

Regeneración in vitro de plantas de soya de la variedad cubana Incasoy-36

✉ Natacha Soto, Aleines Ferreira, Celia Delgado, Gil A Enríquez

Laboratorio de Biotecnología de la Soya, División de Plantas,
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11 600, La Habana, Cuba
E-mail: natacha.soto@cigb.edu.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Un procedimiento eficiente y reproducible de regeneración de plantas es esencial para introducir genes de interés en cultivos importantes, mediante la transformación genética de las plantas. Sin embargo, hay cultivos como la soya [*Glycine max* (L.) Merrill], cuya manipulación *in vitro* es difícil, muchas veces depende de su genotipo, y no es posible la reproducibilidad de todos los protocolos establecidos. El objetivo de este trabajo fue la optimización de un protocolo de regeneración de brotes de soya de la variedad cubana Incasoy-36, de modo que se pueda reproducir. Para promover la inducción de los brotes en condiciones específicas de cultivo, se seleccionó el nudo cotiledonal de las semillas maduras como explante. Se evaluó el efecto de varias concentraciones de bencilaminopurina y se demostró que la edad del explante es fundamental en el proceso de regeneración. La concentración óptima para la organogénesis fue 1.5 mg/L de bencilaminopurina, que favoreció el 96.8 % de la frecuencia de formación de los brotes y una eficiencia de 4.3 brotes en explantes de 6 días de germinados. La elongación de los brotes y la inducción de las raíces ocurrieron en un medio MSB5 sin hormonas. Las plantas regeneradas se obtuvieron entre 7 y 8 semanas de iniciado el cultivo, y fueron morfológicamente similares a las de esta variedad.

Palabras clave: Soya, *Glycine max*, regeneración de brotes, nudo cotiledonal

Biotecnología Aplicada 2013;30:29-33

ABSTRACT

In vitro regeneration of Cuban soybean variety Incasoy-36. An efficient and reproducible plant regeneration procedure is essential for introducing genes of interest in important crops through genetic transformation. However, some crops, such as soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], are difficult to manipulate *in vitro*, often depending on their genotype, and the reproduction of the established protocols is not always possible. The purpose of this paper is the optimization of a regeneration protocol for soybean shoots of the Cuban variety Incasoy-36 to enable its reproduction. Cotyledonary nodes of mature seeds were the explants of choice to promote regeneration under specific culture conditions. The effect of several concentrations of benzylaminopurine on shoot induction was evaluated and it was demonstrated that the age of explants is essential for regeneration. Shoot formation was increased with 1.5 mg/L of benzylaminopurine, producing a regeneration frequency of 96.8 % and 4.3 shoots in explants with a 6 day germination period. The elongation of shoots, as well as rooting occurred in an MSB5 medium without hormones. Regenerated plantlets were obtained 7-8 weeks after the start of the culture and they were morphologically similar to plants of this variety.

Keywords: Soybean, *Glycine max*, shoot regeneration, cotyledonary nodes

Introducción

La soya [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los cultivos más comercializados y al que se dedica una gran parte del área productiva del planeta. El elevado contenido de proteínas y lípidos de su grano, lo convierten en uno de los de mayor interés para la alimentación humana y animal. Por tal razón, los genetistas buscan métodos para optimizar sus características. Como la aplicación satisfactoria de la biotecnología en el mejoramiento genético de los cultivos priorizados como la soya se basa en un eficiente protocolo de regeneración, los investigadores han tratado de optimizar las condiciones que aumentan la regeneración de sus explantes. Casi todas las partes de esta planta se han utilizado como explantes para su regeneración, ya sea por organogénesis [1] o por embriogénesis somática [2]. Estos explantes pueden ser nudos cotiledonales [3, 4], entrenudos de los tallos [5], secciones de epicótilos [6], tejidos de hojas primarias [7], plúmulas [8], hipocótilos [9], ejes embriogénicos [10], cotiledones inmaduros [11, 12], embriones

inmaduros y maduros [1] y raíces [13]. Con la organogénesis se logran brotes en un corto periodo de 2-3 meses y se mantienen las características del genotipo, a diferencia de la embriogénesis somática que se necesita alrededor de 6 meses para obtener plantas y puede presentar altos niveles de variación somaclonal en las plantas regeneradas [2]. Se han descrito sistemas de organogénesis donde los explantes necesitan dos medios de cultivo, uno para la inducción de los brotes y otro para su elongación. También requieren más tiempo de cultivo y medios para obtener las plantas. Se plantea que tanto la regeneración de esta leguminosa como su transformación genética son marcadamente dependientes del genotipo de la planta. Por tales razones, la mayoría de los protocolos de regeneración y de transformación establecidos para algunas variedades no se puede reproducir. El nudo cotiledonal es uno de los explantes más usados para la transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens* [14]; y aunque fue de los primeros para

1. Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta*. 1986; 167(4):473-81.
2. Finer JJ, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1988;15(2):125-36.
3. Cheng T-Y, Saka H, Voqui-Dinh TH. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci Lett*. 1980;19(2):91-9.
4. Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, Harada K, Akihama T, Kitamura K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep*. 1997;17(1):8-12.
5. Kim J, LaMotte CE, Hack E. Plant Regeneration *In Vitro* from Primary Leaf Nodes of Soybean (*Glycine max*) Seedlings. *J Plant Physiol*. 1990;136(6):664-69.

obtener plantas transgénicas [15], todavía hay genotipos cuya regeneración de brotes es difícil [16-18].

El cultivo de la soya ha alcanzado un alto grado de importancia en Cuba. Hay variedades adaptadas a las condiciones de los suelos, y algunas poseen elevados índices de rendimiento. En este artículo se describe un protocolo optimizado de organogénesis en la variedad cubana de soya Incasoy-36, que utiliza el nudo cotiledonal de semillas maduras como explante. Este procedimiento puede ser útil para su multiplicación *in vitro*, para su transformación genética y para la introducción de nuevos caracteres agronómicos.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de soya de la variedad cubana Incasoy-36, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (Inca, La Habana, Cuba). Estas se desinfectaron con etanol al 70 % durante 1 min, y luego se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial al 12 % durante 10 minutos con agitación frecuente. Después se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril y se pusieron a germinar en un medio basal MSB5 (sales MS [19] y vitaminas B5 [20]) enriquecido con sacarosa (30 g/L) y solidificado con fitoagar (7 g/L) (Duchefa Biochemie B.V., Holanda) después de ajustado el pH a 5.7. Las semillas se mantuvieron de 6 a 8 días a una temperatura de 27 °C y con un periodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Preparación de los explantes para la inducción de los brotes

Los germinados de 6 a 8 días se utilizaron como explantes para la inducción de los brotes. A cada uno se le hizo un corte horizontal de 5 a 7 mm en la región del hipocótilo, para eliminar la radícula. Después se separaron los cotiledones con un corte longitudinal, se eliminó la yema apical y se colocaron en el medio MSB5 enriquecido con bencilaminopurina (0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 6 mg/L) y sacarosa (30 g/L).

El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de adicionar el fitoagar (7 g/L). Se probaron otras concentraciones de fitoagar (5, 6, 7 y 8 g/L) y fitagel (2 y 3 g/L) en el medio de inducción de los brotes. Todos los explantes se incubaron a 27 °C, con 16 h de luz.

Para cada tratamiento se utilizaron 21 explantes (7 explantes/placa) y los experimentos se repitieron 3 veces. Se evaluaron dos parámetros: edad del explante y concentración de la bencilaminopurina en el medio de inducción de los brotes. La influencia de la edad del explante en la regeneración del nudo cotiledonal se analizó comparando las frecuencias de regeneración de los explantes de cada edad (6, 7 y 8 días) y el número de brotes por explante en las diferentes concentraciones de bencilaminopurina.

Enraizamiento de los brotes y adaptación de las plantas al suelo

Los brotes regenerados después de 35 a 40 días (de 3 a 4 cm) se pusieron a enraizar en un medio MSB5 sin hormonas durante 7 a 15 días. Las plantas enraizadas se transfirieron a macetas plásticas pequeñas con una mezcla de materia orgánica y zeolita (1:1 v/v), bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura

ambiente durante 7 días. Después se trasplantaron a macetas grandes y se mantuvieron en invernadero hasta la floración y producción de las semillas.

Análisis estadístico

Periódicamente se observaron los cultivos y se evaluaron el efecto de la edad del explante y la concentración de la bencilaminopurina en la regeneración de los brotes. Se analizaron los datos mediante un análisis de varianza (Anova) simple. Se compararon las medias según el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) para $p < 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Plus, versión 5.0.

Resultados

Efecto de la edad del explante y la concentración de la bencilaminopurina sobre la regeneración de los brotes a partir del nudo cotiledonal

Los cotiledones de las semillas maduras de soya germinadas *in vitro*, seleccionados como explantes para los ensayos de regeneración, alcanzaron una coloración verde después de 6 a 8 días en el medio de germinación MSB5 sin hormonas (Figura 1). Al comparar el efecto de la edad del explante en la regeneración

6. Wright MS, Williams MH, Pierson PE, Carnes MG. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr.: Plants from tissue-cultured epicotyls. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1987;8(1):83-90.

7. Wright MS, Ward DV, Hinchee MA, Carnes MG, Kaufman RJ. Regeneration of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] from cultured primary leaf tissue. *Plant Cell Rep.* 1987;6(2):83-9.

8. Yang Y-S, Wada K, Futsuhara Y. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. *Plant Sci.* 1990;72(1):101-8.

9. Dan Y, Reichert N. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. *In Vitro Cell Dev-Pl.* 1998;34(1):14-21.

10. Liu H-K, Yang C, Wei Z-M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta.* 2004;219(6):1042-9.

11. Samoylov VM, Tucker DM, Parrott WA. Soybean [*Glycine max* (L.) merrill] embryonic cultures: The role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell Dev-Pl.* 1998;34(1):8-13.

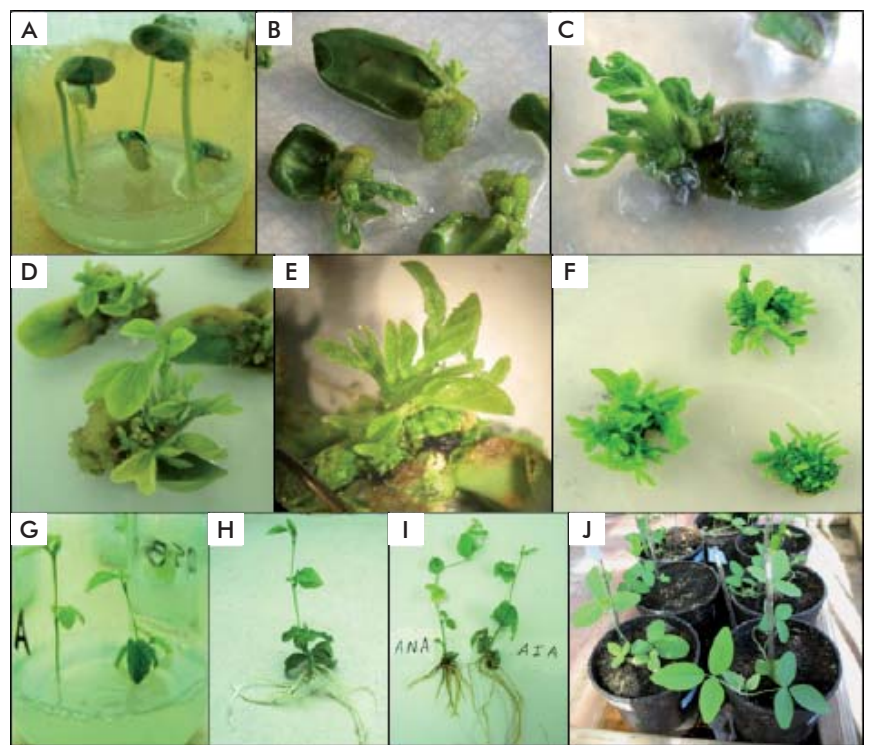


Figura 1. Sistema de regeneración a partir del nudo cotiledonal de semillas maduras de soya (*Glycine max*) de la variedad Incasoy-36. A) Germinados de soya después de 6 a 8 días en un medio MSB5 sin hormonas. B) Explantes con callos y brotes después de 25 días en MSB5 con 2 mg/L de bencilaminopurina. C) Formación de brotes después de 30 días en MSB5 con bencilaminopurina. D) Explantes con brotes después de 40 días en 1.5 mg/L de bencilaminopurina. E) Organogénesis a partir del nudo cotiledonal de soya. F) Yemas múltiples regeneradas en un medio MSB5 con 3 mg/L de bencilaminopurina. G) Brotes de soya en un medio MSB5 sin hormonas para la formación de raíces. H) Formación de raíces después de 15 días en el medio MSB5 sin hormonas. I) Formación de raíces después de 15 días en un medio MSB5 con las auxinas ácido naftalenacético (ANA) o ácido indolacético (AIA). J) Plantas trasplantadas a macetas en condiciones de invernadero.

de los brotes sobre el medio MSB5 enriquecido con 1.5 mg/L de bencilaminopurina, se observó que los explantes de 6 días alcanzaron la mayor frecuencia de regeneración de los brotes (96.8 %); aunque no difirió de la frecuencia en los explantes de 7 días de edad (92.6 %). Sin embargo, la regeneración de los brotes de ambas edades (6 y 7 días) superó considerablemente la obtenida en los explantes de 8 días (41.2 %) (Figura 2A). Al evaluar la eficiencia de la regeneración, se observaron resultados similares: los explantes más jóvenes (6 días) mostraron el mayor número de brotes por explante y los valores difirieron significativamente de los obtenidos en los explantes de 7 y 8 días (Figura 2B). En estudios preliminares se comprobó que cuando el nudo cotiledonal estuvo expuesto a altas concentraciones de bencilaminopurina (3 a 6 mg/L), los explantes más jóvenes (6 días) mostraban una mayor respuesta regenerativa que los explantes de 7 y 8 días de germinados, que desarrollaron brotes muy pequeños y abundante callosidad. Los explantes que no desarrollaron brotes se tornaron cloróticos y la zona del nudo cotiledonal pardo oscuro.

El número de brotes regenerados dependió de la concentración de bencilaminopurina, aunque esta citoquinina indujo la organogénesis de los brotes en todas las concentraciones probadas (de 0.5 a 6 mg/L) (Tabla 1). Los explantes desarrollaron brotes a partir de la región

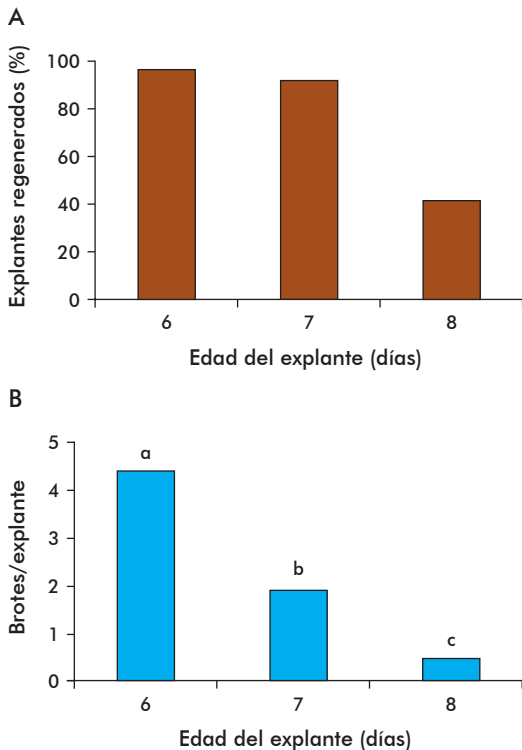


Figura 2. Efecto de la edad del explante (6, 7 y 8 días) sobre la eficiencia de regeneración de los brotes de soya variedad Incasoy-36. A) Por ciento de explantes regenerados a partir del nudo cotiledonal de germinados de diferentes edades. B) Eficiencia de la regeneración en las tres edades evaluadas, representada por el número de brotes total entre el total de explantes. El proceso de regeneración ocurrió en un medio MSB5 enriquecido con 30 g/L de sacarosa, 1.5 mg/L de bencilaminopurina y 6 g/L de fitoagar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según el procedimiento de Fisher (LSD).

Tabla 1. Resultados de la regeneración de brotes a partir del nudo cotiledonal de semillas de soya a diferentes concentraciones de bencilaminopurina*

Bencilaminopurina (mg/L)	Frecuencia de regeneración [†]	Brotes	Brotes/explante [‡]	Brotes enraizados (%)
0.5	33 ± 1.4 (52.4 %)	50	0.8 ^d	90.0
1.0	55 ± 1.2 (87.3 %)	95	1.5 ^c	93.6
1.5	61 ± 0.7 (96.8 %)	271	4.3 ^a	97.0
2.0	58 ± 0.9 (92.1 %)	202	3.2 ^b	95.0
3.0	30 ± 1.7 (47.6 %)	57	0.9 ^d	84.2
6.0	17 ± 1.2 (27 %)	28	0.4 ^e	82.1

* Los datos son la suma de tres experimentos (21 explantes por tratamiento), con semillas germinadas a los 6 días, en un medio MSB5 y expuestas a concentraciones incrementadas de bencilaminopurina.

[†] Frecuencia de regeneración: (Número de explantes con brotes/Número de explantes) × 100.

[‡] Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según el procedimiento de Fisher (LSD).

del nudo cotiledonal donde se hizo el corte y donde estaban las yemas axilares, después de 4 semanas de cultivo (Figura 1B-E). La mayor eficiencia de formación de los brotes se obtuvo en el medio MSB5 con 1.5 mg/L del compuesto, aunque no difirió de la eficiencia obtenida con 2 mg/L (4.3 y 3.2 brotes/explante, respectivamente) (Tabla 1).

Cuando se enriqueció el medio MSB5 con bencilaminopurina se observó una masa de callos verdes, compacta en la zona del nudo cotiledonal de algunos explantes, donde se hizo el corte para separar el hipocótilo (Figura 1B). Esta estructura callosa no afectó el desarrollo normal de los brotes en las concentraciones inferiores a 2 mg/L. Sin embargo, en las concentraciones superiores a 3 mg/L, la callosidad fue abundante en más del 30 % de los explantes y el desarrollo de los brotes se vio afectado. No obstante, se logró un 27 % de brotes en la concentración de 6 mg/L de bencilaminopurina (Tabla 1). Después de 45 días en ese medio, los explantes con callos que no desarrollaron brotes tomaron una coloración parda oscura y se eliminaron.

Al mismo tiempo, aparecieron yemas múltiples en la zona del nudo cotiledonal, cuando los explantes estuvieron en un medio MSB5 con más de 1.5 mg/L de bencilaminopurina (Figura 1F). Estas se desarrollaron solamente cuando los nudos cotiledonales conservaron las yemas axilares al colocarlos en el medio de inducción con la citoquinina. Cuando se eliminaron todas las yemas (apicales y axilares) del nudo cotiledonal, se observó la formación de una masa de callos que no llegó a regenerar brotes. Aunque en los tratamientos con más de 3 mg/L de bencilaminopurina hubo una mayor aparición de estas yemas múltiples, en la mayoría de los explantes se mantuvieron verde intenso, pero no crecieron (Figura 1F). En estas condiciones se logró el desarrollo de brotes bien definidos (2 cm), brotes muy pequeños (menores de 0.7 cm) y hojas. A pesar de haber sido abundantes, los brotes muy pequeños no se tuvieron en cuenta para determinar la eficiencia de la regeneración. El número de brotes (a partir de 2 cm) se contó a las 8 semanas después del cultivo.

Efecto del agente solidificante sobre la morfogénesis del nudo cotiledonal

Otro parámetro estudiado fue el efecto de diferentes concentraciones de agar (5, 6, 7 y 8 g/L) y fitagel (2 y 3 g/L) sobre la formación de los callos y la regeneración de los brotes a partir del nudo cotiledonal. Este estudio

12. Droste A, Pimentel P, Pasquali G, Mundstock E, Bodanese-Zanettini M. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Sci Agric*. 2001; 58(4):753-8.

13. Bueno M, Severin C, Gattuso S, Giubileo G. Inducción de callos embriogénicos en raíces de Soja (*Glycine max*). *Cien Inv Agr*. 2004;31(1):13-9.

14. Hong H, Zhang H, Olthoff P, Hill S, Wiley H, Toren E, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cell Dev-Pl*. 2007;43(6):558-68.

15. Hinchey MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, et al. Production of Transgenic Soybean Plants Using *Agrobacterium*-Mediated DNA Transfer. *Nat Biotechnol*. 1988;6(8):915-22.

16. Staswick PE, Zhang Z, Clemente TE, Specht JE. Efficient down-regulation of the major vegetative storage protein genes in transgenic soybean does not compromise plant productivity. *Plant Physiol*. 2001;127(4):1819-26.

17. Buhr T, Sato S, Ebrahim F, Xing A, Zhou Y, Mathiesen M, et al. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J*. 2002;30(2):155-63.

18. Sato S, Xing A, Ye X, Schweiger B, Kinney A, Graef G, et al. Production of linolenic acid and stearidinic acid in seeds of marker-free transgenic soybean. *Crop Sci*. 2004;44(2):646-52.

19. Margulies MM. Effect of Chloramphenicol on Light Dependent Development of Seedlings of *Phaseolus vulgaris* var. Black Valentine, With Particular Reference to Development of Photosynthetic Activity. *Plant Physiol*. 1962;37(4):473-80.

20. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. 1968;50(1):151-8.

se hizo en un medio MSB5 con 1.5 mg/L de bencilaminopurina. Los mejores resultados se obtuvieron con agar como agente gelificante (Tabla 2). Las mayores frecuencias de regeneración (98.5 y 97.6 %) se alcanzaron con las concentraciones 5 y 6 g/L, respectivamente. Con las cuatro concentraciones de agar se desarrollaron brotes bien definidos después de 25 a 30 días (Figura 3A-C). Sin embargo, en 8 g/L de agar, los brotes regenerados (29 %) tuvieron un crecimiento más lento (30 a 50 días). Cuando se utilizó fitigel, se formaron menos callos (11 y 19 %) que en los explantes cultivados en agar (23 y 41 %) y los brotes tuvieron un crecimiento rápido y definido, similar a lo ocurrido con 5 y 7 g/L de agar (Figura 3D). En cambio, la frecuencia de regeneración de los brotes (28.5 y 42.4 %) no superó la alcanzada en agar.

Enraizamiento de brotes y adaptación de las plantas al suelo

Los brotes regenerados emergieron de la región del nudo cotiledonal, cerca de la zona donde se hizo el corte, sin interferir la formación de callos (Figura 1B-E). Las plantas regeneradas en 1.5 y 2 mg/L de bencilaminopurina presentaron la más alta frecuencia de formación de raíces (97 y 95 %, respectivamente; tabla 1). Aunque más del 80 % de los brotes regenerados (3 a 4 cm de altura) desarrollaron raíces después de 7 a 15 días en un medio MSB5 sin hormonas (Figura 1G-H), los brotes pequeños (de 1 a 2 cm de altura) que se pusieron a enraizar en ese medio no crecieron ni desarrollaron raíces. Por esa razón, se pasaron a un medio MSB5 enriquecido con 0.1 mg/L de ácido indolacético (AIA) o 0.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) para inducir la formación de raíces. En estas dos variantes se logró una elevada formación de raíces (Figura 1I): 96 % en el medio con AIA y 94 % en el medio con ANA. Todas las plantas enraizadas se transfirieron al invernadero para su climatización y crecimiento. Estuvieron en macetas pequeñas cubiertas con un nailon transparente, para crear una cámara de humedad, y después de 7 días se trasplantaron a macetas grandes hasta la producción de semillas (Figura 1J).

Discusión

El nudo cotiledonal es uno de los explantes más usados para los estudios de regeneración y transformación genética de la soja [15]. Sin embargo, la frecuencia

Tabla 2. Regeneración de brotes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] a partir del nudo cotiledonal en diferentes concentraciones de agar y fitigel*

Agente solidificante	Concentración (g/L)	Frecuencia de regeneración [†] (%)
Agar	5	98.5
	6	97.6
	7	93.0
	8	29.0
Fitigel	2	28.5
	3	42.4

* Para cada condición se ensayaron 21 explantes, cultivados en medio MSB5 enriquecido con 1.5 mg/L de bencilaminopurina y solidificado con diferentes concentraciones de agar y fitigel.

[†] Frecuencia de regeneración: (Número de explantes que regeneran / Total de explantes) × 100.

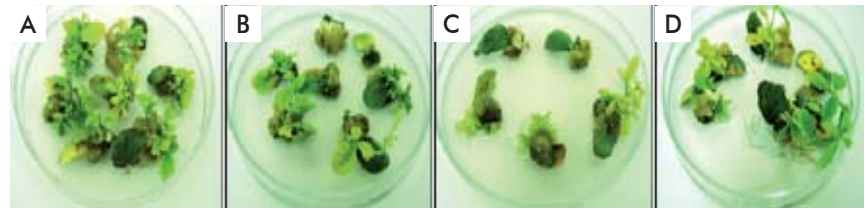


Figura 3. Formación de brotes a partir del nudo cotiledonal de semillas maduras de soja, en un medio MSB5 con 1.5 mg/L de bencilaminopurina. A-C) Formación de brotes después de 40 días en diferentes concentraciones de agar: 5, 6 y 7 g/L. D) Formación de brotes después de 40 días en un medio MSB5 con 3 g/L de fitigel.

de regeneración con este tipo de explantes es baja en algunas variedades y el periodo para lograrlo es largo [10, 21]. La regeneración de los brotes a partir del nudo cotiledonal en este estudio ocurrió en un periodo relativamente corto (de 30 a 45 días) en todas las concentraciones de bencilaminopurina probadas. Ello confirma que es el regulador de crecimiento más efectivo para la iniciación de los brotes [9, 21]. Varios protocolos emplean un medio para inducir la formación de callos y otro para la inducción de los brotes [22, 23]. En esta investigación se utilizó un solo medio para la inducción y la regeneración de los brotes, y se logró la organogénesis con brotes bien definidos (Figura 1C-E). Estos resultados demuestran que a partir de 3 mg/L de bencilaminopurina disminuye el número de brotes que regeneran (Tabla 1). Se ha demostrado que altas concentraciones de este compuesto pueden estimular la formación de yemas múltiples [24]; sin embargo, pueden inhibir su crecimiento, como se observó en este trabajo. También se ha descrito que las altas concentraciones afectan la frecuencia de diferenciación de los brotes en *Phaseolus* spp. [25].

Al comparar la frecuencia de regeneración en las tres edades evaluadas, se apreció que la respuesta regenerativa de los explantes tiende a disminuir con la edad (Figura 3). Los explantes de 6 y 7 días alcanzaron las mayores frecuencias de regeneración en el medio MSB5 con 1.5 mg/L de bencilaminopurina. Los explantes de 6 días mantuvieron una respuesta regenerativa superior a los explantes de 7 días, con todas las concentraciones probadas en este trabajo y en estudios previos con la variedad Incasoy-36 (Soto N; datos no publicados). Los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y suelen tener más plasticidad *in vitro* [26]. Se afirma que el potencial organogénico de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica [27]; por esa razón, los explantes de 8 días de germinados mostraron una regeneración inferior a la de los explantes de 6 y 7 días, independientemente de la concentración de bencilaminopurina empleada. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores en la regeneración *in vitro* de variedades de soja, en que las mayores frecuencias de regeneración se alcanzaron en concentraciones de 0.5 a 2 mg/L de bencilaminopurina [21, 24]. Sin embargo, Paz et al. obtuvieron frecuencias de regeneración inferiores a las descritas en este trabajo (de 92.6 % y 96.8 %), pero con una concentración de 1.12 mg/L, usando como explantes cotiledones de semillas maduras de las variedades: Thorne (60 %), Williams (46 %), Williams 79 (37 %) y Williams 82 (56 %) [28]. Cuando

21. Ma X-H, Wu T-L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiol Plant.* 2008; 30(2):209-16.

22. Hammatt N, Davey MR, Nelson RS. Plant regeneration from seedling cotyledons, leaves and petioles of *Glycine clandestina*. *Physiol Plant.* 1986;68(1): 125-8.

23. Sairam RV, Franklin G, Hassel R, Smith B, Meeker K, Kashikar N, et al. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2003;75(1):79-85.

24. Kim Y, Park T, Kim H, Park H, Chon S, Yun S. Factors affecting organogenesis from mature cotyledon explants and regeneration in Soybean. *J Plant Biotechnol.* 2004;6(1):39-43.

25. Malik K, Saxena P. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct formation in intact seedling by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta.* 1992;186(3):384-9.

26. Litz RE, Jarret RL. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca WM, Mroginski LA, editors. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical; 1991. p. 143-171.

27. Alleveldt G, Radler F. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes & growth of plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 1962;37(3):376-9.

28. Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 2006;25(3):206-13.

se evaluó la frecuencia de regeneración de los brotes a partir del nudo cotiledonal de esta variedad cubana de soya, hubo diferencias en los explantes utilizados, independientemente de la concentración hormonal del medio de cultivo. Algunos explantes desarrollaron abundantes brotes, mientras que otros desarrollaron callos blancos y raíces, incluso algunos se tornaron cloróticos y no mostraron morfogénesis. Esto demuestra que la respuesta regenerativa *in vitro* suele ser variable, debido probablemente a los niveles endógenos de fitohormonas durante la organogénesis [26].

La formación de yemas múltiples en varios explantes fue relevante. Estos explantes tuvieron en común que conservaron las yemas axilares después de cortar el nudo cotiledonal a la mitad, antes de ser colocados en el medio de regeneración con bencilaminopurina. Shan *et al.* [29] observaron que la formación de yemas múltiples solo ocurre cuando las yemas axilares se dejan en el nudo cotiledonal, mientras que en los nudos cotiledonales donde estas se remueven, aparece abundante callosidad y no se forman multiyemas. Por tanto, la integridad estructural del meristemo axilar contribuye a la alta eficiencia de la regeneración. Por estudios histológicos, otros investigadores mostraron que la aplicación de citoquininas exógenas altera el desarrollo de los meristemos axilares, promueve la proliferación de las células meristemáticas en las yemas axilares e incrementa el número de yemas primordiales que se originan a partir de los meristemos axilares existentes [30, 31].

En este trabajo también se obtuvo una baja regeneración cuando se aumentó la concentración de agar en el medio de cultivo. Se plantea que las altas concentraciones de agar crean un medio con mucho estrés para las plantas, lo cual reduce la formación de meris-

temoides [32]. Sin embargo, algunos investigadores han logrado resultados positivos al utilizar 8 g/L de agar para solidificar el medio de cocultivo [33].

También se estudió la inducción y el desarrollo de raíces en las plantas regeneradas *in vitro*. En presencia de ANA, las raíces inducidas fueron cortas (de 2 a 3 cm de largo) y gruesas (Figura 1I). En cambio, en presencia de AIA las raíces inducidas fueron largas (de 6 a 7 cm) y delgadas (Figura 1I derecha), similares a las desarrolladas en el medio MS libre de hormonas (Figura 1H). Se ha descrito el efecto estimulante que tienen las auxinas en el enraizamiento de los brotes. Liu *et al.* describieron que con ANA se estimuló la formación de raíces adventicias: observaron que durante la inducción de raíces adventicias en soya, los niveles de AIA endógenos aumentaron a causa de la aplicación de ANA exógena, lo cual provocó una mayor producción de raíces adventicias [34]. También se ha referido el efecto estimulante del ácido indolbutírico en el aumento del número de raíces inducidas por brotes de soya [35].

Cuando las plantas enraizadas *in vitro* se pasaron al suelo, tuvieron un desarrollo normal y todas las raíces eran viables independientemente del medio en que se desarrollaron. Este resultado permitió tener otras variantes para lograr el enraizamiento de brotes *in vitro* con diferentes estados de desarrollo fisiológico.

Finalmente se optimizó un procedimiento para regenerar plantas de la variedad cubana de soya Incasoy-36, a partir del nudo cotiledonal de semillas maduras germinadas *in vitro*, en un tiempo relativamente corto y con una elevada frecuencia de formación de los brotes. Consta de un solo paso para obtener los brotes y se puede utilizar para la transformación genética y la propagación *in vitro* de esta variedad de soya.

29. Shan Z, Raemakers K, Tzitzikas EN, Ma Z, Visser RG. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Plant Cell Rep.* 2005;24(9):507-12.

30. Wright MS, Koehler SM, Hinchee MA, Carnes MG. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* 1986;5(2):150-54.

31. Carmen S, Ballester A, Vieitez A. Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. *J Hort Sci Biotechnol.* 2001;76(5):588-95.

32. Brown DCW, Leung DWM, Thorpe TA. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol Plant.* 1979;46(1):36-41.

33. Paz MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica.* 2004;136(2):167-9.

34. Liu ZH, Hsiao IC, Pan YW. Effect of naphthalene acetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyl cutting of soybean during root formation. *Bot Bull Acad Sin.* 1996;37(4):247-53.

35. Radhakrishnan R, Ranjithakumari B. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *J Agric Technol.* 2007;3(2):287-97.

Recibido en mayo de 2012.

Aprobado en septiembre de 2012.