



EVALUACIÓN DE DOS AUXINAS EN LA INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* WEBER VARIEDAD AZUL †

[TWO AUXINS EVALUATION IN THE EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION IN VITROPLANTLETS OF *Agave tequilana* WEBER CULTIVAR BLUE]

**Alejandro Ángeles-Espino^{2*}, Leticia Sánchez-Mendoza¹,
Hilda E. Dimas-Estrada¹ David Ramírez-Alvarado¹
and Juan F. Gómez-Leyva¹**

¹*Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.*

²*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. Teléfono: 52 33 3777 1160 Fax: 52 33 3777 1150.*

Email: aangeles_1305@hotmail.com

**Corresponding author*

SUMMARY

Agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), it is commonly known as “Agave Azul Tequilero”. The Agave crop is an economically important of Mexico because employers in field and industry, in addition it is the ingredient for tequila, a distilled spirit drink. The objective of this research was to evaluate two auxins with three concentrations to embryogenic callus induction and somatic embryos obtention from vitroplantlets of *A. tequilana*. Treatments were two auxins ANA & 2,4-D in three concentrations: 2, 3 & 4 mg L⁻¹ in Murashige and Skoog media. Embryogenic callus induction, globular, maturation embryos and plant conversion were evaluated. Statistics differences were present in embryogenic callus induction and development globular embryos between auxins and concentrations. The mostly callus induction, globular and development embryos was present in 3 mg L⁻¹ concentration in both auxins. Maturation and plant conversion did no show statistic difference. An external auxins is required for the induction of embryogenic callus, and the behavior is related with concentration. Regression confirms positive behavior between embryogenic callus induction, globular embryos and maturation.

Key words: Agave; auxins; tissue culture; somatic embryogenic; phytohormons.

RESUMEN

El agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) es comúnmente conocido como “Agave Azul Tequilero”. El Agave es económicamente importante en México debido a los empleos que genera en campo e industria, además que es el ingrediente base del tequila, una bebida destilada. El objetivo de esta investigación fue evaluar dos auxinas en tres concentraciones en la inducción de callo embriogénico y obtención de embriones somáticos en vitroplántulas de *A. tequilana*. Los tratamientos fueron dos auxinas ANA y 2,4-D en tres concentraciones: 2, 3 y 4 mg L⁻¹ en el medio Murashige y Skoog. Se evaluaron la inducción de callo embriogénico, embriones globulares, maduración de embriones y conversión en plántula. Hubo diferencia significativa en la inducción de callo y embriones globulares entre auxinas y entre concentraciones. La mayor inducción de callo se presentó en la concentración de 3 mg L⁻¹ en las dos auxinas La maduración y conversión en plántula no mostró diferencia significativa. La inducción de callo embriogénico requiere de una fuente de auxina, mientras que la respuesta depende de la concentración. La regresión confirmó el comportamiento positivo entre la inducción de callo, embriones globulares y la maduración.

Palabras clave: Agave; auxinas; cultivo de tejidos; embriogénesis somática; fitohormonas.

† Submitted October 18, 2017 – Accepted December 12, 2017. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License

INTRODUCCIÓN

El cultivo de agave azul tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) tiene alta importancia económica y social dada la superficie plantada en la zona de denominación de origen del tequila (DOT) y las familias que dependen por los empleos que genera tanto en campo como en el proceso de industrialización (González *et al.*, 2007). El tequila presenta una alta demanda tanto en el mercado nacional como en los mercados internacionales, además cuenta con la denominación de origen que obtuvo el gobierno Mexicano en 1977, la cual protege al país como productor y procesador del cultivo utilizado como materia prima para la obtención industrial de ésta bebida, contenidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994. La cual autoriza al agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), como la única especie para la producción del tequila (González *et al.*, 2007).

Se reportan 197 especies incluidas dentro de los dos subgéneros reconocidos (*Littaea* y *Agavaceae*), de las cuales 136 se encuentran en México, presentando factores que limitan la multiplicación masiva por métodos convencionales, debido a que requiere de 6 a 14 años para su maduración, (Hurtado, 2008). Una alternativa es la aplicación de las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la biotecnología vegetal, siendo la micro propagación la que aporta mayores ventajas, ya que es clonal y mantiene las características genotípica (Prina *et al.*, 2010).

Aun cuando el agave tequilero ha sido cultivado durante más de dos siglos en el estado de Jalisco, continúan las metodologías de cultivo poco tecnificadas para mejorar la producción. No se utiliza el mejoramiento genético mediante la vía sexual para encontrar variación en la progenie. Por otra parte, la propagación asexual durante muchos años ha ocasionado un incremento en la clonación de los pocos genotipos seleccionados disminuyendo la variación dentro de las plantaciones, lo que ha ocasionado la incidencia y proliferación de enfermedades (Rodríguez, 2004).

El mismo autor consigna que el mejoramiento genético convencional en *Agave tequilana* se dificulta por ser semépala, el ciclo de vida (6 a 12 años), tiempo corto de floración y la dificultad para manipular la floración. Por lo que debe en los programas de mejoramiento debe hacerse uso de las nuevas tecnologías como el cultivo *in vitro* y la embriogénesis somática, y así poder explotar al máximo la variabilidad genética que lleve a seleccionar individuos con mejores características agronómicas, así como las que la industria requiere para su proceso. Arizaga (2008), menciona que la

micropropagación para el establecimiento de plantaciones comerciales dentro de la zona de denominación de origen, parten de un solo código genético que produce plantaciones homogéneas, aunque se ha reportado variabilidad dentro del género *Agave* a pesar de la propagación asexual.

La embriogénesis somática es una técnica de cultivo *in vitro*, de interés por sus aplicaciones potenciales en propagación clonal, transformación genética y estudios de desarrollo de embriones. Esta biotecnología ha sido ampliamente usada en plantas de interés económico y se presenta también como una alternativa para la obtención de material vegetal de algunos forestales. La embriogénesis somática es un sistema que permite obtener clones con una arquitectura dimórfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material (Medina *et al.*, 2007).

Rodríguez *et al.* (1996) y Martínez *et al.* (2003) reportaron embriogénesis somática en *A. victoria-reginae* Moore, a partir de explantes de hoja y segmentos de tallo. Por su parte, Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) lograron la propagación *in vitro* de *A. parrasana* Berger a través de brotes axilares.

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de dos fuentes de auxina en tres concentraciones en la inducción de callo embriogénico, obtención y maduración de embriones somáticos en vitroplántulas de *Agave tequilana* Weber var. Azul.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología del Posgrado del Instituto Tecnológico de Tlajomulco ubicado en el Km 10 Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco; de octubre de 2015 a abril de 2016.

Material biológico

Se utilizaron como explantes secciones de hoja procedentes de vitroplántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul obtenidas a partir de yemas axilares siguiendo la metodología citada por Angeles-Espino *et al.* (2012).

Fuentes de auxina

Se evaluaron tres concentraciones del Ácido Naftalén Acético (ANA) y tres concentraciones del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) como se muestra en la tabla 1. La concentración de las Citocininas Benciladenina (BA) y Cinetina se mantuvieron constantes en todos los tratamientos.

Tabla 1. Distribución de tratamientos de dos fuentes de auxina en tres concentraciones, manteniendo constante la concentración de Benciladenina y Cinetina

Tratamiento	Auxina	Benciladenina	Cinetina
a1 b1	ANA	2 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
a1 b2	ANA	3 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
a1 b3	ANA	4 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
a2 b1	2,4-D	2 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
a2 b2	2,4-D	3 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
a2 b3	2,4-D	4 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹

Preparación del medio de cultivo

Se seleccionó el medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 suplementado con nitrógeno reducido, Fe EDTA, mio-inositol, tiamina, piridoxina, 30 g L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos y 8 g L⁻¹ de agar para su solidificación. Tomando en cuenta que la unidad experimental constó de tres frascos y cuatro repeticiones (ver diseño experimental), se tuvieron 12 frascos por tratamiento (300 mL). Previo a la esterilización y a la adición del agar, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.03 para posteriormente transferir el medio fundido en dosificaciones de aproximadamente 25 mL en contenedores de 100 mL. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a una presión de 1.4 kg/cm² (20 lb/pulg²) a una temperatura de 121 °C.

Siembra de los explantes

Se omitió el tratamiento de desinfección de las plántulas, debido a que estas se encontraban en condiciones asépticas en contenedores sellados con medio de cultivo MS. Los frascos con las vitroplántulas se llevaron a la cámara de flujo laminar para la obtención de los explantes. Se extrajeron las plántulas de los contenedores y se colocaron en cajas de Petri previamente esterilizadas en autoclave bajo las mismas condiciones del medio de cultivo. La siembra se realizó en cámara de flujo laminar (VECO, U.S.A.) bajo condiciones de asepsia.

Se seleccionaron las hojas más jóvenes y se colocaron en cajas de Petri previamente identificadas de acuerdo al tratamiento correspondiente a las dosis de 2,4-D (C₈H₆Cl₂O₃), y ANA (C₁₂H₁₀O₂). Una vez obtenidos los explantes, las plántulas se colocaron nuevamente en contenedores estériles con medio MS adicionado con 0.53 µM de Ácido Naftalenacético (ANA) y 44.4 µM de Benciladenina (BA) para continuar con su desarrollo y multiplicación.

Las hojas se seccionaron en tablas de 5 mm aproximadamente. Se sembraron tres frascos por tratamiento colocando seis explantes por contenedor,

obteniendo 18 explantes por repetición. Se sellaron, rotularon y se transfirieron a la cámara de incubación a una temperatura de 27 °C ± 1 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

Maduración de embriones

Para el desarrollo y maduración de los embriones, una vez que los callos alcanzaron la etapa globular (28 días) se subcultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento, adicionado con 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada y 250 mg L⁻¹ de glutamina, 40 g L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos y 8 g L⁻¹ de agar para su solidificación. Previo a la esterilización y a la adición del agar, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.03 . Se sellaron, rotularon y se transfirieron a la cámara de incubación a una temperatura de 27 °C ± 1 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Durante el desarrollo de los embriones se cambiaron a medio fresco cada 28 días hasta que se alcanzó la conversión en plántula.

Análisis estadístico y Variables evaluadas

Diseño experimental

Se diseñó un experimento bifactorial con arreglo combinatorio y una distribución completamente al azar con cuatro repeticiones (Reyes, 1978). El Factor "A" corresponde a las fuentes de auxina y el Factor "B" a las dosis de aplicación como se muestra en la tabla 1. La unidad experimental constó de tres frascos por repetición, colocando seis explantes por contenedor obteniendo 18 explantes por tratamiento y por repetición, lo que correspondió a 12 frascos por tratamiento. Los resultados se procesaron mediante análisis de varianza (prueba de F<5%) y la diferencia entre tratamientos se obtuvo mediante componentes ortogonales entre las auxinas, así como entre las concentraciones evaluadas. Se hicieron análisis de correlación y regresión lineal entre la inducción de callo vs longitud, inducción de callo vs embriones globulares y embriones globulares vs diferenciación

de embriones. Los resultados se procesaron con el programa estadístico Statgraphics Centurión 12®.

VARIABLES EVALUADAS

Inducción de callo embriogénico. Se contabilizaron los explantes en los que se presentó la inducción de callo embriogénico a los 28 días posteriores a la siembra (No. de callos).

Desarrollo de callo (cm). Se muestrearon tres callos por contenedor a los 28 días posteriores a la siembra, midiendo la longitud con un vernier obteniendo el promedio de seis explantes.

Embriones globulares. Se contabilizaron las células pro-embriogénicas que alcanzaron el estado globular (No de embriones globulares).

Maduración de embriones somáticos. Se contabilizaron los embriones obtenidos a partir de los embriones globulares (No. de embriones).

Longitud de embriones somáticos (cm). Se midió con un vernier la longitud de tres embriones por repetición.

Conversión en plántulas. Se contabilizaron las plántulas que se obtuvieron a partir de la maduración de los embriones somáticos (No. de plántulas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la embriogénesis somática se presentan diversos factores genéticos, fisiológicos, así como el medio de cultivo que intervienen en la inducción de los embriones somáticos, desencadenando la expresión de genes embriogénicos. Este proceso sólo es posible si las células son competentes y reciben los estímulos inductores apropiados, entre los que intervienen los reguladores del crecimiento (fitohormonas) y en particular las auxinas, que son componentes esenciales debido a que su aplicación exógena induce el potencial embriogénico de las células somáticas mitóticamente inactivas, convirtiéndolas en células bipolares (Silveira *et al.*, 2013).

En la tabla 2 se presentan los valores promedio obtenidos en las seis variables evaluadas en cada una de las fases del experimento, que corresponden a la evaluación de la respuesta en la aplicación de dos fuentes de auxina, Ácido Naftalén Acético (ANA) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en tres concentraciones.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos del análisis de varianza, así como la diferencia entre tratamientos mediante contrastes ortogonales, correspondientes a las variables evaluadas en la aplicación de dos auxinas (ANA y 2,4-D) en tres concentraciones.

Tabla 2. Valores promedio para dos fuentes de auxina y tres dosis de aplicación en las variables que se indican.

Dosis de Auxina	Inducción de callo (No)	Tamaño callo (cm)	No. Embriones Globulares	No. Embriones Maduros	Longitud Embriones (mm)	Conversión en plántula (No)
ANA 2 mg	7.50	1.05	28.8	21.25	11.35	19.00
ANA 3 mg	12.25	1.23	36.5	29.00	11.03	20.25
ANA 4 mg	7.75	1.08	30.8	24.00	10.78	20.50
2,4-D 2 mg	9.00	1.33	30.5	22.50	11.05	19.25
2,4-D 3 mg	13.50	1.57	41.8	31.75	11.43	22.00
2,4-D 4 mg	9.75	1.23	35.3	22.50	11.20	19.50

Tabla 3. Análisis de varianza y contrastes ortogonales entre fuentes de auxina y dosis de aplicación en las variables que se indican.

FUENTE	GL	Inducción de	Tamaño	No. Embriones	No. Embriones	Longitud	Conversión
		callo (No)	(cm)	Globulares	Maduros	Embriones (mm)	en plántula
		CM	CM	CM	CM	CM	CM
Tratamientos	5	23.74**	0.14**	94.57**	71.16**	0.27 ^{ns}	4.86 ^{ns}
SC _A (Auxinas)	1	15.04**	0.39**	88.16**	4.16 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.66 ^{ns}
C ₁ : ANA vs 2,4-D	1	15.04**	0.39**	88.16**	4.16 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.66 ^{ns}
SC _B (Concentraciones)	2	51.54**	0.14**	185.54**	166.54**	0.13 ^{ns}	8.04 ^{ns}
C ₁ : 2 y 4 ppm vs 3 ppm	1	102.08**	0.28**	325.52**	325**	0.09 ^{ns}	13.02 ^{ns}
C ₂ : 2 ppm vs 4 ppm	1	1.00 ^{ns}	0.005 ^{ns}	45.56**	7.54 ^{ns}	0.18 ^{ns}	3.06 ^{ns}
Interacción A x B	2	0.29 ^{ns}	0.022 ^{ns}	6.79 ^{ns}	9.29 ^{ns}	0.33 ^{ns}	3.79 ^{ns}
Error	18	1.01	0.01	2.94	4.75	0.19	2.86
C. V. %		10.11%	9.55%	5.21%	8.66%	3.92%	8.42%

*diferencia significativa ($p < 5\%$); **diferencia altamente significativa ($P < 1\%$); ns=diferencia no significativa ($P > 5\%$)

Inducción de callo embriogénico

La inducción de callo embriogénico se inició a los 14 días después de la siembra, sin embargo, la evaluación de los explantes se hizo a los 28 días una vez que los callos alcanzaron su máximo desarrollo (figura 3A y 3B), presentándose la inducción en el 73.7% de los explantes sembrados. Estadísticamente el comportamiento de las células competentes en la inducción de callo presentó una diferencia significativa al 1% de probabilidad tanto en las fuentes de auxina, así como en las dosis evaluadas (tabla 3). Al comparar la inducción de callo en las dos auxinas los componentes ortogonales mostraron que el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) superó significativamente al Ácido Naftalén Acético (ANA), debido a que los índices de inducción en las tres concentraciones fue de 79 y 67% respectivamente, siendo 12% superior en la auxina 2,4-D (tabla 2 y 3). Por otra parte al comparar las concentraciones, la mayor inducción se presentó en 3 mg L⁻¹ que difiere estadísticamente de 2 y 4 mg L⁻¹, mientras que entre las dosis de 2 y 4 mg L⁻¹ la diferencia no fue significativa, por lo que se deduce que la dosis de 3 mg L⁻¹ presentó la mayor inducción de callo en las dos fuentes de auxina (ANA y 2,4-D) alcanzando prácticamente los mismos valores y superando en 35% a las dosis de 2 y 4 mg L⁻¹ en los explantes con inducción (figura 1). Por otra parte considerando que el experimento se inició con 18 explantes por tratamiento, en la dosis de 3 mg L⁻¹ la inducción fue de 66% en ANA y 72% en 2,4-D; mientras que en las dosis de 2 y 4 mg L⁻¹ fue de 38% en ANA y 50% en 2,4-D. Además, si bien la inducción de callo

embriogénico se presentó en las dos fuentes de auxina y en las tres concentraciones, explica el comportamiento no significativo de la interacción entre las fuentes de auxina y las dosis de aplicación, lo que indica que la activación de las células competentes para la inducción de callo embriogénico depende de la adición de una fuente de auxina (2,4-D o ANA), y la mayor o menor inducción de la concentración. Martín *et al.* (2011), reportó una respuesta positiva a la inducción de callo en *Agave angustifolia* aplicando diversas auxinas (2,4-D, ANA y AIA,) en medio MS, lo que confirma los resultados obtenidos en el experimento.

Los resultados muestran que el mayor número de explantes con presencia de callo embriogénico en las dos fuentes de auxina evaluadas fue en la dosis de 3 mg L⁻¹, por lo que se deduce que es el mejor tratamiento en la inducción de callo embriogénico a partir de tejido somático de vitroplántulas de *Agave azul* tequilero como se presenta en la tabla 2. La inducción y la emergencia del callo embriogénico, coincide con lo reportado por Amuray-Martínez *et al.* (2011) donde la mayor inducción de callo embriogénico en *Agave angustifolia* se presentó en medio MS suplementado con 2 y 3 mg L⁻¹ de 2,4-D sobre todo cuando contenían 1 mg L⁻¹ de Bencil Adenina (BA). Además, González *et al.* (2005), indujeron callo embriogénico en limbos foliares de Boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) a partir de células del parénquima perivascular del cual surgieron las estructuras embriogénicas, con el rompimiento de la epidermis, lo que permitió la emergencia de las células bipolares. Diversos estudios indican que la

acción de las auxinas, así como el estrés son esenciales en la reprogramación genética de células competentes durante la inducción de callo en la embriogénesis temprana, lo cual es necesario para la diferenciación y alcanzar la condición embriogénica, además que se activan rutas de control genético similares a las que se presentan en la embriogénesis cigótica, lo que se considera como un fenómeno natural, sin embargo la capacidad embriogénica varía entre genotipos de la misma especie (Freire, 2003).

Desarrollo de callo embriogénico

Los callos presentaron una textura compacta con una coloración cremosa al iniciar la aparición de las células bipolares, tomando una coloración verde conforme se desarrollaron hasta alcanzar el estado globular (figura 3A). En cuanto al crecimiento de los callos, el análisis de varianza presentó diferencia significativa ($P < 1\%$) entre las fuentes de auxina, así como entre concentraciones, y no significativa ($P > 5\%$) para la interacción auxina-concentración. Al comparar el desarrollo de los callos entre las auxinas

evaluadas, el componente ortogonal reportó una diferencia significativa ($P < 1\%$), correspondiendo al 2,4-D el mayor crecimiento ya que el promedio de las tres concentraciones fue de 1.37 cm y de 1.12 cm en ANA (18% menor), lo que explica la diferencia estadística. Para las concentraciones la dosis de 3 mg L⁻¹ mostró diferencia significativa ($P < 1\%$) con respecto a las concentraciones de 2 y 4 mg L⁻¹; mientras que entre estas la diferencia no fue significativa ($P > 5\%$) como se presenta en la tabla 3 y la figura 1. Estos resultados indican que el desarrollo de callo tuvo un comportamiento similar a la inducción en cuanto a la respuesta a la fuente de auxina, así como a las concentraciones. Además, la diferencia entre el callo somático y embriogénico, se basa en que el primero corresponde a un crecimiento celular indiferenciado; mientras que el segundo se desarrolla a partir de la inducción de las células competentes del tejido somático del explante, induciendo células pro-embriónicas que se caracterizan por ser bipolares (plúmula y radícula) y que generan su propia pared celular, por lo que cada célula da origen a una planta completa (Freire, 2003).

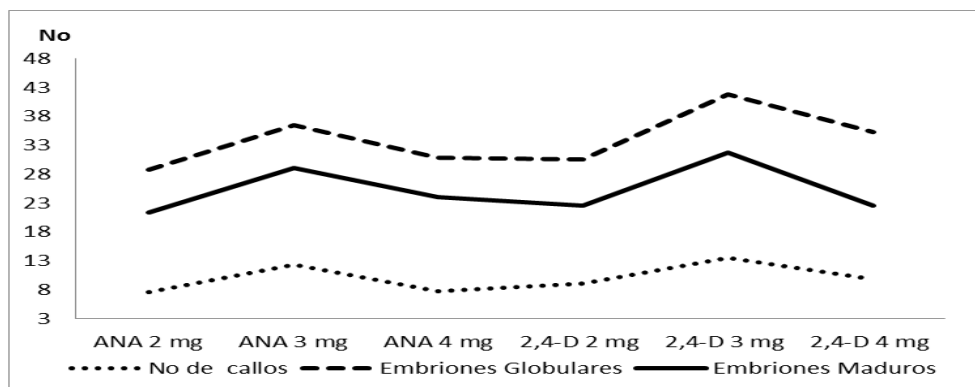


Figura 1. Inducción de callo embriogénico, embriones globulares y embriones maduros en dos fuentes de auxina y tres concentraciones

Por otra parte, el comportamiento de la interacción al no ser significativa, y de acuerdo a las diferencias estadísticas entre las fuentes de auxina, así como entre las concentraciones, muestra que las células pro-embriogénicas responden al estímulo de la auxina para inducir callo embriogénico, mientras que el número de células que responden al estímulo está en función de la concentración, lo que explica el comportamiento independiente. López-Gómez, *et al.* (2010), trabajando con hojas de café, reportan que en la formación de callo embriogénico en los genotipos INIFAP 95-8 y 00-28, tuvieron valores de 77 a 97 %, y superaron ($P \leq 0.01$) al resto de los materiales cuyos valores fluctuaron de 18 a 72 % de callo embriogénico. Así mismo, Taiz y Zeiger (2002), consignan que los reguladores de crecimiento son determinantes en la respuesta embriogénica ya que

estos interactúan con los niveles hormonales endógenos y, en algunos casos, las respuestas están dadas por la acción conjunta de dos o más reguladores. Se obtuvo una correlación positiva y significativa al 5% de probabilidad ($r = 0.63$) entre las células competentes que presentaron inducción (X) y el tamaño de callo (Y) como aparece en la figura 2A, lo que confirma que el desarrollo del callo está en función de las células bipolares que se convierten en embriones globulares, por consiguiente a mayor respuesta de las células pro-embriogénicas para convertirse en células bipolares, mayor será el tamaño que alcance el callo embriogénico; además el coeficiente de determinación indica que el 40% del crecimiento de callo está en función de la inducción de las células pro-embriogénicas que responden al estímulo de la auxina.

Embriones globulares

En la fase de inducción, el tejido somático adquiere competencia embriogénica, en el que las células competentes o pro-embriónicas inician el desarrollo después de recibir el estímulo adecuado, presentan características comunes a las células en activa división, las cuales son de tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucléolo prominente, vacuola pequeña, profusión de gránulos de almidón y se caracterizan por tener su propia pared celular; para continuar con los estadios globular y torpedo previo a la maduración de los embriones, (William y Mahescuaran, 1986). La contabilización de los embriones globulares se hizo a los 28 días de la siembra debido a que es cuando alcanzan su máximo desarrollo, para dar inicio a la maduración de los embriones, además que se obtuvo una embriogénesis somática de alta frecuencia que se caracterizó por la presencia de grupos de pro-embriones en estado globular agrupados. En la tabla 3 se presentan los resultados de la prueba de “F”, mostrando diferencia altamente significativa entre las fuentes de auxina, así como entre las concentraciones, además que la interacción no fue estadísticamente significativa. Al comparar las fuentes de auxina el componente ortogonal presentó diferencia estadística ($P < 1\%$) entre la auxina 2,4-D y ANA. Al obtener los promedios de cada una difieren en 4 embriones en estado globular, sin embargo, lo que marcó la diferencia significativa fue la dosis de 3 mg L^{-1} con 41 y 36 embriones globulares respectivamente como se presenta en la figura 1. Así mismo estas dosis difieren de 2 y 4 mg L^{-1} en las dos auxinas, sin que haya diferencia significativa entre estas últimas. Este comportamiento se explica la relación que hay entre los explantes que indujeron callo, así como el tamaño que este alcanzó en cada fuente de auxina y en cada concentración, debido a que los callos de mayor tamaño corresponden a un mayor número de células pro-embriónicas (figura 3B) que se convierten en bipolares (radícula y plúmula), aunado a las características embriónicas que se mencionaron con antelación. González-Oramas *et al.* (2002), reportan que tanto el tipo de auxina como la concentración se relaciona estrechamente con la formación de los callos con estructuras embriónicas 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 embriónicas. Además se obtuvo una correlación positiva y significativa ($P < 5\%$) entre los explantes que tuvieron inducción de callo embriónico (X) y las células competentes que alcanzaron el estado globular (Y) como se presenta en la figura 2B, donde el coeficiente de determinación (R^2) indica que el 71.5% de las células bipolares que alcanzaron el estado globular, se explica por los

explantes en los que se presentó inducción de callo, ya que el promedio de inducción en las dos fuentes de auxina y las tres concentraciones evaluadas fue de 73.7%.

Maduración de embriones somáticos

Los embriones globulares colocados en el medio para la maduración y diferenciación de los embriones somáticos, se observó a partir de los 21 días la presencia de pequeñas estructuras de color crema claro (figura 3C), lo que marcó el inicio de la diferenciación. Los resultados muestran que la fuente de auxina (2,4-D y ANA) no interviene en la maduración de los embriones somáticos ya que no se presentó diferencia significativa ($P > 5\%$); sin embargo, entre las concentraciones la diferencia fue altamente significativa como se presenta en la tabla 3. Además, el componente ortogonal entre la dosis de 3 mg L^{-1} vs 2 y 4 mg L^{-1} , fue altamente significativa, en cambio la diferencia entre 2 y 4 mg L^{-1} no fue significativa (tabla 3). Los resultados muestran que el desarrollo y la madurez de los embriones disminuyó en 25% en promedio con respecto a los embriones que alcanzaron la etapa globular, lo que indica por una parte que no todos los embriones se desarrollan y maduran (figura 1), y por otra que la maduración no depende de la presencia de auxina, ya que la maduración se llevó en medio MS sin reguladores de crecimiento, adicionado con nitrógeno reducido, peptona y sacarosa, lo que explica el que el componente ortogonal no haya presentado diferencia estadística entre las fuentes de auxina. Se ha reportado que la adición de carbohidratos estimula la histodiferenciación, debido a que la concentración de sacarosa puede afectar la inducción morfogénica, como fuente nutritiva y como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo. (Ramsay *et al.*, 2003, Körbes y Droste, 2005). La diferencia significativa entre las concentraciones se atribuye al alto índice de inducción de callo embriónico que se presentó en la concentración de 3 mg L^{-1} en ambas auxinas, además que la madurez de los embriones somáticos depende de los embriones globulares como lo demuestra la correlación positiva y significativa ($r = 0.81$) entre estas variables, o sea que conforme se incrementan los embriones globulares se incrementa la maduración de los embriones somáticos como se muestra la figura 2C. Por otra parte, este comportamiento explica el que la interacción no haya sido significativa.

Crecimiento de embriones y conversión en plántula

Considerando que el crecimiento de los embriones, así como la conversión en plántula no depende de la adición de una fuente de auxina, ya que este proceso se llevó a cabo en medio MS sin reguladores de crecimiento. El análisis estadístico para la tabla 3 muestra

que no hubo diferencia significativa entre las fuentes, entre dosis, así como la interacción fuente concentración. Los embriones alcanzaron una longitud de 11 mm en promedio, mientras que la conversión en plántula se presentó a los 56 días

después de haberse transferido los embriones para su maduración (figura 3D y 3E). La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa.

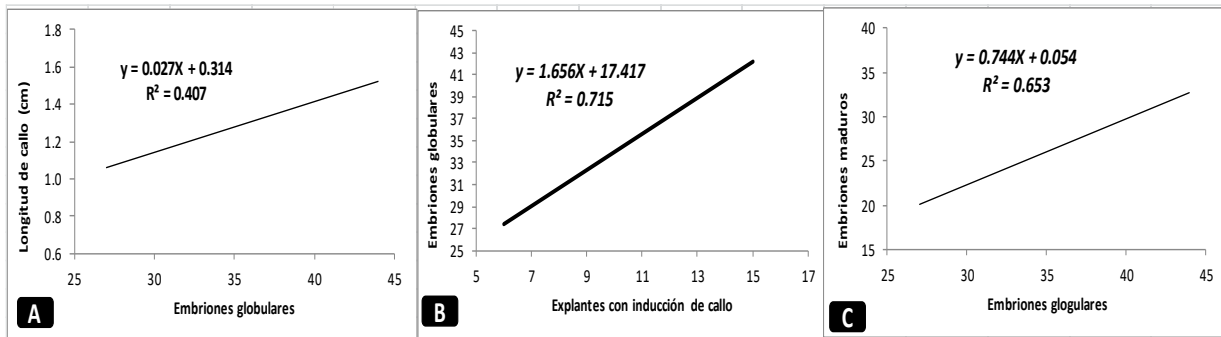


Figura 2. Análisis de correlación y regresión lineal. A) Embriones globulares vs longitud de embrión, B) Explantes con inducción vs embriones globulares y C) Embriones globulares vs embriones maduros

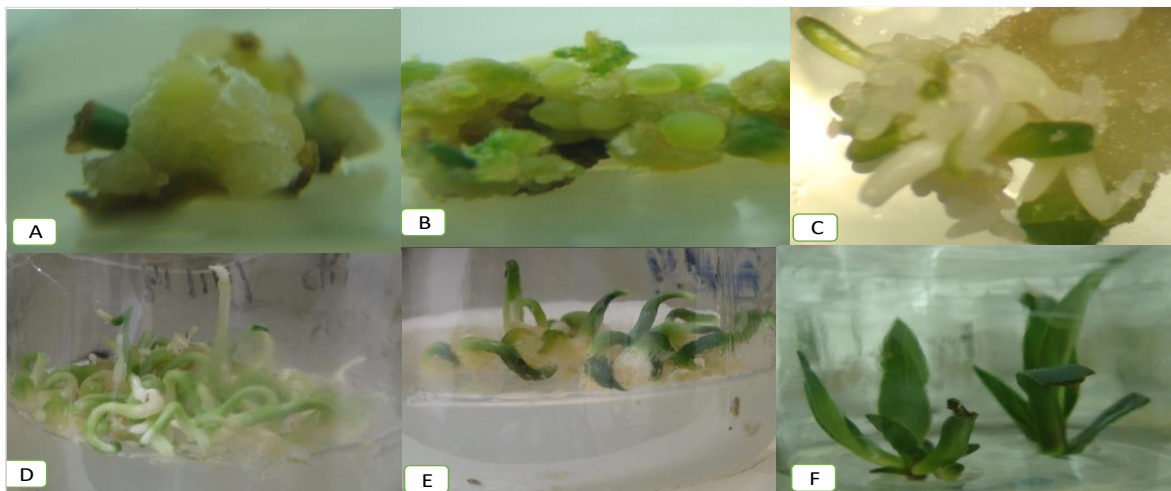


Figura 3. Efecto del Ácido Naftalén Acético (ANA) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en la obtención de Embriones somáticos en *A. tequilana* Weber var azul. A) Inducción de callo embriogénico. B) Embriones somáticos en estado globular. C) Inducción de embrioides somáticos. D) Maduración de embriones somáticos y E) Conversión en plántula.

CONCLUSIONES

La inducción de callo embriogénico se presentó en las fuentes de auxina (ANA y 2,4-D) evaluadas, así como el crecimiento de callo y los embriones globulares. La mayor inducción se presentó en la concentración de 3 mg L⁻¹ en las variables. La inducción de callo embriogénico requiere de la adición de una auxina, mientras que la respuesta está en función de la concentración. En las variables estudiadas, la interacción auxina vs concentración no fue

significativa, lo que indica que son independientes. La maduración de los embriones somáticos se obtuvo en medio MS sin reguladores de crecimiento, así como la conversión en plántula.

Agradecimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al Dr. Alejandro Angeles Espino para su estancia posdoctoral en el Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Jalisco, México.

REFERENCIAS

- Angeles-Espino, A., A. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez, y S. Hurtado-De la Peña. 2012. Micropropagación de *Agave* (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 : 693 – 698.
- Arzate-Fernández, A.M., Mejía-Franco, R. 2011. Capacidad Embriogénica de Callos Inducidos en Ejes Embrionarios Cigóticos de *Agave Angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(2):101-106.
- Arizaga, S. 2008. En peligro el tequila mexicano. Lo que somos – Electronic magazine <http://www.loquesomos.org/amasando/elbicho/tequila.htm>
- Freire, S. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biología Vegetal*. 3(4):195-209.
- González Oramas, G., Alemán-García, S.; Barredo, F., Robert-García, M.L. 2002. Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biología Vegetal*. 2: 3-8.
- González, H., Del Real, J., Solís, J. 2007. Manejo de Plagas del Agave Tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V. 123 p.
- González, O.S., Sam, O., Hernández, M., Coronado, M., Silva, J. 2005. Caracterización Histológica de la Embriogénesis Somática a Partir de Limbos Foliare de Boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Cultivos Tropicales*, 26(4): 37-41.
- Hurtado de la P., S. 2008. Variabilidad Intraespecífica en *Agave tequilana* Weber var azul Detectada con Caracteres Morfológicos y Moleculares. Tesis Doctoral sin publicar. CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco. México .
- Körbes, A.P., Droste, A. 2005. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 40:211-216
- López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivel A., Aguirre-Medina, J., Ojeda-Zacarias, M., Gutiérrez-Díez, A. 2010. Influencia del Explante y Medio de Cultivo en la Embriogénesis Somática en Hojas de Café. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33(3): 205 – 213
- Martín, A., Fernández, A., Mejía, R. 2011. Capacidad Embriogénica de Callos Inducidos en Ejes Embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34 (2): 101 – 106.
- Martínez, P., Ortega, M., Chávez, V., Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *A. victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 74:135-142.
- Medina, C., García, I., Caro, M., Aristizába, F. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Revista Colombiana Ciencias Químico-Farmacéutica*. 36 (1): 70-80.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Prina, A., Landau, A., Pacheco, M.G., Hopp, E.H. 2010. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. In: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L. (Eds.) *Biología y mejoramiento vegetal II*. Editorial INTA. Segunda edición. Argentina. 217-228 pp. Reyes, C. P. 1978. *Diseño de Experimentos Agrícolas*. Primera Edición. Ed. Trillas 344.P
- Ramsay, J.L., Galitz, D., Lee, C.W. 2003. Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of Easter Lily in ovary culture. *HortScience* 38:404-406.
- Reyes, C.P. 1978. *Diseño de Experimentos Agrícolas*. Primera Edición. Ed. Trillas 344.P
- Rodríguez, G.B., Gutiérrez, A., Acosta, B. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 46:85-87.
- Rodríguez, G.B. 2004. La materia prima *Agave tequilana* Weber var azul. *Avances de la Investigación en el Agave Tequilero*. Consejo Regulador del Tequila. P: 3-43
- Santacruz, R.F., Gutiérrez, H., Rodríguez, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 56:163-167.
- Silveira, V., Martins, A., Ferreira, A., Ribeiro, M., Segal, E., Santa, C. 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 114: 351-364.

Taiz, L., Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. California: Oxford University Press.

Williams, E., Maheswaran, M. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing

coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462.