

RASGADO DEL TEGUMENTO E INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS DE SOJA (*GLYCINE MAX*) EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO

SEVERIN, C. R.¹, BUENO, M. S.², GOSPARINI, C. O.¹,

GIUBILEO, M. G.³ & MORANDI, E. N.¹

RESUMEN

Con la finalidad de determinar el efecto del rasgado del tegumento sobre la inducción de la germinación *in vitro* de semillas inmaduras de soja en etapas tempranas de su desarrollo, se sembraron semillas de 7, 10, 15 y 20 días desde la anthesis (DDA), de los cultivares Saporo midori, Williams, Asgrow 5308 y Bragg. Se probaron 2 medios de cultivo: Gamborg et al. (1968) (B5) y Murashige y Skoog (1962) (MS) modificados. A un grupo de semillas se les rasgó el tegumento (R) y el resto permanecieron intactas (I). Los mayores porcentajes de germinación (% G) se obtuvieron en los cultivares Williams y Saporo midori, con edades de 15 y 20 DDA. Las semillas del cv. Bragg no germinaron, las del cv. Asgrow 5308 germinaron sólo en el tratamiento R y en medio MS. En todos los casos, el % G aumentó con el rasgado de los tegumentos. Cuando las semillas germinadas se transplantaron a macetas con tierra, en condiciones de invernáculo, se desarrollaron plantas fértiles. Se concluye que, a partir de los 15 DDA, el rasgado del tegumento aumenta el % G de las semillas inmaduras de soja de los cvs. Williams y Saporo midori cultivadas *in vitro*. Esta respuesta es, sin embargo, dependiente del genotipo.

Palabras claves: *in vitro*, semillas inmaduras, soja, *Glycine max*, germinación.

SUMMARY

Tearing of the seed coat and induction of *in vitro* germination of soybean seeds (*Glycine max*) in early stages of its development

In order to determine the tearing effect of the seed coat over the induction of the *in vitro* germination of immature soybean seeds in early stages of its development, seeds of 7, 10, 15 and 20 days from the anthesis (DDA) of the cultivars Saporo midori, Williams, Asgrow 5308 and Bragg were cultured. Two culture media were tested: Gamborg et al. (1968) (B5) and Murashige and Skoog (1962) (MS) modified. The seed coat of a group of seeds was torn (R) and the rest remained intact (I). The greater

1.- Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. CC 14. ZAA 2125 Santa Fe, Argentina. Tel: (0341) 4970080. E-mail: cseverin@fcagr.unr.edu.ar

2.- Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.

3.- Cátedra de Estadística. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario

Manuscrito recibido el 28 de diciembre de 2001 y aceptado para su publicación el 28 de abril de 2002.

percentages of germination (% G) were obtained in the cultivars Williams and Sapiro midori, with ages of 15 and 20 DDA. The seeds of the cvs. Bragg and Asgrow 5308 did not germinate, except Asgrow 5308 which early germinated, in the treatment R and in MS medium. In all the cases, the % G increased with the tearing of the seed coat. When the germinated seeds were transplanted to pots with soil, under greenhouse conditions, such seeds developed in fertile plants. It is concluded that, from 15 DDA, the tearing of the seed coat increases the % G of immature soybean seeds of the cvs. Williams and Sapiro midori cultivated *in vitro*. This response, however, depends on the genotype.

Key words: *in vitro*, immature seeds, soybean, *Glycine max*, germination.

INTRODUCCIÓN

Semillas de soja (*Glycine max* L. Merr.) separadas de la planta madre a partir de mediados del desarrollo y cultivadas *in vitro*, germinan precozmente, produciendo plantas que desarrollan normalmente (Tilton & Russell, 1984; Lippmann & Lippmann, 1993; Yudakova *et al.*, 1994). Cuando se trabajó con semillas inmaduras cosechadas en la primera mitad del desarrollo, la inducción de la germinación requirió de la remoción del tegumento y/o cultivo *in vitro* de los embriones (Tilton & Russell, 1984; Lippmann & Lippmann, 1993). Pero en la mayoría de los casos, la eficiencia en la recuperación de plantas dependió del cultivar empleado, la edad del embrión, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Tilton & Russell, 1984; Lippmann & Lippmann, 1993; Roumet & Morín, 1994, 1997; Yudakova *et al.*, 1994). En general, embriones más pequeños, son más sensibles a la composición del medio de cultivo, siendo necesario optimizar los componentes del medio para favorecer el crecimiento y desarrollo *in vitro* (Bewley & Black, 1994). Las cubiertas seminales pueden causar inhibición de la germinación atribuible a: impermeabilidad al agua y/o al O₂, restricciones mecánicas al crecimiento del eje embrional, elevados contenidos de inhibidores y/o reducción en el lixiviado de los mismos (Baskin & Baskin, 1998). Entre los inhibidores de la

germinación que se acumulan en las semillas en desarrollo, induciendo la dormición temporaria del embrión, el más conocido y estudiado es el ácido abscísico (ABA) (Bewley & Black, 1994). En semillas de varias especies, incluida soja, se ha encontrado correlación negativa entre el contenido de ABA y la germinabilidad durante el desarrollo (Black, 1991). La concentración de ABA en semillas de soja en desarrollo es baja al comienzo de la embriogénesis, aumentando rápidamente hasta alcanzar el pico máximo entre los 18 y 21 DDA, para luego caer lentamente hasta valores muy bajos a la madurez fisiológica de la semilla (máximo peso seco) (Ackerson, 1984a; Schussler *et al.*, 1984; Morandi *et al.*, 1990). La germinación de semillas inmaduras de soja de 25 a 40 DDA puede inducirse por la remoción del tegumento, por el lavado y por el aumento en la concentración de O₂ (Morandi & Gosparini, 1991; Gosparini *et al.*, 1992). La estimulación de la germinación debida a la remoción de los tegumentos y al aumento en la concentración de O₂ fueron atribuidas a la baja permeabilidad al O₂ de los tegumentos de semillas inmaduras cultivadas *in vitro* (Morandi & Gosparini, 1991; Gosparini *et al.*, 1992). Por otra parte, se ha informado que el tegumento constituye una barrera importante para la difusión de O₂ en semillas en desarrollo *in planta*, limitando su tasa de crecimiento (Sinclair, 1988).

Existen trabajos donde se ha logrado indu-

cir la germinación de embriones inmaduros de soja aislados luego de haberles extraído completamente los tegumentos (Tilton & Russell, 1984; Lippmann & Lippmann, 1993; Roumet & Morín, 1994; 1997). Sin embargo, la remoción del tegumento de semillas muy jóvenes es dificultosa, aumenta el tiempo de manipulación del explanto, con el consiguiente riesgo de contaminación, y puede producir daños mecánicos al embrión.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del rasgado del tegumento sobre la germinación *in vitro* de semillas inmaduras de soja en etapas tempranas de su desarrollo. Se pretende desarrollar una metodología simple y rápida para inducir la germinación precoz de semillas inmaduras de soja durante la primera mitad del desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas inmaduras se obtuvieron de plantas de soja de los cultivares (cvs.) Saporomidori (S), grupo de maduración (GM) 00, Williams (W) GM III, Asgrow 5308 (A) GM V y Bragg (B) GM VII, cultivadas en invernáculo.

La edad de las semillas inmaduras se midió como los días después de la antesis, (DDA). Si bien suele utilizarse como parámetro para la selección de las semillas inmaduras su tamaño y/o morfología, en este trabajo se utilizaron los DDA como indicador del estado de desarrollo de las semillas, por existir diferencias de tamaño entre las semillas de los distintos cvs. utilizados. Las diferencias de tamaño entre las semillas de los distintos cvs. se debieron principalmente a diferencias en la tasa de crecimiento de las mismas y no a cambios en la duración del período de llenado. Es por ello que la edad fue un indicador más apropiado del estado de desarrollo de las semillas que su masa. Por

otro lado, la edad es el parámetro más comúnmente utilizado en la literatura sobre el tema y su utilización facilita la comparación de los resultados obtenidos en este ensayo con los existentes en la literatura.

Para obtener semillas de igual edad, se marcaron las flores utilizando un mismo color para identificar las que alcanzaron la antesis el mismo día. Se utilizaron semillas de 7, 10, 15 y 20 DDA. Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % más Tween 20 durante 15 minutos, seguido por 3 enjuagues con agua destilada esterilizada.

Todas las manipulaciones relativas a la extracción de las semillas de las vainas y al cultivo *in vitro* de las mismas se realizaron en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. Las semillas de 7 DDA, debido a su pequeño tamaño, fueron extraídas bajo lupa binocular con aumento 10-50 x.

Se probaron 2 medios de cultivo, solidificados con 0,7 % de agar: 1) Gamborg (B5) (Gamborg *et al.*, 1968), suplementado con 0,5 mg/l de piridoxina, 1400 mg/l de glutamina, 0,5 mg/l de ácido pantoténico, 25 g/l de sacarosa y 0,018 mg/l de ácido indolacético (AIA), pH 5,5 (Lippmann & Lippmann, 1993) y 2) Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 1,68 mg/l de tiamina, 1,38 mg/l de prolina, 30 g/l de sacarosa, 2,97 mg/l de benciladenina (BA) y 0,037 mg/l de ácido naftalen acético (ANA), pH 5,8 (Tilton & Russell, 1984; Christou & Yang, 1989). Cada 7 días se realizaron transferencias a medio fresco.

Previo a la siembra en el medio de cultivo, las semillas se dividieron en dos grupos elegidos al azar. Al primer grupo se le rasgó el tegumento, mediante una incisión con bisturí en la zona del hilo (R), a partir del extremo micropilar y en dirección opuesta al eje embrional, tomando la precaución de no tocar el ápice de la radícula. El segundo

grupo de semillas conservó su tegumento intacto (I).

Se sembraron 5 semillas por caja de Petri de 10 cm de diámetro, con el hilo en contacto con el medio de cultivo. La incubación fue en cámara de crecimiento a luz continua, 40 mE.m⁻².s⁻¹ y 27 ± 1°C, durante 15 días. Luego de germinadas, las semillas se dejaron con fotoperíodo de 16 h. En este trabajo se igualó germinación con protrusión de la radícula.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con arreglo factorial y con cuatro repeticiones. Los factores fueron Medios de Cultivo (MS y B5), Tegumentos (R e I); Cultivares (Saporo midori y Williams) y Edades (15 y 20 DDA), dando como resultado un factorial de cuatro factores, a dos niveles cada uno y obteniéndose así ocho combinaciones de tratamientos. La variable analizada porcentaje de germinación, no siguió una distribución normal, por lo tanto, para el análisis de la variancia,

los datos fueron transformados por medio de la función arco seno Ö%.

Se evaluó el porcentaje de germinación promedio (% G) para cada uno de los tratamientos (medios de cultivo, tegumentos, cultivares y edades). Las semillas germinadas fueron transplantadas a potes con tierra cuando la longitud del hipocótilo-radícula alcanzó los 2 cm. El desarrollo de estas plantas se continuó en invernáculo hasta su fructificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se presentan los % G de semillas de soja de 7, 10, 15 y 20 DDA de los cvs. W, S, B y A, con tegumento intacto (I) o rasgado (R), luego de 14 días de incubación en medio B5 o MS. Los cvs. B y A tuvieron respuesta nula al ensayo de germinación en todas las edades, con

Cuadro 1: Porcentaje de germinación de semillas de 7, 10, 15 y 20 DDA de los cvs. Williams, Saporo midori, Bragg y Asgrow 5208 con tegumento intacto (I) y rasgado (R) luego de 14 días de incubación en medios B5 y MS.

Edad (DDA)	Medio de cultivo	Williams		Saporo		Bragg		A 5308	
		I	R	I	R	I	R	I	R
% G									
7	B5	0	0	0	0	0	0	0	0
	MS	0	0	0	0	0	0	0	0
10	B5	0	15	0	10	0	0	0	0
	MS	0	5	0	20	0	0	0	0
15	B5	67	89	36	70	0	0	0	0
	MS	65	90	55	75	0	0	0	0
20	B5	55	85	65	60	0	0	0	0
	MS	40	55	20	20	0	0	0	20

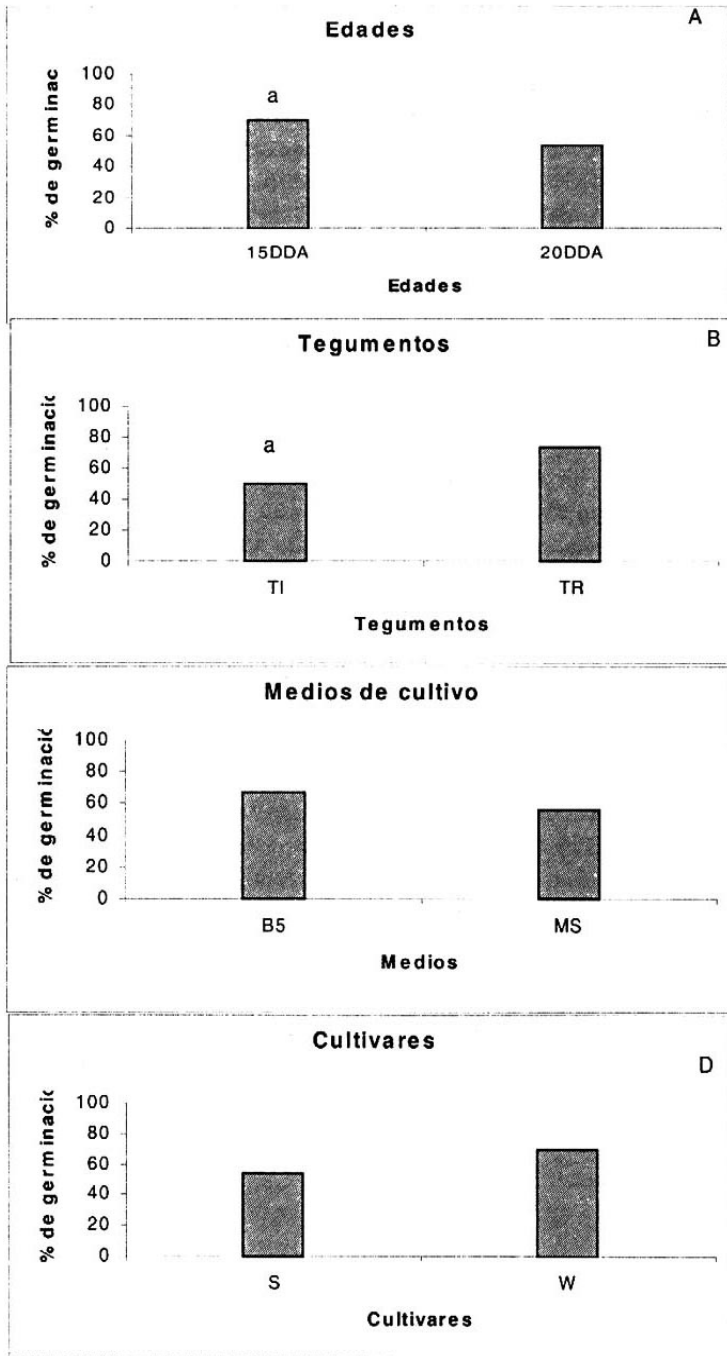


Fig. 1: Porcentaje de germinación de semillas de soja: (A) 15 y 20 DDA, (B) Tegumento Intacto (TI) y Rasgado (TR), (C) Medios de cultivo B5 y MS, (D) Cultivares Sapor midori (S) y Williams (W).

excepción del cv. A en el tratamiento R y en el medio MS que sólo alcanzó un 20 % G (Cuadro 1). Los cvs. W y S germinaron a partir de los 10 DDA, aunque en muy baja proporción y únicamente en los tratamientos R (Cuadro 1). Sólo a partir de los 15 DDA hubo respuestas consistentes en la germinación de los cvs. W y S, obteniéndose siempre los mayores % G en las semillas del tratamiento R (Cuadro 1).

A partir de estos resultados se procedió a realizar un nuevo análisis factorial para discriminar el efecto de cada factor, incluyendo sólo a las edades 15 y 20 DDA, a los cvs. W y S, a los medios de cultivo B5 y MS, y a los tratamientos I y R, por ser los que mostraron respuestas consistentes a la germinación. Los resultados de este análisis se muestran en la Fig. 1. Cuando se analizaron los efectos de la edad se obtuvieron 70 y 53 % G para 15 y 20 DDA, respectivamente ($p < 0,02$) (Fig. 1 A). Para los tratamientos R e I se obtuvieron 73 y 50 % G, respectivamente ($p < 0,001$) (Fig. 1 B). No se encontraron diferencias significativas en el % G entre los medios B5 y MS (Fig. 1 C) ni entre los cvs. W y S (Fig. 1 D). No hubo interacción tegumento x cultivares,

tegumento x edad, tegumento x medio de cultivo, medio de cultivo x cultivar, ni cultivar x edad (datos no presentados). Sí hubo diferencias significativas cuando se analizó la interacción edad x medio de cultivo ($p < 0,045$) (Cuadro 2).

El mayor % G obtenido para semillas de 15 DDA respecto de semillas de 20 DDA podría deberse al aumento en la concentración de ABA que experimentan las semillas de soja durante la primera mitad del desarrollo (Morandi *et al.*, 1990). El efecto estimulante del rasgado de los tegumentos sobre la germinación de las semillas inmaduras se debería a: 1) disminución de la resistencia mecánica del tegumento (Baskin & Baskin, 1998), 2) disminución del contenido endógeno de inhibidores por aumento de la difusión al medio de cultivo (Morandi & Gosparini, 1991; Bewley & Black, 1994), 3) aumento en la difusión del O_2 (Sinclair, 1988; Morandi & Gosparini, 1991; Gosparini *et al.*, 1992; Baskin & Baskin 1998), o a una combinación de estos factores.

Lippmann y Lippmann (1993) utilizando embriones del cv. Mapple Arrow, obtuvieron las mejores respuestas para germinación en medio B5, suplementado con AIA. En

Cuadro 2: Interacción entre la edad de las semillas (15 y 20 DDA) y los medios de cultivo (B5 y MS) medida sobre el porcentaje de germinación (% G) de las semillas inmaduras de soja de los cvs. W y S.

Medios de cultivo	Edad	% G
B5	15 DDA	34,34 a
	20 DDA	35,00 a
MS	15 DDA	35,62 a
	20 DDA	20,00 b

Letras iguales dentro de cada medio de cultivo no difieren ($p < 0,05$)

nuestro caso, las diferencias entre medios se debieron a la formación o no de callos. En el medio MS, tanto las semillas germinadas como las no germinadas manifestaron formación de callos. Por el contrario, con el medio B5 con AIA no se observó formación de callos en ningún caso (Cuadro 3).

La diferente respuesta obtenida en los distintos cvs. de soja utilizados en este ensayo confirman informes previos sobre la existencia de diferencias genotípicas en el potencial germinativo de las semillas inmaduras (Tilton & Russell, 1984; Yudakova *et al.*, 1994).

En este trabajo, los % G se midieron a los 14 días del inicio de la incubación. Las semillas que no germinaron durante los primeros 14 días se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación durante 25 días adicionales, con transferencias periódicas a medio fresco cada 7 días, sin que se registraran nuevos eventos de germinación.

Sin embargo, estas semillas continuaron su crecimiento, el que se hizo evidente por un marcado aumento de volumen. Algunos autores informaron que la germinación se indujo luego de transferir las semillas incubadas en medio B5 con hormonas, a medio B5 sin hormonas, luego de 30 días de la siembra *in vitro* (Lippmann & Lippmann, 1993). En nuestro caso, la transferencia se realizó a medio fresco, de composición igual al original, cada 7 días a partir de la siembra *in vitro*, durante 25 días, y los máximos % G se obtuvieron a los 14 días de la siembra.

El período de tiempo transcurrido desde la siembra *in vitro* de las semillas y la transferencia a tierra de las plantas obtenidas fue de aproximadamente un mes.

Los porcentajes de supervivencia en tierra fueron de 12 y 43 % para las plántulas del cv. W de 15 y de 20 DDA, respectivamente y de 10 y 18 % para plántulas del cv.

Cuadro 3: Porcentaje de callos en semillas de 7, 10, 15 y 20 DDA de los cvs. Williams, Saporo midori, Bragg y Asgrow 5308 con tegumento intacto (I) y rasgado (R) luego de 14 días de incubación en medios B5 y MS.

Edad (DDA)	Medio de cultivo	Williams		Saporo		Bragg		A 5308	
		I	R	I	R	I	R	I	R
%									
7	B5	0	0	0	0	0	0	0	0
	MS	0	20	5	27	10	0	93	100
10	B5	0	0	0	0	0	0	0	0
	MS	15	30	25	0	0	0	30	40
15	B5	0	0	0	0	0	0	0	0
	MS	15	65	0	30	0	0	7	7
20	B5	0	0	0	0	0	0	0	0
	MS	40	80	100	10	20	10	10	20

S de 15 y de 20 DDA, respectivamente. En nuestras condiciones, con fotoperíodo de 15 h 10 min y temperatura diurna de 28 ± 2 °C y nocturna de 18 ± 2 °C, registradas en invernáculo, la floración comenzó alrededor de los 90 días desde la siembra *in vitro* en los cv. W y S. Las plantas obtenidas a partir de semillas inmaduras tuvieron pequeño tamaño pero fueron morfológicamente normales y produjeron frutos con semillas viables en el 100 % de los casos. Estos resultados coinciden con lo informado en la literatura para plantas provenientes de semillas inmaduras inducidas a germinar pre-cozmente (Tilton & Russell, 1984; Lippmann & Lippmann, 1993; Roumet & Morín, 1994; Yudakova *et al.*, 1994).

Lippmann y Lippmann (1993) trabajando con embriones de 18 DDA del cv. Mapple Arrow colocados a luz continua, informaron recuperación del 95 % de plántulas *in vitro*, aunque no mencionan porcentajes de recuperación en tierra. En el presente trabajo, utilizando el cv. W y condiciones de cultivo y de incubación similares, se obtuvo un 89 % para las semillas de menor edad (15 DDA) en el tratamiento R. Tilton y Russell (1984) utilizando embriones del cv. Tonica de 15 DDA, incubados durante 2 semanas en oscuridad, obtuvieron un 75 % G.

La germinación *in vitro* de embriones inmaduros de soja fue informada por varios autores en distintos cultivares, pero en todos los casos hubo remoción completa de los tegumentos (Tilton & Russell, 1984; Lippmann & Lippmann, 1993) y/o tratamientos previos como desecación (Roumet & Morín, 1994). En este trabajo se logró un incremento similar a lo informado previamente en el % G de semillas inmaduras de soja solamente con el rasgado de los tegumentos. La metodología propuesta es simple, rápida y con ella se evitan posibles daños al embrión, como así también se disminuye el tiempo de manipulación y de exposición del

explanto y la posibilidad de contaminación del mismo.

Se puede concluir que el rasgado del tegumento aumenta el porcentaje de germinación en los cvs. W y S y que a partir de semillas de 15 DDA cultivadas *in vitro* es posible recuperar plantas fértiles. Esta metodología es simple, rápida y segura, evita la necesidad de realizar la extracción total de los tegumentos.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKERSON, R. C.** 1984. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *J. Exp. Bot.* 35: 414-421.
- BASKIN, C. C. & J. M. BASKIN.** 1998. Seeds ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. London: Academic Press. 666 pp.
- BEWLEY, J. D. & M. BLACK.** 1994. Development, regulation and maturation. En: *Seeds Physiology of Development and Germination*. 2nd ed., Plenum Press, New York, USA. 445 pp.
- BLACK, M.** 1991. Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds (pp 99-124). In: *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. DAVIES, W. J. & JONES, H. J. (eds.) Bios Scientific Publishers Limited. Oxford, UK.
- CHRISTOU, P. & N. YANG.** 1989. Developmental aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 64: 225-234.
- GAMBORG, O. L.; R. A. MILLER & K. OJIMA.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.
- GOSPARINI, C. D.; C. A. CAIRO & E. N. MORANDI.** 1992. Inducción de la germinación de embriones inmaduros de soja: 1. Efecto del lavado, tegumento y ABA. *Actas XIX Reunión Argentina de Fisiología*

- Vegetal. 25 al 27 de marzo. Huerta Grande, Córdoba, RA: pp.175-176.
- LIPPMANN, B. & G. LIPPMANN.** 1993. Soybean embryo rescue: factors influencing plant recovery from isolated embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 32: 83-90.
- MORANDI, E. N. & C. D. GOSPARINI.** 1991. Utilización de efectores físico-químicos para inducir la germinación de embriones inmaduros de soja. Primera Reunión Nacional de Oleaginosos, Rosario, RA: pp. 137-143.
- MORANDI, E. N.; J. R. SCHUSSLER & M. L. BRENNER.** 1990. Photoperiodically induced changes in seed growth rate of soybean as related to endogenous concentration of ABA and sucrose in seed tissues. *Annals of Botany* 66: 605-611.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- ROUMET, P. & F. MORÍN.** 1994. Shortening soybean cycle duration with immature embryo culture. Abstract Book World Soybean Research Conference I Chiang Mai Thailand. 82 pp.
- ROUMET, P. & F. MORÍN.** 1997. Germination of immature soybean seeds to shorten reproductive cycle duration. *Crop Science* 37: 521-525.
- SCHUSSLER, J. R.; M. L. BRENNER & W. A. BRUN.** 1984. Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiol.* 76: 301-306.
- SINCLAIR, T. R.** 1988. Oxygen and temperature effects on soybean seed coat respiration rates. *Plant Physiology* 86: 124-128.
- TILTON, V. R. & S. H. RUSSELL.** 1984. *In vitro* culture of immature soybean embryos. *J. Plant Physiol* 115: 191-200.
- YUDAKOVA, Z. S.; T. V. TANASHKINA & Y. N. ZHURAVLEV.** 1994. Optimizing the conditions for *in vitro* production of fertile plants from immature embryos of soybean. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*. 5: 27-31.