Artículo original

Biotecnología Vegetal Vol. 12, No. 2: 93 - 97, abril - junio, 2012
ISSN 2074-8647, RNPS: 2154 (Versión electrónica)
ISSN 1609-1841, RNPS: 0397 (Versión impresa)

Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de embriones somáticos en variedades cubanas de soya

Idalmis Bermúdez-Caraballoso[1]*, Teresa Del Socorro Blanco[2], Jorge Pérez-Pérez[3], Lourdes R. García[1], Novisel Veitía[1], Raúl Collado[1], Damaris Torres[1], Carlos Romero[1]. *Autor para correspondencia.

[1]Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5. 5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

[2]Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Instituto Universitario de la Paz. Carretera a Bucaramanga km 15. Barrancabermeja, Colombia.

[3]Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera vía Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba. CP 85 100.

RESUMEN

En el cultivo de la soya para desarrollar nuevos programas de mejoramiento genético, es necesario contar con sistemas eficientes de regeneración de plantas, sin embargo por su condición genotipo dependiente no es posible aplicar los desarrollados previamente. El presente trabajo tuvo como objetivo: determinar el efecto de la concentración de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) en la formación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya (Incasoy-1, Incasoy-24, Incasoy-27 e Incasoy-35). Como material vegetal se utilizaron cotiledones inmaduros. Se establecieron tres tratamientos según la concentración de 2,4-D (30, 40 y 50 mg l^{-1}). A los 30 días se cuantificó el número de embriones somáticos formados por cotiledón inmaduro. La concentración de 2,4-D requerida para obtener la mayor formación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya varió en dependencia del genotipo (30 mg l^{-1} para Incasoy-24; 40 mg l^{-1} para Incasoy-27 e Incasoy-35; 40 y 50 mg l^{-1} para Incasoy-1). Sobre la base de los resultados, se seleccionó la concentración de 40 mg l^{-1} para las variedades cubanas con excepción de la Incasoy-24 que respondió mejor a una concentración de 30 mg l^{-1}. Estos resultados pueden contribuir al desarrollo de nuevos programas para el mejoramiento genético de la soya en Cuba.

Palabras clave: embriogénesis somática, *Glycine max*, regeneración de plantas.

Effect of 2,4-D concentration in somatic embryos formation of cuban soybeans varieties

ABSTRACT

Developing new breeding programs of soybean crops needs an efficient systems for plants regeneration. Eventhough due this is impossible taking into account its genotype dependent condition. This study aimed to: determine the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) concentration in the formation of somatic embryos in soybean Cuban varieties (Incasoy-1, Incasoy-24, Incasoy-27 and Incasoy-35). Immature cotyledons were used as plant material. Three treatments were established according to the concentrations of 2,4-D (30, 40 and 50 mg l^{-1}). The number of somatic embryos per immature cotyledon were evaluated after 30 days. The necessary concentration of 2,4-D to obtain the mayor formation of embryos depended on the genotypes (30 mg l^{-1} for Incasoy-24; 40 mg l^{-1} for Incasoy-27 and Incasoy-35; 40 and 50 mg l^{-1} for Incasoy-1). Depending on the results obtained the concentration 40 mg l^{-1} for the cuban varieties was selected The Incasoy-24 was the exception since it responded better with a concentration of 30 mg l^{-1}. These results favor the development of new programs for genetic breedig of soybeans in Cuba.

Keywords: *Glycine max*, plants regeneration, somatic embryogenesis.

INTRODUCCIÓN

La soya [*Glycine max* (L.) Merril] es uno de los cultivos más importantes en el mundo por su alto contenido de proteínas y aceite (Wiebke-Strohm *et al.*, 2011). En Cuba, representa una alternativa económica importante para la alimentación humana y animal (Marrero *et al.*, 2004). Por tales motivos, el blanco principal para los mejoradores en la familia de las leguminosas se ha encaminado al mejoramiento de las variedades para la resistencia a factores bióticos, abióticos, condiciones de estrés e incremento de la calidad nutricional de las semillas, que limitan sus rendimientos especialmente en los países

tropicales y subtropicales (Angenon y Thu, 2011). No obstante, uno de los factores limitantes para desarrollar estos programas de mejoramiento genético ha sido no contar con un sistema eficiente de regeneración de plantas vía embriogénesis somática, por su condición genotipo-dependiente (Parrott *et al.,* 1989; Hiraga *et al.,* 2007), lo cual limita el empleo de los protocolos ya existentes. Es por ello imprescindible, el desarrollo de protocolos de regeneración de plantas en variedades cubanas con importancia para el mejoramiento genético.

Por todo lo antes expuesto el presente trabajo tuvo como objetivo: determinar el efecto de la concentración de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) en la formación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las variedades cubanas de soya, Incasoy-1, Incasoy-24, Incasoy-27 e Incasoy-35. Como control se utilizó el genotipo Williams-82, en consideración a que se ha probado en los protocolos empleados como referencia en este estudio (Bailey *et al.*, 1993; Saymolov *et al.*, 1998). Las semillas de todas las variedades fueron aportadas por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba (INCA).

Como explante para el inicio del proceso de embriogénesis somática se emplearon cotiledones inmaduros provenientes de semillas de vainas cosechadas entre 12 y 15 días después de la antesis. Las vainas se lavaron con una solución de agua y detergente comercial, luego se desinfectaron sumergiéndolas en alcohol al 70% (v/v) durante 20 segundos, seguido de una segunda desinfección en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3.0% (v/v) y seis gotas de Tween-20 durante diez minutos. Al término de este tiempo, y en cámara de flujo laminar, se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril. Las semillas inmaduras fueron separadas de las vainas y el extremo donde se encontraba el eje embrionario fue cortado y descartado. Los dos cotiledones fueron obtenidos ejerciendo una presión suave en el extremo contrario al corte. Para el establecimiento de los cotiledones inmaduros se siguió el procedimiento descrito por Bermúdez-Caraballoso *et al.* (2010).

Se establecieron tres tratamientos según la concentración de 2,4-D (30, 40 y 50 mg l^{-1}) en las variedades cubanas y el control (Williams-82). Cada tratamiento estuvo conformado por cinco réplicas cada una con cuatro explantes, con diseño completamente al azar.

Los frascos fueron incubados en cámaras de crecimiento, provista por lámparas fluorescentes, con fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad, 26±2°C e intensidad luminosa de 5-10 µE m^{-2} s^{-1} según lo propuesto por Lazzeri *et al.* (1987).

A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados por cotiledón inmaduro.

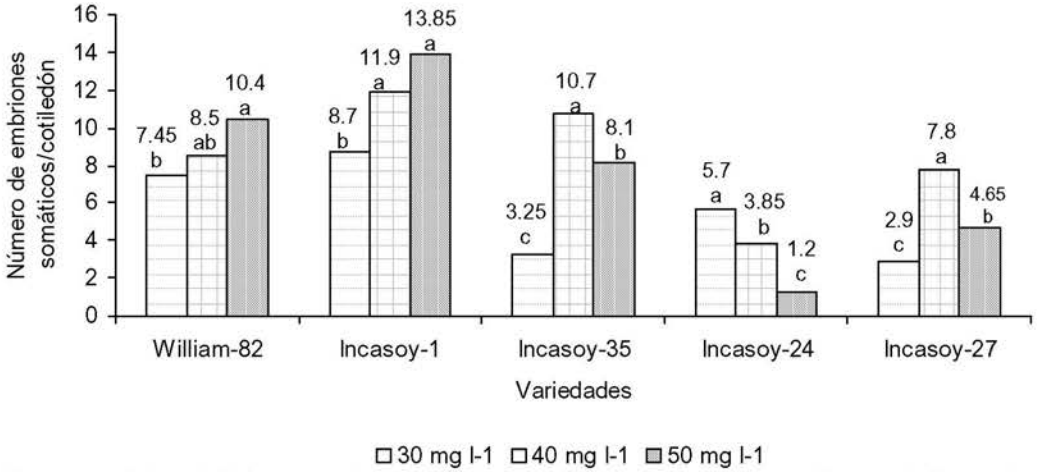
Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se usó el programa estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 16.0 sobre Windows. La comparación de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de 2,4-D tuvo un efecto significativo en la formación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya. De las variedades Incasoy-27 e Incasoy-35 se logró el mayor número de embriones somáticos en el medio de cultivo que contenía 40 mg l^{-1} de 2,4-D. Los resultados con esta concentración difirieron significativamente en estas variedades con las concentraciones de 30 y 50 mg l^{-1} de 2,4-D (Figura 1).

En las variedades Incasoy-1 y Williams-82 el mayor número de embriones somáticos formados se logró en las concentraciones de 40 y 50 mg l^{-1} de 2,4-D sin diferencias significativas. En contraste, en la variedad Incasoy-24 los valores más altos se obtuvieron con 30 mg l^{-1} de 2,4-D en el medio de cultivo, con diferencias significativas con las otras concentraciones estudiadas. Este resultado evidencia la condición genotipo-dependiente de la especie en lo que respecta a la capacidad de respuesta de las diferentes variedades a la concentración de la auxina exógena requerida para inducir la respuesta embriogénica (Figura 1 y 2).



Barras con letras distintas en cada genotipo indican diferencias entre las medias según la prueba de Kruskall Wallis, para p<0.05.

Figura 1. Efecto de la concentración del 2,4-D en la formación de embriones somáticos en variedades cubanas de soya a los 30 días de cultivo.

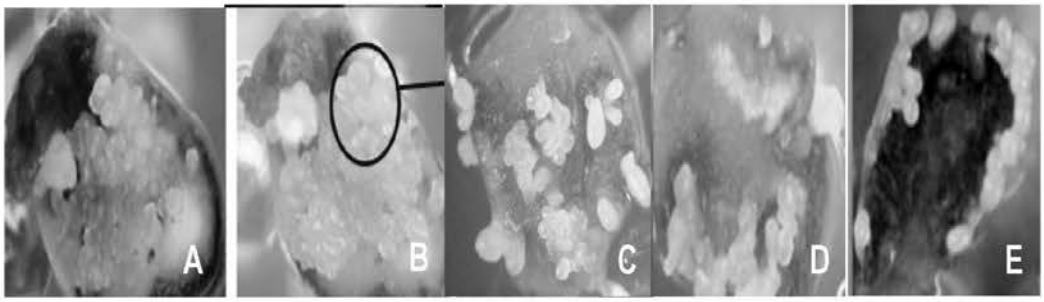


Figura 2. Embriones somáticos formados en las variedades cubanas de soya con las diferentes concentraciones de 2,4-D a los 30 días de cultivo (A- Incasoy-1 en 40 mg l^{-1} de 2,4-D; B- Incasoy-24 en 30 mg l^{-1} de 2,4-D; C- Incasoy-27 en 40 mg l^{-1} de 2,4-D; D- Incasoy-35 en 40 mg l^{-1} de 2,4-D y D- Williams-82 en 40 mg l^{-1} de 2,4-D).

En estudios similares, Hiraga *et al.* (2007), encontraron que la mejor respuesta embriogénica, asociada al número de embriones somáticos formados en variedades japonesas de soya, se logró con concentraciones de auxina que fluctuaron entre 40 y 80 mg l^{-1} de 2,4-D. Estos autores sugirieron que las diferencias en la respuesta se debieron posiblemente tanto a la sensibilidad de cada variedad al 2,4-D como a los niveles endógenos de auxina presentes en el explante. El nivel endógeno de hormonas vegetales, es considerado uno de los factores cruciales que influyen en el potencial embriogénico de los explantes. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado que tanto los primordios cotiledonales como los cotiledones tienen altos niveles de auxina endógena, los cuales se correlacionan con la alta competencia embriogénica exhibida por estos tejidos (Gaj, 2004).

La alta eficiencia del 2,4-D para inducir la respuesta embriogénica en diferentes variedades de soya también fue demostrada por Yang *et al.* (2009), quienes encontraron diferencias altamente significativas en la respuesta embriogénica de 98 variedades chinas de soya (0.0% hasta 85.7% de cotiledones inmaduros con embriones somáticos), asociadas al empleo de 40 mg l^{-1} de 2,4-D en el medio de cultivo para la formación de embriones somáticos. Según estos autores, los resultados pudieron estar asociados a diferencias en la sensibilidad de los genotipos a esta auxina sintética.

Aunque generalmente, se ha manifestado que para inducir la embriogénesis somática en soya se requieren concentraciones relativamente altas de 2,4-D (40 mg l^{-1}). En este sentido, Lazzeri *et al.* (1985), obtuvieron más del 90%

de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica cuando emplearon 5.0 mg l^{-1} de 2,4-D. Resultados similares, se encontraron en Beversdorf y Bighman (1977); Christianson *et al.* (1983); Lippman y Lippmman (1984). En contraste, Loganathan *et al.* (2010), no obtuvieron respuesta embriogénica en una variedad taiwanesa de soya cuando emplearon un amplio rango de concentraciones de 2,4-D (9.06; 18.12; 27.19; 36.26 y 45.32 mg l^{-1}).

El 2,4-D es una de las auxinas más empleadas para la inducción de la embriogénesis somática en soya y se ha demostrado que puede tanto inhibir la elongación de las células (Saymolov *et al.,* 1998) como promover su división (Griga, 2002), a través de un estímulo en la división celular asimétrica (Schnabel y Frugolicol, 2004) y afectar la regulación y balance endógeno de hormonas (Moon e Hildebrand, 2003). Las diferencias en el efecto inductor, usualmente son asociadas a la capacidad de cada genotipo para programar y reprogramar genéticamente las células competentes embriogénicamente en respuesta al efecto que ejercen los factores externos.

Por otra parte, se considera que el 2,4-D puede regular adecuadamente el metabolismo endógeno del ácido indol-3-acético (AIA), comparado con otros reguladores de crecimiento vegetal sintéticos empleados para la embriogénesis somática. En otras especies como la zanahoria (*Daucus carota* L), el incremento en la respuesta embriogénica como resultado de la exposición al 2,4-D exógeno, estuvo asociada con un incremento de los niveles de AIA endógeno, lo cual sugiere que la auxina sintética 2,4-D tiene un efecto indirecto significativo sobre la embriogénesis somática posiblemente debido a disturbios causados sobre el metabolismo de la auxina endógena. Igualmente, se ha considerado que el 2,4-D promueve la producción de AIA asociado a proteínas, lo que incrementa la sensibilidad de las células al AIA y les confiere competencia embriogénica (Sharma *et al.,* 2007).

En el mismo sentido, Jiménez (2005) plantó que la sensibilidad de un tejido al cambio en la concentración de hormonas (probablemente percibida por un receptor en particular) es más importante que el cambio en la concentración por sí misma. Esta sensibilidad puede ser evidenciada por el hecho de que el tejido responde solamente en presencia de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo. La sensibilidad a las auxinas podría explicarse, al menos parcialmente, sobre la base de las diferentes respuestas entre las especies de plantas, genotipos o células en el mismo explante o entre diferentes explantes en la misma especie, en su capacidad de convertirse en embriogénico. Por tanto, las diferencias en la sensibilidad probablemente son la consecuencia de la variación en la habilidad de ciertos explantes en producir los receptores apropiados.

La concentración de 2,4-D requerida para obtener la mayor formación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya evaluados, varió en dependencia del genotipo (30 mg l^{-1} para Incasoy-24; 40 mg l^{-1} para Incasoy-27 e Incasoy-35; 40 y 50 mg l^{-1} para Incasoy-1). Sobre la base de los resultados, se seleccionó la concentración de 40 mg l^{-1} para las variedades cubanas con excepción del Incasoy-24 que respondió mejor a una concentración de 30 mg l^{-1}.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la concentración de 2,4-D influyó en la formación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya estudiadas. Se demostró la condición genotipo dependiente de este cultivo. Estos resultados pueden contribuir al desarrollo de nuevos Programas para el Mejoramiento genético de la soya en Cuba.

REFERENCIAS

Angenon, G, Thu TT (2011) Grain legume improvement through genetic transformation. En: Pratap A and Kumar J (Ed) Biology of food legumes pp 178-192 CABI. Kanpur, India

Bailey, MA, Boerma HR, Parrott WA (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology 29: 102-108

Bermúdez-Caraballoso, I, Del Socorro Blanco T, Pérez-Pérez J, García LR, Veitía N, Collado R, Torres D, Romero C, Roque B (2010) Efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos en dos genotipos cubanos de soya. Biotecnología Vegetal 10(2):121-128

Beversdorf, WD, Bingham ET (1977) Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. Crop Sci. 17: 307-311

Christianson, ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. Science 222: 632-634

Gaj, MD (2004) factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regulation 43: 27-47

Griga M (2002) Morphology and anatomy of *Pisum sativum* somatic embryos. Biologia Plantarum 45 (2): 173-182

Jiménez, VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation 47: 91-110

Hiraga, S, Minakawa H, Takahashi K, Takahashi R, Hajika M, Harada K, Ohtsubo N (2007) Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. Plant Biotechnology 24: 435–440

Lazzeri, PA, Hildebrand DF, Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. Plant Molecular Biology Reports 3: 160-167

Lazzeri, PA, Hildebrand DF, Collins GB (1987) Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell Tissue and Organ Culture 10: 197-208

Lippmann, B, Lippmann G (1984) Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. Plant Cell Reports 3: 215–218

Loganathan, M, Maruthasalam, S, Shiu, LY, Lien, WC, Hsu, WH, Lee, PF, Yu, CW, Lin, CH (2010) Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merril) throught direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 46(3): 265-273

Moon, H, Hildebrand D (2003) Effects of proliferation, maturation and desiccation methods on conversion of soybean somatic embryos. *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant 39: 623-628

Samoylov, VM, Tucker DM, Parrott WA (1998) Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 34: 8-13

Schnabel, EL, Frugoli J (2004) The *PIN* and *LAX* families of auxin transport genes in *Medicago truncatula*. Mol Gen Genomics 272: 420-432

Sharma, SK, Bryan GJ, Millam S (2007) Auxin pulse treatment holds the potential to enchance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. Plant Cell Rep. 26: 945-950

Wiebke-Strohm B, Droste A, Pasquali G, Borges MO, Bucker-Neto L, Pereira LMP, Bencke M, Schenkel MH, Margis-Pinheiro M, Bodanese-Zanettini MH (2011) Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. Euphytica 177(3): 343-354

Yang, C, Zhao T, Yu D, Gai J (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro* Cell Dev Biol-Plant 45: 180-188

Recibido: 12-1-2012
Aceptado: 27-2-2012