

IMPROVEMENT OF DIRECT REGENERATION OF MEXICAN SOYBEAN FROM COTYLEDONARY NODES

MEJORA DE LA REGENERACIÓN DIRECTA DE SOYA MEXICANA A PARTIR DE NODOS COTILEDONALES

Soledad Mora-Vásquez^{1*}, Silverio García-Lara¹, Edgardo J. Escalante-Vázquez¹, Guy A. Cardineau^{1,2}

¹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Avenida Eugenio Garza Sada 2501, Monterrey, Nuevo León, México, 64849. (morasole@gmail.com). ²Beus Center for Law and Society, Arizona State University, Mail Code 9520, 111 E. Taylor Street, Phoenix, AZ 85004-4467, USA.

ABSTRACT

Plant tissue culture provides an alternative approach to improve the quality of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. This study was undertaken to analyze the susceptibility of Mexican soybean for direct shoot regeneration and to determine the critical factors that affect *in vitro* performance. Our hypothesis was that Mexican soybean is suitable for *in vitro* regeneration using a cotyledonary node as explant. The effects of the seed disinfection procedure, soaking pretreatment before germination, soybean variety, as well as the culture medium composition of the shoot induction medium, were evaluated by two split-plot statistical designs. According to the statistical analysis, the seed disinfection procedure, the soaking pretreatment before germination, and the soybean genotype were the factors that brought about a significant effect ($p \leq 0.01$), while the hormones composition of the shoot induction medium did not have a significant effect. The best response for multiple shoot formation was observed using a chlorine gas seed disinfection method, 3% hydrogen peroxide soaking pretreatment, and Huasteca-100, Nainari and Suaqui soybean genotypes. A robust protocol was developed, and under these selected conditions, it is possible to obtain more than 10 shoots per explant. Well-developed plantlets were obtained after 60 d of *in vitro* culture.

Key words: plant tissue culture, *in vitro* culture, *Glycine max*, direct organogenesis, hydrogen peroxide soaking.

RESUMEN

El cultivo de tejidos de plantas brinda una estrategia alterna para mejorar la calidad de los cultivares del frijol de soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Este estudio se llevó a cabo para analizar la susceptibilidad de la soya mexicana para la regeneración de brotes y para determinar los factores críticos que afectan su desempeño *in vitro*. Nuestra hipótesis fue que la soya mexicana es adecuada para la regeneración *in vitro* con el uso de un nodo cotiledonal como explante. Los efectos del procedimiento de desinfección de semillas, el pretratamiento de remojo antes de la germinación, la variedad de soya, así como la composición del medio de inducción de brotes, se evaluaron con el uso de dos diseños estadísticos en parcelas divididas. De acuerdo con el análisis estadístico, el procedimiento de desinfección, el pretratamiento de remojo antes de la germinación y el genotipo de soya fueron los factores que produjeron un efecto significativo ($p \leq 0.01$), mientras que la composición hormonal del medio de inducción de brotes no tuvo un efecto significativo. La respuesta mejor para la formación de brotes múltiples se observó al usar un método de desinfección con cloro gaseoso, un pretratamiento de remojo en agua oxigenada al 3%, y los genotipos de soya Huasteca-100, Nainari y Suaqui. Un protocolo robusto se desarrolló y, bajo las condiciones seleccionadas, es posible obtener más de 10 brotes por explante. Después de 60 d de cultivo *in vitro* se obtuvieron plántulas bien desarrolladas.

Palabra clave: cultivo de tejidos vegetales, cultivo *in vitro*, *Glycine max*, organogénesis directa, remojo en agua oxigenada.

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* (L.) Merrill), uno de los cultivos más importantes del mundo, presenta una tasa constante de crecimiento en

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.
Received: October, 2018. Approved: January, 2019.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 387-399. 2020.

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), one of the most important crops in the world, reaching a constant growth rate in terms of its production due to a consistently increasing demand and the development of new genomic technologies (USDA, 2018). Mexico imports the vast majority of the soybeans it consumes, since domestic production is insufficient to meet the national demand as a result of adverse climate conditions and biological factors such as pathogens and insects as pests (Ruiz *et al.*, 2013).

Consequently, the requirement for new soybean genotypes to address these important constraints is on the rise. Plant tissue culture provides an alternative approach that facilitates the development of new soybean cultivars with specific improvements through genetic transformation via particle bombardment (Stewart *et al.*, 1996) or *Agrobacterium tumefaciens* (Lee, 2011), through targeted mutagenesis (Haun *et al.*, 2014) or through wide hybridization (Singh and Nelson, 2015).

The main goal of tissue culture is to maximize the number of shoots obtained per explant. This is a prerequisite for an efficient transformation and clonal propagation of plants (Yildiz, 2012). Using cotyledonary nodes as explant, different soybean genotypes respond in a significantly different manner to the same protocol conditions. For example, the genotype most efficient at producing shoots was PNR791 (10.5 shoots per explant) in Australia, PK416 (39 shoots per explant) in India, Hefeng-25 (33 shoots per explant) in China, and NARC-4 (7.3 shoots per explant) in Pakistan (Ma and Wu, 2008; Zia *et al.*, 2010; Arun *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2017). Soybean regeneration depends upon several factors including the genotype, the medium composition (Texeira *et al.*, 2011) and the disinfection protocol (Paz *et al.*, 2004).

A direct shoot organogenesis from cotyledonary node tissues is a convenient procedure that was efficient on Chinese soybean genotypes (Ma and Wu, 2008). The main advantage of this approach is that it uses plant growth regulators (PGR), which present less potential for inducing mutations and allowing a reduced culture time in comparison with the indirect organogenesis procedures that go through an intermediate callus phase (Duncan, 2011).

términos de su producción, debido a una demanda en constante crecimiento y el desarrollo de nuevas tecnologías genómicas (USDA, 2018). México importa la gran mayoría de la soya que consume, ya que la producción doméstica no es suficiente para satisfacer la demanda nacional como resultado de condiciones climáticas adversas y de factores biológicos, tales como patógenos y plagas de insectos (Ruiz *et al.*, 2013).

En consecuencia, cada vez se vuelve un requisito más importante que los nuevos genotipos de soya enfrenten estas limitaciones. El cultivo de tejidos de plantas brinda un enfoque alternativo que facilita el desarrollo de nuevos cultivares de soya con mejoras específicas a través de la transformación genética por medio del bombardeo de partículas (Stewart *et al.*, 1996) o *Agrobacterium tumefaciens* (Lee, 2011), por mutagénesis dirigida (Haun *et al.*, 2014) o por medio de hibridación amplia (Singh and Nelson, 2015).

El objetivo principal del cultivo de tejidos es maximizar el número de brotes obtenidos por explante; este es un requisito previo para lograr una eficiente transformación y propagación de clones de plantas (Yildiz, 2012). Usando nodos cotiledonales como explantes, diferentes genotipos de soya respondieron de maneras significativamente diferentes a las mismas condiciones de protocolo. Por ejemplo, el genotipo más eficiente en cuanto a producción de brotes fue PNR791 (10.5 brotes por explante) en Australia, PK416 (39 brotes por explante) en India, Hefeng-25 (33 brotes por explante) en China, y NARC-4 (7.3 brotes por explante) en Pakistán (Ma y Wu, 2008; Zia *et al.*, 2010; Arun *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2017). La regeneración de soya depende de varios factores, incluyendo el genotipo, la composición del medio (Texeira *et al.*, 2011) y el protocolo de desinfección (Paz *et al.*, 2004).

La organogénesis directa de brotes a partir de tejidos de nodos cotiledonales es un procedimiento conveniente que demostró su eficiencia en genotipos chinos de soya (Ma y Wu, 2008). La principal ventaja de este método es que usa reguladores de crecimiento vegetal (RCV), que presentan potencial menor para inducir mutaciones y permiten un tiempo de cultivo menor en comparación con los procedimientos de organogénesis indirectos que atraviesan una fase intermedia de callo (Duncan, 2011).

En este estudio, la hipótesis es que la soya mexicana es adecuada para la regeneración *in vitro*, usando

In our study, the hypothesis is that Mexican soybean is suitable for *in vitro* regeneration using a cotyledonary node as explant. We aim to analyze the regeneration efficiency of eight Mexican genotypes by subjecting them to two seed disinfection procedures, two soaking pretreatments and four different shoot induction medium compositions, using the cotyledonary node method.

MATERIALS AND METHODS

The Mexican soybean genotypes for the study were selected on the basis of their commercial availability: Huasteca 100, Huasteca 200, Huasteca 300, Huasteca 400, Huasteca 600, Tamesi, Nainari and Suaqui-86. They were kindly donated by INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Mexico). The seeds were harvested in 2013 and stored at 4 °C until analysis.

The culture reagents were obtained from PhytoTechnology Laboratories (Shawnee Mission, KS, USA). The basal medium used was Murashige and Skoog salts with B5 vitamins, supplemented with 30 g L⁻¹ Sucrose, and 8 g L⁻¹ Plant Agar (MSB5). The pH was adjusted to 5.8 with 1M NaOH before autoclaving at 121 °C for 15 min. The incubation room was under a photoperiod of 16 h, an irradiance of 60 µmol m⁻² s⁻¹, and a temperature of 27 ± 1 °C.

Seed surface disinfection, soaking pretreatment and genotype evaluation

Two disinfection methods were evaluated: 1) chlorine gas seed disinfection and 2) aqueous sodium hypochlorite/ethanol method, with and without overnight soaking pretreatments with either water or 3% solution of commercial hydrogen peroxide (active ingredient 3% H₂O₂, DEGASA, Jiutepec, Mexico). In the first case, the seeds were placed into a tightly sealed chamber containing chlorine gas for 24 h. The chlorine gas was generated by mixing 3 mL of concentrated HCl and 100 mL commercial bleach (active ingredient 5% NaOCl, Clorox, Mexico City, Mexico) inside the chamber (Olhoft *et al.*, 2008). In the second method, the seeds were washed three times under running tap water, treated with 70% v/v ethanol for 30 s, disinfected with 12% commercial bleach for 20 min and rinsed four times with sterile distilled water (Ma and Wu, 2008).

For the soaking pretreatment, the seeds were soaked in sterile distilled water, or in a freshly prepared 3% dilution of commercial hydrogen peroxide, overnight (13 h) at 26 °C. The seeds were germinated over a period of five days on a basal medium supplemented with 0.50 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine

un nodo cotiledonal como explante. El objetivo fue analizar la eficiencia de regeneración de ocho genotipos mexicanos al someterlos a dos procedimientos de desinfección, dos pretratamientos de remojo y cuatro composiciones de medio de inducción de brotes, con el método de nodos cotiledonales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los genotipos de soya mexicanos utilizados en el presente estudio se eligieron con base en su disponibilidad comercial: Huasteca 100, Huasteca 200, Huasteca 300, Huasteca 400, Huasteca 600, Tamesi, Nainari y Suaqui-86. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, México) los donó amablemente. Las semillas se sembraron en el 2013 y almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Los reactivos de cultivo se obtuvieron de PhytoTechnology Laboratories (Shawnee Mission, KS, EE. UU.) El medio de cultivo usado fue con sales de Murashige and Skoog con vitaminas B5, complementadas con 30 g L⁻¹ sacarosa, y 8 g L⁻¹ Agar vegetal (MSB5). El pH se ajustó a 5.8 con NaOH 1M antes de esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. La incubación se hizo bajo un fotoperiodo de 16 h, una irradiancia de 60 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 27 ± 1 °C.

Desinfección superficial de semillas, pretratamiento de remojo y evaluación de genotipo

Dos métodos de desinfección se evaluaron: 1) desinfección de semillas con cloro gaseoso y 2) el método acuoso de hipoclorito de sodio /etanol, con o sin pretratamientos de remojo, ya sea en agua o en una disolución al 3% de agua oxigenada comercial (ingrediente activo 3% H₂O₂, DEGASA, Jiutepec, México). En el primer caso, las semillas se colocaron en una cámara hermética con cloro gaseoso durante 24 h. El cloro gaseoso se generó con una mezcla de 3 mL de HCl concentrado y 100 mL de blanqueador comercial (ingrediente activo 5% NaOCl, Clorox, Ciudad de México, México) adentro de la cámara (Olhoft *et al.*, 2008). En el segundo método, las semillas se lavaron tres veces con agua potable, se trataron con etanol al 70% por 30 s, se desinfectaron con blanqueador comercial al 12% por 20 min y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril (Ma and Wu, 2008).

Para el pretratamiento de remojo, las semillas se pusieron a remojar en agua estéril destilada, o en una dilución al 3% de agua oxigenada comercial durante la noche (13 h) a 26 °C. Las semillas se dejaron germinar durante un periodo de cinco días en un medio de cultivo complementado con 0.50 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP). Para preparar los explantes, las hojas pri-

(BAP). In order to prepare the explants, the primary leaves, epicotyl, and a portion of the hypocotyl were excised using a sterile blade; several scratches were made in the meristematic region of the cotyledonary node.

Explants from 5-day old seedlings were transferred onto a shoot induction medium (basal medium with PGR: 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ Indole-3-butyric acid (IBA), and 0.5 mg L⁻¹ Kinetin (KIN) and incubated for 15 d. The percentage of germination and the mean number of shoots were recorded.

Genotype and shoot induction medium evaluation

After using the chlorine gas disinfection method and overnight soaking pretreatment (3% H₂O₂), the seeds were germinated for 5 d, and explants prepared as described above. Then, the explants were transferred onto a Shoot Induction Medium (SIM) and incubated for 15 d. Eight Mexican genotypes and four SIM with different PGR composition were tested: 1) 3.0 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP), 0.2 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA), 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN); 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. After 15 d in SIM, the shoots were counted.

Regeneration protocol

The explants were prepared for the elongation stage using the conditions that maximized the number of shoots. The explants were transferred onto a PGR-free basal medium (shoot elongation medium) until elongated shoots were 3-4 cm in length. Several shoots required only a few days for elongation, while others needed 1-6 weeks. In the latter case, the explant was subcultured onto fresh elongation medium every 15 d.

Elongated shoots were excised and transferred to a rooting medium, which consisted of basal medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA), and then incubated for 15 d. The plantlets were gently washed under tap water, then transferred to pots containing autoclaved garden soil (#70786350, Scotts Miracle-Gro, Marysville, OH, USA). Plantlets were acclimatized 7 d by covering the pots with inverted transparent plastic cups to keep internal humidity, watered with tap water every 3 d and grown under a photoperiod of 16 h, an irradiance of 60 µmol m⁻² s⁻¹ and a temperature of 27 ± 1 °C.

Experimental design and statistical analysis

In order to test the amenability of Mexican soybean for direct shoot regeneration, the effects of the soybean genotype, seed disinfection procedure, soaking pretreatment before germination, as well as the culture medium composition of

marías, el epicótilo, y una porción del hipocótilo, se extirparon con un bisturí esterilizado; se realizaron varias rasgaduras en la región meristemática del nodo cotiledonal.

Los explantes de plántulas de 5 días de edad se transfirieron a un medio de inducción de brotes (medio de cultivo con RCV: 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ ácido Indol-3-butírico (AIB), 0.5 mg L⁻¹ Cinetina (CIN) e incubados por 15 d. El porcentaje de germinación y el número promedio de brotes se registraron.

Evaluación del genotipo y del medio de inducción de brotes

Después de usar el método de desinfección con cloro gaseoso y el pretratamiento de remojo durante toda la noche (3% H₂O₂), las semillas germinaron durante 5 d, y los explantes se prepararon según lo descrito anteriormente. Después, los explantes se transfirieron a un medio de inducción de brotes (MIB) e incubados por 15 d. Ocho genotipos mexicanos se probaron y cuatro MIB con diferentes composiciones RCV: 1) 3.0 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP), 0.2 mg L⁻¹ ácido indol-3-butírico (AIB), 0.5 mg L⁻¹ cinetina (CIN); 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. Después de 15 d en MIB, se contaron los brotes.

Protocolo de regeneración

Los explantes se prepararon para la fase de elongación, con las condiciones que maximizaron el número de brotes. Los explantes se transfirieron a un medio de cultivo libre de RCV (medio de elongación de brotes) hasta que los brotes alcanzaron una longitud de 3-4 cm. Varios brotes solo requirieron pocos días para su elongación, mientras que otros necesitaron 1-6 semanas. En el último caso, el explante se subcultivó a un medio de elongación nuevo cada 15 d.

Los brotes largos se extirparon y trasladaron a un medio de enraizamiento, que consistió en un medio de cultivo complementado con 1.0 mg L⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (ANA), y se incubó por 15 d. Las plántulas se lavaron con cuidado con agua potable y se transfirieron a macetas con tierra de jardín previamente esterilizada en autoclave (#70786350, Scotts Miracle-Gro, Marysville, OH, EE. UU.) Las plántulas se aclimataron durante 7 d por medio de cubrir las macetas con vasos de plástico transparentes invertidos para mantener la humedad interna, se regaron con agua potable cada 3 d, se dejaron crecer bajo un fotoperiodo de 16 h, una irradiancia de 60 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 27 ± 1 °C.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para probar la capacidad de respuesta de la soya mexicana a la regeneración directa de brotes, los efectos del genotipo de soya,

the shoot induction medium, were evaluated by two split-plot statistical designs (Altman and Krzywinski, 2015). In the first split-plot design, the effects of genotype (8 levels), disinfection procedure (2 levels) and soaking pretreatment (3 levels) were evaluated. The response variables were the germination percentage (%) and the mean number of shoots per explant (#). In the second split-plot design, the shoot induction medium (4 levels) and the genotype (8 levels) were evaluated; the response variable was the mean number of shoots (#).

In the first split-plot experiment, the germination percentage was determined from 15 seeds per treatment and the mean number of shoots was determined from eight explants per disinfection/soaking treatment in eight repetitions of the whole experiment. The Freeman–Tukey transformation and the Wilcoxon/Kruskal-Wallis nonparametric tests were used for the analysis of the germination percentage. When treatments had a significant effect, the nonparametric Steel-Dwass multiple comparison test was used ($p \leq 0.05$).

After validating the normality assumption through residuals analysis, the mean number of shoots was analyzed using the Standard Least Squares method with restricted maximum likelihood estimations (REML). Factors were statistically significant if $p \leq 0.01$ ($\text{LogWorth} > 2$). Multiple comparisons of the means were carried out using Tukey's test ($p \leq 0.05$). The Pearson coefficient was calculated for the correlation of the germination percentage with the mean number of shoots in the regeneration protocol.

In the second split-plot experiment, the shoot induction medium was the whole plot with eight subplots (eight varieties). Eight explants (one for each cultivar) per culture vessel and 15 replicates for each of the four evaluated media were used. The mean number of shoots per explant was recorded and analyzed by Standard Least Squares and Tukey's test. All statistical analyses were conducted in JMP v.12 (by SAS Institute for Mac).

RESULTS AND DISCUSSION

In the first split-plot analysis, the germination response was significantly affected by the disinfection method (Chi Square = 104, $df=1$, $p \leq 0.0001$), the soaking pretreatment (Chi Square=64, $df=2$, $p \leq 0.0001$) and the interaction between the two (Chi Square=189, $df=5$, $p \leq 0.0001$), but not by the genotype (Table 1). The germination percentage was significantly higher when using chlorine gas disinfection and a soaking pretreatment with either water or 3% hydrogen peroxide. Soaked seeds disinfected with chlorine gas reached close to optimal germination rates ($> 90\%$).

el procedimiento de desinfección de semillas, el pretratamiento de remojo antes de la germinación, así como la composición del medio de inducción de brotes se evaluaron por medio de dos diseños estadísticos en parcelas divididas (Altman y Krzywinski, 2015). En el primer diseño en parcelas divididas se evaluaron los efectos del genotipo (8 niveles), el procedimiento de desinfección (2 niveles) y el pretratamiento de remojo (3 niveles). Las variables de respuesta fueron el porcentaje de germinación (%) y el promedio de brotes por explante (#). En el segundo diseño en parcelas divididas se evaluó el medio de inducción de brotes (4 niveles) y el genotipo (8 niveles); la variable de respuesta fue el promedio de brotes (#).

En el primer experimento en parcela dividida, el porcentaje de germinación se determinó a partir de 15 semillas por tratamiento y el número promedio de brotes se determinó a partir de ocho explantes por tratamiento de desinfección/remojo en ocho repeticiones del experimento entero. Las pruebas de transformación de Freeman–Tukey y la no-paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis se usaron para el análisis del porcentaje de germinación. Cuando los tratamientos tuvieron efecto significativo, se usó la prueba de comparación múltiple no-paramétrica Steel-Dwass ($p \leq 0.05$).

Una vez validada la suposición de normalidad a través del análisis de residuales, el promedio de brotes se analizó por medio del método de mínimos cuadrados estándar, con estimaciones de máxima verosimilitud restringida. Los factores fueron estadísticamente significativos si $p \leq 0.01$ ($\text{LogWorth} > 2$). Múltiples comparaciones de las medias se llevaron a cabo al aplicar la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El coeficiente de Pearson se calculó para la correlación del porcentaje de germinación con el promedio de brotes en el protocolo de regeneración.

En el segundo experimento en parcelas divididas, el medio de inducción de brotes fue la parcela grande con ocho subparcelas (ocho variedades). Ocho explantes (uno por cada cultivar) se usaron por recipiente de cultivo y 15 réplicas para cada uno de los cuatro medios evaluados. El número promedio de brotes por explante se registró y analizó por medio de las pruebas de mínimos cuadrados estándar y de Tukey. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en JMP v. 12 (desarrollado por SAS Institute para Mac).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer análisis en parcelas divididas, la respuesta de germinación se vio significativamente afectada por el método de desinfección (Chi Cuadrado = 104, $df=1$, $p \leq 0.0001$), el pretratamiento de remojo (Chi Square=64, $df=2$, $p \leq 0.0001$) y la interacción entre ambos (Chi Cuadrado=189, $df=5$,

Table 1. Effect of the genotype, seed disinfection method, soaking pretreatment and the interaction disinfection $\times$ soaking, over the germination and shoot induction of Mexican soybean genotypes.**Cuadro 1. Efecto del genotipo, método de desinfección de la semilla, pretratamiento de remojo y la interacción desinfección $\times$ remojo sobre la germinación e inducción de brotes en genotipos de soya mexicana.**

Effect	Germination %	Mean number of shoots [†]
Genotype		
Huasteca 100	76.8 $\pm$ 3.1	7.0 $\pm$ 0.9 a
Huasteca 200	74.0 $\pm$ 3.7	3.9 $\pm$ 0.5 b
Huasteca 300	73.3 $\pm$ 4.0	3.0 $\pm$ 0.6 b
Huasteca 400	77.8 $\pm$ 3.2	3.5 $\pm$ 0.3 b
Huasteca 600	75.0 $\pm$ 3.3	3.0 $\pm$ 0.3 b
Nainari	78.3 $\pm$ 4.0	6.4 $\pm$ 0.9 a
Suaqui-86	71.9 $\pm$ 4.7	6.5 $\pm$ 0.9 a
Tamesí	74.9 $\pm$ 3.7	3.3 $\pm$ 0.3 b
Disinfection procedure		
Cl ₂ (g)	85.8 $\pm$ 1.5 a	5.9 $\pm$ 0.4 a
NaOCl(aq) /EtOH	64.7 $\pm$ 1.5 b	3.3 $\pm$ 0.2 b
Soaking pretreatment		
3% H ₂ O ₂	83.8 $\pm$ 2.0 a	6.2 $\pm$ 0.5 a
No soaking	64.4 $\pm$ 1.4 b	3.1 $\pm$ 0.2 c
Water	77.6 $\pm$ 2.5 a	4.5 $\pm$ 0.4 b
Disinfection $\times$ Soaking		
Cl ₂ (g) $\times$ 3 % H ₂ O ₂	96.7 $\pm$ 0.9 a	8.6 $\pm$ 0.8 a
Cl ₂ (g) $\times$ No soaking	69.2 $\pm$ 1.8 b	2.9 $\pm$ 0.2 c
Cl ₂ (g) $\times$ Water	91.6 $\pm$ 1.7 a	6.3 $\pm$ 0.7 b
NaOCl(aq) /EtOH $\times$ 3% H ₂ O ₂	70.9 $\pm$ 2.1 b	3.8 $\pm$ 0.3 c
NaOCl(aq) /EtOH $\times$ No soaking	59.6 $\pm$ 1.9 b	3.3 $\pm$ 0.4 c
NaOCl(aq) /EtOH $\times$ Water	63.5 $\pm$ 3.3 b	2.7 $\pm$ 0.3 c

[†]The values represent means $\pm$ SE. For multiple comparisons, the Germination % was analyzed using a nonparametric test (Steel-Dwass) and the number of shoots was analyzed using Tukey's test. Different letters indicate statistical differences ($p \leq 0.05$). ♦ Los valores representan medias $\pm$ EE. Para comparaciones múltiples, el porcentaje de germinación se analizó con una prueba no-paramétrica (Steel-Dwass) y el número de brotes se analizó con la prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

The shoot induction was significantly affected by the disinfection method, the genotype, the soaking pretreatment and by the disinfection $\times$ soaking interaction with LogWorth values of 28, 27, 23 and 18, respectively. The number of shoots per explant was significantly higher when using the chlorine gas and a soaking pretreatment in comparison with the number of shoots produced by explants with no soaking pre-treatment (Table 1). Considering the chlorine gas method $\times$ soaking interaction, the water soaking pretreatment increased the mean number of shoots from 2.9 to 6.3 (117% increment), while the hydrogen peroxide pretreatment increased the mean number of shoots from 2.9 to 8.6 shoots per explant (197% increment).

$p \leq 0.0001$), aunque no por el genotipo (Cuadro 1). El porcentaje de germinación fue significativamente mayor al usar la desinfección con cloro gaseoso y un pretratamiento de remojo, ya sea con agua o agua oxigenada al 3%. Las semillas remojadas y desinfectadas con cloro gaseoso alcanzaron tasas de germinación cercanas a las óptimas ($> 90\%$).

La inducción de brotes se vio afectada de manera significativa por el método de desinfección, el genotipo, el pretratamiento de remojo y la interacción desinfección $\times$ remojo con valores LogWorth de 28, 27, 23 y 18, respectivamente. El número de brotes por explante fue significativamente mayor con el uso del cloro gaseoso y un pretratamiento de remojo en comparación con el número de brotes producidos

A seed surface disinfection method is a key factor in eliminating bacterial and fungal contamination when the seeds are harvested from open fields. Wet disinfection protocols with sodium hypochlorite are very common; however, it was noticed that when using a NaOCl(aq) /EtOH disinfection protocol, the germination rate and the shoot induction of Mexican soybean remained low (Table 1). Yildiz and Er (2002) and Barampuram *et al.* (2014) showed adverse effects of commercial sodium hypochlorite on plant species like wheat, cotton and flax, as well as the importance of optimizing NaOCl concentrations and exposure time to guarantee viability on explants.

Exposure to ethanol could also have detrimental effects on seed viability (Li *et al.*, 2017). A significant positive correlation was found between the germination and the shoot induction ($r=0.5$, $p\leq 0.0001$). This fact means that the lower the germination rate, the lower the capability to regenerate the target tissues. Since reduction of seed viability by disinfectants could result in unhealthy explants, it is worth noticing that the pretreatment of the seed affects the *in vitro* performance, from germination to shoot induction.

A prolonged dry disinfection protocol with chlorine gas can also have a negative effect on the explant vigor (Paz *et al.*, 2004). Using chlorine gas (without a soaking pretreatment) the germination percentage and the shoot induction were still suboptimal. This problem was circumvented by combining the chlorine gas disinfection method with a soaking pre-treatment. Maroufi and Aliabadi (2011) and Chen and Arora (2013) hypothesized that a water soaking pretreatment of seeds (hydropriming) improves the germination rate, uniformity, as well as the stress tolerance and vigor of germinating seeds.

When seeds are soaked in water, they quickly reach a high level of hydration and oxygen, which, in turn, increases the level of intermediate metabolites and enzymes associated with germination, DNA repair and energy production (Zulueta-Rodriguez *et al.*, 2015). The early repair mechanism activated during the imbibition phase has been associated with seed vigor (Ventura *et al.*, 2012). Our results showed that the overnight soaking enhanced the seed performance by improving the germination percentage and vigor of the explants, which consequently resulted in a higher number of shoots per explant in the regeneration process.

al no remojar los explantes (Cuadro 1). Al tomar en cuenta la interacción del método cloro gaseoso (g) $\times$ remojo, el pretratamiento de remojo en agua aumentó el promedio de brotes de 2.9 a 6.3 (incremento del 117%), mientras que el pretratamiento con agua oxigenada aumentó el número promedio de brotes de 2.9 a 8.6 brotes por explante (incremento de 197%).

Un método de desinfección de la superficie de semillas es un factor clave en la eliminación de contaminación bacteriana y fúngica cuando las semillas se cosechan en campos abiertos. Los protocolos de desinfección húmedos con hipoclorito de sodio son muy comunes; sin embargo, se observó que al usar un protocolo de desinfección con NaOCl(aq) /EtOH, la tasa de germinación y la inducción de brotes de soya mexicana permaneció baja (Cuadro 1). Yildiz y Er (2002) y Barampuram *et al.* (2014) demostraron efectos adversos del hipoclorito de sodio comercial sobre especies vegetales como trigo, algodón y linaza, así como la importancia de optimizar concentraciones de NaOCl y tiempos de exposición para garantizar la viabilidad del explante.

La exposición al etanol también podría tener efectos nocivos sobre la viabilidad de las semillas (Li *et al.*, 2017). Una correlación positiva se encontró entre la germinación y la inducción de brotes ($r=0.5$, $p\leq 0.0001$). Este hecho significa que cuanto más baja sea la tasa de germinación, menor será la capacidad de regeneración del tejido buscado. Debido a que la reducción en la viabilidad de las semillas por los desinfectantes podría resultar en explantes poco saludables, es importante indicar que el pretratamiento de la semilla afecta el desempeño *in vitro*, desde la germinación hasta la inducción de brotes.

Un protocolo prolongado de desinfección seca con cloro gaseoso también puede tener un efecto negativo sobre el vigor del explante (Paz *et al.*, 2004). Con el uso de cloro gaseoso (sin un pretratamiento de remojo) el porcentaje de germinación y la inducción de brotes continuaron siendo subóptimos. Este problema se evitó al combinar el método de desinfección con cloro gaseoso y el pretratamiento de remojo. Maroufi y Aliabadi (2011) y Chen y Arora (2013) plantearon la hipótesis de que un pretratamiento de remojo de semillas en agua (hidro-acondicionamiento) mejora la tasa de germinación, uniformidad, así como la tolerancia al estrés y el vigor de las semillas en germinación.

According to Mohammad (2013), hydrogen peroxide functions as a modulator, activating multiple defense responses that reinforce resistance to various abiotic and biotic stresses in plants. Hydrogen peroxide shows a signaling role with other reactive molecules, such as nitric oxide and hydrogen sulfide, and phytohormones, such as abscisic acid, gibberellins and ethylene, during seed germination (Wojtyla *et al.*, 2016).

Even though it was not possible to uncover previous evidence that correlated hydrogen peroxide with the regeneration capability, in our study it was confirmed that a pretreatment with hydrogen peroxide is a simple and valuable method to stimulate not only germination, but also shoot induction. The number of shoots was significantly higher for the seeds soaked in hydrogen peroxide, as compared to the ones soaked in water.

The effectiveness of the overnight soaking (for both water and 3% H_2O_2) was dependent on the disinfection method, with the combination of soaking after the chlorine gas disinfection being preferable (Table 1). Unlike the improvement in seed vigor observed after a soaking pretreatment following a chlorine gas disinfection; seeds that were soaked after a NaOCl (aq)/EtOH disinfection protocol did not improve their viability. It could be hypothesized that the phytotoxicity from the wet disinfection protocol surpassed a critical level, thereby preventing the advantages of the soaking pretreatment.

The shoot induction was also significantly affected by the genotype (Table 1) and by the following genotype-treatment interactions: genotype $\times$ soaking, genotype $\times$ disinfection and genotype $\times$ disinfection $\times$ soaking with LogWorth values of 11, 8 and 7 respectively (Figure 1). Under the NaOCl (aq)/EtOH disinfection protocol, there were no significant differences between the soaking pretreatments in all varieties. In contrast, under the chlorine gas disinfection protocol, the water pretreatment had a significant effect on the number of shoots in Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86 genotypes, while hydrogen peroxide had a significant effect on Huasteca-100, Huasteca-200, Nainari and Suaqui-86 genotypes (in comparison with the no soaked control).

Most Mexican genotypes registered an increase in the number of shoots when using a soaking pretreatment, however not all genotypes were equally

Las semillas se encuentran remojadas en agua, rápidamente alcanzan un nivel de hidratación y de oxígeno que, a su vez, aumenta el nivel de metabolitos intermedios y enzimas relacionadas con germinación, reparación de DNA y producción de energía (Zulueta-Rodriguez *et al.*, 2015). El mecanismo temprano de reparación activado durante la fase de imbibición se ha relacionado con el vigor de la semilla (Ventura *et al.*, 2012). Nuestros resultados mostraron que el remojo durante toda la noche contribuyó al desempeño de la semilla por medio de mejorar el porcentaje de germinación y el vigor de los explantes; esto en consecuencia, dio como resultado un número mayor de brotes por explante en el proceso de regeneración.

De acuerdo con Mohammad (2013), el agua oxigenada funciona como un modulator, al activar respuestas de defensa múltiples que refuerzan la resistencia a formas distintas de estrés biótico y abiótico en las plantas. El agua oxigenada desempeña un papel en la señalización hacia otras moléculas reactivas, tales como el óxido nítrico y el sulfuro de hidrógeno, y algunas fitohormonas como el ácido abscísico, giberelinas y el etileno, durante la germinación de la semilla (Wojtyla *et al.*, 2016).

Aun cuando no fue posible descubrir evidencia previa que correlacionara el agua oxigenada con la capacidad de regeneración, en este estudio se confirmó que el pretratamiento con agua oxigenada es un método simple y valioso para estimular, no sólo la germinación, sino también la inducción de brotes. El número de brotes fue significativamente más alto para las semillas remojadas en agua oxigenada, en comparación con las remojadas en agua.

La efectividad del remojo durante toda la noche (tanto del agua potable como del H_2O_2 3%) dependió del método de desinfección, con la preferencia de la combinación del remojo después de la desinfección con cloro gaseoso (Cuadro 1). A diferencia de la mejora en el vigor de las semillas, observado después de un pretratamiento de remojo posterior a una desinfección con cloro gaseoso; las semillas que se remojaron después de un protocolo de desinfección de NaOCl (aq)/EtOH no mejoraron su viabilidad. La conjetura posible es que la fitotoxicidad del protocolo de desinfección húmedo sobrepasó un nivel crítico e impidió las ventajas del pretratamiento de remojo.

La inducción de brotes también se vio afectada de manera significativa por el genotipo (Cuadro 1) y

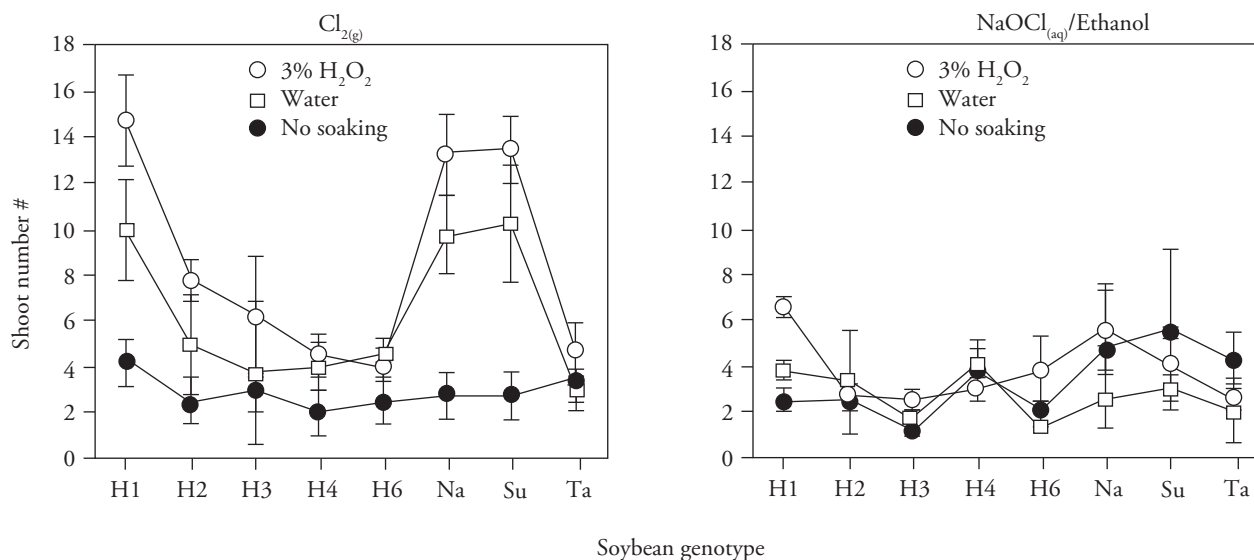


Figure 1. Effect of interactions of genotype, disinfection and soaking pretreatment on the shoot induction in Mexican soybean. If the difference between means is larger than Tukey's HSD value 3.8, the corresponding means are significantly different ($p \leq 0.05$). H1: Huasteca 100, H2: Huasteca 200, H3: Huasteca 300, H4: Huasteca 400, H6: Huasteca 600, Na: Nainari, Su: Suaqui-86 and Ta: Tamesi.

Figura 1. Efecto de las interacciones del genotipo, desinfección y pretratamiento de remojo sobre la inducción de brotes en la soya mexicana. Si la diferencia entre medias es mayor al valor HSD de Tukey de 3.8, las medias correspondientes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). H1: Huasteca 100, H2: Huasteca 200, H3: Huasteca 300, H4: Huasteca 400, H6: Huasteca 600, Na: Nainari, Su: Suaqui-86 y Ta: Tamesi.

affected (Figure 1). Thus, the regeneration capability, in terms of the number of shoots, is the result of interactions between the genotype and the explant pretreatments. This finding agrees with Pratap *et al.* (2018), who pointed out that regeneration of grain legumes is highly genotype dependent. The process of organogenesis involves the activation of several metabolic pathways and developmental genes; therefore, protocols must be customized for each genotype (Nagle *et al.*, 2018). The most regenerative genotypes regarding shoot induction were Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86 under the current protocol conditions.

In the second split-plot analysis, in which the evaluated factors were the shoot induction medium composition and the genotype; the shoot induction was affected by the soybean genotype (LogWorth=73), but not by the shoot induction medium (LogWorth=0.8). The higher multiple shoot formation was obtained using the varieties Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86, which on average produced more than 10 shoots per explant; these three varieties were not significantly different (Figure 2).

por las siguientes interacciones genotipo-tratamiento: genotipo $\times$ remojo, genotipo $\times$ desinfección y genotipo $\times$ desinfección $\times$ remojo con valores Log-Worth de 11, 8 y 7 respectivamente (Figura 1). Bajo el protocolo de desinfección NaOCl (aq)/EtOH, no hubo diferencias significativas entre los pretratamientos de remojo en todas las variedades. Por el contrario, bajo el protocolo de desinfección con cloro gaseoso, el pretratamiento con agua tuvo un efecto significativo sobre el número de brotes en los genotipos Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86, mientras que el agua oxigenada tuvo un efecto significativo sobre los genotipos Huasteca-100, Huasteca-200, Nainari y Suaqui-86 (en comparación con el control sin remojar).

La mayoría de los genotipos mexicanos registraron un incremento en el número de brotes con un pretratamiento de remojo, aunque no todos los genotipos se afectaron igual (Figura 1). Por lo tanto, la capacidad de regeneración en términos del número de brotes es el resultado de las interacciones entre el genotipo y los pretratamientos a los explantes. Este hallazgo concuerda con Pratap *et al.* (2018), quien señaló que la regeneración a partir de granos de le-

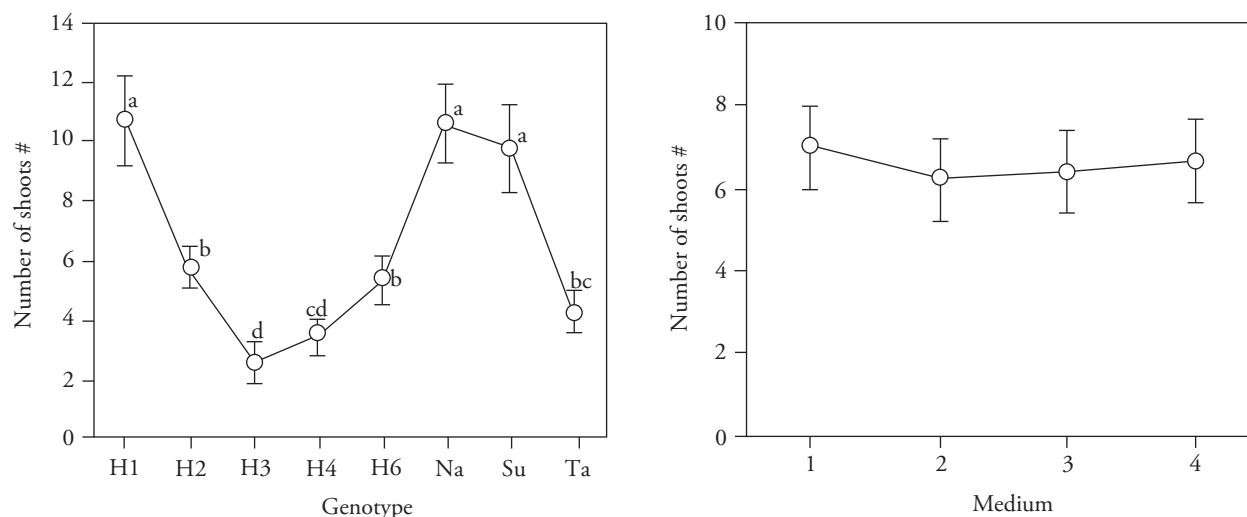


Figure 2. Effect of the genotype and the shoot induction medium on the shoot induction of Mexican soybean genotypes. 1) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA, 0.5 mg L⁻¹ KIN; 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. If the difference between two means is larger than the Tukey's critical value (4.3) the two means are significantly different ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Efecto del genotipo y el medio de inducción de brotes sobre la inducción de brotes en genotipos de soya mexicana. 1) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA, 0.5 mg L⁻¹ KIN; 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. Si la diferencia entre dos medias es mayor al valor crítico de Tukey (4.3), ambas medias son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

These genotypes are potentially a good platform for the improvement of soybean quality through *in vitro* systems. Huasteca-100 is adapted to Yucatan Peninsula, is resistant to plant diseases such as canker and frog eye (*Cercospora sojina*). Nainari and Suaqui-86 are adapted to northwestern Mexico and are resistant to whiteflies (Financiera Rural, 2013).

Another critical and important parameter in the regeneration process is the presence of auxins and cytokinins in the early stages of shoot development. Hai *et al.* (2014), Ma and Wu (2008), Song *et al.* (2013), Yang *et al.* (2016) and Zhang *et al.* (2014) reported successful results using BAP, IBA and KIN in the shoot induction stage. We tested different BAP, IBA and KIN levels in search of a medium to further optimize the regeneration capability.

However, in our experiments, the four evaluated media (and the interaction medium $\times$ genotype) did not have a significant effect on the mean number of shoots. In further studies, it would be of interest to determine whether additional changes in the composition of SIM, for example, the use of different PGR, the addition of polyamines, or the

guminosas depende en gran medida del genotipo. El proceso de la organogénesis involucra la activación de más de una ruta metabólica y genes codificadores del desarrollo; por lo tanto, los protocolos se deben adecuar a cada genotipo (Nagle *et al.*, 2018). Los genotipos más regenerativos en términos de inducción de brotes fueron Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86 bajo las condiciones del protocolo actual.

En el segundo análisis en parcelas divididas, en el cual los factores evaluados fueron la composición del medio de inducción de brotes y el genotipo; la inducción de brotes se vio afectada por el genotipo de soya (LogWorth=0.73), pero no así por el medio de inducción de brotes (LogWorth=0.8). La formación mayor de brotes múltiples se obtuvo con las variedades Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86; ya que en promedio produjeron más de 10 brotes por explante; estas tres variedades no fueron significativamente diferentes (Figura 2).

Estos tres genotipos tienen potencial como plataforma apropiada para la mejora de la calidad de la soya a través de sistemas *in vitro*. Huasteca-100 está adaptada a la Península de Yucatán, presenta resis-

addition of antibiotics and antioxidants (required in transformation), might affect the regeneration capability of Mexican genotypes (Arun *et al.*, 2014).

The regeneration of Mexican soybean was initially limited by low germination rates and low shoot induction frequencies. The elongation and root induction stages showed that all tested genotypes elongated shoots in shoot elongation medium (without PGR), and then 100% of elongated shoots formed roots after transference to rooting medium. In contrast to the shoot induction, the elongation stage, the root induction and the acclimatization of plantlets were not affected by the genotype.

The improved regeneration protocol for Mexican soybean (Figure 3) includes chlorine gas disinfection method, soaking pretreatment with 3% commercial hydrogen peroxide, a shoot induction phase with

tencia a fitopatologías tales como el cancro y el manchado “ojo de rana” (*Cercospora sojina*). Nainari y Suaqui-86 están adaptadas al noroeste mexicano y son resistentes a la mosquita blanca (Financiera Rural, 2013).

Otro indicador crítico e importante en el proceso de regeneración es la presencia de auxinas y citoquininas en las primeras etapas del desarrollo de los brotes. Hai *et al.* (2014), Ma y Wu (2008), Song *et al.* (2013), Yang *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2014) reportaron resultados exitosos con el uso de BAP, AIB y CIN en la etapa de inducción del brote. Así que se probaron niveles diferentes de BAP, AIB y CIN en busca de un medio para optimizar aún más la capacidad de regeneración.

Sin embargo, en nuestros experimentos, los cuatro medios evaluados (así como la interacción medio

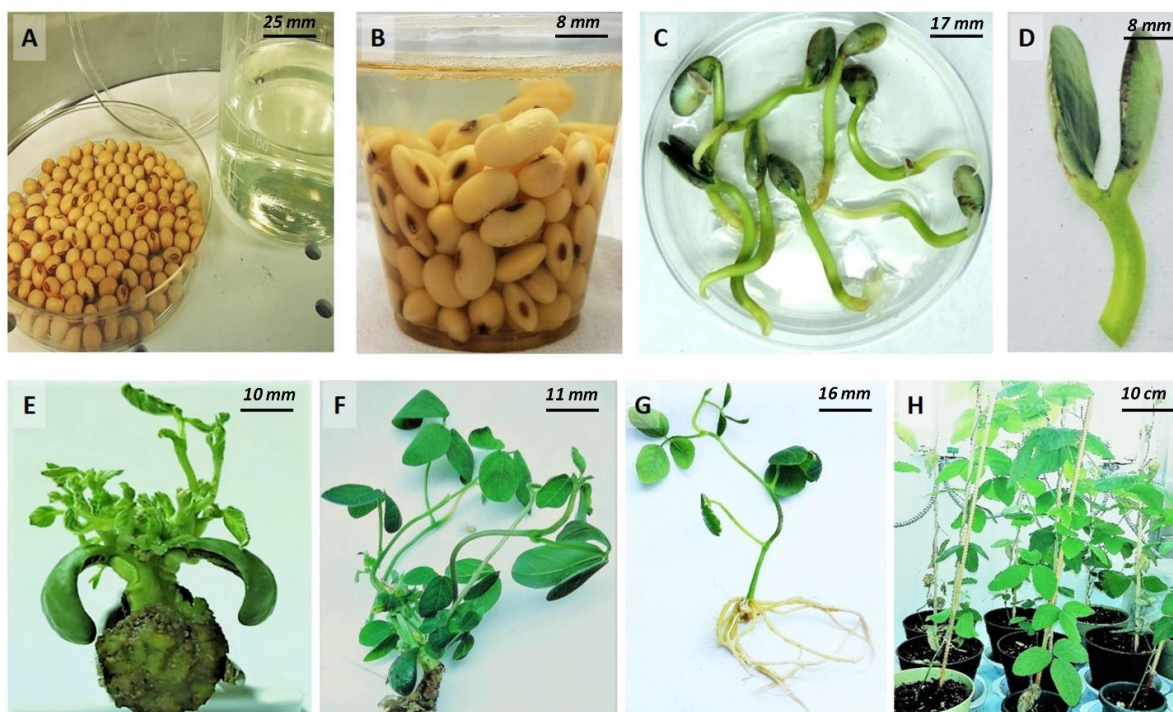


Figure 3. Regeneration of Mexican soybean (Huasteca-100) from cotyledonary node: A. Chlorine gas surface seed disinfection; B. 13 h soaking (3% H_2O_2); C. Five days old seedlings; D. Explant preparation; E. Explant with multiple shoots after 15 d in MSB5 supplemented with phytohormones (BAP, IBA, KIN); F. Elongated shoots after 15 d in hormone-free medium; G. Plantlet after 15 d in medium supplemented with NAA; H. Plants growing in soil.

Figura 3. Regeneración de soya mexicana (Huasteca-100) a partir de nódulos cotiledonales: A. Desinfección de semillas con cloro gaseoso; B. 13 h en remojo (3% H_2O_2); C. Plántulas de cinco días de edad; D. Preparación de explantes; E. Explante con brotes múltiples después de 15 d en MSB5 complementado con fitohormonas (BAP, IBA, KIN); F. Brotes alargados después de 15 d en un medio libre de hormonas; G. Plántula después de 15 d en un medio complementado con ANA; H. Plantas en crecimiento en suelo.

PGR (SIM-1), and Mexican genotypes with a good regeneration capability such as Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86. The entire process from the stage of soaking pretreatment to the stage of formation of plantlets in soil takes at least 60 d. This regeneration protocol enabled the successful regeneration of all tested varieties into healthy plants that produced viable seeds.

CONCLUSIONS

Mexican soybean varieties Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86 were the most suitable for *in vitro* regeneration from cotyledonary node explants. For the improvement of the regeneration protocol, disinfection with chlorine gas and overnight soaking pretreatment with 3% commercial hydrogen peroxide were advantageous to increase the mean number of shoots per explant.

According to our knowledge, this is the first reported study on the influence of the disinfection and the soaking pretreatments on the regeneration of Mexican soybean. This regeneration protocol opens the door to future improvement for these Mexican genotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

To CIDPRO (Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas) for its financial support and Dr. Sergio Serna and Dr. Robert Winkler for their revision of the manuscript. To the Centro de Agrobiotecnología and the Centro de Biotecnología, FEMSA for support through their facilities. And to CONACyT for the scholarship (Ref.No. 487097) granted to S. Mora-Vásquez. To Karla Lorena López and Francisco Almeida, for their technical assistance.

LITERATURE CITED

- Altman, N. and M. Krzywinski. 2015. Points of significance: Split plot design. *Nat. Methods* 12: 165–166.
- Arun, M., K. Subramanyam, J. Theboral, A. Ganapathi, and M. Manickavasagam. 2014. Optimized shoot regeneration for Indian soybean: The influence of exogenous polyamines. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 117: 305–309.
- Barampuram, S., G. Allen, and S. Krasnyanski. 2014. Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 118: 179–185.
- Chen, K., and R. Arora. 2013. Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 94: 33–45.
- Duncan, D. 2011. Organogenesis and embryogenesis in plant genetic transformation. *In*: Yinghui, D., and O. David

× genotipo) no tuvieron un efecto significativo sobre el promedio de brotes. En estudios futuros sería de interés determinar si cambios adicionales en la composición del MIB, por ejemplo, el uso de diferentes RCV, la adición de poliaminas, o de antibióticos y antioxidantes (requeridos en la transformación), podrían afectar la capacidad de regeneración de genotipos mexicanos (Arun *et al.*, 2014).

La regeneración de la soya mexicana estaba, en un principio, limitada por tasas bajas de germinación y frecuencias bajas de inducción de brotes. Las fases de elongación e inducción de raíz mostraron que todos los genotipos analizados elongaron brotes en el medio de elongación (sin RCV), y luego, 100% de los brotes elongados formaron raíces después de transferirse a un medio de enraizamiento. A diferencia de la inducción de brotes, a las etapas de elongación, inducción de raíz y aclimatación de las plántulas no las afectó el genotipo.

El protocolo mejorado de regeneración para la soya mexicana (Figura 3) incluye el método de desinfección con cloro gaseoso, el pretratamiento de remojo con agua oxigenada comercial al 3%, una fase de inducción con RCV (MIB-1), y genotipos mexicanos con una buena capacidad de regeneración, tales como Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86. Todo el proceso, desde la etapa de pretratamiento de remojo, hasta la etapa de formación de plántulas en el suelo requiere al menos 60 d. Este protocolo de regeneración permitió la regeneración exitosa de todas las variedades probadas, las cuales se convirtieron en plantas sanas que produjeron semillas viables.

CONCLUSIONES

Las variedades de soya mexicana Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86 fueron las más adecuadas para la regeneración *in vitro* a partir de explantes de nodos cotiledonales. Para la mejora del protocolo de regeneración, la desinfección con cloro gaseoso y un pretratamiento de remojo durante toda la noche en agua oxigenada comercial al 3% representaron una ventaja para aumentar el promedio de brotes por explante.

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer estudio reportado sobre la influencia de la desinfección y los pretratamientos de remojo en la regeneración de soya mexicana. Este protocolo de regeneración abre la puerta a mejoras futuras en estos genotipos mexicanos.

- (eds). Historical Technology Developments in Plant Transformation. Bentham Science Publishers. Chesterfield, Missouri, USA. pp: 46–54.
- Financiera Rural. 2013. Semilla para siembra de soya. <https://www.yumpu.com/es/document/read/30771461/semilla-para-siembra-de-soya-financiera-rural>. (Accessed: August 2018).
- Hai, H. N., S. K. Lal, S. K. Singh, K. V. Prabhu, and A. Talukdar. 2014. Direct organogenesis in some soybean genotypes using cotyledonary segments. *Indian J. Biotechnol.* 13: 527–531.
- Haun, W., A. Coffman, B. M. Clasen, Z. L. Demorest, A. Lowy, E. Ray, A. Retterath, T. Stoddard, A. Juillerat, F. Cedrone, L. Mathis, D. F. Voytas, and F. Zhang. 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol. J.* 12: 934–940.
- Lee, K., B.-Y. Yi, K.-H. Kim, J.-B. Kim, S.-C. Suh, H.-J. Woo, K.-S. Shin, and S.-J. Kweon. 2011. Development of efficient transformation protocol for soybean (*Glycine max* L.) and characterization of transgene expression after *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54: 37–45.
- Li, K., W. Dong, Y. Zhao, H. Xu, J. Chen, and C. Xu. 2017. Effects of cultivar and ethanol disinfection on aseptic ermination of floquat (*Eriobotrya japonica*) seeds. *HortScience* 52: 941–945.
- Ma, X.-H., and T.-L. Wu. 2008. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiol. Plant.* 30: 209–216.
- Maroufi, K., and H. Aliabadi. 2011. Increasing of germination percentage by hydropriming method in soybean (*Glycine Max* L.). *Adv. Environ. Biol.* 5: 1663–1667.
- Mohammad, H. 2013. Hydrogen peroxide priming stimulates drought tolerance in mustard (*Brassica juncea* L.) Seedlings. *Plant Gene Trait* 4: 109–123.
- Nagle, M., A. Déjardin, G. Pilate, and S. H. Strauss. 2018. Opportunities for innovation in genetic transformation of forest trees. *Front. Plant Sci.* 9: 1–8.
- Olhoft, P. M., C. M. Donovan, and D. A. Somers. 2008. Soybean transformation using mature cotyledonary node explants. In: Wang, K. (ed). *Agrobacterium Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 385–396.
- Paz, M. M., H. Shou, Z. Guo, Z. Zhang, A. K. Banerjee, and K. Wang. 2004. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167–179.
- Pratap, A., U. Prajapati, C. M. Singh, S. Gupta, M. Rathore, N. Malviya, R. Tomar, A. K. Gupta, S. Tripathi, and N. P. Singh. 2018. Potential, constraints and applications of in vitro methods in improving grain legumes. *Plant Breed.* 137: 235–249.
- Raza, G., M. B. Singh, and P. L. Bhalla. 2017. *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *Biomed Res. Int.* 2017: 1–9.
- Ruiz C., J. A., E. Bravo M, G. Ramirez O., A. D. Baez G., M. Alvarez C., J. L. Ramos G., U. Nava C., y K. F. Byerly M. 2013. Plagas de importancia económica en México: Aspectos de su biología y ecología. Libro Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. 447 p.
- Singh, R. J., and R. L. Nelson. 2015. Intersubgeneric hybridization between *Glycine max* and *G. tomentella*: production of F1, amphidiploid, BC1, BC2, BC3, and fertile soybean plants. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1117–1136.
- Song, Z., J. Tian, W. Fu, L. Li, L. Lu, L. Zhou, Z. Shan, G. Tang, and H. Shou. 2013. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 14: 289–298.
- Stewart, C. N., M. J. Adang, J. N. All, H. R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, and W. a Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIaC gene. *Plant Physiol.* 112: 121–129.
- Texeira, L., A. de L. Braccini, B. G. M. Churata, E. S. N. Vieira, P. K. Martins, and I. Schuster. 2011. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. *Acta Sci. Agron.* 33: 67–74.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2018. Mexico Oilseeds and Products. Annual Economic Uncertainty to Drag on Oilseed Sector Growth, USDA GAIN Report MX8013. Mexico City, 24 p.
- Ventura, L., M. Dona, A. Macovei, D. Carbonera, A. Buttafava, A. Mondoni, G. Rossi, and A. Balestrazzi. 2012. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 60: 196–206.
- Wojtyla, Ł., K. Lechowska, S. Kubala, and M. Garnczarska. 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 7: 1–16.
- Yang, X., X. Yu, Z. Zhou, W.-J. Ma, and G. Tang. 2016. A high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system using cotyledonary node as explants in soybean (*Glycine max* L.). *Acta Physiol. Plant.* 38: 60.
- Yildiz, M. 2012. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. In: Leva, A., and Rinaldi, L.M.R. (eds.), *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*. Intechopen, p. 64.
- Yildiz, M., and C. Er. 2002. The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften* 89: 259–261.
- Zhang, F., C. Chen, H. Ge, J. Liu, Y. Luo, K. Liu, L. Chen, K. Xu, Y. Zhang, G. Tan, and C. Li. 2014. Efficient soybean regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation using a whole cotyledonary node as an explant. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61: 620–625.
- Zia, M., Z. F. Rizvi, R. Riaz-ur, and M. F. Chaudhary. 2010. Micropropagation of two Pakistani soybean (*Glycine max* L.) cultivars from cotyledonary nodes. *Spanish J. Agric. Res.* 8: 448–453.
- Zulueta-Rodriguez, R., L. G. Hernandez-Montiel, B. Murillo-Amador, E. O. Rueda-Puente, L. Lara-Capistran, E. Troyo-Dieguez, and M. V. Cordoba-Matson. 2015. Effect of hydropriming and biopriming on seed germination and growth of two Mexican fir tree species in danger of extinction. *Forests* 6: 3109–3122.