

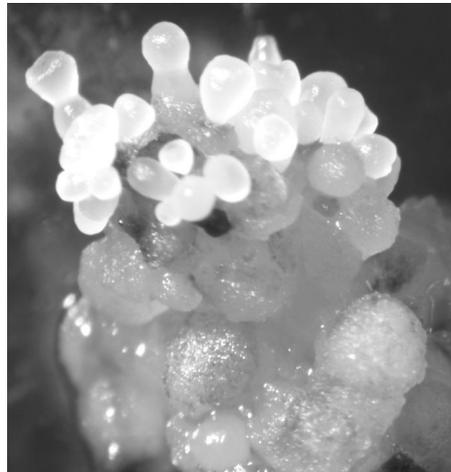


UNIVERSIDAD CENTRAL
"MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS



Tesis presentada para optar por el grado académico de
Master en Biotecnología Vegetal

Formación y proliferación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soya [*Glycine max* (L.) Merril]



Autora: Ing. Teresa del Socorro Blanco Tirado

Tutora: Dr. C. Idalmis Bermúdez Carabaloso

Santa Clara, Cuba
2010

**“¿Entonces, qué es lo que es el tiempo?. Si nadie me pregunta, yo sé;
si tengo que explicarlo a alguien que me ha preguntado,
no sé.”**

San Agustín, filósofo cristiano

AGRADECIMIENTOS

De antemano un agradecimiento en general a todo aquel que contribuyó para que pudiera llegar hasta este momento y en especial:

Al Instituto Universitario de la Paz, por la comisión otorgada.

A la Dra. Idalmis Bermúdez Caraballosa, tutora del trabajo por la asesoría y apoyo brindado.

A la MSc. Leyanis García, oponente, por su valiosa colaboración en la revisión y evaluación del documento

A la Dra. Novisel Veitía porque sin su apoyo y ayuda incondicional, este documento jamás se hubiese escrito.

A Maritza Reyes por la generosidad al compartir su conocimientos y brindar su cariño y colaboración para que este trabajo se pudiera concretar.

A Dámarita y Blanquita por su magnífica e inolvidable colaboración y compañía.

A los integrantes del laboratorio de Mejora Genética: Dra. Lourdes, MSc. Jorge Pérez, Carlos Romero, MSc. Raúl Collado por el trabajo compartido.

A los técnicos y profesionales del laboratorio de Fitopatología del IBP por su colaboración en la obtención del material histológico.

A la Dra. Yelenys Capó por su orientación en la preparación del material histológico. De igual manera al Dr. Eduardo Cruz Muñoz por la gentileza al momento de compartir sus conocimientos.

Al Ing. Reynaldo Quiñones R. por sus aportes en el análisis estadístico de la información.

Al cuerpo docente de la maestría por la experiencia académica compartida.

A los compañeros de aula Ortelio, Ivian, Maye, Maité, Rinier, Yovanny, Ventura, Yudith, Dariel, a todos un abrazo eterno por la calidez, compañía y apoyo.

A Tatiana Pichardo y Deivi Mirabal, técnicos del laboratorio de medios de cultivo, por la ayuda recibida.

Al Dr. Rodobaldo Ortíz, investigador del INCA por facilitarme las semillas certificadas con las cuales se desarrolló el presente trabajo.

A Cynthia, una persona maravillosa que estuvo presente en los momentos más cruciales de mi estancia en Cuba, por todo eso y por su apoyo invaluable en la elaboración de este documento, mi cariño y agradecimiento eterno.

A Nancy, Martha, Ana, Gisela, Lucía, Elieser, Eleonor, Fidel, Ocelys, su amor y generosidad sin límites hicieron posible este momento.

A todas las familias cubanas que me abrieron su corazón, un abrazo eterno.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-dicloroacético
ABA	Ácido abscísico
HCl	Ácido clorhídrico
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido Indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-Benzilaminopurina
cm	Centímetro(s)
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potasio
CO ₂	Dióxido de carbono
sp.	Especie
EEUU	Estados Unidos de América
FNL	Finer y Nagasawa Lite
g	gramo(s)
g.L ⁻¹	Gramo(s) por litro
NaOH	Hidróxido de sodio
IS	INCASoy
INCA	Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
m	Metro(s)
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
mg	Miligramo(s)
mg.L ⁻¹	Miligramo(s) por litro
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
M	Molar
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio
KNO ₃	Nitrato de potasio
rpm	revoluciones por minuto
MS	Sales basales Murashige y Skoog, 1962
s	Segundos
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Generalidades	4
2.1.1 Origen y distribución.....	4
2.1.2 Ubicación taxonómica y descripción.....	4
2.2 Importancia del cultivo y producción mundial.....	6
2.3 Mejoramiento genético de la soya.....	7
2.3.1 Genotipos cubanos de soya.....	7
2.4 Embriogénesis somática.....	9
2.4.1 Embriogénesis somática en soya.....	10
2.4.2 Factores que determinan la embriogénesis somática	14
2.4.2.1 Genotipo.....	14
2.4.2.2 Naturaleza del explante.....	15
2.4.2.3 Reguladores del crecimiento.....	17
2.4.2.4 Factores físicos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Formación de embriones somáticos.....	23
3.1.1 Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo.....	23
3.1.2 Influencia de la longitud de la semilla.....	25
3.1.3 Efecto de la concentración del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).....	26
3.1.4 Influencia de la intensidad luminosa.....	27
3.1.4.1 Luz artificial.....	27
3.1.4.2 Luz solar	28
3.2. Proliferación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido MSD20 y en medio de cultivo líquido FNL.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Formación de embriones somáticos.....	31
4.1.1 Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo.....	31
4.1.2 Influencia de la longitud de la semilla.....	35
4.1.3 Efecto de la concentración del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).....	39
4.1.4 Influencia de la intensidad luminosa.....	44
4.1.4.1 Luz artificial.....	44
4.1.4.2 Luz solar	50
4.2. Proliferación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido MSD20 y en medio de cultivo líquido FNL.....	52
5. CONCLUSIONES.....	57
6. RECOMENDACIONES.....	58
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUCCIÓN

La soya [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los cultivos más importantes del mundo por el alto contenido de proteína y de aceite en sus semillas, potencialmente útiles para emplearlas con fines alimentarios o industriales (Nishizawa e Ishimoto, 2009; FAO, 2009).

Debido a la importancia económica del cultivo, los esfuerzos en las investigaciones se han orientado al mejoramiento de las variedades con el fin de incrementar la calidad de las semillas, su adaptación a las condiciones edafoclimáticas adversas, su resistencia a plagas y enfermedades y la tolerancia a la aplicación de herbicidas (Yang *et al.*, 2009). En tal sentido, a nivel mundial se emplean tanto métodos tradicionales como herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético (Finer *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2008).

En Cuba, se emplean métodos de mejoramiento tales como mutaciones inducidas e hibridación natural para la obtención de nuevos genotipos de soya, entre los cuales se encuentran Incasoy-1, Incasoy-24, Incasoy-27 e Incasoy-35 (Ortíz *et al.*, 2000; Ponce *et al.*, 2005).

La transformación genética como vía de mejoramiento de este cultivo, cobra cada día mayor relevancia y su éxito se relaciona directamente con la eficiencia del sistema de regeneración empleado para la obtención de plantas transformadas. Dentro de los sistemas de regeneración de plantas conocidos, la embriogénesis somática ha sido uno de los más empleados en soya (Parrott *et al.*, 1989; Ko *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005), debido a que las plantas obtenidas por esta vía son

más uniformes genéticamente y a que mediante el establecimiento de cultivos embriogénicos proliferativos se puede obtener un alto volumen de material útil como blanco para la transformación (Parrot *et al.*, 1989; Meng *et al.*, 2007; Kita *et al.*, 2007).

No obstante, uno de los factores limitantes para la regeneración de plantas por esta vía, es su condición genotipo-dependiente (Parrott *et al.*, 1989; Hiraga *et al.*, 2007), lo cual impide el empleo directo de los protocolos ya existentes. Adicionalmente, se requieren concentraciones relativamente altas de auxina, especialmente 2,4-D, en las fases de formación y proliferación de embriones somáticos, lo cual unido al tiempo de exposición de los explantes a estas altas concentraciones, disminuyen la calidad de los embriones somáticos y en consecuencia, su capacidad de regeneración (Christianson *et al.*, 1983; Ranch *et al.*, 1986; Song *et al.*, 2009; Loganathan *et al.*, 2010).

De esta manera, la identificación de genotipos apropiados para la embriogénesis somática, así como el conocimiento de su interacción con los factores físico-químicos que la determinan resulta de gran importancia.

Teniendo en cuenta la problemática planteada anteriormente se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“La determinación de la orientación y el tamaño del explante inicial, la concentración de 2,4-D y las condiciones de iluminación adecuadas para inducir la respuesta embriogénica permitirá lograr la formación y proliferación de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya”

Con el fin de lograr la hipótesis anteriormente planteada, se trazaron los siguientes objetivos:

- Definir la orientación y el tamaño del explante y la concentración de 2,4-D en la formación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soya.
- Establecer las condiciones de iluminación para la formación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soya.
- Determinar el efecto del medio de cultivo en la proliferación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soya.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Mejora Genética del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, durante el periodo comprendido entre abril del 2009 y mayo del 2010.

Técnicas y procedimientos generales

Los medios y los frascos de cultivo utilizados en la investigación fueron esterilizados en autoclave (BK-75) a 121°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión, por un período de 20 minutos. Los platos metálicos, pipetas y placas de Petri, fueron esterilizados en estufa a 180°C durante dos horas. La desinfección de las pinzas, espátulas y bisturíes empleados para los cortes realizados al material vegetal se realizó con un esterilizador modelo DENT-EQ. Para los experimentos con medio de cultivo líquido se emplearon pipetas de vidrio cortas de 5 y 10 mL de volumen y un dosificador de marca PIPETBOT (TECNOMARA). El establecimiento de los experimentos se realizó bajo condiciones estériles en cámara de flujo laminar horizontal modelo IKEM.

Los medios de cultivo semisólido se dosificaron en frascos de 250 mL a razón de 30 mL por frasco. Antes de su esterilización en autoclave se ajustó el pH empleando NaOH 0,5N y HCl 0,5N. La intensidad luminosa se midió durante el transcurso de los experimentos con un luxómetro modelo 401025.

Material vegetal

Se emplearon los genotipos cubanos de soya IS-1, IS24, IS27 e IS35. Como control se utilizó el genotipo de origen americano 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 todos los genotipos fueron aportadas por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba, INCA.

Las plantas donantes se cultivaron en bolsas de polietileno en casa de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas. El sustrato estuvo compuesto por 25% de zeolita y 75% de materia orgánica. Se realizaron dos riegos al día, cada uno con una duración de cinco minutos. Estas plantas fueron cultivadas durante las temporadas de marzo-abril y agosto-octubre de 2009 y enero-febrero de 2010. El tiempo transcurrido desde la antesis hasta que la semilla alcanzó la longitud requerida en cada uno de los experimentos se determinó marcando, de manera aleatoria y a partir del momento de la antesis, botones florales en varias plantas dentro de cada genotipo. La longitud de la semilla se determinó midiendo su eje plano con una escala milimetrada acoplada al ocular del microscopio estereoscopio marca OLYMPUS.

Como explante para el inicio del proceso de la 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 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 (Lazzeri *et al.*, 1985).

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se usó el programa estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 16,0 sobre Windows. En cada experimento se especifica el análisis estadístico que se empleó.

3.1 Formación de embriones somáticos

3.1.1 Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo en la formación de embriones somáticos de los genotipos cubanos de soya IS-24 e IS-35.

Cotiledones inmaduros de semillas entre 4,0 y 5,0 mm fueron colocados por el lado abaxial y adaxial sobre el medio de cultivo semisólido para la inducción de los embriones somáticos MSD40 (Bailey *et al.*, 1993; Saymolov *et al.*, 1998) compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3,0% de sacarosa y 40,0 mg.L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,0 g.L⁻¹ de Gelrite® (SIGMA). El pH se ajustó a 7,0 (Santarém *et al.*, 1997) antes

de la esterilización. En este experimento se establecieron dos tratamientos según la orientación del cotiledón inmaduro en los dos genotipos cubanos y el control (Williams-82), con diseño completo al azar. Cada tratamiento tuvo cinco réplicas, cada una con cuatro explantes.

Los frascos fueron incubados en cámaras de crecimiento con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidad luminosa de $5-10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, según lo propuesto por Lazzeri *et al.* (1987a), provista por lámparas fluorescentes.

A los 30 días de cultivo se evaluó: el número de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos formados por cotiledón.

Se realizó una descripción del proceso de formación de los embriones somáticos respaldado por un análisis histológico. Para esto, se tomaron muestras de tejido de los cotiledones inmaduros a los nueve y doce días cultivo. Se fijaron en FAA (formaldehído 37%, ácido acético 100%, etanol 70%, en una proporción 5:5:90). Luego fueron deshidratados en un gradiente ascendente de etanol y embebidas en cera de parafina. Posteriormente se realizaron cortes de $10 \mu\text{m}$ de espesor con un micrótopo rotatorio (Zeiss, Alemania), se fijaron en portaobjetos y se tiñeron con safranina al 0,5% y con *fast green*. Las secciones histológicas de las diferentes muestras se examinaron en microscopio óptico (AXIOSKOP) y las imágenes fueron captadas con una cámara digital (OLYMPUS DP70) acoplada al microscopio.

La comparación de los datos relacionados con el número de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos por cotiledón inmaduro, se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.1.2 Influencia de la longitud de las semillas

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la longitud de semilla en la formación de embriones somáticos de los genotipos cubanos IS-24 e IS-35 y el control (Williams-82). Para ello, se emplearon cotiledones inmaduros provenientes de semillas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0 mm de longitud. Los cotiledones fueron colocados sobre el medio de cultivo MSD40 según la orientación en la cual se logró el mayor número de embriones somáticos en dependencia del genotipo de acuerdo a los resultados obtenidos en el acápite 3.1.1. En este experimento se establecieron cinco tratamientos según la longitud de la semilla y en cada genotipo cubano y el control. Cada tratamiento tuvo cinco réplicas, cada una con cuatro explantes, con diseño completamente al azar.

Los frascos fueron colocados en cámaras de crecimiento con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidad luminosa de $5-10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes.

A los 30 días de cultivo se evaluó el número de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos por cotiledón inmaduro. La comparación de los datos se realizó mediante una prueba no

paramétrica de Kruskall Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.1.3 Efecto de la concentración del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2,4-D en la formación de embriones somáticos en cuatro genotipos cubanos de soya IS-1, IS-24, IS-27 e IS-35.

Como explante se emplearon cotiledones inmaduros con orientación y longitud de acuerdo con los resultados de los acápites 3.1.1 y 3.1.2 respectivamente. Los cotiledones se colocaron sobre el medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3,0% de sacarosa, 2,0 g.L⁻¹ de Gelrite® (SIGMA), preparado a tres concentraciones de 2,4-D (30, 40 y 50 mg.L⁻¹). El pH se ajustó a 7,0 antes de su esterilización. En este experimento se establecieron tres tratamientos según la concentración de 2,4-D en los genotipos cubanos y el control (Williams-82). Cada tratamiento estuvo conformado por cinco réplicas cada una con cuatro explantes, con diseño completamente al azar. Los frascos se colocaron en cámaras de crecimiento en las condiciones similares a las descritas en el acápite 3.1.1.

A los 30 días después del establecimiento se evaluó el número de embriones somáticos por cotiledón. La comparación de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.1.4 Influencia de la intensidad luminosa

3.1.4.1 Luz artificial

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la intensidad de la luz en la formación de embriones somáticos en los genotipos IS-1, IS-24, IS-27 e IS-35. Para ello, se emplearon cotiledones inmaduros con orientación y longitud de acuerdo a los acápites 3.1.1 y 3.1.2, colocados sobre medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3% de sacarosa, 2,0 g.L⁻¹ de Gelrite® (SIGMA), preparado con la concentración de 2,4-D según los resultados del acápite 3.1.3.

Los explantes se incubaron en cámaras de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura 26±2°C con los siguientes valores de intensidad luminosa: 5-10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 68,3-72,81 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se establecieron dos tratamientos por genotipo cubano y el control Williams-82. Cada tratamiento estuvo conformado por cinco réplicas cada una con cuatro explantes.

Se evaluó el número de embriones somáticos en etapa globular, por cotiledón inmaduro a los 15, 22 y 30 días de cultivo se evaluó. A los 22 se calculó el número de embriones somáticos con respecto a los formados a los 30 días. A los 22 y 30 días se calculó el número de cotiledones inmaduros con embriones somáticos diferenciados

Adicionalmente, a los 30 días se evaluó el grado de diferenciación de los embriones somáticos mediante un análisis histológico. Para esto se tomaron

muestras de tejido de los cotiledones inmaduros a los 22 y 30 días del cultivo y se prepararon según lo establecido para este propósito en el acápite 3.1.1.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.1.4.2 Luz solar

El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia de la luz solar en la formación de embriones somáticos en los genotipos IS-1, IS-24, IS-27 e IS-35. Para este propósito se emplearon cotiledones inmaduros con orientación y longitud de acuerdo a los acápites 3.1.1 y 3.1.2, colocados sobre medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3,0% de sacarosa, 2,0 g.L⁻¹ de Gelrite® (SIGMA), preparado con la concentración de 2,4-D según los resultados del acápite 3.1.3.

Los frascos fueron colocados en cámaras de crecimiento de luz solar con duración máxima y mínima del periodo luminoso de 13h y 34 minutos y 10h y 41 minutos, temperatura 26±2°C e intensidad luminosa entre 68-72 μE m⁻² .s⁻¹. Como control se empleó la intensidad luminosa que favoreció la formación del mayor número de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya, de acuerdo a los resultados obtenidos en el acápite 3.1.4. El experimento se estableció con diseño completo al azar Se realizaron cinco réplicas, por cada genotipo, cada una con cuatro explantes. Se evaluó el número de embriones somáticos por cotiledón inmaduro.

La comparación de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2 Proliferación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido MSD20 y en medio de cultivo líquido FNL

El objetivo de este experimento fue evaluar la respuesta de los genotipos cubanos de soya IS-1 e IS-27 en la proliferación de embriones somáticos en los medios de cultivo semisólido MSD20 (Wright *et al.*, 1991) y líquido FNL (Samoylov *et al.*, 1998). Como explante se emplearon 100 mg de embriones somáticos en etapa globular, obtenidos a las cuatro semanas de formados en el medio de cultivo con la concentración de 2,4-D, según los resultados del acápite 3.1.3.

Para los tratamientos con medio de cultivo semisólido se utilizaron placas de Petri de 9,0 cm de diámetro que contenían 20,0 mL de medio de cultivo MSD20 compuesto por Sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3,0% de sacarosa y 20,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 2,0 g.L⁻¹ de Gelrite® (SIGMA). El pH fue ajustado a 5,8 antes de la esterilización.

Las placas fueron colocadas en cámaras de crecimiento con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura 26±2°C e intensidad luminosa de 5-10 μE.m⁻².s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes. Se establecieron cuatro placas por genotipo, cada una considerada como una réplica.

Para los tratamientos con medio de cultivo líquido se utilizaron Erlenmeyers 25,0 mL con 4,0 mL de medio de cultivo FNL compuesto por sales macro FNL, sales

micro MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 1,0% sacarosa, 1,0 g.L⁻¹ de asparagina, 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Las sales macro FNL estuvieron compuestas por 2830 mg.L⁻¹ de KNO₃, 463 mg.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 370 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 185 mg.L⁻¹ de KH₂PO₄ y 300 mg.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O. El pH fue ajustado a 5,8 antes de la esterilización. Se prepararon cuatro Erlenmeyers por genotipo. Cada Erlenmeyer constituyó una réplica. Los Erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital a 90 rpm, ubicado en cámara de crecimiento con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura 26±2°C e intensidad luminosa de 5-10 μE.m⁻².s⁻¹, provista por lámparas fluorescentes. Semanalmente, y durante un mes, se procedió a renovar el 50% del medio de cultivo de cada Erlenmeyer.

Tanto en el medio de cultivo semisólido como en el medio cultivo líquido se realizó la caracterización morfológica de los embriones somáticos obtenidos. Esta caracterización se hizo con el empleo de un microscopio estereoscopio marca LEYCA WILD M8 y las fotos se tomaron con una cámara digital (OLYMPUS DP70) acoplada al microscopio. Se calculó el incremento de masa fresca (mg) de cada réplica, con el empleo de una balanza analítica modelo SARTORIUS. El incremento en masa fresca se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$gMF = M_{\text{final}} - M_{\text{inicial}}$$

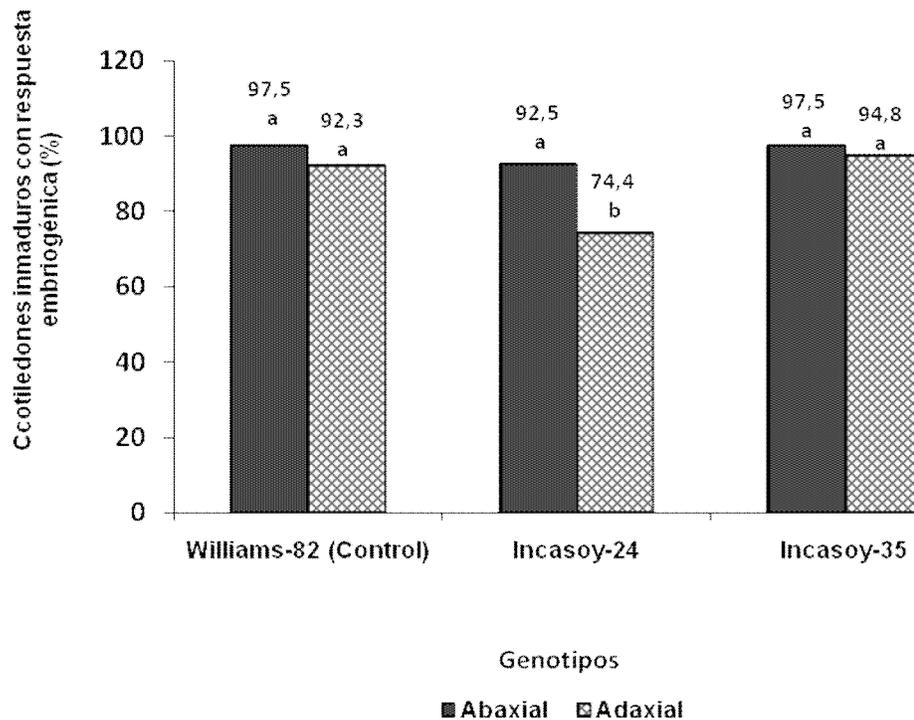
La comparación de los datos del incremento en masa fresca de los embriones somáticos proliferados se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Formación de embriones somáticos

4.1.1 Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo

Se determinó que la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo influyó en el valor promedio de embriones somáticos formados en los genotipos cubanos IS-24 e IS-35. En el genotipo IS-24 el valor de porcentaje obtenido en la orientación abaxial difirió significativamente al alcanzado en la orientación adaxial (Figura 1).

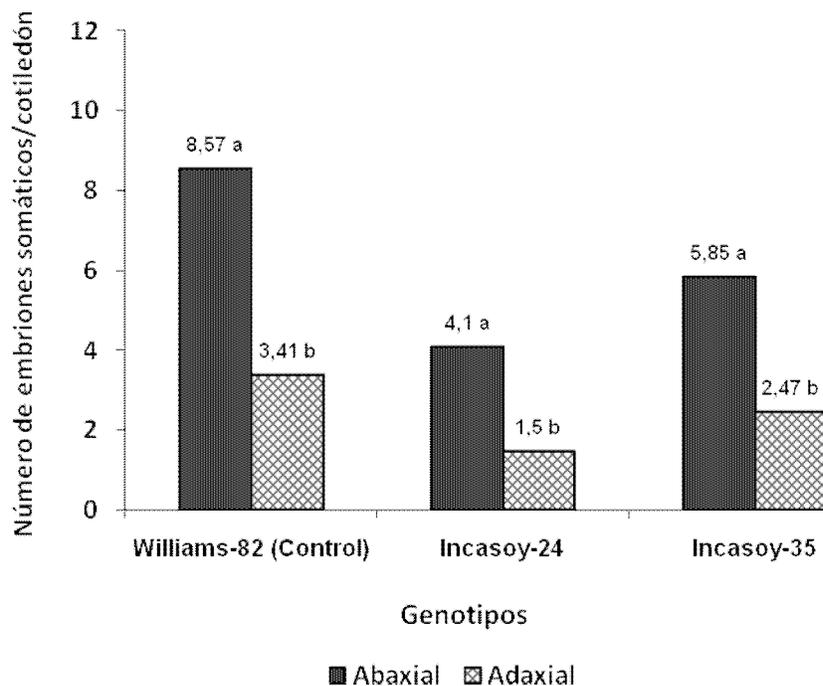


Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba no paramétrica de Mann Whitney, para $p < 0,05$.

Figura 1. Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro en el porcentaje de cotiledones con respuesta embriogénica a los 30 días de cultivo

Por su parte, en los genotipos IS-35 y el Williams-82 (Control) no se encontraron diferencias significativas entre las dos orientaciones estudiadas. Sin embargo, los mayores valores de porcentaje se lograron cuando los cotiledones inmaduros se orientaron con el lado abaxial sobre el medio de cultivo.

Al analizar el número promedio de embriones somáticos por explante se encontraron diferencias significativas entre las orientaciones evaluadas por genotipo. En los genotipos cubanos IS-24 e IS-35 los mayores valores promedios se alcanzaron cuando el cotiledón inmaduro se orientó de manera abaxial sobre el medio de cultivo. Resultados similares mostró el genotipo control Williams-82 (Figura 2).



Barras con letras distintas en cada difieren significativamente según prueba no paramétrica de Mann Whitney, para $p < 0,05$.

Figura 2. Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo en la formación de embriones somáticos a los 30 días de cultivo

En los genotipos cubanos de soya estudiados se observó que el proceso de la embriogénesis somática se inició directamente de la superficie de los cotiledones inmaduros. Las primeras estructuras embriogénicas fueron visibles a partir de los siete días después del establecimiento en el genotipo Williams-82 y, entre los 9 y 11 días, en los genotipos cubanos IS-24 e IS-35 respectivamente.

En la orientación abaxial, los embriones somáticos se formaron en el centro y en el borde del explante, tanto en los genotipos cubanos como en el control (Figura 3 A, B y C) y en la orientación adaxial se formaron con mayor frecuencia en los bordes del cotiledón en los genotipos evaluados (Figura 3 D). Independientemente de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo, los embriones somáticos se formaron sobre el tejido necrosado y el tamaño de los mismos varió en dependencia del genotipo: menores de 1,0 mm de longitud en IS-24 e IS-35 y entre 2,0 y 3,0 mm en el genotipo Williams-82.

Lazzeri *et al.* (1985), publicaron por primera vez el empleo de cotiledones inmaduros para la inducción y formación de embriones somáticos en soya, desde entonces ha sido considerado como el único explante adecuado para regenerar plantas, vía embriogénesis somática (Finer y Nagasawa, 1988; Bailey *et al.*, 1993; Ko y Korban, 2003; Hiraga *et al.*, 2007). El efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo, ha sido estudiado por varios autores en esta especie (Hepher *et al.*, 1988; Hartweck *et al.*, 1988; Griga, 1993; Santarém *et al.*, 1997; Ko y Korban, 2004; Loganathan *et al.*, 2010).

En las secciones histológicas tomadas de tejidos con nueve días de cultivo se observó una proliferación de tejido con células proembriogénicas ubicado cerca de

la epidermis de los cotiledones inmaduros en las dos orientaciones estudiadas, aunque en mayor proporción cuando el cotiledón se orientó por el lado abaxial (Figura 3 E y F). La sección histológica correspondiente al tejido embriogénico a los 12 días de cultivo, permitió confirmar que en los genotipos cubanos de soja la embriogénesis somática es directa, ya que se observa la continuidad de la epidermis entre el tejido materno y el embrión somático globular (Figura 3 G). Esta característica coincide con lo descrito por Aparecida *et al.* (2002) en un estudio sobre la caracterización anatómica de la embriogénesis somática de un genotipo brasileiro de soja y el genotipo Williams-82.

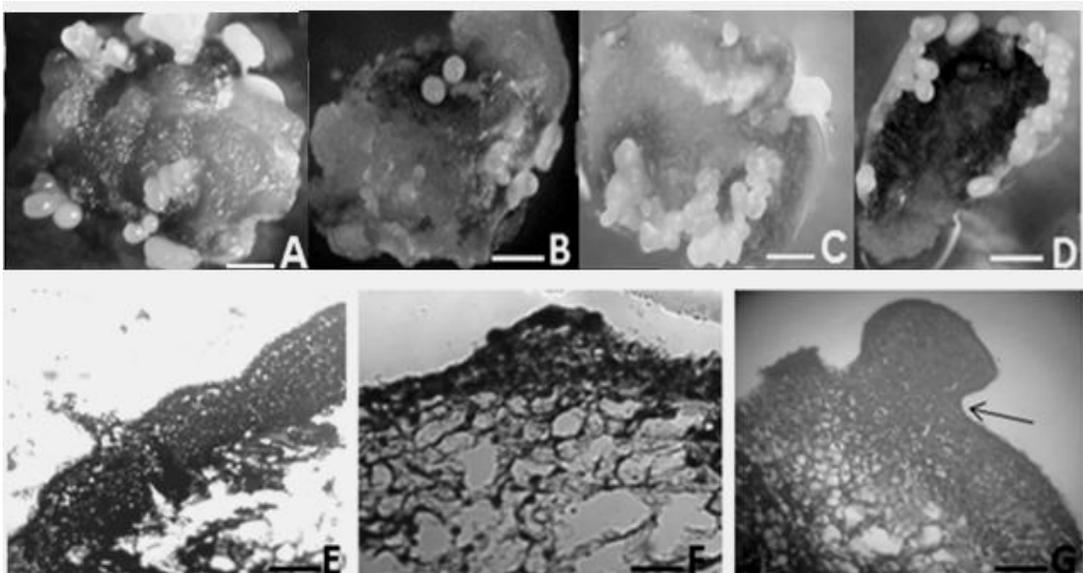


Figura 3. Morfología e histología de la formación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soja en orientación abaxial. (A) Williams-82 (Control); (B) IS-24; (C) IS-35; (D) Williams-82 (Adaxial). A, B, C y D a los 30 días de cultivo. Escala de la barra: 1,0 mm. Secciones histológicas de cotiledones inmaduros del genotipo cubano de soja IS-35 (E) orientación abaxial y (F) orientación adaxial. E y F a los nueve días de cultivo. (G) Embrión somático en etapa globular a los 12 días de cultivo. La flecha indica continuidad en la epidermis. Escala de la barra 100 μ m

Los resultados del presente estudio indican que la orientación fue determinante en el número de embriones somáticos que se formaron en los genotipos cubanos

evaluados. De esta manera, en la orientación abaxial se obtuvieron los mayores valores de embriones somáticos por cotiledón. Estos resultados fueron similares a los descritos por Santarém *et al.* (1997), cuando evaluaron el efecto de la orientación del cotiledón inmaduro en cuatro genotipos de soya de EEUU. Sin embargo, difieren de los obtenidos por Ko y Korban (2003) quienes encontraron una mejor respuesta embriogénica cuando el cotiledón se orientó por el lado adaxial sobre el medio de cultivo, en genotipos de soya de EEUU.

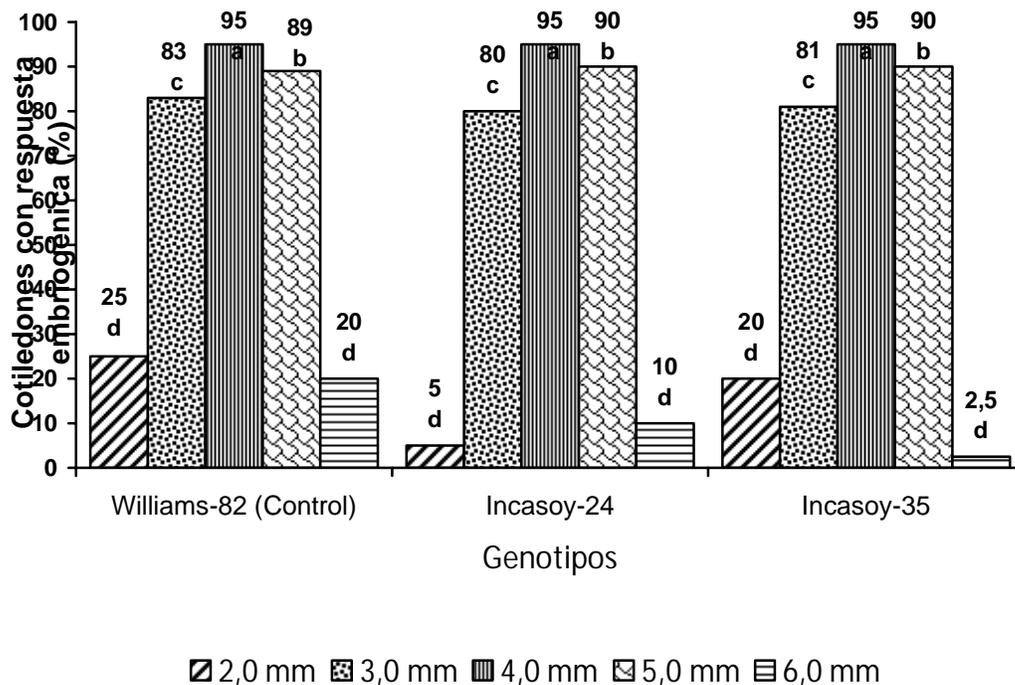
La influencia de la orientación del cotiledón en la respuesta embriogénica, pudiera estar dada por las diferencias estructurales y fisiológicas de las células y los tejidos que existen en el lado abaxial y adaxial del cotiledón, las cuales determina en última instancia, el transporte de auxinas y por tanto, el proceso embriogénico (Griga, 1993; Aparecida *et al.*, 2002). Hopher *et al.* (1988), citados por George (2008), sugirieron que el potencial embriogénico de un tejido está relacionado con su papel activo en el transporte de nutrientes. Estos autores plantearon que varios tejidos embriogénicos (nucela, escutelo, sinérgidas y la epidermis abaxial de los cotiledones de soya) tienen esta capacidad.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este experimento se seleccionó la orientación abaxial para la formación de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya.

4.1.2 Influencia de la longitud de la semilla

La longitud de las semillas influyó en la respuesta embriogénica de los genotipos cubanos de soya IS-24 e IS-35. El mayor porcentaje de cotiledones inmaduros con

respuesta embriogénica se logró cuando estos provenían de semillas de 3,0, 4,0 y 5,0 mm de longitud en los dos genotipos cubanos y el control. Los porcentajes más bajos se presentaron cuando se empleó semillas de 2,0 y 6,0 mm en todos los genotipos evaluados (Figura 4).

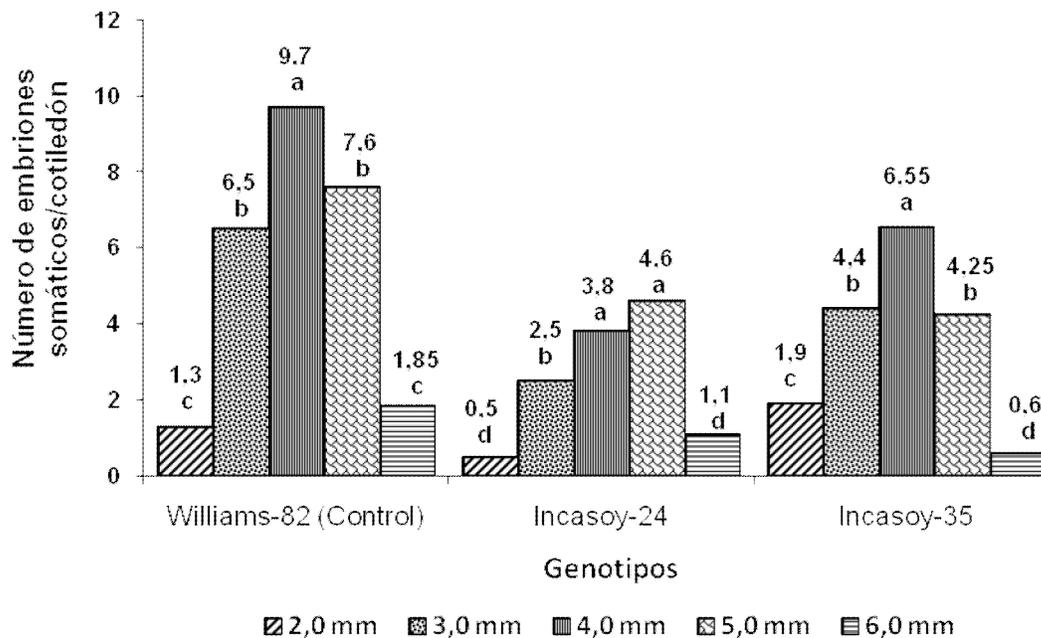


Barras con letras distintas difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para $p < 0,05$.

Figura 4. Efecto de la longitud de la semilla en el porcentaje de cotiledones con respuesta embriogénica a los 30 días de cultivo

Al analizar el número de embriones somáticos formados por cotiledón inmaduro se encontró que el genotipo IS-35 alcanzó los mayores valores cuando provenían de semillas de 4,0 mm de longitud con diferencia significativa con las otras longitudes evaluadas. Resultados similares se encontraron en el genotipo Williams-82. Por su parte, en el genotipo IS-24 no se presentaron diferencias significativas en el

número de embriones somáticos por cotiledón cuando se emplearon semillas de 4,0 y 5,0 mm de longitud. Estos resultados difirieron significativamente con los valores obtenidos en los cotiledones de semillas con longitudes 2,0, 3,0 y 6,0 mm. Los dos genotipos cubanos evaluados lograron la mayor respuesta embriogénica cuando se emplearon cotiledones de semillas de 4,0 y 5,0 mm para IS-24 y 4,0 mm de longitud para IS-35 (Figura 5).



Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para $p < 0,05$.

Figura 5. Efecto de la longitud de la semilla en la formación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soja a los 30 días de cultivo

La embriogénesis somática está asociada predominantemente a la existencia de células competentes en el explante inicial, ya que estas células pueden dar lugar a embriones somáticos directamente o después de varios ciclos mitóticos, en

dependencia del estado fisiológico del explante y del genotipo (Parrot *et al.*, 1989). En soya, generalmente se emplean cotiledones inmaduros para la inducción de la embriogénesis somática directa, debido a la existencia de meristemas organizados en este tipo de explante, razón por la cual el tamaño del cotiledón es considerado uno de los factores limitantes de este proceso morfogénico (Lazzeri *et al.*, 1985; Gaj, 2004; Yang *et al.*, 2009; Loganathan, 2010).

Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación fueron descritos por Yang *et al.* (2009) en genotipos de soya chinos, donde la mayor respuesta embriogénica se logró cuando los cotiledones procedían de semillas de 4,0 a 5,0 mm de longitud; y la menor respuesta con longitudes menores de 3,0 y mayores de 6,0 mm.

De igual forma, al evaluar la respuesta embriogénica en cotiledones inmaduros procedentes de semillas de longitudes entre 1,5 y 8,5 mm en genotipos de soya de EEUU, Lazzeri *et al.* (1985), concluyeron que los cotiledones tomados a partir de semillas entre $4,0 \pm 1,0$ mm proveían el tejido más apropiado para la inducción embriogénica, ya que en estas longitudes de semillas se formaron la mayor cantidad de embriones somáticos.

A partir del estudio de los factores determinantes en la embriogénesis somática de genotipos coreanos de soya, Kim *et al.* (2004), encontraron una relación directamente proporcional entre el tamaño óptimo del cotiledón y el tamaño final de la semilla madura con la respuesta embriogénica. Estos autores observaron que en los genotipos en los cuales la semilla madura era de tamaño pequeño, la mayor formación de embriones somáticos se presentó cuando los cotiledones provenían

de semillas de 3,0 mm de longitud y en los genotipos en los cuales la semilla madura era de tamaño grande, la mayor respuesta embriogénica se relacionó con cotiledones provenientes de semillas de 4,0 mm. Al igual que en el presente estudio, estos autores obtuvieron los menores valores en formación de embriones somáticos cuando emplearon cotiledones de semillas menores de 3,0 mm y mayores a 5,0 mm.

La capacidad embriogénica, según Gaj (2004), está restringida a un corto periodo de tiempo dentro del desarrollo del tejido empleado como explante. En estudios sobre embriogénesis somática en *Arabidopsis thaliana*, este autor encontró una relación inversa entre la capacidad embriogénica y el grado de madurez del embrión cigótico, concluyendo que el grado de madurez no sólo influye en la cantidad de embriones somáticos formados sino también en el tipo de embriogénesis inducida. De esta forma, cuando empleó embriones cigóticos maduros, observó que los embriones somáticos se formaron directamente sobre el explante, es decir, la embriogénesis era directa; mientras que, cuando empleó embriones cigóticos inmaduros frecuentemente se formó un callo embriogénico, o sea, se indujo embriogénesis somática indirecta.

En consideración a los resultados obtenidos en este experimento se seleccionó como longitud de la semilla a emplear en los experimentos posteriores la de 4,0 mm.

4.1.3 Efecto de la concentración del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)

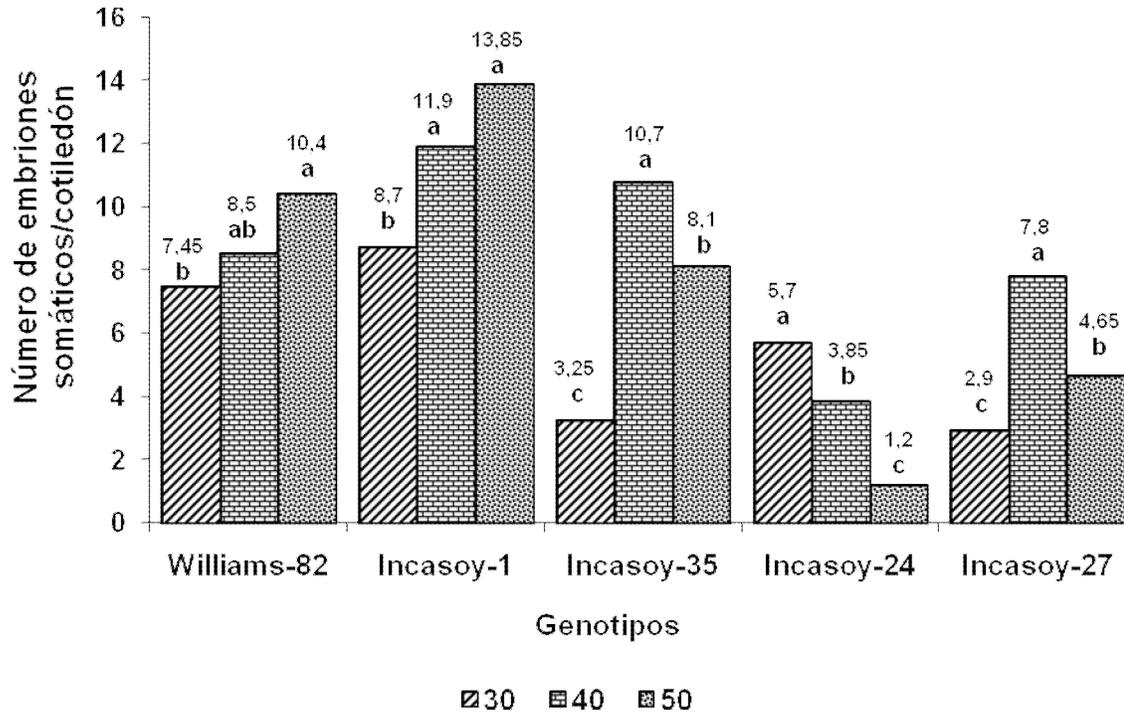
La concentración de 2,4-D tuvo un efecto significativo en la formación de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya. Los genotipos IS-27 e IS-

35 presentaron el mayor número de embriones somáticos en el medio de cultivo que contenía 40 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Los resultados obtenidos con esta concentración difirieron significativamente en estos genotipos con las concentraciones de 30 y 50 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Figura 6).

En los genotipos IS-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 el genotipo IS-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 los diferentes genotipos a la concentración de la auxina exógena requerida para inducir la respuesta embriogénica (Figura 6).

En estudios similares, Hiraga *et al.* (2007), encontraron que la mejor respuesta embriogénica, asociada al número de embriones somáticos formados en genotipos japoneses 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 genotipo 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. 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).



Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para $p < 0,05$.

Figura 6. Efecto de la concentración del 2,4-D mg.L^{-1} en la formación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soya a los 30 días de cultivo

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 genotipos chinos 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), 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 Lippman (1984). En contraste, Loganathan *et al.* (2010), no obtuvieron respuesta embriogénica en un genotipo taiwanés 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), estimulando la división celular asimétrica (Schnabel y Frugolico, 2004) y afectando la regulación y balance endógeno de hormonas (Moon e Hildebrand, 2003). Las diferencias en el efecto inductor, usualmente son asociadas a la habilidad 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 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) plantea 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 para volverse 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.

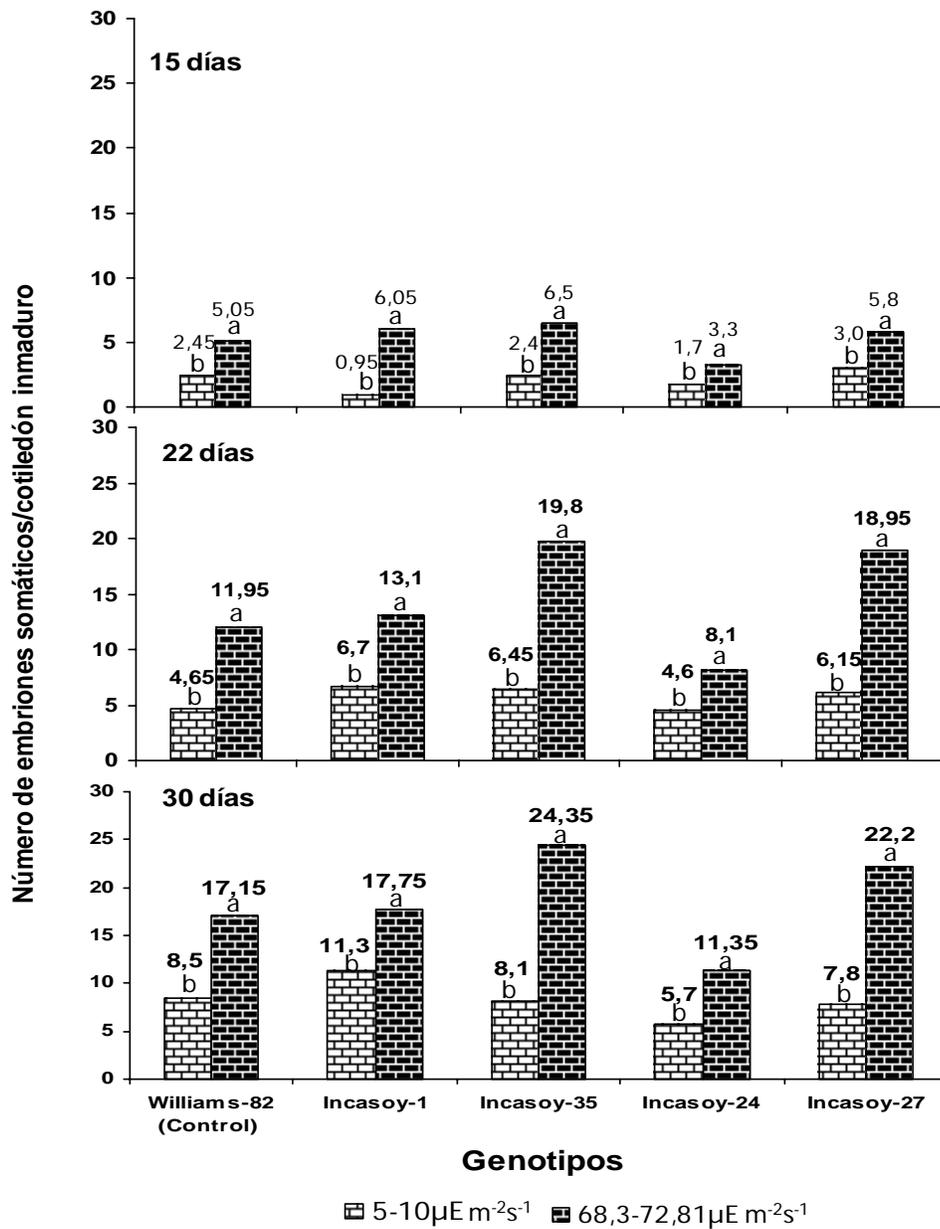
La concentración de 2,4-D requerida para obtener la mayor formación de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya evaluados, varió en

dependencia del genotipo (30 mg.L⁻¹ para IS-24; 40 mg.L⁻¹ para IS-27 e IS-35; 40 y 50 mg.L⁻¹ para IS-1). Sobre la base de los resultados obtenidos en este experimento se seleccionó, para los experimentos posteriores, la concentración de 40 mg.L⁻¹ para los genotipos cubanos con excepción del IS-24 que respondió mejor a una concentración de 30 mg.L⁻¹.

4.1.4 Influencia de la intensidad luminosa

4.1.4.1 Luz artificial

La intensidad de la luz influyó en la formación de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya evaluados. La mayor formación de embriones somáticos se logró cuando se empleó la intensidad luminosa comprendida entre 68,3-72,81 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Estos valores difirieron significativamente con los resultados obtenidos en el tratamiento que se mantuvo bajo intensidad luminosa de 5-10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (tratamiento control). Estas diferencias se observaron a los 15, 22 y 30 días en los dos tratamientos evaluados (Figura 7). Resultados contrarios a los obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron descritos por Lazzeri *et al.* (1987), quienes lograron valores similares en el número de embriones somáticos formados en dos genotipos de soya de EEUU, cuando evaluaron altas y bajas intensidades de iluminación. Bonacin *et al.* (2000), no encontraron diferencias significativas cuando evaluaron el efecto de la intensidad luminosa sobre la respuesta embriogénica en genotipos brasileños de soya, aduciendo que los resultados pudieron estar dados por el bajo rango de intensidad luminosa empleados en dicho estudio.

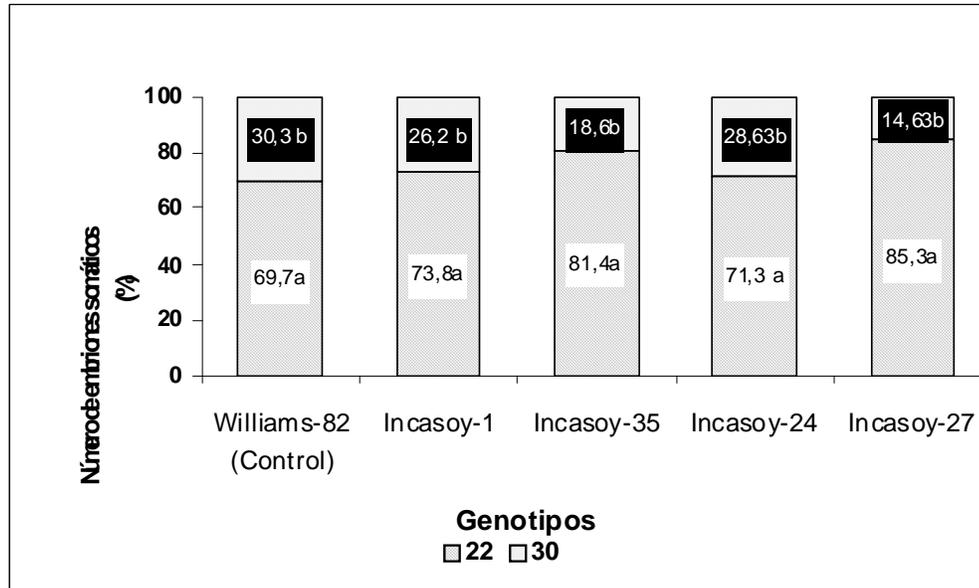


Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba no paramétrica de Mann Whitney, para $p < 0,05$.

Figura 7. Efecto de la intensidad luminosa en la formación de embriones somáticos en etapa globular a los 15, 22 y 30 días de cultivo

Sin embargo, en atención a las diferencias altamente significativas observadas en las interacciones genotipo-auxina-intensidad luminosas y genotipo-pH-intensidad

luminosa, estos autores sugieren ampliar el rango y el número de intensidad luminosa para estudios posteriores.



Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba no paramétrica de Mann Whitney, para $p < 0,05$.

Figura 8. Porcentaje de embriones somáticos formados a los 22 y 30 días de cultivo en cámara de crecimiento con intensidad luminosa entre 68,3-72,81 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Al comparar el porcentaje de embriones somáticos formados en la intensidad luminosa de 68,3-72,81 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, se determinó que los mayores porcentajes se observaron a los 22 días en todos los genotipos evaluados, los cuales difirieron significativamente con los obtenidos a los 30 días de cultivo (Figura 8).

En el presente estudio también se observó que a los 22 días de cultivo bajo la intensidad luminosa de 68,3-72,81 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, el porcentaje de cotiledones inmaduros con embriones somáticos diferenciados fue menor con relación al obtenido a los 30 días (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de cotiledones inmaduros con embriones somáticos diferenciados en genotipos de soya a los 22 y 30 días de cultivo

% Cotiledones inmaduros con embriones somáticos diferenciados				
Intensidad luminosa				
	5-10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		68,3-72,81 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	
	22*	30*	22*	30*
Williams-82 (Control)	16,4 ^b	32,6 ^a	21,7 ^b	35,6 ^a
Incasoy-1	18,3 ^b	35,7 ^a	22,8 ^b	39,3 ^a
Incasoy-35	17,5 ^b	49,7 ^a	29,5 ^b	87,1 ^a
Incasoy-24	25,7 ^b	56,4 ^a	32,6 ^b	91,3 ^a
Incasoy-27	21,4 ^b	55,4 ^a	30,9 ^b	89,5 ^a

* Días de cultivo

Medias con letras diferentes en una misma fila en cada intensidad luminosa difieren por según prueba *t*-student, para $p < 0,05$.

Adicionalmente, a los 22 días de cultivo se encontró un predominio de estructuras embriogénicas, en etapas tempranas de desarrollo (Figura 9 A), y a los 30 días fue evidente un progreso en la diferenciación hacia etapas más avanzadas (Figura 9 B y C). El análisis histológico permitió determinar que a los 22 días los embriones somáticos se encontraban en etapas tempranas de desarrollo (Figura 9 D) y a los 30 días los embriones somáticos se encontraban diferenciados principalmente en las etapas torpedo y corazón (Figura 9 E y F).

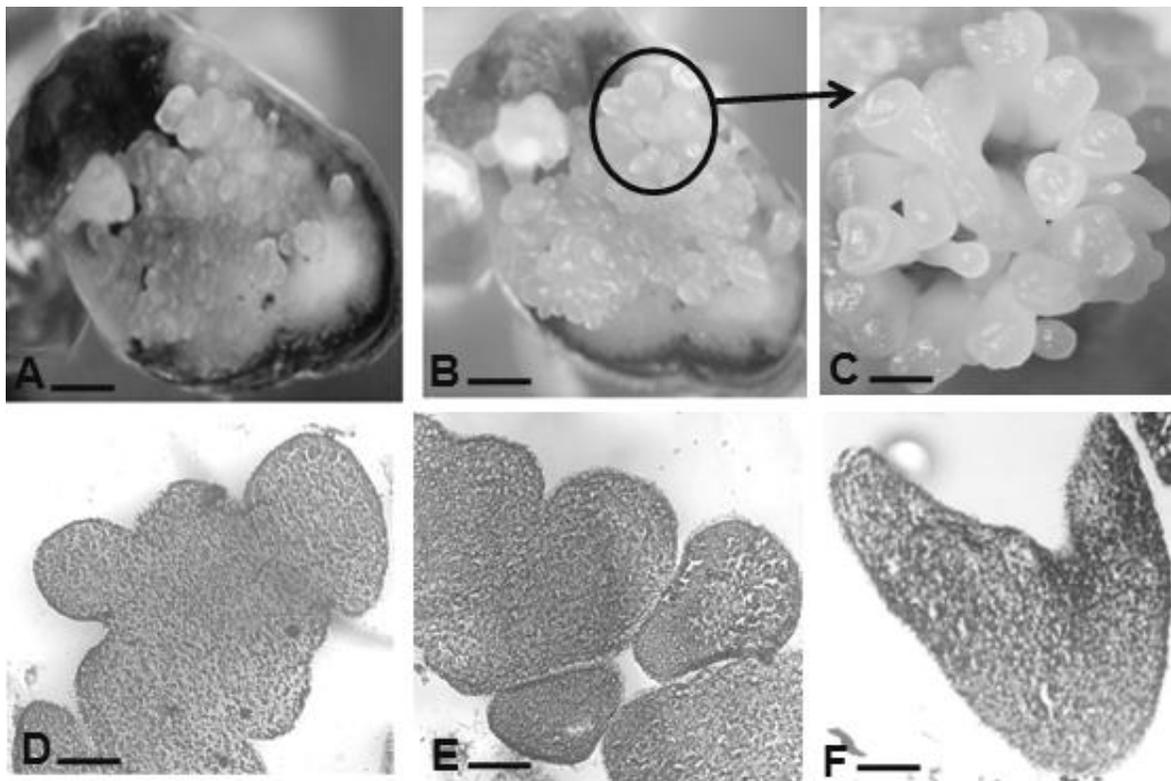


Figura 9. Formación de embriones somáticos en el genotipo cubano IS-35 a los 22 y 30 días de cultivo en cámara de crecimiento con intensidad luminosa entre $68,3-72,81 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A y B Cotiledón inmaduro a los 22 y 30 días de cultivo, respectivamente. C. Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo a los 30 días de cultivo. Escala de la barra: 1,0 mm. D y E. Sección histológica de cotiledón inmaduro a los 30 días de cultivo en etapas torpedo y corazón. Escala de la barra 100 μm . Safranina (D); *Fast green* (E)

El efecto de la luz sobre la diferenciación de los embriones somáticos fue estudiado por Micheler y Lineberger (1987) citados por Hoshino y Cuello (2006). Al exponer cultivos de células de zanahoria (*Daucus carota* L.) a diferentes intensidades y calidades de luz, ellos observaron que más del 50% de los embriones somáticos formados pasaron de la etapa globular a la etapa torpedo, cuando se mantuvieron bajo la influencia de la luz azul en intensidades luminosas entre $5,0$ y $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Estos autores plantearon que la diferenciación observada pudo deberse no sólo a la intensidad de la luz que emplearon sino a la calidad de

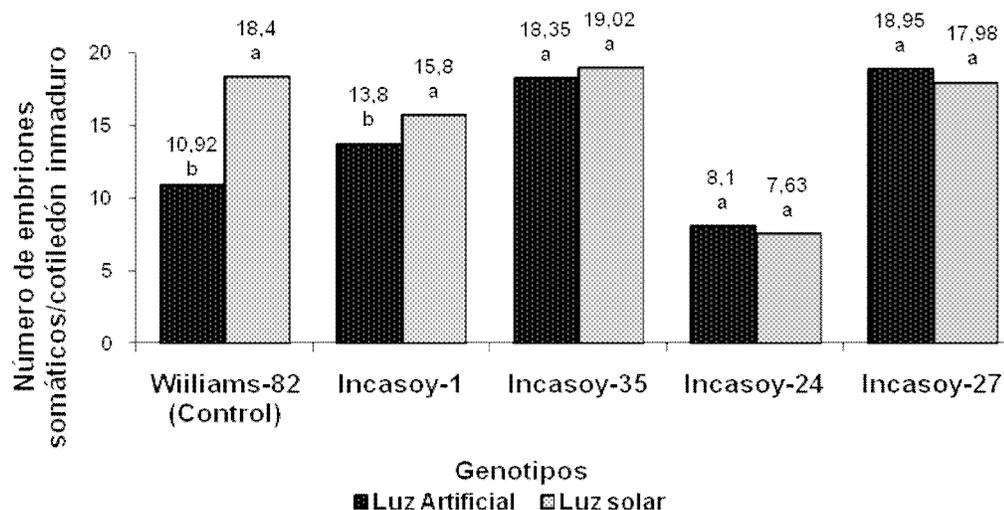
la misma, ya que al exponer este cultivo de células a la luz roja y verde observaron menos cambios morfológicos en los embriones somáticos.

En el mismo sentido, D'Onofrio *et al.* (1998), informaron sobre los efectos tanto positivos como negativos de la luz en la diferenciación de los embriones somáticos de *Sidonia* sp. Adicionalmente, estos autores correlacionaron la proporción de los embriones somáticos diferenciados con el fotoequilibrio. De esta manera, encontraron un incremento exponencial desde 0% hasta el 30% en la cantidad de embriones somáticos diferenciados en la medida en que se incrementó el fotoequilibrio de 0 hasta 1.

Con base en los resultados obtenidos en este experimento se determinó que la respuesta embriogénica de los genotipos cubanos de soya fue superior cuando se empleó la intensidad luminosa de 68,3-72,81 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. De igual forma se observó que a los 22 días de cultivo bajo esta condición de iluminación se puede obtener más del 60% de embriones somáticos sin diferenciación. Estos resultados indican que la intensidad luminosa puede ser empleada para disminuir el tiempo de exposición de los cotiledones inmaduros a las altas concentraciones de 2,4-D y en consecuencia, contribuir a incrementar la calidad de los embriones somáticos formados, lo cual según Parrot *et al.* (1988) y de Moon e Hildebrand (2003), cualquier tratamiento que incremente la calidad de los embriones somáticos puede incrementar la proporción de embriones somáticos que pueden ser convertidos en planta.

4.1.4.2 Luz solar

Se demostró que con el empleo de la luz solar se logró la formación de embriones somáticos tanto en los genotipos cubanos como en el genotipo control. Se encontró que todos los genotipos formaron embriones somáticos bajo esta condición de iluminación. Los genotipos Williams-82 e IS-1 formaron más embriones somáticos bajo condiciones de luz solar que bajo condiciones de luz artificial (Control). En Williams-82 e IS-1, estos valores mostraron diferencias estadísticas con relación a los obtenidos bajo luz artificial (Control). Los genotipos IS-24, IS-27 e IS-35 obtuvieron más embriones somáticos bajo luz artificial (Control) aunque sin diferencias significativas con respecto a los obtenidos bajo luz solar (Figura 10). En todos los genotipos evaluados, se observó que los primeros embriones somáticos se formaron entre los siete y los diez días de cultivo.



Barras con letras distintas en cada genotipo, difieren significativamente según prueba no paramétrica de Mann Whitney, para $p < 0,05$.

Figura 10. Número de embriones somáticos formados a los 22 días de cultivo en cámara de crecimiento de luz solar y artificial con una intensidad luminosa de $68-72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $68,3-72,81 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente

En condiciones naturales, se conoce que la luz solar tiene una proporción constante entre la luz del rojo (R) y la del rojo lejano (FR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 1,1. El efecto de la luz sobre los procesos morfogénicos se lleva a cabo a través de fotoreceptores tales como los fitocromos y los fotoreceptores de luz azul y de luz ultravioleta. Los fitocromos son interconvertidos de manera reversible por la luz del espectro rojo y la del rojo lejano en fitocromo inactivo (P_r) y fitocromo fisiológicamente activo (P_{fr}). La relación entre P_{fr}/P_{tot} , se denomina fotoequilibrio. Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, el efecto de la proporción R:FR sobre la embriogénesis se evalúa empleando lámpara especiales o filtros de luz. Las lámparas fluorescentes empleadas normalmente en el cultivo *in vitro* aportan luz azul y luz roja (Hoshino y Cuello, 2006).

La respuesta embriogénica observada en los genotipos cubanos de soya coincide con los resultados obtenidos por Micheler y Lineberger (1987), quienes al evaluar el cultivo de células embriogénicas de zanahoria (*Daucus carota* L.) expuesto a diferentes calidades de luz (roja, verde, blanca, azul) encontraron que una alta intensidad luminosa estimulaba la producción de embriones somáticos mantenidos bajo luz roja. Sin embargo, la intensidad de la luz no redujo la respuesta embriogénica cuando D'Onofrio *et al.* (1998) expusieron los explantes de (*Cydonia oblonga* Mill), a tratamientos combinados de luz del rojo lejano y luz roja, sugirieron una influencia positiva del fotoequilibrio y del fitocromo en la embriogénesis somática. Estos autores también determinaron que en la medida en que el fotoequilibrio se disminuía, los efectos negativos de la luz azul se incrementaban. Los resultados de Micheler y Lineberger (1987) y los de D'Onofrio permiten

entender hasta el momento que el efecto de la luz sobre la embriogénesis somática en los genotipos cubanos de soya, puede estar dado más por la calidad de la luz que por la intensidad de la misma.

Kodym *et al.* (1999) compararon el efecto de dos intensidades de la luz solar y fotoperiodo entre 12-16 h con las condiciones de intensidad y fotoperiodo de una cámara de crecimiento de luz artificial ($65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 16/8 horas luz/oscuridad) sobre la respuesta morfogénica de ápice caulinares de banano (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). La más alta respuesta morfogénica la lograron en las intensidades correspondientes a las de los experimentos con luz solar. Adicionalmente, encontraron que independientemente del fotoperiodo, la respuesta morfogénica siempre fue mayor bajo condiciones de iluminación con luz solar. Por tanto, estos resultados sugieren que la influencia de la luz sobre la respuesta embriogénica de los genotipos cubanos de soya pudo estar dada más por la calidad de la luz que por el fotoperiodo.

Con el empleo de luz solar con una intensidad luminosa de $68-72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con luz artificial en este rango de intensidad.

4.2 Proliferación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido MSD20 y en medio de cultivo líquido FNL

Como resultado de este experimento se encontró que los genotipos cubanos IS-1 e IS-27 y el genotipo control Williams-82 proliferaron en los dos medios de cultivo evaluados.

Según el medio de cultivo empleado para la proliferación, los tejidos embriogénicos de los genotipos cubanos de soya presentaron diferentes características morfológicas. De esta manera, cuando los grupos de embriones somáticos globulares proliferaron en medio de cultivo semisólido MSD20 se observó una morfología nodular, multiestratificada debido a que las nuevas estructuras embriogénicas se formaron sobre la superficie de los embriones somáticos más viejos, de consistencia friable, con embriones somáticos globulares de tamaños pequeños y algunos traslúcidos, otros con tonalidades entre blanca y amarilla en los genotipos IS-1 e IS-27 y de embriones somáticos globulares de tamaño más grande y tonalidades entre amarilla y verde claro en el control Williams-82 (Figura 11 A, B, C y D).

Cuando proliferaron en medio de cultivo líquido FNL, crecieron en forma de masas densas de embriones somáticos, de superficie plana y multilobulada. Cada lóbulo correspondía a un embrión en etapa de desarrollo temprana. No se apreciaron diferencias en color debidas al genotipo (Figura 11 E, F, G). En el medio de cultivo semisólido se observaron estructuras embriogénicas en diferentes etapas tempranas de desarrollo (Figura 11 H).

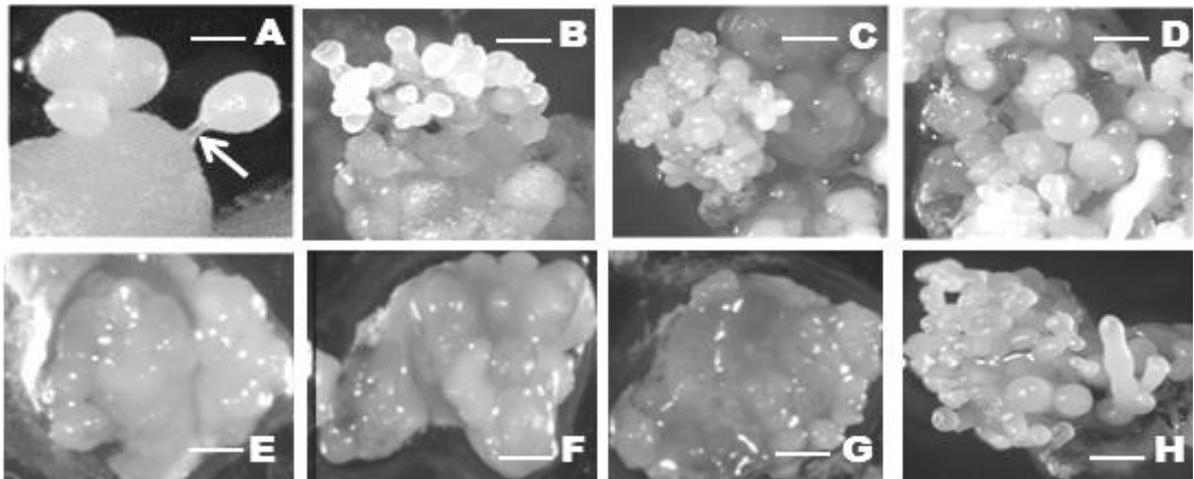
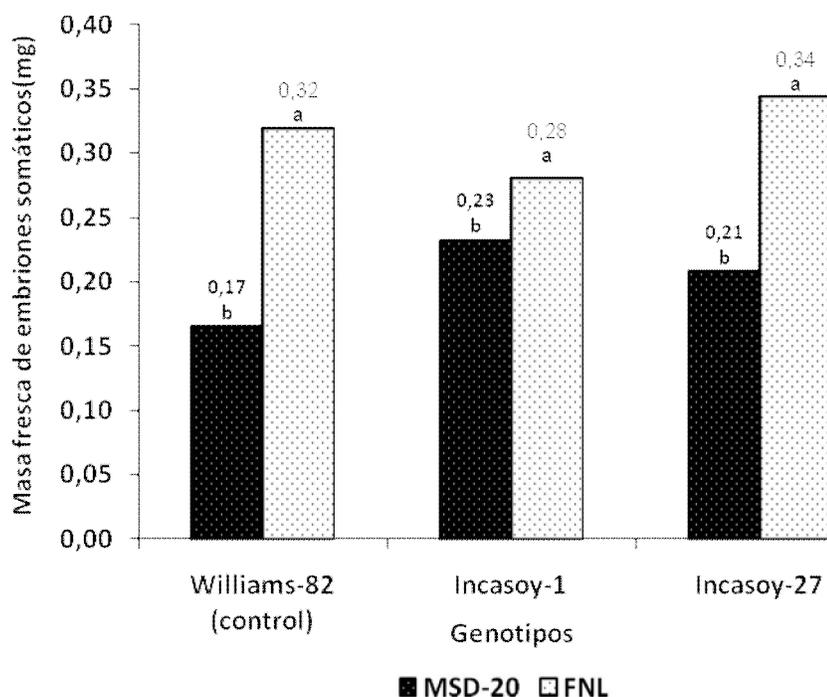


Figura 11. Proliferación de embriones somáticos de genotipos cubanos de soya IS-1 e IS-27 y del control Williams-82 en medio de cultivo semisólido MSD20 y en medio de cultivo líquido FNL a los 30 días de cultivo. A. Formación estratificada de embriones somáticos secundarios. La flecha indica el suspensor. B. Genotipo cubano IS-27. C. Genotipo cubano IS-1. D. Genotipo control Williams-82. E. IS-1. F. IS-27. G. Williams-82. H. Proliferación asincrónica de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido. Escala de la barra 1,0 mm

El incremento en masa fresca fue mayor en todos los genotipos cuando se empleó el medio de cultivo líquido FNL. Estos valores difirieron significativamente con los resultados obtenidos por cada genotipo cuando se utilizó el medio de cultivo semisólido MSD20. Cuando se empleó el medio de cultivo FNL, el genotipo que mostró más incremento de masa fresca fue IS-27, seguido por Williams-82 e IS-1. En contraste, cuando se empleó el medio de cultivo MSD20, el mayor incremento en masa fresca se observó en el genotipo IS-1 seguido de IS-27 y Williams-82 (Figura 12).



Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba t-student, para $p < 0,05$.

Figura 12. Incremento de masa fresca de los embriones somáticos de los genotipos cubanos de soja IS-1 e IS-27 en los medios de cultivo MSD-20 y FNL a los 30 días de cultivo

Los resultados obtenidos en este experimento se corresponden con lo planteado en la literatura científica, en el sentido en que la proliferación de los embriones somáticos de soja puede llevarse a cabo tanto en medio de cultivo líquido FNL como en medio de cultivo semisólido MSD20 (Samoylov *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1991). En segundo lugar, estos resultados también coinciden con lo expuesto por Finer y Nagasawa (1988), quienes manifestaron que debido al contacto directo del tejido con el medio de cultivo, la proliferación es más eficiente en medio de cultivo líquido (FNL) que en medio de cultivo semisólido (MSD20).

En términos generales, es importante tener en cuenta que en soja los medios de cultivo líquidos son adecuados para la proliferación a gran escala de embriones

somáticos y su uso está asociado a los sistemas de transformación genética (Finer y Nagasawa, 1988; Moon e Hildebrand, 2003).

A la luz de los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que el genotipo que mejor se adaptó a la proliferación en medio de cultivo líquido fue IS-27 en comparación al resultado obtenido por el genotipo IS-1 cuando se empleó este mismo medio de cultivo. Estos resultados coinciden con Hiraga *et al.* (2007) quienes concluyeron que la respuesta a la proliferación en medios líquidos es genotipo dependiente, es decir, no todos los genotipos se adaptan de la misma manera a la proliferación en medios de cultivo líquidos.

Estos resultados constituyen los primeros estudios sobre embriogénesis somática en genotipos cubanos de soya. Además, se comprobó que el tamaño y la orientación del explante, la concentración de 2,4-D y las condiciones de iluminación determinan la respuesta embriogénica de los genotipos cubanos de soya Incasoy-1, Incasoy-24, Incasoy-27 e Incasoy-35. De igual forma, se logró por primera vez la formación de embriones somáticos de soya bajo condiciones de luz solar. Finalmente, este trabajo proporciona información básica sobre la formación y proliferación de embriones somáticos de genotipos cubanos de soya, necesaria para estudios posteriores.

5 CONCLUSIONES

1. Se definió que con la orientación abaxial y una longitud de la semilla de 4,0 mm se obtuvo el mayor número de embriones somáticos por cotiledón inmaduro.
2. Se definió que la concentración de 2,4-D requerida para obtener la mayor formación de embriones somáticos en el genotipo IS-24 fue de 30 mg.L⁻¹ y para IS-1, IS-27 e IS-35 de 40 mg.L⁻¹.
3. Se estableció que la mayor formación de embriones somáticos, en etapas tempranas de desarrollo, se obtuvo al exponer los explantes durante 22 días de cultivo a una intensidad luminosa de 68-72 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.
4. Se estableció que con el empleo de la luz solar se formaron embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya.
5. Se determinó que en el medio de cultivo líquido FNL hubo una mayor proliferación de los embriones somáticos en los genotipos evaluados. El Incasoy-27 fue el genotipo que mostró mayor incremento en masa fresca.

6 RECOMENDACIONES

1. Continuar la evaluación de la respuesta embriogénica de los genotipos cubanos de soya en las fases posteriores a la formación y proliferación de embriones somáticos.
2. Evaluar la respuesta de los embriones somáticos formados bajo condiciones de alta intensidad luminosa tanto de luz artificial como de luz solar en las fases de maduración, germinación y conversión de la embriogénesis somática.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acquaah George (2007) Principles of Plant Genetics Breeding. Blackwell Publishing. Capítulo 31, pp 519-522.
2. Alabadí D, Blázquez MA (2009) Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mole Biol.* 69: 409-417.
3. Aparecida J, Carneiro ML, Olívio I, Appezzato B (2002) Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 45 (3): 277-286.
4. 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.
5. Becerra DS K, De Araujo M JE, Moço C MC, Bodanese Z MH (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill): Ontogeny of somatic embryos. 49(1): 49-55.
6. Barwale UV, Kerns HR y Widholm JM (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta.* 167: 473-481.
7. Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell,* 115: 591-602.
8. Beversdorf WD, Bingham ET (1977) Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop Sci.* 17: 307-311.
9. Bonacin GA, Di Mauro AO, de Oliveira RC, Perecin D (2000) Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. *Gen Mol Biol.* 23: 865-868.
10. Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science.* 222: 632-634.

11. de la Fe C, Romero M, Ortiz R, Ponce M (2000) Radiosensibilidad de semillas de soya a los rayos gamma ^{60}Co . *Cultivos Tropicales*. 21 (2): 37-42.
12. Donaldson PA, Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep.* 19:478-484.
13. D'Onofrio CD, Morini S, Bellocchi G (1998) Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 53: 91-98.
14. FAO (2009) *Perspectivas Alimentarias*. En línea:
<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e07.htm>. Consulta Enero de 2010.
15. Ferraz de Toledo JF, de Almeida LA, de Souza RA, Kiihl MC, Carrão M, Kaster LC, Menosso OG (1995) *Genética y mejoramiento*. Colección FAO: Producción y protección vegetal, No. 27. Roma pp 19-36.
16. Filippov M, Miroshnichenko D, Vernikovskaya D (2006) The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84: 213-222.
17. Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports*. 7: 236-241.
18. Finer JJ, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 15: 125–136.
19. Finer JJ, McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell and Development Biology*. 27: 175–182.
20. Fuentes RLS, Calheiros BPM, Manetti-Filho J, Viera GEL (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic

- embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 60: 5-13.
21. Ghazi TD, Cheema HV, Nabors MW (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. Plant Cell Rep. 5: 452-456.
 22. 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.
 23. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Plant cell cultures. 50:151–158.
 24. George EF, Hall MA, Jan De Klerk, G (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Ed. Capítulo 13. Volumen 1. pp 464-473. Springer.
 25. Griga M (1993) Some factors affecting somatic embryogenesis efficiency in soybean (*Glycine max* [L.] Merrill). Biologia Plantarum. 35 (2): 101-106.
 26. Griga M (2002) Morphology and anatomy of *Pisum sativum* somatic embryos. Biologia Plantarum. 45 (2): 173-182.
 27. Hartweck LM, Lazzeri PA, Cui D, Collins GB y Williams EG (1988) Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybeans cotyledons. In Vitro Cell Dev Biol. 24: 821-828.
 28. Hopher A, Boulter ME, Harris N, Nelson RS (1988) Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Ann Bot. 62: 513-519.
 29. 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.
 30. Hoshino T, Cuello JL (2005) Environmental Design Considerations for Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs (2). En: Somatic

- Embryogenesis. Mujib A, Samaj JE (Eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp 25-32.
31. Jiménez, V.M (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*. 47: 91-110.
32. Kim Y, Il T, Soon H, Ki, H., Uk, S y Joong, S (2004). Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. *J. Plant Biotechnology*. 6(1): 45-50.
33. Kita Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayaman M, Ishimoto M (2007) Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Rep*. 26: 439-447.
34. Kodym A, Zapata A FJ (1999). Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. "Grande Naine". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 55:141-145.
35. Ko T.S, Lee S, Krasnyanski S, Korban S.S (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical Applied Genetics*, 107:439–447.
36. Ko TS y Korban SS (2004) Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*- mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 552-558.
37. Komamine A, Murata N, Nomura K (2005) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 6-10.
38. Komatsuda, T, Kaneko K, Oka S (1991) Genotype x sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean. *Crop Science Society of America*, 31:333–337.

39. Lazzeri, P.A, Hildebrand D.F, Collins G.B (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Molecular Biology Reports*, 3:160–167.
40. Lazzeri, P.A, Hildebrand D.F, Collins G.B (1987a) Soybean somatic embryogenesis: Effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 10:197–208.
41. Lazzeri, P.A, Hildebrand D.F, Collins G.B (1987b) Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 10:197–208.
42. Lippmann, B, Lippmann G (1984) Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Reports*, 3:215–218.
43. Loganathan, M, Maruthasalam, S, Shiu, L.Y, Lien, W.C, Hsu, W.H, Lee, P.F, Yu, C.W y Lin, C.H (2010) Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant*. DOI 10.1007/s11627-009-9263-1.
44. Meng Q, Zhang C, Gai, Yu D (2007). Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *J Plant Physiology*. 164: 1002-11012.
45. Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 90: 1-8.
46. Nishizawa K, Ishimoto, M (2009) Maturation of somatic embryos as a model for soybean seed development. *Plant Biotechnology*. 26: 543–550.
47. Nomura K, Komamine A (1999) Physiological and Morphological Aspects of Somatic Embryogenesis. En: *Morphogenesis in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. Soh WY y Bhojwani SS (Eds) The Netherlands. Capítulo 5, pp 115- 129.
48. Meurer CA, Dinkins RD, Redmond CT, McAllister KP, Tucker DT, Walker DR, Parrott WA, Trick HN, Essig JS, Frantz M, Finer JJ, Collins GB (2001)

- Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 37: 62-67.
49. Micheler CH, Lineberger RD (1987) Effects of light on somatic embryo development and abscisic level in carrot suspension cultures. *Plant Cell Tissues and Organ Culture*. 11: 189-207.
50. MINAG (2010) El cultivo de la soya en Cuba. Instructivo Técnico. MINAG. pp 6-16.
51. 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.
52. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
53. Nishizawa K, Ishimoto Masao (2009) Maturation of somatic embryos a model for soybean seed development. *Plant Biotechnology*. 26: 543-550.
54. Ortiz R, de la Fé C, Ponce M (2008) INCASOY-36: Variedad de soya obtenida en Cuba a partir de la inducción de mutaciones con los rayos gamma de ^{60}Co . *Cultivos Tropicales*. 29 (3): 73.
55. Ortiz R, de la Fé C, Ponce M (2005) Informe de nuevas genotipos. INCASOY-35: Primera variedad de soya obtenida en Cuba a partir del empleo de técnicas de irradiación de rayos gamma de ^{60}Co . *Cultivos Tropicales*. 26 (2): 57.
56. Parrott WA, Dryden G, Vogt S, Hildebrand DF, Collins GB, Williams EG (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 24: 817-820.
57. Parrott WA, Hildebrand DF, Williams EG, Collins GB (1989) Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 15-21.

58. Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D y Fehér A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129: 1807-1819.
59. Ponce M, de la Fé C, Ortiz R, Moya C (2003) Informe de nuevas genotipos. IS-24 e IS-27: Nuevas genotipos de soya para las condiciones climáticas de Cuba. *Cultivos Tropicales.* 24 (3): 49.
60. Ponce M, Ortiz R, de la Fé C (2007) INCASOY-1: Variedad de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) para usos múltiples. *Cultivos Tropicales,* 28 (1): 57.
61. Quiroz FR, Rojas HR, Galaz A R y Loyola V (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be use to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86: 285-301.
62. Radice S (2004) Morfogénesis *In Vitro*. En: biotecnología y mejoramiento vegetal. Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L (Eds). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 1, 448 p.
63. Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC (1985) Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* 21: 653–657.
64. Ranch JP y Palmer RG (1987) A ploidy variant regenerated from embryogenic tissue cultures of soybean. *Soybean Genet. Newslett.* 14: 116-163.
65. Samaj J, Baluska F, Petrová A y Volkmann D (2003) Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmamic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Rep.* 21: 940-945.
66. Schnabel EL, Frugoli J (2004) The *PIN* and *LAX* families of auxin transport genes in *Medicago truncatula*. *Mol Gen Genomics.* 272: 420-432.

67. Sharma SK, Bryan GJ, Millam S (2007) Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. *Plant Cell Rep.* 26: 945-950.
68. 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.
69. Santarém ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent, and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 33:13-19.
70. Schmidt MA, Tucker DM, Cahoon EB, Parrot WA (2005) Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. *Plant Cell Rep.* 24: 383-391.
71. Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biobalistic transformation of short-season soybeans genotypes. *Plant Cell Rep.* 19: 485-490.
72. Socorro Q MA, Martín F DS (1989) Granos. Editorial Pueblo y Educación. Capítulo II pp. 54-58.
73. Song X, Han Y, Teng W, Sun G, Li W (2009) Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Report.* DOI 10.1007/s00299-0090804-1.
74. Torné JM, Moysset L, Santos M, Simón M (2001) Effects of quality on somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. *Physiologia Plantarum* 111: 405-411.
75. Thomas C, Bronner R, Molinier J, Prinsen E, Van Onckelen H, Hahne G (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta.* 215: 577–583.

76. Tomlin ES, Branch SR, Chamberlain D, Gabe H, Wright MS, Stewart CN Jr (2002) Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons. In *Vitro Cell Dev Biol Plant*. 38:543–548.
77. Walker DR y Parrott WA (2001) Effect of polyethylene glycol and sugar alcohol on soybean somatic embryo germination and conversión. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 64: 55-62.
78. Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann Bot*. 57: 443-462.
79. Wright MS, Launis KL, Novitzdy R, Duesiing JH, Harms CT (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. In *Vitro Cellular and Developmental Biology*. 27(3): 153–157.
80. Yang C, Zhao T, Yu D, Gai J (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): impacts of manitol, abscisic acid, and explant age. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 45: 180-188.