

## Efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos en dos genotipos cubanos de soya

I. Bermúdez-Caraballoso<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>, B. Roque<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, km17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba. CP 85 100

### RESUMEN

En el cultivo de la soya la identificación de genotipos apropiados para la embriogénesis somática resulta de gran importancia para su posterior aplicación en programas de mejoramiento genético. Con el objetivo de determinar el efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos de dos genotipos cubanos de soya (Incasoy-24 e Incasoy-35) se realizó la siguiente investigación. Se evaluaron dos orientaciones: abaxial y adaxial, así como cinco longitudes del cotiledón inmaduro: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 mm. Se incluyó como control el genotipo Williams-82. Los resultados demostraron que la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro fueron determinantes en el número de embriones somáticos que se formaron en los genotipos cubanos evaluados. Con la orientación abaxial se obtuvo el mayor número de embriones somáticos por cotiledón. La mayor respuesta embriogénica se alcanzó cuando se emplearon cotiledones inmaduros de 4.0 mm de longitud. Estos resultados proporcionan información básica para investigaciones posteriores en este cultivo.

Palabras clave: embriogénesis somática, orientación abaxial, regeneración

### ABSTRACT

Identification of the suitable genotype for somatic embryogenesis in soybean culture is very important for further application in Genetic Improvement Programs. The objective of the investigation was to determine the effect of the orientation and length of immature cotyledons in the formation of somatic embryos of two Cuban soybean genotypes (Incasoy-24 and Incasoy-35). The genotype Williams-82 was included as control. Two orientations were evaluated: abaxial and adaxial, as well as five lengths of the immature cotyledons: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 mm. Results demonstrated that the orientation and seed size are determinant in the number of somatic embryos formed in the Cuban genotypes evaluated. The highest values of somatic embryos per cotyledon were obtained in abaxial orientation. The highest embryogenic response was achieved using cotyledons of 4.0 mm length. These results provided basic information for further researches in this crop.

Keywords: abaxial orientation, regeneration, somatic embryogenesis

### INTRODUCCIÓN

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

Debido a la importancia económica del cultivo, los esfuerzos en las investigaciones se han orientado al mejoramiento de las variedades con el fin de incrementar la calidad de las semillas, su adaptación

a las condiciones edafoclimáticas adversas, su resistencia a plagas y enfermedades y la tolerancia a la aplicación de herbicidas (Yang *et al.*, 2009). En tal sentido, a nivel mundial se emplean tanto métodos tradicionales como herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético (Schmidt *et al.*, 2005).

En Cuba, se han empleado métodos de mejoramiento genético tales como: inducción de mutaciones e hibridación natural para la obtención de nuevos genotipos de soya, entre los cuales se encuentran Incasoy-1, Incasoy-24, Incasoy-27 e Incasoy-35 (Ortíz *et al.*, 2005; Ponce *et al.*, 2003).

La transformación genética como vía de mejoramiento de este cultivo, cobra cada día mayor relevancia y su éxito se relaciona directamente con la eficiencia del sistema de regeneración empleado para la obtención de plantas transformadas. Dentro de los sistemas de regeneración de plantas conocidos, la embriogénesis somática ha sido uno de los más empleados en soya (Parrott *et al.*, 1989; Ko *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2005), debido a que las plantas obtenidas por esta vía son más uniformes genéticamente y a que mediante el establecimiento de cultivos embriogénicos proliferativos se puede obtener gran cantidad de material vegetal útil, como blanco para la transformación (Parrot *et al.*, 1989; Meng *et al.*, 2007; Kita *et al.*, 2007).

No obstante, uno de los factores limitantes para la regeneración de plantas por esta vía, es su condición genotipo-dependiente (Parrott *et al.*, 1989; Hiraga *et al.*, 2007), lo cual impide el empleo directo de los protocolos ya existentes.

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

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente planteados, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos de dos genotipos cubanos de soya.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon los genotipos cubanos de soya, IS-24 e IS-35. Como control se utilizó el genotipo Williams-82, en consideración a que se ha probado en los protocolos empleados como referencia en este estudio (Bailey *et al.*, 1993; Saymolov *et al.*, 1998). Las semillas de todos los genotipos fueron aportadas por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba (INCA).

Las plantas donantes se cultivaron en bolsas de polietileno en casa de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas. El sustrato estuvo compuesto por 25% de zeolita y 75% de materia orgánica. Se realizaron dos riegos al día, cada uno con una duración de cinco minutos. El tiempo transcurrido desde la antesis hasta que la semilla alcanzó la longitud requerida en cada uno de los

experimentos se determinó marcando, de manera aleatoria y a partir del momento de la antesis, botones florales en varias plantas dentro de cada genotipo. La longitud de la semilla se midió por su eje plano con una escala milimetrada acoplada al ocular del microscopio estereoscópico (OLYMPUS).

Como explante para el inicio del proceso de embriogénesis somática se emplearon cotiledones inmaduros provenientes de semillas de vainas cosechadas entre 12 y 15 días después de la antesis. Las vainas se lavaron con una solución de agua y detergente comercial, luego se desinfectaron sumergiéndolas en alcohol al 70% (v/v) durante 20 segundos, seguido de una segunda desinfección en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3.0 % (v/v) y seis gotas de Tween-20 durante diez minutos. Al término de este tiempo, y en cámara de flujo laminar, se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril. Las semillas inmaduras fueron separadas de las vainas y el extremo donde se encontraba el eje embrionario fue cortado y descartado. Los dos cotiledones fueron obtenidos ejerciendo una presión suave en el extremo contrario al corte (Lazzeri *et al.*, 1985).

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

Se tomaron cotiledones inmaduros (4.0 y 5.0 mm) los que fueron colocados por el lado abaxial y adaxial sobre el medio de cultivo semisólido para la inducción de embriones somáticos MSD40 (Bailey *et al.*, 1993; Saymolov *et al.*, 1998). Este tenía en su composición sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3% de sacarosa, 40 mg l<sup>-1</sup> de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® (SIGMA). El pH se ajustó a 7.0 (Santarém *et al.*, 1997) antes de la esterilización. En este experimento se establecieron dos tratamientos según la orientación del cotiledón inmaduro en los dos genotipos cubanos y el control (Williams-82), con diseño completo al azar. Cada tratamiento tuvo cinco réplicas, cada una con cuatro explantes.

Los frascos fueron incubados en cámaras de crecimiento con fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad, 26±2°C e intensidad luminosa de 5-10 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> según lo propuesto por Lazzeri *et al.* (1987), provista por lámparas fluorescentes. A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos formados por cotiledón.

Se realizó una descripción del proceso de formación de los embriones somáticos respaldado por un análisis histológico. Para ello, se tomaron muestras de tejido de los cotiledones inmaduros a los nueve y doce días de cultivo. Se fijaron en FAA (formaldehído 37%, ácido acético 100%, etanol 70%, en una proporción 5:5:90). Luego fueron deshidratados en un gradiente ascendente de etanol y embebidos en cera de parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor con un micrótopo rotatorio (Zeiss), se fijaron en portaobjetos y se tiñeron con safranina al 0.5%. Las secciones histológicas de las diferentes muestras se examinaron en microscopio óptico (AXIOSKOP) y las imágenes fueron captadas con una cámara digital (OLYMPUS DP70) acoplada al microscopio.

### Influencia de la longitud del cotiledón inmaduro

Se emplearon cotiledones inmaduros provenientes de semillas de 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 mm de longitud. Los cotiledones fueron colocados sobre el medio de cultivo MSD40 según la orientación en la cual se logró el mayor número de embriones somáticos en dependencia del genotipo de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente. En este experimento se establecieron cinco tratamientos según la longitud del cotiledón inmaduro y en cada genotipo cubano y el control. Cada tratamiento tuvo cinco réplicas, cada una con cuatro explantes, con diseño completamente al azar.

Los frascos fueron colocados en cámaras de crecimiento con fotoperíodo 16/8 horas luz/

oscuridad,  $26\pm 2^\circ\text{C}$  e intensidad luminosa de  $5\text{-}10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provista por lámparas fluorescentes.

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

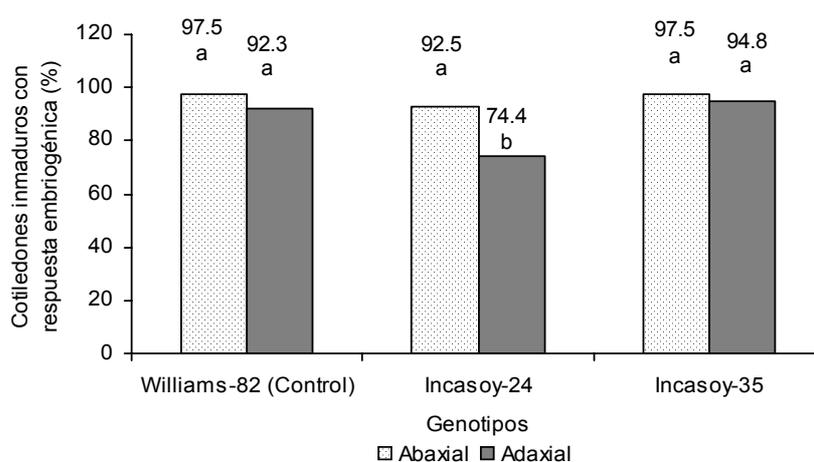
### Análisis estadístico

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 efecto de la orientación del explante en el número de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos por cotiledón inmaduro, se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. Para la comparación de los datos en la variable longitud de la semilla se realizó una prueba de Kruskal Wallis. En todos los casos se realizó una comprobación previa de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

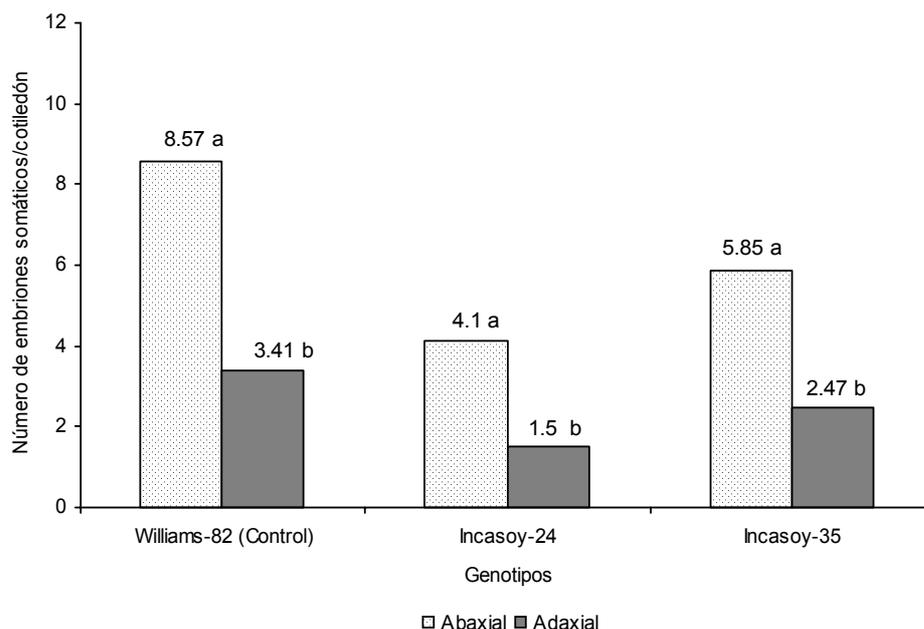
### Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo

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



Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba de Mann-Whitney, para  $p < 0.05$ .

Figura 1. Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro en el porcentaje de cotiledones con respuesta embriogénica a los 30 días de cultivo, en los genotipos cubanos de soja Incasoy-24 e Incasoy-35



Barras con letras distintas en cada difieren significativamente según prueba de Mann Whitney, para  $p < 0.05$ .

Figura 2. Efecto de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo en la formación de embriones somáticos a los 30 días de cultivo, en los genotipos cubanos de soya Incasoy-24, Incasoy-35

Por su parte, en los genotipos IS-35 y el Williams-82 (Control) no se encontraron diferencias significativas en la respuesta embriogénica a los 30 días de cultivo en las dos orientaciones estudiadas.

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

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

Con la orientación abaxial, los embriones somáticos se formaron en el centro y en el borde del explante, tanto en los genotipos cubanos como en el control (Figura 3 A, B y C) y en la orientación adaxial se formaron con mayor frecuencia en los

bordes del cotiledón en los genotipos evaluados (Figura 3 D). Independientemente de la orientación del cotiledón inmaduro sobre el medio de cultivo, los embriones somáticos se formaron sobre el tejido necrosado y su tamaño varió en dependencia del genotipo: menores de 1.0 mm de longitud en IS-24 e IS-35 y entre 2.0 y 3.0 mm en el genotipo Williams-82.

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

En las secciones histológicas tomadas de tejidos con nueve días de cultivo se observó una proliferación de tejido con células proembriogénicas ubicado cerca de la epidermis de los cotiledones inmaduros en las dos orientaciones estudiadas, aunque en mayor proporción cuando el cotiledón se orientó por el lado abaxial (Figura 3 E y F). La sección histológica

correspondiente al tejido embriogénico a los 12 días de cultivo, permitió confirmar que en los genotipos cubanos de soya la embriogénesis somática fue directa, ya que se observa la continuidad de la epidermis entre el tejido materno y el embrión somático globular (Figura 3 G). Esta característica coincide con lo descrito por Aparecida *et al.* (2002) en un estudio sobre la caracterización anatómica de la embriogénesis somática de un genotipo brasilero de soya y el genotipo Williams-82.

Los resultados del presente estudio indicaron que la orientación fue determinante en el número de embriones somáticos que se formaron en los genotipos cubanos evaluados. De esta manera, con la orientación abaxial se obtuvieron los mayores valores del número de embriones somáticos por cotiledón. Estos resultados fueron similares a los descritos por Santarém *et al.* (1997), cuando evaluaron el efecto de la orientación del cotiledón inmaduro en cuatro genotipos de soya americanos. Sin embargo, difieren de los obtenidos por Ko y Korban (2004) quienes encontraron una mejor respuesta embriogénica cuando el cotiledón se orientó por el lado adaxial sobre el medio de cultivo, en genotipos de soya americanos.

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

### Influencia de la longitud del cotiledón inmaduro

La longitud del cotiledón inmaduro influyó en la respuesta embriogénica de los genotipos cubanos de soya IS-24 e IS-35. El mayor porcentaje de cotiledones inmaduros con respuesta embriogénica se logró con 3.0, 4.0 y 5.0 mm de longitud en los dos genotipos cubanos y el control. Los porcentajes más bajos se presentaron con 2.0 y 6.0 mm en todos los genotipos evaluados (Figura 4).

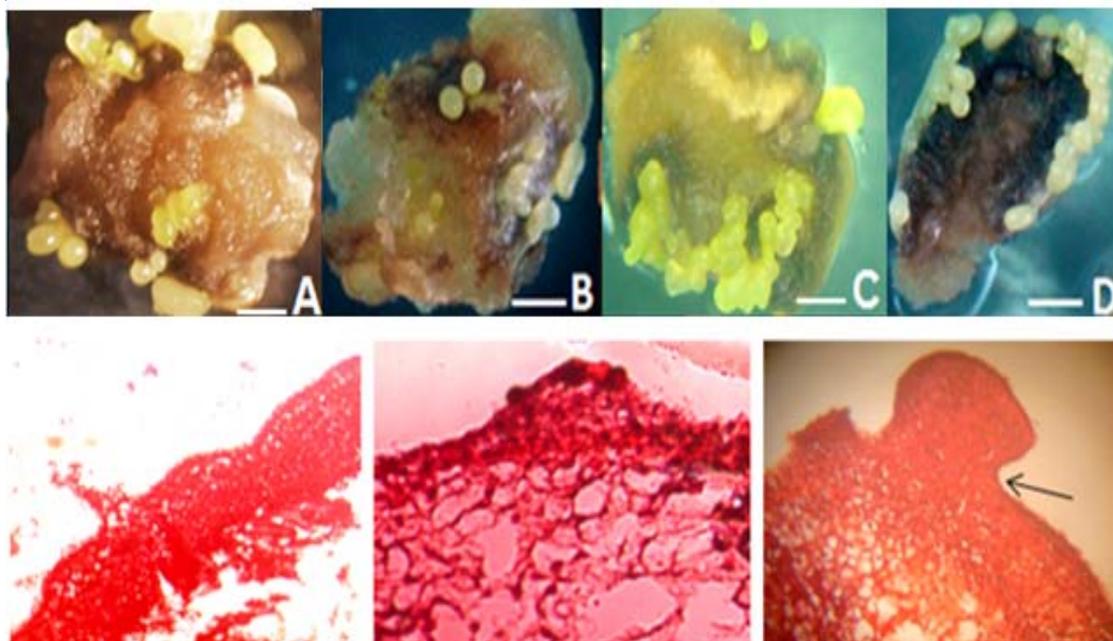


Figura 3. Morfología e histología de la formación de embriones somáticos en genotipos cubanos de soya en orientación abaxial. (A) Williams-82 (Control); (B) IS-24; (C) IS-35; (D) Williams-82 (Adaxial). A, B, C y D a los 30 días de cultivo. Escala de la barra: 1.0 mm. Secciones histológicas de cotiledones inmaduros del genotipo cubano de soya IS-35 (E) orientación abaxial y (F) orientación adaxial. E y F a los nueve días de cultivo. (G) Embrión somático en etapa globular a los 12 días de cultivo. La flecha indica continuidad en la epidermis. Escala de la barra 100  $\mu$ m

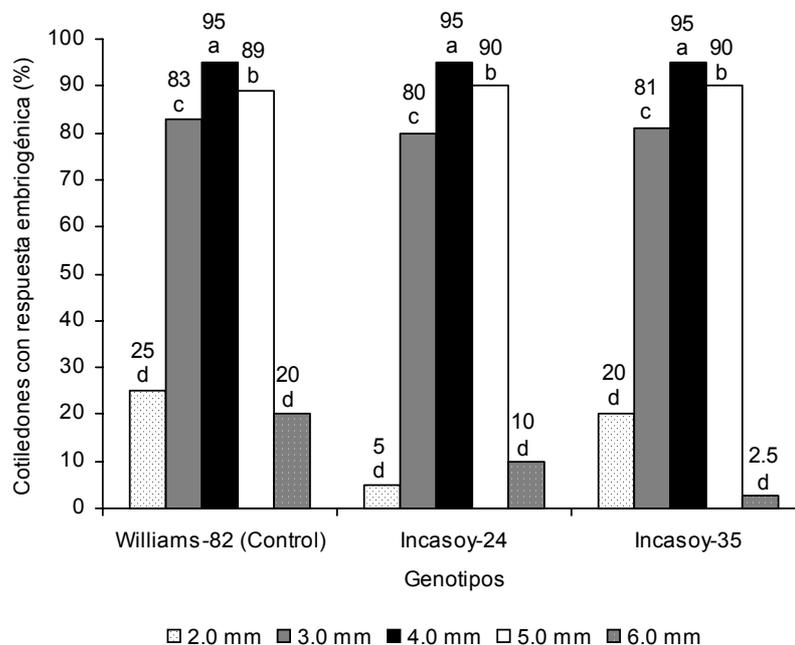
Al analizar el número de embriones somáticos formados por cotiledón inmaduro se encontró que el genotipo IS-35 alcanzó los mayores valores con una longitud de 4.0 mm con diferencia significativa con las otras longitudes evaluadas. Resultados similares se encontraron en el genotipo Williams-82. Por su parte, en el genotipo IS-24 no se presentaron diferencias significativas en el número de embriones somáticos por cotiledón cuando se emplearon tamaños de 4.0 y 5.0 mm de longitud. Estos resultados difirieron significativamente con los valores obtenidos en los cotiledones de longitudes de 2.0, 3.0 y 6.0 mm. Los dos genotipos cubanos evaluados lograron la mayor respuesta embriogénica cuando se emplearon cotiledones de 4.0 y 5.0 mm para IS-24 y 4.0 mm de longitud para IS-35 (Figura 5).

La embriogénesis somática está asociada predominantemente a la existencia de células competentes en el explante inicial, ya que estas pueden dar lugar a embriones somáticos directamente o después de varios ciclos mitóticos, en dependencia del estado fisiológico del explante y del genotipo (Parrot *et al.*, 1989). En soya, generalmente se emplean cotiledones

inmaduros para la inducción de la embriogénesis somática directa, debido a la existencia de meristemos organizados en este tipo de explante, razón por la cual el tamaño del cotiledón es considerado uno de los factores limitantes de este proceso morfogénico (Lazzeri *et al.*, 1985; Gaj, 2004; Yang *et al.*, 2009).

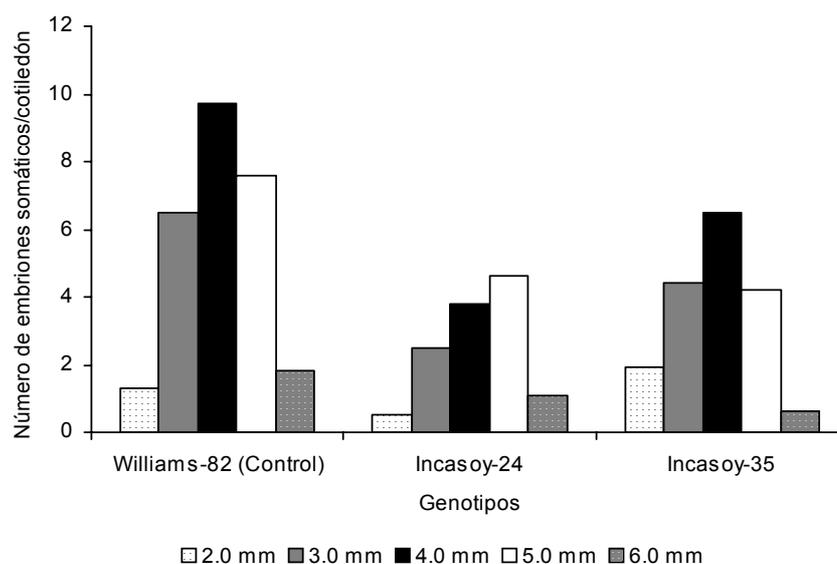
Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación fueron descritos por Yang *et al.* (2009) en genotipos chinos de soya, donde la mayor respuesta embriogénica se logró cuando los cotiledones procedían de semillas de 4.0 a 5.0 mm de longitud; y la menor respuesta con longitudes menores de 3.0 y mayores de 6.0 mm.

De igual forma, al evaluar la respuesta embriogénica en cotiledones inmaduros procedentes de semillas de longitudes entre 1.5 y 8.5 mm en genotipos de soya americanos, Lazzeri *et al.* (1985), concluyeron que los cotiledones tomados a partir de semillas entre  $4.0 \pm 1.0$  mm proveían el tejido más apropiado para la inducción embriogénica, ya que en estas longitudes de semillas se formaron la mayor cantidad de embriones somáticos.



Barras con letras distintas difieren significativamente según prueba de Kruskal Wallis, para  $p < 0.05$ .

Figura 4. Efecto de la longitud del cotiledón inmaduro en el porcentaje de cotiledones con respuesta embriogénica a los 30 días de cultivo, en los genotipos cubanos de soya Incasoy-24, Incasoy-35



Barras con letras distintas en cada genotipo difieren significativamente según prueba de Kruskal Wallis, para  $p < 0.05$ .

Figura 5. Efecto de la longitud del cotiledón inmaduro en la formación de embriones somáticos en los genotipos cubanos de soya Incasoy-24, Incasoy-35 a los 30 días de cultivo

Igualmente, a partir del estudio de los factores determinantes en la embriogénesis somática de genotipos coreanos de soya, Kim *et al.* (2004), encontraron una relación directamente proporcional entre el tamaño óptimo del cotiledón y el tamaño final de la semilla madura con la respuesta embriogénica. Estos autores observaron que en los genotipos en los cuales la semilla madura era de tamaño pequeño, la mayor formación de embriones somáticos se presentó cuando los cotiledones provenían de semillas de 3.0 mm de longitud y en los genotipos en los cuales la semilla madura era de tamaño grande, la mayor respuesta embriogénica se relacionó con cotiledones provenientes de semillas de 4.0 mm. Al igual que en el presente estudio, estos autores obtuvieron los menores valores en formación de embriones somáticos cuando emplearon cotiledones de semillas menores de 3.0 mm y mayores a 5.0 mm.

La capacidad embriogénica, según Gaj (2004), está restringida a un corto periodo de tiempo dentro del desarrollo del tejido empleado como explante. En estudios sobre embriogénesis somática en *Arabidopsis thaliana*, este autor encontró una relación inversa entre la capacidad embriogénica y el grado de madurez del embrión cigótico. Por ello concluyeron que el grado de madurez no sólo influye en la cantidad de embriones somáticos formados sino también en el tipo de embriogénesis

inducida. De esta forma, cuando empleó embriones cigóticos maduros, observó que los embriones somáticos se formaron directamente sobre el explante, es decir, la embriogénesis era directa; mientras que, cuando empleó embriones cigóticos inmaduros frecuentemente se formó un callo embriogénico, o sea, se indujo embriogénesis somática indirecta.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se concluyó que la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro tuvieron efecto en la respuesta embriogénica en los dos genotipos cubanos de soya (Incasoy-24 e Incasoy-35) y el control Williams-82. El mayor número de embriones somáticos se obtuvo con la orientación abaxial y longitud del cotiledón inmaduro de 4.0 mm, en los genotipos estudiados. Estos resultados proporcionan información básica para investigaciones posteriores.

## REFERENCIAS

- Aparecida, J, Carneiro ML, Olívio I, Apezatto B (2002) Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. Brazilian Archives of Biology and Technology 45 (3): 277-286
- 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

- FAO (2009) Perspectivas Alimentarias. [En línea] En: <http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e07.htm> (Consulta 21 de enero de 2010)
- 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
- Gaj, MD (2004) factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27-47
- Gamborg, OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Plant cell cultures* 50:151-158
- Griga, M (1993) Some factors affecting somatic embryogenesis efficiency in soybean (*Glycine max* [L.] Merrill). *Biologia Plantarum* 35 (2): 101-106
- Hartweck, LM, Lazzeri PA, Cui D, Collins GB y Williams EG (1988) Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybeans cotyledons. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 821-828
- 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.) Merrill]. *Ann Bot* 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
- Kim, Y, All T, Soon H, Ki, H., Uk, S y Joong, S (2004) Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. *J. Plant Biotechnology* 6(1): 45-50
- Kita, Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayaman M, Ishimoto M (2007) Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Report* 26: 439-447
- Ko, TS, Korban SS (2004) Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 552-558
- Ko, TS, Lee S, Krasnyanski S, Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical Applied Genetics* 107:439-447
- Lazzeri, PA, Hildebrand DF, Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Molecular Biology Reports* 3:160-167
- Lazzeri, PA, Hildebrand DF, Collins GB (1987) Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 10:197-208
- Meng, Q, Zhang C, Gai, Yu D (2007). Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Physiology* 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
- Nishizawa, K, Ishimoto M (2009) Maturation of somatic embryos as a model for soybean seed development. *Plant Biotechnology* 26: 543-550
- Ortiz, R, de la Fé C, Ponce M (2005) Informe de nuevas genotipos. INCASOY-35: Primera variedad de soya obtenida en Cuba a partir del empleo de técnicas de irradiación de rayos gamma de <sup>60</sup>Co. *Cultivos Tropicales* 26 (2): 57
- Parrott, WA, Hildebrand DF, Williams EG, Collins GB (1989) Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 15-21
- Ponce, M, de la Fé C, Ortiz R, Moya C (2003) Informe de nuevas genotipos. IS-24 e IS-27: Nuevos genotipos de soya para las condiciones climáticas de Cuba. *Cultivos Tropicales* 24 (3): 49
- 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
- Santarém, ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent, and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:13-19
- Schmidt, MA, Tucker DM, Cahoon EB, Parrot WA (2005) Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. *Plant Cell Report* 24: 383-391
- 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 Cell Dev Biol-Plant* 45: 180-188
- Ziv, M, Chen J (2008) The anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. En: George EF, Hall MA, Jan De Klerk, G (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*, pp. 465-477. Springer. Dordrecht