

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

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 soja 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 soja 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 soja 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 soja 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.

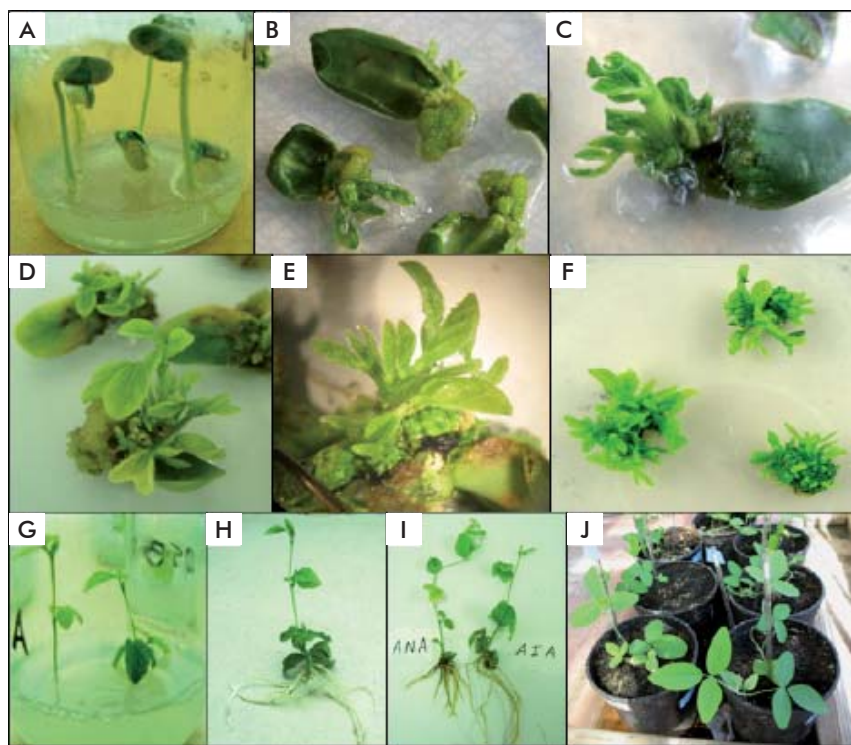


Figura 1. Sistema de regeneración a partir del nudo cotiledonal de semillas maduras de soja (*Glycine max*) de la variedad Incasoy-36. A) Germinados de soja después de 6 a 8 días en un medio MSB5 sin hormonas. B) Explantes con callos y brotes después de 25 días en MSB5 con 2 mg/L de bencilaminopurina. 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 soja. F) Yemas múltiples regeneradas en un medio MSB5 con 3 mg/L de bencilaminopurina. G) Brotes de soja 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

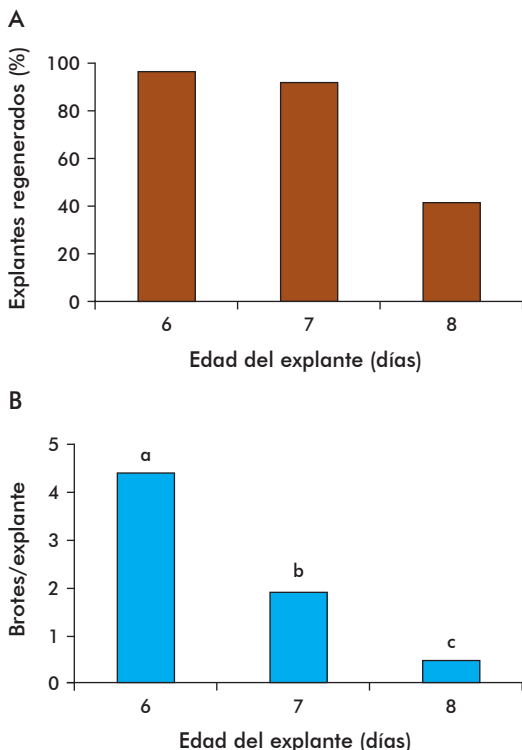


Figura 2. Efecto de la edad del explante (6, 7 y 8 días) sobre la eficiencia de regeneración de los brotes de soja variedad Incasoy-36. A) Por ciento de explantes regenerados a partir del nudo cotiledonal de germinados de diferentes edades. B) Eficiencia de la regeneración en las tres edades evaluadas, 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 soja 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 fitigel (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, Olhoft 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 stearidic 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 fitagel, 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 soya [15]. Sin embargo, la frecuencia

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

Agente solidificante	Concentración (g/L)	Frecuencia de regeneración† (%)
Agar	5	98.5
	6	97.6
	7	93.0
	8	29.0
Fitagel	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 fitagel.

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

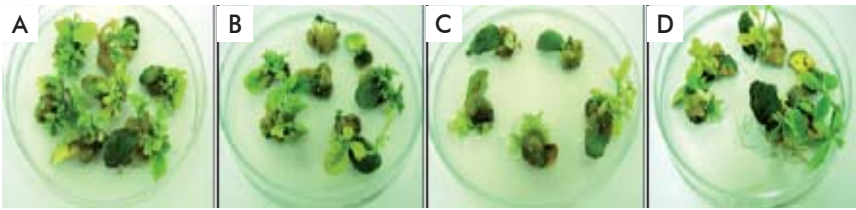


Figura 3. Formación de brotes a partir del nudo cotiledonal de semillas maduras de soya, en un medio MSB5 con 1.5 mg/L de bencilaminopurina. A-C) Formación de brotes después de 40 días en diferentes concentraciones de agar: 5, 6 y 7 g/L. D) Formación de brotes después de 40 días en un medio MSB5 con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

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 soya, 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 meristemas 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 meristemas 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, Hinchey 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.

In vitro regeneration of soybean plants of the Cuban Incasoy-36 variety

✉ 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

RESEARCH

ABSTRACT

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

Biotecnología Aplicada 2013;30:34-38

RESUMEN

Regeneración *in vitro* de plantas de soya de la variedad cubana Incasoy-36. 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 cotilodonal 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 of 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 cotilodonal

Introduction

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is one of the most widely marketed crops and a large part of the productive land in the world is used for its cultivation. Containing high level of proteins and lipids, it is of utmost importance in human and animal feeding. Geneticists, therefore, search for methods to optimize its characteristics. Since the application of biotechnology in genetic improvement of prioritized crops, such as soybean, is based on an efficient regeneration protocol, researchers have tried to optimize the conditions to increase the regeneration of its explants. Almost all parts of the plant have been used as explants for its regeneration, either by organogenesis [1] or somatic embryogenesis [2]. These explants may be cotyledonary nodes [3, 4], stem internodes [5], epicotyl sections [6], and tissues from primary leaves [7], plumules [8], hypocotyls [9], embryogenic axes [10], immature cotyledons [11, 12], immature and mature embryos [1] and roots [13]. Through organogenesis shoots are observed after 2 to 3 months and they have the characteristics of the

corresponding genotype. This contrasts with somatic embryogenesis that requires about 5 months to obtain plants, while showing a large somaclonal variation in the regenerated plants [2]. In certain organogenesis systems the explants would need two culture media, one for the introduction of the shoots and the other for their elongation. They also require more time for cultivation and more media to obtain the plants. Both the regeneration of this legume and its genetic transformation are highly dependent on the genotype of the plant. Therefore, most of the regeneration and transformation protocols established for some varieties may not be reproducible in others. The cotyledonary node is one of the most frequently used explants for genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* [14]; and although it was used since the beginning to obtain transgenic plants [15], certain genotypes still show difficult regeneration of shoots [16-18].

Soybean production is of great importance in Cuba. Some varieties are well adapted to soil condi-

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.

tions and some have high yields. Here we describe an optimized protocol for organogenesis in the Cuban variety of soybean Incasoy-36 that uses the cotyledonary node of mature seeds as the explant. This procedure may be useful for *in vitro* multiplication, for its genetic transformation, and for the introduction of new agronomic traits.

Materials and methods

Plant material

Mature soybean seeds of the Cuban variety Incasoy-36, of the National Institute of Agriculture Sciences (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Havana, Cuba) were used. They were disinfected with 70 % ethanol for 1 minute and then immersed in 12 % commercial sodium hypochlorite for 10 min while shaking frequently. Afterwards, they were rinsed 4 times with sterile distilled water and placed to germinate in a basal medium MSB5 (MS salts [19] and vitamin B5 [20]) enriched with sucrose (30 g/L) and solidified with phytoagar (7 g/L) (Duchefa Biochemie B.V., Holland) after adjusting the pH to 5.7. The seeds were maintained 6 to 8 days at 27 °C with a periodicity of 16 h of light and 8 h of darkness.

Preparation of the explants for the induction of shoots

The germinated seeds of 6 to 8 days were used as explants for the induction of the shoots. Each one was cut horizontally 5 to 7 mm at the hypocotyls region to eliminate the radicle. Then the cotyledons were separated through a longitudinal cut, the apical bud was eliminated and they were placed in the MSB5 medium enriched with benzylaminopurine (0.5, 1, 1.5, 2, 3 and 6 mg/L) and sucrose (30 g/L).

The pH of the medium was adjusted to 5.7 before adding the phytoagar (7 g/L). Other concentrations for the phytoagar (5, 6, 7 and 8 g/L) and phytigel (2 and 3 g/L) were tested in the medium for the induction of shoots. All explants were incubated at 27 °C, with 16 h of light.

Twenty-one explants (7 explants/plate) were used for each treatment, and the experiments were repeated 3 times. Two parameters were evaluated, namely, the age of the explants and the concentration of the benzylaminopurine in the medium, for shoot induction. The influence of age of the explants in the regeneration of the cotyledonary node was analyzed by comparing the regeneration frequency of the explants of each age (6, 7 and 8 days) and the number of shoots per explant in the different concentrations of the benzylaminopurine.

Rooting of shoots and adaptation of plants to the soil

The regenerated shoots after 35 to 40 days (3 to 4 cm) were placed to root in the MSB5 without hormones for 7 to 15 days. The rooted plants were transferred to small plastic pots containing a mixture of organic material and zeolite (1:1 v/v), under controlled conditions of light, humidity and room temperature for 7 days. They were then transplanted to large pots and kept in a greenhouse until they flowered and produced seeds.

Statistical analysis

The cultures were periodically observed and the effect of age of the explant and concentration of benzylaminopurine in the regeneration of shoots were evaluated. The data were analyzed using a simple analysis of variance (Anova). Means were compared according to the least significant differences of Fisher (LSD) for $p < 0.05$. For the statistical analysis we used the Statgraphics Plus program, version 5.0.

Results

Effect of age of the explant and the concentration of benzylaminopurine on the regeneration of shoots from the cotyledonary node

The cotyledons of mature soybean seeds germinated *in vitro* and selected as explants for the regeneration trials reached a green color after 6 to 8 days in the MSB5 germination medium without hormones (Figure 1). On comparing the effect of age of the explant on the regeneration of the shoots in the MSB5 medium enriched with 1.5 mg/L of benzylaminopurine, it was observed that the 6 day explants had a higher regeneration frequency of the shoots (96.8 %), although it did not differ from the frequency found in 7 day explants (92.6 %). However, the regeneration of the shoots of both ages (6 and 7 days) considerably surpassed that obtained in 8 day explants (41.2 %)

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, Hinchey 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):1042-49.

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

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.

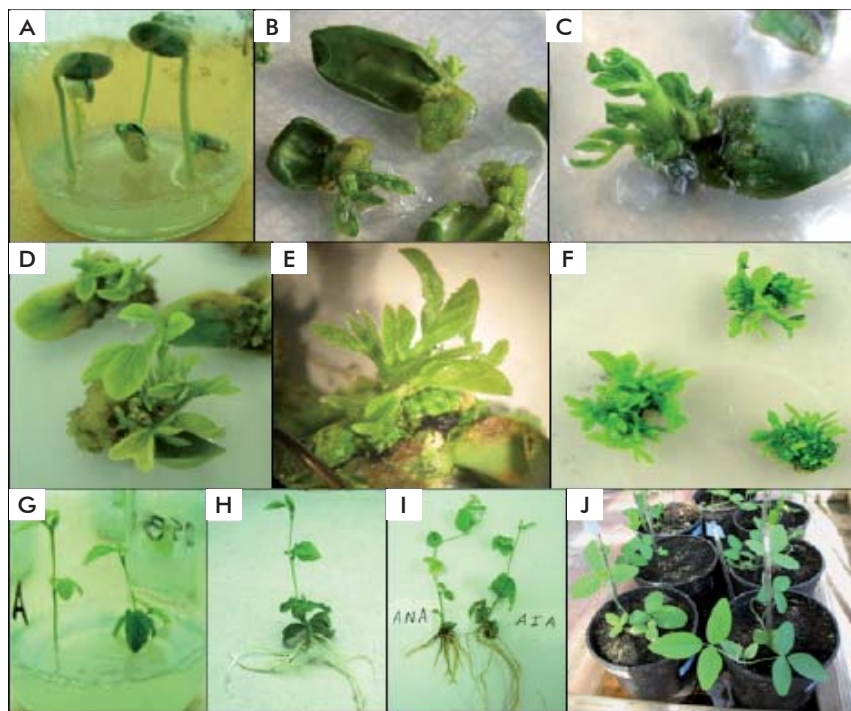


Figure 1. Regeneration system using the cotyledonary node of mature soybean seeds (*Glycine max*) of the variety Incasoy-36 A) Germinated soybean seeds after 6 to 8 days in an MSB5 medium without hormones. B) Explants with calluses and shoots after 25 days in MSB5 with 2 mg/L of benzylaminopurine. C) Formation of shoots after 30 days in MSB5 with benzylaminopurine. D) Explants with shoots after 40 days in 1.5 mg/L of benzylaminopurine. E) Organogenesis from the cotyledonary node of soybean F) Multiple buds are regenerated in an MSB5 medium with 3 mg/L of benzylaminopurine. G) Soybean shoots in an MSB5 medium without hormones for root formation H) Rooting after 15 days in the MSB5 medium without hormones. I) Root formation after 15 days in an MSB5 medium with the following auxins: naphthalene acetic acid (NAA) or indole acetic acid (IAA). J) Plants transplanted to a pot under greenhouse conditions.

(Figure 2A). On evaluating the efficiency of the regeneration, we observed similar results: the youngest explants (6 days) showed the highest number of shoots per explant and the values differed significantly from those obtained in the explants of 7 and 8 days (Figure 2B). In preliminary studies it was demonstrated that when the cotyledonary node was exposed to high concentrations of benzylaminopurine (3 to 6 mg/L), the youngest explants (6 days) showed a better regeneration response compared to explants of 7 and 8 days of germination, which developed very small shoots and much callus. The explants that did not develop shoots turned chlorotic and were dark brown at the cotyledonary node area.

The number of regenerated shoots depended on the concentration of the benzylaminopurine, although this cytokine induced organogenesis in the shoots within all tested concentrations (0.5 to 6 mg/L) (Table 1). The shoots of the explants developed at the cotyledonary node region where the cut had been made and where the axillary buds were found, after 4 weeks of culture (Figure 1B-E). The highest efficiency in the formation of shoots was obtained in the MSB5 medium with 1.5 mg/L of the hormone, although the efficiency obtained did not differ from that of 2 mg/L (4.3 and 3.2 shoots/explant, respectively) (Table 1).

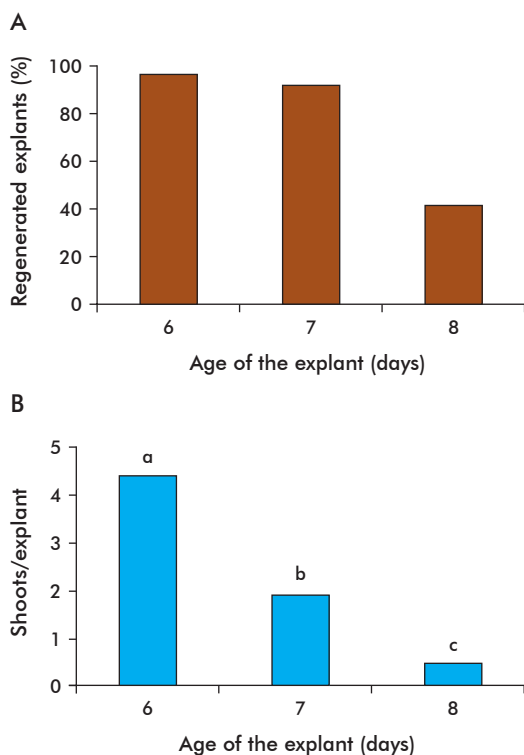


Figure 2. Effect of age of the explant (6, 7 and 8 days) on the efficiency of the regeneration of soybean shoots of the variety Incasoy-36. A) Percentage of explants that are regenerated from the cotyledonary node germinating at different ages. B) Efficiency of regeneration at the three ages evaluated, which are represented by the total number of shoots divided by the total number of explants. The regeneration process occurred in an MSB5 medium enriched with 30 g/L of sucrose, 1.5 mg/L of benzylaminopurine and 6 g/L of phytoagar. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) according to the procedure of Fisher (LSD).

Table 1. Results of the regeneration of shoots from the cotyledonary node of soybean seeds at different concentrations of benzylaminopurine*

Benzylaminopurine (mg/L)	Frequency of regeneration†	Shoots	Shoots/explant‡	Rooted shoots (%)
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

* The data are the sum of three experiments (21 explants per treatment), with seeds germinated at 6 days, in an MSB5 medium and exposed to increasing concentrations of benzylaminopurine.

† Frequency of regeneration: (Number of explants with shoots / Number of explants) × 100.

‡ Values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), according to the procedure of Fisher (LSD).

When the MSB5 medium was enriched with benzylaminopurine a green mass of calluses, that was compact at the cotyledonary node area, was observed in some explants where the cut was made to separate the hypocotyl (Figure 1B). This callous structure did not affect the normal growth of the shoots in concentrations lower than 2 mg/L. However, in concentrations of over 3 mg/L, the calluses were numerous in more than 30 % of the explants and the growth of shoots was then affected. Nonetheless, the shoots reached 27 % at the concentration of 6 mg/L of benzylaminopurine (Table 1). After 45 days in this medium, the explants with calluses that did not develop shoots turned dark brown and were eliminated.

At the same time, there were multiple buds at the cotyledonary node area when the explants were in an MSB5 medium with more than 1.5 mg/L of benzylaminopurine (Figure 1F). They developed only when the cotyledonary nodes conserved the axillary buds on placing them in the induction medium with the cytokinin. When all buds were eliminated (apical and axillary buds) from the cotyledon node, the formation of a callus mass was observed, which did not regenerate shoots. Although in the treatments with more than 3 mg/L of benzylaminopurine there was a greater presence of these multiple buds, in most of the explants they remained with an intense green color, but they did not grow (Figure 1F). Under these conditions the shoots had a well defined development (2 cm), there were very small shoots (less than 0.7 cm) and leaves. Although there were many, the very small shoots were not taken into account to determine the efficiency of regeneration. The number of shoots (of over 2 cm) was counted after 8 weeks of growth.

Effect of the solidifying agent on the morphogenesis of the cotyledon node

Another parameter studied was the effect of different concentrations of agar (5, 6, 7 and 8 g/L) and phytagel (2 and 3 g/L) on the formation of calluses and the regeneration of shoots from the cotyledon node. This study was made in an MSB5 medium with 1.5 mg/L of benzylaminopurine. The best results were obtained with agar as the gelling agent (Table 2). The highest regeneration frequencies (98.5 and 97.6 %) were reached with concentrations of 5 and 6 g/L, respectively. With the four concentrations of agar well defined shoots were developed after 25 to 30 days (Figure 3A-C). However, in 8 g/L of agar, the regenerated

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 stearidic 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.

Table 2. Regeneration of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] shoots from the cotyledonary node at different concentrations of agar and phytagel*

Solidifying Agent	Concentration (g/L)	Regeneration Frequency [†] (%)
Agar	5	98.5
	6	97.6
	7	93.0
	8	29.0
Phytagel	2	28.5
	3	42.4

* For each condition we tested 21 explants, cultured in the MSB5 medium with 1.5 mg/L of benzylaminopurine and solidified with different concentrations of agar and phytagel.

[†] Regeneration frequency: (Number of explants that regenerate / Total number of explants) × 100.

shoots (29 %) grew slower (30 to 50 days). When using phytagel, less calluses were formed (11 and 19 %) than those of the explants cultured in agar (23 and 41 %) and the shoots had a more rapid and defined growth, which is similar to that of 5 and 7 g/L of agar (Figure 3D). In contrast, the frequency of regeneration of the shoots (28.5 and 42.4 %) did not surpass that achieved in agar.

Rooting of shoots and adaptation of plants to the soil

The regenerated shoots emerged from the cotyledonary node region, near the zone where the cut was made, without interfering in the formation of calluses (Figure 1B-E). The regenerated plants in 1.5 and 2 mg/L of benzylaminopurine presented the highest frequency of rooting (97 and 95 %, respectively; table 1). Although more than 80 % of the regenerated shoots (3 to 4 cm high) rooted after 7 to 15 days in an MSB5 medium without hormones (Figure 1 G-H), the small shoots (1 to 2 cm high) that were placed to root in this medium did not grow or develop any roots. Hence, they were transferred to an MSB5 medium enriched with 0.1 mg/L of indole acetic acid (IAA) or 0.5 mg/L of naphthalene acetic acid (NAA) to induce rooting. In these two variants we obtained a good formation of roots (Figure 1I): 96 % in the medium with IAA and 94 % in the medium with NAA. All rooted plants were transferred to the greenhouse under controlled climatic conditions and for growth. They were placed in small pots covered with a transparent plastic sheet to create a humidity chamber, and after 7 days they were transplanted to large pots for seed production (Figure 1J).

Discussion

The cotyledonary node is one of the most frequently used explants for regeneration studies and the genetic transformation of soybean [15]. However, the frequency of regeneration with this type of explants is low in some varieties and the period to achieve it is long [10, 21]. The regeneration of the shoots from the cotyledonary node in this study occurred in a relatively short period (30 to 45 days) in all concentrations of benzylaminopurine tested. This confirms that it is the most effective growth regulator for the initiation of shoots [9, 21]. Several protocols use a medium to induce the formation of calluses and another one for the induction of the shoots [22, 23]. In this study we

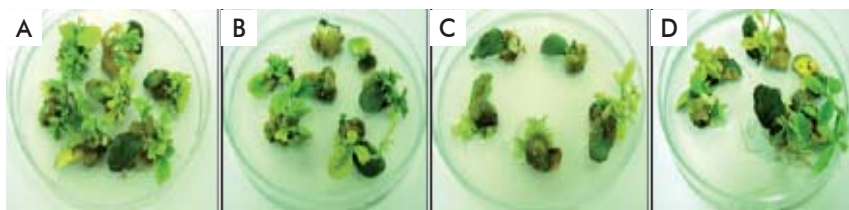


Figure 3. Formation of shoots from the cotyledonary node of mature soybean seeds, in an MSB5 medium with 1.5 mg/L of benzylaminopurine. A-C) Formation of shoots after 40 days in different agar concentrations: 5, 6 and 7 g/L. D) Formation of shoots after 40 days in an MSB5 medium with 3 g/L of phytagel.

used only one medium for the induction and regeneration of the shoots and we achieved the organogenesis with well defined shoots (Figure 1 C-E). These results demonstrated that after 3 mg/L of benzylaminopurine there is a decrease in the number of shoots that are regenerated (Table 1). It has been demonstrated that high concentrations of this compound may stimulate the formation of multiple buds [24]; however, growth may be inhibited, as observed in this study. Also, high concentrations have been shown to affect the frequency of the differentiation of the shoots in *Phaseolus* spp. [25].

On comparing the frequency of regeneration at the three ages evaluated, we find that the regeneration response of the explants tend to decrease with age (Figure 3). The explants of 6 and 7 days reached the highest frequencies of regeneration in the MSB5 medium with 1.5 mg/L of benzylaminopurine. The 6 day old explants gave a higher regenerative response than the 7 day old explants, with all concentrations tested in this study and previous studies with the variety Incasoy-36 (Soto N; unpublished data). The juvenile tissues have a high degree of meristematic activity and tend to have more plasticity *in vitro* [26]. It is confirmed that the organogenic potential of an explant is inversely proportional to its physiological age [27]; therefore, the 3 day old explants showed a lower regeneration than the 6 and 7 day old explants, regardless of the concentration of the benzylaminopurine used. These results agree with those of other researchers in the *in vitro* regeneration of soybean varieties, in which the highest frequency of regeneration is reached in concentrations of 0.5 to 2 mg/L of benzylaminopurine [21, 24]. However, Paz et al. obtained frequencies of regeneration that were lower to those described in this study (92.6 to 96.8 %), but with a concentration of 1.12 mg/L, using as explants cotyledons of mature seeds of the varieties: Thorne (60 %), Williams (46 %), Williams 79 (37 %) and Williams 82 (56 %) [28]. When evaluating the frequency of regeneration of the shoots from the cotyledonary node of the Cuban soybean variety, there were differences in the explants used, regardless of the hormonal concentration of the culture medium. Some explants developed many shoots, while others developed white calluses and roots; there were some that even became chlorotic and showed no morphogenesis. This demonstrates that the regenerative response *in vitro* tends to be variable, probably because of the endogenous levels of phytohormones during the organogenesis [26].

The formation of multiple buds in several explants was relevant. These explants coincided in that they

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, Martínez 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.

preserved the axillary buds after cutting the cotyledonary node in half, before placing them in the regeneration medium with benzylaminopurine. Shan *et al.* [29] observed that the formation of multiple buds only occurred when the axillary buds are left in the cotyledon node, while when the axillary buds are removed there is an abundant formation of calluses and no multi-buds are formed [29]. Therefore, the structural integrity of the axillary meristems contributes to the high efficiency of regeneration. Through histological studies, other researchers showed that the application of exogenous cytokinins alter the development of the axillary meristems, promote the proliferation of the meristematic cells in axillary buds and increase the number of primordial buds that are formed from the existing axillary meristems [30, 31].

Here we also obtained a low regeneration when increasing the concentration of agar in the culture medium. It is stated that high concentrations of agar create a very stressful medium for the plants, which reduces the formation of meristemoids [32]. However, some researchers have reached positive results on using 8 g/L of agar to solidify the co-culture medium [33].

We also studied the induction and development of roots in regenerated plants *in vitro*. In the presence of NAA, the induced roots were short (2 to 3 cm long) and thick (Figure 1I). In contrast, in the presence of

IAA the roots induced were long (6 to 7 cm) and thin (Figure 1I right), and similar to those developed in the MS medium without hormones (Figure 1H). The stimulating effect of the auxins in the rooting of shoots has been described. Liu *et al.* described that with NAA the formation of adventitious roots were stimulated; they observed that during the induction of adventitious roots in soybean, the levels of endogenous IAA increased because of the application of exogenous NAA, which produced a greater production of adventitious roots [34]. The stimulating effect of indolebutyric acid in the increase of the number of roots induced per soybean shoot has also been reported [35].

When plants rooted *in vitro* are transplanted to soil, they have a normal development and all roots are viable regardless of the medium in which they developed. This result made it possible to have other variants to achieve rooting of shoots *in vitro* with different states of physiological development.

Finally, a procedure was optimized to regenerate plants of the Cuban soybean variety Incasoy-36, using the cotyledonary node of mature seeds germinated *in vitro*, in a relatively short time and with a high frequency for shoot formation. This requires only one step to obtain the shoots and it can be used for the genetic transformation and *in vitro* propagation of this soybean variety.

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, Hinchey 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 Hortic 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.

Received in May, 2012.

Accepted in September, 2012.