



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL DE GLUFOSINATO DE AMONIO PARA SELECCIONAR EMBRIONES SOMÁTICOS TRANSFORMADOS DE SOYA CULTIVAR INCASOY-27

Determination of minimum lethal concentration of Glufosinate-ammonium for selection of transformed somatic embryos of soybean cultivar INCASoy-27

Jorge L. Pérez-Pérez^{1, 2✉}, Lourdes García Rodríguez¹, Novisel Veitía¹, Idalmis Bermúdez-Caraballoso¹, Raúl Collado López¹ y Damaris Torres Rodríguez¹

ABSTRACT. The establishment of a genetic transformation program requires a selection *in vitro* system of transformed tissues. In the *Glycine* genus exists few references that employ the Glufosinate-ammonium that selective agent in transformed somatic embryos. For this reason this work had as objective to determine the minimum lethal concentration of the herbicide Glufosinate-ammonium in somatic embryos of Cuban soybean cultivar INCASoy-27, to use as selective agent in genetic transformation programs. The soybean somatic embryos were placed on multiplication medium that contained 2,4-dichlorophenoxyacetic acid 20 mg L⁻¹ with different concentrations of Glufosinate-ammonium (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mg L⁻¹). All concentrations of selective agent caused necrosis in not transformed soybean somatic embryos. The increments of selective agent concentration and culture time increased the necrosis of somatic embryos. Finally was determined the minimum lethal concentration of 6,0 mg L⁻¹ Glufosinate-ammonium in semisolid medium, that selective agent in the genetic transformation of somatic embryos of soybean cultivar INCASoy-27.

Key words: agents, somatic embryogenesis, phosphinothricin, *Glycine max*, genetic transformation

RESUMEN. El establecimiento de un programa de transformación genética de plantas requiere de un sistema de selección *in vitro* de los tejidos transformados. En el género *Glycine* existen pocas referencias que emplean el Glufosinato de amonio como agente selectivo de embriones somáticos transformados. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración mínima letal del herbicida Glufosinato de amonio en embriones somáticos de soya cultivar cubano INCASoy-27, para usarlo como agente selectivo en programas de transformación genética. Los embriones somáticos fueron colocados en medio de cultivo de multiplicación con 20 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y diferentes concentraciones de Glufosinato de amonio (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mg L⁻¹). Todas las concentraciones del agente selectivo causaron necrosis en embriones somáticos no transformados de soya. El incremento de la concentración del agente selectivo y el tiempo de cultivo, aumentó la necrosis de los embriones somáticos. Finalmente se determinó la concentración mínima letal de Glufosinato de amonio 6,0 mg L⁻¹, en medio de cultivo semisólido, requerida para su empleo como agente selectivo en la transformación genética de embriones somáticos de soya cultivar INCASoy-27.

Palabras clave: agentes, embriogénesis somática, fosfínóttrica, *Glycine max*, transformación genética

INTRODUCCIÓN

La soya [*Glycine max* (L.) Merrill], es uno de los cultivos de mayor importancia económica en la agricultura mundial, debido al alto contenido de aceite y proteínas de sus semillas, por lo que es útil para fines alimenticios e industriales (1).

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

² Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba.

✉ jperez@udg.co.cu

Debido a su importancia económica se han desarrollado programas de mejora genética a través de métodos tradicionales, los cuales presentan limitaciones por el bajo potencial de variabilidad genética entre cultivares. En este sentido, la transformación genética ofrece la posibilidad de obtener nuevos cultivares rompiendo las barreras sexuales. Sin embargo, la transferencia de genes no siempre es estable, debido a la baja eficiencia y aleatoriedad en la integración del ácido desoxirribonucleico (ADN) foráneo en el genoma de la célula hospedera, siendo necesario un sistema de selección de los tejidos transformados (2).

En soya, la mayoría de los trabajos de transformación genética emplean como agente selectivo el antibiótico higromicina (3, 4, 5). Sin embargo, a nivel internacional existe un rechazo al empleo de antibióticos como agentes selectivos, debido al potencial de incorporación de los genes marcadores de selección en patógenos humanos (6). Cabe resaltar que pocos trabajos publicados utilizan el herbicida Glufosinato de amonio en la selección de embriones somáticos transformados de esta especie (6, 7).

El Glufosinato de amonio es un compuesto sintetizado químicamente, conocido comercialmente como Basta® y Finale®. Este compuesto contiene como ingrediente activo fosfotricina, que es un tripéptido natural producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* y el componente herbicida de bialafos. El Glufosinato de amonio es un herbicida inhibidor de la glutamina sintetasa, enzima que interviene en la asimilación de amonio y en la regulación del nitrógeno en las plantas (2).

Por lo antes expuesto, para realizar un proceso de selección eficiente se requiere conocer la mínima concentración letal del agente selectivo que elimine las células y tejidos no transformados. Por el contrario, el uso de altas concentraciones puede causar la muerte de aquellas células donde la resistencia adquirida puede ser inferior a la concentración empleada.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración mínima letal del herbicida Glufosinato de amonio en embriones somáticos de soya cultivar cubano INCASoy-27, para utilizarlo como agente selectivo en programas de transformación genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas en Santa Clara, Cuba. Se empleó el cultivar de soya INCASoy-27, obtenido en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas mediante hibridación natural en el genotipo brasileño BR-32.

Para los ensayos en condiciones de cultivo *in vitro*, se partió de cotiledones cigóticos inmaduros provenientes de vainas de plantas donantes. Las vainas fueron desinfectadas con agua corriente y detergente. Luego fueron sumergidas en etanol al

70 % (v/v) durante 20 segundos y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Al finalizar, en cabina de flujo laminar, se realizó una inmersión en hipoclorito de sodio (2,0 %) (v/v) durante diez minutos seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril.

Los cotiledones cigóticos inmaduros fueron extraídos y colocados en frascos de cultivo de 250 mL que contenían medio de cultivo de formación de embriones somáticos, compuesto por las sales MS (8), vitamina B5, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 40 mg L⁻¹, sacarosa 3,0 %, Gelrite® 0,3 % y pH 7, durante cuatro semanas de cultivo. Los embriones somáticos fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación, compuesto por las sales MS, vitamina B5, 2,4-D 20 mg L⁻¹, sacarosa 3,0 %, Gelrite® 0,3 % y pH 5,8 durante tres semanas de cultivo.

Luego los embriones somáticos fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación enriquecido con diferentes concentraciones de Glufosinato de amonio. Para ello, se evaluaron seis concentraciones del herbicida (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mg L⁻¹) y un tratamiento control para un total de siete tratamientos.

El Glufosinato de amonio se preparó a una concentración de 20 mg mL⁻¹ y se esterilizó por filtración con ayuda de un filtro de membrana estéril con un tamaño del poro de 0,22 µm. Las soluciones del agente selectivo fueron adicionadas cuando el medio de cultivo alcanzó una temperatura aproximada de 40 °C previo a la solidificación.

Para determinar la concentración mínima letal del Glufosinato de amonio, se realizaron cinco ciclos de selección de embriones somáticos sin transformar en medio de cultivo de multiplicación que contenía el agente selectivo. Cada 10 días se realizó el subcultivo durante siete semanas correspondiendo con los ciclos de selección. En cada subcultivo, se tomó una muestra de embriones somáticos y fue transferida a medio de cultivo de multiplicación sin el agente selectivo, para comprobar la inhibición de la capacidad regenerativa de los embriones somáticos.

Para cada tratamiento se tomaron diez placas de Petri de 5,0 cm de diámetro que contenían cinco grupos con aproximadamente 30 embriones somáticos en etapa globular. Para los subcultivos los embriones somáticos fueron tomados con una espátula y disgregados sobre el medio de cultivo para facilitar un mayor contacto con el herbicida presente.

En cada subcultivo se describieron los daños causados por el Glufosinato de amonio y se evaluó el grado de mortalidad de los embriones somáticos de cada tratamiento.

Para ello, se empleó un microscopio óptico OPTON (Axioskop) y la escala de evaluación del grado de mortalidad (9): sin afectación (grado 1), necrosis 25 % (grado 2), necrosis 50 % (grado 3), necrosis 75 % (grado 4) y necrosis total (grado 5).

Las placas Petri fueron selladas con *Parafilm*[®] y colocadas en cámara de crecimiento con luz artificial, intensidad luminosa 68-73 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) a 24 ± 2 °C. La intensidad luminosa dentro de la cámara de crecimiento se midió con un luxómetro EXTECH 401025.

El análisis de los datos se realizó con ayuda del paquete estadístico *Statistic Packaged for Social Science* (SPSS) versión 18. Los datos referentes al grado de mortalidad de los embriones somáticos se procesaron mediante la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann-Whitney* ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se logró definir la concentración mínima letal del herbicida Glufosinato de amonio usado como agente selectivo en embriones somáticos sin transformar de soya cultivar INCASoy-27, nunca antes descrito en genotipos cubanos de soya.

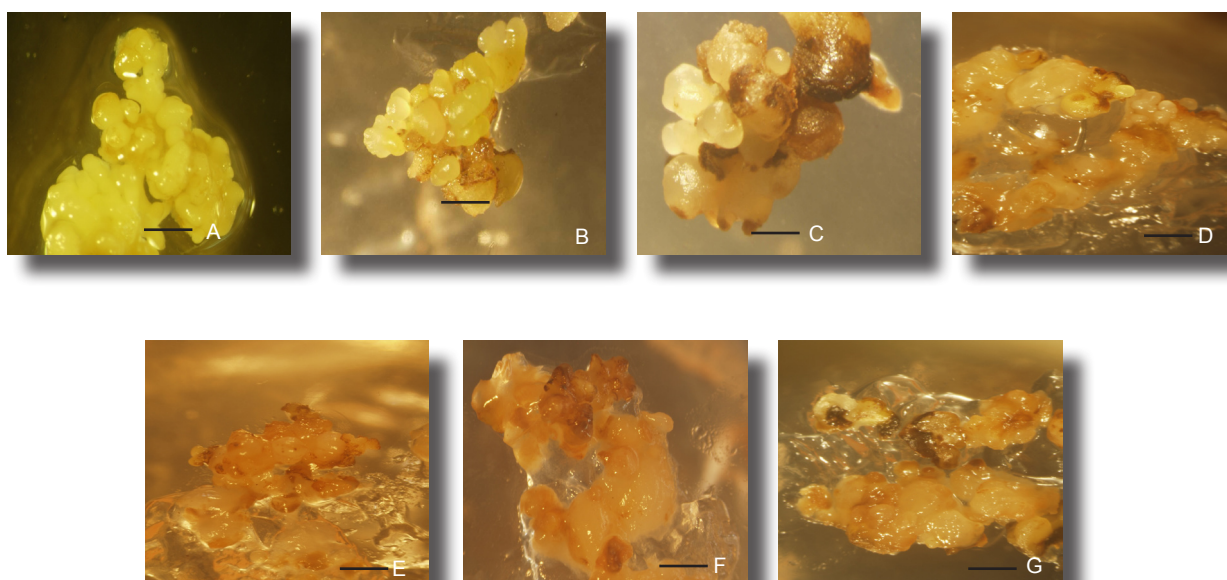
Todas las concentraciones evaluadas de Glufosinato de amonio causaron afectaciones sobre los embriones somáticos no transformados de soya cultivar INCASoy-27. A partir de los 15 días de cultivo se observó que los embriones somáticos adquirieron un color pardo, que se intensificó con el tiempo de cultivo.

Después de 30 días, los embriones somáticos tenían un aspecto necrótico, debido al incremento de la concentración del agente selectivo y el tiempo de cultivo. Sin embargo, en el tratamiento control sin el agente selectivo, los embriones somáticos mantuvieron su color amarillo y su capacidad de multiplicación (Figura 1).

Al analizar el grado de mortalidad a las seis semanas en medio de cultivo con el agente selectivo, se observó que en la medida que aumentaron las concentraciones del Glufosinato de amonio se incrementó el grado de afectación de los embriones somáticos. También se observó que las concentraciones de 5,0 mg L^{-1} y 6,0 mg L^{-1} del agente selectivo produjeron los mayores valores en el grado de mortalidad, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla I).

Los mayores valores de mortalidad de embriones somáticos se alcanzaron con las concentraciones de 5,0 y 6,0 mg L^{-1} de Glufosinato de amonio con diferencias significativas con el resto de las concentraciones evaluadas. En estas concentraciones se manifestó entre el 80-100 % de necrosis total de los embriones somáticos (Figura 2).

Sin embargo, en las concentraciones con 3,0 y 4,0 mg L^{-1} del agente selectivo, se observó necrosis en el 50-100 % de la superficie del tejido y en la totalidad de los embriones somáticos evaluados (Figura 2).



(A) control, (B) 1,0 mg L^{-1} , (C) 2,0 mg L^{-1} , (D) 3,0 mg L^{-1} , (E) 4,0 mg L^{-1} , (F) 5,0 mg L^{-1} , (G) 6,0 mg L^{-1} . Barra=1,0 mm.

Figura 1. Efecto de las concentraciones de Glufosinato de amonio en los embriones somáticos de soya cultivar INCASoy-27 a los 30 días en medio de cultivo de multiplicación.

Tabla I. Efecto de las diferentes concentraciones del herbicida Glufosinato de amonio en los embriones somáticos de soja cultivar INCASoy-27 a los 40 días en medio de cultivo de multiplicación .

Glufosinato de amonio (mg L ⁻¹)	Grado de mortalidad en los embriones somáticos	
	Media	Rangos medios
0	1,00	26,50 e
1,0	2,16	83,72 d
2,0	3,22	144,09 c
3,0	3,98	198,57 b
4,0	4,28	222,12 b
5,0	4,74	267,03 a
6,0	5,00	286,47 a

Letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba Kruskal-Wallis /Mann Whitney ($p \leq 0,05$).

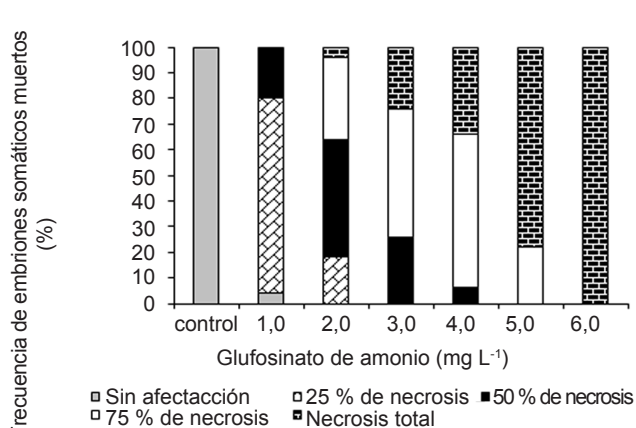


Figura 2. Efecto de las concentraciones de Glufosinato de amonio en embriones somáticos de soja cultivar INCASoy-27 a los 40 días en medio de cultivo de multiplicación.

A partir de estos resultados se seleccionó 6,0 mg L⁻¹ como la mínima concentración de Glufosinato de amonio a emplear como agente selectivo en embriones somáticos transformados de soja cultivar INCASoy-27 en medio de cultivo semisólido.

Para ello, se tuvo en cuenta que a partir de esta concentración el 100 % de los embriones somáticos evaluados tenían necrosis total.

El necrosamiento observado en los embriones somáticos es un reflejo del efecto fitotóxico del Glufosinato de amonio, dada la inhibición de la glutamina sintetasa, una enzima esencial para la asimilación de amonio y la regulación del nitrógeno en los tejidos (10).

La Sociedad Americana de Ciencias de las Malezas (por sus siglas en inglés: WSSA, *Weed Science Society of America*), define la resistencia como la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de exponerse a una concentración de herbicida letal en la especie salvaje. Esta puede ser natural o inducida por Ingeniería Genética, selección de variantes producidas por cultivo de células y tejidos o mediante mutagénesis (11).

Por otro lado, la eficiencia de la transformación genética puede ser mejorada variando la concentración y duración del régimen de selección o el empleo de diferentes marcadores y agentes de selección.

La literatura consultada (7) refiere el empleo de higromicina 30 mg L⁻¹ o fosfotricina 80 mg L⁻¹ en medio de cultivo líquido durante la selección de embriones somáticos transformados de soja. Como resultado obtuvieron 12 líneas transgénicas con resistencia a higromicina. Sin embargo, solo dos líneas mostraron resistencia a fosfotricina, y en una de ellas se confirmó la presencia del gen *bar*. Todas las plantas resultaron estériles, atribuido a la edad de los tejidos embriogénicos y al método de transformación empleado.

El Glufosinato de amonio se ha probado en un amplio rango de concentraciones, acorde con el empleo de medio de cultivo líquido o semisólido. En un estudio, embriones somáticos transformados de soja cultivar Jack, fueron colocados en medio de cultivo líquido FN-Lite (del inglés: *Finer & Nagasawa Lite*) con y sin asparagina, y 5,0 a 35,0 mg L⁻¹ de Glufosinato de amonio. Como resultado, con el empleo de 5,0 mg L⁻¹ de Glufosinato de amonio se inhibió el crecimiento en más del 95 % de los embriones somáticos a las tres semanas de cultivo, con inhibición total a las cinco semanas (6).

En un segundo estudio, estos autores evaluaron de 0,16 a 0,5 mg L⁻¹ de Glufosinato de amonio en medio de cultivo FN-Lite 50 % sin asparagina. Sin embargo, la única diferencia encontrada fue que la inhibición del crecimiento de los embriones somáticos comenzó en la primera semana de selección con empleo de medio de cultivo FN-Lite 50 %, mientras que en medio de cultivo FN-Lite normal la inhibición fue notable a partir de la segunda semana (6).

Los resultados de este trabajo difieren de los descritos previamente (6), atribuidos al tipo y composición del medio de cultivo. El empleo de medio de cultivo líquido permite una mayor exposición de los tejidos al contacto con el agente selectivo y disminuye el tiempo de selección.

Por el contrario, en medio de cultivo semisólido solo las zonas del tejido en contacto con el medio de cultivo están expuestas al efecto del agente selectivo,

y pueden aparecer embriones somáticos conocidos como falsos positivos en zonas que no están en contacto con el herbicida presente en el medio de cultivo.

La literatura consultada (12) refiere el empleo de 5,0 mg L⁻¹ de Glufosinato de amonio en la selección de nudos cotiledonales de soya durante cuatro semanas. Después de este periodo observaron necrosis en los tejidos no transformados, mientras los tejidos transformados formaron brotes en los cultivares Jack (82,8 %) y Williams (67,7 %).

Otros autores también han observado que de 3,0 a 5,0 mg L⁻¹ de Glufosinato de amonio es suficiente para prevenir la formación de brotes en nudos cotiledonales de soya (13). Estas concentraciones son similares a las requeridas para inhibir la multiplicación de embriones somáticos de soya según indica este estudio.

El Bialafos o tripéptido fosfinotricina que es producido por *Streptomyces hygroscopicus*, también ha sido empleado como agente selectivo. En un estudio, los autores encontraron que ningún brote se formó a partir de nudos cotiledonales de soya al emplear bialafos a 5,0 mg L⁻¹, y solo el 5,0 % lograron regenerar brotes al emplear 4,0 mg L⁻¹, tomando esta última concentración para la selección de los transformantes (14).

En otras especies de leguminosas como *Phaseolus vulgaris* se demostró que 0,50 mg L⁻¹ de Glufosinato de amonio fue suficiente para que más del 87 % de los callos mostraran necrosis total a las ocho semanas de cultivo (9).

Las diferencias encontradas en las concentraciones de Glufosinato de amonio requeridas para inhibir la multiplicación de los embriones somáticos pudieron estar dadas por la composición celular de este tejido, al estar constituidos por células diferenciadas en activo proceso de división celular que difieren de las células totalmente indiferenciadas que conforman al callo.

También existen estudios que han empleado otros tipos de herbicidas y confirmado la inhibición de la multiplicación de los embriones somáticos de soya en medio de cultivo líquido. Tal es el caso del herbicida Bispyribac-sodio, un inhibidor de la enzima acetolactato sintetasa. Cuando se empleó 1,0 µM de este herbicida, aparecieron embriones somáticos del cultivar Jack que no contenían el transgen *Os-mALS*, y con 2,0 µM no lograron sobrevivir (15).

Los resultados que se muestran, constituyen la primera referencia de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio, para su empleo en la selección de embriones somáticos transformados de soya en medio de cultivo semisólido.

CONCLUSIONES

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio 4,0 mg L⁻¹, en medio de cultivo semisólido, requerida para su empleo como agente selectivo en la transformación genética de embriones somáticos de soya cultivar INCASoy-27.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taski-Ajdukovic, K.; Djordjevic, V.; Vidic, M. y Vujakovic, M. "Subunit composition of seed storage proteins in high-protein soybean genotypes", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 45, no. 7, julio de 2010, pp. 721-729, ISSN 0100-204X, DOI 10.1590/S0100-204X2010000700013.
2. Sundar, I.K. y Sakthivel, N. "Advances in selectable marker genes for plant transformation", *Journal of Plant Physiology*, vol. 165, no. 16, 1 de noviembre de 2008, pp. 1698-1716, ISSN 0176-1617, DOI 10.1016/j.jplph.2008.08.002.
3. Wiebke-Strohm, B.; Droste, A.; Pasquali, G.; Osorio, M.B.; Bucker-Neto, L.; Passaglia, L.M.P.; Bencke, M.; Homrich, M.S.; Margis-Pinheiro, M. y Bodanese-Zanettini, M.H. "Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and Agrobacterium system", *Euphytica*, vol. 177, no. 3, 9 de septiembre de 2010, pp. 343-354, ISSN 0014-2336, 1573-5060, DOI 10.1007/s10681-010-0249-1.
4. Mariashibu, T.S.; Subramanyam, K.; Arun, M.; Mayavan, S.; Rajesh, M.; Thebora, J.; Manickavasagam, M. y Ganapathi, A. "Vacuum infiltration enhances the Agrobacterium-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 35, no. 1, 11 de julio de 2012, pp. 41-54, ISSN0137-5881, 1861-1664, DOI 10.1007/s11738-012-1046-3.
5. Wiebke-Strohm, B.; Pasquali, G.; Margis-Pinheiro, M.; Bencke, M.; Bucker-Neto, L.; Becker-Ritt, A.B.; Martinelli, A.H.S.; Rechenmacher, C.; Polacco, J.C.; Stolf, R.; Marcelino, F.C.; Abdelnoor, R.V.; Homrich, M.S.; Ponte, E.M.D.; Carlini, C.R.; Carvalho, M.C.C.G.D. y Bodanese-Zanettini, M.H. "Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi", *Plant Molecular Biology*, vol. 79, no. 1-2, 1 de marzo de 2012, pp. 75-87, ISSN0167-4412, 1573-5028, DOI 10.1007/s11103-012-9894-1.
6. Rao, S.S.; Mamadou, L.; McConnell, M.; Polisetty, R.; Kwanyuen, P. y Hildebrand, D. "Non-antibiotic selection systems for soybean somatic embryos: the lysine analog aminoethyl-cysteine as a selection agent", *BMC Biotechnology*, vol. 9, no. 1, 18 de noviembre de 2009, p. 94, ISSN 1472-6750, DOI 10.1186/1472-6750-9-94, [PMID: 19922622].
7. Simmonds, D.H. y Donaldson, P.A. "Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes", *Plant Cell Reports*, vol. 19, no. 5, 1 de abril de 2000, pp. 485-490, ISSN 0721-7714, 1432-203X, DOI 10.1007/s002990050760.

8. Murashige, T. y Skoog, F. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures", *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, 1 de julio de 1962, pp. 473-497, ISSN 1399-3054, DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
9. Bermúdez-Carabaloso, I.; Collado, R.; García, L.R.; Veitía, N.; Martirena, A.; Torres, D.; Romero, C.; Angenon, G. y others "Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* L cv.CIAP7247F", *Biotechnología Vegetal*, vol. 12, no. 4, 2012, pp. 203-210, ISSN 1609-1841.
10. Vencill, W.K.; Nichols, R.L.; Webster, T.M.; Soteris, J.K.; Mallory-Smith, C.; Burgos, N.R.; Johnson, W.G. y McClelland, M.R. "Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops", *Weed Science*, vol. 60, no. Special Issue, 4 de abril de 2012, pp. 2-30, ISSN 0043-1745, DOI 10.1614/WS-D-11-00206.1.
11. Lea, P.J. y Mifflin, B.J. "Nitrogen Assimilation and its Relevance to Crop Improvement" [en línea], eds. Foyer, C.H. y Zhang, H., *Annual Plant Reviews*, vol. 42, edit. Wiley-Blackwell, 2010, pp. 1-40, ISBN 978-1-4443-2860-8, [Consultado: 21 de marzo de 2015], Disponible en: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444328608.ch1/summary>>.
12. Song, Z.; Tian, J.; Fu, W.; Li, L.; Lu, L.; Zhou, L.; Shan, Z.; Tang, G. y Shou, H. "Screening Chinese soybean genotypes for Agrobacterium-mediated genetic transformation suitability", *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, vol. 14, no. 4, 7 de abril de 2013, pp. 289-298, ISSN 1673-1581, 1862-1783, DOI 10.1631/jzus.B1200278.
13. Zhang, Z.; Xing, A.; Staswick, P. y Clemente, T.E. "The use of glufosinate as a selective agent in Agrobacterium-mediated transformation of soybean", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 56, no. 1, 1 de enero de 1999, pp. 37-46, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1023/A:1006298622969.
14. Liu, S.C.; Zhang, G.C.; Yang, L.F.; Mii, M.; Gai, J.Y. y Zhu, Y.L. "Bialaphos-resistant Transgenic Soybeans Produced by the Agrobacterium-mediated Cotyledonary-node Method", *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 16, no. 1, 1 de enero de 2014, pp. 175-190, ISSN 2345-3737.
15. Tougou, M.; Yamagishi, N.; Furutani, N.; Kaku, K.; Shimizu, T.; Takahata, Y.; Sakai, J.; Kanematsu, S. y Hidaka, S. "The application of the mutated acetolactate synthase gene from rice as the selectable marker gene in the production of transgenic soybeans", *Plant Cell Reports*, vol. 28, no. 5, 15 de febrero de 2009, pp. 769-776, ISSN 0721-7714, 1432-203X, DOI 10.1007/s00299-009-0679-1.

Recibido: 18 de marzo de 2014

Aceptado: 23 de septiembre de 2014

¿Cómo citar?

Pérez-Pérez, Jorge L.; García Rodríguez, Lourdes; Veitía, Novisel; Bermúdez-Carabaloso, Idalmis; Collado López, Raúl y TorresRodríguez, Damaris Determinación de la concentración mínima letal de Glufosinato de amonio para seleccionar embriones somáticos transformados de soya cultivar INCASoy-27. [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 3, pp. 58-63. ISSN 1819-4087. [Consultado: ____]. Disponible en: <----->.