

EFECTO DEL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA RESPUESTA EMBRIOGÉNICA DE SOYA CULTIVAR INCASoy-27

Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on embryogenic response of soybean cultivar INCASoy-27

Jorge L. Pérez Pérez[✉], Lourdes García Rodríguez, Novisel Veitía Rodríguez, Idalmis Bermúdez Carabaloso y Raúl Collado López

ABSTRACT. The aim of this work was to evaluate the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the embryogenic response of Cuban soybean cultivar INCASoy-27. Immature zygotic cotyledons between 3,0-4,0 mm length were placed with the abaxial surface on the culture medium for embryos induction. The culture medium was formulated with concentrations of 15, 25, 35, 40 and 45 mg.L⁻¹ 2,4-D. After four weeks in culture medium, the number of embryogenic cotyledons in the total of cotyledons and number of somatic embryos by embryogenic cotyledon was quantified. The percentage of immature zygotic cotyledons that produced somatic embryos varied between 23-93 % with 2,4-D concentration in the culture medium. The average number of somatic embryos formed per immature cotyledon fluctuated from 1,2 to 7,9 while in embryogenic cotyledons was 5,3 to 8,5 somatic embryos. The major response of this morphogenetic route was obtained at a concentration range of 40 and 45 mg.L⁻¹ 2,4-D in the culture medium. A differentiation process of somatic embryos with asynchrony in morphology began in the fourth week of culture.

Key words: somatic embryogenesis, *Glycine max*, plant growth regulators

RESUMEN. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) en la respuesta embriogénica de soya cultivar cubano INCASoy-27. Se emplearon cotiledones cigóticos inmaduros entre 3,0-4,0 mm de longitud, colocados con la superficie abaxial sobre el medio de cultivo de formación de embriones somáticos. El medio de cultivo fue formulado con concentraciones de 15, 25, 35, 40 y 45 mg.L⁻¹ 2,4-D. Después de cuatro semanas en medio de cultivo, se cuantificó el número de cotiledones embriogénicos, número de embriones somáticos formados en el total de los cotiledones y número de embriones somáticos por cotiledón embriogénico. La frecuencia en la respuesta embriogénica de los cotiledones cigóticos inmaduros varió con la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo de 23-93 %. El número medio de embriones somáticos formados por cotiledón inmaduro fluctuó entre 1,2 a 7,9 mientras que en cotiledones embriogénicos fue de 5,3 a 8,5 embriones somáticos. La mejor respuesta de esta ruta morfogénica se obtuvo en las concentraciones de 40 y 45 mg.L⁻¹ de 2,4-D en el medio de cultivo. En la cuarta semana de cultivo inició un proceso de diferenciación de los embriones somáticos con asincronía en su morfología.

Palabras clave: embriogénesis somática, *Glycine max*, reguladores del crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

El frijol de soya [*Glycine max*, (L.) Merrill], es uno de los diez cultivos de mayor importancia económica en la agricultura mundial, debido fundamentalmente a su alto

contenido en aceite y proteínas (1). Además, contiene lecitina, vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales (triptófano, glicina, lisina) y metabolitos secundarios (2).

En Cuba, por su importancia económica ha sido empleada en programas de mejoramiento genético por métodos tradicionales. Por esta vía, a partir de hibridación natural en el genotipo brasileño BR-32 se obtuvo el cultivar cubano INCASoy-27, con alto contenido en proteína bruta y capacidad para la siembra en época de primavera (3).

Otra alternativa para el mejoramiento genético es a través del cultivo de tejidos, con empleo de la organogénesis a partir de nudos cotiledonales y

M.Sc. Jorge L. Pérez-Pérez, Profesor Asistente, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad Granma, carretera vía Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba, CP 85100; Dra.C. Lourdes García Rodríguez, Investigador Titular, Dr.C. Novisel Veitía, Investigador Agregado, Dra.C. Idalmis Bermúdez Carabaloso, Investigador Agregado y M.Sc. Raúl Collado López, Investigador Agregado, Laboratorio de Mejora Genética del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830.

✉ jperez@udg.co.cu

embriogénesis somática en cotiledones cigóticos inmaduros, como rutas morfogenéticas para la regeneración de plantas (4).

Diversos estudios indican que una de las etapas más importante en el proceso de regeneración de plantas de soya a través de la embriogénesis somática, es la formación de embriones somáticos y que existen diferencias entre los genotipos en su capacidad para desarrollar la embriogénesis somática debido al efecto genotipo dependiente (5).

Además, la embriogénesis somática es un evento multifactorial influenciado por diversos factores, donde la aplicación de reguladores del crecimiento y los niveles endógenos de hormonas particularmente las auxinas, se consideran uno de los factores clave para la adquisición de la competencia embriogénica en los tejidos vegetales (6).

Entre las auxinas se destaca el 2,4-D, el cual ha sido empleado en la formación de embriones somáticos de soya en un rango de concentraciones entre 1,0-80 mg.L⁻¹, con variaciones en dependencia del tejido vegetal y el cultivar empleado (7, 8).

En estudios similares en el cultivar cubano INCASoy-24 los valores más altos en la respuesta embriogénica, se obtuvieron con 30 mg.L⁻¹ 2,4-D en el medio de cultivo. En contraste, en el cultivar Williams-82 el mayor número de embriones somáticos se logró en las concentraciones de 40 y 50 mg.L⁻¹ 2,4-D. Estos resultados evidencian la condición genotipo-dependiente de esta especie y limita el empleo de los protocolos existentes (9).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D, para la formación de embriones somáticos de soya en el cultivar cubano INCASoy-27.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Para obtener plantas donantes del cultivar INCASoy-27, fueron sembradas semillas maduras en bolsas de polietileno (26 x 36 cm) que contenían como sustrato materia orgánica (75 %) y zeolita (25 %), las cuales crecieron en casa de cultivo.

A partir de las plantas donantes, se tomaron legumbres que contenían cotiledones cigóticos inmaduros de 3-4 mm de longitud.

DESINFECCIÓN

Para su desinfección en cabina de flujo laminar horizontal (IKEM), fueron lavadas con agua corriente y detergente comercial; sumergidas en etanol 70 % (v/v) durante un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se realizó una inmersión en hipoclorito de sodio 2 % (v/v) con seis gotas de Tween-20 durante diez minutos y se lavó cuatro veces con agua destilada estéril.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los cotiledones cigóticos inmaduros fueron colocados con la superficie abaxial, sobre el medio de cultivo de formación de embriones somáticos, compuesto por las sales MS (10), vitaminas B5, sacarosa 3 %, 2,4-D (15, 25, 35, 45 mg.L⁻¹), Gelrite® 0,3 % y pH 7. Como tratamiento control se empleó 40 mg.L⁻¹ 2,4-D, que es la base de los protocolos empleados.

Se emplearon frascos de vidrio de 250 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio de cultivo y siete cotiledones cigóticos inmaduros, colocados en cámara de crecimiento con luz artificial proporcionada por lámparas fluorescente con intensidad luminosa de 68-73 μE.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad a 26±2°C.

A las cuatro semanas de cultivo, se contó el número de cotiledones cigóticos inmaduros con formación de embriones somáticos (%), número de embriones somáticos en el total de los cotiledones cigóticos inmaduros, número de embriones somáticos en los cotiledones embriogénicos y se realizó una caracterización morfológica de los embriones somáticos. Para ello, se utilizó un microscopio estereoscópico (*Olympus*, Japón, 10x) y las fotos se tomaron con ayuda de una cámara digital.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el experimento se utilizó un diseño factorial completamente al azar, con siete cotiledones cigóticos inmaduros por frascos de vidrio y diez réplicas por tratamiento para un total de 70 cotiledones por tratamiento.

Posterior a la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos relacionados con el número de cotiledones con formación de embriones somáticos, se realizó un análisis de varianza simple y la comparación de los valores medios mediante la prueba de la mínima diferencia significativa.

Para la comparación de las medias relacionadas con el número de embriones somáticos por cotiledón cigótico inmaduro y número de embriones somáticos por cotiledón embriogénico, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis/Mann Whitney.

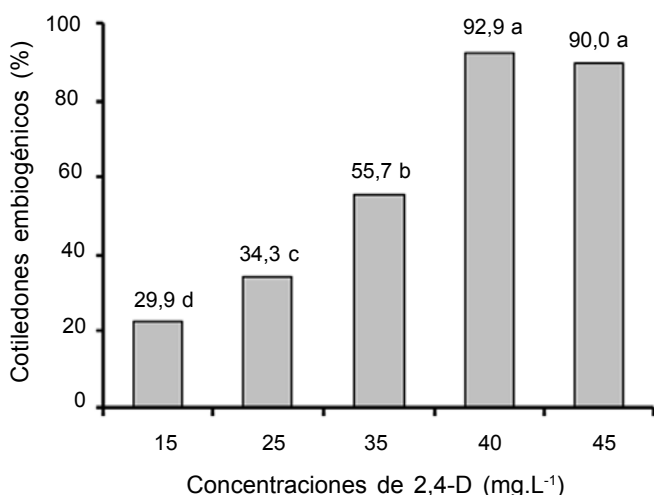
En todos los casos se utilizó un intervalo de confianza $p \leq 0,05$. Para el procesamiento de los datos se empleó el programa estadístico SPSS (*Statistic Package for Social Science*) versión PASW Statistics 18.

RESULTADOS

Se observó que el regulador del crecimiento (2,4-D), influyó en la respuesta embriogénica de los cotiledones cigóticos inmaduros del cultivar cubano de soya INCASoy-27. En todas las concentraciones evaluadas, se observó la formación de estructuras embriogénicas en la superficie adaxial de los cotiledones. No obstante, en concentraciones de 40 y 45 mg.L⁻¹ de 2,4-D se lograron

los mayores porcentajes de cotiledones embriogénicos (Figura 1).

Este resultado permite confirmar que se requiere del estímulo de este regulador de crecimiento para inducir la respuesta embriogénica de los cotiledones cigóticos inmaduros en soya.



Medias con letras diferentes sobre las barras difieren según la prueba de la mínima diferencia significativa $p \leq 0,05$

Figura 1. Efecto de la concentración del ácido 2,4-D en el número de cotiledones cigóticos inmaduros con respuesta embriogénica en el cultivar de soya INCASoy-27 a las cuatro semanas de cultivo

En cuanto al número promedio de embriones somáticos formados en el total de los cotiledones cigóticos inmaduros por tratamiento, se observaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas, con el mayor número de embriones somáticos al colocar los cotiledones inmaduros en medio de cultivo enriquecido con 40 y 45 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Tabla I). Sin embargo, en los cotiledones embriogénicos se obtuvo la mayor formación de embriones somáticos en un rango de concentraciones entre 25 y 45 mg.L⁻¹ de 2,4-D las cuales difieren de los resultados al emplear una concentración inferior.

Los embriones somáticos primarios aparecieron en zonas necróticas de los cotiledones y dieron origen a una embriogénesis somática directa, al no existir una fase intermedia de formación de callo.

Tabla I. Efecto de las concentraciones del ácido 2,4-D en la formación de embriones somáticos en el cultivar de soya INCASoy-27

2,4-D (mg.L ⁻¹)	Embriones somáticos/cotiledón inmaduro	Rangos medios	Embriones somáticos/cotiledón embriogénico	Rangos medios
15	1,2±0,4	105,6 c	5,3±1,3	76,0 b
25	2,7±0,7	130,2 c	7,9±1,7	98,7 ab
35	3,8±0,7	166,2 b	6,9±0,9	98,1 ab
40 (control)	7,9±0,8	242,6 a	8,5±0,8	112,7 a
45	7,5±1,0	232,9 a	8,3±1,1	107,8 a

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann Whitney, $p \leq 0,05$ (\pm error estándar)

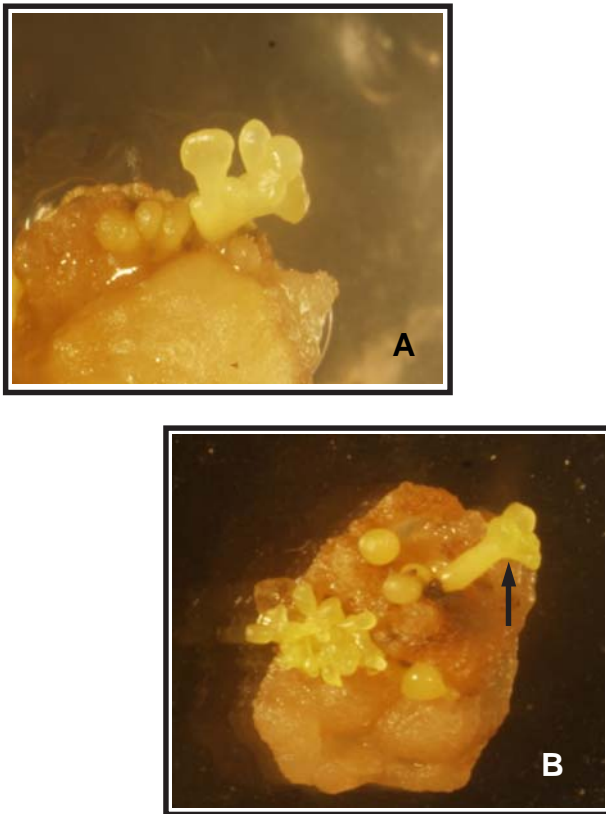
Estas estructuras eran de color amarillo, consistencia dura, morfología globular, formados como unidades independientes que podían ser separados del tejido vegetal y organizados en pequeños grupos o aislados (Figura 2).



Figura 2. Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones cigóticos inmaduros en el cultivar de soya INCASoy-27 a las cuatro semanas en medio de cultivo con ácido 2,4-D

En este experimento se observó la formación estratificada de embriones somáticos, dando origen a embriones somáticos secundarios, tanto en la superficie apical como basal de los embriones somáticos primarios, mediante un proceso conocido como embriogénesis somática repetitiva (Figura 3a).

Igualmente fueron visibles embriones somáticos en diferentes estadios desarrollo, con la existencia de embriones somáticos en etapa globular y cotiledonal con características bipolares, las cuales son típicas de esta ruta morfogénica (Figura 3b).



(A) formación estratificada de embriones somáticos secundarios, (B) embrión somático en etapa cotiledonal

Figura 3. Morfología de embriones somáticos en el cultivar de soya INCASoy-27 a los 28 días de cultivo

Estos embriones somáticos permanecieron en estado globular durante las primeras tres semanas de cultivo. Luego comenzó un proceso de diferenciación asincrónico con diferentes tamaños y grados de desarrollo, que inició en la menor concentración del regulador de crecimiento empleada.

DISCUSIÓN

La influencia del 2,4-D en la formación y multiplicación de embriones somáticos de soya ha sido referida en la literatura científica, la cual varía entre los diferentes genotipos y es influenciado por el estado fisiológico del tejido (11).

Estudios similares refieren poca formación de embriones somáticos con empleo de bajas concentraciones de 2,4-D, lo cual fue mejorado al combinar altas concentraciones (40 mg.L⁻¹ 2,4-D) y el empleo de los cotiledones cigóticos inmaduros como explante, siendo la base de los protocolos actuales (12).

Los resultados que se muestran en este trabajo, concuerdan con los obtenidos en el genotipo cubano INCASoy-35, donde se alcanzó el mayor número de embriones somáticos cuando los cotiledones cigóticos inmaduros fueron establecidos en medio de cultivo con 40 mg.L⁻¹ 2,4-D. En contraste, en el cultivar INCASoy-24 los valores más altos se obtuvieron en la concentración con 30 mg.L⁻¹ 2,4-D (9).

Estos resultados evidencian la condición genotipo-dependiente de esta especie, en lo que respecta a las concentraciones de auxina exógena requeridas para inducir la formación de embriones somáticos y la capacidad embriogénica de los diferentes genotipos.

En este sentido, se ha referido que en cultivares japoneses se requieren concentraciones de 40-80 mg.L⁻¹ 2,4-D para inducir las formaciones de estructuras embriogénicas (8). Por su parte, en el genotipo taiwanés K10, no se obtuvo respuesta embriogénica en un rango de concentraciones entre 9-45 mg.L⁻¹ 2,4-D aludido a la influencia del genotipo. Esto ha motivado el estudio de diferentes rangos de concentraciones de 2,4-D los cuales deben ser optimizados para cada cultivar (13).

Por otro lado, la respuesta embriogénica en soya es considerada un carácter heredable, atribuido a la estrecha base genética que existe entre cultivares. A partir de esto podemos inferir que los resultados en el cultivar INCASoy-27, son un reflejo de la capacidad embriogénica heredada a partir de su progenitor brasileño BR-32.

Sin embargo, los resultados en el cultivar cubano INCASoy-27 difieren de los alcanzados por otros autores en el genotipo BR-32. Por ejemplo, después de 45 días de cultivo en 40 mg.L⁻¹ 2,4-D, el 1,0 % de los cotiledones tenían respuesta embriogénica, con un promedio 0,1 embrión somático por par de cotiledón embriogénico (14).

Esta variabilidad en la formación de embriones somáticos también fue descrita en diez cultivares brasileños con un rango de 0,12 a 2,30 embriones somáticos después de seis semanas de cultivo (15).

Por otra parte, el proceso de diferenciación observado en este trabajo, es atribuido a una concentración auxínica inferior a la requerida, donde los embriones somáticos continúan su desarrollo hasta agotar los nutrientes del medio de cultivo e inician su proceso de diferenciación. En contraste, cuando existen altos niveles de auxinas en el medio de cultivo, se induce la formación de embriones somáticos que permanecen en la fase globular y dan origen a embriones somáticos secundarios (11).

Esto concuerda con los resultados de otros autores, quienes refieren que al colocar los cotiledones cigóticos inmaduros en medio de cultivo con 5,0 mg.L⁻¹ 2,4-D, se generaron embriones somáticos en los cuales rara vez se observó la etapa globular y torpedo, pasando a etapas más avanzadas en cortos periodos de tiempo. Por el contrario, las estructuras inducidas con 44 mg.L⁻¹ de 2,4-D se mantuvieron en etapa globular (16).

Por otro lado, esta influencia en la respuesta embriogénica a causa de la concentración de 2,4-D, está relacionada con su posible efecto como modulador de

los niveles de hormonas endógenas del mismo grupo como el ácido indol-3-acético (AIA) presente en el tejido vegetal, debido a disturbios en el metabolismo de la auxina endógena (17).

Así en la búsqueda de un equilibrio en la célula vegetal una determinada concentración de 2,4-D puede crear un doble efecto, actuar como auxina o alterar el metabolismo del AIA endógeno para promover su producción, de esta forma incrementa la sensibilidad de las células al conferirle competencia embriogénica y comienza un proceso de división celular mitótico (17). Además, existen evidencias que demuestran que el 2,4-D funciona como una sustancia de estrés, capaz de activar la adquisición de competencia embriogénica en la célula vegetal (18).

Los resultados que se muestran corroboran la influencia de la concentración del 2,4-D en la respuesta embriogénica en esta especie y permitió seleccionar la concentración de 40 mg.L⁻¹ 2,4-D como adecuada, para desarrollar la embriogénesis somática en el cultivar cubano de soya INCASoy-27.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los técnicos de laboratorio Damaris Torres y Carlos Romero, por haber contribuido en la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Taski-Ajdukovic, K.; Djordjevic, V.; Vidic, M. y Vujakovic, M. Subunit composition of seed storage proteins in high-protein soybean genotypes. *Pesq. Agropec. Bras.*, 2010, vol. 45, no. 7, p. 721-729.
- Radhakrishnan, R. y Ranjithakumari, B. D. Changes in protein content in micropropagated and conventional soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 2009, vol. 5, no. 2, p. 186-189.
- Ponce, M.; de la Fé, C.; Ortiz, R. y Moya, C. Informe de nuevas variedades. INCASoy-24 e INCASoy-27: Nuevas variedades de soya para las condiciones climáticas de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 3, p. 49.
- Yang, C.; Zhao, T.; Yu, D. y Gai, J. 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*, 2009, vol. 45, no. 2, p. 180-188.
- Droste, A.; Machado, A.; Freitas, I.; Wiebke-Strohm, B.; Bucker-Neto, L.; Bencke, M.; Viviane, M. y Bodanese-Zanettini, M. H. Screening of Brazilian soybean genotypes with high potential for somatic embryogenesis and plant regeneration. *Pesq. agropec. bras.*, 2010, vol. 45, no. 7, p. 715-720.
- Karami, O. y Saidi, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol. Biol. Rep.*, 2010, vol. 37, no. 5, p. 2493-2507.
- Jin, Y.; Il, T.; Soon, H.; Ki, H.; Uk, S. y Joong, S. Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. *Journal of Plant Biotech.*, 2004, vol. 6, no. 1, p. 45-50.
- Hiraga, S.; Minakawa, H.; Takahashi, K.; Takahashi, R.; Hajika, M.; Harada, K. y Ohtsubo, N. Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnol.*, 2007, vol. 24, no. 4, p. 435-440.
- Bermúdez-Carabaloso, I.; Socorro, T.; Pérez-Pérez, J.; García, L. R.; Veitia, N.; Collado, R.; Torres, D. y Romero, C. Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de embriones somáticos en variedades cubanas de soya. *Biocología Vegetal*, 2012, vol. 12, no. 2, p. 93-97.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, no. 3, p. 473-497.
- Widholm, J. M.; Finer, J. J.; Vodkin, L. O.; Trick, H. N.; LaFayette, P.; Li, J. y Parrott, W. Soybean. En: F. Kempken y C. Jung (eds.), *Genetic Modification of Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry 64*, (Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, p. 473-498.
- Dinkins, R. D. y Collins, G. B. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Soybean. En: Taylor & Francis Group (eds.), *Handbook of New Technologies for Genetic Improvement of Legumes*. (Ed.) P.B. Kirti CRC Press, 2008, p. 89-102.
- Loganathan, M.; Maruthasalam, S.; Shiu, L. Y.; Lien, W. C.; Hsu, W. H.; Lee, P. F.; Yu, C. W. y Lin, C. H. Regeneration of soybean (*Glycine max*, L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2010, vol. 46, no. 3, p. 265-273.
- Droste, A.; Pimentel, P. C.; Pasquali, G.; Mundstock, E. C. y Bodanese-Zanettini, M. H. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Scientia Agricola*, 2001, vol. 58, no. 4, p. 753-758.
- Regina, L.; Lucca, A.; Martinho, B. G.; Negra, E. S.; Kelly, P. y Schuster, I. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 2011, vol. 33, no. 1, p. 67-74.
- Shoemaker, R. C.; Amberger, L. A.; Palmer, R. G.; Oglesby, L. y Ranch, J. P. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1991, vol. 27, p. 84-88.
- Deo, P. C.; Tyagi, A. P.; Taylor, M.; Harding, R. M. y Becker, D. K. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 2010, vol. 28, no. 1, p. 27-40.
- Sharma, S. K.; Millam, S.; Hedley, P. E.; McNicol, J. y Bryan, G. J. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: An auxin led perspective. *Plant Mol. Biol.*, 2008, vol. 68, p. 185-201.

Recibido: 9 de abril de 2012

Aceptado: 5 de octubre de 2012

¿Cómo citar?

Pérez Pérez, Jorge L.; García Rodríguez, Lourdes; Veitia Rodríguez, Novisel; Bermúdez Carabaloso, Idalmis y Collado López, Raúl. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la respuesta embriogénica de soya cultivar INCASoy-27. *Cultivos Tropicales*, 2013, vol. 34, no. 3, p. 40-44.