Nota de investigación

Fuentes de sacarosa y nitrógeno orgánico influyen en la embriogénesis somática de *Agave angustifolia*

Jesús Ignacio Reyes-Díaz
Amaury Martín Arzate-Fernández[§]
José Luis Piña-Escutia

[1]Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento-Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 11.5, *Campus* Universitario 'El Cerrillo', Toluca, Estado de México, México. CP. 50200. Tel. 01 (722) 2965518. (jird.rd@gmail.com).

[§]Autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx.

Resumen

El protocolo de embriogénesis somática en *Agave angustifolia* implica la inducción de callos embriogénicos, el desarrollo y maduración de embriones y su conversión o germinación para formar una planta completa. En este sentido, se requiere una juiciosa selección de los nutrientes presentes en el medio de cultivo. En este trabajo, se estudió el efecto de las concentraciones de sacarosa y las fuentes de nitrógeno orgánico sobre la embriogénesis somática de *A. angustifolia*. Nuestros resultados mostraron que la inducción de callos embriogénicos y la producción de embriones somáticos pueden controlarse positivamente mediante cambios en la concentración de sacarosa y se ven afectados por la adición de fuentes de aminoácidos. La frecuencia de conversión a las plántulas varió de 90 a 95% con una supervivencia de 100% en condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, embriogénesis somática, glutamina, hidrolizado de caseína, sacarosa.

Recibido: junio de 2018
Aceptado: agosto de 2018

A. angustifolia es una de las materias primas más importantes para la producción de mezcal de alta calidad, este valor económico da como resultado una gran demanda nacional e internacional, lo que convierte a la especie en un objetivo importante para la propagación masiva *in vitro* y el mejoramiento genético.

La embriogénesis somática es un modo deseable de regeneración de la planta. Sin embargo, para genotipos particulares, las condiciones de cultivo *in vitro* y las etapas de la embriogénesis somática (adquisición de la capacidad embriogénica, inducción y maduración de embriones somáticos y conversión a plántulas) deben optimizarse experimentalmente, especialmente los compuestos del medio de cultivo.

En este sentido, los carbohidratos juegan un papel vital en la vida de las plantas, son un sustrato de la respiración, desempeñan una función en la ruta sintética de muchos compuestos y crean bloques de macromoléculas que pueden controlar varios procesos de desarrollo en las células (Smeekens, 2000). La sacarosa es la fuente de carbohidratos más común utilizada en el cultivo de tejidos vegetales y está presente de manera dominante en el floema afectado por la formación de embriones somáticos en el medio de cultivo (Nakagawa *et al*., 2001).

Por otro lado, en la embriogénesis somática el crecimiento de las células tiene altas demandas de energía y sintetiza grandes cantidades de proteínas y ácidos nucleicos. Es una fuente de energía alternativa para células en rápida división y células que utilizan la glucosa de manera ineficiente. Las células requieren átomos de nitrógeno para construir moléculas como nucleótidos, aminoácidos, azúcares de azúcar y vitaminas. Cuando los niveles de glucosa son bajos y las demandas de energía son altas, las células pueden metabolizar los aminoácidos de las fuentes de nitrógeno orgánico para obtener energía. En este sentido, la glutamina es uno de los aminoácidos más fácilmente disponibles para su uso como fuente de energía y es una fuente importante de energía para muchos tipos de células que se dividen rápidamente *in vitro* porque desempeña un papel en la asimilación del nitrógeno, ya que es un intermediario. En la transferencia de amoníaco a aminoácidos. Asimismo, los hidrolizados de caseína pueden ser una fuente de calcio, fosfato, varios microelementos, vitaminas y, lo que es más importante, una mezcla de hasta 18 aminoácidos.

La sacarosa (6%) solo se ha utilizado como fuente de carbono para la inducción de embriones somáticos en *A. angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011), pero el efecto de diferentes concentraciones de azúcar o la influencia de las fuentes de aminoácidos (glutamina e hidrolizado de caseína) en la embriogénesis somática de *Agave* todavía no se ha investigado. En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y su interacción con nitrógeno orgánico en la embriogénesis somática de *A. angustifolia*.

Para llevar a cabo nuestra investigación, se diseccionaron embriones zigóticos maduros asépticos de las semillas de *Agave angustifolia* Haw. y se utilizaron como explantes iniciales para la inducción de callos. Estos se colocaron en medio de inducción de callo que consiste en medio basal salino MS de un cuarto de fuerza (Murashige y Skoog, 1992) con 3 mg de 2,4-D L^{-1} y 1 mg de BA L^{-1} suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), en esta etapa, cinco niveles de sacarosa (40, 50, 60, 70 y 80 g L^{-1}) y nitrógeno orgánico (500 mg L-glutamina o hidrolizado de caseína) en la inducción de embriogénesis somática del callo de *Agave angustifolia* Haw. fueron evaluados. El pH del medio se ajustó a 5,6-5,8 antes de agregar el agente gelificante (8 g de agar

L^{-1}) (Sigma-Aldrich®) y autoclave a 121 °C durante 20 min. Así, se ensayaron diez tratamientos aleatorios. Cada tratamiento consistió en 12 repeticiones de diez explantes cada uno. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad a 25 ±2 °C durante 60 días.

En esta etapa, se registró el porcentaje de inducción del callo y el peso del callo. En esta etapa, se registraron el porcentaje de formación y el peso del callo. Sesenta días después del inicio del cultivo (DACI), los callos de los explantes que respondieron a los tratamientos para la inducción de callos se transfirieron a un medio de expresión de embrión: sales MS de fuerza media, 0.5 mg de 2,4-D L^{-1} y 30 g de sacarosa L^{-1}, gelificado con 3 g de Gelrite® L^{-1}. Los callos se incubaron en las mismas condiciones ambientales que en el paso anterior durante otros 60 días. En esta etapa, se registró el número de embriones somáticos (SE). Para la regeneración de plantas, todas las SE desarrolladas se transfirieron a matraces con medio de germinación (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). Con el fin de mejorar el desarrollo de la planta y aumentar la proliferación de la raíz, las plántulas regeneradas (4-5 cm de longitud) de SE se transfirieron a macetas que contenían una mezcla de compost, perlita y suelo (1:1:1).

Se mantuvieron a 25 ±2 °C con un fotoperíodo de 16 h bajo luz fluorescente (16 μmol s^{-1} m^{-2}) durante 20 días y se regaron con una pistola de pulverización a intervalos de 3 días. Posteriormente, todas las plántulas regeneradas se transfirieron a condiciones de invernadero. Para evaluar el efecto de cada tratamiento, utilice los datos sobre el porcentaje y el peso de los callos inducidos (60 DACI) y el número de embriones somáticos (120 DACI), un análisis de varianza (prueba F) y la prueba de rango múltiple de Tukey ($p< 0.05$) se realizaron en el software Statgraphics PLUS®.

Como resultado, los callos embriogénicos fueron blandos y amarillentos (Figura 1A), comenzando la iniciación en el extremo apical del explante, esta respuesta se observó en todos los tratamientos. Se indujeron embriones somáticos cuando se transfirieron a medios de expresión de callos embriogénicos cultivados en diferentes concentraciones de sacarosa (40, 50, 60, 70 y 80 g L^{-1}) y nitrógeno orgánico (500 mg de L-glutamina o hidrolizado de caseína). Después de 1 semana, los embriones en forma globular se desarrollaron aún más en embriones en forma de corazón y torpedo.

Se observaron embriones cotiledones en la mayoría (90-95%) de los callos DACI después del subcultivo (Figura 1B). Se observaron simultáneamente varias etapas de la embriogénesis somática en el mismo callo en medios de cultivo agregados con fuentes de nitrógeno (Figura 1C), lo que indica que la embriogénesis somática en *A. angustifolia* es un fenómeno asíncrono en estas condiciones que causa la reducción del número de embriones somáticos en un estado cotiledóneo 120 DACI (Tabla 1). En la Tabla 1 también muestra el número de embriones en el callo embriogénico cuando se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa. La embriogénesis somática aumentó significativamente al aumentar la concentración de sacarosa, pero el desarrollo de embriones normales fue bajo a la concentración más alta de 80 g L^{-1}.

Los embriones somáticos inducidos se transfirieron a un medio de expresión donde se desarrollaron en plántulas completas en 2 semanas (Figura 1D). La tasa promedio de germinación de los embriones somáticos fue de aproximadamente 90 a 95%. El cien por ciento de las plántulas enraizadas se transfirieron con éxito a una mezcla de compost, perlita y suelo cuando se convirtieron en plantas normales en el invernadero con un promedio de supervivencia de 95%. No se observó variabilidad fenotípica en las plantas en este experimento.

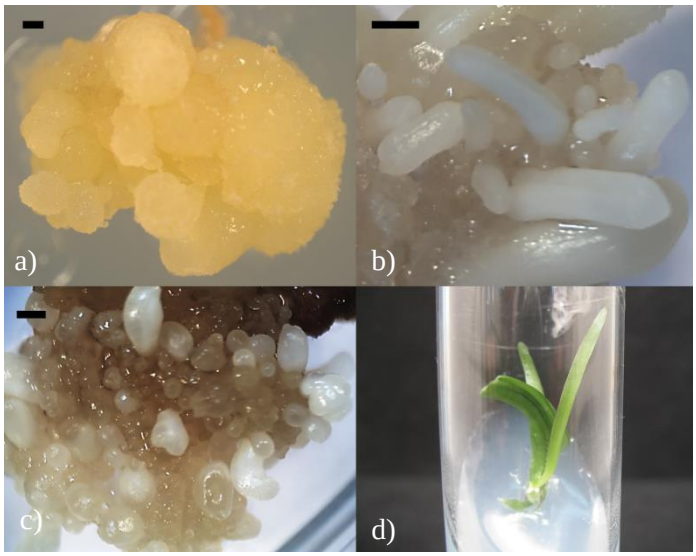

Figura 1. Embriogénesis somática en *Agave angustifolia*. a) callo embrionario; b) embriones cotiledonares; c) variabilidad de embriones somáticos en el mismo callo en medios de cultivo agregados con fuentes de nitrógeno; d) plantlet (Barra: 1 mm).

Aunque la regeneración de *A. angustifolia* a través de embriogénesis somática indirecta ha sido reportada previamente (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). Se ha encontrado que la disponibilidad de azúcar en el medio de cultivo afecta la embriogénesis somática en muchas especies de plantas (Mehta *et al*., 2000; Huang y Liu, 2002; Kim y Kim, 2002). En este estudio, el aumento de la concentración de sacarosa aumentó la inducción de callos embriogénicos y embriones somáticos (Tabla 1). El cultivo de células, tejidos u órganos de plantas normalmente requiere la incorporación de una fuente de carbono al medio de cultivo (George, 1993) y la sacarosa se ha utilizado como la principal fuente de carbono en el cultivo de tejidos.

Tabla 1. Efecto de cinco niveles de sacarosa y su interacción con nitrógeno orgánico en la inducción de embriogénesis somática a partir de callos de *Agave angustifolia* Haw.

Sacarosa (g L^{-1})	Nitrógeno orgánico*	Formación de callo (%)+	Peso del callo (g)++		Embriones somáticos por explante+++	
40	-	35.83 ±3.57	0.62 ±0.04	e	8.2 ±0.47	f
	+	40.83 ±3.12	0.52 ±0.02	f	5.02 ±0.3	g
50	-	37.5 ±3.28	0.91 ±0.02	c	19.33 ±0.36	c
	+	40 ±3.25	0.67 ±0	e	11.02 ±0.46	e
60	-	33.58 ±1.38	1.22 ±0.06	b	35.71 ±0.27	a
	+	39.16 ±2.87	0.94 ±0.03	c	23.41 ±0.68	b
70	-	38.33 ±3.21	1.64 ±0.05	a	34.53 ±0.69	a
	+	32.5 ± 2.78	0.78 ±0.02	d	18.71 ±0.28	c
80	-	28 ±4.2	1.7 ±0.3	a	17 ±0.4	c
	+	37.5 ±2.75	1.26 ±0.05	b	16.22 ±0.22	d

Media ± error estándar. *= Sin (-) o con (+) hidrolizado de caseína (250 mg L^{-1}) y L-glutamina (250 mg L^{-1}). Los promedios en la columna con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey en $p< 0.05$; +, ++= 60 días de cultivos; +++= 120 días de cultivo. Los datos son de 10 tratamientos con 12 réplicas de 10 explantes por réplica.

La sacarosa puede servir como fuente de carbono durante la embriogénesis somática (Kim y Kim, 2002) y también como un regulador osmótico (Biahoua y Bonneau, 1999). Sin embargo, es de conocimiento general que el papel de la alta concentración de azúcar en la embriogénesis somática puede afectar la osmolaridad celular (Hazarika, 2003). Por lo tanto, el papel de la sacarosa en el presente estudio podría interpretarse como funciones reguladoras tanto nutricionales como osmóticas de este carbohidrato. El resultado de este estudio mostró que las concentraciones más altas de sacarosa mejoran la maduración de los embriones somáticos (Tabla 1). El aumento de la concentración de sacarosa en el medio puede crear estrés osmótico, pero ayuda a mejorar la embriogénesis somática. Por lo tanto, se podría sugerir que el efecto osmótico de la sacarosa puede causar el desarrollo normal de los embriones somáticos. El efecto positivo de la alta osmolaridad puede imitar las alteraciones de la osmolaridad que ocurren alrededor del embrión en la naturaleza (Merkle *et al*., 1995).

Por otro lado, el hidrolizado de caseína y la glutamina han sido las principales fuentes de nitrógeno utilizadas en el cultivo de tejidos y el crecimiento del tejido del callo de *A. angustifolia* se vio significativamente afectado por la adición de aminoácidos, específicamente la glutamina y la caseína. Esta respuesta sugiere que el nitrógeno orgánico era un factor limitante del crecimiento en cultivos de agave. Además, el tipo y la concentración de aminoácidos afectaron significativamente la expresión de los embriones somáticos de *A. angustifolia*, a medida que la concentración aumenta a medida que disminuye el desarrollo (Tabla 1).

Conclusión

La inducción de callos embriogénicos en explantes de embriones cigóticos y la producción de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos podría controlarse por cambios en la concentración de sacarosa y se ve afectada por la adición de fuentes de aminoácidos. Los resultados de este estudio también mostraron que los altos porcentajes de embriones somáticos podrían regenerarse con éxito para formar plantas normales completas. El establecimiento de las condiciones requeridas para la alta frecuencia de regeneración a través de la embriogénesis somática facilitaría el cultivo de protoplastos, la hibridación somática, la transformación genética y la producción de semillas artificiales en *A. angustifolia*.

Literatura citada

Arzate, F. A. M. and Mejía, F. R. 2011. Embryogenic capacity of induced calli on zygotic embryonic axis of *Agave angustifolia* Haw. Rev. Fitotec. Mex. 34(2):101-106.

Biahoua, A. and Bonneau, L. 1999. Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. Plant Cell Rep. 19(2):185-190.

George, E. E. 1993. Plant micropropagation of tissue culture, sugars nutritional and regulatory effects. Exegetics. 15(3):322-336.

Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue cultured plants. Curr. Sci. 12(85):1704-1711.

Huang, W. and Liu, F. L. 2002. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. Bot. Bull. Acad. Sci. 43(1):107-113.

Kim, S. H. and Kim, S. K. 2002. Effect of sucrose level and nitrogen source on fresh weight and anthocyanin production in cell suspention culture of 'Sheridan' Grape (*Vitis* spp.). J. Plant Biotecch. 40(4):2327-2330.

Mehta, U. J.; Krishnamurthy, V. K. and Hazra, S. 2000. Regeneration of plant via adventitious bud formation from zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica*). Curr. Sci. 10(78):1231-1236.

Merkle, S.A.; Parrott, W. A. and Flin, B. S. 1995. Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. In: Torpedoed *in vitro* embryogenesis in plant, Klauwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 155-203 pp.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(1):473-497.

Nakagawa, H.; Saijyo, T.; Yamauchi, N.; Shigyo, M.; Kako, S. and Ito, A. 2001. Effect of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scientia Hortic. 90(1):85-92.

Phillips, G. C. and Collins, G. B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19(1):59-64.

Smeekens, G. S. M. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51(1):49-81.