

AN EFFICIENT AGROBACTERIUM-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM IN LENTIL (*Lens culinaris* MEDIK)

UN SISTEMA EFICIENTE DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN LENTEJA (*Lens culinaris* MEDIK) MEDIADO POR AGROBACTERIUM

Carolina Bermejo^{1,3*}, Gustavo Rodríguez^{1,2}, Ileana Gatti³, Enrique Cointry^{1,3}

¹Research Institute of Agricultural Sciences of Rosario, National Scientific and Technical Research Council (IICAR-CONICET), Faculty of Agricultural Sciences, National University of Rosario (UNR), CC 14, S2125ZAA, Zavalla, Argentina. ²Department of Genetics, Faculty of Agricultural Sciences, UNR, CC 14, S2125ZAA, Zavalla, Santa Fe, Argentina. ³Department of Plant Breeding and Seed Production, Faculty of Agricultural Sciences, UNR, CC 14, S2125ZAA, Zavalla, Santa Fe, Argentina. (bermejo@iicar-conicet.gob.ar).

ABSTRACT

Up to date, the transformation frequency in lentil (*Lens culinaris* Medik) is low. Therefore, the main objective of this study was to optimize an *in vitro* regeneration system compatible with an *Agrobacterium*-mediated transformation and to establish the best antibiotic concentration to allow the selection of transformed plants, to develop transgenic lentil plants with higher efficiency. Cotyledonary node explants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV2260 harboring binary vector pBI₁₂₁ with neomycin phosphotransferase (*npt-II*) and β -glucuronidase (*gus*) genes. A 50 mg L⁻¹ kanamycin continuous selection regime was efficient for transformants development as did not affect shoots and roots regeneration in most explants and no escape was observed. Stable integration and expression of transgenes in lentil genome were confirmed by PCR analysis and histochemical assay for β -glucuronidase (GUS) enzymatic activity. Wounding of explants, use of an optimized *in vitro* regeneration protocol, application of high acetosyringone concentration and bacterial density were important to achieve high transformation frequency. Transgenic lentil shoots were produced with an overall frequency of 7%.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, cotyledonary node, *Lens culinaris* Medik, stable transformation.

INTRODUCTION

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is a self-pollinating diploid ($2n=2\times=14$) species belonging to the *Fabaceae* Family. It is one of the oldest crops

* Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: April, 2018. Approved: January, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 741-755. 2019.

RESUMEN

Hasta la fecha, la frecuencia de transformación en lenteja (*Lens culinaris* Medik) es baja. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue optimizar un sistema de regeneración *in vitro* compatible con una transformación mediada por *Agrobacterium* y establecer la mejor concentración de antibióticos que permita la selección de plantas transformadas, para desarrollar plantas de lentejas transgénicas con mayor eficiencia. Los explantes de nudos cotiledonales se transformaron con la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el vector binario pBI₁₂₁ con genes de neomicina fosfotransferasa (*npt-II*) y β -glucuronidasa (*gus*). Un régimen de selección continua con 50 mg L⁻¹ de kanamicina fue eficaz para el desarrollo de transformantes, ya que no afectó la regeneración de tallos y raíces en la mayoría de los explantes y no se observaron emisiones. La integración y expresión estable de los transgenes en el genoma de lenteja se confirmaron mediante análisis de PCR y ensayo histoquímico para la actividad enzimática de la β -glucuronidasa (GUS). La herida de los explantes, el uso de un protocolo de regeneración *in vitro* optimizado, la aplicación de una alta concentración de acetosiringona y la densidad bacteriana fueron importantes para lograr una alta frecuencia de transformación. Los tallos de lenteja transgénicos se produjeron con una frecuencia global del 7%.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, nudo cotiledonar, *Lens culinaris* Medik, transformación estable.

INTRODUCCIÓN

La lenteja (*Lens culinaris* Medik.) es una especie diploide ($2n=2\times=14$), autógama que pertenece a la familia *Fabaceae*. Es uno de los cultivos más antiguos conocidos, con 8000 a 9000

known, with 8000 to 9000 years of history (Zohary, 1972). Canada is the main producer (1 987 000 Mg year⁻¹), followed by India (1 100 000 Mg year⁻¹), Australia (348 080 Mg year⁻¹) and Turkey (345 000 Mg year⁻¹) (FAOSTAT, 2014).

Main concern with lentil is the narrow genetic base of most of the varieties, which can lead to crop vulnerability due to pest and disease epidemics and unpredictable climatic factors (Bermejo *et al.*, 2014). Therefore, there is an immediate need to broaden the genetic base of lentil through introgression of new genes from exotic germplasm (Crippa *et al.*, 2009; Prabisha *et al.*, 2017). An alternative approach for the improvement of this crop is to complement traditional breeding methods with biotechnology techniques such as transgenesis. Genetic transformation protocols enable the transfer of desirable genes from one species to another, overcoming crossing barriers between species or genus and enhancing the chances to obtain breeding progress in such species. With this technique, the inheritance of undesirable genes linked to the desirable gene can be avoided, and there is no need to perform repeated crossings with elite parents, reducing the time consumed considerably. Transgenesis has become a reality for many pulse crops (Chandra and Pental, 2003) although in some cases the recovery of transgenic lines is low (<3%). The success in routine transformation protocols is limited in most grain legumes due to poor *in vitro* regeneration ability and lack of compatible gene delivery methods (Mello-Farias and Chaves, 2008). *Agrobacterium*-mediated plant transformation is the most successful and widely used method in some pulse crops: soybean (Tóth *et al.*, 2016), chickpea (Pathak and Hamzah, 2008; Indurker *et al.*, 2010), and pea (Svabova *et al.*, 2008; Negawo *et al.*, 2013). Lentil, despite being a dicotyledonous plant with a proven susceptibility to many strains of this bacterium, the transformation is difficult (Sarker *et al.* 2019).

Compared to other grain legumes, genetic transformation studies in lentil are limited (Popelka *et al.*, 2004). Transient expressions of β -glucuronidase (*gus*) gene were reported in a variety of lentil tissues (Warkentin and McHughen, 1992; Mahmoudian *et al.*, 2002a; Hassan *et al.*, 2007) using *Agrobacterium* and particle bombardment mediated transformation systems. Although stable *Agrobacterium*-mediated transformation was reported in lentil, the obtained transformation efficiencies were low varying from

años de historia (Zohary, 1972). Canadá es el principal productor (1 987 000 Mg año⁻¹), seguido de India (1 100 000 Mg año⁻¹), Australia (348 080 Mg año⁻¹) y Turquía (345 000 Mg año⁻¹) (FAOSTAT, 2014).

La principal preocupación con la lenteja es la estrecha base genética de la mayoría de las variedades, que puede llevar a la vulnerabilidad de los cultivos debido a las epidemias de plagas y enfermedades y a factores climáticos impredecibles (Bermejo *et al.*, 2014). Por lo tanto, existe una necesidad inmediata de ampliar la base genética de la lenteja a través de la introgresión de nuevos genes a partir de germoplasma exótico (Crippa *et al.*, 2009; Prabisha *et al.*, 2017). Un enfoque alternativo para la mejora de este cultivo es complementar los métodos tradicionales de mejora con técnicas biotecnológicas, como la transgénesis. Los protocolos de transformación genética permiten la transferencia de genes deseables de una especie a otra, superando las barreras de cruzamiento entre especies o géneros y aumentando la probabilidad de obtener progreso genético en estas especies. Con esta técnica se puede evitar la herencia de genes indeseables ligados al gen de interés, y no es necesario realizar cruzamientos repetidos con padres *elites*, lo que reduce considerablemente el tiempo consumido. La transgénesis se ha convertido en una realidad para muchas legumbres (Chandra y Pental, 2003), aunque en algunos casos la recuperación de líneas transgénicas es baja (<3%). El éxito en los protocolos de transformación de rutina está limitado en la mayoría de las leguminosas de grano debido a la capacidad baja de regeneración *in vitro* y la falta de métodos de transferencia de genes compatibles (Mello-Farias y Chaves, 2008). La transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* es el método más exitoso y ampliamente utilizado en algunas leguminosas de grano: soja (Tóth *et al.*, 2016), garbanzo (Pathak y Hamzah, 2008; Indurker *et al.*, 2010) y chícharo (Svabova *et al.*, 2008; Negawo *et al.*, 2013). La transformación en lenteja es difícil a pesar de ser una planta dicotiledónea con susceptibilidad a muchas cepas de esta bacteria (Sarker *et al.* 2019).

En comparación con otras leguminosas de grano, los estudios de transformación genética en lentejas son limitados (Popelka *et al.*, 2004). Las expresiones transientes del gen *gus* se documentaron en una variedad de tejidos de lenteja (Warkentin y McHughen, 1992; Mahmoudian *et al.*, 2002a; Hassan *et al.*,

0.14% (Khatib *et al.*, 2011) to 2.3% (Akçay *et al.*, 2009) lentil (*Lens culinaris* M.). To improve transformation efficiency in lentil, more precise methods and compatible with an efficient *in vitro* regeneration system need to be developed. Therefore, the objective of this study was to optimize an *in vitro* regeneration system compatible with an *Agrobacterium*-mediated transformation and to establish the best antibiotic concentration to allow the selection of transformed plants, to develop transgenic lentil plants with higher efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The A1146 genotype of lentil was used because it showed the highest *in vitro* regeneration capacity between 10 elite genotypes of lentil from our breeding program (Bermejo *et al.*, 2012). Healthy seeds were surface sterilized with 70% ethanol for 2 s, then in 3.5% sodium hypochlorite for 15 min, and rinsed four times with sterile distilled water. The seeds were placed aseptically on half-strength MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing 1.5% sucrose and 0.45% agar in glass vial for germination at 23 ± 2 °C in the dark. Cotyledonary nodes were excised from 3-days-old seedlings by removing the shoot apex and root meristem to within 3-4 mm of the node and cotyledons to within 1 mm of the node.

Determination of the optimal kanamycin dose for selection of transgenic plants

Based on results reported by Bermejo *et al.* (2012), M0 and M1 media were chosen for rooting and shoot regeneration respectively. M0 medium contained MS medium salts with 3% sucrose and 0.8% agar, without growth regulators, and M1 medium consisted of the M0 medium supplemented with 1 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). Both media were adjusted to pH 5.8 prior to addition of agar and autoclaved at 121 °C for 20 min. Cotyledonary node explants were cultured in an inverted orientation by embedding the epicotyl end into M1 medium supplemented with eight concentrations of the antibiotic kanamycin (0, 25, 50, 70, 90, 100, 125 and 150 mg L⁻¹). During 17 d it was kept in a growth room at 23 ± 2 °C and a 16:8 h light regime (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from cool white fluorescent lamps); besides, antibiotic was added to the cooled media (40-50 °C) after autoclaving. Forty explants per kanamycin concentration on M1 medium were cultured individually in culture tubes and the experiment was repeated three times. The effect of kanamycin on shoot regeneration was evaluated. The percentage of surviving

2007) con el uso de sistemas de transformación mediados por *Agrobacterium* y bombardeo de partículas. Aunque la transformación estable mediada por *Agrobacterium* se registró en lentejas, las eficiencias de transformación obtenidas fueron bajas, variaron desde 0.14% (Khatib *et al.*, 2011) a 2.3% (Akçay *et al.*, 2009). Para mejorar la eficiencia de transformación en lentejas, se necesita desarrollar métodos más precisos y compatibles con un sistema de regeneración *in vitro* eficiente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue optimizar un sistema de regeneración *in vitro* compatible con una transformación mediada por *Agrobacterium* y establecer la mejor concentración de antibióticos para permitir la selección de plantas transformadas, para desarrollar con mayor eficiencia plantas de lentejas transgénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El genotipo de lenteja A1146 se utilizó porque demostró la mayor capacidad de regeneración *in vitro* entre 10 genotipos élite de nuestro programa de mejoramiento (Bermejo *et al.*, 2012). Las semillas sanas se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% durante 2 s, luego en hipoclorito de sodio al 3.5% durante 15 min, y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Para su germinación se colocaron en vasos de vidrio estériles con medio MS diluido (Murashige y Skoog, 1962) que contenía 1.5% de sacarosa y 0.45% de agar y se mantuvieron en oscuridad a 23 ± 2 °C. Los nudos cotiledonales se extrajeron de plántulas de 3 d de edad con la remoción de los ejes apicales y el meristemo radicular a 3 a 4 mm del nudo y los cotiledones a 1 mm del nudo.

Determinación de la dosis óptima de kanamicina para la selección de plantas transgénicas

Basado en los resultados reportados por Bermejo *et al.* (2012), se seleccionaron los medios M0 y M1 para el enraizamiento y la regeneración de tallos, respectivamente. El medio M0 se formuló con sales de medio MS con 3% de sacarosa y 0.8% de agar, sin reguladores de crecimiento, y el medio M1 consistió en el medio M0 y un suplemento con 1 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). Ambos medios se ajustaron a pH 5.8 antes de la adición de agar y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min. Los explantes de nudos cotiledonales se cultivaron con orientación invertida introduciendo el extremo del epicótilo en medio M1 y un suplemento con

explants (percentage of explants regenerating at least one green shoot in the presence of kanamycin) and the average number of shoots regenerated per explant were scored after 17 d of culture for every kanamycin concentration. Afterwards, in M1 medium all the surviving explants which regenerated green shoots were transferred with inverted orientation (apical end into the medium) to M0 medium to reduce the inhibition effect of BAP on root formation. This inverted orientation is opposite to the normal orientation (basal end into the medium). In M1 media with kanamycin concentrations $\geq 70 \text{ mg L}^{-1}$, in which the percentages of surviving explants were lower than 20%, all the surviving explants were transferred to M0 media without selection pressure to try to maintain the same percentage of surviving explants as M1 medium. On the contrary, in M1 media with kanamycin concentrations of 25 and 50 mg L^{-1} , in which the percentages of surviving explants were higher than 20%, half of the surviving explants were transferred to M0 without selection pressure and the other half were transferred to M0 supplemented with kanamycin maintaining the same concentration as M1 medium in order to reduce the number of surviving explants. The *in vitro* rooting of explants was evaluated and the percentages of surviving explants were recalculated after 35 d of culture in M0 medium.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized, data collected from all three repetitions were subjected to ANOVA and differences between the means were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$) using the Info-Gen software (Balzarini and Di Rienzo, 2003).

Bacterial strain and vector

The *Agrobacterium tumefaciens* strain GV2260 transformed with the binary plasmid vector pBI₁₂₁ (Jefferson *et al.*, 1987) containing the neomycin phosphotransferase (*npt-II*) and β -glucuronidase (*gus*) genes were used in this study.

Preparation of *Agrobacterium*

Three mL of liquid LB (Luria-Bertani) medium (Miller, 1972) containing 100 mg L^{-1} rifampicin, 50 mg L^{-1} ampicillin and 100 mg L^{-1} kanamycin were inoculated with a single colony of 3 mm in diameter from a fresh bacterial plate and grown at 150 rpm on a rotary shaker at 28 °C for 16 h. An aliquot of the saturated culture was taken to make 1:1000 dilutions in a final volume of 250 mL of the same medium and grown overnight to OD₆₀₀ of 0.6-0.7. The culture was centrifuged for 10 min at 5000 rpm, at

ocho concentraciones del antibiótico kanamicina (0, 25, 50, 70, 90, 100, 125 y 150 mg L^{-1}). Durante 17 d se mantuvo en una cámara de cultivo a $23 \pm 2 \text{ °C}$ y un régimen de luz de 16: 8 horas (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes blancas frías); además, luego de la esterilización se añadió antibiótico a los medios refrigerados (40-50 °C). Cuarenta explantes por concentración de kanamicina se cultivaron individualmente en tubos de cultivo con medio M1 y el experimento se repitió tres veces. El efecto de la kanamicina se evaluó en la regeneración de tallos. El porcentaje de explantes supervivientes (porcentaje de explantes que regeneraron al menos un tallo verde en presencia de kanamicina) y el número promedio de tallos regenerados por explante se registraron después de 17 d de cultivo por cada concentración de kanamicina. Luego, todos los explantes supervivientes que regeneraron tallos verdes en el medio M1 se transfirieron al medio M0 con orientación invertida (extremo apical dentro del medio) para reducir el efecto de inhibición de BAP en la formación de la raíz. Esta orientación invertida es opuesta a la orientación normal (extremo basal dentro del medio). En medios M1 con concentraciones de kanamicina $\geq 70 \text{ mg L}^{-1}$, en los cuales los porcentajes de explantes supervivientes fueron inferiores al 20%, todos los explantes supervivientes se transfirieron a medios M0 sin presión de selección para tratar de mantener el mismo porcentaje de explantes supervivientes que en el medio M1. Por el contrario, en medios M1 con concentraciones de kanamicina de 25 y 50 mg L^{-1} , en los cuales los porcentajes de explantes supervivientes fueron superiores al 20%, la mitad de los explantes supervivientes se transfirieron a M0 sin presión de selección y la otra mitad se transfirió a M0 suplementado con kanamicina manteniendo la misma concentración que el medio M1 para reducir el número de explantes supervivientes. El enraizamiento *in vitro* de los explantes se evaluó y los porcentajes de los explantes supervivientes se recalcularon después de 35 d de cultivo en medio M0.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, los datos recopilados de las tres repeticiones se sometieron a ANDEVA y las diferencias entre los valores promedio se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el software Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2003).

Cepa bacteriana y vector

En este estudio se utilizó la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el vector plásmido binario pBI₁₂₁ (Jefferson *et al.*, 1987) que contenía los genes de la neomicina fosfotransferasa (*npt-II*) y la β -glucuronidasa (*gus*).

4 °C. The pellet was resuspended in MS medium containing 2% sucrose and 200 mM acetosyringone (pH=5.8) to a final OD₆₀₀ of two. Finally, the *Agrobacterium* suspension was kept at 25 °C for 1 h and then used for transformation of cotyledonary node explants.

Transformation of cotyledonary node explants

One hundred cotyledonary nodes of A1146 genotype were extracted and the petiole axils were wounded six to eight times using a sterile needle. The explants were immersed in 10 mL of the bacterial suspension aforementioned in sterile glass Petri dishes and incubated for 30 min and manual agitation during 10 min. Each Petri dish contained 20 explants. They were blotted dry on a sterilized filter paper, transferred with inverted orientation to M1 shoot regeneration medium and kept in a growth room at 23±2 °C in the dark for 4 d (co-culture period). Afterwards, all the regenerated shoots were completely removed with scalpel to eliminate escape shoots and allow new putative transgenic shoots to emerge. The explants were washed for 1 h in sterile distilled water supplemented with 400 mg L⁻¹ cefotaxime for elimination of *Agrobacterium tumefaciens* and then cultured with inverted orientation in M1 shoot regeneration medium containing 200 mg L⁻¹ cefotaxime and 50 mg L⁻¹ kanamycin as selection agent. After 17 d of culture, the explants were subcultured in M0 medium containing 200 mg L⁻¹ cefotaxime and 50 mg L⁻¹ kanamycin for shoot elongation and rooting. After 15 d of culture in this medium, histochemical GUS assay and detection of *npt-II* gene by PCR analysis were performed.

Histochemical GUS assay

Leaf tissues from non-transgenic and putative transgenic shoots were immersed in the GUS staining solution consisting of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM potassium ferrocyanide, 10 mM EDTA, and 0.5 mg mL⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA) and incubated 3 d at 37 °C in the dark. After staining, the solution was discarded and the tissues were rinsed in 70% ethanol for 24 h to stop the reaction and extract chlorophyll. They were then washed with distilled water and visualized with a 6.5x magnification lens (Leica).

Detection of *npt-II* gene in transgenic plants by Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis

Total genomic DNA was extracted from four leaves of putative transgenic and non-transformed shoots by using the CTAB method according to Doyle and Doyle (1990). The DNA

Preparación de *Agrobacterium*

Tres mL de medio LB (Luria-Bertani) líquido (Miller, 1972) que tenían 100 mg L⁻¹ de rifampicina, 50 mg L⁻¹ de ampicilina y 100 mg L⁻¹ de kanamicina se inocularon con una única colonia de 3 mm de diámetro proveniente de una placa bacteriana fresca y cultivada a 150 rpm en un agitador rotativo a 28 °C durante 16 h. Una alícuota del cultivo saturado se tomó para realizar diluciones 1: 1000 en un volumen final de 250 mL del mismo medio y se cultivó toda la noche hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6-0.7. El cultivo se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm, a 4 °C. El sedimento se resuspendió en medio MS que contenía 2% de sacarosa y 200 mM de acetosiringona (pH=5.8) y se ajustó la DO a un valor de 2. Finalmente, la suspensión de *Agrobacterium* se mantuvo a 25 °C durante 1 h y luego se usó para la transformación de explantes de nudos cotiledonales.

Transformación de explantes de nudos cotiledonales

Cien nudos cotiledonales se extrajeron del genotipo A1146 y las axilas del pecíolo se perforaron de seis a ocho veces con una aguja estéril. Los explantes se sumergieron en 10 mL de la suspensión bacteriana mencionada anteriormente en placas de Petri de vidrio estériles, se incubaron durante 30 minutos y se agitaron manualmente durante 10 min. Cada placa de Petri contenía 20 explantes. Estas se secaron en un papel de filtro esterilizado, se transfirieron con orientación invertida al medio de regeneración de tallos M1 y se mantuvieron en una cámara de cultivo a 23±2 °C en la oscuridad durante 4 d (período de co-cultivo). Después, todos los tallos regenerados se eliminaron completamente con bisturí para eliminar la emisión de yemas y permitir la aparición de nuevos tallos transgénicos putativos. Los explantes se lavaron durante 1 h en agua destilada estéril y un suplemento con 400 mg L⁻¹ de cefotaxima para la eliminación de *Agrobacterium tumefaciens* y luego se cultivaron con orientación invertida en medio de regeneración de tallos M1 que contenía 200 mg L⁻¹ de cefotaxima y 50 mg L⁻¹ de kanamicina como agentes de selección. Después de 17 d de cultivo, los explantes se subcultivaron en medio M0 que contenía 200 mg L⁻¹ de cefotaxima y 50 mg L⁻¹ de kanamicina para el alargamiento y enraizamiento de los tallos. Después de 15 d de cultivo en este medio, se realizó el ensayo histoquímico de GUS y la detección del gen *npt-II* mediante análisis por PCR.

Prueba histoquímica de GUS

Tejidos foliares provenientes de tallos no transgénicos y de tallos putativamente transgénicos se sumergieron en la solución de tinción GUS que consistió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.0), ferrocianuro de potasio 0.5 mM,

concentration was quantified comparing the bands intensity with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ lambda phage DNA on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The presence of *npt-II* gene in the genomic DNA of putative transformed shoots was tested by PCR analysis. *npt-II* gene specific primers (Forward: 5'-gaggctattcgctatgactg-3' and Reverse: 5'-atcgggagcggcgataaccgta-3'), designed by Akcay *et al.* (2009), were used for PCR. The primers amplify the entire *npt-II* gene with 700 base pairs. The amplification reaction was performed using a MyCycler™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) DNA Thermal Cycler. DNA was amplified under the following cycle conditions using hot start: 94 °C for 5 min (denaturation), then 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, followed by an elongation step of 72 °C for 10 min. The final PCR reaction volume was 20 mL containing 1×PCR buffer *Taq*, 0.6 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM of each primer, 50 ng genomic DNA and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Genomic DNA from non-transformed plants and water in place of template DNA were included as negative controls. DNA from *A. tumefaciens* strain GV2260 carrying pBI₁₂₁ plasmid was used as positive control. This control was prepared taking an isolated bacterial colony and immersing it in 30 mL of sterile distilled water. The *Agrobacterium* suspension was incubated at 98 °C for 5 min and then centrifuged at 10 000 rpm for 4 min. Five mL of supernatant were used as template DNA in the PCR reaction. The amplified products were electrophoresed on 2% agarose gel containing 0.0075% SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The electrophoretic run was performed at 60 V for the first 30 min and then continued at 80 V for 60 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of the optimal kanamycin dose for selection of transgenic plants

In order to identify transgenic plants, the *npt-II* selection marker gene was used. Non-transformed cells, lacking the *npt-II* gene, are sensitive and die in the presence of the selection agent. However, large explants or non-transformed cell groups can often survive under selective conditions for long periods leading to very high frequencies of escapes (false positives). False positives refer to the explants grow in the presence of kanamycin but lacking the *npt-II* gene. This problem may be due to cross protection of untransformed tissue regions detoxified by the transformed cells (Christou *et al.*, 1992). To minimize the frequency of escapes it is necessary to perform tolerance curves to selective agents in order to know

EDTA 10 mM y 0.5 mg mL^{-1} de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo- β -D-glucurónido (X-GLUC) (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, EUA) e incubaron 3 d a 37 °C en la oscuridad. Luego de la tinción, la solución se descartó y los tejidos se enjuagaron en etanol al 70% durante 24 h para detener la reacción y extraer la clorofila. Los tejidos se lavaron en agua destilada y se visualizaron con lente de aumento (Leica) con magnificación de 6.5x.

Detección del gen *npt-II* en plantas transgénicas por análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico total se extrajo de cuatro hojas de tallos potencialmente transgénicos y de tallos no transformados con el uso del método CTAB de acuerdo con Doyle y Doyle (1990). La concentración de ADN se cuantificó comparando la intensidad de las bandas con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN del fago lambda en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La presencia del gen *npt-II* en el ADN genómico de tallos putativos transformados se demostró mediante análisis por PCR. Iniciadores específicos del gen *npt-II* (Progresivo: 5'-gaggctattcgctatgactg-3' y regresivo: 5'-atcgggagcggcgataaccgta-3'), diseñados por Akcay *et al.* (2009), se utilizaron para la PCR. Estos iniciadores amplifican el gen *npt-II* entero con 700 pares de bases. La reacción de amplificación se realizó utilizando un termociclador de ADN MyCycler™ (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA). El ADN se amplificó siguiendo las siguientes condiciones de ciclado utilizando el arranque en caliente: 94 °C durante 5 min (desnaturalización), luego 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min, seguido por un paso de elongación de 72 °C durante 10 min. El volumen final de la reacción de PCR fue de 20 mL conteniendo 1×de solución amortiguadora *Taq*, 0.6 mM de cada dNTP, 2.5 mM de MgCl_2 , 0.5 mM de cada iniciador, 50 ng de ADN genómico y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, EUA). El ADN genómico de plantas no transformadas y agua en lugar del molde de ADN se incluyeron como testigos negativos. El ADN de la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* que contiene el plásmido pBI₁₂₁ se usó como testigo positivo. Este testigo se preparó tomando una colonia bacteriana aislada y sumergiéndola en 30 mL de agua destilada estéril. La suspensión de *Agrobacterium* se incubó a 98 °C durante 5 min y luego se centrifugó a 10 000 rpm durante 4 min. Cinco mL de sobrenadante se usaron como molde de ADN en la reacción de PCR. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% que contenía 0.0075% de colorante de geles para visualización de ADN, SYBR® *Safe* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). La corrida electroforética se realizó a 60 V durante los primeros 30 min y luego continuó a 80 V por 60 min.

the minimum concentration of selective agent that causes the death of 80-90% of the cultured tissues, *i.e.* the antibiotic concentration allowing 10-20% of escapes. According to Brasileiro (1998), a tolerance curve with kanamycin doses varying between 25 and 300 mg L⁻¹ should be performed since most of the plant species are sensitive to this range. In our study, to define the optimal dose of kanamycin different antibiotic concentrations (25 to 150 mg L⁻¹) on *in vitro* regeneration media were tested. All the explants regenerated one or two green shoots per explant after 3 d of culture in M1 medium. There were no differences between the control medium (without kanamycin) and media with antibiotic, indicating that the shoot regeneration is not delayed and starts normally in presence of kanamycin. The toxic effect of the antibiotic on the explants began with chlorosis in some explants and shoots after 7 d of culture in selective media for all kanamycin concentrations assayed (Figure 1A), whereas in the control medium all the explants and shoots remained of green color (Figure 1B). This was as expected because kanamycin inhibits chlorophyll synthesis (Lu *et al.*, 2017). At 17 d of culture, with the increase of kanamycin concentration in the M1 medium, the percentage of surviving explants decreased and the explants were unable to survive to a 150 mg L⁻¹ selection pressure (Table 1).

The ANOVA showed significant differences between the kanamycin concentration assayed for M1 medium (F=50.7; p≤0.0001) and M0 medium (F=83.4; p≤0.0001). Kanamycin doses of 50 and 70 mg L⁻¹ produced an acceptable level of escapes, 20% and 10% respectively (Table 1). Regarding to surviving explants, the number of shoots regenerated per explant and *in vitro* rooting were affected by the concentration of the selective agent. Six to eight green shoots/explant were regenerated in the control medium and in M1 media containing 25 and 50 mg L⁻¹ kanamycin (Figure 1C-E). When the explants were subcultured in M0 medium maintaining the same kanamycin concentration, they were also able to root (Figure 1H). These treatments gave high rooting percentages around 70%. When kanamycin doses higher than 70 and 100 mg L⁻¹ were used in M1, the number of regenerated shoots decreased to two-four shoots/explant and two-three shoots/explant, respectively (Figure 1F, G) and all the explants lost the rooting ability in the M0 rooting medium despite the

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la dosis óptima de kanamicina para la selección de plantas transgénicas

Para identificar las plantas transgénicas, se usó el gen marcador de selección *npt-II*. Las células no transformadas, que carecen del gen *npt-II*, son sensibles y mueren en presencia del agente de selección. Sin embargo, explantes grandes o grupos celulares no transformados con frecuencia pueden sobrevivir en condiciones selectivas durante largos periodos conduciendo a frecuencias muy altas de emisiones (falsos positivos). Los falsos positivos se refieren a los explantes que crecen en presencia de kanamicina pero que carecen del gen *npt-II*. Este problema puede deberse a la protección cruzada de regiones no transformadas del tejido detoxificadas por las células transformadas (Christou *et al.*, 1992). Para minimizar la frecuencia de emisiones, es necesario realizar curvas de tolerancia a agentes selectivos para conocer la concentración mínima que causa la muerte del 80-90% de los tejidos cultivados, es decir, la concentración de antibióticos que permite el 10-20% de emisiones. Según Brasileiro (1998), se debe realizar una curva de tolerancia con dosis de kanamicina que varían entre 25 y 300 mg L⁻¹ ya que la mayoría de las especies de plantas son sensibles en este intervalo. En nuestro estudio, para definir la dosis óptima de kanamicina se probaron diferentes concentraciones de antibióticos (25 a 150 mg L⁻¹) en medios de regeneración *in vitro*. Todos los explantes regeneraron uno o dos tallos verdes por explante después de 3 d de cultivo en medio M1. No hubo diferencias entre el medio testigo (sin kanamicina) y el medio con antibióticos, lo que indica que la regeneración de tallos no se retrasa y comienza normalmente en presencia de kanamicina. El efecto tóxico del antibiótico sobre los explantes comenzó con clorosis en algunos explantes y tallos después de 7 d de cultivo en medios selectivos para todas las concentraciones de kanamicina probadas (Figura 1A), mientras que en el medio control todos los explantes y tallos permanecieron de color verde (Figura 1B). Esto fue lo esperado ya que la kanamicina inhibe la síntesis de clorofila (Lu *et al.*, 2017). A los 17 d de cultivo, con el aumento de la concentración de kanamicina en el medio M1, el porcentaje de explantes supervivientes disminuyó y los explantes no pudieron sobrevivir a una presión de selección de 150 mg L⁻¹ (Cuadro 1).

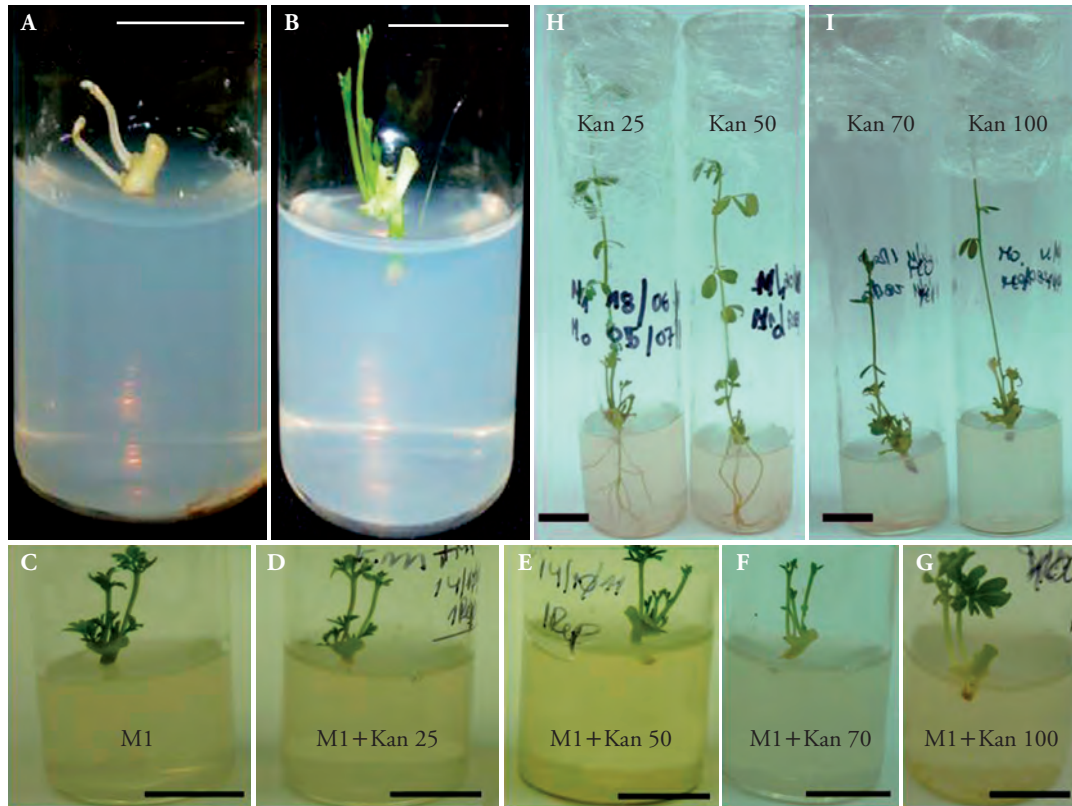


Figure 1. Effect of kanamycin (Kan) on shoot and root regeneration in cotyledonary node explants. A) Regenerating chlorotic shoots from explant cultured in M1 medium with 100 mg L⁻¹ kanamycin at 7 d of culture. B) Regenerating green shoots from explant cultured in control M1 medium (without kanamycin) at 7 d of culture. C-G) Number of shoots regenerated per cotyledonary node explant after 17 d of culture in MS medium containing 1 mg L⁻¹ BAP (M1) + different kanamycin concentrations (mg L⁻¹). H) *In vitro* rooting from explants cultured in M1 medium with 25 and 50 mg L⁻¹ kanamycin and then subcultured in M0 medium with 25 and 50 mg L⁻¹ kanamycin respectively. I) Loss of the *in vitro* rooting capability from explants cultured in M1 medium with 70 and 100 mg L⁻¹ kanamycin and then subcultured in M0 medium without kanamycin. (bar=1 cm).

Figura 1. Efecto de la kanamicina (Kan) sobre la regeneración de tallos y raíces en los explantes de nudos cotiledonales. A) Tallos cloróticos regenerados a partir de explantes cultivados en medio M1 con 100 mg L⁻¹ de kanamicina a los 7 d de cultivo. B) Tallos verdes regenerados a partir de explantes cultivados en medio M1 control (sin kanamicina) a los 7 d de cultivo. C-G) Número de tallos regenerados por nudo cotiledonal después de 17 d de cultivo en medio MS conteniendo 1 mg L⁻¹ de BAP (M1) + diferentes concentraciones de kanamicina (mg L⁻¹). H) Enraizamiento *in vitro* a partir de explantes cultivados en medio M1 con 25 y 50 mg L⁻¹ de kanamicina y luego subcultivados en medio M0 con 25 y 50 mg L⁻¹ de kanamicina respectivamente. I) Pérdida de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de explantes cultivados en medio M1 con 70 y 100 mg L⁻¹ de kanamicina y luego subcultivados en medio M0 sin kanamicina. (bar=1 cm).

absence of selection pressure (Figure 1I). The optimal dose chosen for use in the subsequent selection of transgenic shoots was 50 mg L⁻¹ because it did not affect the regeneration of shoots and allowed rooting in most explants (Figure 1E, H).

A novelty of our study is the culture of cotyledonary node explants of lentil in an inverted orientation for both shoot regeneration and rooting. The higher shoot regeneration capability (six-eight shoots per explant)

El ANDEVA mostró diferencias significativas entre la concentración de kanamicina probada en el medio M1 (F=50.7; p≤0.0001) y el medio M0 (F=83.4; p≤0.0001). Las dosis de kanamicina de 50 y 70 mg L⁻¹ produjeron un nivel aceptable de emisiones, 20% y 10% respectivamente (Cuadro 1). Con respecto a los explantes supervivientes, la concentración del agente de selección afectó el número de tallos regenerados por explante y el enraizamiento

Table 1. Effect of kanamycin (Kan) concentrations (Kan 0, 25, 50, 70, 90, 100, 125, 150 mg L⁻¹) on the percentage of surviving cotyledonary node explants after 17 d of culture in MS medium containing 1 mg L⁻¹ BAP (M1) and after 35 d of subculture in MS medium without BAP (M0).**Cuadro 1.** Efecto de las concentraciones de kanamicina (Kan) (Kan 0, 25, 50, 70, 90, 100, 125, 150 mg L⁻¹) sobre el porcentaje de explantes de nudos cotiledonales supervivientes luego de 17 d de cultivo en medio MS conteniendo 1 mg L⁻¹ BAP (M1) y luego de 35 d de subcultivo en medio MS sin BAP (M0).

| M1 medium (mg L ⁻¹) | M0 medium (mg L ⁻¹) | Surviving explants in M1 medium (%) | Surviving explants in M0 medium (%) |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| Kan 0 | Kan 0 | 100.00±0.00 ^f | 100.00±0.00 ^f |
| Kan 25 | Kan 0 / Kan 25 | 78.33±2.20 ^e | 78.33±2.20 ^e / 78.33±2.20 ^e |
| Kan 50 | Kan 0 / Kan 50 | 50.83±3.00 ^d | 50.83±3.00 ^d / 19.70±0.30 ^c |
| Kan 70 | Kan 0 | 20.00±1.44 ^c | 10.00±0.00 ^b |
| Kan 90 | Kan 0 | 10.83±0.83 ^b | 8.47±0.77 ^b |
| Kan 100 | Kan 0 | 7.70±0.00 ^{ab} | 4.17±0.83 ^{ab} |
| Kan 125 | Kan 0 | 4.17±0.83 ^{ab} | 0.00±0.00 ^a |
| Kan 150 | Kan 0 | 0.00±0.00 ^a | 0.00±0.00 ^a |

Means ± SEM of three replicates, *n*=40. Mean values with different letters in a column are significantly different (Tukey; *p*≤0.05).❖ Valores promedios ± Desviación estándar de tres repeticiones, *n*=40. Valores promedios con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (Tukey, *p*≤0.05).

from inverted cotyledonary nodes in our study contrasts with the number of shoots regenerated from axillary buds of inverted nodal segments (two-three shoots per explant) in other papers of lentil (Fratini and Ruiz, 2003).

The rooting of regenerated shoots is a very important step and it is often the bottleneck point for the regeneration of whole plants *in vitro* (Polanco and Ruiz, 2001). Traditional *in vitro* rooting studies focus on the application of phytohormones, especially auxins, in order to induce a rooting response. Zimmerman (1988) described roots grown with the basal end into the agar medium as inefficient, since they possess few or no root hairs and may have poor vascular connections. Newell *et al.* (2006) demonstrated that hypoxia, in agar-based media, compromises rooting *in vitro*. In our research the basal end of the explants was exposed to air by inverting cotyledonary nodes on M0 to provide greater aeration at the proximal end of the explants and then to obtain whole plants.

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation**

One hundred cotyledonary nodes were transformed by *Agrobacterium*. At 17 d of culture in M1 medium the number of putative transgenic explants was 14 regenerating six-eight shoots per explant. All explants

in vitro. Seis a ocho tallos / explantes verdes se regeneraron en el medio control y en medios M1 que contenían 25 y 50 mg L⁻¹ de kanamicina (Figura 1C-E). Cuando los explantes se subcultivaron en medio M0 con la misma concentración de kanamicina, también pudieron enraizar (Figura 1H). Estos tratamientos dieron porcentajes altos de enraizamiento alrededor del 70%. Cuando se utilizaron dosis de kanamicina superiores a 70 y 100 mg L⁻¹ en M1, el número de tallos regenerados disminuyó a dos-cuatro tallos / explante y dos-tres tallos / explante, respectivamente (Figura 1F, G) y todos los explantes perdieron la capacidad de enraizamiento en el medio M0 a pesar de la ausencia de presión de selección (Figura 1I). La dosis óptima elegida para su uso en la selección posterior de tallos transgénicos fue de 50 mg L⁻¹ porque no afectó la regeneración de tallos y permitió el enraizamiento en la mayoría de los explantes (Figura 1E, H).

Una novedad de nuestro estudio es el cultivo de nudos cotiledonales de lenteja en una orientación invertida para la regeneración de tallos y raíces. La mayor capacidad de regeneración de tallos (seis u ocho tallos por explante) a partir de los nudos cotiledonales invertidos en nuestro estudio contrasta con el número de tallos regenerados a partir de yemas axilares de segmentos nodales invertidos (dos o tres tallos por explante) documentados en otros artículos acerca de la especie (Fratini y Ruiz, 2003).

were transferred to selective medium without BAP (M0) to allow rooting. After 15 d of culture in M0 medium the number of potentially transformed explants remained at a value of 14.

Factors conditioning the success of *Agrobacterium*-mediated transformation are explant type, optical density of the bacterial suspension and inoculation and co-cultivation periods (Das *et al.*, 2012). Regarding explant type, it is important to ensure the compatibility between the used plant tissue and the *Agrobacterium* strain in order for the transfer of T-DNA and the posterior integration in the genome to happen. Besides, the DNA must be introduced in susceptible cells that can also regenerate shoots (Finer *et al.*, 1996). Cotyledonary node explant was suitable for lentil transformation because the axillary meristems showed *Agrobacterium* susceptibility and were capable to regenerate shoots with high transformation efficiency. Our results are consistent with those reported by Mahmoudian *et al.* (2002a) and Ackay *et al.* (2009), but other studies showed that cotyledonary nodes are incapable to regenerate transgenic shoots (Sarker *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2012). This can be due to different *vir* gene-inducing conditions used in the *Agrobacterium* preparation. Kapila *et al.* (1997) demonstrated that a strong bacterial induction before explant inoculation is important for the transgenesis success. In our protocol, a 200 mM concentration of acetosyringone showed to be enough to induce the *vir* genes and regenerate transgenic shoots from cotyledonary nodes. Another successfully factor in our trial could be the chosen *Agrobacterium* cell density ($OD_{600}=2$), which was higher than that reported by Ackay *et al.* (2009) and Das *et al.* (2012). A combination of strong *vir* gene-inducing conditions and a high bacterial cell density seem to be important in *Agrobacterium*-mediated transformation in lentil cotyledonary nodes (Mahmoudian *et al.*, 2002b).

An essential requirement for the production of transgenic plants from mature tissues such as cotyledonary node, is to apply an efficient treatment that causes tissue injury. Minor incisions in the explant before co-cultivation with the bacteria enable better penetration into tissue and possibly stimulate the production of potent inducers of *vir* genes (Stachel *et al.*, 1985). This implies the creation of new meristematic zones as response to damage. In order to obtain higher transformation efficiency, six to eight punctures with sterile needle were performed

El enraizamiento de los tallos regenerados es un paso muy importante y, a menudo, es el cuello de botella para la regeneración de plantas completas *in vitro* (Polanco y Ruiz, 2001). Los estudios tradicionales de enraizamiento *in vitro* se centran en la aplicación de fitohormonas, especialmente auxinas, para inducir su respuesta. Zimmerman (1988) describió como ineficientes a las raíces desarrolladas cuando el extremo basal se introduce en el medio de cultivo agarizado, ya que poseen pocos o ningún pelo radical y pueden tener conexiones vasculares deficientes. Newell *et al.* (2006) demostraron que la hipoxia, en medios basados en agar, compromete el enraizamiento *in vitro*. En nuestra investigación, el extremo basal de los explantes se expuso al aire por introducir invertidos los nudos cotiledonales en M0 para proporcionar una mayor aireación en el extremo proximal de los explantes y luego obtener plantas completas.

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Cien nudos cotiledonales se transformaron por *Agrobacterium*. A los 17 d de cultivo en medio M1, el número de explantes transgénicos putativos fueron 14 que regeneraron entre seis y ocho tallos por explante. Todos los explantes se transfirieron a un medio selectivo sin BAP (M0) para permitir el enraizamiento. Después de 15 d de cultivo en medio M0, el número de explantes potencialmente transformados se mantuvo en un valor de 14.

Los factores que condicionan el éxito de la transformación mediada por *Agrobacterium* son: el tipo de explante, la densidad óptica de la suspensión bacteriana y los períodos de inoculación y cocultivo (Das *et al.*, 2012). Con respecto al tipo de explante, es importante asegurar la compatibilidad entre el tejido vegetal usado y la cepa de *Agrobacterium* para que ocurra la transferencia de T-ADN y la integración posterior en el genoma. Además, el ADN debe introducirse en células susceptibles que también puedan regenerar tallos (Finer *et al.*, 1996). Los nudos cotiledonales fueron adecuados para la transformación en lenteja porque los meristemos axilares mostraron susceptibilidad a *Agrobacterium* y fueron capaces de regenerar tallos con una alta eficiencia de transformación. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por Mahmoudian *et al.* (2002a) y Ackay *et al.* (2009), pero otros estudios demostraron que los nudos cotiledonales

in the axils of each cotyledonary node before the *Agrobacterium* infection. After 4 d of co-culture, all regenerated shoots were extracted with scalpel and discarded because they can be escapes and in order to permit new putatively transgenic shoots to emerge. It is possible that the young meristematic tissues or those absent when the incision was made had the chance to regenerate in the selective medium, so, all regenerated shoots had the potential to contain transformed cells leading to the absence of escapes.

The co-culture period is another critical parameter in different vegetal species (Brasileiro, 1998). The 4 d period of co-culture used in our experiment showed was suitable for attaining transgenic shoots. For *Agrobacterium*-mediated transformation, Burrow *et al.* (1990) and Dong and McHughen (1991) showed that a period of co-culture longer than 2 d is beneficial, whereas Brasileiro (1998) reported that a two to four period of co-culture is enough and that periods longer than 5 d could difficult the explant decontamination and cause severe cellular damage.

Vacuum infiltration has enhanced transformation frequency in lentil (Hoque *et al.*, 2003; Ackay *et al.*, 2009); however, in our study it was not necessary to use the vacuum infiltration mechanism for increasing efficiency of transformation. Avoiding this step, the transformation protocol is easier, cheaper and more efficient. Besides, our protocol reduces risks of contamination caused by the use of the vacuum pump.

Analysis of putative transgenic plants

A detailed molecular analysis of putative transgenic shoots is needed to check the integration and expression of exogenous genes in the plant genome (Brasileiro, 1998). The transgenic nature of the shoots regenerated from the 14 potentially transformed explants was confirmed by PCR amplification of the *npt-II* gene. The detection of a 700 bp fragment in the 14 explants showed the presence of the *npt-II* transgene in genomic DNA of the shoots regenerated from transformed explants (Figure 2A). This gene was not detected in the shoots regenerated from explants that were not transformed with *Agrobacterium* (Figure 2A). The presence of the *npt-II* gene in all kanamycin resistant shoots revealed that the continuous selection regime with a kanamycin concentration of 50 mg L⁻¹ used in our study was efficient for recovery of transgenic shoots because no escape was observed. PCR analysis

son incapaces de regenerar tallos transgénicos (Sarker *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2012). Esto puede deberse a las diferentes condiciones de inducción del gen *vir* utilizadas en la preparación de *Agrobacterium*. Kapila *et al.* (1997) demostraron que una fuerte inducción bacteriana antes de la inoculación del explante es importante para el éxito de la transgénesis. En nuestro protocolo, una concentración de 200 mM de acetosiringona demostró ser suficiente para inducir los genes *vir* y regenerar tallos transgénicos a partir de nudos cotiledonales. Otro factor exitoso en nuestra investigación podría ser la densidad celular elegida de *Agrobacterium* (DO₆₀₀=2), que fue más alta que la reportada por Ackay *et al.* (2009) y Das *et al.* (2012). Una combinación de condiciones inductoras fuertes de los genes *vir* y una densidad celular bacteriana alta parecen ser importantes en la transformación mediada por *Agrobacterium* en nudos cotiledonales de lenteja (Mahmoudian *et al.*, 2002b).

Un requisito esencial para la producción de plantas transgénicas a partir de tejidos maduros, como el nudo cotiledonal, es aplicar un tratamiento eficaz que cause lesiones tisulares. Incisiones leves en el explante antes del co-cultivo con la bacteria permiten una mejor penetración de la misma en el tejido y posiblemente estimulan la producción de inductores potentes de los genes *vir* (Stachel *et al.*, 1985). Esto implica la creación de zonas meristemáticas nuevas como respuesta al daño. Para obtener una eficiencia de transformación mayor, se realizaron de seis a ocho punciones con aguja estéril en las axilas de cada nudo cotiledonal antes de la infección por *Agrobacterium*. Después de 4 d de co-cultivo, todos los tallos regenerados se extrajeron con bisturí y se descartaron como posibles emisiones y para permitir el desarrollo de nuevos tallos transgénicos putativos. Es posible que los tejidos meristemáticos jóvenes o aquellos ausentes cuando se hizo la incisión tuvieran la oportunidad de regenerarse en el medio selectivo, por lo que, todos los tallos regenerados tenían el potencial de contener células transformadas llevando a la ausencia de emisiones.

El período de co-cultivo es otro parámetro crítico en diferentes especies vegetales (Brasileiro, 1998). El período de 4 d de co-cultivo utilizado en nuestro experimento demostró ser adecuado para lograr tallos transgénicos. Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, Burrow *et al.* (1990) y Dong y McHughen (1991) demostraron que un período de co-cultivo superior a 2 d es benéfico, mientras que

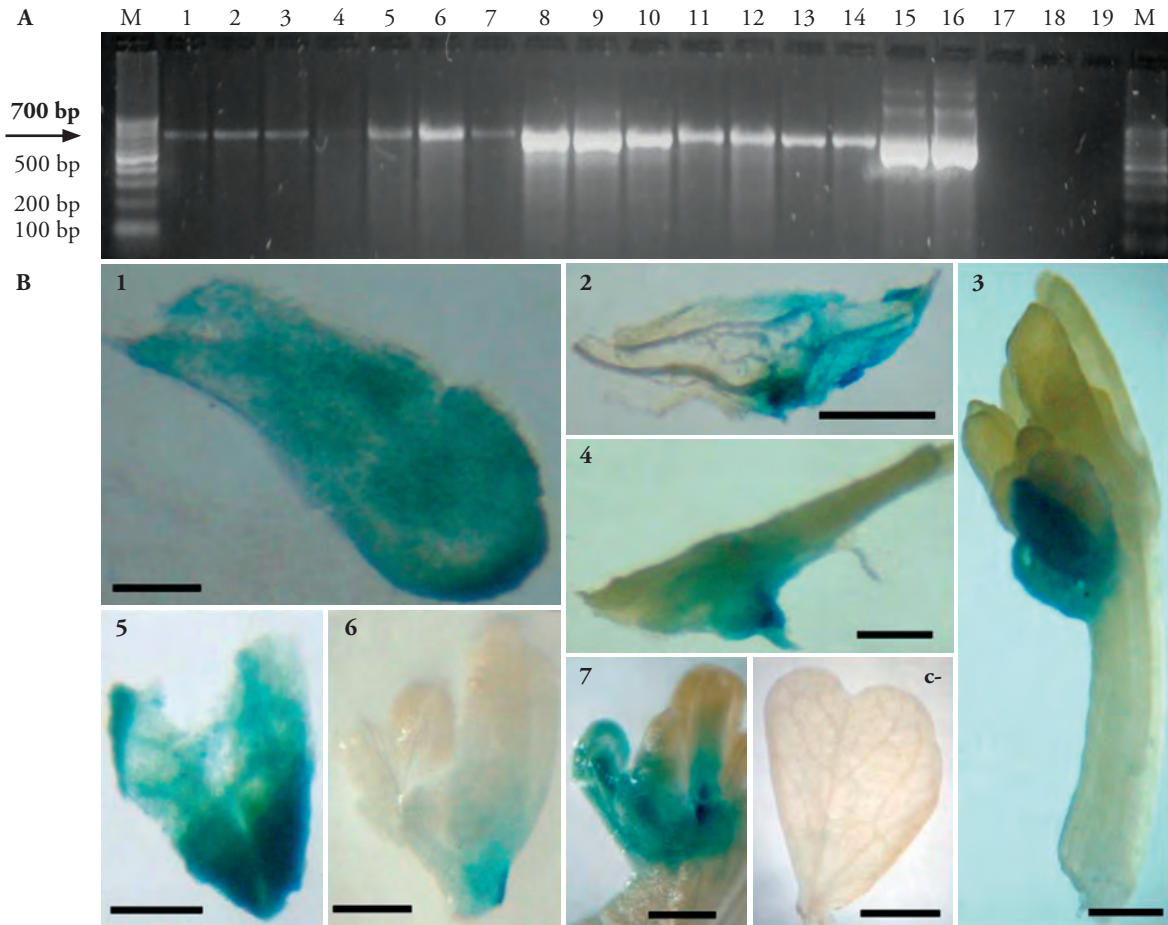


Figure 2. Analysis of putative transgenic plants. A) PCR analysis to confirm the presence of the *npt-II* gene in the shoots regenerated from 14 putatively transformed cotyledonary node explants. The amplified fragment of 700 bp (marked with an arrow) was detected in the 14 transformants (lanes 1-14). Lanes 15, 16, positive controls from two different colonies of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV2260 transformed with the plasmid pBI₁₂₁; lanes 17, 18, non-transformed plants (negative controls); lane 19, PCR negative control (water); M, 100-bp marker. B) Histochemical GUS assay in lentil. 1-7, GUS expression in various leaf tissues of seven putatively transformed cotyledonary node explants, shown by the appearance of blue indigo color. c-) (negative control), lentil leaf from a non-transformed control plant. (bar=1 mm).

Figura 2. Análisis de plantas transgénicas putativas. A) Análisis por PCR para confirmar la presencia del gen *npt-II* en los tallos regenerados a partir de 14 explantes potencialmente transformados a partir de nudos cotiledonales. El fragmento amplificado de 700 pb (marcado con una flecha) se detectó en los 14 transformantes (líneas 1-14). Líneas 15, 16, testigos positivos provenientes de 2 colonias distintas de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el plásmido pBI₁₂₁; líneas 17, 18, plantas no transformadas (testigos negativos); línea 19, testigo negativo de la PCR (agua); M, marcador de peso molecular 100-pb. B) Prueba histoquímica de GUS en lenteja. 1-7, Expresión de GUS en tejidos distintos de hojas de siete explantes de nudos cotiledonales potencialmente transformados demostrados por la aparición de color azul índigo. c-) (testigo negativo), hoja de lenteja proveniente de una planta testigo no transformada. (bar=1 mm).

showed that the transformation efficiency calculated as the number of explants that regenerated shoots containing the *npt-II* transgene (14) / total number of explants that were cocultivated with *Agrobacterium* (100) × 100 was 14%.

To verify *gus* reporter gene expression in shoots regenerated from the 14 putative transformed explants, a histochemical GUS assay was performed

Brasileiro (1998) informó que un período entre dos y cuatro días de co-cultivo es suficiente y que períodos más largos que 5 d podrían dificultar la descontaminación del explante y causar graves daños celulares.

La infiltración al vacío ha mejorado la frecuencia de transformación en lenteja (Hoque *et al.*, 2003; Ackay *et al.*, 2009); sin embargo, en nuestro estudio no fue necesario utilizar este mecanismo para aumentar la

on leaves of these shoots. β -glucuronidase activity was detected in seven of these explants, shown by the appearance of blue indigo color (precipitates) on transformed leaves (Figure 2B, 1-7). The leaves from non-transformed control shoots did not give color reaction (Figure 2B, c-).

However, negative *gus* activity in seven of our transformants was obtained. This may be due to *gus* gene silencing, inactivation, methylation or co-suppression (Rezmer *et al.*, 1999). Another explanation of the negative *gus* activity could be the physical loss of the gene due to incomplete T-DNA transfer to the plant genome, since the transfer occurs in a defined direction, starting from the right border to the left border (Frisch *et al.*, 1995). As the location of the *gus* gene is downstream of the *npt-II* gene, which is located in the right border of the T-DNA in the pBI₁₂₁ construct used, likely the *npt-II* gene was transferred completely but not the *gus* gene. This could increase the frequency of transformed plants containing the *npt-II* selection marker alone. To confirm these sentences a PCR reaction with primers that recognize the *gus* gene will be performed in future transformation experiments.

Therefore, the efficiency of *gus* transgene expression calculated as the number of explants that regenerated *gus* positive shoots (seven) / total number of explants that were cocultured with *Agrobacterium* (100) \times 100 was 7%. Although this frequency of transformation is high, these results are not conclusive because there is no evidence that the transgene will be inherited to the next generation. Thus, it is necessary to analyze the presence of the transgene in future transformation events.

CONCLUSIONS

The cotyledonary nodes explants and the inverted orientation allowed the regeneration of whole plants with a high shoot and root regeneration frequency optimizing the *in vitro* culture system.

A continuous selection regime with a kanamycin concentration of 50 mg L⁻¹ was efficient for recovery of transgenic shoots without escapes.

The *Agrobacterium*-mediated transformation protocol was easy, cheap and with a high transformation frequency (7%).

The highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system is compatible with an

eficiencia de la transformación. Al evitar este paso, el protocolo de transformación es más sencillo, barato y eficiente. Además, nuestro protocolo reduce los riesgos de contaminación causados por el uso de la bomba de vacío.

Análisis de plantas transgénicas putativas

Un análisis molecular detallado de los tallos transgénicos putativos es necesario para verificar la integración y expresión de genes exógenos en el genoma de la planta (Brasileiro, 1998). La naturaleza transgénica de los tallos regenerados a partir de los 14 explantes potencialmente transformados se confirmó mediante amplificación por PCR del gen *npt-II*. La detección de un fragmento de 700 pb en los 14 explantes mostró la presencia del transgén *npt-II* en el ADN genómico de los tallos regenerados a partir de explantes transformados (Figura 2A). Este gen no se detectó en los tallos regenerados a partir de explantes que no se transformaron con *Agrobacterium* (Figura 2A). La presencia del gen *npt-II* en todos los tallos resistentes a kanamicina reveló que un régimen de selección continua con una concentración de kanamicina de 50 mg L⁻¹ fue eficaz para la recuperación de tallos transgénicos porque no se observó la presencia de emisiones. El análisis por PCR mostró que la eficiencia de transformación calculada como el número de explantes (14) que regeneraron tallos que contenían el transgén *npt-II* / el número total de explantes (100) que fueron cocultivados con *Agrobacterium*, \times 100 fue del 14%.

Para verificar la expresión del gen reportero *gus* en tallos regenerados a partir de los 14 explantes putativos transformados, se realizó una prueba histoquímica de GUS en las hojas de los mismos. La actividad de la β -glucuronidasa se detectó en siete de estos explantes, como lo demostró la aparición (de precipitados) de color azul índigo sobre las hojas transformadas (Figure 2B, 1-7). Las hojas de los tallos testigo no transformados no dieron positivo la reacción de color (Figure 2B, c-).

Sin embargo, se obtuvo una actividad *gus* negativa en siete de nuestros transformantes. Esto podría deberse al silenciamiento, inactivación, metilación o co-supresión del gen *gus* (Rezmer *et al.*, 1999). Otra explicación de la actividad negativa de *gus* podría ser la pérdida física del gen debido a una transferencia incompleta de T-ADN al genoma de la planta, ya que la transferencia ocurre en una dirección definida,

optimized *in vitro* regeneration protocol from lentil cotyledonary nodes.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this research work was provided by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

LITERATURE CITED

- Akçay, U. C., M. Mahmoudian, H. Kamci, M. Yucel, and H. A. Oktem. 2009. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of a recalcitrant grain legume, lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plant Cell Rep.* 28: 407-417.
- Balzarini, M., and J. Di Rienzo. 2003. Info-Gen: Software para Análisis Estadístico de Datos Genéticos. Universidad Nacional de Córdoba- Córdoba. Argentina. 141 p.
- Bermejo, C., A. Espósito, V. P. Cravero, and E. L. Cointry. 2012. *In vitro* plant regeneration from cotyledonary nodes of recombinant inbred lines of lentil. *Sci. Hortic.* 134: 13-19.
- Bermejo, C., I. Gatti, N. Caballero, V. Cravero, E. Martin, and E. Cointry. 2014. Study of diversity in a set of lentil RILs using morphological and molecular markers. *Aust. J. Crop Sci.* 8: 689-696.
- Brasileiro, A. C. M. 1998. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: Brasileiro A. C. M., and V. T. C. Carneiro (eds). *Manual de Transformação Genética de Plantas*. EMBRAPA-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília. pp: 111-125.
- Burrow, M. D., C. A. Chlan, P. Sen, and N. Murai. 1990. High frequency generation of transgenic tobacco plants after modified leaf disk cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 124-139.
- Chandra, A., and D. Pental. 2003. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview. *Curr. Sci.* 84: 381-387.
- Christou, P., T. L. Ford, and M. Kofron. 1992. Rice genetic engineering: a review. *Trends Biotechnol.* 10: 239-246.
- Crippa, I., C. Bermejo, M. Espósito, E. Martin, V. Cravero, D. Liberatti, F. López-Anido, and E. Cointry. 2009. Genetic variability, correlation and path analyses for agronomic traits in lentil genotypes. *Int. J. Plant Breed.* 3: 76-80.
- Das, S., K. Shethi, M. Hoque, and R. Sarker. 2012. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in lentil (*Lens culinaris* Medik.) followed by *in vitro* flowering and seed formation. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 22: 13-26.
- Dong, J. Z., and A. McHughen. 1991. Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 10: 555-560.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 149-151.
- FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Rome. <http://faostat.fao.org>. (Accessed: October 2017).
- Finer, J. J., T. S. Cheng, and D. P. S. Verma. 1996. Soybean transformation: Technologies and progress. In: Verma D. P. S., and R. C. Shoemaker (eds). *Soybean Biotechnology*. Arlington, CABI. pp: 249-263.
- que comienza desde el borde derecho hasta el borde izquierdo (Frisch *et al.*, 1995). Como la ubicación del gen *gus* se encuentra corriente abajo del gen *npt-II*, que se encuentra en el borde derecho del T-DNA en el constructor pBI₁₂₁ utilizado, es probable que el gen *npt-II* se haya transferido completamente, pero no el gen *gus*. Esto podría aumentar la frecuencia de las plantas transformadas que contienen el marcador de selección *npt-II* solo. Para confirmar esto, se realizará una reacción de PCR con iniciadores que reconozcan al gen *gus* en experimentos de transformación futuros.
- Por lo tanto, la eficacia de la expresión del transgén *gus* calculada como el número de explantes que regeneraron tallos positivos (7) para *gus* / número total de explantes (100) que se cocultivaron con *Agrobacterium* × 100 fue del 7%. Aunque esta frecuencia de transformación es alta, estos resultados no son concluyentes porque no hay evidencia de que el transgén se herede a la siguiente generación. Por lo tanto, es necesario analizar la presencia del transgén en eventos de transformación futuros.

CONCLUSIONES

Los explantes de nudos cotiledonales y la orientación invertida permitieron la regeneración de plantas completas con una frecuencia alta de tallos y raíces, lo cual optimiza el sistema de cultivo *in vitro*.

Un régimen de selección continua con una concentración de kanamicina de 50 mg L⁻¹ fue eficaz para la recuperación de tallos transgénicos sin emisión.

El protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium* fue sencillo, barato y con una frecuencia de transformación (7%) alta.

El sistema eficiente de transformación mediado por *Agrobacterium* es compatible con un protocolo de regeneración *in vitro* optimizado a partir de nudos cotiledonales de lenteja.

—Fin de la versión en Español—



Fratini, R., and M. L. Ruiz. 2003. A rooting procedure for lentil (*Lens culinaris* Medik.) and other hypogeous legumes (pea, chickpea and *Lathyrus*) based on explant polarity. *Plant Cell Rep.* 21: 726-732.

Frisch, D. A., L. W. Harris-Haller, N. T. Yokubaitis, T. L. Thomas, S. H. Hardin, and T. C. Hall. 1995. Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol. Biol.* 27: 405-409.

- Hassan, F., M. I. Hoque, H. Kiesecker, and H. Jacobsen. 2007. Transient Gus expression in decapitated lentil embryos. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 17: 97-102.
- Hoque, M. I., F. Hassan, R. H. Sarker, H. Kiesecker, and H. J. Jacobsen. 2003. Lentil improvement through biotechnology. *In: Islam A. S. (ed). In vitro Culture, Transformation and Molecular Markers for Crop Improvement.* Science Publishers, Inc. Enfield, USA, pp: 175-192.
- Indurker, S., H. Misra, and S. Eapen. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) with an insecticidal protein gene: optimization of different factors. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 16: 273-284.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. Gus fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Kapila, J., R. De Rycke, M. Van Montagu, and G. Angenon. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122: 101-108.
- Khatib, F., A. Makris, K. Yamaguchi-Shinozaki, S. Kumar, A. Sarker, W. Erskine, and M. Baum. 2011. Expression of the DREB1A gene in lentil (*Lens culinaris* Medik. subsp. *culinaris*) transformed with the *Agrobacterium* system. *Crop Pasture Sci.* 62: 488-495.
- Lu, Y., S. Stegemann, S. Agrawal, D. Karcher, S. Ruf and R. Bock. 2017. Horizontal transfer of a synthetic metabolic pathway between plant species. *Curr. Biol.* 27: 3034-3041.
- Mahmoudian, M., U. Celikkol, M. Yücel, and H. Öktem. 2002a. Vacuum infiltration based *Agrobacterium* mediated gene transfer to lentil (*Lens culinaris*) tissues. *Biotechnol. Biotech. Eq.* 16: 24-29.
- Mahmoudian, M., M. Yücel, and H. Öktem. 2002b. Transformation of lentil (*Lens culinaris* M.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 251-257.
- Mello-Farias, P., and A. Chaves. 2008. Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on soybean. *Sci. Agric.* 65: 95-106.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 468 p.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Negawo, A. T., M. Afatbi, H. J. Jacobsen, I. Altosaar, and F. S. Hassan. 2013. Insect resistant transgenic pea expressing cry1Ac gene product from *Bacillus thuringiensis*. *Biol. Control* 67: 293-300.
- Newell, C., D. Grown, and J. McComb. 2006. Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris* Medik.) Cv. 'Digger' microcuttings *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42: 197-200.
- Pathak, M. R., and R. Y. Hamzah. 2008. An effective method of sonicated-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 93: 65-71.
- Polanco, M.C., and M.L. Ruiz. 2001. Factors that affect plant regeneration from *in vitro* culture of immature seeds in four lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 66: 133-139.
- Popelka, J. C., N. Terryn, and T. J. V. Higgins. 2004. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries. *Plant Sci.* 167: 195-206.
- Prabisha, V. K. P. 2017. Advances in genetic engineering of primary grain legume crops: A Review study. *Int. J. Biotech. Trends Technol.* 22: 9-16.
- Rezmer, C., R. Schlichting, R. Wächter, and C. I. Ullrich. 1999. Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens*- induced plant tumors. *Planta* 209: 399-405.
- Sarker, R., A. Biswas, and B. Mustafa. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plant Tiss. Cult.* 13: 1-12.
- Sarker, R. H., S. K. Das, K. J. Shethi, and M. I. Hoque. 2019. Genetic transformation. *In: Singh M. (ed). Lentils: Potential Resources for Enhancing Genetic Gains.* Elsevier Inc. Netherland. pp: 141-202.
- Stachel, S. E., E. Messens, M. Van Montagu, and P. Zambryski. 1985. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- Svabova, L., P. Smykal, and M. Griga. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.): transformant production *in vitro* and by non-tissue culture approach. *In: Kharkwal, M. C. (ed). Food Legumes for Nutritional Security and Sustainable Agriculture.* IS-GPB, New Delhi, India. pp: 208-220.
- Tóth, K., J. Batek, and G. Stacey. 2016. Generation of soybean (*Glycine max*) transient transgenic roots. *Curr. Protoc. Plant Biol.* 1: 1-13.
- Warkentin, T. D., and A. McHughen. 1992. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated beta-glucuronidase (GUS) gene expression in lentil (*Lens culinaris* Medik) tissues. *Plant Cell Rep.* 11: 274-278.
- Zimmerman RH (1988) Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. *Acta Hort.* 227: 489-499.
- Zohary, D. 1972. The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil. *Econ. Bot.* 26: 326-332.

