



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Regeneración *in vitro* a partir de semilla madura en la variedad de soya (*Glycine max* (L). Merrill) soyica P34

Diana Constanza Gómez Gutiérrez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2014

Regeneración *in vitro* a partir de semilla madura en la variedad de soya (*Glycine max* (L). Merrill) soyica P34

Diana Constanza Gómez Gutiérrez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Biología

Director:

Alejandro Chaparro Giraldo. Ph.D.

Línea de Investigación:

Genética

Grupo de Investigación:

Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2014

*A Dios y a mi familia, sin su invaluable fuerza
esto no hubiera sido posible*

*“Lo escuché y lo olvidé, lo vi y lo entendí, lo hice y lo aprendí”
Confucio*

Agradecimientos

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones y personas que aportaron de diferentes maneras para que este proyecto fuera una realidad:

A la Universidad Nacional de Colombia sedes Palmira y Bogotá, por abrirme sus puertas en este programa, y por el apoyo financiero e institucional.

A la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas - FENALCE por su confianza e importante apoyo financiero.

Al Grupo de investigación Ingeniería Genética de Plantas y su Director el Dr. Alejandro Chaparro Giraldo, por su confianza y dirección del proyecto.

A los profesores Luis Alberto López, Pedro Nel Pacheco y a los estudiantes Ruth Leidy Araque M, María Fernanda Osorio y Luis Felipe Santos del Departamento de Estadística de la Universidad Nacional del programa de Asesoría en Estadística, por su acompañamiento en el planteamiento y manejo de los datos.

A las empresas Panorama y Semillas Kamerun y a las señoras Beatriz y Luz Estella Giraldo por el suministro y envío de la semilla desde Cartago – Valle.

Al Dr. Xavier Marquínez, (Departamento de Biología) por facilitarnos el Laboratorio de Histología.

A mis padres Julio y Amparo, hermanos César y Marcela y mi sobrinito Tomás, por su apoyo y confianza durante el desarrollo de este proceso, sin su infinito amor esto no hubiera sido posible.

Gracias a Andrés, por ser mí cómplice y compañero durante todo este proceso y por tu invaluable apoyo.

A mis amigos y compañeros: Lilian Matallana, Cristina Lozano, Daniela Portela, Jenny Jiménez, Leidy Ávila, Lizeth Tabima, Dr. Alejandro López por su incondicional amistad, compañía y apoyo. A Iván un especial agradecimiento por sus invaluable y oportunas sugerencias y soporte.

Resumen

Se desarrolló un sistema de caulogénesis *in vitro* para la variedad de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) soyica P34. Durante la primera fase del proyecto se estableció un protocolo de desinfección óptimo. Semillas maduras fueron tratadas con una solución al 2% (v/v) de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 15 minutos. El protocolo mostro una eficiencia de desinfección del 86% y una tasa de germinación del 68% en el cual todas las semillas no contaminadas se desarrollaron normalmente. La fase de propagación clonal consistió en la inducción y regeneración directa de brotes múltiples a partir de nudos cotiledonares de semillas germinadas en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) y 3 mg de BAP durante 12 días. En la etapa final se evaluaron el crecimiento y desarrollo de hojas y raíces a partir de los brotes obtenidos durante la etapa de propagación sin la adición de ningún regulador de crecimiento.

Palabras clave: *Glycine max*, Regeneración *in vitro*, Bencilaminopurina, Ácido indolbutírico

Abstract

System for *in vitro* regeneration variety of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Soyica P34 was developed. First established a system of mature seed disinfection with various concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) where 2% of concentration for 15 minutes allowed the lowest contamination with 12% and 68% of non-contaminated sprouts. A regeneration system was established by inducing multiple shoots from cotyledonary node of mature seed, where it was found that the effect of BAP was sufficient for induction and the best treatment was 3 mg / L. The shoots obtained are evaluated for the development and were found to develop leaves and roots in culture medium without growth regulators.

Keywords: *Glycine max*, Regeneration *in vitro*, Benzylaminopurine, Indolebutyric acid.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XII
Lista de gráficas.....	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Objetivos.....	5
1.1 Objetivo general	5
1.2 Objetivos específicos	5
2. Marco teórico	7
2.1 Morfogénesis del brote vegetativo	7
2.1.1 Zona inicial	7
2.1.2 Zona de organogénesis.....	8
2.2 Cultivo de tejidos vegetales	9
2.2.1 Explante y desinfección.....	9
2.2.2 Organogénesis	10
2.2.3 Reguladores de crecimiento vegetal	12
2.3 Generalidades del cultivo de la soya	15
2.3.1 Taxonomía, origen y distribución	15
2.3.2 Morfología	16
2.3.3 El cultivo en Colombia.....	20
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de la soya	22
2.4.1 Embriogénesis somática	22
2.4.2 Caulogénesis.....	23
3. Materiales y métodos	29
3.1 Localización	29
3.2 Material vegetal.....	29
3.3 Agentes desinfectantes.....	29
3.4 Medios de cultivo	30
3.4.1 Medio de germinación (MG).....	31
3.4.2 Medio de Inducción de brotes (MIB)	31

3.5	Establecimiento del sistema de desinfección superficial y su efecto sobre la germinación de la semilla de soya.....	31
3.5.1	Prueba de germinación	31
3.5.2	Tratamientos de desinfección	32
3.6	Inducción de caulogénesis.....	34
3.7	Estudio histológico	36
4.	Resultados y discusión.....	39
4.1	Establecimiento del sistema de desinfección superficial y su efecto sobre la germinación de la semilla de soya.....	39
4.1.1	Prueba de germinación	39
4.1.2	Tratamientos de desinfección	40
4.2	Inducción de brotes múltiples	45
4.3	Estudio histológico	52
4.4	Desarrollo de los brotes	53
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	57
5.1	Conclusiones	57
5.2	Recomendaciones	58
A.	Anexo: Protocolo de histotecnica.....	59
	Bibliografía	61

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1. Estructura de un meristemo apical de tabaco	8
Figura 2-2. Estructura química del AIA e IBA	13
Figura 2-3. Efecto de auxinas y citoquininas en la inducción de organogénesis	15
Figura 2-4. Estructura de la semilla de soya.....	18
Figura 2-5. Germinación y estructuras de la planta de soya.....	18
Figura 3-1. Procedimiento de desinfección de semillas de soya.....	33
Figura 3-2. Esquema del explante compuesto por el nudo cotiledonar.....	35
Figura 3-3. Disección de la semilla de soya para la preparación del nudo cotiledonar.....	35
Figura 3-4. Brotes múltiples elongados de soya.....	36
Figura 4-1. Semilla de soya P34 germinada en agua.....	39
Figura 4-2: Semillas de soya P34 germinadas <i>in vitro</i> luego del proceso de desinfección.....	44
Figura 4-3. Explantes de soya con brotes elongados en el tratamiento T0.....	47
Figura 4-4. Explantes de soya con desarrollo de brotes múltiples en los tratamientos con BAP.....	48
Figura 4-5. Explantes de soya con desarrollo de brotes múltiples en los tratamientos con BAP más IBA.....	49
Figura 4-6. Cortes histológicos de las zonas meristemáticas de semillas en MIB.....	53
Figura 4-7. Estados de desarrollo de los brotes.....	55

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Clasificación taxonómica de la soya (<i>Glycine max</i> (L). Merrill).....	15
Tabla 3-1. Composición del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog).....	30
Tabla 3-2. Tratamientos de desinfección de semilla de soya.....	32
Tabla 3-3. Tratamientos para inducción de brotes múltiples.....	34
Tabla 4-1. Estados de desarrollo de los brotes subcultivados en medio MS sin reguladores.....	54

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 4-1. Efecto de los tratamientos de desinfección en semilla de soya.....	41
Gráfica 4-2. Porcentaje de explantes de soya que responden a la inducción de brotes.....	46
Gráfica 4-3. Promedio del número de brotes por cada explante de soya y por tratamiento.....	46
Gráfica 4-4. Plano factorial para el desarrollo de las plántulas de soya obtenidas a partir de brotes.....	56

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>t</i>	Tonelada	1 t	10 ³ Kg
<i>Kg</i>	Kilogramo	1 Kg	1.000 g
<i>ha</i>	Hectárea	1 ha	10.000 m ²

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>BAP</i>	6-benzil amino purina
<i>IBA</i>	Ácido indol-3-butírico
<i>ICA</i>	Instituto Colombiano Agropecuario
<i>KIN</i>	Kinetina
<i>MG</i>	Medio de Germinación
<i>MIB</i>	Medio de Inducción de Brotes
<i>NaClO</i>	Hipoclorito de Sodio
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>RCV</i>	Reguladores de Crecimiento Vegetal
<i>TDZ</i>	Tidiazuron

Introducción

La soya (*Glycine max* (L). Merrill) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y es reconocido como la mayor fuente de alimento rico en proteína. Es la dicotiledónea con más área sembrada en el mundo. La soya es una planta autógama y la variación genética entre las variedades es muy estrecha haciendo difícil su mejoramiento genético. La comunidad científica involucrada con este cultivo logró con éxito en tiempo record el secuenciamiento de su genoma en el año 2010 (Schmutz et al., 2010).

Una de las estrategias utilizadas para la introducción de características genéticas agronómicas de interés como resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas es mediante la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, sin embargo el uso de esta herramienta de mejoramiento genético requiere del establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro*, el cual depende de la fuente del explante y del genotipo. (Meurer et al., 2001) (Sairam et al., 2003).

Los reportes para la regeneración *in vitro* de diferentes genotipos de soya se basan en la regeneración de plántulas a partir de diversos tipos de explantes, epicótilo (Wright, Williams, Pierson, & Carnes, 1987), epicótilos y hojas primarias (Rajasekaran & Pellow, 1997), anteras (Rodrigues, Oliveira, Mariath, & Helena, 2005) y ápice caulinar de embriones inmaduros (Loganathan et al., 2010).

La inducción de brotes incluye el uso de dos sistemas ampliamente utilizados en cultivo de tejidos vegetales estos son caulogénesis indirecta (Phillips & Collins, 1981); (Lazzeri, Hildebrand, & Collins, 1985); (Wright et al., 1987) y (Finer & Nagasawa, 1988) y caulogénesis de brotes (Kaneda et al., 1997); (Shan, Raemakers, Tzitzikas, Ma, & Visser, 2005); (Ma & Wu, 2007); (Radhakrishnan,

Ramachandran, & Ranjitha Kumari, 2009),. En ambos sistemas el objetivo principal es aumentar el número, frecuencia y viabilidad de nuevos brotes y disminuir el tiempo del proceso para que sea viable su uso en programas de biotecnología. En los sistemas de transformación genética la regeneración para obtención de plantas modificadas se hace a partir de semillas inmaduras para la inducción de callos o vía caulogénesis directa a partir de nudos cotiledonares de semillas maduras (Christou, y otros, 1989; Finer y McMullen, 1991; citados por Shan et al., 2005).

La caulogénesis de brotes a partir del nudo cotiledonar como sistema de regeneración para transformación genética reporta resultados satisfactorios relacionados con el tiempo empleado y el éxito en la regeneración de plántulas en diferentes genotipos. Dichas características la hacen la estrategia inicial más recomendada para evaluar genotipos nuevos *in vitro* de soya (Kaneda et al., 1997), (Olhoft, Flagel, Donovan, & Somers, 2003), (Shan et al., 2005), (Ma & Wu, 2007), (Radhakrishnan et al., 2009).

La caulogénesis directa a partir del nudo cotiledonar de semilla madura de soya requiere el uso de diferentes reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas. Hinchee, y otros, (1988), fueron pioneros de la transformación genética de soya a partir del nudo cotiledonar. Su sistema de organogénesis se basó en la utilización de los reguladores de crecimiento 6-benzil amino purina (BAP, por su siglas en inglés) combinado con el ácido indol 3-butírico (IBA, por su sigla es inglés). Otros investigadores lograron la propagación a partir de múltiples brotes empleando thidiazuron (TDZ) y BAP (Kaneda et al., 1997), (Shan et al., 2005), (Ma & Wu, 2007) , evaluaron el efecto combinado de BAP, IBA y kinetina (KIN) demostraron que cada regulador tiene un efecto sobre la inducción de brotes, siendo el efecto del BAP el más significativo.

En términos de eficiencia, el empleo de semillas maduras para la regeneración directa de plántulas de soya, está bien documentado, por esta razón se eligió este

tipo de explante para la propagación de la variedad de soya P34. Adicionalmente, el empleo de ésta variedad presentaba otras ventajas como su fácil adquisición, manipulación y conservación; ya que trabajar con semilla inmadura involucra garantizar condiciones biológicas estrictas a las cuales es difícil acceder ya que requieren de infraestructura y control adecuados, lo cual no ocurre con la semilla madura ya que esta puede adquirirse a empresas productoras de semilla certificada.

Durante la fase de desinfección de semillas maduras se evaluaron diferentes concentraciones de NaClO. Las semillas se germinaron en medio MS durante un periodo de siete días. Las semillas no contaminadas que se desarrollaron completamente se usaron durante la etapa de inducción de caulogénesis directa. Luego de la apertura y extensión de los cotiledones, se aislaron los nudos cotiledonares y se cultivaron en diferentes medios para la inducción de nuevos brotes. Durante esta etapa se probaron diferentes combinaciones de BAP e IBA y se evaluó la inducción, producción y viabilidad de los brotes.

En Colombia el cultivo de la soya toma importancia ya que la producción nacional de soya es insuficiente para la demanda interna del mercado. En el año 2013 la producción interna de frijol de soya fue de 107.316 t, durante este mismo período se importaron 360.624 t de frijol y 1.048.949 t de torta de soya que es un subproducto de la obtención del aceite que se utiliza como materia prima en la producción de alimentos concentrados para animales (Fenalce, 2011).

La soya es un constituyente esencial en la elaboración de concentrados balanceados para la alimentación animal, en especial para las cadenas avícola y porcícola; adicionalmente es una excelente alternativa para la rotación de cultivos en el trópico colombiano. Sin embargo, la producción nacional de este grano no alcanza a suplir el 10% de la demanda nacional que supera las 900.000 t anuales.

Es importante para el país el establecimiento de programas de mejoramiento que permitan aumentar la competitividad agrícola del país. Por tanto, este trabajo es un aporte al desarrollo de un sistema de regeneración *in vitro* de una variedad adaptada a las condiciones ambientales del país que servirá de base para el establecimiento de estrategias biotecnológicas para la mejora de este cultivo en Colombia.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema de regeneración *in vitro* a partir de semilla madura de soya (*Glycine max* (L). Merrill) de la variedad P34 por organogénesis directa.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer un sistema de desinfección superficial y germinación de semillas de soya para su introducción a condiciones de cultivo *in vitro*.
- Evaluar la eficiencia del uso de BAP e IBA en la formación y desarrollo de brotes múltiples a partir del nudo cotiledonar de semilla madura.

2. Marco teórico

2.1 Morfogénesis del brote vegetativo

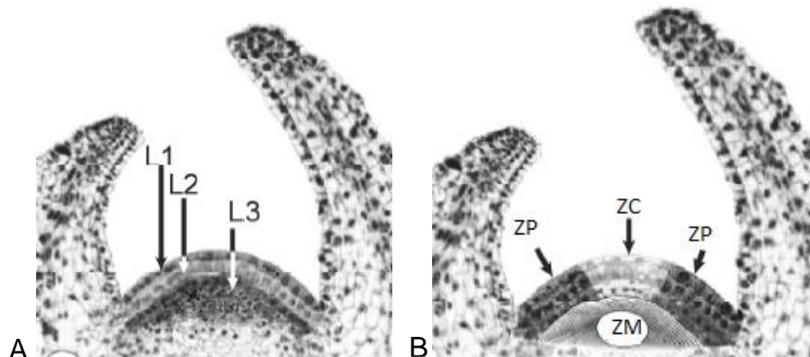
2.1.1 Zona inicial

A diferencia de los animales, las plantas continúan la generación de nuevos órganos y tejidos luego de su desarrollo postembrionario. Este proceso se logra a través de la actividad de áreas específicas que se forman durante la embriogénesis en los dos polos de los embriones en desarrollo y que tienen la capacidad de renovarse así mismos, estos son los meristemos primarios que dan origen a los meristemos axilares en donde tiene lugar la formación de brotes y raíces. Estos adhieren permanentemente nuevos órganos al cuerpo de la planta y generan toda la progenie de células que son necesarias para la diferenciación de órganos y tejidos.

El cuerpo adulto de las plantas vasculares es el resultado de la actividad de los meristemos. Estos son centros de división celular mitótica y se componen de grupos de células indiferenciadas que se autorenewan y dan origen a los órganos y tejidos de las plantas. El meristemo apical de brotes inicia la formación de hojas durante el desarrollo vegetativo y de inflorescencias y flores durante el desarrollo reproductivo. El meristemo apical de brotes es una estructura altamente organizada dividida en capas de células y zonas con diferentes funciones. La disposición de las capas se mantiene por divisiones predominantemente anticlinales. En la mayoría de las dicotiledóneas el meristemo se compone de tres linajes de células llamadas capas histogénicas: la túnica compuesta de dos capas de células externas que rodean el corpus el cual se

compone de una o más capas de células que se divide en varias direcciones y produce la masa principal del meristemo apical (Fig. 2-1). Se distinguen además tres zonas: la zona central que corresponde a la más superior y se compone de células indiferenciadas que se dividen con poca frecuencia; la zona periférica, que rodea a la zona central y tiene más alta tasa de división celular, estas células contribuyen a la formación de órganos; por debajo de la zona central está la región medular, en donde las células se dividen rápidamente y dan lugar al tallo de la planta (De Lozano, N., Barrera, E, & Marquínez, X, 2006), (George, Hall, & De Klerk, 2008).

Figura 2.1. Estructura de un meristemo apical de tabaco. A. Capas histogénicas: L1-L3; B. Estructura del meristemo: ZC: zona central; ZP: zona periférica; ZM: zona medular.



Los primordios foliares se originan mediante divisiones periclinales de un pequeño grupo de células situadas en la periferia del meristemo apical, de yemas terminales o axilares, su formación continua y crecimiento hacen que el ápice vegetativo cambie constantemente de forma (De Lozano, N., Barrera, E, & Marquínez, X, 2006).

2.1.2 Zona de organogénesis

Compuesta por la protodermis, meristema fundamental y procambium, donde predominan las divisiones anticlinales y aparecen los espacios intercelulares

esquizogénicos en procortex y promédula. En la zona del cilindro meristemático remanente se producen divisiones longitudinales determinantes de la formación de células largas del procámbium, que darán origen a las trazas foliares. Los entrenudos se forman por divisiones celulares en la base de los lugares donde se insertan las hojas. Inicialmente las células se dividen a lo largo del entrenudo joven, lo que ocasiona la separación de las hojas y la aparición de los entrenudos.

2.2 Cultivo de tejidos vegetales

2.2.1 Explante y desinfección

En cultivo de tejidos vegetales se llama explante a la parte de un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pecíolo, etc.) u órgano pequeño de una planta, que se usa para la inducción de callogénesis u organogénesis con el fin de propagar una planta. Se tienen en cuenta tres factores para la selección del explante, estos son, el tipo de procedimiento que se vaya a trabajar, resultado esperado y la planta madre de la cual se va a tomar el tejido. La selección de las plantas madres en cuanto a su sanidad son un criterio clave en la propagación *in vitro*. Esto puede ser un factor limitante que puede determinar el éxito o fracaso del establecimiento de un proceso de cultivo *in vitro*. Un aspecto que se debe tener en cuenta es la procedencia de las plantas madres, ya que cuando es de un ambiente externo estas presentan sobre su superficie una gran variedad de microorganismos. Para su cultivo *in vitro* se debe hacer previamente una desinfección con agentes desinfectantes y así poder iniciar su establecimiento bajo condiciones asépticas.

Los procedimientos que se utilizan para la desinfección del explante deben eliminar los microorganismos de la superficie y causar el mínimo daño al tejido. Entre los compuestos más comúnmente utilizados está el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO) y el etanol antiséptico. Adicionalmente se recomienda el uso de tensoactivos como el Tween 20, que ayuda a romper la

tensión superficial y mejorar la adsorción de los desinfectantes al tejido vegetal. El uso de antibióticos también se puede utilizar, sin embargo se recomienda como última alternativa ya que pueden influir negativamente sobre otros procesos del cultivo. (Abdelnour, E & Escalant, 1994). En la mayoría de los casos, los protocolos de desinfección son particulares para cada tipo de explante y se hace necesario establecer el sistema más adecuado de acuerdo al objetivo de la investigación. Hay que evaluar entre otros factores el tipo de desinfectantes, las concentraciones y tiempo de aplicación y su efecto sobre el desarrollo de los tejidos tratados.

2.2.2 Organogénesis

En cultivo *in vitro* cuando un órgano o parte de un tejido (explante) o un tejido desorganizado inducido previamente son puestos en un medio de cultivo y estos son capaces de generar *de novo* la formación de un tejido u órgano, es decir la creación de nueva forma y organización a partir de tejidos organizados o no organizados, se da un proceso de morfogénesis u organogénesis. La formación de brotes por organogénesis se conoce como caulogénesis y de raíz como rizogénesis (George et al., 2008).

El crecimiento organizado se refiere al cultivo que se inicia con una parte organizada de la planta (ápices, hojas, brotes, semillas, etc.) y esa parte u órgano sigue creciendo *in vitro* manteniendo sus características estructurales. Se da igualmente cuando se desarrolla una estructura a partir de un tejido desorganizado. El crecimiento desorganizado se caracteriza por que a partir de un explante se produce un tejido sin estructura específica llamada callo, este puede crecer con subcultivos y ser mantenido en medio sólido o líquido por meses o años (Abdelnour E & Escalant, 1994).

El desarrollo vegetal y la organogénesis *in vitro* son altamente dependientes de las interacciones entre las sustancias del desarrollo (hormonas vegetales) y sus análogos los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo. Es necesario establecer unas condiciones de concentración de éstos de acuerdo a la especie o variedad que se va a cultivar, el tipo de explante y tipo de cultivo. Un balance entre reguladores de crecimiento del tipo auxina y citoquinina es necesario para la formación de brotes y raíces (Fakhrai & Fakhrai, 1990). Las plantas obtenidas mediante este sistema de reproducción asexual son consideradas como una extensión de la línea celular somática, ya que las características de la planta madre suelen perpetuarse durante las divisiones mitóticas por tanto los genes serán copias exactas es cada división. A este grupo de plantas obtenidas se les denomina clones (George et al., 2008).

La obtención de nuevas plantas a partir de células que normalmente no han participado en el proceso de regeneración, muestra que las células vegetales diferenciadas pueden expresar totipotencialidad, es decir, que cada una conserva una capacidad latente para producir una planta completa. Totipotencia es una característica especial de células de tejidos jóvenes y meristemas. Puede ser exhibida por algunas células diferenciadas, por ejemplo, células del cambium y células de la hoja de empalizada (George et al., 2008).

La propagación de plantas vía cultivo de tejidos vegetales puede hacerse mediante la inducción de formación de brotes a partir de un tejido no organizado o explantes de tejidos diferenciados. Debergh and Maene (1981), citado y adaptado por George et al., (2008), especifican las siguientes fases para la obtención de brotes múltiples, el cual se puede sugerir para la obtención a partir de semilla: *fase 0*: selección y preparación de las plantas madre; *fase I*: germinación aséptica de las semillas en un medio con altos contenidos de citoquininas; *fase II*: inducción y proliferación de múltiples brotes. Subcultivo de los brotes y *fase III*: separación de los propágulos con alta tasa de sobrevivencia como plantas individuales a condiciones externas.

En 1980 se descubrió la posibilidad de obtener múltiples brotes *in vitro* a partir de semilla, estas se esterilizaban y se ponían en un medio con citoquininas. Luego de la germinación de la semilla se presentaba el desarrollo de cluster de brotes múltiples axilares y/o adventicios. Este puede ser desarrollado en varias especies, especialmente en dicotiledóneas (George et al., 2008).

2.2.3 Reguladores de crecimiento vegetal

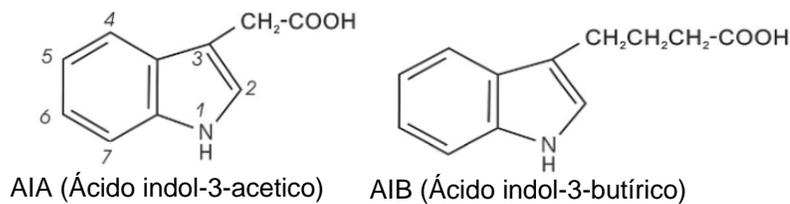
Son moléculas que ocurren de manera natural en las plantas, cumplen funciones reguladoras a nivel del crecimiento y desarrollo. Estos compuestos son generalmente activos en bajas concentraciones y se conocen como reguladores del crecimiento vegetal (RCV). También se pueden obtener mediante síntesis química moléculas con actividades fisiológicas similares (George et al., 2008). Se reconocen varias clases de estas sustancias: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Las auxinas y las citoquininas son las más importantes en la regulación del desarrollo y morfogénesis en cultivo de tejidos vegetales. Para estas se han descubierto reguladores sintéticos con actividad biológica igual o superior a su equivalente natural. No ocurre lo mismo para el caso de giberelinas y el ácido abscísico, en donde sólo existe la forma natural, aunque algunas giberelinas son extraídas de hongos y se consiguen como reguladores exógenos. Existen otros reguladores menos importantes que los anteriores, como los brasinosteroides, ácido jasmónico, oligosacarinas y sisteminas han sido bien caracterizados (George et al., 2008).

- Auxinas

Las auxinas son ampliamente utilizadas en cultivo de tejidos vegetales y generalmente forman parte integral del medio de cultivo. Estas promueven junto con las citoquininas el desarrollo de callos, suspensiones celulares y órganos y regulan la dirección de la morfogénesis. A nivel celular las auxinas controlan

procesos básicos como la elongación y diferenciación celular, están involucradas en la formación de meristemas dando lugar a tejidos desorganizados y de órganos. En los tejidos organizados las auxinas están involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad y en toda la planta su efecto más notable es el mantenimiento de la dominancia apical y mediación de los tropismos (George et al., 2008). Las auxinas naturales más comunes son el ácido indol-3-ácetico (AIA) y el IBA, su estructura química se muestra en la figura 2-2.

Figura 2-2. Estructura química del AIA e IBA.



Las auxinas con moléculas conjuntas son protectoras de la degradación oxidativa y pueden liberarse de nuevo a través de la acción de enzimas. Las auxinas naturales y sintéticas son de bajo peso molecular, sustancias orgánicas que contienen un anillo indol o aromático. Son cristalinas, ligeramente solubles en agua y muy solubles en solventes orgánicos, con excepción del AIA son muy estables y permanecen en el medio de cultivo (George et al., 2008). El metabolismo de los RCV consiste de biosíntesis que se da en mayor grado a nivel del meristemo y de órganos en rápido desarrollo, como hojas en crecimiento, yemas apicales, raíces, e inflorescencias en desarrollo. En la planta los mayores niveles de auxinas se concentran en los ápices y se distribuyen de manera basipétala (George et al., 2008).

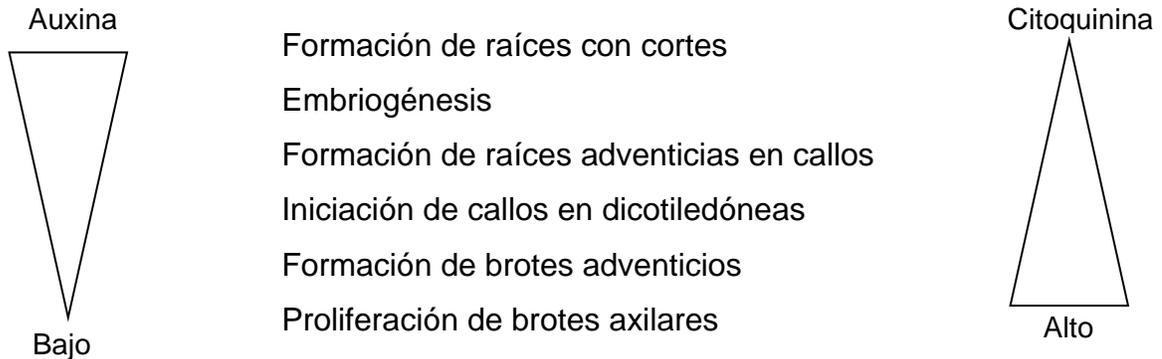
- Citoquininas

Las citoquininas naturalmente estimulan la biosíntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular. Su efecto en cultivo de tejidos es más notable

cuando se usa junto con una auxina, en donde estimulan la división celular y controlan la morfogénesis. La primera citoquinina descubierta fue la kinetina la cual se identificó como 6-furfuril aminopurina, posteriormente se adoptó el termino citoquinina a todos los compuestos con actividad similar (George et al., 2008).

Muchas citoquininas naturales relacionadas estructuralmente con la kinetina se han identificado, entre las utilizadas en cultivo de tejidos se encuentran transzeatina (4-hydroxy-3-metiltrans-2-butenilaminopurina), ZiP (N6- Δ 2-isopentiladenina), y dihidrozeatina (6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina). Las citoquininas aparecen como moléculas libres en toda la planta, pero también se encuentran en los t-RNA de citoplasma y del cloroplasto. En la planta parece ser que las raíces son el sitio de biosíntesis, pero también se producen en otros sitios que se encuentran en desarrollo (George et al., 2008). Aunque las citoquininas naturales se utilizan en investigación estas no pueden ser utilizadas rutinariamente en laboratorios por su alto costo. Afortunadamente varios análogos químicos han sido sintetizados a partir de la kinetina y son activamente funcionales como citoquininas. Algunos de estos análogos se han reportado más eficientes que la KIN como el BAP particularmente en la promoción de la morfogénesis (George et al., 2008).

Las citoquininas son extremadamente efectivas en la remoción de la dominancia apical, su uso se combina con pequeños cortes o pinchazos en el ápice de los brotes o sembrando los explantes en forma horizontal. Las interacciones entre los reguladores de crecimiento son complejas, en ocasiones más de una combinación es necesaria para la obtención de buenos resultados. La figura 2-3 muestra un esquema de las relativas cantidades de auxinas y citoquininas que son generalmente necesarias en la inducción de algún tipo de morfogénesis (Fakhrai & Fakhrai, 1990).

Figura 2-3: Efecto de auxinas y citoquininas en la inducción de organogénesis.

2.3 Generalidades del cultivo de la soya

2.3.1 Taxonomía, origen y distribución

La soya (*Glycine max* (L). Merrill) presenta la siguiente clasificación taxonómica (Tabla 2-1):

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de la soya (*G. max* (L). Merrill).

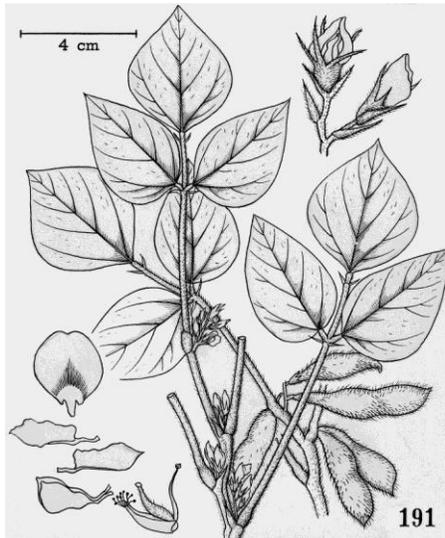
Rango	Nombre científico
Reino	Plantae - Planta
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyita
División	Magnolliophyta
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novak ex Takht
Superorden	Rosanae Takht
Orden	Fabales Bromhead
Familia	Fabaceae Lindl
Género	<i>Glycine</i> Willd
Especie	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.

<http://www.tropicos.org/Name/13043775>

La soya se originó en norte y centro de China y está considerado como uno de los cultivos más antiguos. Las evidencias históricas y geográficas sugieren que la soya fue domesticada primero en la mitad oriental de China ente los siglos 17 y

11 A.C. Fue considerada sagrada para los pueblos de oriente, pues desde el año 3000 ya formaba parte de la alimentación básica en estos pueblos. En la India se comenzó a utilizar a partir del año 1935 (<http://www.agrobiomexico.org.mx/>).

Los botánicos orientales crearon colecciones en China y Manchuria a finales del siglo XIX, de donde se distribuyeron semillas a Europa y Estados Unidos. Éste último la acepto lentamente y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos generó las primeras variedades en Norte América (García et al., 2006).



<http://www.tropicos.org/Image/833265>

La soya (*G. max* (L). Merrill) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y es reconocido como la mayor fuente económica de alimento rico en proteína. Es uno de los cultivos con más área sembrada en el mundo que cualquier otra dicotiledónea. Para el año 2012 se sembraron en el mundo 105 millones de hectáreas con una producción de 253 millones

de toneladas siendo los mayores productores Estados Unidos, Brasil, Argentina, India y China (FAO, 2012).

2.3.2 Morfología

La soya es una planta de ciclo corto y de porte herbáceo, normalmente pubescente, su altura es variable entre 25 – 150 cm. poco o muy ramificada (1 a 4) dependiendo de la variedad. El período vegetativo del cultivo es de 110 a 140 días y en Colombia se acostumbra rotarlo con maíz, algodón y sorgo.

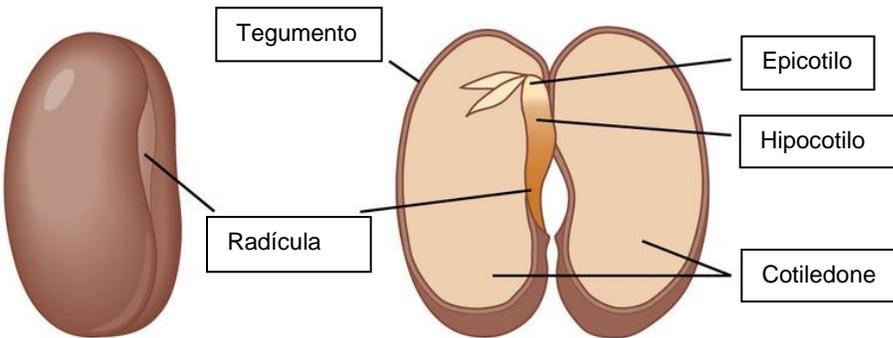
Dentro de sus características morfológicas, algunas son constantes y otras variables, por la interacción del ambiente con el genotipo. El tallo es rígido y

erecto (0,4 a 1,5 m), en su etapa inicial comprende el hipocótilo y el epicótilo, posteriormente se desarrolla el primer nudo de la hoja trifoliada. El número de brotes axilares sobre el tallo depende de la variedad y densidad de plantas. Generalmente se presentan dos tipos de crecimiento, determinado e indeterminado, en el primero el brote terminal se desarrolla en una inflorescencia que posteriormente da origen a un racimo de vainas, y en el segundo el tallo no termina en inflorescencia. El sistema radicular consiste de una raíz primaria que puede alcanzar una longitud de 100 cm y un gran número de raíces secundarias con pequeñas raíces. En las raíces pueden formarse nódulos de bacteria fijadoras de nitrógeno.

Se presentan diferentes tipos de hojas: el primer par de cotiledones simples, el segundo par de hojas primarias, simples, opuestas y ovaladas y las trifoliadas alternas, ovaladas o lanceoladas, raramente con 5 trifolios. Las yemas axilares dan origen a ramas o racimos de flores. Las flores son de color blanco, púrpura o combinado. La flor tiene un cáliz tubular y una corola zigomorfa de cinco pétalos (un pétalo grande o “estandarte”, dos pétalos laterales y dos delanteros denominados “quilla”). La flor presenta un ovario con 2 a 5 óvulos, diez estambres (nueve soldados y uno libre) y un pistilo. Por ser una flor completa la soya se autofecunda, aunque puede haber un 0.5% de polinización cruzada (García et al., 2006).

La semilla consta de un embrión protegido por una cubierta seminal o tegumento, si ésta cubierta se rompe permite la entrada de patógenos al interior de la semilla y disminuye su viabilidad. El embrión se compone de radícula, hipocótilo y epicótilo. Tiene dos cotiledones carnosos que ocupan casi todo el volumen y peso de la semilla (Jiménez et al., 2005), en la Figura 2-4 se muestra la estructura de la semilla. La semilla de soya se forma en vainas, cada una puede contener de 1 a 3

Figura 2-4: Estructura de la semilla de soya.

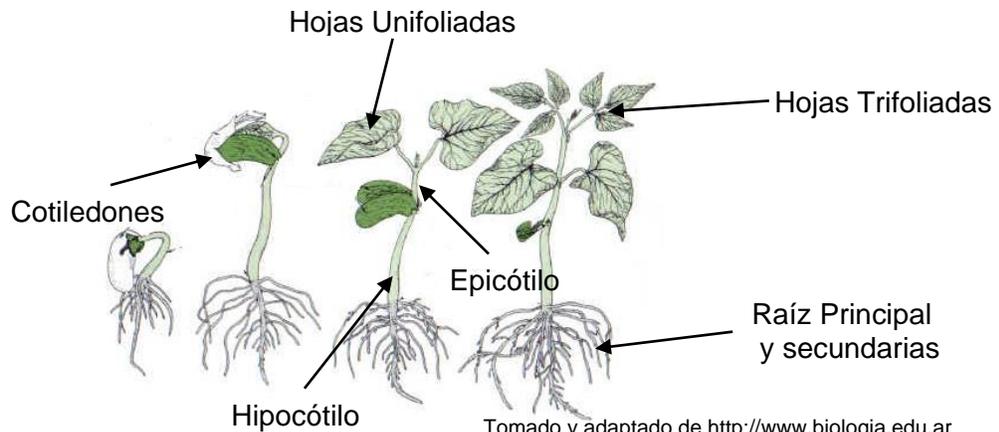


Adaptado de <http://www.esu.edu/>

granos. Su forma generalmente es ovalada y el tegumento de las variedades comerciales es amarillo, contiene esencialmente un promedio de 40 a 42 % de proteína y 20 a 22% de aceite (Embrapa-CNPso, 1995).

La germinación inicia con la absorción de agua con lo que puede duplicar su tamaño en tres horas. Inicialmente se hace visible la radícula, cuando tiene de 2 a 3 cm, aparecen las primeras ramificaciones en la parte más envejecida de la raíz. Luego se da la apertura de los cotiledones y la aparición de las primeras hojas unifoliadas. Las plántulas emergen luego de 4 a 5 días. En la Figura 2-5 se muestra el proceso de germinación de la semilla y sus partes.

Figura 2-5. Germinación y estructuras de la planta de soya.



Tomado y adaptado de <http://www.biologia.edu.ar>

La calidad de una semilla está determinada por factores genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios. La alta calidad de las semillas es un factor clave de los sistemas agrícolas de producción de granos, ésta es necesaria para asegurar una adecuada población de plantas y una tasa de germinación razonable (Minuzzi et al., 2007).

La calidad de las semillas en el cultivo representa los efectos integrados del ambiente durante la producción de semillas y las condiciones en que se expongan durante la cosecha y el almacenamiento (Egli et al., 2005 citado por Minuzzi et al., 2007).

La semilla de soja presenta características morfológicas y fisiológicas particulares que determinan que en su manejo se deban tener en cuenta una serie de medidas específicas para obtener un producto de calidad. Desde el punto de vista morfológico posee el eje embrionario muy expuesto, razón por la cual es extremadamente susceptible al daño mecánico. A su vez, presenta en su composición química un elevado contenido de ácidos grasos poli insaturados, motivo por el cual la semilla puede sufrir una importante reducción en su calidad fisiológica en cortos períodos de tiempo ya que esto hace que su metabolismo sea rápido (Rossi & González, 2006).

El efecto ambiental sobre el daño a la semilla se da por la ocurrencia de altas temperaturas asociada a baja disponibilidad hídrica durante el llenado de los granos, esto puede originar semillas pequeñas, menos densas, inmaduras, verdes, arrugadas o deformadas (Rossi & González, 2006). Adicionalmente la disminución del poder germinativo y del vigor de las semillas se da por el retraso de la cosecha luego de la madurez fisiológica. Esta reducción está determinada por factores genéticos, además de las condiciones ambientales a que están expuestas las semillas (Minuzzi et al., 2007).

La germinación es fuertemente afectada por los daños ambientales y mecánicos. Estos se registran como los responsables en la baja germinación y obtención de plantas anormales. La trilla es el principal responsable del daño mecánico de la semilla, aunque este puede ocurrir a lo largo de todo el proceso desde la cosecha, pasando por el almacenamiento y maquinación de la semilla. La humedad es un factor determinante en el daño mecánico, bajos niveles ocasionan daños por fisura y altos niveles por amasamiento. El lugar del impacto también influye, si este es cercano al eje embrionario el daño será mayor si ocurre distal al mismo, esto se debe tener en cuenta con la cosechadora (Jiménez et al., 2005), (Rossi & González, 2006).

Otro aspecto que incide sobre la calidad de la semilla es el daño por chinche, este depende del ciclo del cultivo pudiendo provocar desde la caída de las vainas jóvenes o muerte de las semillas, hasta a sólo manchado de los granos por la picadura permitiendo la entrada de hongos y bacterias. Estos daños en edad temprana de la semilla ocasionan daño profundo a los cotiledones lo que puede afectar la germinación por interrumpirse la traslocación de nutrientes al embrión (Rossi & González, 2006).

2.3.3 El cultivo en Colombia

La soya (*G. max* (L). Merrill) llegó al país en 1929 y su producción se inició en 1955 con variedades comerciales que fueron introducidas de los Estados Unidos. En el año 1960 el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) con los programas de mejoramiento genético en su unidad de investigación generan las primeras variedades híbridas. La empresa privada también inicia el desarrollo de variedades a mediados de los años 70 a partir de selecciones dentro de introducciones. Desde el año 1960, se han registrado 42 variedades de soya generadas por procesos de mejoramiento genético por el ICA, CORPOICA y en algunas empresas productoras de semillas (ICA, 1994).

Para el año de 1992 fue liberada la variedad Soyica P34, la cual fue desarrollada para la zona geográfica del Valle del Río Cauca y zonas similares entre los 800 – 1200 msnm por el ICA. Proviene de cruzamientos entre las variedades Davis, AGS 129 y la línea experimental 568-M(3)-1-7-M(3) de donde se escogió la línea agronómicamente más sobresaliente. Dentro de sus características está la alta productividad de 2.7 t/h y la resistencia a enfermedades como la mancha de ojo de rana (*Cercospora sojina*) y mancha púrpura de la semilla (*Cercospora kikuchii*); tolerancia a pústula bacterial (*Xanthomonas phaseoli*), mildew veloso (*Peronospora manchurica*) y al complejo viroso. También presenta tolerancia a crisomélidos y al pegador de follaje (*Omiodes indicata*) (Bastidas & Agudelo, 1992).

El ICA mediante la Resolución 002404 de 19 Julio de 2010 el ICA autorizó siembras comerciales de soya Roundup Ready (MON-Ø4Ø32-6) para la subregión natural de la Orinoquía. La empresa Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & CIA. SCA, en el marco de la legislación vigente, solicitó autorización al ICA para introducir, producir y comercializar en Colombia semillas de soya Roundup Ready® (MON-Ø4Ø32-6) la cual fue desarrollada utilizando el método de transformación por biobalística o aceleración de partículas utilizando el plásmido PV-GMGT04 de la serie PuC. Esta soya expresa la proteína CP4 EPSPS, 5 enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, que es una enzima derivada de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 que le confiere tolerancia al glifosato (ICA, 2013).

La soya cultivada es esencialmente compatible sólo con miembros del género *Glycine* especie *Glycine max*. Por lo tanto, los únicos lugares donde puede ocurrir polinización cruzada son en Australia y China donde las especies perennes ocurren endémicamente. La soya cultivada es esencialmente autógama y la polinización cruzada generalmente es muy escasa y varios estudios ha mostrado que está entre el 0.03% y 3.62%.

El cultivo tiene gran importancia para el desarrollo de la altillanura colombiana, esto radica en la producción de alimentos concentrados para animales, en donde la porción proteica es dada en gran parte por la soya. La producción nacional de alimentos concentrados en el país alcanzó para el año 2011 las 5.787.890 t lo que involucra el uso de materias primas como maíz, sorgo, cebada, soya, entre otros. El crecimiento de la demanda mundial de las materias primas agrícolas aumenta año tras año y contrariamente la oferta de las tierras para la agricultura ha reducido sustancialmente (Fundallanura, 2012).

En Colombia las zonas productoras de soya son la altillanura, el piedemonte y el valle, siendo las dos primeras los principales productores. La producción interna de Colombia para el año 2011 fue de 89.074 t de frijol soya, y se importaron para el mismo año 271.944 t de frijol soya y 1.013.997 t de torta de soya. Para abastecer la demanda interna se deberían sembrar 769.767 ha que produciría con un rendimiento de 2.5 t/ha 1.924.418 t de frijol soya (Fenalce, 2011), (Fundallanura, 2012).

2.4 Cultivo *in vitro* de la soya

2.4.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se da a través de diferentes fases de histodiferenciación, maduración, desecación, germinación y conversión. Inicia con el cultivo de embriones cigóticos inmaduros en altas concentraciones de auxina como 2,4-D para la inducción de callo, luego se baja la concentración de auxina para que inicie el desarrollo de embriones somáticos. En esta etapa los embriones están en división activa y pasan por las etapas: globular, corazón y torpedo. En la maduración la mitosis cesa y se da la acumulación de sustancias de reserva y adquisición de tolerancia a la desecación. El genotipo es un factor

determinante en la cantidad y calidad de los embriones somáticos (Olhoft et al., 2007).

La capacidad de producir callos organogénicos en soya se ha comprobado que es dependiente del genotipo (Tian, Brown, Voldeng, & S, 1994),(Li & Grabau, 1996), y varios tipos de explantes se han utilizado para la inducción de callos embriogénicos como hipocotilos y epicotilos (Phillips & Collins, 1981), ejes embrionarios (Christianson, Warnick, & Carlson, 1983) y embriones inmaduros ((Lazzeri, P A et al., 1985).

El balance entre auxinas, citoquininas y aminoácidos se reporta como el factor que mayor efecto tiene sobre la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros; otros factores de importancia son el inoculo, método de subcultivo y la composición del medio de cultivo. La maduración de los embriones ha sido uno de los aspectos que más ha determinado el éxito de esta metodología. Se han evaluado varias características para mejorar la proliferación y maduración de los embriones entre estos está la concentración de sacarosa (Komatsuda, Lee, & Oka, 1992), cantidad y frecuencia de los subcultivos, (Lazzeri, P A, 1987), concentración de etileno (Santos, Mundstock, & Bodanese-Zanettini, 1997), contenido de nitrógeno (Samoylov, 1998), entre otros.

2.4.2 Caulogénesis

La caulogénesis en soya involucra la regeneración de brotes directamente de las células meristemáticas o de tejidos cercanos a células meristemáticas. Los brotes pueden formarse de los tejidos del explante pasando o no por la fase de callo. Los métodos reportados en la regeneración de brotes se basan en la inducción a partir del meristemo axilar o apical sin desarrollar una etapa significativa de callo (Olhoft et al., 2007).

Comparado con los métodos de regeneración vía embriogénesis somática, los métodos vía organogénesis son dependientes del cultivar, especialmente en el desarrollo *in vitro* del explante y su sensibilidad a los componentes del medio de cultivo. La inducción de brotes *in vitro* en soya es posible mediante la remoción de la dominancia apical y la estimulación del meristemo axilar con o sin la adición de bajos niveles de RCV al medio de regeneración. La regeneración de plantas ha sido reportada de diferentes meristemos axilares de semillas germinadas en diferentes niveles de desarrollo (Olhoft et al., 2007).

En los métodos descritos, la inducción de los brotes se realiza mediante la adición al medio de cultivo de citoquininas y auxinas, combinadas en diferentes concentraciones. Las más regularmente utilizadas son el IBA y BAP, éstas promueven la división celular e inducen el desarrollo de las yemas laterales en las regiones del nudo. Para que continúe el desarrollo de las yemas en el explante, los brotes generados son retirados para estimular el desarrollo de nuevas yemas por la reducción de la concentración endógena de auxinas que son producidas en las puntas apicales de los brotes en desarrollo (Wright, y otros, 1986, citado por Olhoft et al., 2007). El tiempo de regeneración de plantas a partir de brotes axilares o apicales es más rápido que las obtenidas por embriogénesis somática. Los primordios de los brotes son formados dentro de una semana en el medio de inducción de brotes, y la formación de las plantas comunmente se da en un mes de cultivo (Olhoft et al., 2007).

La regeneración de soya mediante caulogénesis se ha establecido a partir de tres tipos de explantes: nudo primario, nudo cotiledonar y callo. Para efectos de este trabajo se utilizará la regeneración a partir del nudo cotiledonar. Este se considera como el método en el que más se da la inducción y formación de brotes a partir del meristemo axilar. El explante compuesto por el nudo cotiledonar con cotiledones es el más reportado en los sistemas de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, este explante se aísla de semillas de 4

a 10 días de germinadas. La siembra de este explante sin cotiledones ha mostrado que reduce la producción de brotes, indicando su importancia en la traslocación de nutrientes. (Franklin, (2004), citado por Olhoft et al., 2007).

Algunos investigadores han reportado el uso de TDZ en la inducción de caulogénesis a partir de diferentes explantes. Concentraciones de TDZ entre 0.9 y 5.4 uM indujeron la formación de brotes únicamente en el explante del nudo cotiledonar con yemas axilares (Kaneda et al., 1997), (Radhakrishnan et al., 2009). Ma, X.-H., & Wu, T.-L. (2007), desarrollaron una metodología rápida y eficiente para la inducción de caulogénesis basándose en la metodología del nudo cotiledonar. Tomaron semillas maduras de soya con 7 días de germinación a las que retiraron una fracción del hipocótilo dejándolo de 3 cm desde la base, retiraron las primeras hojas y adicionalmente hicieron unas incisiones a nivel de la zona meristemática apical, se conservaron los cotiledones. Evaluaron diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, IBA y KIN estableciendo que la concentración en donde se obtuvo la mejor respuesta fue con 3.0 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de IBA y 0.5 mg/L de KIN en uno de los cuatro genotipos evaluados.

Para evaluar la caulogénesis en semillas de soya se han evaluado diferentes variables, entre ellas están los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el genotipo. Dentro de los reguladores de crecimiento el BAP ha sido el más reportado para la inducción de brotes a partir del nudo cotiledonar (Cheng et al., 1980), (Hinchee et al., 1988), (Ma & Wu, 2007), en donde se utiliza para disminuir la dominancia apical y estimular el desarrollo de brotes axilares y adventicios. Algunos autores reportan también el uso del TDZ para aumentar la caulogénesis a partir del nudo cotiledonar. (Kaneda et al.,1987), (Shan et al., 2005), (Radhakrishnan et al., 2009).

Cheng, et al., (1980), reportaron por primera vez la inducción de caulogénesis a partir del nudo cotiledonar utilizando BAP (en un rango de 5 a 50 uM), con un subcultivo previo de BAP (10 a 50 uM) o de IBA (0.025 uM) en el medio de

germinación; observaron un efecto del BAP sobre la germinación de las semillas y una relación con el genotipo. Bajas concentraciones de BAP (0.2 μ M) permitieron una buena germinación de las semillas y formación de caulogénesis, mientras que altas concentraciones de BAP (10 μ M) indujeron la formación de caulogénesis pero el desarrollo de los brotes se vio inhibido. Reportaron además una continua estimulación de brotes al subcultivar los explantes en medio fresco con las mismas concentraciones de BAP. Las plántulas obtenidas fueron subcultivadas y enraizadas exitosamente en un medio sin reguladores de crecimiento.

El tipo de explante ha sido objeto de modificaciones en varios estudios reportados; el explante base es el nudo cotiledonar que es el que tiene las zonas meristemáticas axilares y apical, pero algunos autores retiran los cotiledones a nivel del eje del tallo y cortan el hipocótilo 3 mm por debajo y epicótilo 3 mm por encima del eje del nudo cotiledonar (Cheng et al., 1980), otro tipo de explante fue utilizado por Hinchee et al., 1988, en donde una vez se tienen las semillas germinadas se retira el hipocótilo y epicótilo, dejando los cotiledones, estos se separan con un corte que atraviesa el nudo cotiledonar dejando los cotiledones individuales y esto se siembran adaxialmente sobre el medio de cultivo con 1,15 mg/L de BAP para la inducción de brotes múltiples adventicios. Reportan que el 70% de los explantes producen brotes adventicios y una de las ventajas que se señala de este método es que por una semilla se obtienen dos explantes. El tiempo de obtención de los brotes se da entre la 4 y 12 semana del cultivo en el medio de inducción. Estos métodos fueron utilizados por varios investigadores en proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con algunas modificaciones a nivel de las concentraciones de BAP en el medio y composición del explante (Meurer, Dinkins, & Collins, 1998), (Donaldson & Simmonds, 2000), (Olhoft & Somers, 2001), (Paz et al., 2004), (Xue, Zhang, & Xie, 2007). Por ejemplo Zhang et al., 1999, transformaron soya utilizando como explantes cotiledones sembrados adaxialmente y la inducción de brotes se hizo

en un medio con 1.67 mg/L de BAP, luego de 4 semanas subcultivaron los explantes a un medio suplementado con 1 mg/L de Zeatina ribosido, 0.5 mg/L de AG3 y 0.1 mg/L de AIA, en este estudio obtuvieron regenerantes transgénicos.

3. Materiales y métodos

3.1 Localización

Todos los experimentos necesarios para el desarrollo de este proyecto se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en cuartos con condiciones controladas localizados en el Instituto de Genética de la misma sede.

3.2 Material vegetal

Se utilizó semilla madura certificada de soya (*G. max* (L). Merrill) del genotipo P34, la cual no superaba los tres meses de cosechada. La semilla fue suministrada por las empresas productoras Semillas Panorama y Semillas Kamerun.

3.3 Agentes desinfectantes

Para la desinfección superficial de las semillas se utilizaron los agentes comúnmente recomendados en cultivo de tejidos vegetales para la desinfección de explantes, como etanol antiséptico al 70%, hipoclorito de sodio (NaClO) fresco y tween 20.

3.4 Medios de cultivo

Se utilizó el medio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) sales y vitaminas completas (Phytotechnology Labs.), en la Tabla 3-1 se muestra la composición del medio. La fuente de carbono fue sacarosa pura (Phytotechnology Labs.) 30 g/L. El pH se ajustó a 5,8 con NaOH 1 N y HCl 1N. Como agente gelificante se utilizaron 7,5 g/L de Agar Plant TC (Phytotechnology Labs.). Se esterilizó por autoclave a 120°C durante 20 min.

Tabla 3-1: Composición del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

Compuesto	mg/L
Macronutrientes	
Nitrato de Amonio (NaHNO ₃)	1650
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	1900
Fosfato de Potasio, Monobásico (KH ₂ PO ₄)	170
Cloruro de Calcio Anhidro (CaCl ₂)	332,2
Sulfato de Magnesio Anhidro (MgSO ₄)	180,7
Micronutrientes	
Cloruro de Cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,025
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37,26
Sulfato Cuprico (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,025
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8
Sulfato de Manganeso (MnSO ₄ .H ₂ O)	16,9
Yoduro de Potasio (KI)	0,83
Ácido Molibdico (Sal de Sodio) (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,25
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	6,2
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6
Vitaminas y Otros Suplementos	
Inositol	100
Tiamina HCl	0,1
Piridoxina HCl	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Glicina	2,0

3.4.1 Medio de germinación (MG)

Para la germinación de las semillas de soya (*G. max* (L). Merrill) se utilizó el medio descrito en el numeral 3.4. Luego de ser esterilizado se sirvió en cámara de flujo laminar en cajas de petri plásticas de 100 mm x 15 mm estériles, 25 ml por caja.

3.4.2 Medio de Inducción de brotes (MIB)

Para la inducción de los brotes se utilizó el medio descrito en el numeral 3.4 complementado con BAP e IBA en las concentraciones a evaluar. Se esterilizó por autoclave y posteriormente en cámara de flujo se le adicionaron los RCV y se sirvió en contenedores plásticos de 300 ml, se sirvieron 90 ml por cada contenedor.

3.5 Establecimiento del sistema de desinfección superficial y su efecto sobre la germinación de la semilla de soya

3.5.1 Prueba de germinación

Previamente a los ensayos se realizó una evaluación de calidad a las semillas en donde se evaluó su capacidad de germinación (ISTA Rules International Seed Testing, 2006). El objetivo de esta prueba fue determinar el potencial máximo de germinación de cada lote de semillas a utilizar en los ensayos, y compara la calidad entre los lotes. El método consistió en germinar las semillas en agua colocándolas uniformemente entre dos capas de servilletas Scott húmedas, estas se colocaron en una bandeja y se cubrieron bien para evitar la pérdida de humedad y dar condiciones de oscuridad. Se dejaron toda una noche y al día

siguiente se contabilizó el porcentaje de semillas germinadas y no germinadas, lo que se evidencia por la elongación del hipocótilo.

3.5.2 Tratamientos de desinfección

Para el establecimiento de un sistema óptimo de desinfección superficial de semilla madura de soya se evaluó el efecto de varias concentraciones de NaClO en diferentes tiempos de exposición bajo un diseño factorial 2x3 que consistió en evaluar dos tiempos de exposición: 15 min y 20 min, y tres concentraciones de NaClO: 2 %, 2,5 % y 3,0 % (v/v) de NaClO. Para cada tratamiento se utilizaron 50 semillas y el ensayo se realizó dos veces. Los tratamientos se muestran en la Tabla 3-2.

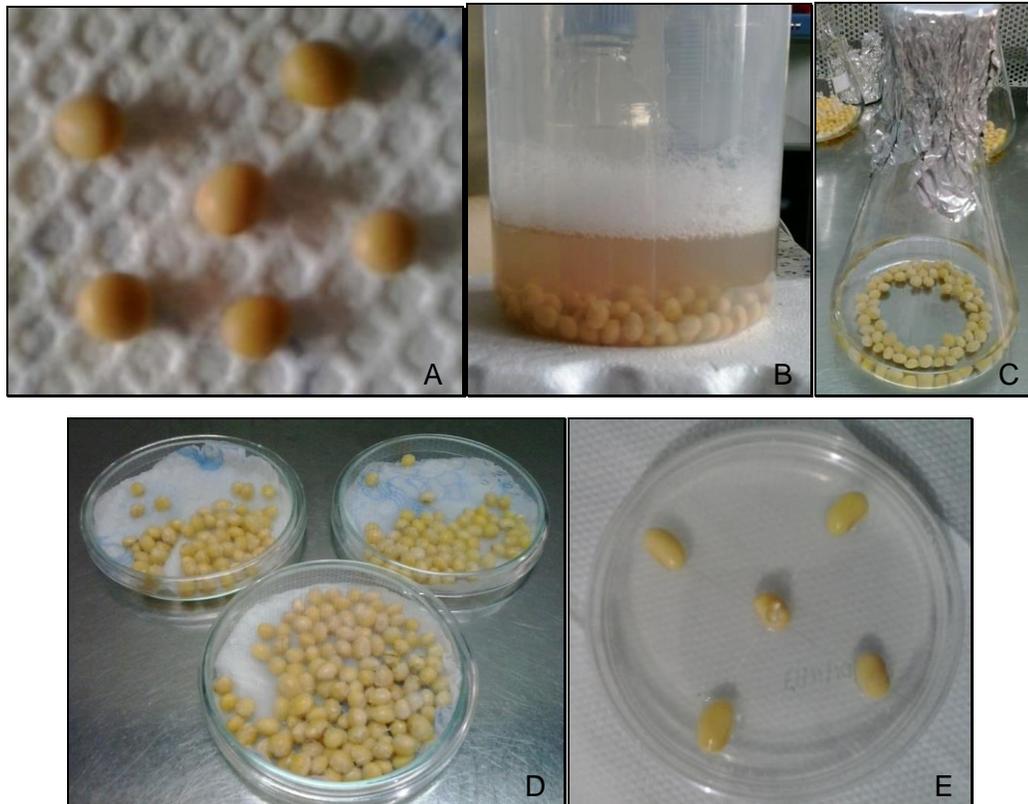
Tabla 3-2: Tratamientos de desinfección superficial de semilla de soya.

Tratamiento	Tiempo (min)	NaClO (%)
T1	15	2,0
T2	15	2,5
T3	15	3,0
T4	20	2,0
T5	20	2,5
T6	20	3,0

Inicialmente se seleccionaron las semillas por la apariencia del tegumento, estas no debían presentar irregularidades como manchas, hendiduras o agrietamientos. Una vez seleccionadas las semillas se lavaron con agua corriente y jabón suave; se hicieron dos enjuagues finales de agua destilada. En cámara de flujo laminar se colocaron grupos de 50 semillas en un erlenmeyer de 500 ml estéril y se procedió con la desinfección. A cada erlenmeyer se adicionaron 100 ml de etanol antiséptico y se agitó durante 1 min, luego se descartó y se hicieron dos lavados con agua destilada estéril. Luego se adicionaron 100 ml de NaClO en las

respectivas concentraciones a evaluar (2,0%, 2,5% y 3,0%) más dos gotas tween 20. Se agitaron durante los respectivos tiempos a evaluar 15 min. y 20 min. Pasados los tiempos se descartó el NaClO y se hicieron tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas se pasaron a caja de petri de vidrio con papel toalla Scott estéril hasta su siembra, el proceso se muestra en la Figura 3-1.

Figura 3-1: Procedimiento de desinfección de semillas de soya. **A.** Selección de las semillas; **B.** Lavado con agua corriente; **C.** Distribución en erlenmeyers y desinfección con etanol antiséptico y NaClO; **D.** Secado y conservación; **E.** Siembra en medio MG.



Posteriormente las semillas se sembraron en el medio MG, se pusieron cinco semillas por caja de petri equidistantemente, para un total de diez cajas por tratamiento. Las cajas se sellaron con cristaflex y se incubaron por ocho días en condiciones de oscuridad a 25°C. Pasado este tiempo se evaluó el porcentaje de semillas germinadas y contaminadas (semillas con microorganismos sobre su

superficie). Para el análisis de los resultados se hizo uso de la teoría de modelos lineales generalizados, aplicando el modelo logístico de Poisson. Se utilizó el software estadístico R.

3.6 Inducción de caulogénesis

Para la inducción de brotes múltiples a partir del nudo cotiledonar en semilla madura de soya se aplicó un diseño factorial donde se evaluó el efecto de 2 reguladores de crecimiento; BAP con cuatro niveles de concentración 0, 1, 2 y 3 mg/L e IBA con dos niveles 0.1 y 0.5 mg/L. Los tratamientos se muestran en la Tabla 3-3. Se tomaron treinta nudos cotiledonares por tratamiento para un total de trescientos explantes por ensayo. Éste se realizó dos veces.

Para la inducción de los brotes se siguió el método inicialmente propuesto por Hinchee et al., (1988), el cual ha tenido varias modificaciones, específicamente

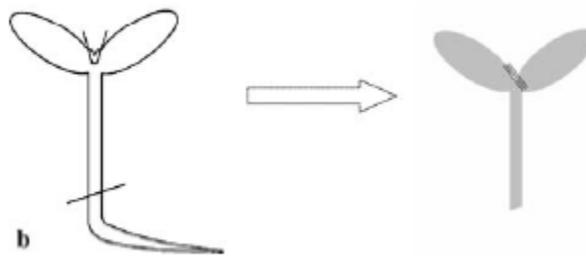
Tabla 3-3: Tratamientos para inducción de brotes múltiples.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)
T0	Control (No BAP ni IBA)
T1	BAP 1
T2	BAP 2
T3	BAP 3
T4	BAP 1 + IBA 0.5
T5	BAP 1 + IBA
T6	BAP 2 + IBA 0.5
T7	BAP 2 + IBA 1
T8	BAP 3 + IBA 0.5
T9	BAP 3 + IBA 1

se siguió el método de Ma, X.-H., & Wu, T.-L. (2007), en donde el explante es el nudo cotiledonar, un segmento del hipocotilo y los cotiledones. En cámara de flujo laminar se tomaron semillas germinadas al día siete de su siembra inicial

luego del proceso de desinfección. Con ayuda de un bisturí se retiró una fracción del hipocotilo dejándolo de 3 cm de longitud desde la base y se retiraron las primeras hojas que se ubican en medio de los cotiledones, y se hicieron cortes longitudinales en la zona del meristemo apical como se muestra en la Figura 3-2.

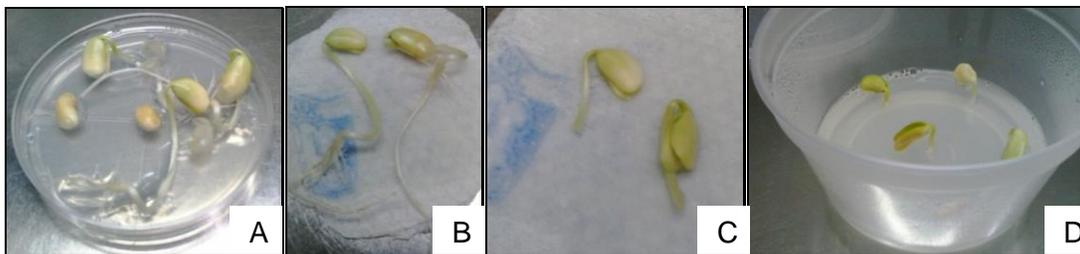
Figura 3-2: Esquema del explante compuesto por el nudo cotiledonar. Se pueden apreciar los dos cotiledones y el hipocótilo (blanco), y los puntos de corte y extracción del nudo cotiledonar (gris).



Tomado de (Ma, X.-H., & Wu, T.-L. 2007)

Los explantes obtenidos se sembraron verticalmente sobre el medio de cultivo MIB y se incubaron en un cuarto de crecimiento a 25°C y 16/8 h de fotoperiodo. En la figura 3-3 se muestra el procedimiento.

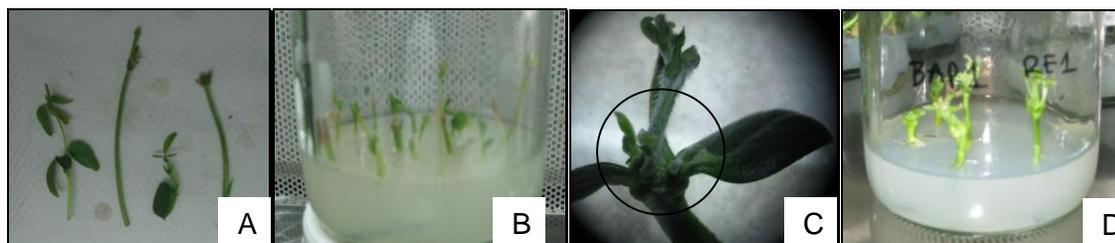
Figura 3-3: Disección de la semilla de soya para la preparación del nudo cotiledonar. A. Semillas de 7 días de germinadas *in vitro*; B. Selección de semillas con hipocotilo mayor a 5 cm y no contaminadas; C. Corte del hipocótilo y primeras hojas; D. Siembra vertical sobre el medio MIB.



Pasados 15 días de la siembra se contabilizó el número de explantes que formaron brotes, número de yemas por explante y número de brotes por explante. Con bisturí se retiraron los brotes que tuvieran una longitud de 2 cm o más, estos

se clasificaron como “brotes elongados” (BE) y se subcultivaron en medio MS sin reguladores; las yemas y brotes con una longitud inferior a 2 cm se clasificaron como “brotes no elongados” BNE. Los explantes con yemas y BNE se subcultivaron a medio MS sin reguladores. Pasados ocho días se volvió a realizar el conteo de BE y BNE. Los brotes elongados subcultivados en el medio MS se evaluaron en cuanto a su desarrollo. El procedimiento se muestra en la figura 3-4.

Figura 3-4: Brotes múltiples elongados de soya. A y B. Brotes mayores a 2 cm aislados y sembrados en medio MS sin reguladores; C y D. Yemas y brotes menores a 2 cm de longitud, este explante sin cotiledones es subcultivado a medio MS sin reguladores.



Para el análisis de los resultados de la inducción de brotes se hizo uso de la teoría de modelos lineales generalizados, aplicando el modelo logístico de Poisson. Para el desarrollo de los brotes se utilizó un análisis descriptivo por medio de un Análisis de Correspondencias Simples (ACS). Se utilizó el software estadístico R.

3.7 Estudio histológico

Se tomaron tejidos de la zona meristemática del nudo cotiledonar durante los cinco primeros días del período de inducción de explantes de los tratamientos con 1, 2 y 3 mg/L de BAP y el control. Estos se fijaron en una solución de formol: ácido acético glacial: etanol, en proporciones 1:1:18 (FAA) y se conservaron en nevera a 4°C. Los tejidos fijados se deshidrataron con etanol en series sucesivas

e infiltraron con una solución de HistoChoice® ClearingAgent (Sigma Aldrich) antes de embeirlas en parafina histológica (Richard-Allan Scientific™ HistoplastParaffin). Las muestras se cortaron longitudinalmente en micrótopo y tiñeron para observar el desarrollo de los meristemas y verificar el carácter organogénico de los brotes. (Anexo A).

4. Resultados y discusión

4.1 Establecimiento del sistema de desinfección superficial y su efecto sobre la germinación de la semilla de soya

4.1.1 Prueba de germinación

La evaluación de la capacidad de germinación en agua de la semilla de la variedad P34, mostró un porcentaje de germinación del 74%. Con este resultado se hizo un estimativo de la cantidad de semilla que se debía poner a germinar para que hubiera el suficiente material para cada ensayo, pues según esto aproximadamente el 26% de la semilla no germina. En la Figura 4-1 se muestra un lote de semillas evaluadas luego de la prueba.

Figura 4-1: Semilla de soya P34 germinada en agua. En el lado izquierdo se observan las semillas germinadas con el hipocótilo elongado; en el lado derecho las semillas no germinadas.



Para el establecimiento de cualquier sistema de propagación *in vitro*, uno de los factores que es determinante en el éxito de estos procesos es la calidad del explante. Para el caso de la semilla de soya varios factores inciden sobre su calidad que afectan de manera directa su desarrollo entre estos está que su alto contenido de ácidos grasos, que hace que su metabolismo sea más rápido comparado con una semilla que almacena almidón, por tanto la semilla de soya conservada a temperatura ambiente pierde rápidamente su viabilidad (Minuzzi et al., 2007). Otros factores que inciden en su calidad son los factores ambientales y físicos. Cambios bruscos en la temperatura ocasiona que la semilla pierda humedad y los golpes ocasionados por los procesos de cosecha y manipulación pueden afectar el cilindro central que está muy expuesto, ocasionando daños al embrión y por tanto afectando la viabilidad de la semilla (Rossi & González, 2006).

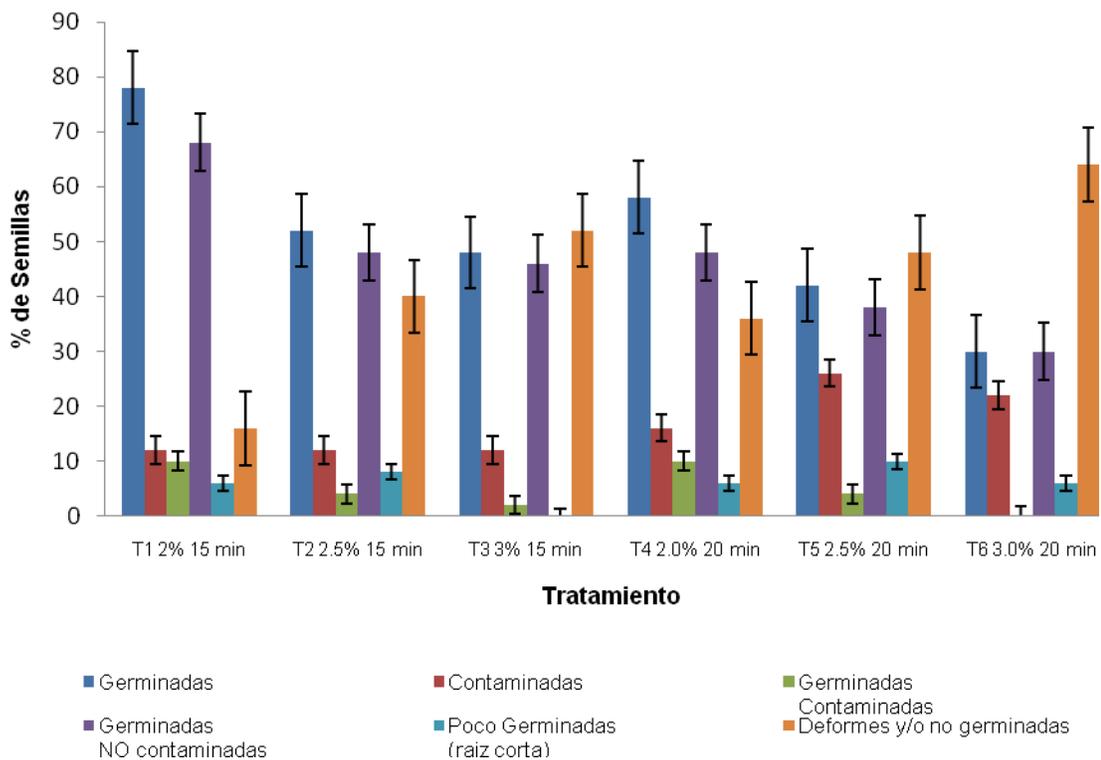
En la muestra se pudo observar que un 26% de las semillas no germinaron, dentro de esta se observaron semillas hidratadas en donde el hipocótilo se desarrollo pero tuvo poco crecimiento y semillas que no se hidrataron conservando el tamaño inicial. En el primer caso aunque hubo germinación, no se observó desarrollo del embrión; esto probablemente ocasionado por daños en la semilla que impidieron el desarrollo del embrión. En el segundo caso se presentó lo que se conoce en plantas forrajeras como semilla dura, el cual es un fenómeno genéticamente programado, en donde las semillas presentan un tegumento con características especiales que impiden la entrada de agua (Galussi, 2007).

4.1.2 Tratamientos de desinfección

Luego de la aplicación de los tratamientos de desinfección se evaluó la capacidad de germinación *in vitro* de la semilla. Se obtuvieron porcentajes de germinación que estuvieron entre un 30% y 78%. El porcentaje más alto se dio en el tratamiento 1(2% NaClO-15 min), correspondiendo a las condiciones más suaves

de desinfección, contrariamente el porcentaje más bajo se presentó en el tratamiento T6 (3% NaClO-20 min) que corresponde al tratamiento con condiciones más fuertes de desinfección, por tanto se puede afirmar que las condiciones de desinfección utilizadas tienen un efecto sobre la germinación de las semillas. Por tanto se observó que tanto la concentración de NaClO y el tiempo de exposición si tienen un efecto sobre la capacidad de germinación de la semilla. Los resultados se muestran en la Gráfica 4-2.

Gráfica 4-1: Efecto de los tratamientos de desinfección en semilla de soya.



Los resultados de contaminación mostraron que en los tratamientos de más baja concentración de NaClO y tiempo de exposición T1 (2% NaClO-15 min), T2 (2.5% NaClO-15 min) y T3 (3.0% NaClO-15 min), se dio el mayor efecto sobre el control de la contaminación con un 12% de semillas contaminadas para los tres tratamientos. Se observó que a medida que las condiciones de desinfección se incrementan el porcentaje de semillas contaminadas aumenta, como se observó

para el tratamiento T5 (2.5% NaClO-20 min) en donde se obtuvo el mayor porcentaje de contaminación con un 26 %.

Dentro de la muestra de semillas contaminadas se presentó un porcentaje de semillas que no germinaron, esto por el daño que las bacterias y hongos tienen sobre el desarrollo de la semilla. Sin embargo hay un porcentaje de semillas que germinan y que se tuvieron en cuenta al momento de evaluar el efecto de los tratamientos sobre la germinación. Para los tratamientos de más baja concentración de NaClO T1 (2% NaClO-15 min) y T4 (2% NaClO-20 min) se observó que un 10 % de las semillas contaminadas logran germinar. En los restantes tratamientos este porcentaje estuvo por debajo del 5%.

Las semillas germinadas no contaminadas es el resultado que más importancia práctica tiene, pues determina qué cantidad de semillas realmente son utilizables luego de aplicar el tratamiento de desinfección. Los resultados siguieron la tendencia que se observó para el total de semillas germinadas, para el tratamiento T1 (2% NaClO-15 min) se obtuvo el mayor porcentaje con un 68% y con el tratamiento T6 (3.0% NaClO-20 min) se obtuvo un 30% de semillas germinadas no contaminadas. Esto reivindica que el NaClO tiene un efecto negativo sobre la capacidad de germinación de las semillas; y segundo a medida que se incrementa la concentración de NaClO aumenta también el porcentaje de contaminación. Adicionalmente se observó en cuanto a la germinación que algunas semillas no presentaron una buena elongación del hipocótilo, en otras la germinación es anormal con enroscamiento y bajo desarrollo del hipocótilo, éstas formas se presentan en alto porcentaje en los tratamientos T3 (3.0% NaClO-20 min) con 52 % y T6 (3.0% NaClO-20 min) con 64 %, que corresponden a los tratamientos en que se aplicó la mayor concentración y tiempo de NaClO.

Para determinar el mejor tratamiento de desinfección con menor afectación del proceso de germinación se realizó un análisis estadístico mediante el uso de la

teoría de modelos lineales generalizados, aplicando un modelo logístico, en este caso una distribución de Poisson. Se trabajó bajo el siguiente modelo:

$$y_{ijm} = \ln \left(\frac{\pi_{ijm}}{1 - \pi_{ijm}} \right) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijm}$$

Con $i=1, 2$; $j=1, 2, 3$; $m=1,2,\dots,10$.

Aquí, π_{ijm} : representa la variable de interés en cada caso (semillas contaminadas, semillas germinadas y semillas germinadas no contaminadas), μ : representa el efecto de la media global, α_i : representa el efecto del i -ésimo tiempo (1= 15 Minutos, 2=20 Minutos), β_j : representa el efecto de la j -ésima concentración de NaOCl (1= NaClO 2 %, 2=NaClO 2.5 %, 3= NaClO 3 %), $\alpha\beta_{ij}$: representa el efecto del i -ésimo tiempo y la j -ésima concentración de NaClO, ϵ_{ijm} : representa el error asociado al i -ésimo tiempo y la j -ésima concentración de hipoclorito de sodio. Los resultados se presentan sobre un nivel de confianza del 90 %.

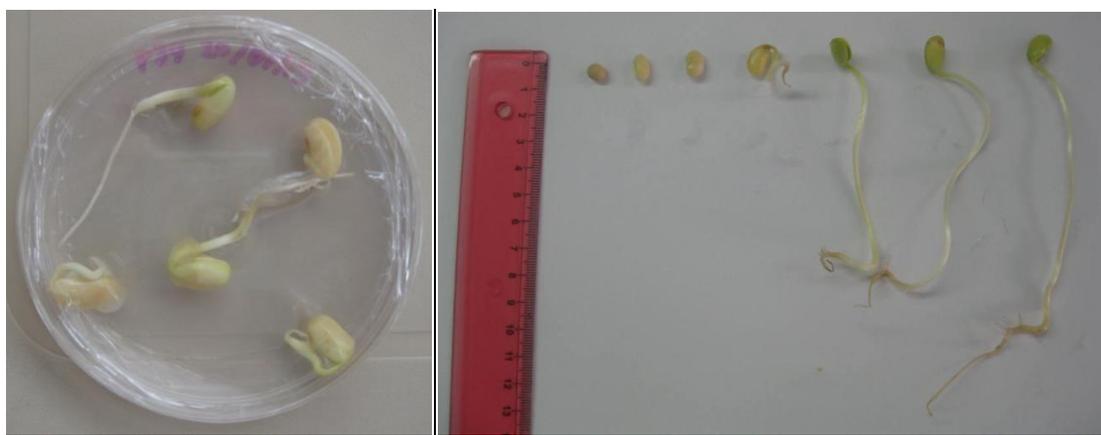
El análisis del efecto del tratamiento sobre la contaminación de las semillas, mostró que tanto la concentración de NaClO y el tiempo tienen un efecto significativo dentro del modelo que explica la contaminación de las semillas con un valor p superior al nivel de significancia establecido. Y al realizar el análisis de contrastes bajo el criterio del valor p , contrastando la hipótesis en cada caso y en donde en ninguno es posible rechazar la hipótesis, se concluye que el tratamiento que está aportando en mayor medida a la contaminación de las semillas es el que se relaciona con un tiempo de 20 min y una concentración de 2.5% de NaClO, que corresponde al tratamiento T5 (2.5% NaClO-20 min). Esto corrobora lo observado en la gráfica 4-1.

El análisis de la interacción entre el efecto del tratamiento de desinfección sobre la germinación de la semilla, deja ver que hay un efecto de cada uno de los factores (% NaClO y tiempo) sobre la germinación de las semillas, se observó con

el análisis de contraste que el tratamiento que tiene mejor efecto sobre la germinación sin contaminación es el tratamiento T1 (2% NaClO-15 min).

La germinación de las semillas de soya *in vitro* se ve afectada por los tratamientos de desinfección, este efecto es gradual a medida que se aumenta la concentración de NaClO y el tiempo de exposición. En la Figura 4-2, se observa la morfología de semillas con 7 y 12 días de germinación *in vitro* en medio MG, se observa hidratación y el desarrollo del hipocótilo, el cual se elonga hasta 13 cm aproximadamente.

Figura 4-2: Semillas de soya P34 germinadas *in vitro* luego del proceso de desinfección.



Ninguno de los tratamientos aplicados alcanza a controlar la contaminación en un 100%, sin embargo la concentración de 2.0 % en los dos tiempos evaluados logró controlar la contaminación en un 88%. Derivado del análisis estadístico se seleccionó al tratamiento T1 (2% NaClO-15 min) como el método de desinfección más adecuado.

Varias concentraciones de NaClO se reporta que han sido utilizadas para la desinfección de las semillas de soya, desde 0.5% (Shan et al., 2005) hasta 12% (Ma & Wu, 2007). En esta evaluación se observó que concentraciones altas afectaron la capacidad germinativa del genotipo P34, por tanto el establecimiento

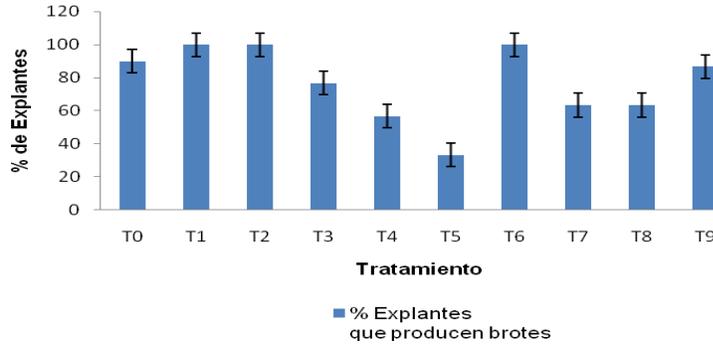
se basó en rangos bajos de NaClO para que no tuviera un efecto adverso sobre la semilla. Como se pudo observar en los tratamientos con NaClO al 3.0%, el porcentaje de semillas germinadas fue el más bajo y el de semillas mal germinadas y no germinadas el más alto, el tegumento de la semilla de soya es bastante permeable, y la zona que más rápido se hidrata es el cilindro central (Hinchee et al., 1988), una alta exposición al NaClO puede ser la que está incidiendo sobre el daño al embrión y esto se reflejan en una mala o nula germinación.

4.2 Inducción de brotes múltiples

La metodología en que se basó este estudio es la regeneración de brotes a partir de meristemas axilares o apicales sin pasar por una etapa de callo. Este método es considerado hasta el momento como el más efectivo para ser utilizado en procesos de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Olhoft & Somers, 2001), (Olhoft et al., 2007). El nudo cotiledonar se utilizó en este estudio para la inducción de brotes múltiples, los cuales se obtuvieron de semillas maduras del genotipo P34 y se indujeron bajo el efecto de varias concentraciones de BAP y combinaciones de BAP combinado con IBA con el objeto de determinar en cuál de estos tratamientos se obtenía la mejor inducción *in vitro* de brotes múltiples.

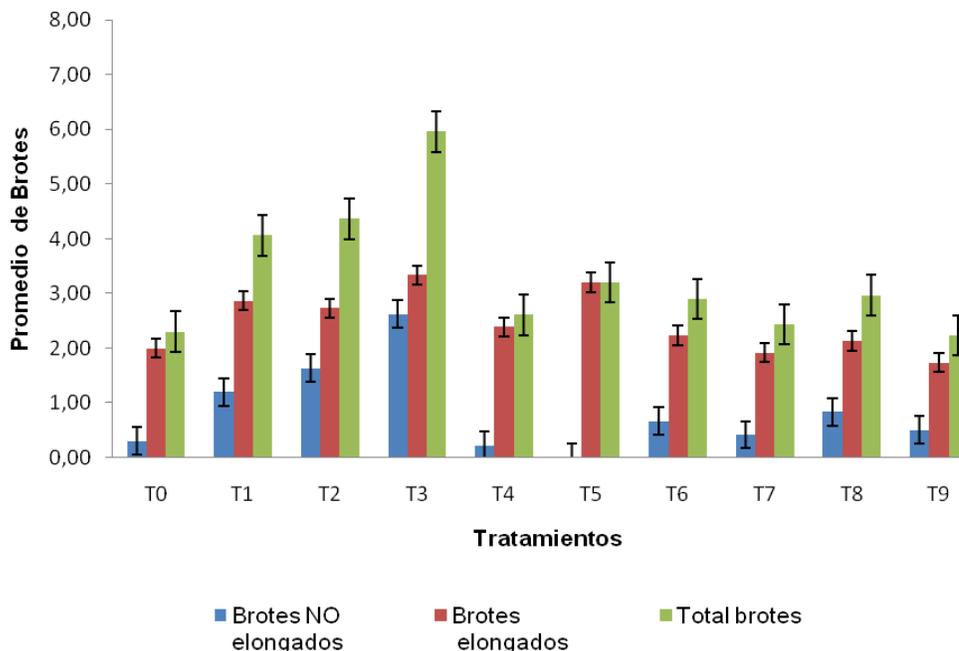
Se determinó inicialmente el porcentaje de explantes que responden a la inducción de brotes y el número de brotes por explante para cada tratamiento. En todos los tratamientos se observó la formación de brotes, sin embargo no todos los explantes respondieron a su inducción, esto se muestra en la Gráfica 4-2. En los tratamientos T1 (BAP1), T2 (BAP2) y T6 (BAP2-IBA0.5) todos los explantes respondieron a la formación de brotes, mientras que en los demás tratamientos los porcentajes estuvieron entre un 87 % para el tratamiento T9 (BAP3-IBA1) y 33% para el tratamiento T5 (BAP1-IBA1).

Gráfica 4-2: Porcentaje de explantes de soya que responden a la inducción de brotes.



La formación de los brotes se presenta inicialmente como una yema la cual es perceptible visualmente hacia el día diez de la siembra del explante en el medio MIB. Hacia el día quince las yemas presentan una elongación del tallo que puede ir de 2 a 5 cm y desarrollo de pequeñas hojas, en este momento se habla de brote. La aparición de los brotes es gradual, por lo que se pueden presentar brotes de diferentes tamaños (Gráfica 4-3).

Gráfica 4-3: Promedio del número de brotes por explante de soya y por tratamiento.



El día quince se separaron del explante los brotes con una longitud de 2 cm o más, y pasados siete días más se realizó un segundo conteo y se retiraron y subcultivaron los brotes elongados restantes. Las yemas que finalmente no se desarrollaron fueron contabilizadas.

El efecto de las citoquininas en el cultivo de tejidos vegetales es la estimulación de la división celular, control de la morfogénesis y rompimiento de la dominancia apical, es por ello que se utiliza en los procesos de caulogénesis a partir de yema axilares específicamente en el método de brotes múltiples a partir de semilla (Shan et al., 2005); (George et al., 2008). En este trabajo se utilizó el BAP para romper la dominancia apical y adicionalmente se retiraron las primeras hojas y se realizaron cortes transversales a nivel de la zona meristemática (Ma & Wu, 2007).

En el control no se aplicaron las concentraciones de RCV, pero sí le fueron retiradas las primeras hojas y se hicieron los cortes transversales en el área del meristemo apical, en los resultados se observó el desarrollo en promedio de dos brotes elongados con baja proporción de brotes no elongados. En la Figura 4-3 se muestran explantes del control con los brotes desarrollados.

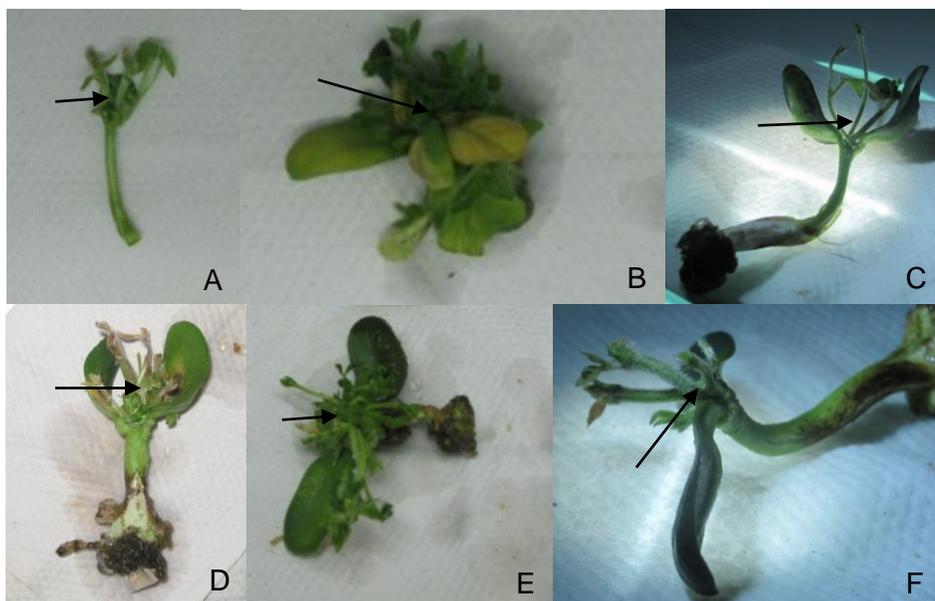
Figura 4-3: Explantes de soya con brotes elongados en el tratamiento control.



En los tratamientos T1 (BAP1), T2 (BAP2) Y T3 (BAP3) se obtuvo la mayor formación de brotes múltiples por explante, la cual fue proporcional a la

concentración de BAP (Fig. 4-4). El número de brotes promedio por explante fue de 4 a 6, sin embargo hubo alta variabilidad en este resultado, ya que estuvo en un rango de 2 a 24 brotes por explante lo que se reflejó en una alta desviación estándar en los resultados, como se observa para el tratamiento T3 (BAP3) (Desviación estándar=5.12).

Figura 4-4: Explantes de soya con desarrollo de brotes múltiples en los tratamientos con BAP. **A.** T1 (BAP1); **B y C.** T2 (BAP2) y **D, E y F.** T3 (BAP3). Las flechas indican los brotes múltiples. Los brotes se indican con flechas.



En los tratamientos que se utilizó BAP en combinación con IBA se esperaba un efecto aditivo sobre la inducción de brotes dado por el IBA. Sin embargo la inducción de brotes fue menor comparada con los tratamientos en donde se uso solo BAP. En la figura 4-5 se muestran los explantes con formación de brotes múltiples en estos tratamientos.

Para evaluar el efecto del BAP y el IBA sobre la producción de brotes y determinar las interacciones se hizo uso del siguiente modelo lineal generalizado:

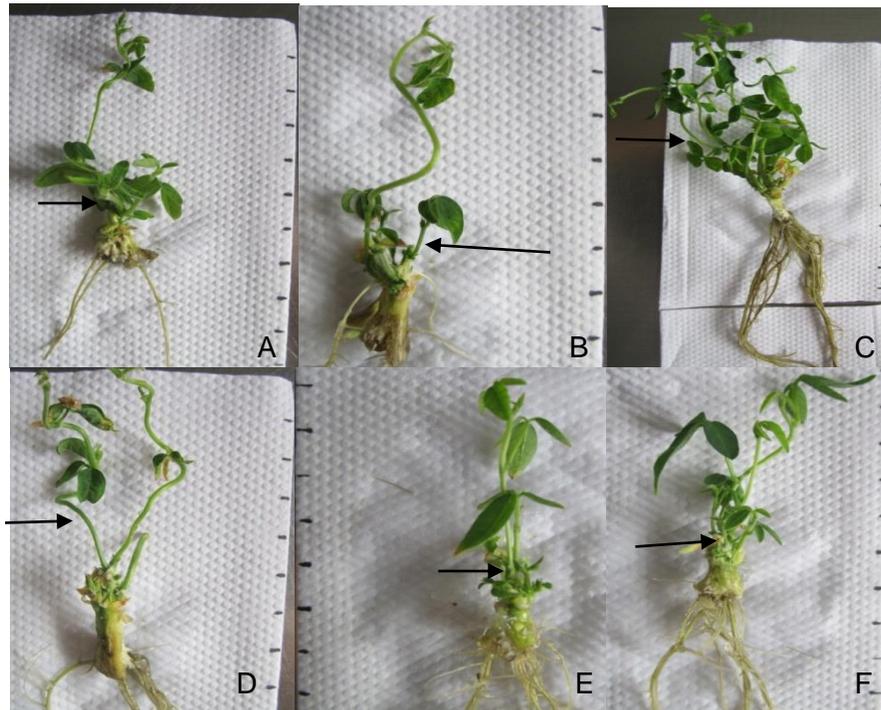
$$y_{ij} = \ln\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Con $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$.

Aquí, π : representa la variable de interés en cada caso (No. brotes totales, No. de brotes elongados y No. de brotes no elongados), μ : es el efecto de la media global y T : representa el efecto de cada uno de los tratamientos aplicados.

El análisis de desviación residual indica que los tratamientos T1 (BAP1) ($p = < 2e-16$), T2 (BAP2) ($p = 5.97e-05$), T3 (BAP3) ($p = 0.00024$) y T4 (BAP1-IBA0.5) ($p = 3.59e-14$) son significativos para la inducción de brotes. Al evaluar los contrastes teniendo como hipótesis nula la igualdad en los contrastes con un 95% de confianza se obtiene analizando las medias que el tratamiento que más contribuye a la inducción de brotes totales es T3 (BAP3).

Figura 4-5: Explantes de soja con desarrollo de brotes múltiples en los tratamientos con BAP más IBA **A.** T4 (BAP1IBA0.5); **B.** T5 (BAP1IBA1); **C.** T6 (BAP2IBA0.5); **D.** T7 (BAP2IBA1); **E.** T8 (BAP3IBA0.5) y **F.** T9 (BAP3IBA1). Las flechas indican los brotes múltiples.



En cuanto al tratamiento en donde más se producen brotes elongados se obtuvo que los efectos puros (solo BAP) son significativos como lo son también las interacciones (BAP3-IBA1) y (BAP2-IBA1). El análisis de los contrastes permite concluir que los tratamientos donde se producen mayor cantidad de brotes elongados son T1 (BAP1), T2 (BAP2) Y T3 (BAP3). El desarrollo de brotes no elongados se ve influenciado por la interacción entre el BAP e IBA y el tratamiento donde mayor se dan es T3 (BAP3).

En cuanto al tratamiento en donde más se producen brotes elongados se obtuvo que los efectos puros (solo BAP) son significativos como lo son también las interacciones (BAP3-IBA1) y (BAP2-IBA1). El análisis de los contrastes permite concluir que los tratamientos donde se producen mayor cantidad de brotes elongados son T1 (BAP1), T2 (BAP2) Y T3 (BAP3). El desarrollo de brotes no elongados se ve influenciado por la interacción entre el BAP e IBA y el tratamiento donde mayor se dan es T3 (BAP3).

En cuanto al tratamiento en donde más se producen brotes elongados se obtuvo que los efectos puros (solo BAP) son significativos como lo son también las interacciones (BAP3-IBA1) y (BAP2-IBA1). El análisis de los contrastes permite concluir que los tratamientos donde se producen mayor cantidad de brotes elongados son T1 (BAP1), T2 (BAP2) Y T3 (BAP3). El desarrollo de brotes no elongados se ve influenciado por la interacción entre el BAP e IBA y el tratamiento donde mayor se dan es T3 (BAP3).

Los reportes de estas metodologías establecidas en diferentes genotipos tienen como propósito aumentar su potencialidad en la producción de brotes para su uso en metodologías de transformación genética. En estos trabajos se hace uso de los RCV en una combinación de citoquininas y auxinas.

El efecto de las citoquininas en el cultivo *in vitro*, en este caso el BAP es fomentar el crecimiento de yemas axilares y reducir la dominancia apical, se observa por tanto que las tres concentraciones de BAP evaluadas inducen la mayor formación de brotes múltiples. Es necesario evaluar la concentración a la cual se da la inducción sin que esta afecte el desarrollo de los brotes, ya que altas concentraciones de citoquinina (0.5 -10 mg/L) inducen la formación de muchos brotes pequeños que no llegan a desarrollarse, adicionalmente pueden ocasionar formas inusuales de las hojas (George et al., 2008). Se observa que en el tratamiento T3 (BAP3) se dio la mayor formación de brotes elongados, pero también la mayor tasa de brotes no elongados.

La inducción de brotes múltiples a partir del nudo cotiledonar de semillas maduras de soya, involucra necesariamente el efecto de una citoquinina, algunas veces se reporta su acción combinada con una auxina. En este trabajo se quiso evaluar el efecto del BAP sólo y su efecto combinado con el IBA, tal como lo reporta Ma & Wu, 2007, quienes evaluaron el efecto del BAP, KIN e IBA en la regeneración de brotes y su efecto sobre el genotipo. En la metodología empleada por ellos se realiza un pretratamiento a la semilla, en su fase de germinación se adiciona al medio 0,4 mg/L de BAP, sin embargo en este trabajo esta variable se obvió para poder evaluar el efecto de los reguladores post germinación y evitar que se enmascara el efecto directo. En su estudio verificaron que los tres reguladores tienen un efecto significativo sobre la regeneración de los brotes y que el BAP es el que más contribuye en la respuesta. La mejor respuesta la obtuvieron con una concentración de 3,0 mg/L de BAP, 0,2 mg/L de IBA y 0,5 mg/L de KIN en uno de los genotipos, en donde un explante puede regenerar entre 30 y 35 brotes y obtener plántulas en un período de dos meses. Para el genotipo P34 se pudo registrar en el presente trabajo que el BAP igualmente es el regulador que más contribuye a la inducción de los brotes con una concentración de 3 mg/L, aunque no hubo una respuesta homogénea, si se registraron explantes que pueden producir hasta 22 brotes.

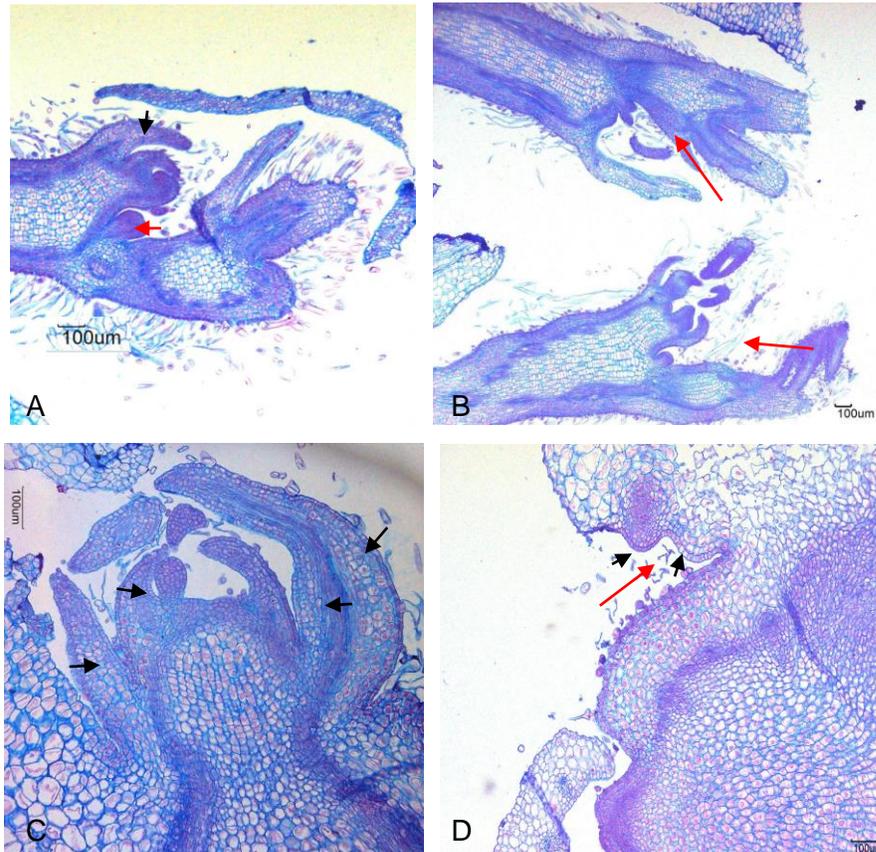
No se puede decir lo mismo acerca del efecto combinado con una auxina, en este caso el IBA, ya que no se registró un aumento en la respuesta. Los tratamientos en los que se combinó el BAP y el IBA redujeron su capacidad en la formación de brotes múltiples, se observó que el IBA tiene un posible efecto inhibitor sobre la inducción de brotes. Adicionalmente se observó una formación de estructuras similares a callos sobre el hipocótilo, aunque con una apariencia muy suelta y de color blanco. Habría que evaluar si esto está incidiendo sobre la formación de los brotes, ya que en los tejidos callosos hay alta concentración de auxinas y estas tienen efectos retardantes sobre la formación de brotes y raíces. Es importante elegir una auxina que a determinada concentración promueva el crecimiento sin inducir la formación de callos (George et al., 2008).

4.3 Estudio histológico

Se evaluó anatómicamente la formación de los brotes, para lo cual se realizaron cortes histológicos a nivel de la zona meristemática del nudo cotiledonar. En la figura 4-6 se muestran los cortes longitudinales realizados.

Se pueden observar diferentes estados de formación de los brotes a partir del nudo cotiledonar de semillas maduras de soya. A nivel de la zona central de los meristemas se observan las capas en división activa por la presencia de altas concentraciones de proteínas (zonas fuertemente teñidas de color morado). Se pueden observar brotes en los primeros estadios de desarrollo (flechas negras). Se puede ver como los cortes transversales realizados en zona del meristemo apical rompen la estructura y esta al fraccionarse genera varios centros en donde se generan brotes de novo (flechas rojas). No se distinguen zonas callogénicas, lo que se observa es la estimulación de las zonas meristemáticas a la formación de yemas y órganos de novo.

Figura 4-6. Cortes histológicos de las zonas meristemáticas de semillas en MIB. A. Meristemo de explante proveniente del tratamiento control; B. Meristemo de explante proveniente del tratamiento 1(BAP1); C. Meristemo de explante proveniente del tratamiento 2(BAP2); D. Meristemo de explante proveniente del tratamiento 3(BAP3).



4.4 Desarrollo de los brotes

Los brotes obtenidos en el MIB fueron separados del explante y subcultivados en medio MS sin reguladores. Luego de quince días se evaluó su desarrollo en cuanto al elongamiento del tallo, formación de hojas y raíces sobre una muestra de 20 brotes por tratamiento. En la Tabla 4-1 se muestran los diferentes estados de desarrollo obtenidos y el número de brotes.

El desarrollo de los brotes mostró hasta cuatro formas que se pudieron diferenciar y se definieron como: brotes que desarrollaron hojas y raíz, brotes que sólo desarrollaron hojas, brotes que sólo desarrollaron raíz, brotes que no se desarrollaron y brotes que murieron (Fig. 4-7). En los tratamientos T8 (BAP3IBA0.5) y T9 (BAP3IBA1) se obtuvo 14 y 15 brotes respectivamente que mostraron un buen desarrollo de hojas y raíces, sin embargo en estos tratamientos se obtuvo la menor formación de brotes en la fase de inducción.

Tabla 4-1: Estados de desarrollo de los brotes subcultivados en medio MS sin reguladores.

Tratamiento	Regulador de crecimiento (mg/L)	Desarrollados con hojas y raíz	Hojas Sin raíz	Raíz sin hojas	muertos/ No crecieron	Total
T0	0	12	0	2	6	20
T1	BAP1	5	1	1	13	20
T2	BAP2	11	6	0	3	20
T3	BAP3	6	3	0	11	20
T4	BAP1 IBA0,5	13	2	1	4	20
T5	BAP1 IBA1	7	11	1	1	20
T6	BAP2 IBA0,5	10	8	0	2	20
T7	BAP2 IBA1	8	11	0	1	20
T8	BAP3 IBA0,5	15	3	1	1	20
T9	BAP3 IBA1	14	2	2	2	20

Para el tratamiento T3 (BAP3) se observó que solamente seis brotes desarrollaron hojas y raíces, y 11 no se desarrollaron o murieron, siendo la menor respuesta entre los tratamientos. Es de anotar que en este tratamiento se dio la mayor inducción de brotes. En los tratamientos 2 (BAP2), 4(BAP1 IBA0,5) y 6(BAP2 IBA0,5) se observó también buen desarrollo de los brotes con formación de hojas y raíces con 11, 13 y 10 brotes respectivamente. Los tratamientos T5 (BAP1IBA1) y T7 (BAP2IBA1) mostraron mayor desarrollo de hojas pero no de raíz.

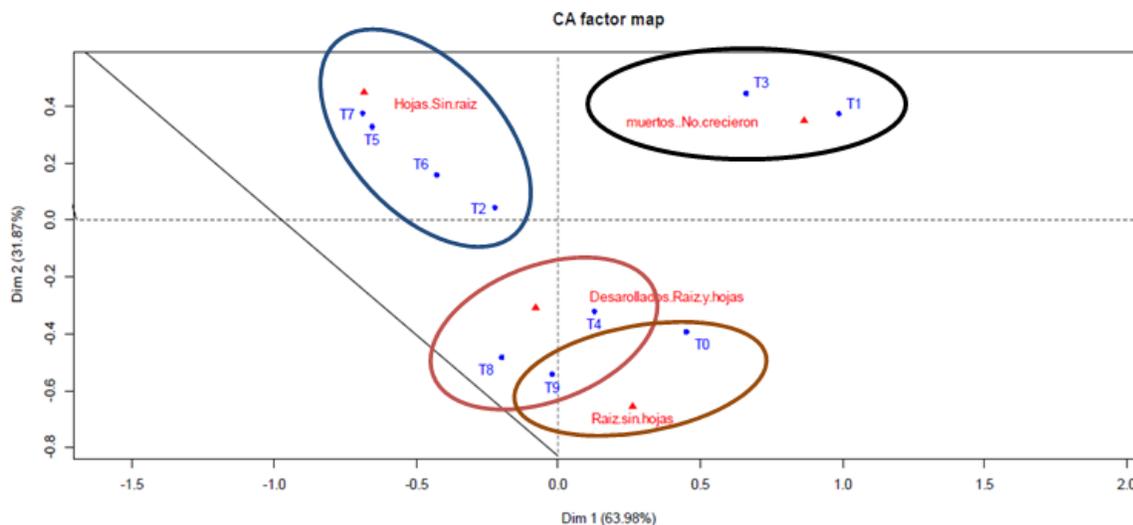
Figura 4-7: Estados de desarrollo de los brotes. **A.** Con hojas y raíz; **B.** Con hojas – sin raíz; **C.** Muerto; **D.** Sin hojas – con raíz.



Los resultados anteriores muestran que existe un efecto residual del BAP e IBA sobre el desarrollo de las plántulas. Los brotes obtenidos de tratamiento con BAP e IBA presentan un mejor desarrollo en cuanto al crecimiento y formación de hojas y raíces. Sin embargo esto no se observa tan claramente en los brotes obtenidos con altas concentraciones de BAP. Para evaluar la asociación entre los tratamientos de inducción de brotes y su posterior desarrollo se hizo un análisis multivariado con las cuatro formas encontradas y esto se representó con un plano factorial, que se muestra en la Gráfica 4-4.

De este análisis se deriva que se pueden asociar los brotes que desarrollaron hojas y raíces a los tratamientos T4 (BAP1IBA0,5); T8 (BAP3IBA0,5) y T9 (BAP3IBA1), con raíz sin hojas a los tratamientos T0 (Control) y T9 (BAP3IBA1). Por su parte los tratamientos T1 (BAP1) y T3 (BAP3) se asocian a aquellos que no crecieron mientras que los que desarrollan hojas y no desarrollan raíz están relacionados con los tratamientos T2 (BAP2), T5 (BAP1IBA1), T6 (BAP2IBA0,5) y T7 (BAP2IBA1).

Gráfica 4-4: Plano factorial para el desarrollo de las plántulas de soya obtenidas a partir de brotes.



La obtención de plántulas de soya a partir de este sistema de propagación se dio en un mes a partir de la siembra del explante en el medio MIB. Esta es una de las ventajas reportadas para este método y pudo ser reproducido para el genotipo P34.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se estableció un sistema de desinfección para semillas maduras de soya utilizando NaClO al 2% durante 15 minutos, en donde se obtuvo un 12 % de contaminación. De igual manera bajo estas condiciones se dio el mayor porcentaje de semillas germinadas en condiciones *in vitro*.

La inducción de brotes múltiples a partir del nudo cotiledonar de semilla madura de soya, se realizó mediante la evaluación de tres concentraciones de BAP (1 mg/L, 2 mg/L, y 3 mg/L) y su efecto combinado con dos concentraciones de IBA (0,5 mg/L y 1 mg/L). Se encontró que ambos reguladores aportan de manera significativa a la inducción de brotes, pero es el BAP el que mayor aporta a la inducción de los brotes. La combinación de BAP con IBA mostro tener un efecto inhibitorio en la formación de los brotes.

Se evaluó el desarrollo de los brotes obtenidos, se observaron cuatro estados: con hojas y raíces, sólo hojas sin raíz, sólo raíz sin hojas y muertos o no desarrollados. Se observó que los brotes con desarrollo completo de hojas y raíces provenían de los tratamientos T8 y T9 en donde se dio la menor inducción de brotes. El menor desarrollo, se dio en los brotes provenientes del tratamiento T3 (BAP3) que corresponde al tratamiento en donde se dio la mayor inducción de brotes.

Por tanto la variedad de soya colombiana soyica P34 responde a la inducción de brotes múltiples *in vitro*, siendo esta una característica cultivar dependiente se considera este como un resultado satisfactorio.

5.2 Recomendaciones

- Evaluar otros genotipos élite de soya, otros tipos de explante y de reguladores como el TDZ, para poder así tener más herramientas a la hora de implementarse en un sistema de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.
- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento vegetal que puedan ayudar al desarrollo de las plántulas luego de la inducción.
- Evaluar el desarrollo de los brotes en una mayor muestra para verificar los efectos residuales de los reguladores de crecimiento vegetal.

A. Anexo: Protocolo de histotecnica

Preparación de cortes en parafina utilizando HistochoiceClearingAgent

1. Fijación en FAA (Formol: ácido acético glacial: etanol = 1:1:18) por 48 horas.
2. 70% Etanol 24 horas.
3. 90% Etanol 4 horas.
4. (95%) 96% Etanol 4 horas.
5. 100% Etanol 4 horas.
6. 100% Etanol 4 horas.
7. 90 Etanol: 10 histochoice 4 horas.
8. 70 Etanol: 30 histochoice 4 horas.
9. 50 Etanol: 50 histochoice 4 horas.
10. 30 Etanol: 70 histochoice 4 horas.
11. 10 Etanol: 90 histochoice 4 horas.
12. Histochoice 100%, 2 cambios por 12 horas.
- 12a. Eliminar $\frac{1}{2}$ de histochoice y reemplazar por parafina a 60 °C, mezclar rápidamente, colocar en horno a 60 °C.
13. Cambios de parafina (x3, 12 horas).
14. Montar bloques.
15. Cortar en micrótopo y montar cortes en láminas con adhesivo de Mayer. Secar en horno por 3 a 4 días.

Preparación adhesivo de Mayer

1. Mezclar 50 cc de clara de huevo y 50 cc de glicerol.
2. Añadir 1 g de salicilato de sodio.
3. Agitar y filtrar (con algodón).

A. Doble tinción Astra-Blue -Fuchsina básica.

A partir del protocolo 1.

1. Xilol 3 min.
2. Xilol 3 min.

3. Xilol 50:50 Etanolabs. 3 min.
4. Xilol 50:50 Etanolabs. 3 min.
5. Etanol 100%, 2 min.
6. Etanol 95%, 2 min.
7. Etanol 70%, 2 min.
8. Etanol 50%, 2 min.
9. H₂O destilada, 2 min.
10. 1% Astra-Blue acidificado.
11. Lavado en H₂O destilada (2 min.).
12. 0,1 % fucsina básica etanólica.
- 12a. Lavado en H₂O destilada (15 segundos).
- F15. Etanol 50% 1 min.
- F16. Etanol 70% 1 min.
- F17. Etanol 95% 1 min.
- F18. Etanol 100% 1 min.
- F19. Etanol 100% 1 min.
- F20. Etanol 70:30 Xilol 2 min.
- F21. Etanol 50:50 Xilol 2 min.
22. Xilol 100%, 3 min.
23. Xilol 100%, 3 min. o hasta montaje (no más de 4 horas).
24. Colocación de citoresina y laminillas. Secar a T^o ambiente por 1 semana.

Astra-Blue acidificado: 1 g /100 mL de ácido tartárico 2%.

Fucsina básica etanólica: 0,1 g/100 mL Etanol 50%.

Bibliografía

- Abdelnour E, A., & Escalant, J. V. (1994). Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Catie.
- Bastidas, G., & Agudelo, O. (1992). Soyica P34 Variedad Mejorada de Altos Rendimientos para el Valle Geográfico del Río Cauca. Pegable de Divulgación No. 250. Palmira, Colombia: ICA.
- Cheng, T. Y., Saka, H., & Voqui D, T. H. (1980). Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letters* (19), 91-99.
- Christianson, M. L., Warnick, D. A., & Carlson, P. S. (1983). A Morphogenetically Competent Soybean Suspension Culture. *Science* , 222 (4624), 632-634.
- Donaldson, P. a., & Simmonds, D. H. (2000). Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Reports*, 19(5), 478–484. doi:10.1007/s002990050759
- Embrapa-CNPso. (1995). El cultivo de la soya en los trópicos. Mejoramiento y Producción. FAO.Roma.
- Fakhrai, H. K., & Fakhrai, F. (1990). Hormonal Control of Growth and Development. En J. W. Pollard, & J. M. Walker, *Methods in Molecular Biology Plant Cell and Tissue Culture* (págs. 49-56).
- FAO. (2012). FAOSTAT3. Recuperado el 8 de Enero de 2014, de <http://faostat3.fao.org/>
- Fenalce. (2011). FENALCE. Recuperado el 4 de Enero de 2014, de FENALCE: <http://www.fenalce.org/archivos/Soya11.pdf>
- Finer, J. J., & Nagasawa, A. (1988). Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 15, 125–136.
- Fundallanura. (2012). *Importancia del cultivo de la soya en el desarrollo agrícola de la Altillanura Colombiana*. Puerto López.

- Galussi, A. (2007). Cuestiones sobre semillas duras de leguminosas forrajeras. Análisis de semillas. Pp: 40-43.
- García, E., López, M., Valencia, R., Garzón, V., Navas, G., Salamanca, C., ... Bernal, J. (2006). *Soya (Glycine max (L.) Merrill Alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquia colombiana*. Villavicencio, Meta: CORPOICA.
- Hinchee, M. A. W., Connor, D., Newel, C., McDonnell, R., Sato, S., Gasser, C., ... Horsch, R. (1988). Production of Transgenic Soybean Plants using Agrobacterium-mediated DNA Transfer. *Biotechnology*, 6, 915 – 922.
- ICA. (1994). El cultivo de la soya. Palmira.
- ISTA Rules International Seed Testing. (2006). A study of lucerne seed development and some aspects of hard seed content. *Seed Science and Technology* , 10, 179-186.
- Jiménez, R., Andrade, C., Triviño, C., Arias, M., Espinoza, A., Peña, L., y otros. (2005). Manual del Cultivo de la Soya. Guayaquil - Ecuador.
- Kaneda, Y., Tabei, Y., Nishimura, S., Harada, K., Akihama, T., & Kitamura, K. (1997). Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Reports*, 17(1), 8–12. doi:10.1007/s002990050342
- Komatsuda, T., Lee, W., & Oka, S. (1992). Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28(1), 103–113. doi:10.1007/BF00039922
- Lazzeri, P. A. (1987). Soybean somatic embryogenesis : Effects of hormones and culture manipulations *, 208(86), 197–208.
- Lazzeri, P. A., Hildebrand, D. F., & Collins, G. B. (1985). A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Molecular Biology Reporter*, 3(4), 160–168. doi:10.1007/BF02886752
- Li, J., & Grabau, E. (1996). Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars, (Table 1), 87–89.
- Loganathan, M., Maruthasalam, S., Shiu, L. Y., Lien, W. C., Hsu, W. H., Lee, P. F., ... Lin, C. H. (2010). Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot

- tip. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(3), 265–273. doi:10.1007/s11627-009-9263-1
- Ma, X.-H., & Wu, T.-L. (2007). Rapid and efficient regeneration in soybean [Glycine max (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(2), 209–216. doi:10.1007/s11738-007-0109-3
- Meurer, C. A., Dinkins, R. D., & Collins, G. B. (1998). Factors affecting soybean cotyledonary node transformation, (July), 180–186.
- Meurer, C. A., Dinkins, R. D., Redmond, C. T., Mcallister, K. P., Tucker, D. T., Walker, D. R., ... Collins, G. B. (2001). Embryogenic response of multiple soybean [glycine max (L .) merr .] cultivars across three locations, (February), 62–67. doi:10.1079/IVP2000125
- Minuzzi, A., Mora, F., Antônio, M., Rangel, S., Lucca, A. De, & Scapim, A. (2007). Características fisiológicas , contenido de aceite y proteína en genotipos de soya , evaluadas en diferentes sitios y épocas de cosecha , Brasil physiologic characteristics , oil and protein content in soybean genotypes across site and harvest period , Brazil, 67(4), 353–361.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* , 15, 473-97.
- Olhoft, P. M., Bernal, L. M., Grist, L. B., Hill, D. S., Mankin, S. L., Shen, Y., ... Jones, T. (2007). A novel Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation method of soybean [Glycine max (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(6), 536–549. doi:10.1007/s11627-007-9050-9
- Olhoft, P. M., Flagel, L. E., Donovan, C. M., & Somers, D. a. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216(5), 723–35. doi:10.1007/s00425-002-0922-2
- Olhoft, P. M., & Somers, D. A. (2001). L -Cysteine increases Agrobacterium - mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20(8), 706–711. doi:10.1007/s002990100379
- Paz, M. M., Shou, H., Guo, Z., Zhang, Z., Banerjee, A. K., & Wang, K. (2004). Assessment of conditions affecting Agrobacterium -mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant, 167–179.

- Phillips, G. C., & Collins, G. B. (1981). Induction and development of somatic embryos from cell suspension cultures of soybean *. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1(November), 123–129.
- Radhakrishnan, R., Ramachandran, a., & Ranjitha Kumari, B. D. (2009). Rooting and shooting: dual function of thidiazuron in *in vitro* regeneration of soybean (*Glycine max*. L). *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(6), 1213–1217. doi:10.1007/s11738-009-0356-6
- Rajasekaran, K., & Pellow, J. W. (1997). Somatic embryogenesis from cultured epicotyls and primary leaves of soybean (*Glycine max* (L.) merrill). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33(June), 88–91.
- Rodrigues, L. R., Oliveira, M. S., Mariath, J. E. A., & Helena, M. (2005). Histology of embryogenic responses in soybean anther culture, 129–137.
- Rossi, C., & González, S. (2006). Problemas en la calidad de semillas de soja. *Revista INIA*, (9), 34–36.
- Sairam, R. V, Franklin, G., Hassel, R., Smith, B., Meeker, K., Kashikar, N., ... Goldman, S. L. (2003). A study on the effect of genotypes , plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus, 79–85.
- Samoylov, V. M. (1998). Soybean [*Glycine max* (L .) merrill] embryogenic cultures : the role of, 4(March), 8–13.
- Santos, K. G. B., Mundstock, E., & Bodanese-Zanettini, M. H. (1997). Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Reports*, 16(12), 859–864. doi:10.1007/s002990050334
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., ... Jackson, S. a. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), 178–83. doi:10.1038/nature08670
- Shan, Z., Raemakers, K., Tzitzikas, E. N., Ma, Z., & Visser, R. G. F. (2005). Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Plant Cell Reports*, 24(9), 507–12. doi:10.1007/s00299-005-0971-7
- Tian, L. N., Brown, D. C. W., Voldeng, H., & S, C. K. I. (1994). *In vitro* response and pedigree analysis for somatic embryogenesis of long-day photoperiod adapted soybean, 269–273.

Wright, M. S., Williams, M. H., Pierson, P. E., & Carnes, M. G. (1987). Initiation and propagation of *Glycine max* L . Merr .: Plants from tissue-cultured epicotyls Introduction Advances have been made recently in the recovery of whole plants from cultured immature cotyledons [4 , 13] and a single plant was obtained from soy, 90, 83–90.

Xue, R.-G., Zhang, B., & Xie, H.-F. (2007). Overexpression of a NTR1 in transgenic soybean confers tolerance to water stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(2-3), 177–183. doi:10.1007/s11240-007-9231-6

Referencias de internet

ICA. (2013). www.ica.gov.co/. Recuperado el 2013

Valencia, R (s.f.). www.corpoica.org.co