

Influencia del 6 Bencilaminopurina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de Henequén obtenidas a partir de embriones

Gerardo González^{1*} Silvia Alemán¹, Reynaldo Trujillo², Roberto Domech¹, Enildo Abreu¹ y Yunel Pérez¹. *Autor para correspondencia.

¹ Universidad de Matanzas, * e-mail: gerardo.gonzalez@umcc.cu

² Centro de Bioplasmas. UNICA.

RESUMEN

Un grupo de vitroplantas de henequén provenientes de la germinación de embriones somáticos, inducidos en diferentes concentraciones de 6 Bencilaminopurina (22.2, 44.4, 66.6 y 88.8 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) fue evaluado en la etapa de aclimatización. En los resultados se evidenció que el contenido 6 BAP en los medios de germinación influyó en el comportamiento de las vitroplantas. A las concentraciones más bajas se produjo un mayor porcentaje de supervivencia, un elevado incremento en la altura y en el diámetro de la base, además los estomas presentaron una menor apertura. Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de 6BAP afectan el desarrollo óptimo de la aclimatización de las vitroplantas de henequén, germinadas de embriones somáticos.

Palabras clave: embriogénesis somática, 6 BAP, aclimatización, *Agave*

ABSTRACT

In the acclimatization phase, a group of derived plants from henequen embryos, germinated in a medium with different concentrations of 6 BAP, was evaluated. In these results it is evidenced that the content of 6 BAP in the germination medium determined the behaviour of the vitroplants. The lower concentrations provoked a significative increase in the height and width of the base from plants, superior survivor percentage and minor stomata opening. These results suggest that high concentrations of 6 BAP prevents the development of the acclimatization phase in derived plants from henequen embryos.

Key words: somatic embryogenesis, 6 BAP, acclimatization. *Agave*

El Henequén (*Agave fourcroydes* Lem) es una especie yucateca que se cultiva con éxito en esa zona mexicana y en Cuba (Colunga, 1998). Esta es una planta productora de biomasa fibrosa y metabolitos esteroideos que son principios activos para la industria farmacéutica y agropecuaria (Eastmond *et al.* 2000). La amplia gama de productos que se obtienen del henequén ha ganado importancia y en el futuro cercano serán producciones codiciadas y muy sostenibles para poder disminuir la alta contaminación de los plásticos y otros productos sintéticos dañinos al ecosistema (Peña *et al.*, 1997).

Con el empleo de la técnica de cultivo *in vitro* en henequén se logró la producción de plantas por la vía organogénica (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1997) y la vía embriogénica (González *et al.*, 2002). En ambas se logró la aclimatización de las vitroplantas. Este proceso presentó dificultades en las plantas derivadas de embriones somáticos pues se produjo alta mortalidad lo cual pudo estar relacionado con las diferentes concentraciones de 6 BAP utilizadas.

La aclimatización es uno de los pasos crítico en la propagación *in vitro* de plantas (Van Huylenbroeck y Deberg, 1996). Los cambios bruscos que se producen constituyen fuentes de estrés para las plantas al finalizar la etapa de cultivo *in vitro*.

Por lo anteriormente expuesto se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar la posible influencia de las diferentes concentraciones de 6 Bencilaminopurina (6 BAP) empleadas en la germinación de embriones de henequén sobre la respuesta *ex vitro*.

Para monitorear el comportamiento de las plántulas durante la aclimatización se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de supervivencia, incremento de la altura y grosor de la base de la planta, incremento en la masa seca (el valor de los incrementos se obtuvo por la diferencia de los valores medidos a los 42 días menos el valor del día 0) y apertura de los estomas. Esta última variable se evaluó en un microscopio (Carl Zeiss), con un aumento de 100X. El valor se calculó a partir de la media de 40 estomas de al menos cuatro hojas por tratamiento, a los 60 minutos de separada de la planta.

En este experimento se empleó un diseño completamente aleatorizado y se repitió dos veces. Un total de 10 réplicas con cuatro plantas fueron usadas para cada tratamiento. Los mismos se correspondieron con las concentraciones de 6 BAP empleada en la germinación de los embriones somáticos (González *et al.*, 2002). Para detectar la diferencia entre las medias se realizó la prueba de Duncan al 5%. Para el análisis estadístico se empleó

el programa JMP, Versión 3.1.4 del Sistema SAS (SAS, 1990).

En el trabajo previo sobre la germinación de embriones somáticos de henequén aunque se logró éxito, solo la concentración de 22.2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de 6BAP combinada con 2,4-D fue efectiva pues se alcanzó el 62% de las plantas regeneradas con hojas y raíces, en las demás concentraciones no rebasó el 30% de plantas completas. En estos resultados se evidenció la necesidad de tener en cuenta lo planteado por Fujii *et al.* (1990) quienes dijeron que la habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro*, lo que sugiere, que no es determinante la presencia de raíces, para corroborar la eficiencia de la germinación de embriones sino que es necesario estudiar el comportamiento de las plantas en la etapa *ex vitro*.

Los resultados en la aclimatización mostraron que el porcentaje de supervivencia, variable fundamental

de las plantas cultivadas *ex vitro*, fue superior en los tratamientos con 22.2 y 44.4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de 6 BAP (Tabla 1). Entre ambas concentraciones de esta citoquinina, no se produjeron diferencias significativas, pero éstas si se diferenciaron estadísticamente de las restantes concentraciones.

Estos resultados además indicaron que la posible residualidad de las altas concentraciones de 6 BAP que se emplearon en la germinación de embriones somáticos influyeron en la aclimatización, pues a concentraciones superiores de 44.4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ disminuyó significativamente el número de plantas aclimatizadas.

En este ensayo se evidenció que en la medida que se disminuyó el nivel de citoquinina se incrementó la altura significativamente, lo que sugirió que las bajas concentraciones de 6BAP favorecen el crecimiento, correspondiendo con lo planteado por Rodríguez–Garay *et al.* (1996) quienes observaron al trabajar con *Agave* que las citoquininas inhibían la dominancia apical.

Tabla 1 Efecto de diferentes concentraciones de 6BAP empleadas en la germinación de embriones somáticos de henequén en relación con el comportamiento de la altura, diámetro de la base, % de supervivencia y apertura de los estomas durante la aclimatización (42 días).

Tratamientos ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) 2,4-D + 6 BAP	% de Supervivencia	Incremento en diámetro de base (cm) Promedio	Incremento en altura (cm) Promedio	Apertura de los estomas (μm)
22.2	90 a	0.22 a	2.343 a	1.70 b
44.4	88 a	0.22 a	2.270 a	1.58 b
66.6	63 b	0.14 b	1.496 c	2.85 a
88.8	42 c	0.08 c	0.833 d	2.98 a
Es	0.28	0.04	0.067	0.40

El valor de los tratamientos representa la media en 10 réplicas con cuatro plantas. Letras distintas difieren significativamente $P < 0.05$. Es- representa el error estándar. Los valores en % se transformaron según la formula $X = 2 \arcsin ((x/100)0.5)$.

En este aspecto del crecimiento, Schmulling *et al.* (1989) señalaron que el alto contenido de citoquininas en el tejido de plantas de tabaco, transformadas con el gen *tmr* de *Agrobacterium tumefaciens* (un gen que codifica para una enzima de la biosíntesis de las citoquininas) produjeron brotes pequeños, tallos ramificados y hojas pequeñísimas debido a la represión de la dominancia apical.

En lo referente al incremento en diámetro de la base (Tabla 1), se observó que a concentraciones superiores a 44.4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de 6BAP se produjo una reducción significativa de este valor. Los valores obtenidos para las concentraciones de 66.6 y 88.8 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de 6 BAP sugirieron una disminución en la eficiencia del proceso metabólico, dado probablemente por un efecto inhibitorio de esta citoquinina durante el crecimiento y diferenciación, con el consecuente retardo del proceso de aclimatización.

Se puede observar en la tabla 1 que en las menores concentraciones de 6 BAP se produjeron los valores significativamente más pequeños de apertura estomática, contrario a lo que se obtuvo a las mayores concentraciones. Santamaría, (2000) planteó que el control transpiracional está muy relacionado con la presencia de ABA, por lo que la pérdida de agua permite que se incremente el contenido de ABA en las hojas, y con ello el cierre estomático. Sin embargo, bajo las condiciones de este trabajo, las altas concentraciones de 6BAP pudieran inhibir la producción de ABA o provocar la insensibilidad de estas sustancias para inducir el cierre estomático en henequén.

El comportamiento de la masa seca (Figura 1) indicó que en las menores concentraciones (22.2 y 44.4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) se produjeron incrementos significativos superiores en relación con las mayores concentraciones de la citoquinina empleada. Ello

puede estar relacionado con el hecho de que se observó cierto grado de hiperhidricidad a las mayores concentraciones de 6 BAP, de lo que se deriva una menor eficiencia del proceso metabólico, en el sentido de una menor acumulación de sustancias de reserva, una menor deposición de ceras epicuticulares y un mayor

contenido de agua. Según Ziv y Ariel (1994), los procesos de gran importancia para la calidad y supervivencia de las plantas propagadas *in vitro* como la fotosíntesis, la transpiración y el intercambio de CO_2 y O_2 se afectan por la hiperhidricidad y al mismo tiempo este fenómeno se estimula con el incremento de las concentraciones de citoquininas.

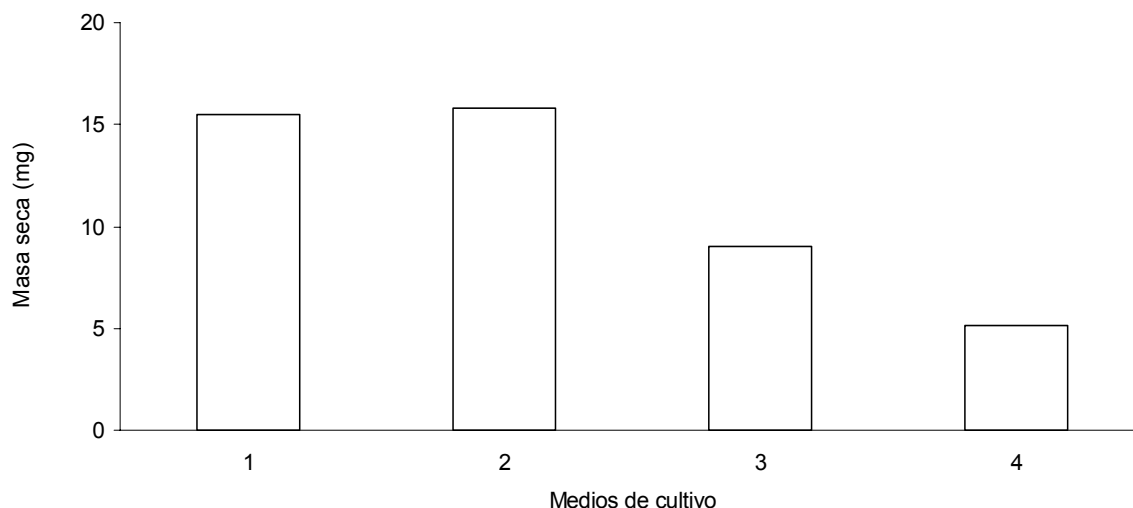


Figura 1. Influencia del medio de cultivo para la germinación en plantas de henequén derivadas de embriones en relación con el incremento de masa seca en la fase de aclimatación. 1: $0.11 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 2,4-D + $22.2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 6 BAP. 2: $0.11 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 2,4-D + $44.4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 6 BAP. 3: $0.11 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 2,4-D + $66.6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 6 BAP. 4: $0.11 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 2,4-D + $88.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 6 BAP. El valor de las barras representa la media de 10 réplicas con cuatro plantas. Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

En trabajo realizado por Chen (1997), se demostró que el 6 BAP estimuló la traducción de algunos genes, mientras se reprimió la de otros. Las elevadas concentraciones de 6 BAP podrían reprimir en gran medida genes involucrados en el proceso de biosíntesis de proteínas y otras reacciones metabólicas que influyen en el normal desarrollo de la planta, provocando retardo en el crecimiento secundario y en la producción de biomasa. De esto se infiere, que el proceso de aclimatación en las vitroplantas que proceden de los medios de cultivo para la germinación con elevadas concentraciones de 6 BAP, se manifieste de forma más lenta.

Con estos resultados se concluye que las altas concentraciones de 6 BAP presentes en los medios de cultivo para la germinación, afectaron el normal desarrollo del proceso de aclimatación, en plantas germinadas de embriones, pues provocaron una menor supervivencia, un menor crecimiento, menor producción de biomasa y menor cierre estomático.

REFERENCIAS

Chen, C M (1997) Cytokinin byosynthesis and interconversions. *Physiol Plant*. 101: 665-673

Colunga, PS (1998) Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequén (*Agave fourcroydes* Lem). *Bot. Soc. Bot. México* 62

Eastmond, A, Herrera JL, Robert ML (2000) Cultivo del Henequén. En: A. Eastmond, JL Herrera, ML Robert (eds) *La biotecnología aplicada al Henequén: Alternativas para el futuro*. p 17-25 Centro de Investigaciones Científica de Yucatán. México

Fujii, J, Slade D, Olsen R, Ruzin SY, Redenbaugh K (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci*. 72: 93-100

González, G, Alemán S, Barredo F, Roberty ML (2002) Embriogénesis somática en henequén (*Agave fourcroydes* Lem) *Revista Biotecnología Vegetal* 2 (1): pp 3 –8

Peña, E, González G, Berrillo A, Sosa D, Arteaga M, Rittolos D, Pérez D, Torriente Z (1997) Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. *Rev. Jardín Botánico Nacional*. 17-18: 169-176

Robert, ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F (1992) Micropropagation of *Agave* spp. En: J. P. Y. Bajaj (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. pp. 306-329 Springer.

Rodríguez-Garay, B, Gutierrez-Mora A, Acosta BA (1996) Somatic embryogenesis of *Agave victoriana reginae*. *Moore. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 4: 85-87

Santamaría, J M (2000) The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated

Tagetes erecta plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany* 51 (352): 1861-1866

SAS (1990) SAS/Stat User's guide, Version 6, 4th ed. SAS Institute, Inc., Cary, NC

Schonullig, T, Beinsberger S, De greef J, Shell J, Van Onckelen H, Spena A (1989) Construction of a heat inducible chimeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. *Febs Letters*. 249: 401-406

Van Huylbroeck, J, Debergh P (1996) Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnological*. 2 (3): 136-141

Ziv, M, Ariel T (1994) Vitrification in relation to stomatal deformation in carnation leaves *in vitro*. En: Lumsden, P J J R Nicholas; W J Davies (eds). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. pp 143-154. Kluwer Academic Publisher. Dordrech