

Formación de embriones somáticos en *Glycine max* variedad Incasoy-27

J.L. Pérez-Pérez^{*1,2}, L.R. García², N. Veitía², I. Bermúdez-Carballoso², R. Collado^{2*} Autor para correspondencia.

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera vía Manzanillo, km17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba. CP 85 100. e-mail: jperez@udg.co.cu

²Instituto 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

RESUMEN

El cultivo de la soya representa una de las principales fuentes de aceite vegetal y concentrado proteico a nivel mundial. Las técnicas de cultivo de tejidos constituyen una herramienta para el mejoramiento genético en soya, sin embargo, las metodologías establecidas presentan baja eficiencia, son específicas para determinados genotipos y no existen para variedades cubanas. Por esta razón, se requiere establecer una metodología de regeneración de plantas vía embriogénesis somática que sirva de base para programas de transformación genética. El objetivo de este trabajo fue obtener embriones somáticos en la variedad Incasoy-27 a partir de cotiledones inmaduros. Para ello, se determinó el efecto de la longitud de los cotiledones inmaduros y se describió la morfología de los embriones somáticos. Los embriones somáticos se obtuvieron en medio de cultivo MSD40 compuesto por las sales de Murashige y Skoog, 40mg.l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoacético, vitaminas B5, 3.0% sacarosa, pH 7.0 y Gelrite 0.3% a partir de cotiledones inmaduros de 2.0 a 4.0 mm de longitud en condiciones de luz artificial. Fue posible formar embriones por embriogénesis somática directa y de alta frecuencia en soya variedad Incasoy-27 en todos los tratamientos. El 77% de los cotiledones de tres y cuatro milímetros formaron embriones somáticos.

Palabras clave: cultivo de tejido, embriogénesis somática, soya

ABSTRACT

The soybean crop is a major source of vegetable oil and protein concentrate worldwide. The tissue culture techniques are a tool for genetic improvement in soybean, however, established methodologies have low efficiency and are specific to certain genotypes but not for Cuban varieties. Then, it is necessary to establish a methodology for plant regeneration via somatic embryogenesis as a basis for genetic transformation programs. The aim of this study was to obtain embryos in variety Incasoy-27 from immature cotyledons. The effect of immature cotyledon size was determined and morphology of somatic embryos was evaluated. The embryos were obtained in MSD40 culture medium containing Murashige and Skoog salts, 40mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, vitamin B5, 3.0% sucrose, pH 7.0, and Gelrite 0.3%, from immature cotyledons of 2.0 to 4.0 mm long, in artificial light conditions. Embryos formation in soybean variety Incasoy-27 was achieved by direct somatic embryogenesis and with a high frequency in all treatments. The 77% of cotyledons of three to four millimetres formed somatic embryos.

Key words: Somatic embryogenesis, Soybean, Tissue culture

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max*), constituye uno de los 10 cultivos de mayor importancia económica en el mundo, debido a su alto contenido en proteínas (40%), aceite vegetal (20%), carbohidratos, vitaminas y metabolitos secundarios (Sakthivelu *et al.*, 2008).

En Cuba, la soya ha cobrado auge, siendo cada vez más extensas las superficies dedicadas a

su cultivo (Ortiz *et al.*, 2004). Además de sus múltiples usos, representa una importante alternativa económica para la alimentación humana y animal (Marrero *et al.*, 2004).

La variedad Incasoy-27, fue obtenida en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana, Cuba, a partir de hibridación natural ocurrida en la variedad Brasileña BR-32 y muestra integralmente buenas cualidades para la siembra en época de primavera con

rendimientos productivos de 3.0 t.ha⁻¹ y 37.3% de proteína bruta (Ponce *et al.*, 2003).

Es un cultivo autopolinizable con 0.04 a 1.0% de fecundación cruzada, lo cual limita la variación genética entre variedades. Por ello, las técnicas biotecnológicas constituyen una herramienta importante en programas de mejora genética (Radhakrishnan y Ranjithakumari, 2007).

El primer paso para el mejoramiento genético de los cultivos mediante técnicas biotecnológicas, es contar con un eficiente sistema de regeneración de plantas a partir del cultivo de células y tejidos (Haliloglu, 2006). En soya, las vías de regeneración empleadas son básicamente la embriogénesis somática a partir de semillas inmaduras y la organogénesis a partir de nudos cotiledonales, mediante complejas y prolongadas metodologías (Xiao-Hong y Tian-Long, 2008).

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática en soya fue informada por primera vez por Christianson *et al.* (1983). Desde entonces, muchos progresos se han logrado, lo cual indica que la etapa más importante en el proceso de regeneración es la formación del embrión somático (Santarém *et al.*, 1997; Meurer *et al.*, 2001; Walker y Parrott, 2001). Además, tanto la eficiencia de formación como la frecuencia de conversión de los embriones somáticos en plantas, es dependiente de la variedad (Donaldson y Simmonds, 2000; Van *et al.*, 2008).

Aunque a nivel internacional se han regenerado plantas de soya vía embriogénesis somática, no se han establecidos metodologías de regeneración para variedades cubanas, que se requieren como base para el desarrollo de protocolos de transformación genética.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue formar embriones somáticos de soya en la variedad cubana Incasoy-27 a partir de cotiledones inmaduros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se tomaron semillas maduras de la variedad Incasoy-27, y se sembraron en bolsas de

polietileno (26x36cm) que contenían como sustrato materia orgánica y zeolita (3:1).

A los 20 días posterior a la antesis de la flor, se cosecharon las vainas que contenían semillas inmaduras entre 3.0 a 5.0mm de longitud, las cuales fueron usadas como fuente de explante acorde con lo referido por Santarém y Finer (1999).

Desinfección

Para la desinfección de las vainas, primero se lavaron con agua corriente y detergente comercial. Luego fueron sumergidas en etanol al 70% (v/v) durante 20 segundos y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, en la cabina de flujo laminar se realizó una inmersión en hipoclorito de sodio (2.0%) (v/v) durante diez minutos y cuatro enjuagues con agua destilada estéril.

La testa de la semilla se retiró y se separaron los dos cotiledones que se clasificaron según su longitud. Acorde con lo descrito por Tomlin *et al.* (2002) se cortó la porción final para eliminar el eje embrionario en su totalidad antes de transferirlos al medio de cultivo.

Formación de embriones somáticos

Para la formación de embriones somáticos, se emplearon frascos de vidrio de 250ml de capacidad que contenían 30ml de medio de cultivo de inducción MSD40 (Finer y Nagasawa, 1988) constituido por: Sales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa (3.0%), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 40mg.l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.3% de Gelrite® (Sigma) y se ajustó el pH (7.0) antes de esterilizar por autoclave a 121°C y 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 20 minutos.

Los cotiledones fueron colocados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo. Los frascos fueron sellados con Parafilm® e incubados en cámara de luz artificial a 22±2°C, fotoperíodo de 16 horas luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz fría de 40 W, con un flujo fotosintético de fotones (FFF) (62 µE.m⁻².s⁻¹), durante 28 días de cultivo.

Los cotiledones fueron clasificados teniendo en cuenta su longitud en tres tratamientos (T1= 2mm;

T2= 3mm; T3= 4mm). Se consideró cada cotiledón inmaduro como explante y se colocaron cuatro por frasco (réplica experimental) y diez frascos por tratamiento.

Se determinó el efecto de la longitud de los cotiledones inmaduros sobre la formación de embriones somáticos. Las evaluaciones se realizaron a los 14 y 21 días de cultivo, con empleo de un microscopio estereoscopio (OLYMPUS) para determinar: número de explantes que formaron al menos un embrión somático, número de embriones somáticos formados por explante embriogénico. De manera visual se describieron las características morfológicas de los embriones somáticos.

Análisis experimental

Se estableció un diseño completamente al azar por considerarse homogéneas las condiciones de cultivo dentro de la cámara de crecimiento y como única fuente de variación los tratamientos.

Los datos fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza clasificación simple (ANOVA). Para comprobar la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para la homogeneidad de varianza la prueba de Levene.

Los datos del número de embriones somáticos por frasco y explantes embriogénicos a los 14

días de cultivo que no cumplían los supuestos, fueron procesados mediante un análisis de varianza y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

En el resto de los casos el grado de significación se determinó mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p < 0.05$) empleando el programa computacional SPSS/PC versión 16.0 para Window.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la formación de embriones somáticos en la variedad Incasoy-27. A partir de los 14 y 21 días de cultivo se observaron zonas de coloración pardo oscura sobre la superficie abaxial y borde de los cotiledones con embriogénesis somática directa, de color amarillo e independiente del tejido materno (Figura 1).

Figura 1. Embriogénesis somática directa en *Glycine max* variedad Incasoy-27 a partir de cotiledones inmaduros en medio de cultivo con 40mg.l^{-1} de 2,4-D a los 21 días de cultivo.

Se comprobó que la longitud de los cotiledones influyó sobre la formación de los embriones. Con explantes de 3 a 4 mm a los 14 días se incrementó significativamente en más de un 20% la formación de embriones con respecto a los de 2mm y a los 21 en más de un 35% (Tabla 1).



Figura 1. Embriogénesis somática directa en *Glycine max* variedad Incasoy-27 a partir de cotiledones inmaduros en medio de cultivo con 40mg.l^{-1} de 2,4-D a los 21 días de cultivo.

Tabla 1. Efecto de la longitud de los cotiledones inmaduros en la formación de embriones somáticos en *Glycine max* variedad Incasoy-27.

Longitud del explante (mm)	No. explantes con embriones somáticos (%)	
	14 días	21 días
2.0	4.17 b	35.71 b
3.0	27.27 a	77.27 a
4.0	24.07 a	77.78 a

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los datos refieren los valores medios por frasco de cultivo en cada tratamiento

Los cotiledones de embriones cigóticos inmaduros han sido empleados anteriormente para obtener embriones somáticos en soya (Parrott *et al.*, 1988).

Resultados publicados por Santarém *et al.* (1997) sobre el trabajo con la variedad Jack, una de las más estables para la embriogénesis somática y de alta eficiencia embriogénica a partir de cotiledones inmaduros, obtuvieron la mayor respuesta en la formación de embriones somáticos después de 21 días de cultivo. Estos autores observaron los primeros embriones somáticos en los bordes de los cotiledones después de 14 días y a los 21 días cubrían toda la superficie del explante.

Se conoce que la longitud de los cotiledones es un factor importante en la inducción de embriones somáticos de soya. Hopher *et al.* (1988) al estudiar los procesos iniciales durante el desarrollo de meristemos embriogénicos en cotiledones inmaduros de soya, observaron que la presencia de 2,4-D en el medio de cultivo condujo a la formación de un tejido embriogénico superficial asociado con la epidermis abaxial en cotiledones de tres milímetros.

Sin embargo, el genotipo tiene también una gran influencia. Hiraga *et al.* (2007) observaron diferencias en la respuesta embriogénica de diferentes variedades cuando emplearon cotiledones entre cuatro y cinco milímetros. En tres variedades japonesas (Nasushirome, Hayahikari y Kitami Nagaha) se alcanzaron frecuencias de inducción de embriones somáticos en más del 50% de los cotiledones, mientras que en las variedades Yuuzuru, Shimabara y Wase Midori, fue entre 40 y 50% y en otras nueve variedades fue menor de 30%. Sin embargo, bajo las mismas condiciones el 78% de los cotiledones de la variedad Jack formaron embriones somáticos.

Por su parte, Klink *et al.* (2008) en la variedad Williams, obtuvieron la mejor respuesta de

explantes embriogénicos en cotiledones de tres milímetros de longitud con un 35% a los 14 días y un 90% a los 30 días de cultivo; mientras que en la variedad MiniMax, a los 14 días de cultivo no encontraron diferencias en la formación de embriones somáticos entre explantes de dos y tres milímetros. Igual respuesta constataron a los 30 días de cultivo donde observaron de 45 a 50% de explantes embriogénicos.

La diferencia en la respuesta de los explantes durante la formación de embriones somáticos puede estar determinada según Hiraga *et al.* (2007) por la interacción entre el nivel de auxina exógena y endógena del tejido, las condiciones de cultivo, estado de desarrollo del explante y el genotipo en particular, respondiendo cada explante de manera distinta.

Igualmente, a los 14 días de cultivo cuando se cuantificó el número de embriones por explante no se encontraron diferencias significativas entre los explantes de 3 y 4mm y sí con los de 2 mm. Sin embargo, a los 21 días de cultivo no se constataron diferencias entre los tratamientos (Tabla 2).

La capacidad de multiplicación de los tejidos embriogénicos no está necesariamente correlacionada con la frecuencia de formación de embriones somáticos (Simmonds y Donaldson, 2000).

Las condiciones fisiológicas y el estado de desarrollo del explante juegan un rol importante en la embriogénesis somática (Tae-Seok y Korban, 2004). Según, Tae-Seok *et al.* (2004), diferencias observadas en la respuesta embriogénica o no embriogénica, puede estar influenciado por las condiciones de crecimiento de la planta donadora y/o condiciones de cultivo *in vitro*, como variaciones en la temperatura dentro de las cámaras de crecimiento, humedad y proximidad a la fuente de luz, pudiendo en su conjunto contribuir a variaciones en la respuesta embriogénicas.

Tabla 2. Efecto de la longitud de los cotiledones inmaduros sobre el número de embriones somáticos por frasco de cultivo y explantes embriogénicos en *Glycine max*.

Longitud del explante (mm)	No. embriones somáticos / explante (14 días)		No. embriones somáticos / explante (21 días)
	Media real	Rangos medios	
2.0	0.25	7.50 b	5.14
3.0	3.00	18.14 a	8.75
4.0	2.56	16.38 ab	7.53

Rangos medios con letras diferentes en la columna del No. embriones somáticos por explante a los 14 días de cultivo difieren significativamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Según, Yang *et al.* (2009) el contenido endógeno de ácido abscísico (ABA) se incrementa con el tamaño del explante, y sus niveles varían entre variedades. Estos autores observaron que explantes de 4–5mm tenían la mayor frecuencia de embriogénesis somática, debido a un contenido endógeno de ABA en un nivel fisiológicamente óptimo para la embriogénesis somática.

Es conocido que la orientación del explante influye en el número de embriones somáticos que se forman, lo cual ha sido descrito en soya. Según, Santarém *et al.* (1997) en estudios previos usando diferentes condiciones de cultivo, el número promedio de embriones somáticos por explante fue inferior a once.

Este mismo autor refiere que obtuvo como promedio 44.20 embriones somáticos por explante en la variedad Jack cuando estos fueron colocados con el lado adaxial en contacto con el medio de cultivo y solo cinco embriones cuando fueron colocados con el lado abaxial. Sin embargo, Hiraga *et al.* (2007) obtuvieron menos de seis embriones por cotiledón en la variedad Jack, cuando estos fueron colocados con el lado adaxial en contacto con el medio de cultivo.

En varios trabajos se ha inducido la formación de embriones somáticos en soya con 40mg.l⁻¹ de 2,4-D. Sin embargo, Hiraga *et al.* (2007) observaron en la variedad Fayette una reducción en la formación de embriones somáticos cuando emplearon 2,4-D (60-80mg.l⁻¹), mientras en la variedad Japonesa Susuyutaka se alcanzó la máxima eficiencia, demostrando diferencias en la adaptabilidad al cultivo de tejido entre variedades asiáticas y americanas, influenciado por la sensibilidad del tejido y los niveles endógenos del regulador de crecimiento que activan

elementos importantes de la ruta embriogénica.

La presencia de altas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo es una de las causas de diversas anomalías en la morfología de los embriones somáticos en soya, lo cual ha sido descrito por diversos autores (Buchheim *et al.*, 1989).

Las masas embriogénicas a los 30 días de cultivo, se caracterizaron por ser compactas, producir embriones somáticos normales, así como, embriones somáticos anormales que mostraban morfologías en forma de copa, trompeta y policotiledonal (Figura 2) en diferentes etapas de desarrollo.

Estos resultados concuerdan con los publicado por Fernando *et al.* (2002) quienes encontraron embriones somáticos en soya con forma de trompeta con un meristema radical normal y ausencia del brote apical.

Con posterioridad Santos *et al.* (2006), observaron en las rutas ontogénicas de los embriones somáticos en etapa torpedo tenían forma de trompeta, en el cual el procambium estaba bien definido pero nunca fueron detectados los brotes meristemáticos apical y radical. También, Hiraga *et al.* (2007), observaron embriones somáticos en soya con forma de copa, estructuras de cotiledones fusionados, vestigios de hipocótilos alargados, entre otras deformaciones.

Por su parte Klink *et al.* (2008), refieren que en la variedad MiniMax a los 14 días en medio de cultivo de inducción, se apreciaba la formación de embriones somáticos con morfologías en forma de copa, lo cual no era evidente en la variedad Williams, debido a altas concentraciones de 2,4-D exógeno.

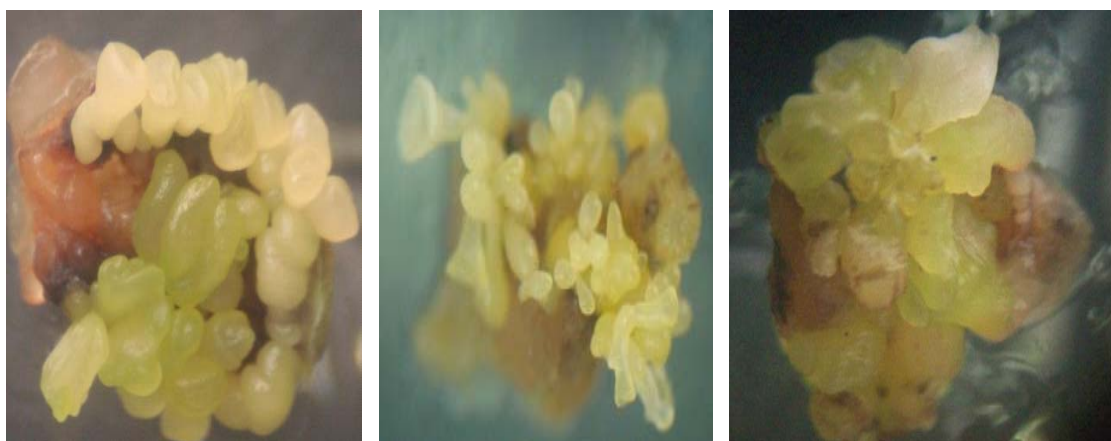


Figura 2. Embriones somáticos con morfologías anormales en *Glycine max* variedad Incasoy-27 a los 28 días de cultivo. (a) Forma de copa, (b) Forma de trompeta y (c) Forma policotiledonal.

En la literatura científica se plantea que tales morfologías causan detrimentos en los procesos de germinación durante la regeneración de plantas. No obstante, en trabajo publicado por Droste *et al.* (2001) estos autores obtuvieron mediante suspensiones celulares altos porcentajes de embriones somáticos anormales en la variedad Bragg, de los cuales el 79.10% fueron capaces de germinar y convertir plantas normales.

Igualmente, Hiraga *et al.* (2007) al diferenciar embriones somáticos en etapa cotiledonal, observaron que 15-40%, mostraban morfologías anormales disminuyendo la eficiencia de conversión en plantas.

CONCLUSIONES

Fue posible formar embriones somáticos por embriogénesis somática directa en soya variedad Incasoy-27 a partir de cotiledones inmaduros. Se logró que el 77% de los cotiledones formara embriones a los 21 días de cultivo en explantes de tres y cuatro milímetros.

REFERENCIAS

Buchheim, JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiology* 89: 768-775

Christianson, ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222: 632-634

Donaldson, PA, Simmonds DH (2000) Susceptibility of *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node

transformation in short-season soybean. *Plant Cell Reports* 19: 478-484

Droste, Annette, Pimentel PC, Pasquali G, Mundstock EC, Bodanese-Zanettini MH (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Scientia Agricola* 58 (4): 753-758

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

Gamborg, OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158

Haliloglu, K (2006) Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. *Biologia Plantarum* 50 (3): 326-330

Hepher, A, Boulter ME, Harris N, Nelson RS (1988) Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max*, L.). *Annals Botany* 62: 513-519

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

Klink, VP, MacDonald M, Martins V, Soo-Chul P, Kyung-Hwan K, So-Hyeon B, Benjamin M (2008) MiniMax, a new diminutive *Glycine max* genotype with a rapid life cycle, embryogenic potential and transformation capabilities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92 (2): 183-195

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

Meurer, CA, Dinkins RF, Redmond CT, McAllister KP, Tucker DT, Walker DR, Parrott WA, Trick HN, Essig J, Frantz HM, Finer JJ, Collins GB (2001) Embryogenic response to multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 62–67

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-498

Ortiz, R, de la Fé C, Ponce M (2004) Evaluación de métodos de almacenaje de semilla de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) en condiciones de bajos insumos. *Cultivos Tropicales* 25 (3): 49-58

Parrott, WA, Dryden G, Vogt S (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 24: 817–820

Ponce, M, de la Fé C, Ortiz R, Moya C (2003) Incasoy-24 e Incasoy-27: Nuevas variedades de soya para las condiciones climáticas de Cuba. *Cultivos Tropicales* 24 (3): 49

Radhakrishnan, R, Ranjithakumari BD (2007) Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *Journal of Agricultural Technology* 3 (2): 287-297

Sakthivelu, G, Akitha MK, Giridhar P, Rajasekaran T, Ravishankar GA, Nikolova MT, Angelov GB, Todorova, RM, Kustorkova G (2008) Isoflavone composition, phenol content and antioxidant activity of Soybean seeds from India and Bulgaria. *Journal Agricultural and Food Chemical* 56: 2090-2095

Santarém, ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 33: 13-19

Santarém, ER, Finer JJ (1999) Transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on semisolid medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35: 451-455

Santos, KGB, Mariath JE, Moço MCC, Bodanese-Zanettini MH (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): ontogeny of somatic embryos. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 49-55

Simmonds, DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. *Plant Cell Rep* 19:485–490

Tae-Seok, KO, Korban SS (2004) Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L) Merrill]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40: 552–558

Tae-Seok, KO, Nelson RL, Korban SS (2004) Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. *Crop Science Society of America* 44: 1825-1831

Tomlin, ES, Branch SR, Chamberlain D, Gabe H, Wright MS, Stewart CN (2002) Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38: 543-548

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

Walker, DR, Parrott WA (2001) Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 55–62

Xiao-Hong, M, Tian-Long W (2008) Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 209-216

Yang, C, Zhao T, Yu D, Gai J (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) - impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45:180–188