

Selección *in vitro* de líneas transgénicas de soya obtenidas de embriones somáticos transformados con *Agrobacterium tumefaciens*

Jorge L. Pérez Pérez^{1,2*} <https://orcid.org/0000-0003-3372-7559>

Lourdes R. García² <https://orcid.org/0000-0003-1016-6939>

Novisel Veitía² <https://orcid.org/0000-0001-6357-4843>

Luis E. Rojas² <https://orcid.org/0000-0002-0107-1842>

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo km 17,5 Peralejo. Bayamo. Granma. Cuba. CP 85100. e-mail: jperez@udg.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

*Autor para correspondencia e-mail: jperez@udg.co.cu

RESUMEN

Aunque la transformación genética en *Glycine max* ha sido intensamente investigada, el proceso sigue siendo ineficaz. En el presente trabajo se aborda por primera vez la selección *in vitro* de líneas transgénicas de soya cultivar Incasoy-27. A partir de embriones somáticos transformados con *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105, se logró la regeneración de tres líneas de plantas supuestamente transformadas que mostraron resistencia a la fosfinitricina 6.0 mg l⁻¹. El análisis histoquímico GUS demostró expresión estable del gen *uidA* en hojas de dos líneas de plantas. Posteriormente se confirmó con la reacción en cadena de polimerasa, la presencia de los genes *bar* y *uidA* en dos líneas regeneradas; mientras que en la tercera línea se encontró la banda referente al gen *uidA* pero no fue posible demostrar la presencia del gen *bar*. En conclusión, es posible la selección *in vitro* de líneas transgénicas de soya cultivar Incasoy-27, con expresión de los genes *uidA* y *bar* en el genoma de las plantas transformadas y 0.30% de eficiencia.

Palabras clave: gen *bar*, *Glycine max*, glufosinato, transformación genética

In vitro selection of transgenic soybean lines obtained from somatic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*

ABSTRACT

Although genetic transformation in *Glycine max* has been intensively investigated, the process remains ineffective. In the present work, for the first time, the *in vitro* selection of transgenic lines of soybean variety Incasoy-27 is addressed. From somatic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, the regeneration of three lines of supposedly transformed plants that showed resistance to phosphinothricin 6.0 mg l⁻¹ was achieved. GUS histochemical analysis demonstrated stable expression of the *uidA* gene in leaves of two plant lines. Subsequently, the presence of the *bar* and *uidA* genes in two regenerated lines was confirmed with the polymerase chain reaction; while in the third line the band referring to the *uidA* gene was found but it was not possible to demonstrate the presence of the *bar* gene. In conclusion, is possible to *in vitro* select transgenic lines of soybean variety Incasoy-27, with expression of the *uidA* and *bar* genes in the genome of the transformed plants and 0.30% efficiency.

Keywords: *bar* gene, *Glycine max*, glufosinate, genetic transformation

INTRODUCCIÓN

La soya *Glycine max* (L.) Merrill, es uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel

mundial, debido a su alto contenido de aceite y proteínas en sus semillas; considerada de gran valor para la industria y la alimentación tanto humana como animal (Hada *et al.*, 2018).

No obstante, el crecimiento y la productividad de este cultivo son afectados por estreses bióticos y abióticos. Esto ha requerido el desarrollo de programas de mejora genética para obtener variedades mejoradas, pero su eficiencia está limitada debido a la estrecha base genética de este cultivo. En la actualidad se emplea la Ingeniería Genética para transferir genes entre organismos no emparentados en cortos periodos de tiempo, lo que resulta una ventaja sobre los métodos convencionales de mejoramiento genético en el cultivo de la soya (Mangena *et al.*, 2017; RNBA, 2020).

En esta especie tanto la regeneración de plantas como la transformación genética, es genotipo dependiente. En el cultivar cubano Incasoy-27 se ha desarrollado la embriogénesis somática en cotiledones cigóticos inmaduros (Pérez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2019). Así mismo, se desarrolló un protocolo de transformación genética por *A. tumefaciens* (Pérez-Pérez, 2016).

Existen antecedentes del empleo de embriones somáticos en la transformación genética vía biobalística (Tougou *et al.*, 2009), y *Agrobacterium tumefaciens* (Wiebke-Strohm *et al.*, 2011). Pero a pesar de los esfuerzos realizados por mejorar la eficiencia de transformación con *A. tumefaciens*, esta se mantiene baja debido a la dependencia del genotipo en términos de susceptibilidad a la infección, así como, la baja capacidad de regeneración de plantas a partir de embriones somáticos transformados genéticamente (Kumari *et al.*, 2016).

Además, la transferencia de genes no siempre es estable, debido a la baja eficiencia y aleatoriedad en la integración del ADN-T en el genoma del hospedero, siendo necesario un gen capaz de expresar una proteína que permita la selección de los tejidos transformados (Tougou *et al.*, 2009), entre estos se encuentra el gen *bar* que confiere resistencia a los herbicidas que tienen como ingrediente activo la fosfinotricina (Rao *et al.*, 2009).

Sin embargo, en el género *Glycine* existen pocos trabajos que describen la utilización del glufosinato de amonio para la selección de embriones somáticos y plantas transformadas (Rao *et al.*, 2009; Paredy

et al., 2020). Por otra parte, en la literatura científica consultada no existe referencia al uso de este compuesto para la evaluación de la expresión estable del gen *bar* en este cultivo.

El cultivar 'Incasoy 27' obtenido en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba (INCA) por la vía de la hibridación natural de la variedad brasileña BR-32 en condiciones de campo (Ponce *et al.*, 2003), ha sido propagado por embriogénesis somática y se han estudiado diferentes factores que pueden incidir en su transformación genética (Pérez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2019). Sin embargo, se requiere establecer un método que permita la selección *in vitro* de las plantas regeneradas.

Este trabajo tuvo como objetivo seleccionar *in vitro* líneas transgénicas de soya cultivar Incasoy-27 obtenidas de embriones somáticos transformados con *Agrobacterium tumefaciens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Embriones somáticos de soya cultivar Incasoy-27 en etapa globular obtenidos según Pérez *et al.* (2012).

Cepa bacteriana y plasmidio

Se empleó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Hood *et al.*, 1993) que porta el plasmidio pCAMBIA3301 (CAMBIA, Australia), que contiene los genes *bar* (Thompson *et al.*, 1987) y *uidA* (Jefferson *et al.*, 1987).

El gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* codifica para la enzima fosfinotricina N-acetil transferasa, que confiere resistencia a los herbicidas que contengan fosfinotricina como producto activo. Este gen está regulado por el promotor 35S del *Virus del Mosaico de la Coliflor* (CaMV) y el terminador 35S poliadenilado del mismo virus. El gen *uidA* contiene un intrón y codifica para la β -glucuronidasa (GUS); es regulado por el mismo promotor que el gen *bar* y por la secuencia terminadora (Tnos) poliadenilada de la enzima neopalina sintetasa de *A. tumefaciens* (Figura 1).

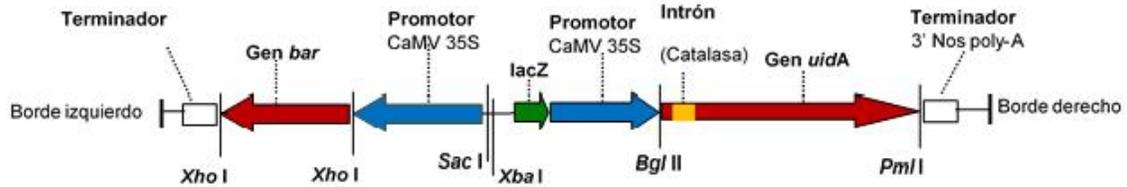


Figura 1. Esquema de la región ADN-T del plasmidio pCAMBIA3301.

Cocultivo

Los embriones somáticos fueron sumergidos en 5.0 ml de una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* ($DO_{600nm}=0.4$) e incubados durante 20 minutos en agitación a 25.0 rpm a 26 ± 1.0 °C en condiciones de oscuridad. Posteriormente, para eliminar el exceso de la bacteria se colocaron 10 segundos, sobre papel de filtro (Whatman® 125 mm) estéril en cabina de flujo laminar según lo referido por Wiebke-Strohm *et al.* (2011).

El cocultivo se realizó en placas de Petri que contenían medio de cultivo de multiplicación con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 2,4-D 20 mg l⁻¹, sacarosa 3.0%, acetosiringona (AS) 200 µM, cisteína 100 mg l⁻¹, ácido cítrico 50.0 mg l⁻¹, pH 5.5 y Gelrite® 0.3%, en condiciones de oscuridad durante cuatro días.

Selección de embriones somáticos y plantas *in vitro* de soya con resistencia a fosfotricina

Al finalizar el periodo de cocultivo, los embriones somáticos se lavaron con agua desionizada estéril y timentina (Duchefa, Holanda) 200 mg l⁻¹, hasta eliminar los restos de bacteria. La timentina se esterilizó por filtración, y se adicionó después de la esterilización por autoclave del medio de cultivo.

Luego los embriones somáticos fueron secados por contacto con papel de filtro estéril, y colocados en placas de Petri que contenían medio de cultivo de multiplicación. Además, se adicionó la timentina y el agente selectivo fosfotricina (6.0 mg l⁻¹), según lo referido por Pérez *et al.* (2015).

Los embriones somáticos que lograron sobrevivir a la selección con el herbicida, fueron colocados en medio de cultivo de maduración durante 28 días de cultivo. Luego

los embriones somáticos maduros fueron desecados parcialmente durante cuatro días, y transferidos a medio de cultivo de germinación durante 30 días (Pérez *et al.*, 2017).

A partir de las líneas de plantas supuestamente transformadas y no transformadas (controles), se tomaron hojas sin síntomas que fueron colocadas en placa de Petri que contenía 20 ml de una mezcla de Gelrite® 0.3% en agua desionizada estéril a pH 5.8. En cabina de flujo laminar, se añadieron diferentes concentraciones de fosfotricina (2.0, 4.0, 6.0 mg l⁻¹), excepto en el tratamiento control sin el agente selectivo. Todo el proceso de crecimiento y desarrollo se realizó en cámara de crecimiento con luz solar con 12-13 horas de luz e intensidad del flujo de fotones fotosintéticos de 68.0-72.0 µmol m⁻² s⁻¹ a 26 ± 1.0 °C.

A los siete días se determinó mediante observación visual el cambio en el color de las hojas y de esta manera se constató si las líneas de plantas regeneradas mostraban o no resistencia a la fosfotricina.

Análisis histoquímico y molecular en líneas de plantas transformadas

Detección histoquímica

A partir del ensayo histoquímico GUS (Jefferson *et al.*, 1987), se determinó la actividad transitoria del gen *uidA*. Muestras de posibles tejidos transformados y el control, se colocaron en tubos de 1.5 ml, se enjuagaron con agua desionizada estéril y se secaron en una campana al vacío.

Después se añadió 1.0 ml de acetona al 90.0% (v/v) y se colocaron 15 minutos en hielo (aprox. 4.0 °C). Se lavaron tres veces con una solución tampón de fosfato de sodio 0.1 M, se colocaron en tubos con la solución de

X-Gluc (Jefferson *et al.*, 1987) y luego en una cámara de infiltración (Bioblock, Inglaterra) con una bomba de vacío (Thomas®, EUA) 15 minutos a una presión de 84 659.7 pascales (Pa), seguido de una represurización. Finalmente se incubaron 24 horas a 37.0 ± 1.0 °C en la oscuridad. Al concluir se lavaron con la solución tampón y se colocaron en etanol 70% (v/v).

La solución con la sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-Gluc), se preparó con el tampón fosfato de sodio (Na_3PO_4 , pH 7.0) 100 mM, EDTA 10 mM, ferrocianuro de potasio $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 M, ferricianuro de potasio $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 M, sustrato X-Gluc 100 mM (Duchefa, Holanda), dimetil sulfóxido 1.5% y Tritón® X-100 1.0% (v/v). La expresión transitoria del gen *uidA* se determinó mediante evaluación visual al microscopio óptico.

Análisis molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para confirmar la transformación genética de las líneas de plantas *in vitro* regeneradas, se realizó la extracción del ADN genómico, según el procedimiento de Rojas *et al.* (2014). Los fragmentos de hojas (0.3 cm^2) de plantas transformadas y no transformadas se sumergieron en 50 μl de la solución tampón A (100 mM NaOH; 2.0% Tween-20) y se incubaron a 95 °C, diez minutos. Se añadió 50 μl de la solución tampón B (150 mM Tris-HCl pH 2.0; 2.0 mM EDTA), y se mezclaron moderadamente hasta homogenizar los tampones.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 20 μl que contenía 2.0 μl de una mezcla con el ADN genómico, 200 μM dNTPs, 0.4 μM de cada cebador (directo y reverso), 1.0 U de la enzima polimerasa *Dream Taq* (5 U μl^{-1}) (Fermentas, Alemania), 1.0%

BSA (m/v), 1.0% PVP 44 000 (m/v) y 1x del tampón *Green Buffer*. Como control positivo se utilizó 1.0 μl del plasmidio pCAMBIA3301, control negativo ADN genómico de plantas sin transformar y un marcador molecular *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, Alemania). Para amplificar los fragmentos de los genes *bar* y *uidA*, se usaron cebadores con las secuencias (Tabla 1).

El PCR se realizó en el termociclador *Mastercycler* (Eppendorf®, Alemania). El programa para amplificar el gen *bar*, comenzó con cuatro minutos de desnaturalización a 95 °C, 35 ciclos de amplificación, 45 segundos a 95 °C, un minuto a 65 °C de hibridación, un minuto a 72 °C de extensión. Al concluir se añadió un paso final de extensión a 72 °C por 10 minutos. Para el fragmento del gen *uidA*, se siguió una secuencia similar excepto la temperatura de hibridación a 68 °C.

Los fragmentos amplificados se corrieron mediante electroforesis a 100 Volt, durante 45 minutos en gel de agarosa 1.5% (m/v) en el tampón de corrida TBE 1x (100 mM Tris-HCl, 83.0 mM ácido bórico, 1.0 mM EDTA, pH=8.0).

El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio a $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Green y Sambrook, 2012) y fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (MacroVue, Alemania).

La eficiencia de transformación genética expresada en porcentaje (%), se determinó a partir del número de plantas regeneradas que mostraron resistencia a la fosfotricina y positivas al PCR, entre el número de embriones somáticos inoculados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el empleo de la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* fue posible la

Tabla 1. Cebadores utilizados en la detección por PCR de los genes *bar* y *uidA*.

Genes	Cebadores	Secuencia	Pares de bases
<i>bar</i>	<i>bar</i>	5'-CGAGACAAGCACGGTCAACTTC-3' (directo)	402
	(SIGMA)	5'-GAAACCCACGTCATGCCAGTTC-3' (reverso)	
<i>uidA</i>	<i>gus-bean</i>	5'-TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT-3' (directo)	400
	(IDT)	5'-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC-3' (reverso)	

transformación genética de embriones somáticos de soya cultivar cubano Incasoy-27, lo que se demostró mediante procedimientos histoquímicos y moleculares.

Las plantas *in vitro* obtenidas a partir de embriones somáticos no transformados, mantuvieron las características morfológicas típicas de la especie (Figura 2 A). Sin embargo, las regeneradas a partir de embriones somáticos que mostraron resistencia a la fosfotricina 6.0 mg l^{-1} , se caracterizaron por tener un crecimiento más lento con respecto a los controles *in vitro* no transformados y los embriones tuvieron una germinación completa (Figura 2 C, D, E).

Después de siete días las hojas sin tratar con fosfotricina mantuvieron el color verde excepto en los bordes donde se realizaron los cortes. Sin embargo, cuando los fragmentos de hojas fueron colocados en diferentes concentraciones de fosfotricina, se encontró que existía clorosis en las hojas debido al efecto tóxico del herbicida, y causó la muerte en la totalidad del tejido en la mayor concentración evaluada (Figura 2 F). Por el contrario, en las hojas de las líneas regeneradas no se encontraron daños visibles de toxicidad por el herbicida (Figura 2 G).

El retardo en el crecimiento en las líneas regeneradas pudo estar dado por el efecto del estrés que se produce por la interacción del tejido vegetal con la bacteria durante la infección y regeneración de plantas. En este sentido, Olhoft *et al.* (2003) plantearon que el empleo de la fosfotricina (1.33 a 5.0 mg l^{-1}) pero en nudo cotiledonal, inhibió la elongación de la mayoría de los brotes transformados en la variedad Bert. Según estos autores con este agente selectivo, la elongación de los brotes ocurrió entre 6 y 12 meses después del cocultivo, mientras que con higromicina requerían de 2 a 6 meses.

Al colocar las hojas de las plantas en el medio de cultivo de selección con la fosfotricina, permitió diferenciar las plantas que mostraban resistencia de los controles no transformados. Un ensayo similar fue realizado por Dang y Wei (2007), pero con la diferencia que con ayuda de un pincel le aplicaron una solución de 200 mg l^{-1} de fosfotricina a las plantas. A los diez días realizaron la evaluación y encontraron un cambio de color en las hojas de las plantas control producto al efecto tóxico del herbicida, el cual no fue visible en las líneas de plantas transgénicas.

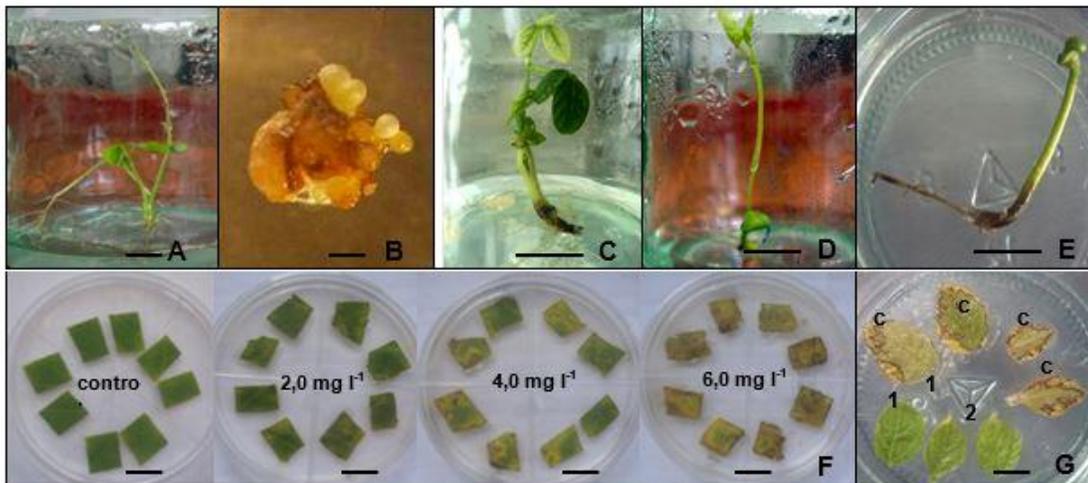


Figura 2. Selección *in vitro* de plantas regeneradas a partir de embriones somáticos supuestamente transformados de *Glycine max* cultivar Incasoy-27. (A) Planta no transformada. (B) Multiplicación de embriones somáticos en medio de cultivo de selección con 6.0 mg l^{-1} de fosfotricina. (C, D, E) Líneas de plantas regeneradas supuestamente transformadas. (F) Ensayo *in vitro* con fragmentos de hojas de plantas no transformadas en medio de cultivo agar-agua y diferentes concentraciones de fosfotricina. (G) Selección *in vitro* de líneas regeneradas en medio de cultivo agar-agua y fosfotricina 6.0 mg l^{-1} a los siete días. (1, 2) Líneas con resistencia a fosfotricina, (c) controles no transformados. Barra= 1.0 cm.

Posteriormente, se demostró, además, que las plantas obtenidas de embriones somáticos de soya cultivar Incasoy-27 posibles transformados, contenían los genes *bar* y *uidA*. Se encontró expresión estable del gen *uidA*, aunque con diferencias en la intensidad de la expresión GUS, lo cual no fue encontrado en las plantas controles. En la línea uno, se evidenció una mayor actividad GUS en toda la superficie de la hoja; mientras que en la línea dos, fue menos intensa con manchas aisladas en ambos meristemas de la hoja. Desafortunadamente no pudo ser evaluada la expresión GUS en la línea tres (Figura 3).

En el presente experimento, el empleo del gen *uidA* con el promotor constitutivo CaMV35S permitió demostrar que la tinción GUS fue debido a su expresión en el tejido vegetal y no por contaminación con *Agrobacterium tumefaciens*. Esto fue confirmado mediante el análisis molecular de reacción en cadena de la polimerasa.

Los fragmentos amplificados contenían las bandas de 402 y 400 pb referentes a los genes *bar* y *uidA* en las líneas regeneradas uno y

dos. Estas bandas fueron iguales a las encontradas en el control positivo referido al plasmidio (pCAMBIA3301) y no se encontraron en los controles de plantas no transformadas, lo que indica que no hubo contaminación en el proceso de manipulación del ADN genómico. En un análisis posterior en la línea tres se encontró la banda referente al gen *uidA* y no fue visible la banda del gen *bar* (Figura 4).

Los investigadores De Bondt *et al.* (1994), hicieron referencia a que la expresión transitoria depende de la adquisición del ADN-T, mientras que la expresión estable, depende de la integración funcional del ADN-T en el genoma del hospedero. Según este planteamiento, los resultados obtenidos demuestran que el gen *bar*, fue transferido e integrado de manera funcional en el genoma de las líneas regeneradas, siendo posible obtener plantas transgénicas vía *Agrobacterium tumefaciens* a partir de embriones somáticos de soya cultivar Incasoy-27. La baja eficiencia alcanzada en la transformación genética del cultivar cubano de soya Incasoy-27 (Tabla 2), se



Figura 3. Expresión estable del gen *uidA* en hojas de plantas *in vitro* de *Glycine max* cultivar Incasoy-27. (A) Control negativo; (B) Línea 1; (C) Línea 2. Barra = 0.5 cm

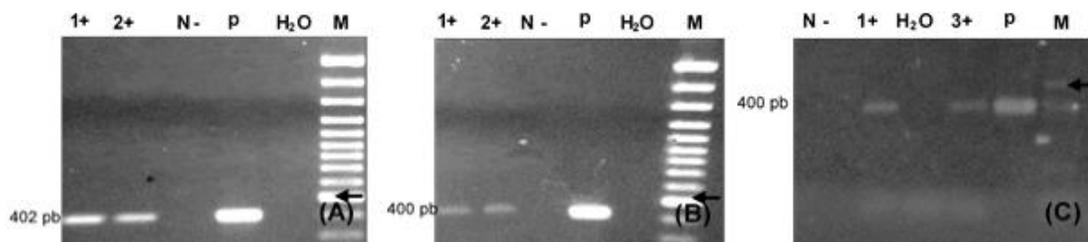


Figura 4. Electroforesis con productos amplificados en plantas de *Glycine max* cultivar Incasoy-27. Amplificación de fragmentos del gen *bar* (A) y el gen *uidA* (B) en las líneas uno y dos. (C) Amplificación de fragmentos de 400 pb del gen *uidA* en las líneas uno y tres. Las flechas indican bandas de 500 pb. Leyenda: (1+, 2+, 3+) productos de PCR de muestras de ADN de las líneas transformadas, (N) control negativo de planta no transformada, (P) control positivo con ADN plasmídico de pCAMBIA3301; (H₂O) agua estéril control negativo, (M) marcador molecular.

Tabla 2. Eficiencia en la transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en soya cultivar Incasoy-27.

Embriones somáticos transformados			Plantas regeneradas		Chequeo			Eficiencia
Inoculados	Maduros	Germinados	Total	(%)	GUS ⁺	PCR ⁺		(%)
						<i>bar</i>	<i>uidA</i>	
1 000	32	10	3	30	2	2	3	0.30

Eficiencia transformación (%) = plantas regeneradas con resistencia a fosfotricina / embriones somáticos inoculados x 100

corresponde con lo descrito en la literatura científica, tanto para la transformación genética de cotiledones y embriones somáticos vía *A. tumefaciens*, y con el uso de la biobalística en embriones somáticos (Mariashibu *et al.*, 2013).

Se plantea que un tiempo prolongado de cultivo de los embriones somáticos utilizados en la transformación genética, pudiera influir en la eficiencia de transformación genética y regeneración de plantas completas (Hazel *et al.*, 1998).

En relación con esto, Wiebke-Strohm *et al.* (2011) evaluaron diferentes plasmidios en variedades brasileñas de soya, pero combinaron la biobalística con el *A. tumefaciens*, y obtuvieron un 2.0% de eficiencia de transformación a partir de 1 225 embriones somáticos en la variedad Bragg, 5.2% de 96 embriones somáticos en la variedad Vencedora, y 12.0% en la variedad IAS5 con empleo de 4 924 embriones somáticos transformados. En otros trabajos, pero con empleo de cotiledones inmaduros, Ko *et al.* (2003) encontraron en tres experimentos de transformación genética con *A. tumefaciens*, cada uno con 225 a 267 cotiledones de la variedad Jack, entre tres y cuatro plantas por experimento, para una eficiencia de transformación entre 1.1 a 1.7%. Por ello, disponer de una metodología para obtener plantas genéticamente modificadas es un desafío en la mayoría de las variedades de soya, debido a diferencias en la respuesta en el cultivo *in vitro*, que junto a la incompatibilidad con las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y las diferencias en los procedimientos empleados, han resultado en una baja eficiencia de transformación.

CONCLUSIONES

A partir de embriones somáticos de soya cultivar Incasoy-27 transformados con *Agrobacterium tumefaciens* es posible seleccionar *in vitro* líneas transgénicas. Se demostró mediante análisis histoquímico y molecular, la integración y expresión de los genes *uidA* y *bar* en el genoma de las plantas transformadas con 0.30% de eficiencia. Los resultados de este trabajo se alcanzan por primera vez con este cultivar y cepa de *Agrobacterium tumefaciens*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo formó parte de las investigaciones realizadas en la Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas titulada: Embriogénesis somática en soya *Glycine max* (L.) Merrill cultivar 'Incasoy-27' y su aplicación en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*. Las investigaciones se realizaron en el marco del Programa de Doctorado Curricular Colaborativo en Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Esta Tesis fue defendida en el Tribunal de Ciencias Agrícolas - Fitotecnia de la República de Cuba.

Conflicto de interés

Los autores no declaran conflictos de intereses

Contribución de los autores

Conceptualización JPP, LGR y NV, Análisis formal JPP, LGR y NV, Investigación JPP, LGR, NV, LER, Metodología JPP, LGR, NV, LER, Escritura-Primera redacción JPP, Escritura-Revisión y Edición JPP, LGR y NV.

REFERENCIAS

- Dang W, Wei Z (2007) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science* 173(4): 381-389
- De Bondt A, Eggermont K, Druart P, Vil M, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports* 13(10): 587-593
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50 (1): 151-158
- Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hada A, Krishnan V, Mohamed MS, Kumari A, Jolly M, Praveen S, Sachdev A (2018) Improved *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean *Glycine max* (L.) Merr. following optimization of culture conditions and mechanical techniques. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 54: 672-688; doi: 10.1007/s11627-018-9944-8
- Hazel CB, Klein TM, Anis M, Wilde HD, Parrott WA (1998) Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Reports* 17(10): 765-772
- Hood EE, Gelvin SB, Melethers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2(4): 208-218
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6(13): 3901-3907
- Ko TS, Lee S, Krasnyanski S, Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics* 107(3): 439-447
- Kumari S, Krishnan V, Dahuja A, Vinutha T, Jolly M, Sachdev A (2016) A rapid method for optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of Indian soybean genotypes. *Indian J Biochem Biophys* 53: 218-226
- Mangena P, Mokwala P, Vassileva R (2017) Challenges of *in vitro* and *in vivo* *Agrobacterium* mediated genetic transformation in soybean. En: Minobu K (Ed). *Soybean-The Basis of Yield, Biomass and Productivity*, pp. 75-94. IntechOpen, Zagreb
- Mariashibu T, Anbazhagan R, Shu J, Ganapathi A, Ramachandran S (2013) *In vitro* regeneration and genetic transformation of soybean: Current status and future prospects. En: Board JE (Ed). *A Comprehensive Survey of International Soybean Research—Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen relationships*, pp. 413-446. InTechOpen, Croatia
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497
- Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Journal Plant Biotechnology* 216(5): 723-735
- Pareddy D, Chennareddy S, Anthony G, Sardesai N, Mall T, Minnick T, Karpova O, Clark L, Griffin D, Bishop B, Shumway N, Samuel P, Smith K, Sarria R (2020) Improved soybean transformation for efficient and high throughput transgenic production. *Transgenic Res* 29: 267-281; doi: 10.1007/s11248-020-00198-8
- Pérez J (2016) Embriogénesis somática en soya *Glycine max* (L.) Merrill cultivar Incasoy-27 y su aplicación en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas- Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba
- Pérez JL, Blanco TS, García L, Veitía N, Bermúdez I, Collado R, Torres D, Romero C (2012) Influencia del tipo e intensidad de luz en la formación y multiplicación de embriones

- somáticos de soya. Revista Colombiana de Biotecnología 14(2): 139-146
- Pérez J, García L, Veitía N, Bermúdez I, Collado R, Torres D, Romero C, Ramos A (2014) Sensibilidad al herbicida Glufosinato de amonio en plantas de soya cultivar Incasoy-27. Centro Agrícola 41(4): 63-67
- Pérez J, García LR, Veitía N, Bermúdez I, Collado R (2015) Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio para seleccionar embriones somáticos transformados de soya cultivar Incasoy-27. Cultivos Tropicales 36(3): 58-63
- Pérez J, García LR, Veitía N, Bermúdez I, Collado R, Torres D (2017) Efecto de la morfología de los embriones somáticos en la regeneración de plantas de soya (*Glycine max* L. Merrill). Cultivos Tropicales 38(2): 28-35
- Pérez J, García LR, Veitía N, Bermúdez-Caraballosa I, Collado R, Roque (2019) Influencia de maltosa y sacarosa en la maduración de embriones somáticos de *Glycine max* cv. 'Incasoy-27'. Biotecnología Vegetal 19(1): 35-42
- Ponce M, de la Fé C, Ortiz R, Moya C (2003) Informe de nuevas variedades, INCASOY-24 e INCASOY-27: Nuevas variedades de soya para las condiciones climáticas de Cuba. Cultivos Tropicales 24(3): 49
- Rao SS, Mamadou L, Mcconnell M, Polisetty R, Kwanyuen P, Hildebrand DF (2009) Non-antibiotic selection systems for soybean somatic embryos: the lysine analog aminoethyl-cysteine as a selection agent. BMC Biotechnology 9(1): 94
- RNBA (2020) Resultados experimentales de la Red Nacional de Biotecnología Agrícola, una experiencia exitosa de articulación público-privada en investigación. Revista INIA (60): 87-91
- Rojas LE, Reyes M, Pérez N, Olóriz MI, Posada L, Ocaña B, Portal O, Chong B, Pérez JL (2014) Extracción *in situ* de ADN genómico para el análisis por PCR de regiones de interés en cuatro especies vegetales y un hongo filamentoso. Biotecnología Vegetal 14 (3): 151-154
- Thompson C, Mowva R, Tizard R, Cramer R, Davies J, Lauwereys M, Bottermann J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal 6(9): 2519-2523
- Tougou M, Yamaghisi N, Furutani N, Kaku K, Shimizu T, Takahata Y, Sakai J, Kanematsu S, Hidaka S (2009) The application of the mutated acetolactate synthase gene from rice as the selectable marker gene in production of transgenic soybean. Plant Cell Reports 28(5): 769-776
- Wiebke-Strohm B, Droste A, Pasquali G, Borges M, Bucker-Neto L, Pereira LM, Bencke M, Schenkel M, Margis-Pinheiro M, Bonadese-Zanettini ME (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

Recibido: 13-10-2020

Aceptado: 23-12-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.