

## **Multiplicación y germinación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya Incasoy-1 e Incasoy-27**

I. Bermúdez-Carabaloso<sup>1\*</sup>, T. del Socorro Blanco <sup>2</sup>, J. Pérez-Pérez <sup>3</sup>, L. R. García<sup>1</sup>, N. Veitía<sup>1</sup>, R. Collado<sup>1</sup>, D. Torres<sup>1</sup>, C. Romero<sup>1</sup> \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Instituto Universitario de la Paz. Carretera a Bucaramanga km 15. Barrancabermeja, Colombia

<sup>3</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera vía Manzanillo, km 17.5. Bayamo, Granma. Cuba. CP 85 100

### **RESUMEN**

Se ha demostrado que la soya es genotipo-dependiente, lo que ha llevado a trabajar en nuevos protocolos de regeneración de plantas por métodos biotecnológicos. La presente investigación tuvo como objetivo lograr la multiplicación y germinación de embriones somáticos en las variedades cubanas Incasoy-1 e Incasoy-27. Como material vegetal se emplearon 100 mg de embriones somáticos en etapa globular, obtenidos a las cuatro semanas de cultivo en medio de cultivo semisólido. A los 30 días se realizó la caracterización morfológica de los embriones somáticos y se determinó el incremento en masa fresca (mg). En la fase de germinación se calculó el porcentaje de germinación así como se cuantificó el número de embriones somáticos germinados en 100 mg. Se logró por primera vez la multiplicación y germinación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soya. Se encontraron diferencias entre ellas en cuanto al incremento de masa fresca durante la multiplicación, Incasoy-1 e Incasoy-27 fueron superiores a Williams-82 empleada como referencia. Durante la germinación un 15% de los embriones somáticos mostraron morfología anormal en todas las variedades, estos fueron excluidos del conteo de los embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ya que ello va en detrimento de los procesos de germinación y regeneración de plantas. En cuanto al porcentaje de germinación así como el número de embriones somáticos germinados, Incasoy-1 e Incasoy-27 fueron superiores a Williams-82. Los resultados de este trabajo podrán ser aplicados en trabajos futuros de mejoramiento genético de la soya.

Palabras clave: embriogénesis somática, medios de cultivo, regeneración

### **ABSTRACT**

Soybean is genotype-dependent as it has been shown. This has led to work on new protocols for plant regeneration. This research aimed to achieve growth and germination of somatic embryos in the Cuban varieties Incasoy-1 and Incasoy-27. Somatic embryos in globular stage (100 mg) were used as initial plant material. These were obtained after four weeks of culture in semisolid culture medium. Morphological characterization of somatic embryos was performed after 30 days. Then, the increase in fresh weight (mg) was determined. The percentage of germination was calculated in the germination phase and the number of somatic embryos that germinated on 100 mg was quantified. The growth and germination of somatic embryos in the Cuban varieties of soybean was achieved for the first time. Differences among them were observed regarding increasing of fresh mass during multiplication. Incasoy-1 and Incasoy-27 were higher than Williams-82. Over 15% of somatic embryos showed abnormal morphology in all varieties during germination. These were excluded from the count of somatic embryos in advanced stages of development since this is detrimental to the germination and plant regeneration. Incasoy-1 and Incasoy-27 were superior to Williams-82 taking into account percentage of germination and number of somatic embryos germinated. Results of this work may be applied in future works about genetic breeding of soybean.

Keywords: culture medium, regeneration, somatic embryogenesis

## INTRODUCCIÓN

La soya [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los cultivos de mayor importancia para la producción de aceite y proteínas a nivel mundial (Meng *et al.*, 2007). En Cuba, representa una importante alternativa económica para la alimentación humana y animal (Marrero *et al.*, 2004).

El mejoramiento genético de la soya por métodos tradicionales ha sido muy limitado, debido a la escasa diversidad de germoplasma. La mayoría de los cultivares de soya en explotación se han derivado de muy pocas líneas parentales (Priolli *et al.*, 2002).

Las variedades cubanas Incasoy-1 e Incasoy-27, fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba, la primera a partir de una mutación natural de la variedad de origen norteamericano Williams-82 y por hibridación natural ocurrida en la variedad Brasileña BR-32, la segunda. Ambas muestran integralmente buenas cualidades para la siembra en época de primavera con rendimientos productivos por encima de 2.5 t ha<sup>-1</sup> (Ponce *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2007).

La transformación genética ofrece un significativo avance para los programas de mejoramiento genético de soya. Sin embargo, para lograr resultados satisfactorios en la transformación genética es necesario disponer de un sistema eficiente de regeneración de plantas (Strohm *et al.*, 2010).

Los primeros investigadores en lograr la regeneración de plantas de soya a través del cultivo de tejidos fueron Christianson *et al.* (1983). Luego de estos primeros resultados a través de la embriogénesis somática, se ha constatado que tanto la eficiencia en la formación y diferenciación de embriones somáticos como el porcentaje de germinación de los embriones somáticos en plantas, es dependiente de la variedad (Donaldson y Simmonds, 2000; Van *et al.*, 2008), por tal motivo la soya ha sido reconocida como recalcitrante a los cultivos *in vitro* (Hofmann *et al.*, 2004).

La capacidad embriogénica ha sido diferente entre variedades en las fases de inducción y proliferación (Hiraga *et al.*, 2007). Por tal motivo, la aplicación de la transformación genética ha

estado limitada a muy pocas variedades (Kita *et al.*, 2007), lo que ha llevado a trabajar en nuevos protocolos de regeneración de plantas.

De esta manera, el estudio de las diferentes fases de la embriogénesis somática permitirá identificar variedades apropiados para la transformación genética.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente planteados, el presente trabajo tuvo como objetivo lograr la multiplicación y germinación de embriones somáticos en las variedades cubanas Incasoy-1 e Incasoy-27.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Embriones somáticos de las variedades cubanas Incasoy-1 e Incasoy-27 y de la variedad Williams-82 que se utilizó como referencia, en consideración a que se ha probado en otros protocolos de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en soya (Bailey *et al.*, 1993; Saymolov *et al.*, 1998). Se emplearon 100 mg de embriones somáticos en etapa globular, obtenidos a las cuatro semanas de cultivo según el protocolo descrito por Bermúdez-Caraballoso *et al.* (2010).

### **Multiplicación de embriones somáticos**

El objetivo de este experimento fue lograr la multiplicación de los embriones somáticos en 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 (Wright *et al.*, 1991) compuesto por Sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3.0% de sacarosa y 20.0 mg l<sup>-1</sup> de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2.0 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® (SIGMA). El pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización.

Las condiciones de cultivo fueron cámaras de crecimiento con fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad, 26±2°C e intensidad luminosa de 5-10 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> provista por lámparas fluorescentes según lo propuesto por Lazzeri *et al.* (1987).

Se establecieron cuatro placas por variedad, cada una considerada como una réplica.

A los 30 días de cultivo, se realizó la caracterización morfológica de los embriones

somáticos obtenidos con el empleo de un microscopio estereoscópico (LEYCA WILD M8) (10 x) y las fotos se tomaron con una cámara digital (OLYMPUS DP70) acoplada al microscopio. Se determinó la masa fresca inicial y final con el empleo de una balanza analítica (SARTORIUS) y con estos datos se calculó el incremento de masa fresca (mg) de cada réplica mediante la siguiente fórmula:

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

### Germinación de los embriones somáticos

Para lograr la germinación de los embriones somáticos de las variedades Incasoy-1, Incasoy-27 y Williams-82, después de cuatro semanas en el medio de cultivo de multiplicación los embriones somáticos globulares fueron colocados en el medio de cultivo de diferenciación (Sales MS, vitaminas B5, Extracto de malta 6.0%, carbón activado 0.5% y 2.0 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® (SIGMA). Se emplearon por cada tratamiento diez frascos de cultivo y se colocaron seis grupos con diez embriones somáticos por cada uno. Transcurrido un mes, se realizó el conteo de los embriones somáticos diferenciados, bajo el microscopio estereoscópico (LEYCA WILD M8) (10 x).

Posteriormente, los embriones somáticos diferenciados fueron colocados en el medio de cultivo de maduración (Sales MS, vitaminas B5, Extracto de malta 6.0% y 2.0 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® (SIGMA). A los 30 días se transfirieron a placas de Petri de 9.0 cm de diámetro que contenían pequeños fragmentos del medio de cultivo de maduración para provocar su desecación gradual durante cinco días. Los embriones somáticos desecados fueron colocados en el

medio de cultivo de germinación B5 (Gamborg *et al.*, 1968) durante 30 días. Se cuantificó el número de embriones somáticos germinados y se calculó el porcentaje de germinación (%).

### Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se usó el programa estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 16.0 sobre Windows. La comparación de los datos relacionados con el incremento de la masa fresca de los embriones somáticos proliferados se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple. Para la variable número de embriones somáticos germinados en 100 mg de tejido, se empleó la prueba de Kruskal Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Multiplicación de embriones somáticos

En los embriones somáticos multiplicados en las variedades en estudio se observó una morfología nodular, muy compacta debido a que las nuevas estructuras embriogénicas o embriones somáticos secundarios se formaron sobre la superficie de los embriones somáticos primarios. En las variedades Incasoy-1 e Incasoy-27, estos eran de tamaño pequeño, redondeados y algunos traslúcidos, otros presentaron tonalidades entre blanca y amarilla. Mientras que en la variedad Williams-82 los embriones somáticos globulares eran de tamaño mayor y se apreciaron tonalidades entre amarilla y verde claro (Figura 1 A, 1B, 1C y 1D).

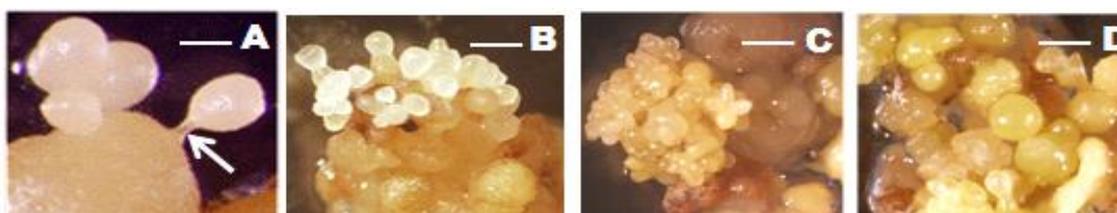


Figura 1. Multiplicación de embriones somáticos de las variedades cubanas de soya Incasoy-1 e Incasoy-27 y de Williams-82 en medio de cultivo semisólido MSD20 a los 30 días de cultivo. A. Formación compacta de embriones somáticos secundarios. La flecha indica el suspensor. B. Incasoy-27. C. Incasoy-1. D. Williams-82. Escala de la barra 1.0 mm

Al respecto, Hiraga *et al.* (2007) plantearon que la morfología de los embriones somáticos en proliferación en el cultivo de la soya, puede considerarse genotipo-específico. Estos autores al trabajar con seis variedades de origen asiático, encontraron que en algunas, los embriones somáticos eran de tamaño pequeño, muy compactos y se apreciaba un gran número de ellos en una muestra de 100 mg de masa fresca, mientras que en otras eran de mayor tamaño, menos compactos y en menor número.

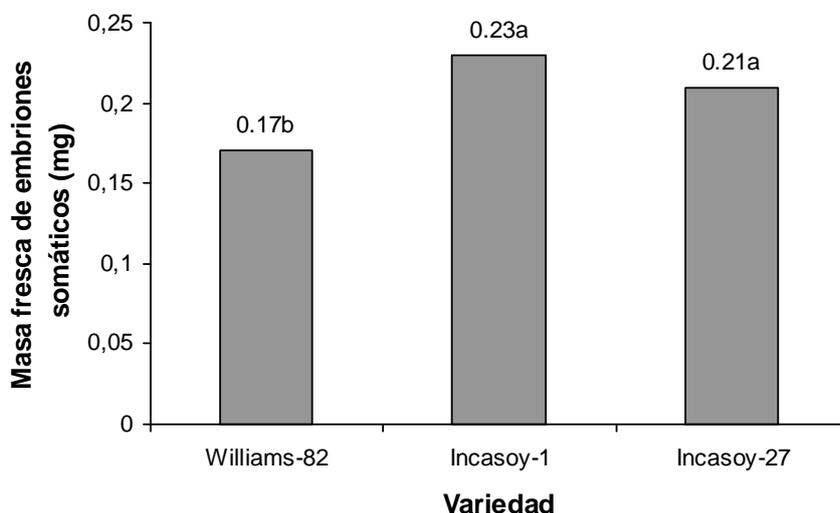
En las variedades Incasoy-1 e Incasoy-27 se logró el mayor incremento en cuanto a los valores de masa fresca a los 30 días de cultivo, sin diferencias entre ellas, pero sí con respecto a la Williams-82 (Figura 2).

Los resultados de este experimento se corresponden con lo planteado en la literatura científica, ya que la proliferación de los embriones somáticos de soya puede llevarse a cabo tanto en medio de cultivo semisólido, como en medio de cultivo líquido (Samoylov *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1991) con una alta influencia en ello del genotipo (Hiraga *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009).

### Germinación de embriones somáticos

En las tres variedades (Incasoy-1, Incasoy-27 y William-82) un 15% de los embriones somáticos mostró morfología anormal como por ejemplo: cotiledón en forma de trompeta, hipocótilo largo y un vestigio de cotiledón, así como cotiledones fusionados (Figura 3A, 3B 3C). Los que presentaron estas características fueron excluidos del conteo de los embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ya que ha sido referido, que ello va en detrimento de los procesos de germinación y regeneración de plantas (Lazzeri *et al.*, 1987; Hiraga *et al.*, 2007). El 85% de los embriones somáticos mostraron morfología normal y sí fueron contados como embriones somáticos diferenciados (Figura 3D, 3E 3F).

Al respecto, Yang *et al.* (2009) encontraron que el uso del medio de cultivo de multiplicación MSD20 permitió obtener embriones somáticos bien desarrollados en etapa cotiledonal durante el proceso de histodiferenciación en tres variedades chinas (N25281, N25263, N06499).



Barras con letras distintas indican diferencias significativas entre las medias en cada variedad según prueba *t*-student, para  $p < 0.05$

Figura 2. Incremento de la masa fresca de los embriones somáticos de las variedades cubanas de soya Incasoy-1 e Incasoy-27 en el medio de cultivo MSD-20 a los 30 días de cultivo



Figura 3. Morfología de embriones somáticos de soja a los 30 días de cultivo en fase de diferenciación (embriones somáticos con morfología anormal: 3A trompeta, 3B hipocótilo largo, 3C un vestigio de cotiledón; embriones somáticos con morfología normal: 3D, 3E, 3F). Escala de la barra 1.0 m

El genotipo influyó en la germinación de los embriones somáticos. En las variedades Incasoy-1 e Incasoy-27 se obtuvieron mayores valores en cuanto a la frecuencia de germinación así como el número de embriones somáticos germinados, con diferencias significativas con respecto a Williams-82 (Tabla 1).

Similares resultados en cuanto al efecto del genotipo en la germinación de los embriones somáticos de soja han sido referidos por Samoylov *et al.* (1998). Estos autores lograron diferentes porcentajes de germinación de los embriones somáticos en tres variedades norteamericanas evaluadas, de  $70.7 \pm 2.4\%$  en Jack, de  $60.0 \pm 8.0\%$  en Chapman, de  $56.7 \pm 1.84\%$  para F-138. Así mismo, Kita *et al.* (2007) obtuvieron valores desde cero hasta 1.9 embriones somáticos germinados/explante al evaluar la respuesta embriogénica de la

variedad norteamericana Jack y tres líneas mejoradas de ella. Por su parte, Yang *et al.* (2009) al trabajar con tres variedades asiáticas informaron altos porcentajes de germinación desde 35.1% hasta 84.6%.

### CONCLUSIONES

Con los resultados del presente estudio, se logró por primera vez la multiplicación y germinación de embriones somáticos en las variedades cubanas de soja Incasoy-1 e Incasoy-27, las que lograron mayor incremento de masa fresca durante la multiplicación con mayores porcentajes de germinación, resultados que fueron superiores a la variedad de origen norteamericano Williams-82. Estos resultados proporcionan información básica para investigaciones posteriores relacionadas con el mejoramiento genético en este cultivo.

Tabla 1. Germinación de embriones somáticos en las variedades Incasoy-1, Incasoy-27 y Williams-82 a los 30 días de cultivo. Inóculo inicial: embriones somáticos en etapa globular.

Variedad	Germinación de ES (%)	Número de embriones somáticos germinados en 100 mg de inóculo inicial	
		Medias	Rangos medios
Williams-82	70.5	0.95	$157.2 \pm 0.073$ b
Incasoy-1	73.9	1.35	$207.8 \pm 0.091$ a
Incasoy-27	74.3	1.46	$223.1 \pm 0.093$ a

Los datos son los rangos medios  $\pm$  Error estándar. Valores con letras diferentes difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) según la prueba de Kruskal Wallis

## REFERENCIAS

- 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
- Bermúdez-Carabaloso I, Del Socorro-Blanco T, Pérez-Pérez J, García LR, Veitía N, Collado R, Torres D, Romero C, Roque B (2010) Efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos en dos genotipos cubanos de soya. *Biotecnología Vegetal* 10(2): 121-128
- Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222:632-634
- Donaldson PA, Simmonds DH (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short season soybean genotypes. *Plant Cell Report* 19:485-490
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Plant Cell cultures* 50:151–158
- Hofmann N, Nelson RL, Korban SS (2004) Influence of medium components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77:157-163
- 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
- Kita Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayama M, Ishimoto M (2007) Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Report* 26:439-447
- Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB (1987) Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 10:197–208
- Marrero, L, de los Ángeles M, Díaz J (2004) Nocividad de crisomélidos sobre plantas de soya en condiciones de laboratorio e invernadero. *Protección Vegetal* 19 (2): 112-117
- Meng Q, Zhang C, Gai J, Yu D (2007) Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *J. Plant Physiol* 164:1002-1012
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473–497
- 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
- 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
- Priolli RHG, Mendes-Junio CT, Arantes NE, Contel EP (2002) Characterization of Brazilian soybean cultivar using microsatellite marker. *Genetic Mol. Biol.* 25:185-193
- 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
- Strohm BW, Droste A, Pasquali G, Borges MO, Bucker-Neto L, Pereira LM, Bencke M, Schenkel MH, Margis-Pinheiro M, Bodanese-Zanettini MH (2010) Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. *Euphytica* 177 (3): 343-354
- Van, K, Jang HJ, Jang YE, Lee SH (2008) Regeneration of plants from EMS-treated immature embryo cultures in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Journal Crop Science Biotechnology* 11 (2): 119-126
- Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesing 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
- Yang Ch, Zhao T, Yu D, Gai J (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] impacts of manitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* (45):180–188