

**COMUNICACIÓN**

# **Embriogénesis somática en soja (*Glycine max* (L.) Merrill) var. Bragg**

Melchiorre, M., L.M. Casano y D.N. Moriconi

## **RESUMEN**

Se describe un sistema para la regeneración de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) variedad Bragg a través de embriogénesis somática. Se probaron tres fuentes de explanto: cotiledones de semillas inmaduras, hojas cotiledonares y secciones de hipocótilos de plántulas de 25 días. A partir de los primeros se obtuvieron callos embriogénicos y embriones somáticos. Inicialmente la producción de callos embriogénicos fue inducida cultivando cotiledones de semillas inmaduras en medio MS adicionado con concentraciones de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) entre 0 y 20 mg/l combinados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético entre 0 y 40 mg/l (2,4-D). Treinta mg/l de 2,4-D en ausencia de ANA fue la combinación hormonal más efectiva para la producción de callos embriogénicos a los 30 días de cultivo. Luego de 30 días de subcultivo en iguales condiciones se formaron embriones somáticos, los cuales desarrollaron en plantas completas cuando fueron cultivados en medio MS adicionado con 0,15 mg/l de ANA, 0,33 mg/l de cinetina y 0,33 mg/l de 6-bencilaminopurina.

**Palabras clave:** soja, embriogénesis somática, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido  $\alpha$ -naftalenacético.

Melchiorre, M., L.M. Casano, y D.N. Moriconi, 1995. Somatic embryogenesis in soybean (*Glycine max*. L. Merrill.) var. Bragg. Agriscientia XII : 77-82.

## **SUMMARY**

The present paper describes a procedure to induce somatic embryogenesis in soybean var Bragg. Three sources of explants were tested: cotyledons of immature seeds, and cotyledonary leaves and hypocotyl sections from 25 day old. Only cotyledons of immature seeds developed embryogenic calli and somatic embryos. Initially embryogenic calli were induced by culturing immature cotyledons in MS medium with 0 to 20 mg/l  $\alpha$ -naphthalenacetic acid (ANA) and 0 to 40 mg/l 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The best hormonal treatment was 0 mg/l ANA and 30 mg/l 2,4-D. After 30 d-subculture under the same conditions somatic embryos were apparent and complete plants were then obtained

by culturing somatic embryos with 0,15 mg/l ANA, 0,33 mg/l kinetin and 0,33 mg/l 6-bencylaminopurine.

**Keywords:** soybean, somatic embryogenesis, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid,  $\alpha$ -naphthalenacetic acid.

*M. Melchiorre, L.M. Casano y D.N. Moriconi, Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Córdoba. Casilla de Correo 509 (5000) Córdoba.*

La embriogénesis somática en soja está fuertemente afectada por diversos factores entre los que se destacan el cultivar y tipo de explanto empleado, y las variaciones en los elementos que constituyen los medios y condiciones de cultivo (sales, tipo y concentración de azúcar; tipo, concentración y tiempo de exposición del explanto a los reguladores de crecimiento, principalmente auxinas) (Lippmann and Lippmann, 1984; Ranch *et al.*, 1985, 1986; Lazzeri *et al.*, 1985, 1987 a, b; Finer, 1988; Finer and Nagasawa, 1988; Buchheim *et al.*, 1989; Shoemaker *et al.*, 1991). Asimismo, la respuesta del explanto puede estar condicionada por otros factores tales como el grado de desarrollo ontogénico y la sensibilidad del tejido a la acción de las fitohormonas (Davies, 1987).

Las condiciones óptimas descritas para la regeneración de soja mediante la embriogénesis somática se adecuan a un limitado número de genotipos y son específicas para cada variedad (Komatsuda and Ohayama, 1988; Komatsuda, 1990; Komatsuda and Ko, 1990). Así, la obtención por medio de dicha técnica de cultivo *in vitro* de plantas de una nueva variedad, requerirá determinar cuáles son para cada material las condiciones que permitan la producción de embriones somáticos y la posterior regeneración de individuos completos. Hasta el momento no se dispone de esta información para la variedad Bragg de soja.

La variedad Bragg es una de las más sembradas en la principal región de producción sojera de Argentina, ya que sus requerimientos fotoperiódicos para floración (perteneció al grupo de maduración VII) y ciclo del cultivo se adecuan a las condiciones climáticas de dicha región. Además, su hábito de crecimiento indeterminado le otorga cierta plasticidad frente a posibles condiciones ambientales desfavorables (Rossi *et al.*, 1991).

En el marco de un proyecto de mejoramiento de soja por técnicas de ingeniería genética, en el presente trabajo se ha tratado de establecer un proto-

colo de regeneración por embriogénesis somática para la variedad Bragg.

Los cotiledones de semillas inmaduras se extrajeron a partir de vainas de plantas de soja variedad Bragg selección Cerrillo INTA cultivadas a campo, a los 20 a 25 días post fecundación. Dichas vainas se desinfectaron por inmersión en etanol 96° durante 3 min. Posteriormente se sumergieron 20 min. en una solución de hipoclorito de sodio (4 % de cloro activo) más Tween 20 aplicando vacío con una bomba y lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas inmaduras se extrajeron de la vaina y luego de eliminar el eje embrionario y los tegumentos, los cotiledones inmaduros se colocaron con la superficie adaxial en contacto con el medio.

Semillas de soja de la misma variedad se desinfectaron según se describió para vainas inmaduras y se sembraron en medio MS0 (ver párrafo siguiente). De plántulas de 25 días desarrolladas *in vitro* se extrajeron las hojas cotiledonares y secciones de hipocótilos (1 cm de longitud) los cuales fueron sembrados en diferentes medios.

Los medios para cotiledones de semillas inmaduras estaban compuestos por medio basal MS0 conteniendo sales MS (Murashige and Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 3 % de sacarosa y 6,5 g/l de agar (Sigma Chem. Co., U.S.A.) adicionado con ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 mg/l más 0, 10, 20, 30 y 40 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxyacético (2,4-D). El pH se ajustó a 5,8 previo a la esterilización en autoclave, 20 min. a 121° C (1 Kg/cm<sup>2</sup>). Se realizaron al menos 2 repeticiones, disponiendo 20 cotiledones en cajas de Petri que contenían 20 ml de cada medio. Los explantos fueron incubados a 21  $\pm$  2° C con un fotoperíodo de 16 hs de luz fluorescente blanca de 2500 lux de intensidad (provista por tubos tipo luz día Sylvania de 30 W) y 8 hs de oscuridad. A los 30 días se evaluó el porcentaje y tipo de callos obtenidos. Los callos embriogénicos (tipo e, Tabla 1) posteriormente se subcultivaron en medios de igual com-

**Tabla 1.** Proporción (%) y tipo de callos desarrollados en los 30 días de cultivo de cotiledones inmaduros de soja var. Bragg en medios con ANA y 2,4-D.

2,4D mg/l	ANA mg/l				
	0	5	10	15	20
0	0	0	30 <b>bf</b>	20 <b>bf</b>	20 <b>bf</b>
10	80 <b>vd</b> – 20 <b>e</b>	80 <b>vf</b> – 20 <b>e</b>	70 <b>vf</b> – 30 <b>e</b>	80 <b>vf</b> – 20 <b>e</b>	80 <b>vf</b> – 20 <b>e</b>
20	80 <b>bf</b> – 20 <b>e</b>	80 <b>bf</b> – 20 <b>e</b>	70 <b>bf</b> – 10 <b>e</b>	70 <b>bf</b> – 10 <b>e</b>	70 <b>bf</b> – 10 <b>e</b>
30	60 <b>bf</b> – 40 <b>e</b>	70 <b>vd</b> – 30 <b>e</b>	70 <b>bf</b> – 30 <b>e</b>	70 <b>vf</b> – 30 <b>e</b>	70 <b>bf</b> – 30 <b>e</b>
40	0	0	40 <b>vf</b> – 60 <b>bf</b>	30 <b>vf</b> – 70 <b>bf</b>	100 <b>bf</b>

Los números representan porcentualmente la proporción de la superficie total del explanto que desarrolló en callo de un determinado tipo. Las letras representan el tipo de callo desarrollado: **bf**: callo blanco y friable, textura rugosa, poco compacto formado por células disgregadas e hiperhídricas. **vd**: callos verdes duros, con estructura desorganizada y textura rugosa. **vf**: callos friables de color verde. **e**: callos embriogénicos, transparentes, de superficie lisa y redondeada, las células dispuestas ordenadamente en porciones globosas (masas proembriogénicas).

posición a la del que provenían, luego de descartar las porciones necróticas y las zonas del explanto que no desarrollaran callos. Al cabo de 30 días de subcultivo se evaluó el número de embriones desarrollados y se los transfirió a medios de regeneración a fin de posibilitar el desarrollo de plantas completas. Dichos medios contuvieron ANA, 6-bencilaminopurina (BA), y cinetina (KIN) en distintas proporciones (Tabla 2) adicionados a MS0.

El cultivo de cotiledones maduros e hipocótilos se realizó en medio basal MS0 adicionado con 0, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/l de 2,4-D. Se realizaron al menos 2 repeticiones de 20 explantos para cada condición, los cuales fueron tratados como se describió para cotiledones inmaduros.

Todos los tratamientos se dispusieron usando un diseño completamente aleatorizado. Las variables se sometieron al análisis de la varianza a 2 criterios, y las medias fueron comparadas de acuerdo a la prueba de Tukey, por medio del programa estadístico Statistix 3.5.

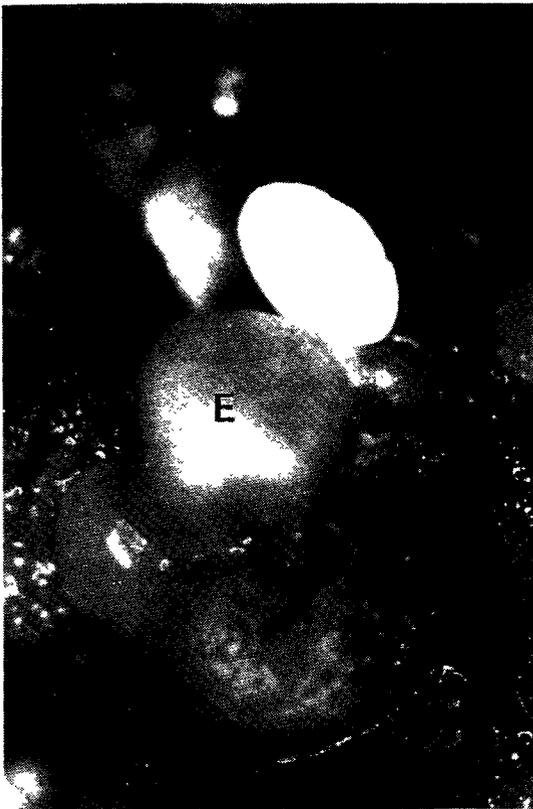
Los resultados muestran que al cabo de 30 días de cultivo *in vitro*, los cotiledones inmaduros aumentaron de volumen y su porción central mostró regiones resquebrajadas. Desde el borde de estas heridas comenzó la proliferación de callos en las zonas sin contacto con el medio de cultivo. Los explantos en los medios con ANA y 2,4-D mostraron diferentes respuestas en cuanto al tipo y proporción de callos desarrollados (Tabla 1). A partir de 10 mg/l de 2,4-D el 100% de la superficie de los explantos produjo callos. Sin embargo sólo entre el 20 y el 40 % correspondió a callos embriogénicos (tipo e, Tabla 1), observándose la mejor respuesta a 0 mg/l de ANA y 30 mg/l de 2,4-D (Fig. 1). Durante los 30 días

de subcultivo posterior los callos embriogénicos desarrollaron embriones somáticos según la composición hormonal del medio al que fueron transferidos (Tabla 3). Nuevamente, la relación 0 mg/l de ANA y 30 mg/l de 2,4-D produjo los mejores resultados, obteniéndose entre 2 y 6 veces más embriones por explanto que en los restantes tratamientos. Esta concentración y la combinación 5 mg/l de ANA y 20 mg/l de 2,4-D difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) de los otros tratamientos ensayados. Los embriones somáticos en medio de regeneración R1 (Tabla 2) desarrollaron plantas completas (Fig. 3), esto no ocurrió en los otros medios. En R2, en la base de los embriones comenzó la proliferación de callos y en R3 los embriones no germinaron.

Los cotiledones maduros e hipocótilos de plántulas no desarrollaron estructuras embriogénicas durante los 30 días del cultivo ni los de subcultivo posteriores. Los cotiledones desarrollaron callos tipo verde duro y friables a las concentraciones hormonales más bajas y tipo marrones blandos y necróticos

**Tabla 2.** Composición hormonal de los medios de regeneración de embriones somáticos de soja var. Bragg.

Medio	ANA	BA	KIN
	mg/l		
<b>R1</b>	0,15	0,33	0,33
<b>R2</b>	0,33	0,33	0,33
<b>R3</b>	0,15	0,66	0,66



**Fig. 1.** Callos embriogénicos (tipo e, ver Tabla 1) formados en medio MS0 con 0 mg/l de ANA y 30 mg/l de 2,4-D obtenidos de plantas de soja var. Bragg

cos con 16 y 32 mg/l de 2,4-D. Lo opuesto ocurrió con los hipocótilos, en donde la presencia de callos oxidados se indujo con 2 y 4 mg/l de 2,4-D mientras que las concentraciones más elevadas indujeron el desarrollo de callos blancos friables.

Sólo los cotiledones inmaduros permitieron la regeneración de plantas de soja variedad Bragg vía

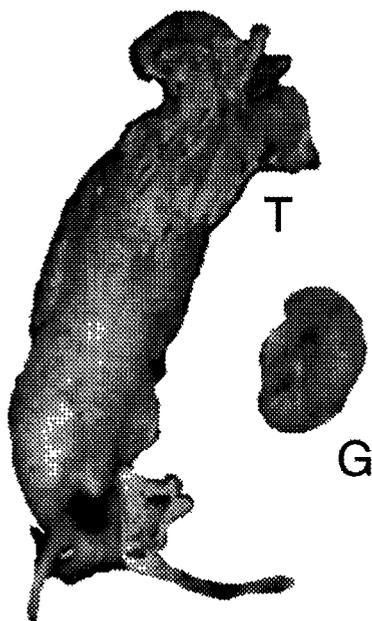
embriogénesis somática. Esto podría deberse a la combinación de las condiciones de cultivo con los altos niveles hormonales endógenos, que en soja son máximos durante el período de llenado rápido de la semilla (Schussler *et al.*, 1984), etapa en la cual se extrajo el material para cultivo. Los cotiledones maduros e hipocótilos no desarrollaron callos embriogénicos ni embriones, probablemente debido a que los explantos de mayor edad fisiológica pierden paulatina e irreversiblemente su capacidad de responder a la estimulación por auxinas y por ende su capacidad de regenerar (Pierik, 1990). Esto no se modificaría ni aún prolongando los tiempos de exposición del explanto a los reguladores, situación verificada también en cultivo de hipocótilos de habas (Cleland, 1987).

Lippman and Lippman (1984) y Lazzeri *et al.* (1985 y 1987 a) lograron embriogénesis somática en soja utilizando concentraciones de 2,4-D entre 0,2 y 5 mg/l; sin embargo, otros autores (Ranch *et al.*, 1986; Finer, 1988; Buchheim *et al.*, 1989; Shoemaker *et al.*, 1991) informaron que, dependiendo del cultivar, se requirieron mayores niveles de este regulador (entre 20 y 40 mg/l). Concordantemente con estos últimos, en el presente trabajo 30 mg/l fue la concentración de 2,4-D más efectiva tanto para la producción de callos embriogénicos como para el desarrollo de embriones somáticos de soja var. Bragg, aunque la combinación 20 mg/l de 2,4-D con 5 mg/l de ANA resultó también adecuada. Las condiciones descriptas, favorecieron el desarrollo de "masas proembriogénicas" durante los primeros 30 días de cultivo, y a partir de éstas, la aparición de los embriones somáticos bipolares que pasaron por los diferentes estadios de diferenciación: globular, corazón y torpedo en los 30 días de subcultivo (Fig. 2).

El número de embriones por explanto obtenidos con la var. Bragg es relativamente escaso si se compara con los rendimientos informados por Liu *et al.*

**Tabla 3.** Efecto del ANA y 2,4-D sobre la producción media de embriones por explanto al cabo de 30 días de subcultivo. Las medias seguidas de \* difieren significativamente ( $p < 0,05$  s/Tukey) del resto de los tratamientos. Entre paréntesis se representa el desvío estándar.

2,4D mg/l	ANA mg/l				
	0	5	10	15	20
10	1,16 (0,16)	1,33 (0,22)	2 (0,24)	1,5 (0,23)	1,33 (0,28)
20	2 (0,3)	* 2,5 (0,23)	1 (0,21)	0,58 (0,13)	0,33 (0,14)
30	*3,3 (0,55)	1,16 (0,29)	1,66 (0,22)	1,5 (0,23)	1 (0,21)



**Fig. 2.** Embryones somáticos en dos estadios de desarrollo. (G) globular y (T) torpedo obtenidos en medio MS0 con 0 mg/l de ANA y 30 mg/l de 2,4-D



**Fig. 3.** Planta completa de soja var Bragg obtenida por embriogénesis somática a partir de cotiledones inmaduros

(1992) para los cultivares Fayette y J103. No obstante, otros trabajos (Komatsuda and Ohyama, 1988; Parrot *et al.*, 1988; Komatsuda, 1990; Komatsuda and Ko, 1990; Wright *et al.*, 1991) muestran resultados similares a los nuestros para otros cultivares y variedades, lo cual confirma nuevamente que la respuesta embriogénica *in vitro* es altamente dependiente del genotipo usado.

De los medios de regeneración ensayados sólo el R1, conteniendo bajas concentraciones de auxinas y citocininas, permitió la germinación de los embriones y la elongación del ápice del brote y raíces (Fig. 3), obteniéndose finalmente individuos vegetativos completos.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado con fondos provenientes del sistema de servicios a través de la Asociación Cooperadora del Campo Experimental, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.

## BIBLIOGRAFÍA

- Buchheim, J. A., S.M. Colburn and J.P. Ranch, 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89:768-775.
- Cieland, R., 1987. Auxin and cell elongation. In *Plant hormone and their role in plant growth and development*. Edited by P.J. Davies. Martinus Nijhoff Publications, Netherlands, pp 132-148.
- Davies, P. J., 1987. The plant hormone concept: transport, concentration and sensitivity. In *Plant hormone and their,role in plant growth and development*. Edited by P.J.Davies. Martinus Nijhoff Publications, Netherlands, pp. 12-22.
- Finer, J., 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean. *Plant Cell Reports* 7:238-241.
- Finer, J. and A. Nagasawa, 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max*.(L.) Merrill). *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 15:125-136.
- Gamborg, O L , R.A. Miller and K. Ojima, 1968. Plant cell cultures I. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean cell roots. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- George, E. and P. Sherrington, 1984. *Plant propagation by tissue culture Handbook and directory commercial operations*. Exegetics Ltd. Eversley Basingtoke.

- Komatsuda, T., 1990. Ability of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) genotypes to produce somatic embryos on a medium containing a low concentration of sucrose. *Japan. J. Breed.* 40:371-375.
- Komatsuda, T. and K. Ohyama, 1988. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max.* *Theor. Appl. Genet.* 75:695-700.
- Komatsuda, T. and S.W. Ko, 1990. Screening of soybean (*Glycine max.*(L.) Merrill) genotypes for somatic embryo production from immature embryo. *Japan. J. Breed.* 40:249-251.
- Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins, 1985. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.* 3:160-167.
- Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins, 1987 a. Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 10:197-208.
- Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins, 1987 b. Soybean somatic embryogenesis: Effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 10:209-220.
- Lippmann, B. and G. Lippmann, 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean (*Glycine max.*(L.) Merr.). *Plant Cell Rep.* 3: 215-218.
- Liu, W., P. Moore and G.B. Collins, 1992. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28p: 153-160.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Parrot, W.A., G. Dryden, S. Vogt, D.F. Hildebrand, G.B. Collins and G. Williams, 1988. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 817-828.
- Pierik, R.L.M., 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundiprensa, Madrid, pp. 109-115.
- Ranch, J.P., L.O. Oglesby and A.C. Zielinski, 1985. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21: 623-658.
- Ranch, J.P., L.O. Oglesby and A.C. Zielinski, 1986. Plant regeneration from tissue culture of soybean by somatic embryogenesis. *Plant Regeneration and Genetic Variability.* In *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol. 3. Edited by I.K. Vasil, Academic Press, N. Y., pp. 97-109.
- Rossi, R., R. Siciliano, A. Rojas y J. Quaine, 1992. Variedades. CREA-Soja. Cuaderno de actualización técnica N° 41, pp. 6-8.
- Shoemaker, R.C., L.A. Amberger, R.G. Palmer, L. Oglesby and J.P. Ranch, 1991. Effect of 2,4-diclorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max.*(L.) Merr.) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27: 84-88.
- Schussler, J.R., M.L. Brener and W.A. Burn, 1984. Concentrations of indole 3- acetic acid and abscisic acid in soybean seed during development. *Plant Physiol.* 76:951-954.
- Wright, M.S., K.L. Launis, R. Novitzky, J.H. Duesing and C.T. Harms, 1991. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean (*Glycine max.*(L.) Merrill). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27p: 153-157.