

## Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem.

Gerardo González Oramas<sup>1</sup>; Silvia Alemán García<sup>1</sup>; Felipe Barredo<sup>2</sup>; Manuel L. Robert García<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Autopista a Varadero Km. 3 ½. Matanzas. Cuba. e-mail: gerardo.gonzález@umcc.cu

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. (CICY). Mérida. México.

### RESUMEN

El ápice resultó el tipo de explante óptimo para la obtención de callos con estructuras embriogénicas en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Se utilizó la variedad Sac Ki o henequén blanco proveniente del germoplasma de la Empresa Henequenera de Matanzas. Se evaluó el potencial embriogénico de tres tipos de explantes (ápices; base de hojas de vitroplántulas; rudimentos seminales (preantésis) provenientes de ovarios de 2-4 cm de longitud), bajo condiciones de luz y oscuridad. Además se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y Dicamba (0; 0.56; 1.12; 1.68; 2.24; 2.81  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Las evaluaciones se realizaron al final del segundo pase (60 días). Se encontraron diferencias significativas entre los explantes estudiados y entre las auxinas y sus respectivas concentraciones empleadas, lo que permitió seleccionar al ápice, 1.12  $\text{mmol.l}^{-1}$  de 2,4-D como mejor explante, concentración y auxina respectivamente para el establecimiento por primera vez de la embriogénesis en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.).

Palabras clave: ácido 2,4-dichlorophenoxyacético, henequén, ápice meristemático.

### ABSTRACT

The use of meristematic apice of plant is reported for callus formation with embryogenic structures in henequen. Sac Ki cultivated variants of henequen from the Matanzas enterprise germoplasm was used. The embryogenic potencial of three explant (shoop top; leaf blade from *in vitro* plants; inflorescence bud) under differents illuminated conditions and six rates (0; 0.56; 1.12; 1.68; 2.24; 2.81  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) of two auxins (2,4-dichlorophenoxyacético acid and Dicamba) was tested. Evaluations after second subculture (60 day) were carried out. Statistical differences within evaluated explants and rates of auxins were found. It was possible to select meristematic apice, 1.12  $\text{mmol.l}^{-1}$  of 2,4-D as the best explant, rate and auxin for the establishment by the first time of the somatic embryogenesis of henequén (*Agave fourcroydes* Lem.).

Key words: 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid, henequen, meritematic apic

### INTRODUCCIÓN

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

Esta especie florece una sola vez al final de su ciclo vegetativo (20 ó 25 años), además una planta es capaz de producir durante toda su vida alrededor de 20 hijos de rizoma. Esta dificultad unida a problemas económicos ha originado una disminución de los rendimientos y las plantaciones, pues son más las áreas que salen de la producción en relación con las que se siembran (González *et al.*, 1996, 1997).

En henequén la mayoría de los trabajos en cultivo de tejidos que se describen, se orientan a la micropropagación (Eastmond *et al.*, 2000). La producción de estructuras similares a embriones fue lograda por Groenewald *et al.* (1977), sin embargo,

embriones somáticos no fueron obtenidos. Rodríguez-Garay *et al.* (1996) fueron los primeros en obtener embriones somáticos en una especie del género *Agave* (*Agave victoria-reginae* More).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo de determinar el tipo de explante y las concentraciones de auxinas adecuadas para lograr la embriogénesis somática por primera vez en henequén.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la variedad Sac Ki o henequén blanco proveniente del germoplasma de la empresa henequenera de Matanzas. Cuba.

A los bulbillos, provenientes de las plantas seleccionadas, se les eliminaron las hojas maduras que envuelven el ápice hasta reducirlos a 10 mm de grosor y 25 mm de largo. Los ápices se sumergieron en etanol (96% v/v) durante 1 min., posteriormente se flamearon sobre una placa de Petri

en cabina de flujo laminar. Una vez concluida la desinfección, según González *et al.* (1996-1997), los ápices se seccionaron transversalmente y se colocaron los fragmentos (dos por frasco) con la zona del corte en contacto directo con el medio de cultivo. Los rudimentos seminales preantésis procedentes de botones florales se seccionaron transversalmente y el contenido del saco embrionario se extrajo y se inoculó todo en el medio de cultivo, a razón de un botón por recipiente. Fragmentos de explantes provenientes de la base de la hoja con tamaño de 8 y 10 mm (se tomaron siempre las dos hojas más externas de la planta) se sembraron uno por frasco.

### **Inducción de la embriogénesis somática**

#### **Influencia del tipo de explante y las condiciones de iluminación**

Para la inducción de callos se utilizaron como explantes: ápices con 35 días de establecidos *in vitro*, base de hojas de planta *in vitro* obtenidas según tecnología propuesta por Peña *et al.* (1997) y rudimentos seminales (preantésis) provenientes de ovarios de 2-4 cm de longitud. Se utilizó como medio de cultivo la formulación de Murashige y Skoog (1962), con las fuentes de nitrógeno modificada por Robert *et al.* (1992), suplementados con sacarosa (2%, w/v), glucosa (2%, w/v), mioinositol (100 mg.l<sup>-1</sup>) y 1.12 µmol.l<sup>-1</sup> of 2,4-D. Los medios se solidificaron con agar (10 g.l<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron en cámaras de luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activo de 12.5 µmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, con fotoperíodo de 16 horas luz y en oscuridad continua. La temperatura osciló entre los 25 y 28 °C.

La condición de luz y oscuridad se combinó con los tres tipos de explantes en un diseño bifactorial donde el factor A: condiciones de cultivo y factor B: tipos de explantes, se ubicaron en tres experimentos con 20 repeticiones cada uno. Al final del segundo subcultivo (cada 30 días) se evaluó el porcentaje de callo / tratamiento y número de agregados embriogénicos. Este último parámetro se corresponde con la media de estas estructuras presentes en 10 campos visualizados en cinco cortes por tratamiento. Las muestras se analizaron en un microscopio óptico (Axioplan Zeiss) de campo claro, bajo un aumento de 10X. Los datos en porcentajes se transformaron según  $X = 2 \arcsin \sqrt{X/100}$  (0,5). Los cortes se realizaron según metodología de Polysciences, Inc (1995).

#### **Influencia de las auxinas**

Con el objetivo de determinar si existía influencia del tipo de auxina en la inducción de la embriogénesis somática, se probó el efecto del 2,4-D y Dicamba. Estas auxinas se emplearon

con seis concentraciones diferentes (0; 0.56; 1.12; 1.68; 2.24; 2.81 µmol.l<sup>-1</sup>) en un diseño bifactorial donde los factores fueron: A tipo de auxina y B concentraciones de auxina. La evaluación se realizó siguiendo el mismo criterio del epígrafe anterior, además se midieron los mismos parámetros. Para este experimento se empleó la condición de oscuridad y el ápice como explante (0.8-2.0mm).

### **Germinación de embriones de henequén**

Embriones obtenidos de henequén fueron cultivados en medios de cultivo con diferentes citoquininas con una proporción de 22.2 mmol.l<sup>-1</sup> (Kinetina; 6BAP y 2ip) combinado con 0.11 µmol.l<sup>-1</sup> de 2,4-D con el objetivo de inducir la germinación. A los 60 días con un subcultivo a los 30 días, se evaluó el número de plantas germinadas. En cada tratamiento se emplearon 40 embriones por repetición, además se realizaron tres experimentos independientes con 20 repeticiones por cada tratamiento.

En todos los experimentos se empleó un diseño completamente aleatorizado. Para detectar la diferencia entre las medias se realizó la prueba de Duncan al 5%. Para los análisis estadísticos se empleó el programa JMP, Versión 3.1.4 del Sistema SAS (SAS, 1990).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Inducción de la embriogénesis somática**

#### **Influencia del tipo de explante y las condiciones de iluminación**

Se puede apreciar en la tabla 1 que no existió interacción entre los factores en estudio (condiciones de cultivo-tipo de explante), sin embargo, el tipo de explante produjo diferencias significativas, siendo el ápice el explante más adecuado para la inducción de la formación de callos, pues con éste se produjo el mayor porcentaje de callos sobre el explante, diferenciándose significativamente del resto. La base de hoja de plantas *in vitro* presentó un bajo porcentaje de formación de callos, lo que indica que bajo estas condiciones no se acerca a lo descrito por Frydych (1982) y Rodríguez-Garay *et al.* (1996), quienes plantearon que esta fue una fuente muy adecuada para la inducción de callo morfogénico trabajando con *Agave sisalana* y *Agave victoria-reginae* Moore respectivamente.

Por otra parte, el rudimento seminal utilizado como explante se necrosó desde el inicio de la explantación. Kiviharju *et al.* (1992), al usar esta fuente de explante en *Cyclamen persicum* lograron buenos resultados.

Tabla 1. Efecto de las condiciones de cultivo y tipo de explante en la inducción de callos de henequén.

Tipo de explante	% de explante con callo	# promedio de agregados embriogénicos
Ápice	86.75 a	17.14 a
Base de la hoja	16.80 b	4.61 b
Rudimento Seminal	4.17 c	1.20 c
Significación	*	*
Es	2.38	2.05

Los valores de cada tratamiento representan la media de tres experimentos con 20 réplicas cada uno. Letras distintas difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ) según la prueba de rangos múltiples de Duncan. Sistema SAS.  $R^2 = 0.96$  para tipo de explante. Para el análisis los datos en por ciento se transformaron según  $X = 2 \arcsin (X/100)$  (0.5).

La calidad en la respuesta positiva del ápice en la obtención de callos con estructuras embriogénicas con relación a los otros explantes utilizados se debe, a que es un tejido con un porcentaje muy elevado de células meristemáticas, a partir de las cuales por la acción de una auxina que media la transición de célula somática a célula embriogénica (Dodeman *et al.*, 1997), se producen los centros meristemáticos que son zonas de acelerada división y crecimiento, de los cuales se desprenden células que inician divisiones polares y asimétricas, convirtiéndose de esta forma en células preembriogénicas a partir de las cuales se forman los embriones. Por lo tanto, un tejido con la presencia mayoritaria de otros tipos de células más diferenciadas en henequén, presentará una calidad reducida para iniciar el proceso embriogénico bajo las condiciones aquí establecidas.

Cuando se analizó la influencia de las condiciones de incubación (luz-oscuridad) para las tres fuentes de explantes, no se observaron diferencias significativas ni en la formación de callos, ni en la presencia de agregados embriogénicos. Esto corrobora lo planteado por Thorpe (1988), quien afirmó que la embriogénesis somática puede ocurrir bajo diferentes regímenes de luz-oscuridad, además para algunas especies puede la oscuridad favorecer la inducción y formación de embriones (Jiménez, 1995). Resultados diferentes fueron obtenidos por Rodríguez-Garay *et al.* (1996), quienes utilizaron una intensidad luminosa muy baja para obtener embriones de *Agave victoria-reginae* Moore.

En estos resultados se indica que el tipo de explante determinó la diferencia significativa, sin embargo para el caso de la condición de cultivo (luz-oscuridad) no hubo diferencia significativa entre los tratamientos por lo que se seleccionó la oscuridad por ser más económico. Khrishnaraj

y Vasil (1995) refieren que el estado fisiológico del explante y las condiciones de cultivo se han considerado como un factor importante en la respuesta de los tejidos cultivados *in vitro*.

### Influencia de las auxinas

En las figuras 1 y 2 se puede observar que la interacción entre los factores en estudio (tipo de auxina-concentraciones) fue significativa. El mayor porcentaje en la formación de callo y el número más elevado de agregados embriogénicos se indujo cuando el ápice se cultivó sobre medio suplementado con 2,4-D a  $1.12 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , tratamiento que se diferenció significativamente del resto de los ensayados.

En los resultados obtenidos en relación con las concentraciones de reguladores del crecimiento utilizadas, se encontró que la concentración en la que se produjo el mayor porcentaje de explantes con callo, independiente del tipo de auxina fue la de  $1.12 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , la cual difirió significativamente del resto de las utilizadas. Ello sugiere, que este género responde mejor a bajas concentraciones pues, resultados similares se alcanzaron por Rodríguez-Garay *et al.* (1996), quienes obtuvieron embriones somáticos en *Agave victoria-reginae* Moore con el empleo de bajas concentraciones. Además a esta concentración se logró el mayor número de agregados embriogénicos

Con estos resultados se evidencia que tanto el tipo de auxina como la concentración de la misma se relaciona estrechamente con la formación de los callos con estructuras embriogénicas en henequén, una posible respuesta puede estar dada, porque este tipo de regulador del crecimiento y su concentración afecta el tipo de división y la polaridad de la célula, mecanismos importantes en la formación de las células embriogénicas (De Jong *et al.*, 1993).

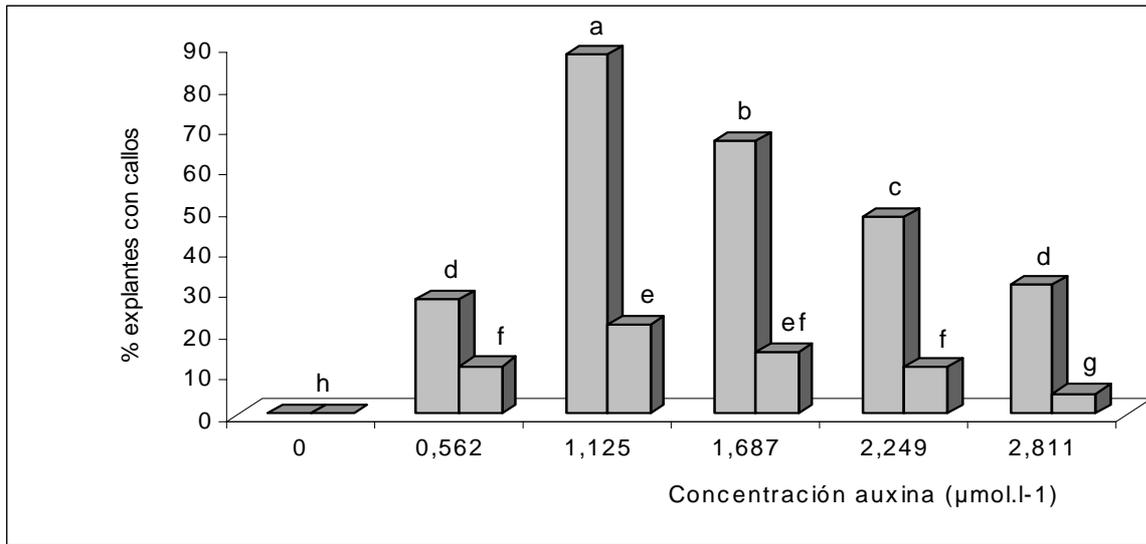


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de dos auxinas (2,4-D; Dicamba), en la formación de callos en henequén. Los valores de cada barra representan la media de tres experimentos con 20 repeticiones cada uno. Letras distintas difieren significativamente  $P < 0.05$  según prueba de rangos múltiples de Duncan. Sistema SAS.  $R^2 = 0.97$  para concentración.  $Es = 0.58$

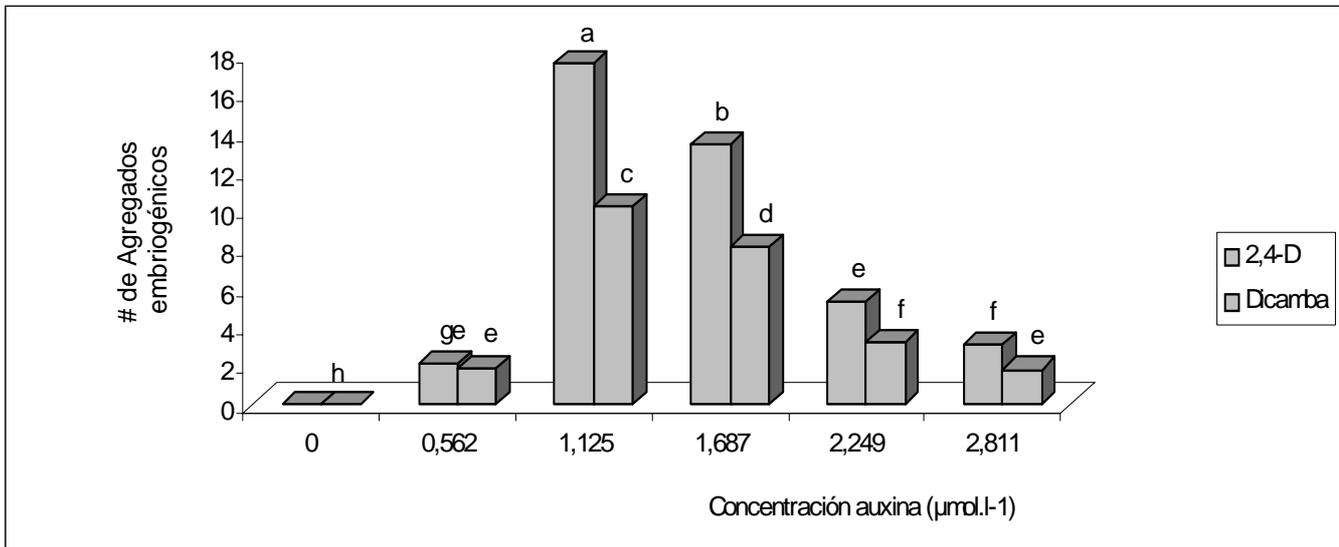


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de dos auxinas (2,4-D; Dicamba), en la formación de Agregados embriogénicos. Los valores de cada barra representan la media de tres experimentos con 20 repeticiones cada uno.

Letras distintas difieren significativamente  $P < 0.05$  según prueba de rangos múltiples de Duncan. Sistema SAS.  $R^2 = 0.93$  para concentración.  $Es = 1.17$ .

Si está bien definido que el explante es el factor fundamental que incide en la respuesta embriogénica de diferentes especies, en este caso la concentración de 2,4-D también ocupa un lugar importante en la cadena de sucesos que definen la habilidad del cultivo bajo condiciones *in vitro* de responder a la formación de callos y su posterior diferenciación en órganos y/o embriones.

#### Germinación de embriones de henequén

La interacción de ambos factores (tipo de citoquinina-concentración) fue significativa. En

la tabla 2 se puede apreciar que el tratamiento donde germinó el mayor número de embriones se utilizó la combinación de  $0.11 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de 2,4-D y  $22.2 \mu\text{mol.l}^{-1}$  6BAP, la cual se diferenció significativamente del resto. Por lo tanto, de los tres tipos de citoquinina (6BAP, Kinetina y 2ip) que se emplearon en el proceso de germinación, fue la 6 benciladenina la más apropiada. La ausencia de citoquinina en el medio de cultivo provocó una baja germinación de los embriones, ello indicó la necesidad de 6BAP combinada con 2,4-D en proporciones adecuadas, para estimular la germinación de embriones somáticos en henequén.

Tabla 2. Comportamiento de diferentes citoquininas combinadas con 0.11  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  2,4-D en la germinación de embriones de henequén.

Tipo de citoquinina	concentración ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	# de plantas/ 40 embriones
6BAP	22.2	30.0 a
Kinetina	22.2	14.7 b
2ip	22.2	7.0 c
significación		*
Es		1.8

Los valores representan la media de tres experimentos con 20 repeticiones cada uno. Letras distintas difieren significativamente  $P < 0.05$  según prueba de rangos múltiples de Duncan. Sistema SAS.

Gómez (1998), planteó que la adición de citoquinina en el medio de cultivo juega un papel importante en la germinación de los embriones, pues éstas contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y proliferación.

Aunque se conoce, que el 2,4-D es una auxina potente que evita la germinación y lo que provoca es un crecimiento desorganizado, se empleó a muy baja concentración en este ensayo. Su utilización se debió a que en varios trabajos se ha utilizado para favorecer diferentes procesos morfogénicos en henequén, entre los que se encuentran, formación de callos (Robert *et al.*, 1987); establecimiento de ápices (González *et al.*, 1996-1997); multiplicación axilar y enraizamiento (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1996-1997) y endurecimiento (Eastmond *et al.*, 2000). Todo ello indicó que este es un genotipo, en el cual, el 2,4-D ejerce una acción positiva en su respuesta morfogénica, incluyendo además, la germinación.

## CONCLUSIONES

El ápice resultó ser el mejor explante para la inducción de la formación de callos con estructuras embriogénicas.

La combinación de los ápices, la concentración de 1.12  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  de 2,4-D bajo condiciones de oscuridad produjeron los mayores porcentajes de formación de callo con estructuras embriogénicas.

La combinación de 2,4-D y 6BAP en proporción adecuada estimuló la germinación de embriones de henequén.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Naciones Unidas por otorgar la beca que permitió la terminación de este trabajo.

## 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

Colunga, P (1998) Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequen (*Agave fourcroydes* Lem). Bol. Soc. Bot. México 62: XX-XX

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

Frydrich, D 1982 Induction in *vitro* de bourgeons adventifs a partir du sisal. Premiers resultats. Cot Fib. Trop. 37 (3): 295-304

Gómez, R, Herrera I, Freire M, Pérez B, García L (1994) Posibilidades del empleo de la embriogénesis somática a partir de callos como vía para la propagación *in vitro* de la caña de azúcar. Centro Azúcar. 4: 53-57

González, G, Trujillo R, Darías R, Peña E (1996-1997) Micropropagación del henequén: Aportes a una tecnología. Rev. Jardín Botánico Nacional. 16 y 17:177-180

Groenewald, EG, Wessels DCJ, Koeleman A (1977). Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (*Agavaceae*) Z. *Planzenphysiol* 21(4). pp. 369-373

Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de la caña d azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar al grado de Doctor de Ciencias Agrícolas, UCLV. Fac de Agronomía, IBP Cuba. pp.93

Kiviharju, E, Tuominen U Tormala T (1992) The effect of explant material on somatic embriogénesis of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 187-194

Krishnaraj, S, Vasil IK (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: T. A. - Thorpe (ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers, Vol. 20. pp. 417-469

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497

Peña, E, González G Berrillo A, Sosa D, Arteaga M, Rittoles D, Pérez D, Torriente Z (1996-1997). Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. Rev. Jardín Botánico Nacional. 17-18: 169-176

Polysciences, Inc. (1995) Instructions for the JB-4™ Embedding Kit. Warrington, PA 18976 p-123 B

Ponsamuel, P, Samson PN, Ganeshan PS, Santhyaprakash V y Abraham GC (1996) Somatic embryogenesis and plant

regeneration from the immature cotyledonary tissues of cultivated tea. (*Camellia sinensis* L. Kuntze.) Plant Cell Reports 16: 210-214

Robert, ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F (1992) Micropropagation of *Agave* spp. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 19. pp. 306-329

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

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

Thorpe, TA (1988) *In vitro* somatic embryogenesis. ISI Atlas of science: Animal and Plant Science pp 81-88

Zárate, S (1997). Domestication of cultivated *Leucaena* (Leguminosae) in Mexico: sixteenth century documents. Economic Botany 51: 238-250