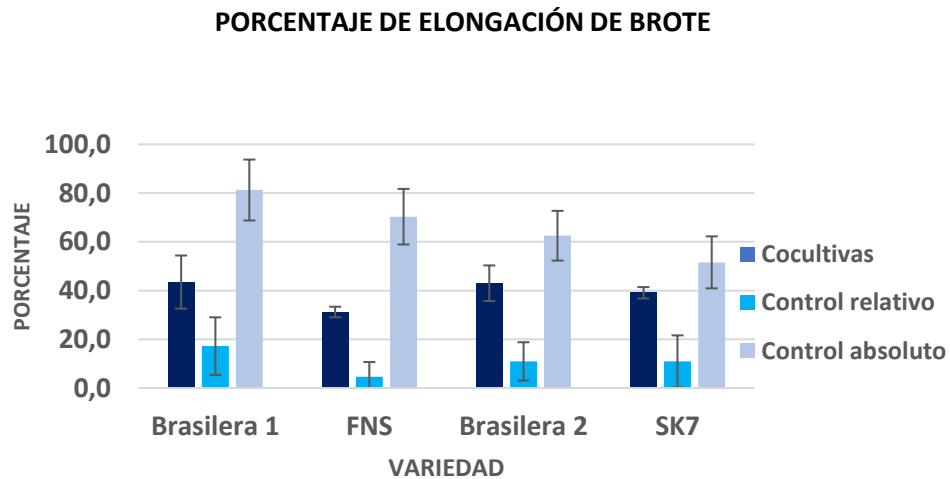


Figura 4-6: Diagrama de porcentaje de elongación de brote. Porcentaje de número de plántulas elongadas de las cuatro variedades (brasileira 1, brasileira 2, FNS01 y soy SK7) cocultivadas.

4.4 Enraizamiento

En la fase de enraizamiento, se observaron plántulas que se mantuvieron verdes, pero no desarrollaron raíz y plántulas que generaron raíces que les permitieron pasar a la etapa de endurecimiento (Figura 4-7).

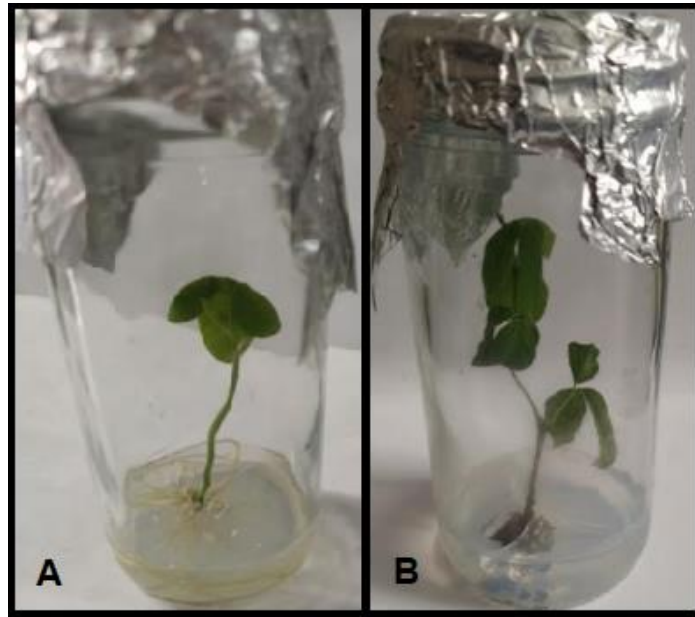


Figura 4-7: Fin de etapa de enraizamiento. (A) Planta con raíz variedad brasilera 2. (B) Planta verde sin raíz variedad brasilera 2.

Los resultados de esta etapa se resumen en la (Tabla 4-1). De los controles relativos solamente se obtuvo una plántula de la variedad Brasileira1, de las demás variedades no se obtuvo ninguna plántula para este control.

Tratamiento	Variedad	Numero inicial de explantes	% De plantulas enraizadas
Cocultivadas	Brasilera 1	133	24.2 ± 11%
	FNS01	125	16.8 ± 7.6%
	Brasilera 2	119	23.6 ± 3.4%
	SoySK7	140	18.2 ± 5.7%
Control Relativo	Brasilera 1	56	1.57 ±
	FNS01	48	0
	Brasilera 2	56	0
	SoySK7	48	0
Control absoluto	Brasilera 1	40	57.8 ± 9.4%
	FNS01	64	23.4 ± 6%
	Brasilera 2	56	36.0 ± 7.9%
	SoySK7	48	23.4 ± 16.4%

Tabla 4-1: Porcentaje de plántulas enraizadas. Numero de explantes iniciales de cada variedad (brasileira 1, brasileira 2, FNS01 y soy SK7) en cada uno de los tratamientos (cocultivadas, control relativo y control absoluto) y su respectivo número de plantas enraizadas con desviación estándar.

Para esta etapa los datos presentan una distribución normal con un valor $p= 0.345$, en la prueba de Shapiro – Wilk con un nivel de confianza del 95%. Con un valor $p= 0.425$ y un nivel de significancia de 0.05 el análisis de varianza indica que la etapa de enraizamiento no está relacionada con la variedad, puesto que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro variedades evaluadas. Sin embargo, la variedad Brasileira 1, es de la cual se obtiene un mayor número de plantas, con 32 plántulas enraizadas.

4.5 Endurecimiento

La prueba de Shapiro-Wilk arrojó un valor $p= 0.378$, por lo tanto, los datos no se alejan de una distribución normal. El ANOVA indica que, en la etapa de endurecimiento, no hay diferencias significativas entre las cuatro variedades cocultivadas con un valor $p= 0.378$. No obstante, los datos de porcentaje de endurecimiento relativo indican que la variedad Soy SK7 presenta un mayor número de plantas endurecidas respecto al número inicial de plantas que inician esta etapa con un 40%, por el contrario, la variedad FNS 01 fue la variedad que presentó menor porcentaje en el endurecimiento relativo con 28%. (Figura 4-2).

Variedad	Endurecimiento absoluto	Endurecimiento relativo
Brasilera 1	8%	34%
FNS01	5%	28%
Brasilera 2	9%	39%
SOYSK7	7%	40%

Tabla 4-2: Porcentaje de endurecimiento. Datos porcentuales de endurecimiento absoluto y relativo de cada una de las 4 variedades (brasileira 1, brasileira 2, FNS01 y soy SK7) cocultivadas.

4.6 Detección del transgén mediante PCR

De un total de 86 plantas analizadas se detectaron 11 PCR positivas, de las cuales una correspondía a la variedad FNS 01, dos a Soy SK7, tres a Brasileira2 (Figura 4-8) y cinco a la variedad Brasileira1 (Figura 4-9).

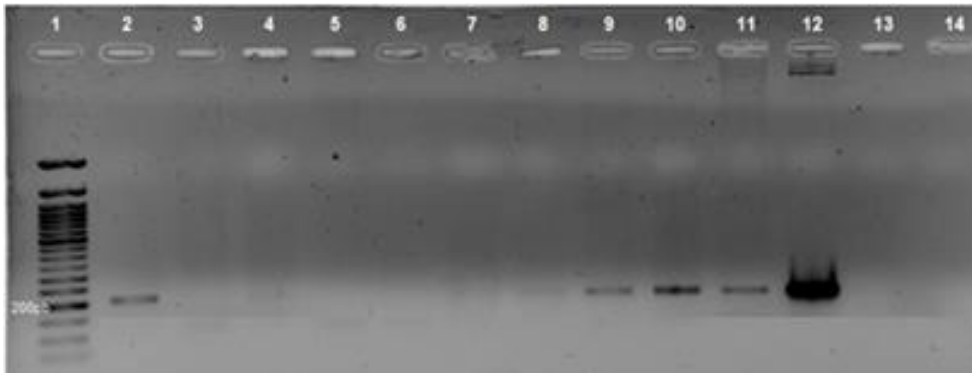


Figura 4-8: Gel de electroforesis de PCR para detección del transgén en las variedades Brasileira2, soySK7 y FNS01. Visualización de ampliaciones de 205pb PCR para detección del transgén. Carril 1. Marcador de peso GeneRuler 50pb DNA Ladder®. Carriles 2, 3 y 4 Soy SK7; 5, 6 y 7 FNS 01; 8, 9 y 10 Brasileira2; 11. Control positivo planta; 12. Control positivo plásmido; 13. Control negativo y 14. Control de agua.

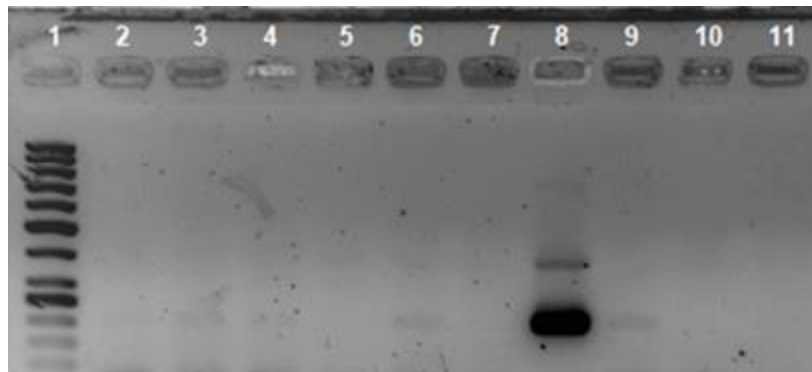


Figura 4-9: Gel de electroforesis de PCR para detección del transgén en la variedad Brasileira1. Carril 1. Marcador de peso GeneRuler 50pb DNA Ladder®;

carriles 2 al 7 Brasileira1; 8. Control positivo de plásmido; 9. Control positivo de planta-, 10. Control negativo y 11 control de H₂O.

Una vez calculada la eficiencia de transformación, se evidencio que la variedad Brasileira1, presento la mayor eficiencia con 3.7%, seguida de la variedad Brasileira 2 con 2.5%. En este estudio las variedades FNS01 y SOYSK7 mostraron una eficiencia de transformación por debajo del 1% con valores de 0.8% y 0.7% respectivamente.

5. Discusión

En la transformación genética mediada por *Agrobacterium* se ha demostrado que las etapas de infección y regeneración influyen de manera directa sobre la eficiencia de transformación y son genotipo-dependientes (Donaldson & Simmonds, 2000) (S. Li et al., 2017). La transferencia exitosa del transgén desde *Agrobacterium* hacia las células vegetales depende entre otros factores, de la susceptibilidad del genotipo vegetal a la infección por *A. tumefaciens* (Hinchee et al., 1988; Wang et al., 2002; Li et al., 2017). La obtención de plántulas *in vitro* al final del proceso de transformación depende de la capacidad de regeneración de cada variedad (Raza et al., 2017; Song et al., 2013).

En este estudio se evaluó la capacidad de regeneración y eficiencia de transformación de cuatro genotipos colombianos de soya (Brasilera 1, fns01, Brasilera 2 y soy SK7), bajo un sistema de transformación mediada por *Agrobacterium* para conferir tolerancia a glifosato. La regeneración se llevó a cabo por organogénesis directa a partir de nodo cotiledonar (Rojas, Lopez Pazos, & Chaparro Giraldo, 2018). La regeneración a partir de este explante incluye las etapas de IB, EB y enraizamiento (S. Li et al., 2017).

Las cuatro variedades evaluadas presentaron un porcentaje de germinación superior al 95%, estos resultados coinciden con lo reportado por Rojas y colaboradores en (2018), donde variedades de soya colombianas, incluida soy SK7, sometidas al mismo método de desinfección, no presentaron diferencias porcentuales en esta etapa.

En la etapa de IB, los cuatro genotipos evaluados desarrollaron brotes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas al genotipo vegetal en esta etapa lo cual ha sido previamente reportado por (Raza et al., 2017),

En este estudio evaluaron la regeneración *in vitro* de diferentes genotipos de soya a partir de tres diferentes tipos de explante incluido el nodo cotiledonar, sin encontrar diferencias asociadas exclusivamente al genotipo vegetal en la fase de IB. Sin embargo, otros estudios reportan rangos de IB variables entre genotipos, con porcentajes que van desde el 68% hasta el 100% en la evaluación de 10 genotipos de soya bajo un sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* (Paz et al., 2004). Por otro lado, Song y colaboradores (2013), evaluaron 20 genotipos chinos de soya, reportando IB en todos los genotipos con tasas de regeneración variables entre 8.4 ± 3.2 para el genotipo Heinong 51, hasta 80.7 ± 4.3 para el genotipo Tianlong 1. Además, utilizaron como control los genotipos Jack y Williams82 los cuales mostraron tasas de $82.8\% \pm 3.3$ y $67.7\% \pm 4.7$ respectivamente. La evaluación en estudios anteriores de variedades de soya colombianas, también mostro IB en las tres variedades evaluadas, sin embargo destacaron el efecto del genotipo vegetal sobre esta etapa, siendo la variedad P29 la que presento mayor número de explantes con brote con 96.2% y la variedad soy SK7 la que presento menor porcentaje con 75.4% (Rojas et al., 2018).

Finalizada la IB en las cuatro variedades se observaron explantes que no regeneraron puesto que estaban oxidados o necróticos. Se ha reportado que las heridas realizadas sobre los explantes pueden desencadenar la producción polifenoles oxidasas como mecanismo de defensa, generando el oscurecimiento del tejido y debilitamiento en el proceso de transformación (Olhoft & Somers, 2001). Por lo tanto, se han utilizado antioxidantes en el medio para mitigar esta respuesta (Dan, 2008). En el caso de soya, se ha utilizado la adición de DTT y L-cys en el medio de cocultivo liquido en el que se resuspende *Agrobacterium* y en el medio de cocultivo sólido, para inhibir la necrosis de explantes durante la infección (S. Li et al., 2017). En este estudio no se adicionaron antioxidantes.

El nodo cotiledonar ha sido el tipo de explante más utilizado en la transformación genética de soya (Raza et al., 2017) Sin embargo se presenta una baja eficiencia de transformación por este método, que se ha asociado entre otras, a la baja tasa de elongación de botes (Song et al., 2013). Diferentes estudios se han enfocado en evaluar diferentes concentraciones de hormonas en el MEB con el fin de mejorar la

eficiencia de transformación.(S. Li et al., 2017; W. Li, Ning, Lv, & Li, 2008; Paz, Martinez, Kalvig, Fonger, & Wang, 2006; Soto, Ferreira, Delgado, & Enríquez, 2016).

En este estudio se evaluó la EB como número de plántulas elongadas por variedad y se incluyeron las plántulas que elongaron en la fase previa de IB. No se encontraron diferencias significativas entre las cuatro variedades evaluadas. Sin embargo, la variedad Brasileira 1 fue la que elongó el mayor número de plántulas (58) que corresponden a una tasa de elongación del $43.47 \pm 10,4\%$, el menor número se obtuvo de la variedad FNS01 (39) con una tasa de elongación del $31.19 \pm 2,17\%$. Li y colaboradores en (2017), evaluaron la tasa de elongación en ocho genotipos de soya utilizando diferentes concentraciones de IAA y GA, reportando diferencias asociadas al genotipo vegetal y a la concentración de hormonas, obteniendo la mayor tasa de elongación en la variedad Jack purple (33.34%) utilizado 1.0 mg / L GA y 0.1 mg / L IAA. En la evaluación de tres genotipos colombianos de soya, la variedad SK7 obtuvo el menor porcentaje de regeneración, sin embargo esta variedad fue la que presentó mayor número de brotes por explante en la etapa de EB, siendo la variedad de la cual obtuvieron mayor número de plántulas (Rojas et al., 2018). Raza y colaboradores 2017, reportaron diferencias respecto al número de brotes que elongan entre las variedades, mostrando que variedades como Bunya generaron brotes múltiples, contrario a variedades como Jack que generaron entre uno y dos brotes, sin embargo, al igual que en el presente estudio, reportan elongación de brotes en todas las variedades evaluadas.

El mecanismo de selección juega un papel fundamental en esta etapa de EB, puesto que se deben estandarizar las concentraciones de los agentes de selección en el medio de tal manera que permitan la regeneración y eviten escapes. En la transformación genética de soya se ha reportado selección con antibióticos como Kanamicina e higromicina (Sundar & Sakthivel, 2008). Sin embargo, el glufosinato de amonio ha sido el agente seleccionador más comúnmente utilizado tanto *in vitro* como en invernadero (S. Li et al., 2017; Paz et al., 2006; Song et al., 2013). El glifosato, utilizado en este estudio, ha sido poco reportado como agente de selección (Clemente et al., 2000; Rojas et al., 2018; Soto et al., 2016). A diferencia del glufosinato de amonio, el glifosato es un herbicida sistémico por lo tanto la selección se basa en criterios fenotípicos (aparición de los brotes) y no en criterios

categoricos como (brotes vivos o muerto) (Rojas et al., 2018). En el presente estudio bajo las condiciones de selección ensayadas se obtuvieron regenerantes de las cuatro variedades evaluadas.

Generalmente se ha reportado que la regeneración es genotipo-dependiente, entendiendo la regeneración como el desarrollo *in vitro* de plantas completas (S. Li et al., 2017; Paz et al., 2006; Song et al., 2013). Sin embargo, en este estudio utilizando las variedades colombianas Brasileira1, FNS01, Brasileira2 y soySK7 no se observó efecto del genotipo. Resultados similares fueron reportados por Reichert y colaboradores en (2003) donde observaron un comportamiento uniforme en la regeneración de las variedades de soya Williams82, Loda y Newton.

Se realizó la detección del transgén mediante PCR, se obtuvo por lo menos una planta PCR positiva de cada una de las variedades, Brasileira1 fue la variedad que presentó mayor eficiencia de transformación con 3.7%. Diferentes estudios han demostrado que el proceso de infección es crucial en la eficiencia de transformación y depende entre otros factores, de la susceptibilidad del genotipo vegetal a la infección por *A. tumefaciens* (S. Li et al., 2017; Rojas et al., 2018; Song et al., 2013). En este estudio no se evaluó la susceptibilidad de los genotipos, in embargo, se observó una mayor tasa de transformación en la variedad Brasileira1, lo cual podría estar relacionado a la interacción con la cepa AGL0 utilizada. Donaldson y Simmonds, (2000) reportaron tasas globales de transformación que variaron entre el 27% y el 92% según la variedad vegetal utilizada. No obstante, la diferencia no la atribuyen a la interacción entre el genotipo vegetal y *Agrobacterium*, si no a la diferencia en la eficiencia de regeneración *in vitro* de cada variedad. Como ya se mencionó, las cuatro variedades evaluadas en este estudio no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a su capacidad de regeneración *in vitro*. Ahora, la eficiencia de transformación observada puede estar asociada al número de plantas obtenidas al final el proceso, siendo Brasileira 1 la variedad de la cual se obtuvo mayor número de plantas (11) y la que presentó mayor eficiencia de transformación (3.7%).

La obtención de transformantes en todas las variedades evaluadas, coincide con lo reportado en otros estudios de transformación genética de soya (S. Li et al., 2017). Pereddy, (2020) también reportó transformación en 19 diferentes genotipos sometidos al mismo protocolo de transformación. No obstante, estos resultados son contrarios a lo reportado por Paz 2006 quienes evaluaron las variedades de soya Thorne, Williams82 y Williams, reportando transformantes solamente de la variedad Williams cuando se utilizó como explante el nodo cotiledonar, con una eficiencia de transformación de 5,3%. Rojas y colaboradores, 2018, utilizando la misma cepa y protocolo de regeneración utilizados en este estudio, obtuvieron plantas transformadas en dos de las tres variedades evaluadas con frecuencias de transformación de 10.8% para soy SK7 y 5.4% para P29. La eficiencia de transformación de la variedad soySK7 (0,7%) obtenida en el presente estudio, se encuentra por debajo de la eficiencia previamente reportada, esta diferencia puede estar asociada al hecho de que estudios anteriores realizan PCR sobre material en etapa de enraizamiento, en este estudio se realizó PCR sobre material endurecido,

Dado que la eficiencia de transformación está determinada en gran medida por la interacción entre la cepa de *Agrobacterium* y el genotipo vegetal y por la capacidad de regeneración, algunos estudios realizan preselección de genotipos con base en estas dos características ((Song et al., 2013). A pesar de que el primer reporte de soya genéticamente modificada se realizó hace 33 años (Hinchee et al., 1988), la soya sigue siendo considerada una especie difícil de transformar (Yang et al., 2019). Diferentes factores resultan limitantes en el proceso de transformación, uno de ellos es el hecho de que la soya es considerada recalcitrante (Salammal et al., 2013). Además, cuando un genotipo logra ser regenerado *in vitro* se presenta un cuello de botella en la fase de elongación que afecta de forma directa la eficiencia de la transformación debido al escaso número de plantas elongadas (S. Li et al., 2017). En el caso de la transformación genética mediada por *Agrobacterium* otros factores pueden afectar la eficiencia como lo son: la cepa utilizada, el tipo de explante y el genotipo (K. Lee et al., 2011).

Por lo tanto, diversos estudios se han concentrado en la mejora de protocolos. Por ejemplo, utilizando como explante nodo cotiledonar se han reportado eficiencias de transformación de 6.3% (Paz et al., 2004; Zeng, Vadnais, Zhang, & Polacco, 2004).

Tomando semilla media como explante se han obtenido eficiencias de transformación entre el 1,4% y 8,7% con una frecuencia promedio de 3.8% (Paz et al., 2006). Con el mismo explante de semilla media y concentraciones de 1.0 mg / L GA y 0.1 mg / L IAA en el MEB se obtuvieron eficiencias que van desde el 7,3 al 10% con una frecuencia media del 8,7% (S. Li et al., 2017). La máxima frecuencia de transformación reportada en soya es de 18,7 % en promedio utilizando semillas divididas que cuentan con un eje embrionario parcial, con un protocolo aplicable a diferentes genotipos (Pareddy et al., 2020).

Diversidad de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se han utilizado en soya como lo son Chry5, LBA4404, EHA101, EHA105, AGL1, KYRT1 y GV3850 (H. Lee, Park, & J., 2013). La cepa EHA 101 resulto ser más eficiente en la transformación de cotiledones inmaduros que la cepa LBA4404 (Parrott, Hoffman, Hildebrand, Williams, & Collins, 1989). En la transformación de variedades colombianas de soya presento mayor eficiencia de transformación la cepa EHA105 que la cepa AGL0 derivada de EHA 101 (Rojas et al., 2018).

Se ha avanzado en aumentar la eficiencia de transformación en soya con la optimización de protocolos. No obstante, los protocolos por sí solos no garantizan dicha eficiencia puesto que cada genotipo puede comportarse de forma diferente, por lo tanto, se deben evaluar los genotipos para identificar aquellos con mayor potencial dentro de un determinado protocolo.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

No se observan diferencias estadísticamente significativas en la regeneración de las variedades colombianas de soja Brasileira1, FNS01, Brasileira2 y soySK7 evaluadas bajo un sistema de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL0, para conferir tolerancia al glifosato. Sin embargo, la variedad Brasileira1 presentó mayor eficiencia en las etapas de IB, EB y enraizamiento.

Se obtuvieron plantas transformadas de las cuatro variedades evaluadas, la variedad Brasileira1 fue la que presentó mayor eficiencia de transformación (3.7%). No obstante, se deben realizar ajustes al protocolo que permitan optimizar las fases de elongación y enraizamiento, orientado a generar un mayor número de plantas y por lo tanto aumentar la eficiencia de transformación.

Las cuatro variedades evaluadas son susceptibles a la infección por *A. tumefaciens* cepa AGL0 y regeneran por la vía de la organogénesis directa tomando como explante el nodo cotiledonar.

Estos resultados muestran que las variedades colombianas evaluadas tienen potencial para ser incluidas dentro de programas de transformación genética principalmente la variedad Brasileira1.

6.2 Recomendaciones

La soja presenta una baja eficiencia de transformación, por lo tanto, se debe buscar la optimización de los diferentes factores que influyen en el proceso. Los genotipos a utilizar deben ser evaluados previamente en un sistema de regeneración de tal manera que se establezca la tasa de regeneración de cada uno de ellos. La inclusión de genes reporteros como *Gus* dentro del casete de expresión es una herramienta

útil que permite preseleccionar genotipos con base en la susceptibilidad a la infección por *Agrobacterium* permitiendo así seleccionar no solo los genotipos más susceptibles sino también la cepa a utilizar. La información de tasa de regeneración y susceptibilidad de cada genotipo permitirá identificar los más promisorios para ser sometidos a transformación. Una vez identificados, se pueden realizar ajustes al protocolo orientados exclusivamente a él o los genotipos seleccionados. Se debe buscar optimizar la fase de EB puesto que una etapa crítica dentro del proceso.

La selección es clave en transformación, a la fecha la selección *in vitro* con glifosato sigue siendo compleja dado que este es un herbicida sistémico, no se observa un efecto de selección inmediato sobre el material no transformado, sino que por el contrario se observa hasta la etapa final de elongación, además este herbicida dificulta la evaluación fenotípica sobre material endurecido. Posterior a la identificación de plantas positivas mediante PCR, se deben realizar pruebas como ELISA (enzimoinmunoanálisis de absorción) que permitan validar la expresión del gen de interés.

Anexo: Características agronómicas de las variedades de
soya usadas en el estudio: Se presentan datos del ciclo de vida,

así como características agronómicas y de la semilla más relevantes de las cuatro variedades de soya evaluadas.

Variedad					
Característica		Soy SK-7	Brasileira 2	Brasileira 1	FNS 01
Ciclo de vida	Días de siembra a emergencia	-	5 – 6	5 – 6	5 - 6
	Días de emergencia a floración	-	30 – 32	28 – 31	34 - 36
	Días de emergencia a madurez	-	85 – 90	85 – 89	93 - 98
	Días de emergencia a cosecha	-	95 – 100	94 – 98	110 - 115
Características agronómicas	Habito de crecimiento	Semideterminado	Determinado	Indeterminado	Determinado
	Altura de planta	101	70	112	87
	Color de flor	Blanca	Morada	Morada	morada
	Numero de vainas		60	56	62
	Numero de semillas por vaina	-	2,4	3	2,6
Características de la semilla	Color de semilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla
	Color de hilum	Negro	Café oscuro	Amarillo	Negro
	Forma	Ovalada	Ovalada	Ovalada	Ovalada
Desarrollador		Semillas Kamerun	FENALCE	FENALCE	FENALCE

Bibliografía

- Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., & Van Lijsebettens, M. (2013). Higher plant transformation: Principles and molecular tools. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6–8), 483–494. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130232mv>
- Barfoot, P., & Brookes, G. (2014). Key global environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2012. *GM Crops & Food*, 5(2), 149–160. <https://doi.org/10.4161/gmcr.28449>
- Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., & Talling, W. (1997). Patente nº US 6248876 B1. USA.
- Caicedo Guerrero, S., Tibocho Ardila, Y., Campuzano Duque, L. F., Flórez Gómez, D. L., & Arguelles Cardenas, J. (2020). Productive performance of seven soybeans genotypes in acid soils of the Colombian Orinoquía. *Agronomy Mesoamerican*, 31(1), 59–68. <https://doi.org/10.15517/AM.V3111.34440>
- Christianson, M. L., Warnick, D. A., & Carlson, P. S. (1983). A Morphogenetically Competent Soybean Suspension Culture Abstract. *SCIENCE*, 222(7), 632–634.
- Clemente, T. E., Lavalley, B. J., Howe, A. R., Conner-ward, D., Rozman, R. J., Hunter, P. E., ... Hinchee, M. A. (2000). Progeny Analysis of Glyphosate Selected Transgenic Soybeans Derived from Agrobacterium-Mediated Transformation. *CROP SCIENCE*, 40, 797–803.

- Cober, E. R., Cianzio, S. R., Pantalone, V. R., & Rajcan, I. (2009). Soybean. In *Oild crops. Handbook of plant breeding*. (pp. 57–90).
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., ... Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7(1), 25–33.
<https://doi.org/10.1023/A:1009687511633>
- Dan, Y. (2008). Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(3), 149–161.
<https://doi.org/10.1007/s11627-008-9110-9>
- Donaldson, P. A., & Simmonds, D. H. (2000). Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Reports*, 19(5), 478–484.
<https://doi.org/10.1007/s002990050759>
- Droste, A., Pasquali, G., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2002). Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica*, 127(3), 367–376.
<https://doi.org/10.1023/A:1020370913140>
- Galindo, L. (2019). Establecimiento de una curva de selección *in vitro* con glifosato en un sistema de regeneración de tres variedades colombianas de soya (*Glycine Max* (L.)Merrill). Universidad INCCA de Colombia.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the " Gene-Jockeying " Tool. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 67(1), 16–37.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Gelvin, S. B. (2012). Traversing the cell : *Agrobacterium* T-DNA ' s journey to the host genome, 3(March), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
- Gómez Gutiérrez, D. (2014). Regeneración *in vitro* a partir de semillamadura

- en la variedad de soya (*Glycine max(L). Merrill*) soyica P34.
- Goodwin, J. L., Pastori, G. M., Davey, M. R., & Jones, H. D. (2004). Selectable marker: antibiotics and herbicide resistanc. In *Methods in molecular biology, transgenic plants: methods and protocols*. (Vol. 286, pp. 191–201).
- Graham H, P., & Vance P, C. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131, 872–877.
- Han, L., Gai, J., & Zhang, W. (2003). The present study of soybean nutrients. *Seed*, 131, 57–59.
- Han, Y., Zhao, X., Liu, D., Li, Y., Lightfoot, D. A., Yang, Z., ... Li, W. (2016). Domestication footprints anchor genomic regions of agronomic importance in soybeans. *New Phytologist*, 209(2), 871–884. <https://doi.org/10.1111/nph.13626>
- Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2018). Insights from Proteomic Studies into Plant Somatic Embryogenesis. *Proteomics*, 18(5–6), 1–25. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700265>
- Hinchee, M. A. W., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S. J., Gasser, C. S., ... Horsch, R. B. (1988). Production of transgenic soybean plants using agrobacterium-mediated DNA transfer. *Bio/Technology*, 6(8), 915–922. <https://doi.org/10.1038/nbt0888-915>
- ISAAA. (2019). ISAAA Brief 55-2019: Executive Summary Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA)*. Retrieved from <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>
- Jefferson, D. J., Graff, G. D., Chi-Ham, C. L., & Bennett, A. B. (2015). The emergence of agbiogenics. *Nature biotechnology*, 33(8), 819.
- Jimenez, J. (2014). *Diseño de genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a herbicidas en soya*. Universidad Nacional de Colombia.

- Lee, G. A., Crawford, G. W., Liu, L., Sasaki, Y., & Chen, X. (2011). Archaeological soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does size matter? *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026720>
- Lee, H., Park, S.-Y., & J., Z. (2013). An Overview of Genetic Transformation of Soybean. *A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*. <https://doi.org/10.5772/51076>
- Lee, K., Yi, B. Y., Kim, K. H., Kim, J. B., Suh, S. C., Woo, H. J., ... Kweon, S. J. (2011). Development of efficient transformation protocol for soybean (*Glycine max* L.) and characterization of transgene expression after *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 54(1), 37–45. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2011.005>
- Lee, T., Tran, A., & Hansen, A. (2016). Major factors affecting global soybean and products trade projections.
- Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., ... Li, Y. (2017). Optimization of *agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00246>
- Li, W., Ning, H., Lv, W., & Li, W. (2008). Optimization of the *agrobacterium*_mediated transformation systems of soybean cotyledonary node. *Science Agriculture*, 41, 971–977.
- Li, Y. H., Li, W., Zhang, C., Yang, L., Chang, R. Z., Gaut, B. S., & Qiu, L. J. (2010). Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci. *New Phytologist*, 188(1), 242–253. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03344.x>
- Ma, X. H., & Wu, T. L. (2008). Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0109-3>

- Meyer, J. J., Horak, M., Rosenbaum, E., & Schneider, R. (2006). *Petition for the Determination of Nonregulated Status for Roundup RReady2Yield Soybean MON 89788*. Sainit Louis. Retrieved from http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs2/06_17801p_com.pdf
- Miki, B., & McHugh, S. (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 193–232. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.011>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *Soya. Direccion de cadenas agricolas y forestales. Nutrition & Food Science*. <https://doi.org/10.1108/nfs.2012.01742eaa.013>
- Olhoft, P. M., & Somers, D. A. (2001). L-Cysteine increases Agrobacterium-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20(8), 706–711. <https://doi.org/10.1007/s002990100379>
- Paes de Melo, B., Lourenço-Tessutti, I. T., Morgante, C. V., Santos, N. C., Pinheiro, L. B., de Jesus Lins, C. B., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2020). Soybean Embryonic Axis Transformation: Combining Biolistic and Agrobacterium-Mediated Protocols to Overcome Typical Complications of *In Vitro* Plant Regeneration. *Frontiers in Plant Science*, 11(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01228>
- Pareddy, D., Chennareddy, S., Anthony, G., Sardesai, N., Mall, T., Minnicks, T., ... Sarria, R. (2020). Improved soybean transformation for efficient and high throughput transgenic production. *Transgenic Research*, 29(3), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00198-8>
- Parrott, W. A., Hoffman, L. M., Hildebrand, D. F., Williams, E. G., & Collins, G. B. (1989). Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Reports*, 7, 615–617.
- Paz, M. M., Martinez, J. C., Kalvig, A. B., Fonger, T. M., & Wang, K. (2006). Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports*, 25(3), 206–213.

- <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0048-7>
- Paz, M. M., Shou, H., Guo, Z., Zhang, Z., Banerjee, A. K., & Wang, K. (2004). Assessment of conditions affecting. *Transformation*, 167–179.
- Qiu, L. J., Xing, L. L., Guo, Y., Wang, J., Jackson, S. A., & Chang, R. Z. (2013). A platform for soybean molecular breeding: The utilization of core collections for food security. *Plant Molecular Biology*, 83(1–2), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0076-6>
- Raza, G., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2017). *In Vitro* Plant Regeneration from Commercial Cultivars of Soybean. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7379693>
- Raza, G., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2020). Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars. *Plants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010038>
- Reddy, M. S. S., Dinkins, R. D., & Collins, G. B. (2003). Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 21(7), 676–683. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0567-4>
- Reichert, N. A., Young, M. M., & Woods, A. (2003). Adventitious organogenic regeneration from soybean genotypes representing nine maturity groups. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 273–277.
- Ribichich Karina F. Mariana Chiozza, Selva Ávalos-Britez, Julieta V. Cabello, Augustin L. Arce, Geronimo Watson, Claudia Arias , Margarita Portapila , Federico Trucco , Maria E. Otegui and Raquel L. Chan. Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 71, No. 10 pp. 3142–3156, 2020 [doi:10.1093/jxb/eraa064](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa064).
- Ridner, E. (2006). *Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. Chemistry &*
- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Koehler, A. D., & Otoni, W. C. (2018). Cellular and

- Morpho-histological Foundations of *In Vitro* Plant Regeneration. *Methods in Molecular Biology*, 1815, 47–68. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_3
- Rodriguez, Y. (2017). Evaluación de dos estrategias de selección *in vitro* con glifosato en un sistema de transformación genética de variedades colombianas de soya (*Glycine Max*). Universidad INCCA de Colombia.
- Rojas Arias, A. C., Palacio, J. L., Chaparro-Giraldo, A., and López Pazos, S. A. (2017). Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance. *World Patent Inform.* 48, 47–51. doi: 10.1016/j.wpi. 2017.01.002
- Rojas, A., Lopez Pazos, S., & Chaparro Giraldo, A. (2018). Screening of colombian soybean genotypes for agrobacterium mediated genetic transformation conferring tolerance to glyphosate. *Agronomia Colombiana*, 36(1), 24–34. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v36n1.67440>
- Rose, R. J. (2019). Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: Cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 10(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00267>
- Rüdelsheim, P., Dumont, P., Freyssinet, G., Pertry, I., & Heijde, M. (2018). Off-Patent Transgenic Events: Challenges and Opportunities for New Actors and Markets in Agriculture. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 71. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00071>
- Salammal, T., Ramesh, V., Jiang, S.-Y., Ganapathi, A., & Ramachandr, S. (2013). *In vitro* Regeneration and Genetic Transformation of Soybean: Current Status and Future Prospects. *A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*. <https://doi.org/10.5772/54268>
- Siehl Daniel L, Yumin Tao , Henrik Albert , Yuxia Dong , Matthew Heckert , Alfredo Madrigal , Brishette Lincoln-Cabatu , Jian Lu , Tamara Fenwick , Ericka Bermudez , Marian Sandoval , Caroline Horn , Jerry M Green , Theresa Hale , Peggy Pagano , Jenna Clark , Ingrid A

- Udranszky , Nancy Rizzo , Timothy Bourett , Richard J Howard , David H Johnson , Mark Vogt , Goke Akinsola , Linda Castle. Broad 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide tolerance in soybean with an optimized enzyme and expression cassette. *Plant Physiol.* 2014 Nov;166(3):1162-76. doi: 10.1104/pp.114.247205
- Shou, H., Frame, B. R., Whitham, S. A., & Wang, K. (2004). Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*, 13(2), 201–208. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000018767.64586.53>
- Somers, D. A., Samac, D. A., & Olhoft, P. M. (2003). Recent advances in legume transformation. *Plant Physiology*, 131(3), 892–899. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017681>
- Song, Z. yue, Tian, J. luan, Fu, W. zhe, Li, L., Lu, L. hong, Zhou, L., ... Shou, H. xia. (2013). Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14(4), 289–298. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200278>
- Soto, N., Delgado, C., Hernández, Y., Rosabal, Y., Ferreira, A., Pujol, M., ... Enríquez, G. A. (2017). Efficient particle bombardment-mediated transformation of Cuban soybean (INCASoy-36) using glyphosate as a selective agent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(1), 187–196. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1099-x>
- Soto, N., Ferreira, A., Delgado, C., & Enríquez, G. a. (2016). *In vitro* regeneration of soybean plants of the Cuban Incasoy-36 variety. *Biotechnologia Aplicada*, 30(1), 34–38.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). GROWTH AND ORGANIZED DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cell. *American Journal of Botany*, 45(10), 705–708. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x>
- Sugiyama, M. (2002). Organogenesis *in vitro*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*.

- Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 47(12 Suppl), 1587–1592.
- Sundar, I. K., & Sakthivel, N. (2008). Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Journal of Plant Physiology*, 165(16), 1698–1716. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.08.002>
- Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W., & Harwood, W. A. (2005). A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23(12), 780–789. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0892-x>
- Valencia R., R., Carmen C, H., Vargas, H., & Arrieta, G. (2006). Variedades mejoradas de soya para zonas productoras actuales y potenciales de Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4(2–3), 7–15.
- Valencia R., R., & Ligarreto M., G. (2010). Soybean breeding (*Glycine max* [L.] Merrill) for the Colombian Altillanura: a prospective and conceptual view. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 155–163.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Yang, S., Hu, Y., Cheng, Z., Rice, J. H., Miao, L., Ma, J., ... Gai, J. (2019). An efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation method using green fluorescent protein as a selectable marker. *Plant Signaling and Behavior*, 14(7), 1–7. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1612682>
- Zeng, P., Vadnais, D. A., Zhang, Z., & Polacco, J. C. (2004). Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0712-8>