

Estudio histológico de la embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem

Silvia Alemán García*¹, Gerardo González Oramas¹, Felipe Barredo.² *Autor para correspondencia

1.- Centro de Estudio Biotecnológico (CEBIO). Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Autopista a Varadero Km 3¹/₂. Matanzas. CP 40100. Cuba. e-mail: silvia@cdict.umtz.edu.cu

2.- Centro de Investigaciones Científica de Yucatán (CICY). Calle 43 No. 130 Col. Chuburna de Hidalgo 97 200, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN

Se realizó el estudio histológico de las estructuras embriogénicas formadas a partir de ápices meristemáticos de *Agave fourcroydes* con el objetivo de observar el comportamiento de la embriogénesis somática desde la inducción de los callos hasta la obtención del embrión somático maduro y comprobar su coincidencia con las fases de la embriogénesis descritas para plantas monocotiledóneas. Los ápices fueron cultivados *in vitro* en medio de inducción MS modificado, donde se tomaron las muestras periódicamente para ser incluidas en la resina JB-4 (Polysciences. Inc.1995), los cortes histológicos de 5-10 μm se realizaron con micrótopo y se tiñeron con el reactivo azul de toluidina al 2% se observaron y fotografiaron en microscopio Axioplan Zeiss con el objetivo de 20X. Los resultados mostraron que a partir de los 60 días de cultivo se observó la presencia de células meristemáticas pre-embriogénicas en toda la masa del callo y que en los siguientes sub-cultivos se hicieron evidentes los embriones en diferentes fases de formación globular y escutelar.

Palabras clave: *Agavaceae*, cultivo *in vitro*, embrión, henequén, histología

ABSTRACT

A histological study of the structures embryogenic formed from meristem of *Agave fourcroydes*, with the objective of observing the behavior of the somatic embryogenesis from the induction until the formation of the embryo was carried out. The meristem cultivated *in vitro* was subculture in modified MS medium the induction. The samples to be included in the resin JB-4 were taken periodically. The histologicals cuts of 5-10 μm were carried out with rotatory microtome and stained in 2% toluidine blue. The sections were observed and photographed in light microscopy Axioplan Zeiss with increases of 20X. The results show to the 60 days of culture the presence of cells meristematic pre-embryogenic. Embryos in different phases of formation globular and scutellum were observed in all the mass of the callus in the following subculture.

Key words: *Agavaceae*, *in vitro* culture, embryo, histology

INTRODUCCIÓN

El henequén es una especie perenne de propagación vegetativa, sobre la que existen pocos estudios (Casas y Caballero., 1996; Casas *et al.*, 1997; Zarate, 1997) lo que ha conllevado a un limitado conocimiento de su origen, variación y tendencias evolutivas.

El imperativo de la economía mundial a favor de la conservación de los recursos bióticos y su diversidad genética así como a favor de la disminución de la contaminación por plásticos y otros productos dañinos al hombre y al ambiente, se precisa de la caracterización, recuperación y conservación de los recursos genéticos disponibles para hacer de ellos un uso más racional. El henequén continúa siendo un cultivo altamente productivo en áreas ecológicas limitantes por escasez de agua y suelo (Colunga *et al.*, 1998).

Tiene además alto potencial de uso como fuente de productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus sapogeninas (Robert *et al.*, 1992), celulosa a partir de su fibra (Cazaurang *et al.*, 1990) y principios activos para la industria farmacéutica y la industria agropecuaria (Eastmond *et al.*, 2000).

La embriogénesis somática es un sistema de regeneración eficiente, sin embargo la inducción exitosa de los embriones somáticos y su siguiente conversión en plantas viables no es rutina o eficiente para la mayoría de las especies en los momentos actuales (Merkle, *et al.*, 1996), en el género *Agave* solo se ha alcanzado con éxito en una especie (*Agave victoria-reginae* Moore Rodríguez-Garay *et al.*, 1996). Logrado este proceso en henequén, se podría potenciar la producción de plantas (propagación masiva, semilla artificial) y se dispondría además, de un

protocolo de vital importancia, para futuros trabajos de transformación genética.

Los estudios histológicos secuenciados del desarrollo de la embriogénesis somática pueden ayudar a comprender el desarrollo de este proceso. Se han descrito cuatro fases para el mismo, las fases 0, 1, 2 y 3 pueden ser reconocidas desde los estados tempranos de la embriogénesis para dicotiledóneas (Gómez, 1998), en el caso de las monocotiledóneas existen las fases 0, 1, y 2; pero no la fase 3, pues no se diferencia el estado de corazón y torpedo, ya que el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por el estadio coleoptilar y de escutelo similar a como se describe para la embriogénesis cigótica en monocotiledóneas (Dodeman, 1997).

El objetivo de este trabajo fue comprobar mediante la observación secuenciada de cortes histológicos las fases del desarrollo de la embriogénesis somática en henequén y su correspondencia con los patrones descritos para la embriogénesis de plantas monocotiledóneas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Las muestras del material vegetal se obtuvieron de las diferentes fases de la embriogénesis somática descrito según el protocolo de González, *et al.* (2001) para el henequén, las mismas se procesaron para su estudio histológico, siguiendo las técnicas descritas en Polysciences. Inc.1995.

Fijación: Los tejidos vegetales colectados provenientes del proceso embriogénico *in vitro* se fijaron en la solución denominada FAA. entre 24 y 72 horas.

A partir de la fijación hasta la etapa de inclusión en todo momento se empleó condiciones de vacío mediante una bomba para tal efecto y un desecador. Posteriormente las muestras se lavaron en agua corriente a flujo lento y constante durante dos horas hasta eliminar el fijador.

Deshidratación: Las muestras fijadas se deshidrataron a través de la inmersión en alcohol a diferentes concentraciones (alcohol etílico), iniciaron con una concentración de 30%, seguida de 50% y 70% durante siete días. En 85% y 96% los tejidos permanecieron sumergidos durante dos horas; finalmente se realizaron tres cambios continuos en alcohol anhidro (100%). En este caso los dos primeros cambios duraron media hora cada uno y el tercero una hora. Cuando el tiempo necesario para realizar la deshidratación completa no fue suficiente, se dejaron los tejidos inmersos

en solución de alcohol al 70% durante toda la noche y el proceso se continuó al día siguiente.

Infiltración: Las muestras deshidratadas se embebieron en la solución de infiltración resina JB-4 (Polysciences. Inc.1995), Solución A más catalizador C durante 72 horas y a temperatura ambiente.

Inclusión: Las muestras fueron incluidas con JB-4 solución B más solución de infiltración. Los bloques se elaboraron llenando moldes de plástico con ambas soluciones, previo a la polimerización de las resinas, los tejidos fueron acomodados en forma transversal y longitudinalmente, una vez lograda la posición deseada se colocaron en los soportes. Las muestras incluidas se almacenaron a temperatura ambiente durante 24-72 horas, hasta que endurecieron para ser seccionadas. La relación necesaria para la polimerización fue la siguiente: Por cada 25 ml de solución de infiltración, se adicionó 1 ml de JB-4 solución B.

Corte: Los moldes con los tejidos incluidos se seccionaron en un micrótopo de rotación (Microm) a un espesor de los cortes de 5-10 μm . Los cortes se extendieron en un cristizador con agua destilada, y posteriormente fueron recogidos en portaobjetos y secados en una placa de calentamiento a 35°C, para su adhesión al cristal.

Tinción: Las muestras seleccionadas se tiñeron con azul de toluidina al 2%. Para ello los tejidos se colocaron en contacto con el colorante durante 45 seg. Posteriormente el exceso de colorante fue retirado mediante varios lavados con agua destilada y puesto a secar a temperatura ambiente.

Preparación del medio de montaje

Las preparaciones permanentes se hicieron con la solución de Permout (Polysciences. Inc.1995), previamente diluida con algunas gotas de xileno, para el montaje de las muestras.

Montaje: En cada portaobjetos se depositaron cuatro gotas del medio de montaje y se les colocó un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire. Estas preparaciones fueron selladas con esmalte de uñas y etiquetadas; posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente hasta ser analizadas en un microscopio óptico Axioplan Zeiss, en campo claro con el objetivo de 20X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cortes histológicos realizados al inicio de la inducción del proceso embriogénico se observó que las células derivadas de los centros meristemáticos del ápice fuente de explante (Fig.1), presentaban en un alto porcentaje la polaridad y división

asimétrica características en la iniciación de la embriogénesis somática, similar a como se describe para los patrones de embriogénesis cigótica (Dodeman, 1997). Estas células con un extremo aguzado y el otro redondeado, de pequeño tamaño, paredes celulares finas, con

grandes núcleos respecto al tamaño celular; nucleolos grandes y prominentes y vacuolas pequeñas, comenzaron a dividirse longitudinal y transversalmente para dar origen al suspensor y el embrión (Fig. 2).

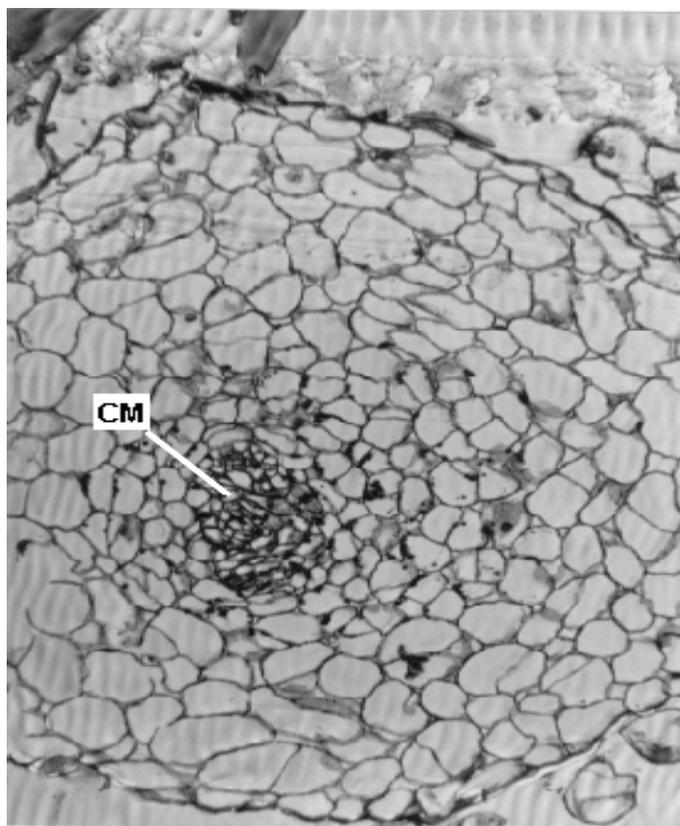


Figura.1. Corte trasversal del ápice fuente de explante en fase de inducción CM (centro meristemático).

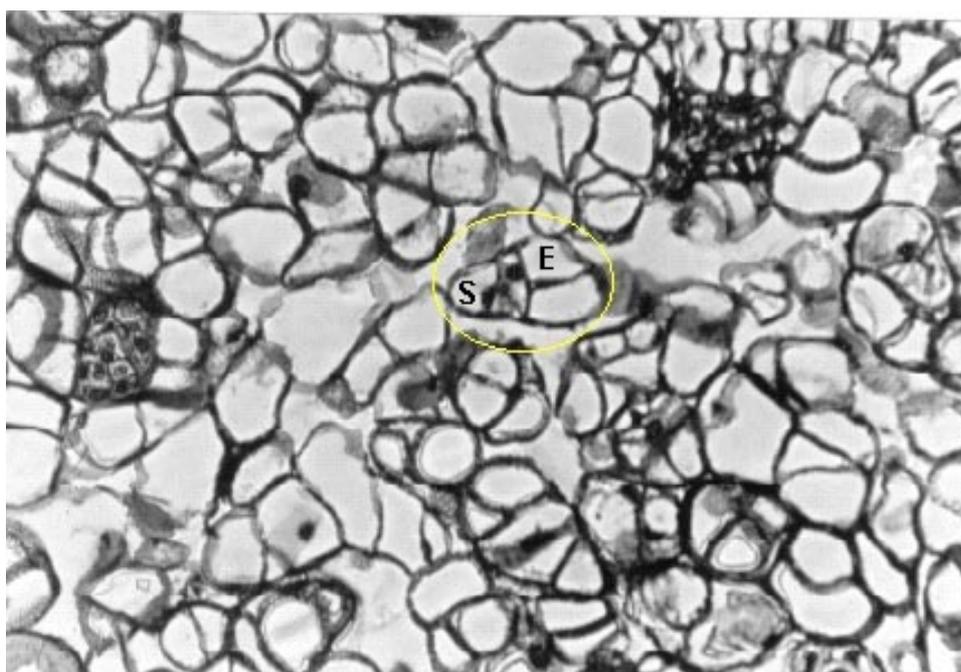


Figura. 2 Células embriogénicas polarizadas y en división. Formación de S (suspensor) y E (embrión).

Las divisiones subsiguientes del embrión, conllevaron a la formación de una masa de células mamilares (Fig.3), donde las células periféricas dieron lugar a la epidermis del embrión, posterior a esto le continua una serie de divisiones sucesivas dando lugar a la fase

globular (Fig.4), la cual pasa por varias etapas de transición antes de llegar al embrión maduro. Estos resultados coincidieron con lo planteado por Gómez, (1998), que refirió que en las plantas monocotiledóneas no se llegan a diferenciar las fases de corazón y torpeda.

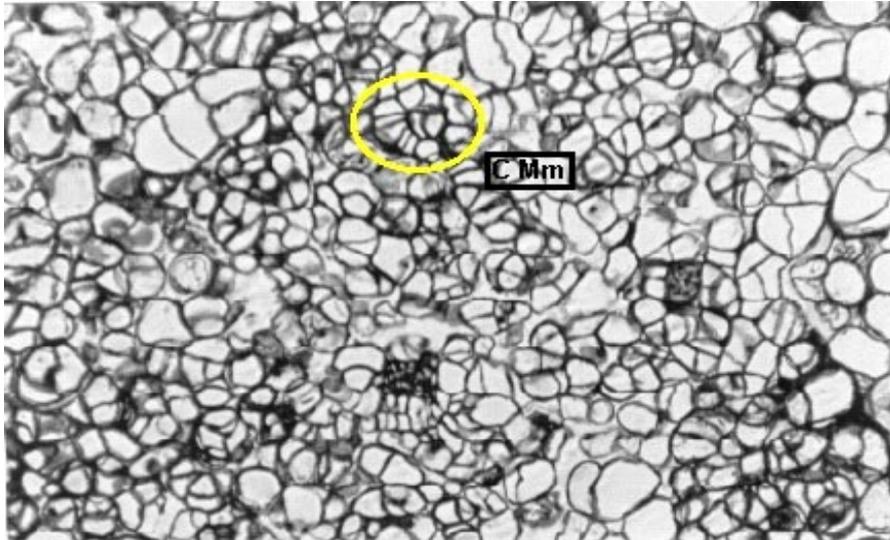


Figura 3. Formación de agregados celulares. C Mm (células mamilares).

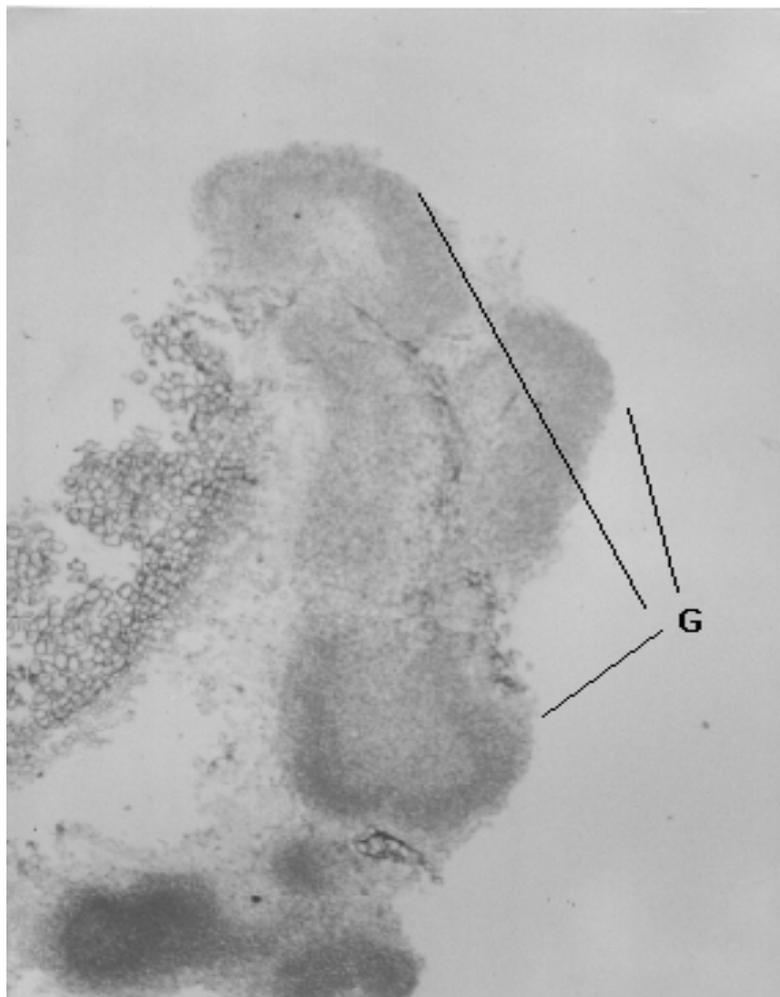


Figura 4. Varios embriones de henequén en estado globular. G (embriones globulares).

En las plantas monocotiledóneas el desarrollo del embrión se diferencia fundamentalmente al de las plantas dicotiledóneas en que produce un solo cotiledón (escutelum), con la asimetría consiguiente en el ápice vegetativo caulinar situado a un lado del cotiledón (coleóptilo), el tejido central de este cotiledón tiene conexión con el cilindro central y con el eje del hipocótilo (Dodeman, 1997), estas estructuras se lograron en la embriogénesis somática de especies de plantas monocotiledóneas, como los alcanzados por Sticklen (1991) en *Oryza sativa* (arroz) donde se desarrollaron embriones con escutelum y coleóptilo perfectamente definidos, se han reportado también con este mismo patrón otras

especies como *Zea mays* (Everett *et al*, 1992.) y en *Allium* sp. (Denchev y Atanassov, 1995).

En la Fig. 5 se muestra como a través del corte longitudinal del embrión que comienza el desarrollo del cilindro central en la parte mas interna del escutelum, el cual hace conexión también con el eje del hipocótilo, comenzaron a esbozarse el coleóptilo. En los cortes histológicos de embriones desarrollados se reconocieron todas las partes integrantes del embrión: la radícula, el escutelum (cotiledón) de forma alargada, el coleóptilo situado a un lado protegiendo la plúmula (Figura 6).

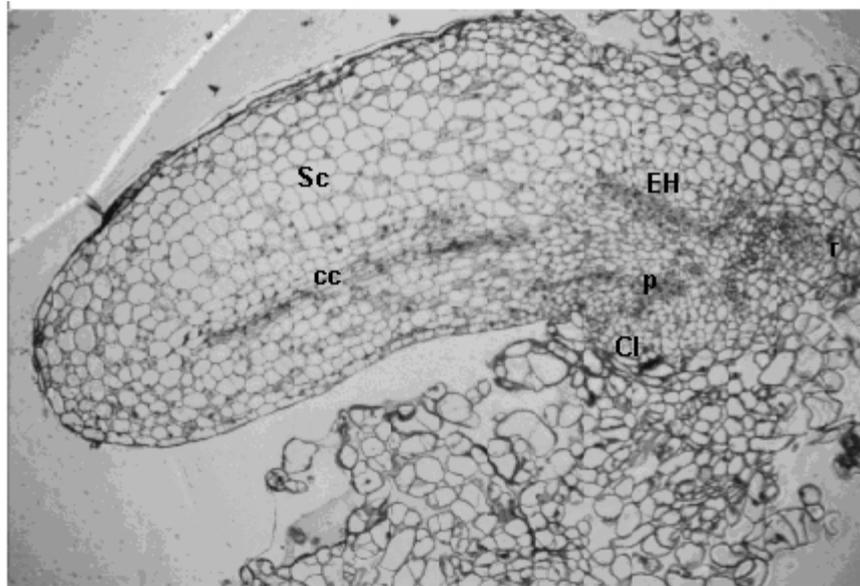


Figura. 5 Corte longitudinal de un embrión de henequén. Sc (escutelum), Cl (coleóptilo), cc (cilindro cambial), EH (eje hipocótilo), p (plúmula), r (radícula).

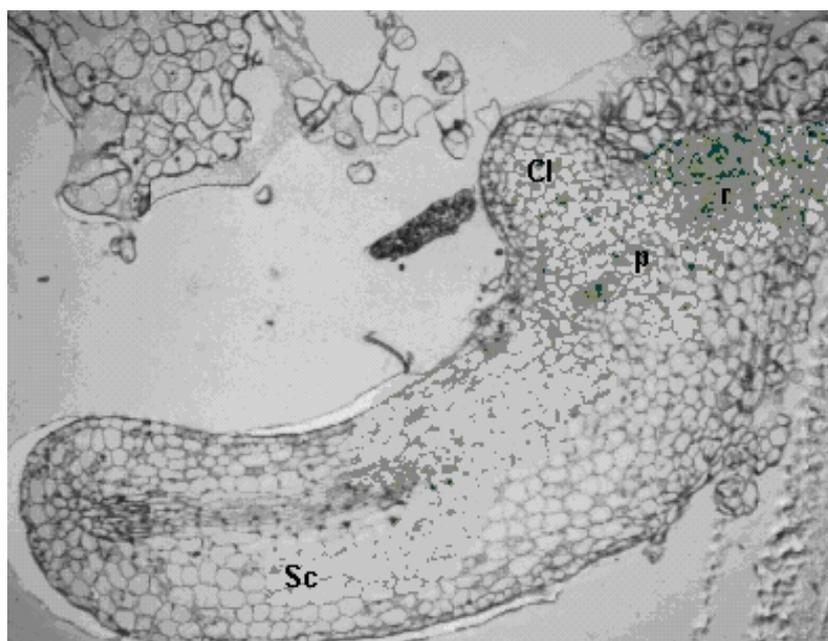


Figura. 6 Embrión de henequén con Cl (coleóptilo) completamente desarrollado.



Figura. 7 Embrión de henequén maduro.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los datos aportados por los cortes histológicos realizados, se evidencia el proceso de la embriogénesis somática en henequén, con las particularidades del desarrollo de un embrión característico para monocotiledóneas.

REFERENCIAS

- Casas, A, Pickersgill B, Caballero J y Valiente-Banuet A (1997) Ethnobotany and domestication in Xoconochtlí, *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in the Tehuacan Valley and a Mixteca Baja México. *Economic Botany* 51: 279-292
- Casas, A, Caballero J (1996) Traditional management and morphological variation in *Leucaena esculenta* (Fabaceae: Mimosoideae) in the Mixtec Region of Guerrero, Mexico. *Economic Botany* 50: 167-181
- Cazaurang, M N, Peraza S R y Cruz C.A (1990) Dissolving-grade pulps from henequen fibers. *Celulose Chemistry Technology*. 24: 629-638
- century documents. *Economic Botany* 51: 238-250
- Colunga, PS (1998) Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequen (*Agave fourcroydes* Lem). *Bot. Soc. Bot. México* 62: XX-XX
- Denchev, PD y Atanassov AI (1995) Micropropagation Through somatic Embryos In Bajaj, Y.P.S (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 30 : 193-206
- Dodeman, VL, Duereux G y Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48, (313): 1493 – 1509
- Eastmond, A, Herrera JL, Robert ML (2000) La biotecnología aplicada al Henequén: Alternativas para el futuro. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. México:17-25
- Everett, NP y Ashworth DI (1992) Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Sci* 41:133- 140
- Gómez, R (1998) Embriogénesis Somática. En .Pérez Ponce, J.N (Ed) *Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología* pp 57-79 Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba
- Merkle, SA, Parrot WA y Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En Thorpe T.A (Ed). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, pp. 155-201
- Polysciences, Inc (1995) Instructions for the JB - 4TM Embedding Kit. Warrington. PA 18976 : 123 B.
- Robert, ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F (1992) Micropropagation of Agave spp. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19: 306-329
- Rodríguez-Garay, B, Gutiérrez-Mora A y Acosta BA (1996) Somatic embryogenesis of *Agave victoriana reginae*. Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4: 85-87
- Sticklen, MB (1991) Direct somatic embryogenesis and fertile plants from Rice Root cultures. *J. Plant Physiol.* 138.: 577-580
- Zárate, S (1997). Domestication of cultivated *Leucaena* (Leguminosae) in Mexico: sixteenth century documents. *Economic Botany* 51: 238-250