

Cultivo de tejidos y transformación genética en *Glycine max* (L.) Merrill

J.L. Pérez-Pérez^{1,2}

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo, km 17.5, Bayamo, Granma, Cuba. CP 85100. e-mail: jperez@udg.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830

RESUMEN

En este trabajo se realiza una breve revisión sobre los antecedentes del cultivo de tejidos y la transformación genética en el cultivo de la soya, así como una introducción al origen, distribución e importancia del cultivo. Se pretende poner a disposición del lector un compendio de resultados como preámbulo para el desarrollo de futuras investigaciones en la mejora genética de este cultivo por métodos biotecnológicos.

Palabras clave: biotecnológicos, cultivo, *in vitro*, mejora genética, soya

ABSTRACT

This work is a brief overview on the background of *in vitro* tissue culture and genetic transformation of soybean, as well as a brief introduction to the origin, distribution and importance of the crop. It is also aimed to present a series of worldwide results as a preamble to the development of future researches on genetic improvement of this crop using biotechnological methods.

Key words: biotechnology, culture, *in vitro*, genetic improvement, soybean

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

IMPORTANCIA DEL CULTIVO

MICROPROPAGACIÓN

Embriogénesis somática

Organogénesis

MEJORAMIENTO GENÉTICO

MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*

Biobalística

Electroporación

Microinyección

MARCADORES DE SELECCIÓN

CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

En el contexto mundial, los granos constituyen un importante grupo de alimentos indispensables para el logro de una dieta balanceada, toda vez que aportan energía, carbohidratos, proteínas y otros elementos esenciales para la nutrición humana y animal. Se cultivan en diferentes regiones, incluyendo América Latina y el Caribe, y se

han convertido en una de las principales líneas de producción en el mundo (Penichet, 2008).

Los altos precios de los alimentos en el mundo, en gran parte motivados por la asignación de los cereales a la producción de biocombustibles, obligan a las naciones pobres a exorbitantes desembolsos financieros, de ahí que algunas de ellas,

incluyendo Cuba, experimenten soluciones alternativas a favor de la sustitución de importaciones.

En este trabajo se realiza una breve reseña sobre los antecedentes del cultivo de tejidos y la transformación genética en la soya, así como una breve introducción al origen, distribución e importancia del cultivo. Se pretende poner a disposición del lector un compendio de resultados como preámbulo para el desarrollo de futuras investigaciones en la mejora genética de este cultivo por métodos biotecnológicos.

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

La familia de las leguminosas (*Leguminosae*) es muy extensa con alrededor de 643 géneros y 18 000 especies, agrupados en 40 tribus que se encuentran distribuidas en regiones tropicales y templadas del planeta. La tribu Phaseoleae [frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol caupí (*Vigna unguiculata*) y frijol de soya (*Glycine max*)], considerado el grupo de mayor importancia económica con el 75% de las legumbres comerciales de todo el mundo (Broughton *et al.*, 2003).

El cultivo de la soya, se ubica en el Reino: *Plantae*, Clase: *Dicotyledoneae*, Subclase: *Archichlamideae*, Orden: Rosales, Familia: *Leguminosae*, Género: *Glycine*, Especie: *G. max* (L.) Merrill, Nombres comunes: soja, soya, soybean, entre otros (Gazzoni, 1994).

En el género *Glycine* han ocurrido duplicaciones seguido de reordenamientos genómicos dirigidos a la diploidización; en consecuencia el número cromosómico en *G. max* es $2n = 40$, mientras, sus parientes silvestres $2n = 40$ (*G. soja* Siebold & Zucc.), $2n = 80$ [*G. tabacina* (Labill.) Benth.], $2n = 38, 40, 78$ y 80 (*G. tomentella* Hayata). La especie *G. max* presenta un genoma de tamaño relativamente grande de aproximadamente 1 100 Mbp organizados en unos 20 pares de cromosomas (McClean *et al.*, 2008).

El cultivo de la soya (*Glycine max* L. Merrill), es muy diferente a su ancestro silvestre, *Glycine ussuriensis*, que eran plantas rastreras que crecían en el Este de Asia. Probablemente 4 000 a 5 000 años atrás en el norte y centro de China, era cultivada en el valle del río Yang-Tze, en la región de Manchuria y en zonas

adyacentes a Rusia, Corea y Japón donde crecía de manera silvestre (Gazzoni, 1995).

El primer documento sobre este cultivo, es una crónica inédita escrita por el emperador Chino, Sheng-Nung, en el año 2838 A.C en su libro «Pen Ts'ao Kong Mu». También se cita en manuscritos posteriores, considerada una de las Fabáceas más importante y uno de los cinco granos sagrados y esenciales en la civilización China, junto al arroz, mijo, centeno y el trigo (Liu, 1999).

En Europa se conoció de su existencia en 1712, por medio del botánico alemán Engelberg Kaempfer, quien residía en Japón entre 1681-1692; las primeras semillas fueron enviadas por misioneros Chinos y sembradas en 1740 en el Jardín Botánico de París. En 1765 se introdujo en EUA (Georgia) desde China y vía Londres. En 1790 se cultivó en el Jardín Botánico Real, Kew, Inglaterra (Ridner, 2006).

Se conoce que llegó a Cuba en 1904 procedente de Estados Unidos y fue sembrada en la Estación Agronómica de Santiago de las Vegas en La Habana (Socorro y Martín, 1989).

IMPORTANCIA DEL CULTIVO

Constituye uno de los diez cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial, por ser la fuente más importante de concentrados proteicos y aceite vegetal. Como leguminosa, es capaz de asociar su sistema radicular con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico para la biosíntesis de moléculas aminadas, como bases nitrogenadas, aminoácidos y coenzimas, reduciendo la utilización de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Castro *et al.*, 1993; Ponce *et al.*, 2002).

Su composición proteica es aproximadamente 30-50%, grasas 20% y carbohidratos 24%, además contiene vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, E, K, A, D y C), y minerales como: hierro, fósforo, magnesio, zinc, cobre y calcio, además contiene entre 1-5% de lecitina (Ridner, 2006; Jain *et al.*, 2008; Radhakrishnan y Ranjitha Kumari, 2009).

Además, se emplea en la extracción de aceite para consumo humano y como base para conformar diversos productos, como son: barnices, colas, esmaltes, grasas industriales,

lubricantes y tintas (Ortiz *et al.*, 2004). Además adquiere relevancia económica por sus múltiples usos, en la industria alimenticia se utiliza en el 60% de los alimentos manufacturados, empleada como complemento dietético, derivados lácteos y forma parte de comestibles cárnicos.

Para Cuba, constituye un cultivo de importancia económica, por ser una de las fuentes más promisorias de concentrados proteicos, aceite vegetal y lecitina, rubros importados y que mantienen de forma sostenida elevados precios en el mercado internacional (Marrero y de los Ángeles, 2003).

MICROPROPAGACIÓN

El cultivo *in vitro* es una herramienta útil que facilita la introducción de variabilidad genética y la producción de híbridos mejorados con tolerancia a patógenos y algunas condiciones edáficas. Sin embargo, muchas leguminosas no se logran regenerar *in vitro* (Chandra y Pental, 2003).

La soya, es una de las leguminosas más estudiada en cultivo de tejidos, donde los sistemas de regeneración de plantas, han sido básicamente la embriogénesis somática a partir de semillas inmaduras u organogénesis a partir de cotiledones maduros (Radhakrishnan y Radhakrishnan, 2007).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación de plantas y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Además, ha recibido mayor atención que otros métodos de regeneración, debido que permite producir un mayor número de plantas en un periodo relativamente corto (Wu *et al.* 2007).

La embriogénesis somática, es definida como la reproducción asexual en el cual una estructura bipolar similar a un embrión cigótico es inducido a partir de una célula no cigótica sin conexión vascular con el tejido materno (Namasivayam, 2007).

Uno de los primeros trabajos en el establecimiento de tejidos embriogénicos en soya fue realizado por Beversdorf y Bingham (1977) a partir de suspensiones celulares de callos obtenidos de hipocótilos y cotiledones. Los callos fueron establecidos en medio de cultivo líquido con altas concentraciones de sacarosa y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), sin lograr la regeneración de plantas completas. Seguidamente, Christianson *et al.* (1983) en su estudio, emplearon suspensiones celulares de pequeñas fracciones de callo formados de ejes embrionarios y cotiledones inmaduros, de los cuales lograron regenerar plantas completas.

Diferentes tipos de explantes han sido evaluados con el objetivo de inducir callos potencialmente embriogénicos, entre ellos: hipocótilos, cotiledones inmaduros, nudos cotiledonales y raíces, con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo (Bueno *et al.*, 2004; Bolívar, 2006).

Tras años de incesante investigación, Finer y Nagasawa (1998), lograron un protocolo para la inducción de tejidos embriogénicos a partir de cotiledones inmaduros en soya. Para ello, tomaron vainas con semillas inmaduras de 7-14 días posterior a la floración, las cuales fueron esterilizadas y seleccionados los cotiledones con un tamaño entre tres a cinco milímetros de longitud, para la inducción de embriones somáticos.

Por su parte, Bonacin *et al.* (2000) indujeron y multiplicaron embriones somáticos de cotiledones inmaduros mantenidos en ácido naftalenacético (ANA). Estos mismos autores, refieren que con ANA (10mg l⁻¹) y pH 7.0 lograron la mayor producción de embriones somáticos y no existieron diferencias significativas al variar la intensidad luminosa.

Igualmente, Gi *et al.* (2001) obtuvieron callos embriogénicos en el borde de cotiledones inmaduros en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 2,4-D (40mg l⁻¹), mientras que la producción de agregados embriogénicos fue lograda en suspensiones celulares con 2,4-D (5.0mg l⁻¹) y asparagina (0.5mg l⁻¹). Este protocolo permitió la germinación del 90% de los embriones somáticos.

Varios autores, entre los que se destacan Lippmann y Lippman (1984), Komatsuda *et al.* (1991) y Hofmann *et al.* (2004), plantearon que la iniciación de estructuras embriogénicas sobre los cotiledones fue mayor con 2-3% de sacarosa y con empleo de 2,4-D.

Trabajando en soya con la variedad 'Jack', Moon y Hildebrand (2003), indujeron y multiplicaron embriones somáticos en medio de cultivo con sales MS, vitamina B₅ y 2,4-D (5.0 y 40mg l⁻¹); mientras que en medio de cultivo líquido sin reguladores de crecimiento y medio de cultivo semisólido con maltosa (6.0%) y carbón activado (0.5%), lograron la maduración. En este trabajo, el porcentaje de regeneración fue relativamente bajo; no obstante, el mayor valor (35%) fue alcanzado cuando los embriones fueron secados al aire.

El 2,4-D no ha sido la única auxina usada para la producción de embriones somáticos en soya. Se ha descrito la formación de raíces adventicias sobre embriones somáticos con empleo del ácido naftalenacético (Lazzeri *et al.*, 1987); estos embriones somáticos se caracterizaron por ser compactos, opacos, de color verde claro y formados generalmente en el borde de los cotiledones (Hofmann *et al.*, 2004).

Es conocido que la regeneración indirecta vía formación de callo, es más ventajosa que la regeneración directa para la transformación genética al ser más efectiva la selección de las células transformadas. Sin embargo, los esfuerzos realizados para regenerar plantas por esta vía, han tenido bajos resultados sin lograr la regeneración de plantas completas en esta especie (Hu y Wang, 1999).

El tipo de explante empleado como material vegetal inicial para la formación de callo, es tan importante como el tipo y concentración del regulador de crecimiento. Por ejemplo, Coelho *et al.* (2003), trabajando con *Glycine wightii*, usaron hipocótilos y cotiledones de semillas germinadas *in vitro*, mantenidos a la oscuridad a 28°C y encontraron que los cotiledones requerían para la inducción y subcultivo de los callos 2,4-D (1.0 mg l⁻¹), kinetina (0.1 mg l⁻¹) y sacarosa (3%), mientras que los hipocótilos requerían el doble de 2,4-D para el subcultivo.

Los tejidos pueden permanecer en estado embriogénicos indefinidamente. La

embriogénesis somática secundaria en soya, surge de la porción apical o terminal de los embriones primarios, lo cual puede ser altamente sensible en tejidos cotiledonales. En el caso de soya, esto es posible en medio de cultivo líquido con 5.0mg l⁻¹ (Finer y Nagasawa, 1988) y en medio de cultivo semisólido con 2,4-D (20"40mg l⁻¹) (Finer, 1988; Wright *et al.*, 1991).

Sin embargo, Hiraga *et al.* (2007) observaron en la variedad Fayette una reducción en la formación de embriones somáticos cuando emplearon 2,4-D (60-80mg l⁻¹), mientras en la variedad Japonesa Susuyutaka, se alcanzó la máxima eficiencia de inducción, demostrando diferencias en la adaptabilidad al cultivo de tejido, entre las variedades asiáticas y las americanas.

Varios trabajos describen el efecto beneficioso de diferentes tipos de aminoácidos en el cultivo *in vitro* de soya. La glutamina, es conocida por incrementar el tamaño de los embriones e incrementar la síntesis de aceite y proteínas de reserva. La metionina, también ha sido descrita por su utilidad en la estimulación del crecimiento. Al comparar el efecto entre la asparagina y glutamina a una concentración de 1.0g.l⁻¹, se evidenció que la glutamina tuvo un mejor efecto al producir embriones somáticos de mayor tamaño en etapa cotiledonal (Schmidt *et al.*, 2005).

Durante la histodiferenciación y maduración de embriones somáticos en soya, la adición de glutamina al medio de cultivo líquido, favorece la obtención de embriones somáticos más grandes, maduros en 35 días, que germinan rápido y vigorosos, siendo la mejor combinación 30mM de glutamina y 1.0mM de metionina (Schmidt *et al.*, 2005).

Una modificación del medio de cultivo FN, denominado FN-Lite, fue desarrollada para mejorar la multiplicación en suspensiones celulares de soya. Samoylov *et al.* (1998) adicionaron 27.9mM de KNO₃ (eliminaron el NH₄NO₃), 3.5mM de (NH₄)₂SO₄, 1.4mM de KH₂PO₄, 2.0mM de CaCl₂ y sacarosa al 3% y obtuvieron tejidos embriogénicos de alta calidad, crecimiento rápido, suave, denso, nodulares y coloración verde.

Eventualmente, en soya la suspensiones celulares forman agrupamientos de embriones somáticos en estado globular con un diámetro

de 0.5–8.0mm, los cuales surgen de la superficie apical de los embriones somáticos primarios, siendo posible regenerar plantas directamente de estos embriones somáticos (Finer y Nagasawa, 1988).

La inducción de la histodiferenciación fue descrita por Bailey *et al.* (1993). Embriones en estado globular fueron transferidos a medio de cultivo semisólido (MSM6AC) sales MS, vitaminas B5, 6% de maltosa, 0.5% de carbón activado, 0.2% de Gelrite y pH 5.8, para la diferenciación de los embriones somáticos. Durante la maduración el carbón activado ayuda a eliminar las auxinas, así como al desarrollo embrionario (Ebert y Taylor, 1990). Después de 28 días, los embriones somáticos con diferenciación hipocótilo/raíz y brotes, fueron transferidos a medio de cultivo MSM6 (MSM6AC con carbón activado) para la maduración. La maltosa, usada en lugar de la sacarosa, permite un mayor desarrollo embrionario y conversión durante la maduración (Finer y McMullen, 1991).

Alternativamente, es posible formar embriones somáticos secundarios en soya a partir de embriones somáticos primarios en medio de cultivo MS con 2,4-D (40mg l⁻¹) o ANA (10mg l⁻¹), finalizando el ciclo de la embriogénesis somática (Liu *et al.*, 1992).

La embriogénesis secundaria es limitada por la diferenciación y maduración de los embriones somáticos cuando la auxina es eliminada del medio de cultivo. Finer y Nagasawa (1988) trabajando en soya con la variedad 'Fayette', iniciaron el cultivo de suspensiones celulares con 20"50mg de callos altamente embriogénicos en un matraz con 35ml de medio de cultivo 10A40N (conocido como FN) con sales MS (nitrógeno remplazado con 10mM de NH₄NO₃ y 30mM de KNO₃), vitaminas B5, sacarosa al 6%, 5.0mg l⁻¹ de 2,4-D y 15mM de glutamina, eventualmente sustituido por 5.0mM de asparagina para prevenir necrosis del tejido.

Las diferentes respuestas de los cultivares a las condiciones de cultivo son el principal obstáculo para la regeneración de soya vía embriogénesis somática. Por ello, un cultivar que presenta una alta capacidad de inducción de embriones somáticos no necesariamente es el que muestra una mayor capacidad de

conversión de embriones somáticos en planta (Santos *et al.*, 1997).

De forma similar, el tamaño del explante influye en la formación de embriones somáticos. Al evaluar diferentes tamaños de cotiledones inmaduros en soya para la inducción de embriones somáticos, Klink *et al.* (2008), observaron que cotiledones menores de un milímetro y mayores de cinco milímetros, no desarrollaban embriones somáticos, alcanzando a los 30 días de cultivo un 90% de los explantes con formación de embriones somáticos en cotiledones de tres milímetros en la variedad Williamns con respecto a un 45% en la variedad MiniMax.

Organogénesis

La organogénesis en soya involucra la regeneración de brotes directamente de células meristemáticas o de tejidos próximos a estas. Estos brotes pueden surgir de los tejidos de los explantes con o sin una fase de callo. Además es menos dependiente del genotipo en comparación con la embriogénesis somática ya que cada planta tiene meristemas axilares capaces de regenerar. Sin embargo, la respuesta es diferente entre los cultivares, debido al vigor, crecimiento de los explantes *in vitro* y su sensibilidad a los componentes del medio de cultivo (Olhoft y Somers, 2007).

Las primeras plantas de soya fueron regeneradas mediante el cultivo *in vitro* de secciones de hipocotilos, con posterioridad diversos tipos de explantes han sido utilizados para la regeneración de plantas vía organogénesis directa. Estos explantes primarios incluyen segmentos de nudo cotiledonal, epicotilos, segmentos de hojas, cotiledones, plúmulas, hipocotilos y ejes embrionarios.

El tiempo de regeneración de plantas a partir de células meristemáticas axilares o apicales, es mucho más corto que en la embriogénesis somática. Los brotes primarios, se forman alrededor de una semana en medio de cultivo de inducción, y la formación de plantas es generalmente al cabo de un mes. Debido al corto tiempo de cultivo, la fertilidad de las plantas regeneradas no suele ser afectada, de aquí que muchos protocolos de regeneración en soya, se centran en el establecimiento de

múltiples brotes en células meristemáticas axilares (Olhoft y Somers, 2007).

En muchas especies la regeneración vía callo es generalmente ventajosa sobre la regeneración directa en la transformación de plantas durante la selección de plantas transgénicas. Sin embargo, durante los últimos 30 años, han sido limitados los eventos de regeneración de a partir de callos organogénicos de soya (Hong *et al.*, 2007).

Aunque la inducción de callo organogénico ha sido lograda mediante el cultivo de cotiledones inmaduros, el desarrollo de yemas adventicias y el crecimiento de estas yemas ha sido ineficiente, sugiriendo que solo parte de estos callos son competentes para la regeneración. Sairam *et al.* (2003) obtuvieron callo organogénico y la diferenciación de brotes a partir del nudo cotiledonal de plántulas jóvenes.

En trabajo realizado por Shan *et al.* (2005) determinaron que explantes obtenidos de plántulas preparadas con Tidiázurón (TDZ) incrementaron el número de brotes desarrollados. Kaneda *et al.* (1997) lograron en la variedad 'Bonminor' formar brotes a partir de hipocótilos como explante, en medio de cultivo MS, sin embargo, Shan *et al.* (2005) trabajando con el mismo explante no lograron formar brotes en la variedad 'White hilum'.

MEJORAMIENTO GENÉTICO

El trabajo de mejoramiento genético es una necesidad constante de la agricultura, con el fin de obtener variedades mejor adaptadas al medio ambiente, tanto a través de los métodos clásicos de mejora, como por los biotecnológicos, nucleares y de fitomejoramiento participativo.

En 2008, la superficie global dedicada a la producción de cultivos transgénicos mantuvo su incremento hasta alcanzar los 125 millones de hectáreas, partiendo de los 114.3 millones de 2007. La soya transgénica continuo siendo el principal cultivo transgénico en 2008, con 65.8 millones de hectáreas que representan el 53% de la superficie de cultivos transgénicos a nivel mundial. La tolerancia a herbicidas en soya, maíz, canola, algodón y alfalfa ocupó el 63% de los 125 millones de hectáreas de cultivo transgénicos de todo el mundo (James, 2008).

En soya, un gran número de protocolos de transformación genética han sido establecidos durante años, vía *Agrobacterium tumefaciens* y la biobalística. Sin embargo, no se ha logrado como en otros cultivos una metodología de transformación eficiente (Stacey *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2009).

Además de la transformación nuclear, la transformación de cloroplastos se emplea para la síntesis de proteínas foráneas en plantas (Maliga, 2004). Basados en este principio, Dufourmantel *et al.* (2004) obtuvieron plantas transplastómicas de soya, lo cual tiene como beneficios la transmisión de transgenes a través de tejido materno y posiblemente mayor expresión de genes que mediante transformación nuclear.

MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*

Varios autores refieren la transformación genética en soya mediante *A. tumefaciens*, entre los que se encuentran Hinchee *et al.* (1988) quienes transformaron hojas cotiledonales para que expresaran resistencia a kanamicina y tolerancia a glifosato.

Los protocolos de transformación mediante *Agrobacterium* en embriones somáticos de soya, en su mayoría emplean cotiledones inmaduros y no buscan una multiplicación significativa de los embriones somáticos secundarios en medio de cultivo líquido (Ko *et al.*, 2004).

En este sentido, Parrott *et al.* (1989) emplearon cotiledones inmaduros de aproximadamente cinco milímetros de longitud de 14 genotipos. Los explantes fueron cortados y colocados con la región adaxial (plana) en medio de cultivo semisólido N10 (sales MS, vitaminas B₅, 1.5% de sacarosa, 10mg l⁻¹ de ANA, 0.2% de Gelrite, pH 5.8) y co-cultivados a la oscuridad con *A. tumefaciens* a 28°C. Las células transformadas fueron seleccionadas con geneticina (10mg l⁻¹) (G418) durante 30 días en medio de cultivo N10.

Igualmente, Yan *et al.* (2000) para la transformación y producción de embriones

somáticos del cultivar 'Jack', utilizaron cotiledones inmaduros de 4 a 10mm de longitud y obtuvieron expresión *GUS* y supervivencia de los explantes. Aunque de cuatro a siete milímetros es el tamaño óptimo de los cotiledones para inducir embriones somáticos, según Finer (1988), cotiledones de ocho milímetros de longitud sobrevivieron a la infección de *Agrobacterium* ($DO_{600} = 0.2-1.0$) (Yan *et al.*, 2000; Ko y Korban, 2004).

En la selección de células transgénicas en medio de cultivo semisólido de inducción y maduración, se requieren nueve meses para llevar las plantas a campo, lo cual puede ser reducido de 4 - 5 meses con una fase de multiplicación en medio de cultivo líquido. La capacidad de producir plantas transgénicas en un plazo de cinco meses fue en gran parte debido al empleo del agente de selección higromicina B (Ko *et al.*, 2003).

Se ha demostrado incrementos en la eficiencia de transformación en cotiledones de soya cuando son sometidos al método de transformación SAAT (Sonicación Asistida con *Agrobacterium tumefaciens*). La sonicación, produce microheridas en la superficie de cotiledones seguido de incrementos en la infección de la bacteria al producir compuestos que estimulan el crecimiento de la bacteria bajo condiciones aeróbicas (Trick y Finer, 1998; Droste *et al.*, 2000; Finer y Finer, 2000).

Diferentes publicaciones refieren a la eficiencia de transformación en soya. Zeng *et al.* (2004) describieron una eficiencia de transformación en la variedad 'Williams-82' de 0.1 a 5.9% usando *A. tumefaciens* y como explante el nudo cotiledonal. También, Paz *et al.* (2004) obtuvieron eficiencias de transformación de 2.0 a 6.3% en las variedades 'Williams 79' y 'Williams' respectivamente empleando *A. tumefaciens*, nudo cotiledonal y glufosinato como agente de selección. Con posterioridad, Tran Thi Cuc Hoa (2008) informaron una eficiencia de transformación en soya en un rango de 1.0 a 5.0%.

Mediante el método de la media semilla «*half seed*», Paz *et al.* (2006) alcanzaron una mayor eficiencia de transformación en comparación con el método del nudo cotiledonal. Por otra parte, Liu *et al.* (2008) obtuvieron una eficiencia de transformación de 3.8 a 11.7% en cinco

variedades de soya chinas usando *A. tumefaciens* e higromicina como agente de selección.

Biobalística

Entre los pioneros en la transformación genética mediante biobalística en soya están McCabe *et al.* (1988) quienes transformaron tejidos meristemáticos de ejes embrionarios de semillas inmaduras. Estos una vez transformados fueron cultivados *in vitro* para inducir la formación de embriones somáticos de los que se desarrollaron plantas que expresaban y heredaban el gen *nptII* de resistencia a la kanamicina.

La biobalística permite la integración de múltiples copias de transgenes en el genoma de plantas transformadas existiendo referencias de hasta 100 copias de un transgén (Reddy *et al.*, 2003). En soya es comúnmente usada para la transformación de suspensiones celulares embriogénicas (Finer y McMullen, 1991) y brotes meristemáticos (Aragão *et al.*, 2000).

En el trabajo publicado por Bobrowski y Dode (2006), se evaluó el efecto de diferentes presiones de helio y concentraciones de manitol como pre-acondicionamiento osmótico en embriones somáticos de soya variedad 'Bragg' obtenidos a partir de cotiledones inmaduros. Los tejidos fueron bombardeados con el plásmido *pGusHyg*, que contenía el gen *GUS* y el marcador de selección *hpt*. En todas las combinaciones, fue observado un aumento en la expresión transitoria cuando los tejidos embriogénicos fueron pre-acondicionados con 0.25M de manitol por una hora y presión de gas helio de 300psi (*Pounds per Square Inch*).

El primer trabajo de transformación genética de soya mediante bombardeo de partículas en masas embriogénicas antes de la inoculación con *Agrobacterium* en las variedades 'IAS5' y 'Bragg', fue desarrollado por Droste *et al.* (2000), quienes describen un nuevo método que combina las ventajas de la embriogénesis somática y la transferencia de genes mediante un sistema integrado de transformación.

Mediante biobalística Yemets *et al.* (2008) transformaron callos embriogénicos en la variedad de soya Kiev-91, logrando una

frecuencia de transformación de 5-6%, empleando como marcador de selección un gen mutante de la tubulina que le confiere resistencia a las plantas frente al herbicida dinitroaniline.

Electroporación

En la literatura consultada se hace referencia al uso de esta tecnología en la producción de plantas transgénicas de soya. En el trabajo de Widholm *et al.* (1992) se obtuvieron protoplastos de semillas inmaduras variedad 'Clark 63' que fueron electroporados con el ADN y un gen de resistencia a kanamicina o higromicina y el gen reportero que codifica para β -glucuronidasa. De una colonia de 2 000 protoplastos electroporados (0.05%), el 75-90% expresaron resistencia al antibiótico, lo cual no fue evidente en los protoplastos usados como controles.

Otro trabajo en la producción de plantas transgénicas de soya fue descrito por Chowrira *et al.* (1996) al integrar un plásmido circular de ADN en yemas axilares de plantas adultas. La región apical de plantas de tres semanas de cultivo fue cortada próximo al nudo de las hojas completamente abiertas y eliminadas las estípulas y pecíolos exponiendo las yemas axilares. El plásmido de ADN fue suspendido en una solución salina e inyectada en las yemas nodales a una profundidad de un milímetro usando una jeringuilla. Después de 20 minutos, cada planta fue electroporada con dos impulsos de 99ms a 200V para colocar la yema nodal en una solución de ADN con un electrodo circular. Las plantas fueron llevadas a invernadero y posteriormente fue confirmada la integración del ADN, mediante la técnica molecular *Southern blot* en semillas de la progenie.

Microinyección

Para la transformación en soya también ha sido utilizada la microinyección con *Agrobacterium* en semillas (Chee *et al.*, 1989), primeramente las semillas fueron pregerminadas durante 18 - 24 horas en papel estéril húmedo en la oscuridad; luego se eliminó la testa, seguido de los cotiledones con la plúmula; los nudos cotiledonales fueron inyectadas mediante una aguja con 30 μ l de *Agrobacterium* a $DO_{600}=0.5$. Las semillas fueron colocadas en la oscuridad

a 26°C por cuatro horas y luego plantadas en suelo hasta completar el desarrollo vegetativo. De 4 000 semillas inoculadas, 2 200 dieron origen a plantas completas, de las cuales solo diez expresaron la actividad enzimática del transgén *nptII*, con una eficiencia de transformación de 0.03%. La transmisión del ADN-Ti a la primera descendencia solo fue detectada en algunos descendientes de una línea transgénica, sugiriendo que los progenitores eran plantas quiméricas.

MARCADORES DE SELECCIÓN

La selección de células transgénicas en soya, ha sido descrita para el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina (Zhang *et al.*, 1999), el gen *epsps* para resistencia a glifosato (Clemente *et al.*, 2000) y el gen *hpt* para la selección con higromicina fosfotransferasa (Olhoft *et al.*, 2007).

Los tejidos vegetales en soya son altamente sensibles a higromicina y, por tanto, la selección de células transgénicas sobre las células no transgénicas ocurre muy temprano en el desarrollo embrionario. La reducción del tiempo de cultivo es muy importante para el desarrollo de un método eficiente de transformación, así como, para la fertilidad de las plantas regeneradas (Olhoft *et al.*, 2007).

De los genes marcadores de selección, el *nptII* ha mostrado los resultados más débiles en la mayoría de los «escapes» no transformados. Una alta eficiencia de transformación (>10%) ha sido encontrada al emplear un régimen de selección estricto con participación de higromicina fosfotransferasa (Olhoft *et al.*, 2003), con poca producción de plantas quiméricas o no «escapes» (Olhoft *et al.*, 2004).

La adición de compuestos tiolados en los medios de co-cultivo resultan en un incremento significativo en la transformación, cuando se han empleado como explantes nudos cotiledonales de soya (Olhoft *et al.*, 2001).

Estos compuestos permiten reducir la necrosis en los cortes del tejido vegetal e infección de *Agrobacterium* por inhibición de la actividad del patógeno en la planta y la producción de enzimas tales como: peroxidasas y polifenol oxidasa (Olhoft *et al.*, 2007).

En estudios realizados con glufosinato como agente de selección y la adición de compuestos tiolados durante el co-cultivo, permitió un incremento en la eficiencia de transformación entre 0.9 - 2.1% usando L-cisteína a razón de 3.3 - 8.8mM (Olhoft y Somers, 2001) de 0.2 - 0.9% con L-cisteína (3.3mM) y de 0.6 - 2.9% con 1.0mM DTT (DL-Dithiothreitol) (Paz *et al.*, 2004) y de 0.2 - 5.9% con L-cisteína (3.3mM) (Zeng *et al.*, 2004).

También ha sido descrita una transformación eficiente de 16.4% cuando los explantes fueron co-cultivados con DTT (1.0mM), tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (1.0mM) y L-cisteína (8.8mM) combinados con el agente de selección *hpt* (Olhoft *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

El cultivo de la soya se caracteriza por presentar poca variabilidad entre los cultivares, lo que limita los programas de mejoramiento genético mediante métodos convencionales. Sin embargo, los cultivares muestran diferencias durante el cultivo *in vitro* y la transformación genética.

Aunque a nivel internacional han sido producidas plantas transgénicas en soya, las metodologías de transformación y regeneración que existen, presentan bajas eficiencias, frecuente obtención de plantas quiméricas y son específicas para determinadas variedades que muestran una mejor respuesta embriogénica.

Existen diferentes métodos para la transformación genética en soya, de ellos, la transformación mediante biobalística y *Agrobacterium tumefaciens*, son los más usados y su efectividad varía acorde al tipo de tejido empleado, edad, genotipo y susceptibilidad a la infección con la bacteria.

Las metodologías de transformación que emplean el *A. tumefaciens* se caracterizan por ser sencillas, de bajo costo, resultan en pocas copias de los transgenes y son reducidos los problemas de expresión. Sin embargo, aunque es una planta dicotiledónea y hospedera de *Agrobacterium*, presenta dificultades para la transformación mediante este vector, siendo limitados los trabajos de transformación genética de embriones somáticos, además, no

existe una metodología para la transformación genética de embriones somáticos mediante *A. tumefaciens* en variedades cubanas de soya.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del Programa de Cooperación Universitaria Institucional entre la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas y el Consejo de Universidades Flamencas de Bélgica (IUC UCLV/VLIR) y forma parte de la tesis doctoral del autor.

REFERENCIAS

- Bailey, MA, Boerma HR, Parrott WA (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29:102-108
- Beversdorf, WD, Bingham ET (1977) Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop Science* 17: 307-311
- Bobrowski, Vera, Dode L (2006) Otimização do método de transformação transitória de soja via bombardeamento de conjuntos embriogénicos. *Agrociencias Pelotas* 12 (3): 375-377
- Bolivar, Jenny (2006) Advances in embryogenesis and organogenesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Thesis of Master of Science in Biology, University of Puerto Rico, Mayagüez Campus, 140 p.
- Bonacin, GA, Di Mauro, AO, De Oliveira, RC, Perecin, D (2000) Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. *Genetics and Molecular Biology* 23 (4): 865 - 868
- Broughton, W.J, Hernandez G, Blair M, Beebe S Gepts P, Vanderleyden, J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128
- Bueno, M, Severin C, Gattuso S, Giubileo G (2004) Inducción de callos embriogénicos en raíces de Soja (*Glycine max*). *Ciencia e Investigación Agraria* 31(1): 13-19
- Cao, D, Hou W, Song S, Sun H, Wu C, Gao Y, Han T (2009) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 96:45-52
- Castro, OM, Prado H, Sevedoi ACR, Cardoso EJBM (1993) Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Scientia Agrícola* 50: 212-219

- Chandra, A, Pental D (2003) Regeneration and transformation of grain legumes: an overview. *Current Sciences* 84 (3): 381-387
- Chee, PP, Fober KA, Slightom JL (1989) Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *A. tumefaciens*. *Plant Physiology* 91:1212-1218
- Chowrira, GM, Akella V, Fuerst PE, Lurquin PF (1996) Transgenic grain legumes obtained by in planta electroporation-mediated gene transfer. *Molecular Biotechnology* 5: 85-96
- Christianson, ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222: 632-634
- Clemente, TE, La Vallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Science* 40: 797-803
- Coelho Da Silva, A, Sulzbacher A, Azevedo R, Góes AC (2003) *In Vitro* induction of callus from cotyledon and hypocotyl explants of *Glycine wightii* (Wight & Am.). *Verdc. Ciencia y Agrotecnología Lavras* 27 (6): 1277-1284
- Das, D, Reddy M, Upadhyaya K, Sopory, SK (2002) An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 991-1005
- Droste, A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2000) Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Molecular Biology Reports* 18: 51-59
- Droste, A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127: 367-376
- Dufourmantel, N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Molecular Biology* 55: 479-489
- Ebert, A, Taylor HF (1990) Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20:165-172
- Finer, JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports* 7: 236-241
- Finer, K., Finer JJ (2000) Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation-treated soybean cotyledons. *Letters in Applied Microbiology* 30: 406-410
- Finer, JJ, McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Development Biology* 27:175-182
- Finer, JJ, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* L. Merrill.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 15:125-136
- Gamborg, OL, Miller RA, Ojima K (1968) Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158
- Gazzoni, DL (1995) Botánica. En: FAO (ed.). El cultivo de la soya en los Trópicos: Mejoramiento y Producción, pp. 1 - 12. FAO. Roma
- Gazzoni, DL (1994) Tropical soybean improvement and production. En: FAO (ed.), pp. 1-12. FAO. Roma
- Gi, Jang, Ro P, Kwang K (2001) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of soybean (*Glycine max*[L] Merrill). *Journal of Plant Biotechnology* 3 (2): 101-106
- Griga, M (2000) Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 43 (2): 161-165
- Hammatt, N, Davey M (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J Plant Physiology* 128: 219-226
- Hinchee, MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922
- Hiraga, S, Minakawa H, Takahashi K, Takahashi R, Hajika M, Harada K, Ohtsubo N (2007) Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnology* 24: 435-440
- Hofmann, N, Nelson RL, Korban SS (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77:157-163
- Hong, HP, Zhang H, Olhoft P, Hill S, Wiley H, Toren E, Hillbrand H, Jones T, Cheng M (2007) Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation

- via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max*(L.) Merr.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43:558–568
- Hu, CH, Wang L (1999) In plant soybean transformation technologies developed in China: procedure, confirmation and field performance. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35: 417–420
- Jain, A, Punia MS, Behl RK (2008) Effect of genotype and medium on callus induction and plant regeneration in soybean (*Glycine max* L.). *National Journal Plant Improvement* 10 (1): 53-57
- James, Clive (2008) Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2008. ISAAA Brief No 39. ISAAA: Ithaca, NY
- Klink, VP, MacDonald M, Martins V, Soo-Chul P, Kyung-Hwan K, So-Hyeon B, Benjamin M (2008) MiniMax, a new diminutive *Glycine max* genotype with a rapid life cycle, embryogenic potential and transformation capabilities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92 (2): 183-195
- Komatsuda, T, Kaneko K, Oka S (1991) Genotype x sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean. *Crop Sci.* 31:333–337
- Ko, TS, Korban SS (2004) Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill.]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:552–558
- Ko, TS, Lee S, Farrand SK, Korban SS (2004) A partially disarmed *vir* helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean. *Planta* 218: 536-541
- Ko TS, Lee S, Krasnyanski S, Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical Applied Genetics* 107:439–447
- Lazzeri, PA, Hildebrand DF, Collins GBA (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.* 3:160–167
- Lazzeri, PA, Hildebrand DF, Collins GB (1987) Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 10:197–208
- Lippmann, B, Lippmann G (1984) Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep.* 3:215–218
- Liu, SJ, Wei ZM, Huang JQ (2008) The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. *Plant Cell Rep.* 27:489-498
- McClellan, PE, Lavin M, Gepts P, Jackson SA (2008) *Phaseolus vulgaris*: A Diploid Model for Soybean. En: G. Stacey (ed.), *Genetics and Genomics of Soybean*, pp.55-76. Springer Science+Business Media. Dordrech
- Moon, H, Hildebrand, D (2003) Effects of proliferation, maturation and desiccation methods on conversion of soybean somatic embryos. *In vitro Cell. and Dev. Biol.-Plant* 39: 623-628
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473–497
- Namasivayam, P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Cult.* 90: 1-8
- Olhoft, PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Journal Plant Biotech.* 216:723–735
- Olhoft, PM, Flagel LE, Somers DA (2004) T-DNA locus structure in a large population of soybean plants transformed using the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method. *Journal Plant Biotechnology* 2: 289 – 300
- Olhoft, PM, Lin K, Galbraith J, Nielsen NC, Somers DA (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary-node cells. *Plant Cell Report* 20: 731–737
- Olhoft, PM, Somers DA (2001) L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Report* 20: 706 – 711
- Olhoft, PM, Somers DA (2007) I.1 Soybean. En: EC Pua, MR Davey (Eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 61. *Transgenic Crops VI*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Ortiz, R, de la Fé C, Ponce M (2004) Evaluación de métodos de almacenaje de semilla de soya (*Glycine max*. (L.) Merrill) en condiciones de bajos insumos. *Cultivos Tropicales* 25 (3): 49–58
- Parrott, WA, Dryden G, Vogt S, Hildebrand DF, Collins GB, Williams EG (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24: 817 - 820
- Parrott, WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Williams EG, Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Reports* 7: 615-617
- Paz, MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using

- the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167 – 179
- Paz, MM, Martínez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 25: 206-213.
- Penichet, Marlene (2008) La Producción de granos: estrategia de diversificación en la agricultura cubana actual. *Revista Académica de Economía, Observatorio de la Economía Latinoamericana* 95. [en línea] En: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/cu/2008/mcp.htm> [consulta: 4 de octubre de 2008]
- Ponce, M, Ortiz R, de la Fé C, Moya C (2002) Estudio comparativo de nuevas variedades de soya (*Glycine max* (L.) Merr) para las condiciones de primavera en Cuba. *Cultivos Tropicales* 23 (2): 55-58
- Radhakrishnan, R, Ranjitha Kumari BD (2007) Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *Journal of Agricultural Technology* 3 (2): 287-297
- Radhakrishnan, R, Ranjitha Kumari BD (2009) Changes in Protein Content in Micropropagated and Conventional Soybean Plants (*Glycine max* (L.) Merr.). *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (2): 186-189
- Reddy, MS, Dinkins RD, Collins GB (2003) gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Report* 21: 676-683
- Ridner, E (2006) Valor nutricional de la soja. En: Ridner, Edgardo (Ed) Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud, pp. 8-32. Grupo Q S. A: Sociedad Argentina de Nutrición. Buenos Aires
- Sairam, RV, Franklin G, Hassel R, Smith B, Meeker K, Kashikar N, Parani M, Abed DA, Ismail S, Berry K, Goldman SL (2003) A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 75: 79–85
- Samoylov, VM, Tucker DM, Parrott WA (1998) Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol.* Plant 34: 8–13
- Santos, KGB, Mundstock E, Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep.* 16: 859-864
- Schmidt, MA, Tucker DM, Cahoon EB, Parrott WA (2005) Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. *Plant Cell Rep.* 24: 383–391
- Socorro, MA, Martín DS (1989) Soya. Granos, pp. 54-90. Ed. Pueblo y Educación, La Habana
- Stacey, G, Vodkin L, Parrott WA, Shoemaker RC (2004) National science foundation-sponsored workshop report. Draft plan for soybean genomics. *Plant Physiology* 135: 59–70
- Tran Thi Cuc Hoa (2008) Efficiency of developing transgenic soybean from the varieties MTD 176, HL 202, Maverick and Williams-82 by cotyledonary-node method using *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation. *Journal of Agriculture and Rural Development* 1:14-19
- Trick, HN, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports* 17: 482-488
- Valderrama, F, Arango I, Afanador K (2005) Plant transformation mediated by *Agrobacterium*: Applied Natural Genetic Engineering. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 58 (1): 2569-2585
- Widholm, JM, Dhir SK, Dhir S (1992) Production of transformed soybean plants by electroporation of protoplasts. *Physiologia Plantarum* 85 (2): 357-361
- Wu, HC, du Toit ES, Reinhardt CF (2007) A protocol for direct embryogenesis of *Protea cynaroides* L. using zygotic embryos and cotyledon tissues. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89: 217-224
- Yan, B, Srinivasa Reddy MS, Collins GB, Dinkins RD (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Reports* 19:1090-1097
- Yemets, AI, Radchuk VV, Pakhomov AV, Blum Ya B (2008) Biolistic Transformation of Soybean Using a New Selective Marker Gene Conferring Resistance to Dinitroanilines. *Cytology and Genetics* 42 (6): 413–419
- Zeng, P, Vadnais DA, Zhang Z, Polacco J (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Report* 22:478–482
- Zhang, Z, Xing A, Staswick P, Clemente T (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56:37–46