

Original

Efecto del estado de desarrollo de los cotiledones en la inducción de embriones somáticos de soya

Effect of the state of development of the cotyledons in the induction of soya somatic embryos

Dr.C. Jorge Pérez Pérez, Profesor Titular, Universidad de Granma, jperez@udg.co.cu, Cuba
Dr.C. Lourdes García Rodríguez, Investigador Titular, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba
Dr.C. Novisel Veitía Rodríguez, Investigador Titular, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba

Recibido: 24/11/2018 Aceptado: 21/12/2018

RESUMEN

La embriogénesis somática es una respuesta de la totipotencia celular en plantas que permite obtener plantas sin la intervención de los gametos. Este evento morfogénico ha sido descrito en diferentes especies vegetales, pero su respuesta ha sido limitada en diferentes genotipos de especies leguminosas como la soya. El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del estado de desarrollo de los cotiledones en la respuesta embriogénica en soya cultivar Incasoy-27. Se emplearon cotiledones inmaduros desde 2,0 hasta 6,0 mm de longitud, que fueron colocados en medio de cultivo de formación de embriones somáticos que contenía como regulador de crecimiento 40 mg.L^{-1} de 2,4-D durante 28 días. Se determinó el número de cotiledones con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos formados por cotiledón. Igualmente se realizaron cortes histológicos en cotiledones de 3,0 y 6,0 mm de longitud, cultivados durante seis días en presencia de 2,4-D. Como resultado se logró la formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros con diferencias significativas entre las diferentes longitudes evaluadas. Los cotiledones con 4,0 mm de longitud tuvieron la mayor proliferación de células embriogénicas (92,0 %) y la formación de alrededor de ocho embriones somáticos. Los análisis histológicos demostraron que el estado de desarrollo de los cotiledones y su composición celular, influyó en la respuesta embriogénica fundamentalmente en el lado adaxial de los cotiledones.

Palabras clave: *Glycinemax*; histología; regeneración; embriogénesis somática

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a response of cell totipotency in plants that allows plants to be obtained without the intervention of gametes. This morphogenetic event has been described in different plant species, but its response has been limited in different genotypes of legume species such as soybeans. The objective of the work was to evaluate the effect of the development status of cotyledons in the embryogenic response in soybean cultivar Incasoy-27. Immature cotyledons from 2.0 to 6.0 mm in length were used, which were placed in somatic embryo formation culture medium containing 40 mg.L⁻¹ of 2,4-D as a growth regulator for 28 days. The number of cotyledons with embryogenic response was determined and the number of somatic embryos formed by cotyledon. Histological sections were also performed on cotyledons of 3.0 and 6.0 mm in length, cultured for six days in the presence of 2,4-D. As a result, the formation of somatic embryos was obtained from immature cotyledons with significant differences between different lengths evaluated. Cotyledons with 4.0 mm length had the highest proliferation of embryogenic cells (92.0%) and the formation of about eight somatic embryos. Histological analyzes showed that the development status of the cotyledons and their cellular composition influenced the embryogenic response, fundamentally on the adaxial side of the cotyledons.

Keywords: Glycinemax; histology; regeneration; somaticembryogenesis.

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycinemax*L. Merrill) es considerada una de las principales leguminosas cultivadas, debido a su uso en la alimentación humana y animal, además de ser una importante fuente de producción de aceite vegetal a nivel mundial (Raza *et al.*, 2017).

Dada su importancia económica se han realizado esfuerzos para su mejora genética, pero los programas de hibridación clásica han sido limitados debido a que es un cultivo que se autopoliniza (Raza *et al.*, 2017). En tal sentido las técnicas de cultivo *invitro* de tejidos vegetales, proporcionan herramientas para la rápida propagación de plantas y el mejoramiento genético del cultivo (Damanik *et al.*, 2018).

En 1983 fue descrito la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en esta especie, considerado el método más eficiente de propagación *in vitro* (Pathak *et al.*, 2017). Este método

permite producir grandes cantidades de plantas, la conservación de germoplasma, la selección de individuos con caracteres deseables, la generación de variación somaclonal y el desarrollo de eventos de manipulación genética (Damaniket *al.*, 2018).

La ocurrencia de este proceso morfogenético, está asociado a la existencia de células competentes en el tejido vegetal, que pueden dar lugar a embriones somáticos en dependencia del estado fisiológico del tejido y factores genéticos (Fehér, 2015).

Hasta la fecha la regeneración de cultivares comerciales de soyaha sido lento e ineficiente, y solo es posible en un reducido número de genotiposde soya, por lo que es considerado genotipo-dependiente, con diferencias significativas entre estos en su capacidad de responder a las diferentes etapas de la embriogénesis somática (Huynhet *al.*, 2017; Pathaket *al.* 2017).

En tal sentido factores como el genotipo,la composición del medio de cultivo,los reguladores de crecimiento, tipo, tamaño y posición delexplante en el medio de cultivo,la edad del tejido entre otros, influyen en la regeneración *in vitro* de plantas de soya (Pérez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2013;Raza *et al.*, 2017; Damaniket *al.*, 2018).

Teniendo en cuenta que la selección del explante es un factor que determina la eficiencia en la embriogénesis somática en la mayoría de los experimentos de cultivo de tejidos (Pathaket *al.*, 2017), el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del estado de desarrollo de los cotiledones en la respuesta embriogénica de soya cultivar Incasoy-27.

Población y muestra

Para obtener plantas donantes, semillas maduras de soya cultivar 'Incasoy-27' fueron sembradas en bolsas de polietileno (26,0 x 36,0 cm) que contenían un sustrato compuesto por materia orgánica (75,0%) y zeolita (25,0%), cultivadas en condiciones de casa de cultivo. A partir de las plantas donantes, se tomaron legumbres con semillas inmaduras (Fig. 1).



Fig. 1. Obtención de plantas donantes con legumbres de soya cultivar 'Incasoy-27' a los 45 días de cultivo

Materiales y métodos

Para la desinfección, se procedió alavar las legumbres con agua corriente y detergente en cabina de flujo laminar. Luego fueron sumergidas en etanol al 70,0% durante un minuto, seguido de una segunda desinfección en 300 ml de hipoclorito de sodio al 2,0% con tres gotas de Tween-20 durante diez minutos. Al finalizar, se lavaron con abundante agua desionizada estéril.

Posteriormente se abrieron longitudinalmente las legumbres, se eliminó la testa de las semillas, ambos cotiledones fueron separados y se eliminó el eje embrionario (Fig. 2). Los cotiledones fueron clasificados según su longitud con una escala milimetrada acoplada al microscopio estereoscópico (Olympus, Japón) con objetivo 100x.

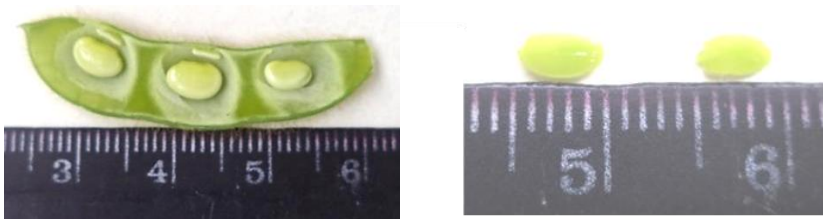


Fig. 2. Semillas y cotiledones inmaduros obtenidos a partir de plantas donantes de soya cultivar 'Incasoy-27'

Se establecieron cinco tratamientos según la longitud (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mm) de los cotiledones. En cada tratamiento se empleó diez frascos de cultivo de 250 ml de capacidad cada uno con diez cotiledones, en medio de cultivo con las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 2,4-D 40 mg.l⁻¹, sacarosa 3,0%, pH 7,0 y Gelrite® 0,3%.

Los explantes fueron cultivados en cámara de crecimiento con luz artificial, intensidad luminosa 5,0–10,0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y temperatura 24 \pm 1,0°C durante 28 días de cultivo.

Los cotiledones fueron colocados en el medio de cultivo con el lado adaxial hacia la superficie, mientras que el lado abaxial se mantuvo en contacto con el medio de cultivo (Fig. 3).

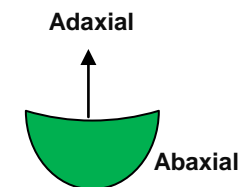


Fig. 3. Representación esquemática de la orientación de los cotiledones en el medio de cultivo

Para los análisis histológicos, se tomaron cotiledones inmaduros de 3,0 y 6,0 mm de longitud cultivados durante seis días en el medio de cultivo descrito previamente. Estos fueron colocados en una solución de fijación que contiene formaldehído al 37,0%, ácido acético glacial 100% y etanol 70,0%, en proporción 5:5:90 durante 24 horas. La deshidratación de las muestras se realizó mediante inmersión en un gradiente ascendente, que inició con etanol al 70,0% hasta llegar al etanol absoluto e inclusión en bloques de parafina (Kraus y Arduin, 1997).

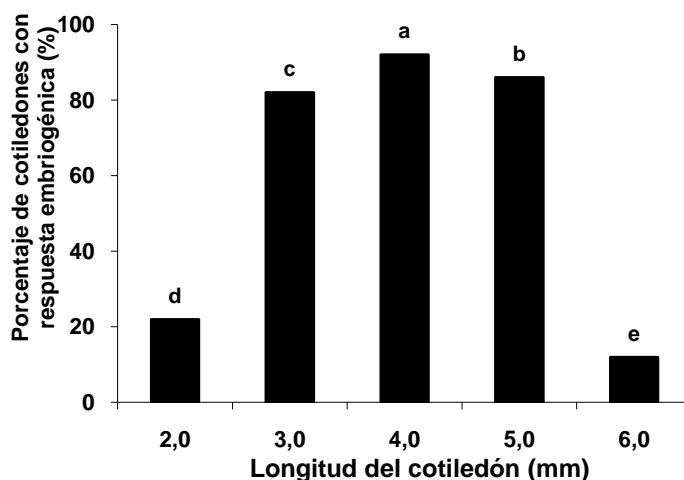
Se realizaron cortes longitudinales de 10,0 μm de espesor con un micrótopo rotatorio (Heidelberg, HM320, Alemania); fijado en portaobjetos y teñido con safranina al 0,5%. Las imágenes de las secciones histológicas fueron tomadas con una cámara digital acoplada a un microscopio óptico.

Se utilizó un diseño completamente al azar dadas las condiciones de homogeneidad en que se realizó la investigación. Para analizar los valores del número de cotiledones con respuesta embriogénica y el número de embriones somáticos formados por cotiledón, se empleó la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* las diferencias entre los tratamientos fueron determinadas mediante la prueba de *Mann Whitney*. Se empleó el programa estadístico SPSS versión PASW Statistics 18, con un valor de significancia de $p < 0,05$.

Análisis de los resultados

Se evidenció que la longitud del cotiledón, influyó en la formación de embriones somáticos en soya cultivar 'Incasoy-27'. En cotiledones de 3,0 a 5,0 mm de longitud, se encontró los mayores porcentajes de formación de embriones somáticos, pero más del 90,0% de la respuesta embriogénica ocurrió en 4,0 mm de longitud, con diferencias significativas con respecto a todos los tratamientos analizados (Fig.4).

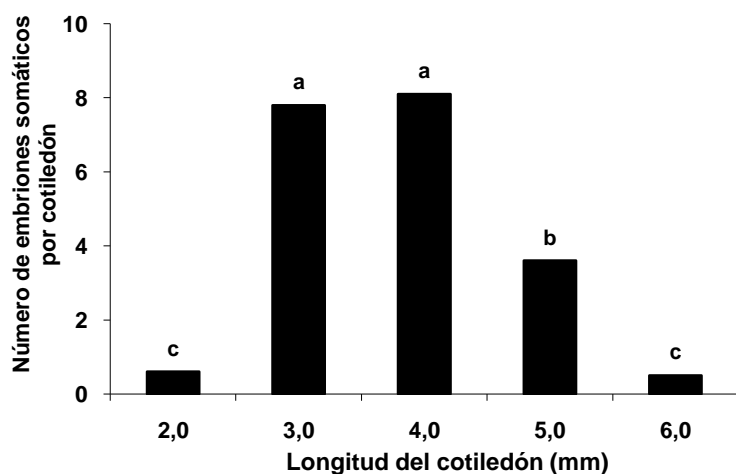
En las longitudes de 3,0 y 5,0 mm, se lograron valores de 80,0 y 85,0% respectivamente, de cotiledones con formación de embriones somáticos, con diferencias significativas entre estos tratamientos. Los porcentajes más bajos en la respuesta embriogénica se registraron en los cotiledones con 2,0 y 6,0 mm de longitud, con diferencias significativas entre ambas. En estas dos últimas longitudes, los mayores porcentajes se lograron en cotiledones de 2,0 mm (Fig. 4).



Barras con letras desiguales difieren según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, $p < 0,05$ ($n = 100$)

Fig. 4. Efecto de la longitud del cotiledón en el porcentaje de cotiledones con respuesta embriogénica en soya cultivar Incasoy-27 a los 28 días de cultivo

El mayor número de embriones somáticos se logró en los cotiledones de 3,0 y 4,0 mm de longitud, y difirió significativamente del resto de los tratamientos. Es de destacar que en estos explantes, se formaron como media alrededor de ocho embriones somáticos por cotiledón. Estas diferencias en la respuesta embriogénica, pudieran estar determinadas por el estadio de desarrollo fisiológico de los cotiledones (Fig. 5).



Embriones somáticos



Cotiledón

Barras con letras desiguales difieren según la prueba de Kruskal-Wallis / Mann-Whitney, $p < 0,05$ ($n = 100$)

Fig. 5. Efecto de la longitud del cotiledón en la formación de embriones somáticos en soya cultivar Incasoy-27 a los 28 días de cultivo

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Huynhet *al.* (2017), quienes al analizar 22 genotipos de soya, observaron la mayor respuesta de cotiledones embriogénicos en el cultivar Bragg (91,11%), mientras que la menor formación fue notada en Pusa 20 (28,33%), en

todos los casos con empleo de cotiledones de 4,0 mm de longitud y cultivados en medio de cultivo con 40 mg.l^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Se plantea que con el aumento del grado de madurez de la semilla, disminuye la actividad mitótica y por consiguiente su potencial embriogénico, debido a la diferenciación celular de los cotiledones y la acumulación de sustancias de reserva. Esto explica como el potencial embriogénico, es inversamente proporcional al estado fisiológico de los cotiledones (Borisjuk et al., 2003; Nishizawa e Ishimoto, 2009).

En este sentido, Yang *et al.* (2009) obtuvieron respuesta embriogénica en los cultivares chinos de soya N25281, N25263 y N06499 al emplear cotiledones inmaduros con 4,0 a 8,0 mm de longitud. Sin embargo, en este estudio se observó una reducida formación de embriones somáticos en cotiledones de 6,0 mm de longitud.

Por su parte, Huynh *et al.* (2017) obtuvieron la mayor respuesta en el genotipo Bragg, con 38,40 embriones somáticos por cotiledón de 3,0-4,0 mm de longitud; mientras que la menor formación ocurrió en el genotipo Pusa 37 con aproximadamente dos embriones somáticos por cotiledón, al emplear una intensidad luminosa de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y subcultivo cada 15 días durante seis semanas de cultivo. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo en el cual se obtuvieron alrededor de ocho embriones somáticos, bajo condiciones de cultivo diferentes con luminosidad de $5-10 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y sin subcultivo en un periodo de cuatro semanas.

Por otro lado, al realizar cortes histológicos en cotiledones de 4,0 y 6,0 mm de longitud, cultivados durante seis días en el medio de cultivo de inducción de embriones somáticos, se observó que diferían en su composición celular, con mayor actividad mitótica y formación de embriones somáticos en el meristemo adaxial (Fig.6A).

En tanto, los cotiledones con 6,0 mm de longitud tenían una menor actividad mitótica en ambos meristemos, debido a que estaban constituidos por células parenquimáticas altamente vacuoladas. Estas características pueden ser una de las causas de la baja formación de embriones somáticos en cotiledones con esta longitud (Fig.6B).

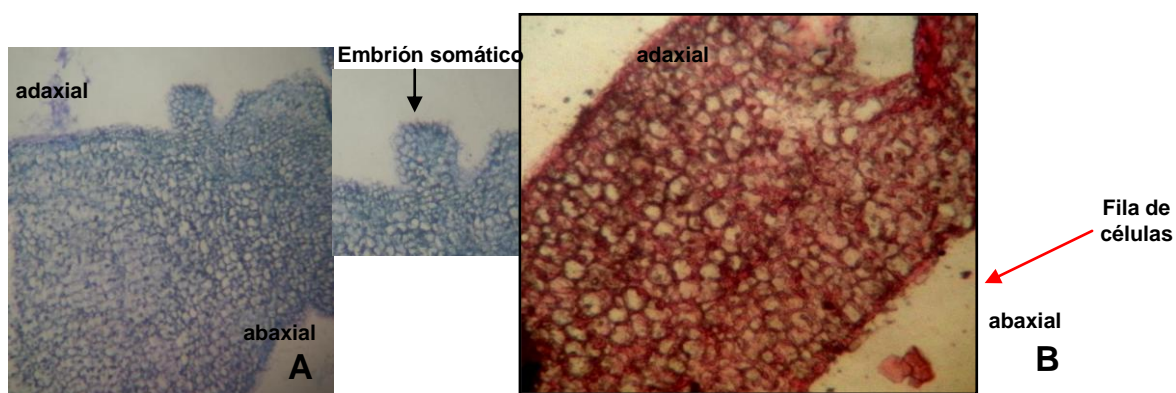


Fig. 6. Composición celular en cotiledones de soya cultivar Incasoy-27 con diferentes grados de madurez a los seis días en medio de cultivo de formación de embriones somáticos. (A) Corte histológico en cotiledón con 3,0 mm de longitud y formación de embrión somático, teñido con *Fastgreen* 0,5%. (B) Corte histológico en cotiledón con 6,0 mm de longitud, teñido con safranina 0,5%. (AD) meristemo adaxial; (AB) meristemo abaxial(400x)

Al respecto un análisis histológico del desarrollo anatómico en cotiledones inmaduros de soya cultivar americano Mitchell con 3,0 y 6,0 mm de longitud, reveló la existencia de diferentes tipos de células en la epidermis abaxial y adaxial (Hepheret *al.*, 1988).

De acuerdo con estos autores, la diferencia fundamental en la respuesta embriogénica entre la epidermis abaxial y adaxial está dado por el estado fisiológico del tejido, y agregaron que el potencial embriogénico de la epidermis abaxial pudiera estar asociado con su rol en la transferencia de nutrientes desde el endospermo al cotiledón en desarrollo.

Esto demuestra que durante las etapas tempranas del desarrollo de los cotiledones, ocurren cambios morfológicos en el tejido y la existencia de células indiferenciadas con mayor potencial embriogénico.

En la presente investigación, se encontró cotiledones que no formaron embriones somáticos y otros con una amplia variabilidad en el número de embriones somáticos formados. Esto demuestra que la respuesta embriogénica está determinada por el estado fisiológico de la célula y condicionado por diversos factores de estrés.

CONCLUSIONES

1. Se logró la formación de embriones somáticos en cotiledones inmaduros de soya cultivar 'Incasoy-27'.
2. El 92,0 % de los cotiledones de 4,0 mm de longitud mostraron respuesta embriogénica con una media de ocho embriones somáticos.
3. Se corroboró mediante análisis histológico, que el estado de desarrollo de los cotiledones influyó en la respuesta embriogénica, influenciada por su longitud y composición celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Wobus, U. y Weber, H. (2003). Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 503-512. DOI:10.1093/jxb/erg051.
- Damanik, R.I., Manurung, B.H. y Bayu, E.S. (2018). Effects of hypoxia condition in embryogenic callus growth of soybean cell culture. IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, 122, 012056. doi :10.1088/1755-1315/122/1/012056.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(4):385-402. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.07.005.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (1968). Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- Hepher, A., Boulter, M.E., Harris, N. y Nelson, R.S. (1988). Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.). *Annals of Botany*, 62(5):513-519.
- Huynh, H.N., Singh, S.K., Talukdar, S.K. y Vinod, A. (2017). Screening of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes for somatic embryogenesis and plant regeneration potential. *Indian J. Genet.*, 77(3): 387-393 (2017) DOI: 10.5958/0975-6906.2017.00052.9
- Kraus, J.E., y Arduin, M. (1997). Manual básico de métodos em morfología vegetal. 25 p. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Brasil.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
- Nishizawa, K. y Shimoto, M. (2009). Maturation of somatic embryos a model for soybean seed development. *Plant Biotechnology*, 26(5):543-550. DOI: 10.1007/s12298-009-9054-3

1. Pathak,N.,Tiwari, S. y Mishra, M.K.(2017). Regeneration of plantlets from immature explants culture in *Glycine max* (L.) Merrill. *LegumeResearch*,40(1):69-73.
2. Pérez, J.L., Blanco, T.S.,García, L.,Veitía,N.,Bermúdez, I., Collado, R.,Torres, D. y Romero, C. (2012). Influencia del tipo e intensidad de luz en la formación y multiplicación de embriones somáticos de soya. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2):139-146.
3. Pérez, J.L., García, L., Veitía, N., Bermúdez,I.yCollado, R.(2013). Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la respuesta embriogénica de soya cv. IS-27. *CultivosTropicales*, 34(3):40-44.
4. Raza, G., Sing,M.B.yBhalla,P.L. (2017).In vitroplant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International*, volume 17,Article ID7379693, 9 pages. DOI: 10.11.1155/2017/7379693.
5. Yang, C., Zhao, T., Yu, D. yGai, J.(2009).Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)-impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45(2):180-188.