



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CLONACIÓN DE *Agave angustifolia* HAW.
MEDIANTE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

JESÚS IGNACIO REYES DÍAZ

TUTOR ACADÉMICO:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

TUTORES ADJUNTOS:

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

DR. LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", TOLUCA, MÉXICO, JULIO, 2017.

*“Ten cuidado de las cosas de la tierra.
Haz algo, corta la leña, labra la tierra, planta magueyes.
Tendrás qué comer, qué beber, qué vestir.
Con eso estarás en pie, serás verdadero, con eso andarás.
Con eso se hablará de ti, se te alabará, con eso te darás a conocer.”*

Fragmento del Huehuetlatolli¹

¹“La antigua palabra”, conjunto de discursos para la enseñanza de niños y jóvenes de la cultura mexicana.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE CUADROS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Generalidades de <i>Agave angustifolia</i>	4
2.2. Embriogénesis somática (ES)	5
2.2.1. Bases fisiológicas de la embriogénesis somática	6
2.2.1.1. Inducción de callo embriogénico	6
2.2.1.2. Expresión y maduración de embriones somáticos	9
2.2.1.3. Germinación y conversión de embriones somáticos a plantas.....	10
2.2.1.4. Adaptación de plantas a condiciones <i>ex vitro</i>	11
2.2.2. Bases moleculares de la embriogénesis somática	11
2.3. Embriogénesis somática en especies del género <i>Agave</i>	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS.....	16

V. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos específicos	17
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Ubicación del experimento	18
6.2. Determinación de las bases fisiológicas de la ES de <i>A. angustifolia</i>	18
6.3. Determinación de las bases moleculares de la ES de <i>A. angustifolia</i>	20
VII. RESULTADOS.....	22
7.1. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in <i>Agave angustifolia</i> Haw.	24
7.2. Culture medium factors influencing somatic embryogenesis induction in <i>Agave</i> <i>angustifolia</i> Haw.	38
7.3. Efecto del complejo vitamínico: Inositol, B6 y B1 en la inducción de embriones somáticos de <i>Agave angustifolia</i>	48
7.4. Isolation and molecular characterization of an <i>Agave angustifolia</i> Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (AaSerk) gene	60
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	75
IX. CONCLUSIONES GENERALES.....	78
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Embriogénesis somática en especies del género <i>Agave</i>	13

RESUMEN

Agave angustifolia Haw., es la materia prima fundamental para la producción de mezcal, una bebida alcohólica destilada con una gran demanda. Los agaves pueden multiplicarse asexualmente, sin embargo, la frecuencia de crecimiento de plantas vegetativas es muy baja. En condiciones ambientales óptimas, rara vez se forman semillas viables. También, la recolección de plantas y semillas, así como la destrucción del entorno ha reducido significativamente las poblaciones de esta planta en su hábitat nativo. Por lo anterior, la urgente necesidad de establecer técnicas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento genético de varias especies del género *Agave*. Utilizando la técnica de embriogénesis somática *in vitro*, los factores (sacarosa, reguladores de crecimiento vegetal, fuentes de nitrógeno orgánico y complejos vitamínicos) que afectan fisiológicamente la inducción de callo embriogénico de *A. angustifolia* fueron investigados, hasta ahora, nuestro protocolo ha permitido la obtención de 50.5 ± 2.48 embriones somáticos por explante con una tasa de 95-100% de frecuencia de conversión a plántulas y un 100% de supervivencia a la adaptación *ex vitro*. Asimismo, en este estudio se identificó y caracterizó por primera vez un gen parcial SERK específico para *A. angustifolia* (llamado AaSERK), un gen fundamental para la adquisición del potencial embriogénico de células somáticas. Así, un eficiente protocolo de clonación vía embriogénesis somática para la producción de plantas de alta calidad de *A. angustifolia* fue desarrollado.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, embriogénesis somática, totipotencia celular, gen *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*.

ABSTRACT

Agave angustifolia Haw., is the fundamental raw material for the production of mescal, a distilled alcoholic beverage with a great demand. The agave species can be multiplied asexually, however the frequency of grown of vegetative plants is very low. Under optimum environmental conditions, rarely sets viable seeds. Also, over collection of plants and seeds, as well as the habitat destruction reduce significantly the populations of this plant in its native habitat. By the above, the urgent needs to stablish biotechnology techniques to mass propagate method and genetically improve several species of the genus *Agave*. Using the technique of *in vitro* somatic embryogenesis, the factors (sucrose, plant growth regulators, organic nitrogen sources and vitamin complexes) that affect physiologically the induction of *A. angustifolia* embryogenic callus were investigated, so far our protocol has allowed to obtained 50.5 ± 2.48 somatic embryos per explant with a rate of 95-100% of conversion frequency to plantlets and 100% survival to *ex vitro* adaptation. Also in this study, a partial gene SERK specific from *A. angustifolia* (called AaSerk) was identified and characterized for the first time, a fundamental gene for the acquisition of the embryogenic potential of somatic cells. Thus, an efficient protocol of cloning via somatic embryogenesis for the production of high quality plants of *A. angustifolia* was developed.

Keywords: *Agave angustifolia*, somatic embryogenesis, cell totipotency, gene Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Agave* es nativo del Continente Americano y muestra su mayor diversidad en México; desde la antigüedad, muchas especies de este género se han utilizado en México para la producción de alimentos, fibras, azúcares, jarabes, celulosa, ensilado para el ganado, productos farmacéuticos, obtención de sapogeninas, como plantas ornamentales, elaboración de bebidas alcohólicas y muchos otros productos (Portillo *et al.*, 2007); una de estas especies es *A. angustifolia*, la cual se utiliza para la producción de mezcal.

A. angustifolia puede ser multiplicado vegetativamente ya sea a través de bulbillos o estolones (hijuelos), sin embargo, la tasa de adaptación a condiciones de campo es muy baja. Además, en condiciones ambientales óptimas el agave florece sólo una vez en su vida (8-30 años de edad) pero rara vez se obtienen semillas viables (Tejavathi *et al.*, 2007). Por otro lado, el incremento en la producción de mezcal ha ocasionado la sobreexplotación de dicha especie (Nikam *et al.*, 2003). Igualmente, la recolección de plantas y semillas, así como la destrucción de su entorno natural han reducido significativamente las poblaciones de este agave en su hábitat nativo.

Por lo anterior, la urgente necesidad de obtener un gran número de individuos uniformes de genotipos *elite*, ha llevado al desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para propagar masivamente varias especies del género *Agave*, en este sentido, se ha informado de un protocolo para la regeneración vía embriogénesis somática de *A. angustifolia* (Arzate-Fernández and Mejía-Franco, 2011).

La embriogénesis somática es un método alternativo para la clonación masiva y se produce con la reprogramación del desarrollo de células somáticas hacia la vía embriogénica, dicho proceso forma la base de la totipotencia celular en las plantas superiores. La embriogénesis somática es una simulación artificial de la embriogénesis natural y puede ser inducida por diferentes señalizaciones destacando la presión osmótica causada por la sacarosa, la influencia de las vitaminas en el medio de cultivo, las fuentes de nitrógeno orgánico o la presencia de reguladores de crecimiento vegetal

(RCV), principalmente las auxinas ya que juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado. La aplicación de RCV como 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y BA (benciladenina) ha tenido un papel importante dentro de la embriogénesis somática por su capacidad para inducir respuestas de crecimiento, diferenciación y en muy diversos fenómenos de desarrollo de las plantas (Thomas *et al* 2004; Nolan *et al* 2009).

Durante la embriogénesis somática, los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren durante el proceso de los tejidos inducidos, están estrechamente relacionados con alteraciones en la expresión génica. Varios genes se sobreexpresan durante la fase de inducción de la embriogénesis somática, y otros se expresan durante la maduración del embrión somático y su desarrollo a una planta completa. Entre los genes implicados en la inducción de la embriogénesis somática se encuentran los *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (SERK)* (Sharma *et al.*, 2008; Singla *et al.*, 2008). Los genes *SERK* fueron aislados por primera vez en células embriogénicas de zanahoria, posicionándose como un marcador molecular para la embriogénesis somática (Schmidt *et al.* 1997; Somleva *et al.*, 2000), dichos genes han sido asociados con el potencial embriogénico en diferentes especies incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), *Zea mays* (Baudino *et al.*, 2001), *Cyrtochilum loxense* (Cueva *et al.*, 2012) y *Cattleya maxima*.

Por la problemática anteriormente expuesta, en la presente investigación se tuvieron como objetivos: 1) evaluar el efecto fisiológico de diferentes factores en el medio de cultivo durante el proceso de embriogénesis somática de *Agave angustifolia* y 2) caracterizar molecularmente los genes específicos que se sobreexpresan y son responsables de la embriogénesis somática en *Agave angustifolia*.

Los resultados de la presente investigación muestran que la producción de embriones somáticos de *Agave angustifolia* se ve considerablemente afectada por una multitud de factores paralelos en el medio de cultivo, incluyendo la influencia de los reguladores de crecimiento vegetal, la participación de agentes precursores de estrés endógeno como lo

son la fuente de carbono y el complejo vitamínico, y la alteración de la expresión génica endógena que encamina a las células somáticas a la vía embriogénica.

Dichos resultados nos permitirán incrementar la eficacia y eficiencia del proceso de clonación *in vitro* (reducción de tiempo y costos, preselección de material vegetal, desarrollo de programas de mejoramiento genético, entre otros) generando clones de alta calidad genética que permitan la reproducción de la especie. Igualmente, este protocolo, permitirá ofrecer material vegetativo suficiente a las empresas y/o productores de mezcal interesados, lo anterior como una alternativa de aprovechamiento agrícola sustentable como está estipulado en la norma NOM-007-SEMARNAT-1997, que hace referencia a la protección y restauración de los recursos forestales no maderables y la biodiversidad de los ecosistemas con la finalidad de lograr un manejo sostenible de estos recursos fitogenéticos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de *Agave angustifolia*

El género *Agave*, que se ubica en la subfamilia Agavoideae (Asparagaceae, Asparagales) incluye varias especies de plantas adaptadas a condiciones de aridez. Tienen una forma característica de roseta y poseen raíces muy ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos y metabolismo fotosintético tipo CAM. Se reportan 204 especies incluidas dentro de los dos subgéneros reconocidos (*Littaea* y *Agaveae*). De este total de especies, 163 las podemos encontrar en México, por lo anterior, nuestro país es considerado como centro de origen del género (García-Mendoza, 2007).

En México, los agaves han tenido una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, materia prima para la elaboración de bebidas fermentadas y destiladas, sus tallos y hojas son utilizados como leña y material de construcción de viviendas, muchas especies son explotadas por la agricultura de ornato, sus hojas se aprovechan para la obtención de fibras y la elaboración de textiles, de igual manera, en años recientes los agaves han sido utilizados para la elaboración de bioplásticos y biocombustibles y la obtención de metabolitos secundarios utilizados en la industria farmacéutica (García-Mendoza, 2007).

Dentro de esta diversidad, se encuentra el *Agave angustifolia*, especie distribuida en la zona norte, centro y sur del país; se caracteriza por su roseta surculosa extendida en forma radial; con tallo de 20 a 90 cm de longitud; hojas maduras generalmente de 60 a 120 cm por 3.5 a 10 cm, lineares, rígidas, fibrosas, de color verde-pálido a gris, planas o cóncavas de arriba, convexas de abajo, angostas y gruesas hacia la base, margen ondulado, algunas veces cartilaginoso; dientes pequeños de 2 a 5 mm de longitud, de puntas débiles curvadas; panículas de 3 a 5 m de alto; brácteas triangulares y secas;

inflorescencias verdes a amarillas de 50 a 65 cm de longitud (García-Mendoza, 2007; Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

A. angustifolia presenta problemas de fecundación, determinada por el fenómeno de protandria. Asimismo, esta especie ha sido reportada con una floración única después de un largo ciclo vegetativo (de 8 a 12 años) y con una baja eficiencia en la producción de semillas y germinación de las mismas (Arzate-Fernández *et al.*, 2016). La propagación asexual se realiza en forma vegetativa a través de bulbos apomícticos que brotan en la inflorescencia y por rizomas-hijuelos que crecen en la base de la planta madre pero con bajos porcentajes de sobrevivencia al momento del trasplante a suelo (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

Las plantas de *A. angustifolia* constituyen la principal materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas, destacando el mezcal y el bacanora. Desafortunadamente, la falta de un sistema eficiente de propagación y repoblación limita el aprovechamiento racional de esta especie, y en el peor de los casos puede provocar una reducción peligrosa de sus poblaciones debido a la sobreexplotación de cultivares, principalmente los de origen silvestre (Domínguez *et al.*, 2008; Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

Por tanto, se requieren acciones que aseguren la permanencia del recurso y permitan la planeación de áreas para su aprovechamiento sustentable. El cultivo *in vitro* de tejidos ha sido considerado una alternativa exitosa para la clonación masiva de plántulas de *A. angustifolia*, en el que destaca la embriogénesis somática (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

2.2. Embriogénesis somática (ES)

En la naturaleza, la embriogénesis está restringida a la fusión de un gameto femenino con un gameto masculino, sin embargo cuando los embriones no proceden de la fusión

de gametos sino que se diferencian a partir de una célula o grupo de células somáticas, se denomina embriogénesis somática (ES). El fenómeno de embriogénesis asexual es posible encontrarlo en la naturaleza, sobre todo en angiospermas, como una forma de apomixis denominada embriogénesis adventicia. En 1902, Haberlandt sugirió que si todas las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial o cigoto, sería posible revertir su expresión génica, de manera que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico hasta formar auténticos embriones de origen somático, sentando así las bases de la totipotencia celular.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares independientes (no poseen conexión vascular con el tejido madre) que desarrollan raíces, ápice y sus órganos cotiledonares, por lo que son capaces de germinar en plántulas de la misma manera como sucede con los embriones cigóticos (Fehér *et al.*, 2003).

2.2.1. Bases fisiológicas de la embriogénesis somática

La ES presenta dos patrones básicos: embriogénesis directa, en que las células predeterminadas embriogénicamente ya están presentes y sólo requieren de las condiciones favorables para el inicio del desarrollo embriogénico; y embriogénesis indirecta, en la que se requiere la inducción de callo embriogénico (desdiferenciación celular), expresión y maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión de los embriones somáticos en plantas y su adaptación a condiciones *ex vitro* (Féher *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004).

2.2.1.1. Inducción de callo embriogénico

La inducción de la respuesta embriogénica supone que las células somáticas del explante inicial contienen toda la información genética necesaria para crear un organismo completo y funcional; el inicio de la embriogénesis somática se basa en la reprogramación de un patrón de expresión somático hacia un patrón de expresión

embriogénico (desdiferenciación) seguido de una elevada división celular llevando a la formación de una nueva estructura morfológica con crecimiento desorganizado (denominada callo) o bien en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión (Féher *et al.*, 2003).

Es probable que dicha regulación génica se deba a factores epigenéticos como la metilación del DNA y compactaciones o descompactaciones en la disposición de la cromatina. Según Von Arnold *et al.* (2002), en este cambio de la expresión génica intervienen muchos factores, algunos están relacionados con la composición del medio de cultivo y condiciones ambientales a los que está sometido, y otros están relacionados con el material vegetal de partida (explante inicial) y la planta donante (genotipo), dicho factores han tenido un papel importante dentro de la embriogénesis somática por su capacidad para inducir respuestas de crecimiento, diferenciación y en muy diversos fenómenos del desarrollo de las plantas (Féher *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2009), siendo los más importantes:

- ***Explante.*** Se ha demostrado que la capacidad para inducir la desdiferenciación celular disminuye con la edad ontogénica del explante, siendo los tejidos más próximos a las zonas donde ocurre el rejuvenecimiento provocado por el proceso de meiosis, los más aptos para la iniciación de la embriogénesis somática: polen, óvulos, filamentos, embriones cigóticos, tejidos asociados como nucela o tegumentos, megagametofitos o zonas de plántulas muy jóvenes.
- ***Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).*** Son los principales responsables de la regulación de los diferentes cambios de desarrollo producidos en la inducción de la ES, se ha evidenciado que la presencia de reguladores tipo auxina y citocinina es fundamental para la adquisición del potencial embriogénico en células somáticas (Von Arnold *et al.*, 2002).

En este sentido, se ha comprobado que la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) promueve la hipermetilación del DNA e interactúa con la biosíntesis endógena de ácido abscísico (ABA) e incrementa la producción

de etileno (consideradas como las hormonas del estrés) (Féher *et al.*, 2003); también se ha inducido embriogénesis somática en medios suplementados con ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB).

Combinadas con las auxinas, también se han utilizado las citocininas, que inhiben el efecto del control que ejerce el eje embrionario sobre el crecimiento coordinado de las células que constituyen el embrión, produciéndose un cambio en las divisiones celulares hacia divisiones periclinales, en oposición a las anticlinales, lo que daría lugar a la formación de embriones somáticos (Maheswaran y Williams, 1985). Las citocininas más utilizadas en la inducción de ES son la benciladenina (BA), la kinetina, la zeatina y la isopentil-adenina (iP); de las cuales, la BA es la más efectiva, aunque también se han usado derivados de la urea con actividad citocinina, como la N-(-2-cloro-4-piridil)-N-fenilurea (CPPU) o el tidiazuron (TDZ) (Park *et al.*, 2006).

- **Glúcidos.** Se añaden al medio de cultivo como fuente principal para la obtención energética de las células, siendo la sacarosa el disacárido más común, debido a que actúa como un agente osmótico que puede desencadenar un estrés endógeno a las células somáticas dirigiéndolas a la vía embriogénica (Von Arnold *et al.*, 2002).
- **Fuente de nitrógeno orgánico.** En el medio de cultivo juega un papel crucial en la inducción de la ES, se ha reportado que la L-glutamina y la Caseína hidrolizada contribuyen al aumento de la reserva de nucleótidos requerida para la rápida proliferación celular y el crecimiento del tejido embriogénico (Klimaszewska *et al.*, 2007).
- **Vitaminas.** Son compuestos nitrogenados que actúan como cofactores enzimáticos en diversos procesos metabólicos, por ejemplo, el inositol es utilizado por las plantas como un suplemento de la sacarosa llevando a cabo un aporte energético considerable durante la etapa de reprogramación celular; de

igual manera, se ha evidenciado que la piridoxina (vitamina B6) participa en reacciones de transaminación y descarboxilación de aminoácidos (biosíntesis proteica) y la tiamina (vitamina B1) participa en reacciones de descarboxilación oxidativa, interviene en el metabolismo de carbohidratos y es esencial en el ciclo de Krebs para la producción de energía y la asimilación de nitrógeno (Murray, 2010).

2.2.1.2. Expresión y maduración de embriones somáticos

En la etapa de proliferación o expresión de embriones somáticos, la formación continua de estructuras pre-embriónicas mediante el proceso de poliembriónía de partición permite la multiplicación indefinida del material embriónico, permitiendo así la aplicación de esta biotecnología para la propagación masiva y la transformación genética de las especies vegetales.

Una vez iniciada la respuesta embriónica, los callos embriónicos se transfieren a medio de cultivo fresco para su proliferación, este medio puede tener la misma composición que el medio de inducción o variar su composición, reduciéndose a menudo la concentración de auxinas y citocininas.

Una vez definida la polaridad del embrión somático, se inicia su desarrollo hasta el estado cotiledonar. Durante la maduración, los embriones somáticos experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, entre los que se desatacan la expansión de sus células, la acumulación de sustancias de reserva, el equilibrio hormonal y la adquisición de la tolerancia a la desecación. En esta etapa juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesario la suplementación con nitratos, amonio, aminoácidos y caseína hidrolizada. Las bajas concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo junto con los carbohidratos (como la sacarosa en concentraciones de 3-6%) son esenciales, pues permiten una maduración total y evitan la germinación precoz del embrión (Von Arnold *et al.*, 2002).

2.2.1.3. Germinación y conversión de embriones somáticos a plantas.

La germinación del embrión somático conlleva el desarrollo coordinado del tallo y la raíz, mientras que la conversión se refiere a la supervivencia de las plántulas germinadas en condiciones *ex vitro*. La embriogénesis somática es un proceso complejo, de manera que la calidad, supervivencia y crecimiento posterior de las plantas somáticas dependerá en gran medida de las condiciones utilizadas en las etapas anteriores; aquellos embriones que presenten una morfología normal y que hayan acumulado suficientes sustancias de reserva, podrán desarrollarse en plantas normales, elongando de manera coordinada el tallo y la raíz (Von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003).

La germinación de los embriones somáticos se lleva a cabo en medio de cultivo sólido, con sacarosa, sin RCV, y pueden o no contener una fuente de nitrógeno orgánico y carbón activo. Si la maduración de los embriones somáticos se ha realizado en medios con alta concentración de gelificante, el medio de germinación debería contener concentraciones algo más bajas, para prevenir la hiperhidricidad en las plantas regeneradas. Respecto a las plantas obtenidas de embriones somáticos, se ha observado que inicialmente son menos robustas que las obtenidas de embriones cigóticos pero una vez transferidas a condiciones *ex vitro* presentan un desarrollo vegetativo normal (Hernández *et al.*, 2011).

Al igual que la fase de inducción de callo embriogénico, las fases de expresión, maduración y germinación también se encuentran bajo cierto control genético; se ha demostrado que la expresión genética disminuye según se avanza en el proceso, limitando así la posibilidad de realizar procesos de mejoramiento genético durante estas etapas (maduración o germinación) que en la fase de inducción (Park *et al.*, 1994,1998).

2.2.1.4. Adaptación de plantas a condiciones *ex vitro*

Una vez que los embriones somáticos se convierten en plantas, son transferidos al mismo sustrato que se usa para las plántulas y crecen bajo condiciones controladas en un invernadero o en un vivero. Normalmente durante los 7 o 10 primeros días se mantiene una alta humedad relativa, que se reduce gradualmente durante un período de unos pocos días hasta alcanzar condiciones ambientales. La fertilización y los tratamientos de pesticidas son los mismos que los utilizados para plántulas, exceptuando aquellas que se fertilizan inmediatamente después del trasplante (Klimaszewska *et al.*, 2007).

2.2.2. Bases moleculares de la embriogénesis somática

Durante la embriogénesis somática, los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en los tejidos inducidos están estrechamente relacionados con alteraciones en la reprogramación de la expresión génica, la desdiferenciación y el desarrollo celular están controlados por la activación espacio-temporal y/o el silenciamiento de genes específicos. En este sentido, la identificación y caracterización de los genes involucrados en la ES ofrecen la posibilidad de determinar el potencial embriogénico de las células somáticas en etapas tempranas de desarrollo y proporcionar información sobre la regulación molecular de este proceso.

De acuerdo con Becraft (2002), la familia de quinasas *Receptor-Like Kinases* (RLKs) con Repeticiones Ricas en Leucina (LRR) tienen funciones importantes durante la vía de señalización celular en el desarrollo de la planta, reciben señales externas y/o información de células vecinas y desencadenan respuestas específicas, entre las que destacan: proveen resistencia a enfermedades, permiten la diferenciación de tejido vascular, participan en la formación del patrón embrionario, controlan la muerte celular y en algunas especies, son las responsables de la auto-incompatibilidad.

El papel de las RLKs en la inducción de la embriogénesis somática se encuentra en los *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK)* (Sharma *et al.* 2008; Singla *et al.* 2008).

Los genes SERK fueron aislados por primera vez en células embriogénicas de zanahoria, estos genes se sobreexpresan en presencia de factores específicos en el medio de cultivo como el 2,4-D, debido a que este RCV promueve la hipermetilación del DNA y desencadena la biosíntesis de ABA que resulta en el aumento del nivel de AIA endógeno, este aumento es un paso clave en la adquisición de la competencia totipotente para el desarrollo embrionario. Lo anterior, se ha demostrado en *Daucus carota* y *Arabidopsis thaliana*, donde el gen SERK sólo se expresa en estructuras embriogénicas expuestas al 2,4-D y se silencia en los cultivos no embriogénicos (es decir, en callos no expuestos a dicho RCV) (Schmidt *et al.*, 1997, Hecht *et al.*, 2001, Salaj *et al.*, 2008).

Estos resultados permiten al gen SERK posicionarse como un marcador molecular para la embriogénesis somática (Schmidt *et al.* 1997; Somleva *et al.* 2000) debido a que dichos genes han sido asociados con el potencial embriogénico en diferentes especies incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), *Zea mays* (Baudino *et al.* 2001), *Cyrtochilum loxense* (Cueva *et al.*, 2012) y *Cattleya máxima*.

2.3. Embriogénesis somática en especies del género *Agave*

A pesar de todo lo anterior, son pocos los antecedentes que se tienen acerca de la aplicación de técnicas biotecnológicas al género *Agave*, la mayoría de los trabajos en esta área se refieren a la regeneración *in vitro* a través de la obtención de brotes a partir de meristemos localizados en el segmento basal de las plantas, o bien a través de organogénesis; sin embargo, en el Cuadro 1 se describen los trabajos realizados sobre embriogénesis somática en diferentes especies del género *Agave*:

Cuadro 1. Embriogénesis somática en especies del género *Agave*

Especie	Resultados	Fuente
<i>A. victoria-reginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hoja en un medio MS con vitaminas L2, 40 g L ⁻¹ sacarosa, 0.2 mg L ⁻¹ ANA durante 84 días; 5.0 ± 0.00 embriones somáticos por explante.	Rodríguez-Garay <i>et al.</i> , (1996).
<i>A. victoria-reginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática indirecta en un medio MS con 2,4-D (2.26 µM) para la inducción de callo.	Martínez-Palacios <i>et al.</i> , (2003)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración por embriogénesis somática indirecta a partir de tallos en un medio MS, 60 g L ⁻¹ sacarosa, 0.2 mg L ⁻¹ 2,4-D y 1 mg L ⁻¹ BA durante 60 días; 9.5 ± 0.68 embriones somáticos por explante.	Nikam <i>et al.</i> (2003).
<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática indirecta en tejidos meristemáticos en un medio MS, 60 g L ⁻¹ sacarosa, 0.2 mg L ⁻¹ ANA y 1.5 mg L ⁻¹ KN durante 60 días.	Portillo <i>et al.</i> , (2007).
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática indirecta en un medio MS, 60 g L ⁻¹ sacarosa, 0.2 mg L ⁻¹ ANA y 1.5 mg L ⁻¹ KN durante 60 días; 46.0 ± 0.80 embriones somáticos por explante.	Tejavathi <i>et al.</i> , (2007).
<i>A. angustifolia</i>	Regeneración por embriogénesis somática indirecta en un medio MS, 3 mg L ⁻¹ 2,4-D, 1 mg L ⁻¹ BA durante 60 días; 9.1 ± 1.42 embriones somáticos por explante.	Arzate-Fernández y Mejia-Franco (2011).

MS: Medio Murashige-Skoog; RCV: Reguladores del Crecimiento Vegetal; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BA: Benciladenina; KN: Kinetina; ANA: Ácido naftalenacético.

III. JUSTIFICACIÓN

La estrecha relación establecida entre los mexicanos y las especies de agave permanece hasta el día de hoy, los agaves satisfacen varias de las necesidades fundamentales de la población e incluso llegan a ser el soporte de importantes actividades económicas generadoras de riqueza como lo son la industria tequilera, mezcalera, medicinal, obtención de miel y de fibras naturales.

A pesar de lo anterior, se han hecho relativamente pocos esfuerzos por estudiarlos, mejorarlos y conservarlos al grado de que muchas de estas especies se encuentran en riesgo de extinción. La NOM-059-ECOL-2001 reconoce la existencia de 18 especies dentro del género cuya supervivencia se ve severamente amenazada en estos momentos. Esta situación se debe, principalmente, a la sobreexplotación de poblaciones silvestres, el saqueo ilegal de plantas jóvenes para ser usadas como ornamentales y la destrucción de su hábitat. Por otro lado, el crecimiento muy lento de estas plantas, así como sus bajas tasas de reproducción asexual y reproducción sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, son factores que hacen a los agaves difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales. Estos mismos factores limitan las posibilidades de mejoramiento de las especies cultivadas. Una alternativa prometedora para la resolución de estos problemas es la aplicación en estas especies de las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la Biotecnología Vegetal.

En estos momentos, la técnica más usada en este campo, es la llamada embriogénesis somática *in vitro*, misma que consiste en la obtención de embriones a partir de células no sexuales. Entre las ventajas que ofrece esta técnica destacan: 1) es un sistema de propagación clonal, es decir, que se mantienen todas las características genotípicas del material inicial seleccionado; 2) el número de plantas que se puede obtener mediante esta técnica es por su naturaleza prácticamente ilimitado, 3) las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos, nemátodos fitopatógenos e incluso de virus y viroides; 4) permite incrementar la eficacia y eficiencia del proceso de clonación *in vitro* (reducción de tiempo y costos, preselección de material vegetal, desarrollo de programas

de mejoramiento genético, entre otros) generando clones de alta calidad genética que permitan la reproducción de la especie; 5) este proceso sienta las bases para el mejoramiento genético de la especie a través de la transgénesis y 6) permite ofrecer material vegetativo suficiente a las empresas y/o productores de mezcal interesados logrando un manejo sostenible de estos recursos naturales.

Por lo anterior, en esta investigación se desarrolló un protocolo eficiente de clonación masiva vía embriogénesis somática de *Agave angustifolia*, especie utilizada principalmente como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas.

IV. HIPÓTESIS

Es posible aumentar la eficiencia de la clonación de *Agave angustifolia* vía embriogénesis somática al determinar las bases fisiológicas y moleculares que regulan dicho proceso biotecnológico.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar las bases fisiológicas y moleculares que regulan el proceso de clonación vía embriogénesis somática (ES) en *Agave angustifolia*.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto fisiológico de los factores nutricionales y químicos (sacarosa, reguladores de crecimiento vegetal, fuentes de nitrógeno orgánico y complejos vitamínicos) en el medio de cultivo sobre la respuesta embriogénica de *A. angustifolia*.
- Caracterizar molecularmente los genes *SERK* expresados durante la fase de inducción de callo embriogénico en *A. angustifolia*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México; ubicado en el Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, México.

6.2. Determinación de las bases fisiológicas de la ES de *A. angustifolia*

Material vegetal. Como explante inicial se utilizaron ejes embrionarios cigóticos maduros de *A. angustifolia* obtenidos a partir de semillas silvestres colectadas en el municipio de Zumpahuacán, Estado de México.

Inducción de callo embriogénico. Los explantes se establecieron en un medio de cultivo para la inducción de callo (MI) (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

Para determinar las bases fisiológicas de la ES, en esta etapa se realizaron los siguientes experimentos:

- a) Se evaluó el efecto de la sacarosa (60, 80 y 100 g L⁻¹), reguladores de crecimiento vegetal (RCV o PGR) (13.59 µM/3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4.44 µM/1 mg L⁻¹ de BA con o sin ABA y solamente 11.34 µM/3 mg L⁻¹ de ABA) (Sigma-Aldrich), suplementado o no con 500 mg L⁻¹ de L-glutamina o caseína hidrolizada (como fuentes de nitrógeno) (Sigma-Aldrich), con o sin el complejo vitamínico MS (Murashige y Skoog, 1992) o el complejo vitamínico L2 (Phillips y Collins, 1979). En total se evaluaron 81 tratamientos.
- b) Se evaluó el efecto de la sacarosa (40, 50, 60, 70 y 80 g L⁻¹) y su interacción con fuentes de nitrógeno orgánico (250 mg L⁻¹ de L-glutamine y 250 mg L⁻¹ de

caseína hidrolizada) (Sigma-Aldrich). En esta etapa, se evaluaron 10 tratamientos.

- c) En una primera fase, se evaluó el efecto de los componentes del complejo vitamínico L2: inositol, vitamina B6 (piridoxina) y vitamina B1 (tiamina) (Phillips y Collins, 1979) (Sigma-Aldrich), en total se ensayaron ocho tratamientos. Asimismo, en una segunda fase, se evaluó el efecto de seis concentraciones de tiamina (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mg L⁻¹) sobre la obtención de callo embriogénico y la inducción de embriones somáticos de *A. angustifolia*; en esta fase se evaluaron seis tratamientos.

En todos los experimentos, se utilizó un diseño completamente al azar y cada tratamiento tuvo de 12 a 20 repeticiones, cada repetición (caja Petri) contó con 10 a 20 ejes embrionarios cigóticos, considerando a cada eje embrionario como una unidad experimental. Todos los tratamientos se mantuvieron durante 60 días en oscuridad a 25 ± 2°C.

Expresión y maduración de embriones somáticos. Los callos obtenidos en la etapa anterior, se transfirieron al medio de expresión (ME) de embriones somáticos durante 60 días hasta su maduración en estado cotiledonar, es decir 120 días después de iniciado el cultivo (ddic). El ME consistió en las sales MS (Murashige y Skoog, 1972), reducidas al 50% de su concentración original, suplementado con 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 30 g L⁻¹ de sacarosa.

Germinación y conversión de embriones somáticos a plantas. La germinación de los embriones somáticos maduros se realizó en un medio de germinación (MG) compuesto por las sales MS sin reguladores del crecimiento vegetal; las plántulas obtenidas se transfirieron a macetas que contenían un sustrato compuesto por agrolita, composta y arena (1:1:1), para finalmente trasladarse a condiciones de invernadero para su adaptación.

Variables evaluadas. En todos los experimentos se evaluó el porcentaje de obtención de callo a los 60 ddic y el número de embriones somáticos inducidos por callo a los 120 ddic (sólo se consideraron embriones en estado cotiledonar).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos sobre el porcentaje de obtención de callo y el número de embriones somáticos inducidos por callo se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software *Stathgraphics* versión 5.0 y, en donde hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey o Duncan con un nivel de significancia del 95%.

6.3. Determinación de las bases moleculares de la ES de *A. angustifolia*

Material vegetal. Se utilizaron callos embriogénicos de *A. angustifolia* obtenidos a partir de embriones cigóticos maduros expuestos durante 60 días a un medio de inducción (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011): sales MS al 25% (Murashige y Skoog, 1992), sacarosa (60 g l⁻¹), reguladores de crecimiento vegetal (3 mg l⁻¹ de 2,4-D; 1 mg l⁻¹ de BA) y vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979).

Extracción de DNA. La extracción de DNA se realizó de callos embriogénicos utilizando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990). El DNA extraído fue cuantificado usando un biofotómetro (Eppendorf), sólo las muestras con altos niveles de pureza [entre 1.9-2.1 (A260/A280 nm) y superiores a 2.0 (A260/A230 nm)] fueron utilizadas. La integridad del DNA se comprobó mediante un análisis electroforético en un gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich) al 0.8%.

Identificación de genes *SERK* sobreexpresados en el proceso de ES. Para identificar los posibles genes *SERK* para *A. angustifolia*, se diseñaron cebadores de tipo degenerado a partir de regiones conservadas de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Daucus carota*, *Arabidopsis thaliana* y *Cyrtocilum loxense* almacenadas en la base de datos del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). El diseño de los cebadores se llevó a cabo con el programa Primer 3 Input versión 4.0 y fueron sintetizados por Sigma-Aldrich teniendo las siguientes secuencias: forward 5'NTGGTGAGGTGGCGGAGG3' y reverse 5'TGTHACRTGGGTRTNCTTCTARTCCAT3'. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo con dichos cebadores; las reacciones de amplificación

se ajustaron a un volumen final de 10 µl que contenían: 10 ng de DNA genómico, 5 mM de dNTPs, 15 mM de MgCl₂, 1 µM de polimerasa (My Taq DNA Polymerase) y 0,4 µM de cada cebador. Los parámetros térmicos de amplificación para la reacción de PCR fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguidos de 35 ciclos de alineación (95°C durante 30 s, 47.5°C durante 30 s, 72°C durante 2 min) y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Multigene Optimax (Labnet).

Secuenciación y análisis filogenético. Los productos amplificados fueron reobtenidos mediante electroforesis en un gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich) al 2%, asimismo fueron purificados mediante el kit Gene Elute PCR Clean-Up (Sigma) y secuenciados (en ambas direcciones) en el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las secuencias obtenidas se alinearon con el BLASTn y BLASTx para comparar nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Para identificar los dominios conservados del gen *AaSERK* se realizó un multialineamiento con las secuencias que mostraban la homología de nucleótidos y aminoácidos más significativas (porcentaje de identidad superior al 80%). Finalmente, para analizar la relación entre la proteína *AaSERK* y otras secuencias *SERK*, se construyó un árbol filogenético utilizando el método UPGMA proporcionado por el programa Mega (versión 6.06).

VII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación se presentaron en los siguientes congresos:

2016:

- Ponencia “**Embriogénesis somática en *Agave angustifolia*: Una alternativa para la industria del mezcal y los bioenergéticos**”. Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis, Vázquez-García Luis-Miguel. Primer Foro Internacional de Talento Mexicano INNOVATION MATCH MX. Senado de la Republica y Secretaría de Economía. Guadalajara, México. 6 al 8 de abril.

2015:

- Ponencia “**Influencia de las vitaminas en la inducción de embriones somáticos de *Agave angustifolia***”. Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis, Vázquez-García Luis-Miguel. Segundo Congreso Nacional de Recursos Fitogénéticos y Primer Congreso Internacional de Conservación y Aprovechamiento Sustentable de la Agrobiodiversidad. Universidad Autónoma Chapingo y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Texcoco, México. 25 al 27 noviembre.
- Cartel “**Efecto de la sacarosa y su interacción con nitrógeno orgánico en la embriogénesis somática de agave mezcalero (*Agave angustifolia*)**”. Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis, Vázquez-García Luis-Miguel. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, México. 21 al 26 de junio.

- Cartel “**Development of Agave as an integrated bio-factory for biofuel, bioenergy and high profit bioproducts**”. J. I. Reyes-Díaz, C. González-Villarreal, I. S. Curtis, R. McQualter, J. Huy, A. Van Amerongen, R. M. Nava-Becerril, J. L. Piña-Escutia, A. M. Arzate-Fernández, S. M. Brumbley. 2015 *In vitro* Biology Meeting. Society for *In Vitro* Biology (SIVB), Arizona, Estados Unidos. 30 de mayo al 3 de junio.

2014:


- Ponencia “**Somatic embryogenesis: An alternative for propagating agave**”. Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis. 3er Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas. Universidad Autónoma Chapingo, Colegio de Postgraduados, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Politécnico Nacional, Universidad Autónoma del Estado de México e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Texcoco, México. 6 y 7 de noviembre.
- Ponencia “**Nutritional and chemical factors affecting *Agave angustifolia* Haw somatic embryogenesis**”. Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis, Vázquez-García Luis-Miguel. XXV Congreso Nacional y V Internacional de Fitogenética. Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Sociedad Mexicana de Fitogenética, San Luis Potosí, México. 29 de septiembre al 3 de octubre.

7.1. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw.

Artículo publicado

- **Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw.** 2017. Reyes-Díaz Jesús I., Arzate-Fernández Amaury M., Piña-Escutia José L., Vázquez-García Luis M. *Industrial Crops and Products* 108: 81-85. (<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>).

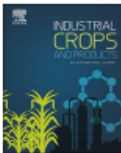
Industrial Crops & Products 108 (2017) 81–85




Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw

 CrossMark

Jesús I. Reyes-Díaz^a, Amaury M. Arzate-Fernández^{a,*}, José L. Piña-Escutia^a,
Luis M. Vázquez-García^b

^a 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" 50200, Toluca, Estado de México, Mexico

^b Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Ex hacienda de Santa Ana 52400,
Tenancingo, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Agave
Embryogenic callus
Plant regeneration
Somatic embryos
Tissue culture

ABSTRACT

A complete protocol of somatic embryogenesis involves induction of embryogenic callus, embryo development, embryo maturation, and their conversion or germination to form complete plants; in this sense judicious selection of nutrient medium, growth regulators, and physical culture environment is required. In this work, culture medium factors that influence somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* were investigated. In an induction medium (IM) we evaluated the effect of three sucrose concentrations, three plant growth regulator (PGR) combinations, two groups of vitamins and two sources of amino acids. We observed that somatic embryos (SE) in medium containing 6% sucrose concentration grew vigorously, while those induced in medium with 8% sucrose were abnormally shaped and did not develop fully. In contrast, a higher sucrose concentration (10%) inhibited development of explants. Embryogenic callus cultured in IM containing 13.59 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4.44 μM 6-benzyladenine (BA) only produced SE, while those explants assayed in IM with 11.34 μM abscisic acid (ABA) did not improve embryogenesis response. Phillips-Collins (L2) vitamins induced a higher number of SE (34 ± 0.4) than Murashige-Skoog (MS) vitamins (1.7 ± 0.7). High levels of amino acids (500 mg l^{-1} L-glutamine or casein hydrolysate) were not effective in promoting embryogenesis. Conversion frequency to plantlets ranged from 95 to 100% with 100% survival under *ex vitro* conditions.

MEDIA CULTURE FACTORS AFFECTING SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Agave angustifolia* HAW.

Jesús I. Reyes-Díaz^{a1}, Amaury M. Arzate-Fernández^{a2*},
José L. Piña-Escutia^{a3}, Luis M. Vázquez-García^b

^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 11.5, Campus Universitario "El Cerrillo" 50200, Toluca, Estado de México, México. Tel. and Fax + 52 1 722 2965518.

Email: ¹jird.rd@gmail.com, ^{2*}Corresponding author: amaury1963@yahoo.com.mx, ³jlpinae@uaemex.mx

^b Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Tenancingo, Estado de México, México. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5, Ex hacienda de Santa Ana 52400, Tenancingo, Estado de México, México. Tel. and Fax + 52 1 714 1407724.

Email: lmvazquezg@uaemex.mx

Abstract

A complete protocol of somatic embryogenesis involves induction of embryogenic callus, embryo development, embryo maturation, and their conversion or germination to form complete plants; in this sense judicious selection of nutrient medium, growth regulators, and physical culture environment is required. In this work, culture medium factors that influence somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* were investigated. In an induction medium (IM) we evaluated the effect of three sucrose concentrations, three plant growth regulator (PGR) combinations, two groups of vitamins and two sources of amino acids. We observed that somatic embryos (SE) in medium containing 6% sucrose concentration grew vigorously, while those induced in medium with 8% sucrose were abnormally shaped and did not develop fully. In contrast, a higher sucrose concentration (10%) inhibited development of explants. Embryogenic callus cultured in IM containing 13.59 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4.44 μM 6-benzyladenine (BA) only produced SE, while those explants assayed in IM with 11.34 μM abscisic acid (ABA) did not improve embryogenesis response. Phillips-Collins (L2) vitamins induced a higher number of SE (34 ± 0.4) than Murashige-Skoog (MS) vitamins (1.7 ± 0.7). High levels of amino acids (500 mg l^{-1} L-glutamine or casein hydrolysate) were not

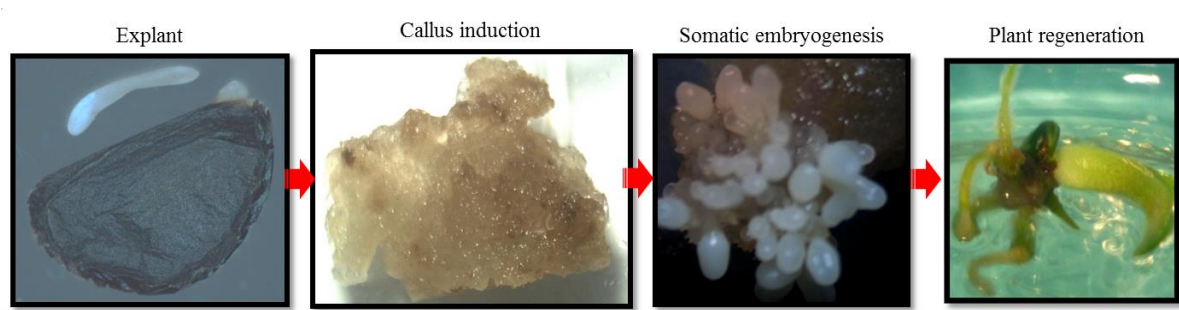
effective in promoting embryogenesis. Conversion frequency to plantlets ranged from 95-100% with 100% survival under *ex vitro* conditions.

Keywords: *Agave*, embryogenic callus; plant regeneration; somatic embryos; tissue culture.

Abbreviations: 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; BA, 6-benzyladenine; ABA, abscisic acid; MS, Murashige–Skoog; PGR, plant growth regulator.

Graphical abstract

Somatic embryogenesis in *Agave angustifolia*



Highlights:

- *Agave angustifolia* somatic embryogenesis is influenced for medium components like sucrose, vitamins, amino acids and plant growth regulators.
- Cultured embryogenic callus in medium containing 13.59 μM 2,4-D and 4.44 μM BA produced somatic embryos.
- Used L2 vitamins induced a higher number of somatic embryos than MS vitamins.
- Added amino acids were not effective in promoting embryogenesis.
- Conversion frequency to plantlets ranged from 95-100% with 100% survival under *ex vitro* conditions.

1. Introduction

The *Agave* species have a great industrial potential for the production of food, cellulose, fibres, sugars, pharmaceutical compounds, syrups, sapogenins, and ornamental plants (Portillo et al. 2007), as an energy crop to produce biofuel and as raw material to produce alcoholic beverages such as tequila or mescal. This economic value results in a tremendous national and international demand of the *Agave* species, making the genus an important target for *in vitro* mass propagation and genetic improvement.

For the genus *Agave*, somatic embryogenesis protocols have been reported for *A. victoria-reginae*, *A. sisalana*, *A. tequilana*, *A. Veracruz* and *A. angustifolia* (Rodríguez-Garay et al. 1996; Martínez-Palacios et al. 2003; Nikam et al. 2003; Portillo et al. 2007; Tejavathi et al. 2007; Arzate-Fernández and Mejía-Franco 2011). *A. angustifolia* is one of most important raw materials for production of high quality mescal.

Somatic embryogenesis forms the basis of cellular totipotency in higher plants. Under *in vitro* conditions, one or a few somatic cells of the explant should be competent to receive a signal (endogenous or exogenous) for the developmental restructuring towards the embryogenic pathway. It triggers the pathway of embryogenic development (commitment) leading to somatic embryo formation. In this fate, plant cells attempt to establish a new programme through changes in pH gradients of all cell compartments, arresting differentiated functions, reactivating the cell cycle and re-organising gene expression as well as metabolism (Feher et al. 2003). However, for a particular genotype, the *in vitro* forms of somatic embryogenesis, the optimum conditions (potential, competence, induction, and commitment) have to be experimentally optimised (Feher et al. 2003). Thus, the establishment of improved micropropagation procedures by testing media culture factors is desirable and could help to increase the efficiency of protocols. In this work, we present data on the influence of some culture medium components (highlighting carbon concentration, plant growth regulators and nitrogenous substances) on growth and development of embryogenic callus to optimize *in vitro* regeneration potential in *A. angustifolia*. The results showed that these factors affected induction frequency of embryogenic calluses, size of embryogenic calluses then differentiation potential of calluses for somatic embryo formation.

2. Materials and methods

2.1 Explant source and surface sterilization

The experimental materials were *Agave angustifolia* Haw seeds, collected from wild plants in Zumpahuacan, State of Mexico. The seeds were washed in running water with detergent for 10 min, surface-sterilized in 96% ethanol for 1 min, followed by immersion in 5% calcium hypochlorite solution (CaClO) for 15 min, and rinsing three times with sterile distilled water (SDW). Later, they were soaked in SDW for 96 h. Under laminar flow bench, aseptic mature zygotic embryos (Fig. 1A) were dissected from seeds and used as initial explants for callus induction.

2.2 Callus induction

Initial explants were placed in callus induction medium (IM) consisting in quarter-strength MS salt basal medium (Murashige and Skoog 1992). In this IM, the following external factors were assessed: sucrose (60, 80 and 100 g l⁻¹), plant growth regulators (PGR) (13.59 µM 2, 4-D and 4.44 µM BA with or without ABA and only 11.34 µM ABA), supplemented or not with 500 mg l⁻¹ L-glutamine or casein hydrolysate (as amino acids source), with or without MS (Murashige and Skoog 1992) or L2 (Phillips and Collins 1979) vitamins. These factors were added to evaluate their influences on embryogenic callus induction (Table 1). Thus, 81 treatments were assayed. The pH of the medium was adjusted to 5.6–5.8 before adding the gelling agent (8 g l⁻¹ agar) and autoclaving at 121°C for 20 min. Petri dishes (9 x 1.5 cm) were filled with 25 ml of medium and sealed with Allupack®.

Each treatment consisted of 12 replicates each with ten explants. The cultures were maintained in darkness at 25 ± 2°C for 60 days. In this stage, the percentage of callus induction and callus weight were scored.

2.3 Somatic embryogenesis and plant regeneration

Sixty days after culture initiation (DACI), the creamy-white and friable calluses of those that responded to the treatments were transferred to embryo expression medium (EM): half-strength MS salts, 0.5 µM 2, 4-D, 30 g l⁻¹ of sucrose, and gelled with 3 g l⁻¹ gelrite. The medium was adjusted to pH as in the IM medium. The calluses were

incubated under the same environmental conditions as in the preceding step for 60 days more. In this stage, the type of callus (embryogenic or not) and number of somatic embryos (SE) were scored.

For plant regeneration, all developed SE were transferred to flasks with germination medium (GM) (Arzate-Fernández and Mejía-Franco, 2011). All cultures were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 16-h photoperiod under fluorescent light ($16 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$).

2.4 Hardening

In order to improve plant development and to enhance root proliferation, regenerated plantlets (4-5 cm in length) from SE were removed from culture flasks, and after washing their roots under running water, they were transferred to pots containing a mixture of compost, perlite and soil (1:1:1). They were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 16-h photoperiod under fluorescent light ($16 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) for 20 days and watered using a spray gun at 3-day intervals. Afterward, all regenerated plantlets were transferred to greenhouse conditions.

2.5 Statistical analysis

To evaluate the effect of each treatment, an analysis of variance (F test) and Duncan's multiple range test ($P < 0.05$) were performed using the data on percentage and weight of induced calluses (60 DACI) and number of somatic embryos (120 DACI).

3. Results and discussion

3.1 Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration

Once the zygotic embryo swelled, early callus induction was observed at the apical end of the explant, especially 5 DACI (Fig. 1B). A creamy-white, friable callus (Fig. 1C) was observed on medium supplemented with 60 or 80 g l⁻¹ of sucrose or with MS or L2 vitamins. In contrast, in the medium containing 100 g l⁻¹ sucrose a creamy-brown callus that had stopped growing was observed. Maximum weight of callus ($1.7 \pm$

0.3 g) was observed 60 DACI on the medium supplemented with 80 g l⁻¹ of sucrose (Table 1).

Induced calluses on medium containing 2,4-D (13.59 µM) and BA (4.44 µM) plus sucrose 60 g l⁻¹ with L2 or MS vitamins or 80 g l⁻¹ with L2 vitamins responded to somatic embryogenesis 60 DACI, and after 20 days on expression medium, they produced globular masses at the surface (Fig. 1D), the somatic embryos at the globular stage were characteristically creamy-yellow in colour, this morphological characteristic coincides with that reported by Tejavathi et al. (2007) and Arzate-Fernández and Mejía-Franco (2011) in *A. vera-cruz* and *A. angustifolia*, respectively. After 50 - 60 days (110-120 DACI) of incubation on embryo EM, the embryogenic calluses developed clusters of mature somatic embryos (Fig. 1E). However, the globular structures obtained in the induction medium with MS vitamins did not differentiate into mature somatic embryos.

Somatic embryos started to germinate when cultured on plant growth regulator-free half-strength MS medium and developed into well-rooted plantlets 140 DACI (Fig. 1F). Even though the induced calluses in medium with 80 g l⁻¹ of sucrose were embryogenic, those hyper-hydric somatic embryos that developed from them did not develop into plantlets.

Overall, the most effective medium for induction of embryogenic callus and regeneration of *A. angustifolia* plantlets contained quarter-strength MS salts and L2 vitamins with 13.59 µM 2,4-D and 4.44 µM BA plus 60 g l⁻¹ of sucrose (Table 1). The conversion frequency of somatic embryos to plantlets varied from 95 -100%.

3.2 Effect of evaluated factors

3.2.1 Sucrose

It is well known that carbohydrates control several developmental processes in the cells. Sucrose is the most commonly used carbohydrate in plant tissues culture because it has multiple roles, including provision of carbon and energy, causing an osmotic effect (Hazarika 2003). In our study, the effect of sucrose concentrations significantly affected maturation and subsequent germination and conversion of *A. angustifolia* somatic embryos; similar results were reported by Arzate-Fernández and Mejía-Franco (2011).

Table 1. Factors evaluated and their effect on somatic embryogenesis of induced *Agave angustifolia* Haw calluses.

Sucrose (g l ⁻¹)	Factors			Callus induction (%) ⁻	Callus weight of (g) ⁻	Callus type	Somatic embryos per explant ⁻					
	Plant growth regulators		Source of amino acids (500 mg l ⁻¹)									
	(PGR) (µM)	Vitamins										
	2,4-D	BA	ABA									
60 (T ₀)	13.59	4.44	0	L2	None	30.6 = 4.0	a	1.2 = 0.5	b	E	34 = 0.4	a
80	13.59	4.44	0	L2	None	28.0 = 4.2	a	1.7 = 0.3	a	E	17 = 0.4	b
100	13.59	4.44	0	L2	None	18.0 = 3.0	b	1.0 = 0.7	b	NE	0	0
60	13.59	4.44	11.34	L2	None	0	0	0	0	-	-	-
60	0	0	11.34	L2	None	7.2 = 1.5	d	0.8 = 0.2	bc	NE	0	0
60	13.59	4.44	0	L2	L- glutamine	14.6 = 3.0	bc	0.8 = 0.4	bc	NE	0	0
60	13.59	4.44	0	L2	Casein hydrolysate	10.6 = 2.3	cd	0.7 = 0.5	c	NE	0	0
60	13.59	4.44	0	MS	None	18.6 = 3.2	b	1.0 = 0.2	b	E	1.7 = 0.7	0
60	13.59	4.44	0	None	None	15.3 = 2.3	b	0.9 = 0.6	b	NE	0	0

The medium consisted of quarter-strength MS salts and 8 g l⁻¹ of agar. Mean = standard error. Embryogenic callus (E). Non-embryogenic callus (NE). Means in a column with same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test at P < 0.05. +60 days of cultures; -+ 120 days of culture. Data is from 1,2 replicates of 10 explants per replicate. T₀: control treatment.

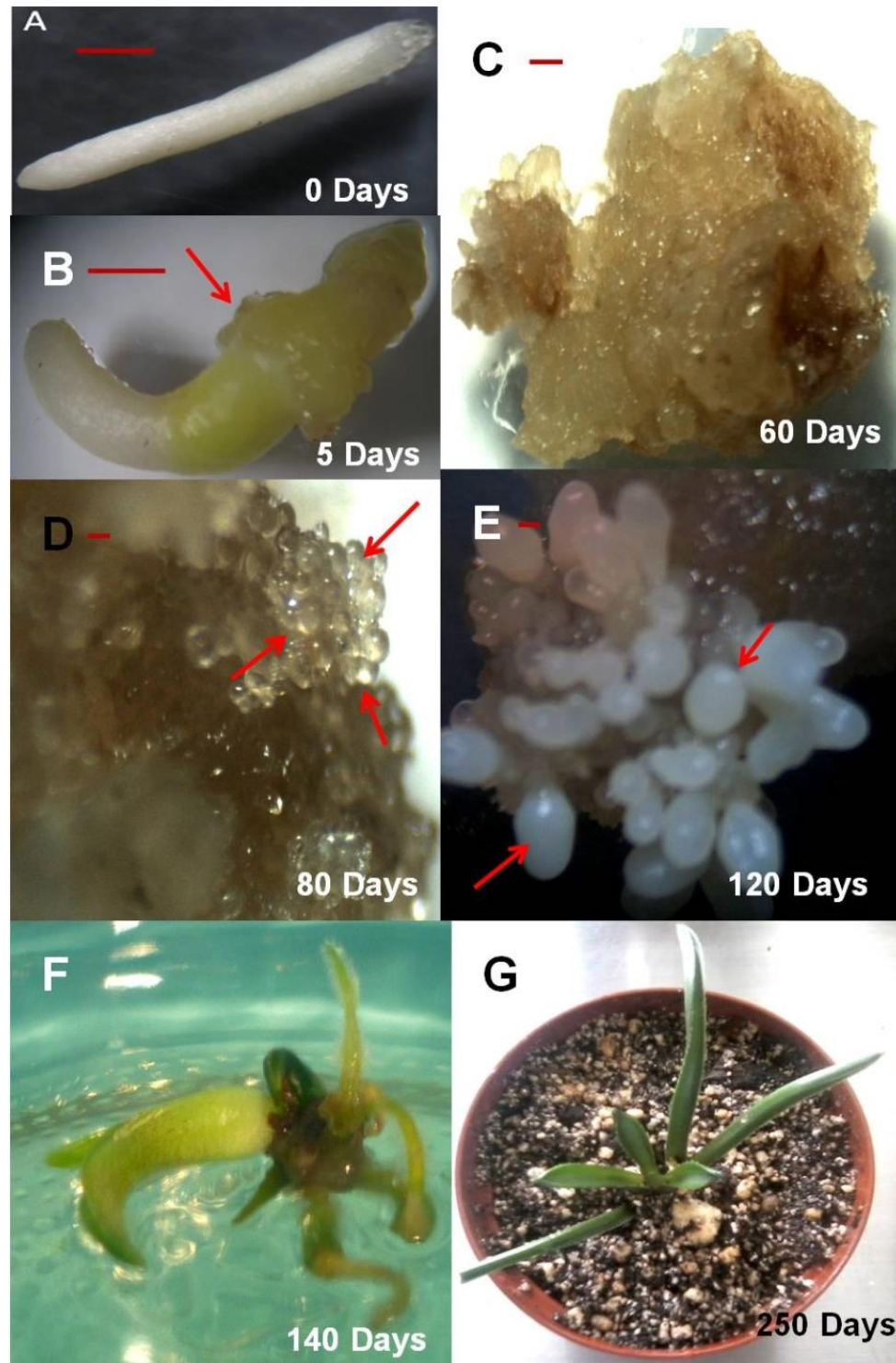


Fig. 1. Somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. obtained with vitamins L2, 14 μM 2,4-D, 5 μM BA and 60 g l^{-1} of sucrose. (A): explant, (B): callus initiation, (C): creamy-white friable callus, (D): globular masses, (E): mature somatic embryos, (F): rooted plantlet, (G): plantlet exposed to natural conditions. Bar: 1 mm

These findings are similar to those reported by Tremblay and Tremblay (1991), Shibli et al. (1992), George (1993), Mehta et al. (2000), Huang and Liu (2002), and Kim and Kim (2002), who considered that the addition of sucrose in the culture medium acts as an osmotic agent that may introduce stress in somatic cells towards the embryogenic pathway allowing the formation of somatic embryos. However, callus growth and embryo formation decrease in the presence of high sucrose concentration because it negatively affects chlorophyll formation causing a reduction in optimal callus turgor and embryo formation.

3.2.2 *Plant growth regulators*

All aspects of plant development are regulated by plant hormones which may act individually or in a concerted fashion. In tissue cultures, internal hormone concentrations are, in a very complex way, influenced by the plant growth regulators (PGR) present in the culture medium.

In this sense, abscisic acid (ABA) has been reported to be an important PGR for somatic embryogenesis, especially in the stages of embryo induction and maturation. It synchronizes the cultures and inhibits aberrant development during transition from globular to later stages. Exogenous ABA promotes synthesis of embryo-specific proteins and mRNA in order to enhance somatic embryo formation (Kikuchi 2006). However, throughout the present assay, the addition of ABA (alone or with 2,4-D and BA) was ineffective in promoting callus induction and consequently embryo formation (Table 1).

It has been reported that auxins and cytokines in the medium promote callus formation. These PGR have a spectrum of biological activities. At the cell level, responses to these PGR involve rapid changes in cell expansion, effects on cell division and meristem activity, as well as differentiation of specific cell types (Seijo 2000). In this respect, it has been suggested that the induction of somatic embryogenesis is promoted by a physiological stress function of auxins, especially 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Indeed, many authors have postulated that presence of 2,4-D in the medium for induction of somatic embryogenesis is necessary for *A. victoria-reginae*, *A. vera-cruz*, *A. sisalana* and *A. tequilana* (Rodríguez-Garay et al. 1996; Martínez-Palacios et al., 2003; Nikam et al. 2003; Portillo et al. 2007;

Tejavathi et al. 2007). In a previous report, Arzate-Fernández and Mejía-Franco (2011) suggest that use of 13.59 μM 2,4-D for induction of somatic embryos in *A. angustifolia* is recommendable. Similar findings were observed in our study when that concentration was replicated as the control treatment (T_0) (Table 1).

3.2.3 Amino acids source and vitamins

As pointed out by Kohlenbach (1978), the source of organic nitrogen in the medium plays a crucial role in manipulating embryogenesis. As a nitrogen source, L-glutamine alone or in combination with casein hydrolysate, has been reported to be critical for somatic embryogenesis, which may contribute to the enlargement of the nucleotide pool required for rapid cell proliferation and growth of the embryogenic tissue. Moreover, Tejavathi et al. (2007) suggested the use of L-glutamine in the phase of maturation-conversion of somatic embryos for good results in *A. vera-cruz*. According to our results, a nitrogen source is not essential for embryo induction because no somatic embryos were observed in calluses that developed on medium containing amino acids as a source of organic nitrogen.

On the other hand, it has been mentioned that vitamins are nitrogenous substances synthesized in suboptimal quantities to serve catalytic functions in enzyme systems, especially in plant cells grown in *in vitro* conditions. Thus, culture media are often supplemented with vitamins (standard media formulations and modifications thereof) to enhance growth (Al-Khayri 2001). In our study, L2 vitamins tended to be superior in terms of a higher number of somatic embryos (34 ± 0.4), whereas frequency of somatic embryos decreased (1.7 ± 0.7) when MS vitamins were used (Table 1). One of the major differences between MS and L2 vitamins is the thiamine concentration (0.1 and 2 mg l^{-1} , respectively). It has been reported that an essential compound in media for plant tissue culture is the vitamin B1 or thiamine, which has been considered an enzymatic cofactor in carbohydrate metabolism, glycolysis, the pentose phosphate pathway and the tricarboxylic acid cycle (Goyer 2010). In this sense, Bunik and Fernie (2009) reported that thiamine is essential in the Krebs cycle for energy production, nitrogen assimilation and amino acid metabolism. Also, Kruger and Von Schaewen (2003) mentioned that thiamine is a cofactor utilized by the enzyme transketolase in the

Calvin cycle where ribulose-1,5-bisphosphate is regenerated from phosphoglycerate formed during CO₂ fixation. In addition, thiamine has been also shown to play an important role as cofactor in response to abiotic (water, osmotic, salt, light, oxidative, and heat) and biotic stress in plants (Goyer 2010).

3.3 Hardening

Regenerated and well-developed plantlets were transferred to a mixture of compost, perlite and soil. Plantlets transferred to pots and kept for 20 days under controlled environment survived well when exposed to natural conditions (Fig. 1G). The survival rate of these plantlets was 100%. No morphological variant among somatic embryo-callus regenerated plants was observed.

4. Conclusions

Recently, cloning of *Agave* species has been successfully achieved throughout the world. Signalling molecules and stress conditions of the isolated somatic cells under given *in vitro* conditions will force the cells towards the embryogenic pathway. Competent cells can respond to a variety of conditions by the initiation of embryogenic development. It can also be hypothesized that the initiation of somatic embryogenesis using *Agave* zygotic embryos is a general response to a multitude of parallel signals (including growth regulators, stress factors, carbon source, vitamins, and alteration of gene expression).

The present study identified some of the factors that affect *A. angustifolia* somatic embryo production. While the concentration of exogenous auxin is the most critical factor in the embryogenic process, others have major effects on somatic embryogenesis, as is the case of sucrose concentration and vitamin formulation.

Acknowledgements

The first author is grateful to Mexican National Council for Science and Technology (CONACyT) for the scholarship granted to undertake his postgraduate studies. This work was supported by the Universidad Autónoma del Estado de México (3888/2015).

References

- Al-Khayri, J.M. 2001. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37:453-456.
- Arzate-Fernández, A. M. and Mejía-Franco, R. 2011. Embryogenic capacity of induced calli on zygotic embryonic axis of *Agave angustifolia* Haw. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(2):101-106.
- Bunik, V.I. and Fernie, A.R. 2009. Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. *Biochem. J.* (422): 405–421.
- George, E.E. 1993. Plant Micropropagation of Tissue Culture, Sugars Nutritional and Regulatory Effects. *Exegetics.* (3): 322-336.
- Goyer, A. 2010. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry.* (71):1615–1624.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue cultured plants. *Curr. Sci.* (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): 107-113.
- Kikuchi, A.; Sanuki, N.; Higashi, K.; Koshiha, T. and Kamada, H. 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta.* (223): 637–645.
- Kim, S. H. and Kim, S.K. 2002. Effect of sucrose level and nitrogen source on fresh weight and anthocyanin production in cell suspension culture of ‘Sheridan’ Grape (*Vitis* spp). *J. Plant Biotech.* (4): 2327-2330.
- Kohlenbach, H.W. 1978. Comparative somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.): *Frontiers of Plant Tissue Culture.* Calgary, University of Calgary Printing Service: 59–66.
- Kruger, N.J. and Von Schaewen, A. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* (6): 236–246.

- Martínez-Palacios, A.; Ortega-Larrocea, M. P.; Chávez, V. and Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: consideration for its conservation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* (74): 135–142.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* (15): 473-497.
- 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.* (78): 1231-12.
- Nikam, T.D.; Bansude, G.M. and Aneesh-Kumar, K.C. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Rep.* (22): 188–194.
- 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): 59–64.
- Portillo, L.; Santacruz-Ruvalcaba, F.; Gutiérrez-Mora, A. and Rodríguez-Garay, B. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* (43): 569–575.
- Rodríguez-Garay, B.; Gutiérrez-Mora, A. and Acosta-Dueñas, B. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* (46): 85–87.
- Seijo, G. 2000. Effect of preculture with sucrose and ABA on cell suspension water status and its relation with vitrification resistance. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegeta.* (12): 35-50.
- Shibli, R.A.; Smith, L.M. A. and Spomer, A.L. 1992. Osmotic adjustment and growth responses of three (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) cultivars to osmotic stress induced *in vitro*. *J. Plant Nutr.* (15): 1373-1381.
- Tejavathi, D.H.; Rajanna, M.D.; Sowmya, R. and Gayathamma, K. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* (43): 423–428.
- Trembley, I. and Tremblay, F. M. 1991. Carbohydrate requirements for the developments of black spruce and red spruce somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* (27): 95-100.

7.2. Culture medium factors influencing somatic embryogenesis induction in *Agave angustifolia* Haw.

Artículo enviado

- **Culture medium factors influencing somatic embryogenesis induction in *Agave angustifolia* Haw.** Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis, Vázquez-García Luis-Miguel. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (*En revisión con clave 365-17*).



CULTURE MEDIUM FACTORS INFLUENCING SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION IN *Agave angustifolia* HAW.

Jesús I. Reyes-Díaz^{1a}, Amaury M. Arzate-Fernández^{1b*}, José L. Piña-Escutia^{1c}

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 11.5, Campus Universitario "El Cerrillo" 50200, Toluca, Estado de México, México. Email:^ajird.rd@gmail.com, ^bamaury1963@yahoo.com.mx, ^cjlpinae@uaemex.mx. *Corresponding author.

ABSTRACT

A complete protocol of somatic embryogenesis involves induction of embryogenic callus, embryo development, embryo maturation, and its conversion or germination to form a complete plant. In this sense, judicious selection of the nutrient medium and physical culture environment is required. Culture medium factors that influence somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* were studied, especially the effect of sucrose concentrations (40, 50, 60, 70 and 80 g L⁻¹) and sources of amino acids (L-glutamine and Casein hydrolyzate). We observed that induction of embryogenic callus on zygotic embryos explants and the production of somatic embryos from embryogenic calli could be controlled by changes in sucrose concentration and is affected by the addition of sources of amino acids. Conversion frequency to plantlets ranged from 90-95% with 100% survival under *ex vitro* conditions.

Keywords: *Agave angustifolia*; somatic embryogenesis; glutamine; casein hydrolysate; sucrose.

INTRODUCTION

Agave angustifolia is one of most important raw materials for production of high quality mescal, this economic value results in tremendous national and international demand making the specie an important target for *in vitro* mass propagation and genetic improvement.

Somatic embryogenesis is a desirable mode of plant regeneration. However, for particular genotypes, *in vitro* culture conditions and the stages of somatic embryogenesis (acquisition of embryogenic competence, induction and maturation of somatic embryos and conversion to seedlings) must be experimentally optimised especially the compounds of the culture medium.

Carbohydrates play vital role in plants life. They are substrate of respiration, perform function in synthetic pathway of many compounds and build blocks of macromolecules. In addition, carbohydrates may control several developmental processes in the cells (Smeekens, 2000). Sucrose is the most common carbohydrate source used in plant tissue culture and present dominantly in the phloem. It has reported that, sugar concentration affects the formation of somatic embryos in culture medium (Nakagawa *et al.*, 2001).

On the other hand, in the somatic embryogenesis the growth of cells have high energy demands and synthesize large amounts of proteins and nucleic acids. It is an alternative energy source for rapidly dividing cells and cells that use glucose inefficiently. Cells require nitrogen atoms to build molecules such as nucleotides, amino acids, amino-sugars and vitamins. When glucose levels are low and energy demands are high, cells can metabolize amino acids for energy. In this sense, L-glutamine is one of the most readily available amino acids for use as an energy source and it is a major source of energy for many rapidly dividing cell types *in vitro* because it plays an important role in nitrogen assimilation as it is an intermediate in the transfer of ammonia into amino acids. Likewise, casein hydrolysates can be a source of calcium, phosphate, several microelements, vitamins and most importantly, a mixture of up to 18 amino acids.

Sucrose (6%) only has been used as a carbon source for the induction of somatic embryos in *A. angustifolia* (Arzate-Fernández and Mejía-Franco, 2011), but the effect of different sugar concentrations or the influence of sources of amino acids (L-glutamine and casein hydrolysate) on somatic embryogenesis of *Agave* has not yet been investigated. In the present work, the effect of different sucrose concentrations and its

interaction with organic nitrogen on somatic embryogenesis of *A. angustifolia* has been studied.

MATERIALS AND METHODS

Initial explant. Aseptic mature zygotic embryos were dissected from *Agave angustifolia* Haw seeds and used as initial explants for callus induction.

Effect of sucrose and organic nitrogen on the callus induction. Initial explants were placed in callus induction medium consisting of quarter-strength MS salt basal medium (Murashige and Skoog, 1992) with 3.0 mg 2,4-D L⁻¹ and 1.0 mg BA L⁻¹ supplemented with L2 vitamins (Phillips and Collins, 1979); in this stage five levels of sucrose (40, 50, 60, 70 and 80 g L⁻¹) and organic nitrogen (250 mg L⁻¹ L-glutamine and 250 mg L⁻¹ Casein hydrolysate) on the induction of somatic embryogenesis from callus of *Agave angustifolia* Haw. were evaluated. Medium pH was adjusted to 5.6–5.8 before adding the gelling agent (8 g agar L⁻¹) (Sigma-Aldrich®) and autoclaving at 121°C for 20 min. Thus, ten random treatments were assayed. Each treatment consisted of 12 replicates of ten explants each. The cultures were maintained in darkness at 25 ± 2°C for 60 days. At this stage, the percentage of callus induction and callus weight were recorded. At this stage, the percent of formation an weight of callus were registered.

Somatic embryos expression and plant regeneration. Sixty days after culture initiation (DACI), the calluses of the explants that responded to the treatments for callus induction were transferred to embryo expression medium: half-strength MS salts, 0.5 mg 2,4-D L⁻¹, and 30 g sucrose L⁻¹, gelled with 3 g Gelrite® L⁻¹. The calluses were incubated under the same environmental conditions as in the preceding step for another 60 days. At this stage, the number of somatic embryos (SE) was registered. For plant regeneration, all developed SE were transferred to flasks with germination medium (Arzate-Fernández and Mejía-Franco, 2011).

Ex vitro adaptation. In order to improve plant development and to enhance root proliferation, regenerated plantlets (4-5 cm in length) from SE were transferred to pots

containing a mixture of compost, perlite and soil (1:1:1). They were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 16-h photoperiod under fluorescent light ($16 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) for 20 days and watered using a spray gun at 3-day intervals. Afterward, all regenerated plantlets were transferred to greenhouse conditions.

Statistical analysis. To evaluate the effect of each treatment, using the data on percentage and weight of induced calluses (60 DACI) and number of somatic embryos (120 DACI), an analysis of variance (F test) and Tukey's multiple range test ($P < 0.05$) were performed in Statgraphics PLUS[®] software.

RESULTS

Embryogenic calli were soft and yellowish (Fig. 1A), starting initiation at the apical end of the explant, this response was observed in all treatments.

Somatic embryos were induced when they transferred to expression media from embryogenic callus cultured in different concentrations of sucrose (40, 50, 60, 70 and 80 g L^{-1}) and organic nitrogen (250 mg L^{-1} L-glutamine and 250 mg L^{-1} Casein hydrolysate). After 1 week, globular-shaped embryos were further developed into heart and torpedo-shaped embryos. Cotyledonary embryos were observed on the most (90–95%) of the calli 60 DACI after subculture (Fig. 1B).

Various stages of somatic embryogenesis were observed simultaneously on the same callus in culture media added with nitrogen sources (Fig. 1C) indicating that somatic embryogenesis in *A. angustifolia* is an asynchronous phenomenon in these conditions causing the number reduction of somatic embryos in a cotyledonary state at 120 DACI (Table 1).

Table 1 also shows the number of embryos on embryogenic callus when different sucrose concentrations were used. Somatic embryogenesis was significantly increased

with increasing sucrose concentration, but the development of normal embryos was low at the higher concentration of 80 g L⁻¹.

Induced somatic embryos were transferred onto expression medium where they developed into entire plantlets within 2 weeks (Fig. 1D). Average germination rate of somatic embryos was about 90–95%. One hundred percent of rooted plantlets were successfully transferred in to mixture of compost, perlite and soil when they developed into normal plants in the greenhouse with an average of 95% survival. Phenotypic variability was not observed in plants in this experiment.

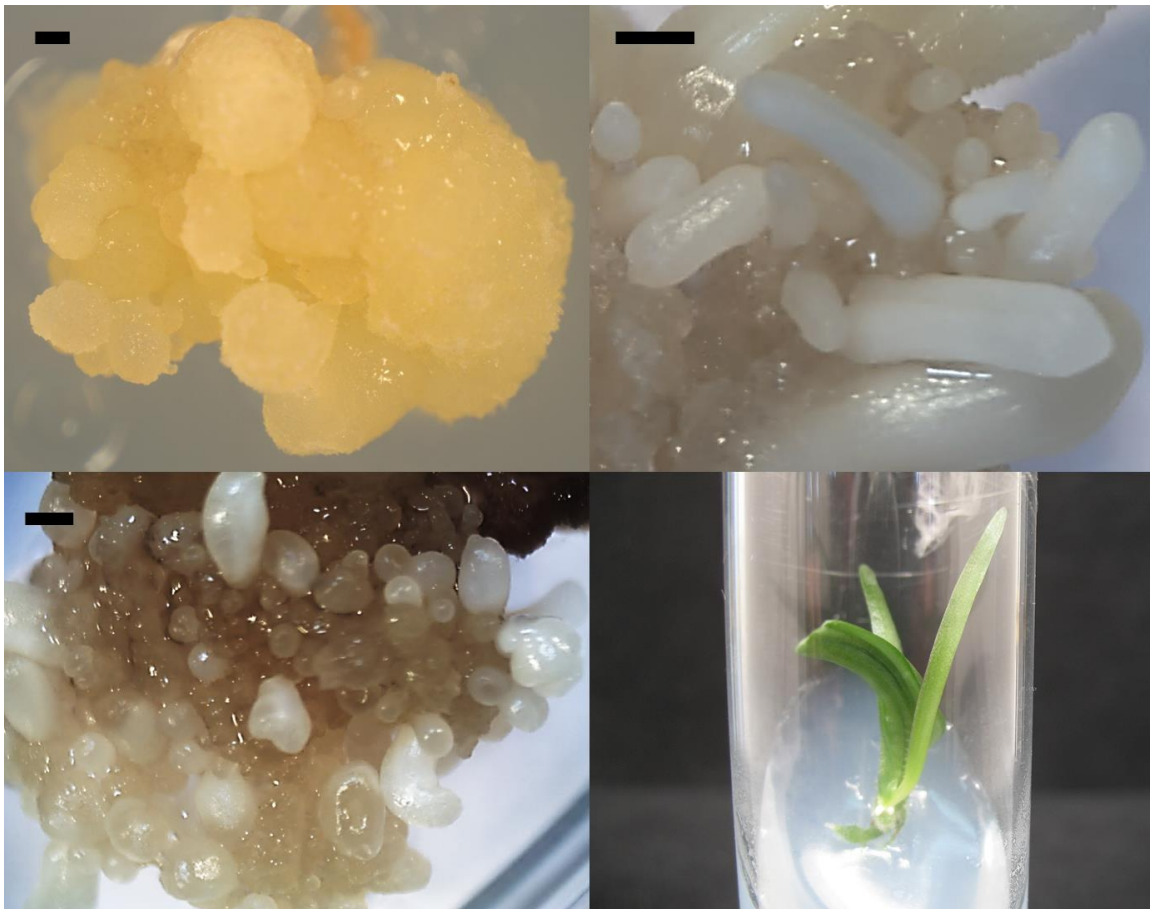


Fig. 1. Somatic embryogenesis in *Agave angustifolia*. A. Embryogenic callus, B. Cotyledonary embryos, C. Variability of somatic embryos on the same callus in culture media added with nitrogen sources, D. Plantlet. Bar: 1 mm.

Table 1. Effect of five levels of sucrose and its interaction with organic nitrogen on the induction of somatic embryogenesis from callus of *Agave angustifolia* Haw.

Sucrose (g l ⁻¹)	Organic nitrogen*	Formation of callus (%) [†]	Weight of callus (g) ^{††}	Somatic embryos per explant ^{†††}
40	-	35.83 ± 3.57	0.62 ± 0.04	8.20 ± 0.47
	+	40.83 ± 3.12	0.52 ± 0.02	5.02 ± 0.30
50	-	37.50 ± 3.28	0.91 ± 0.02	19.33 ± 0.36
	+	40.00 ± 3.25	0.67 ± 0.00	11.02 ± 0.46
60	-	33.58 ± 1.38	1.22 ± 0.06	35.71 ± 0.27
	+	39.16 ± 2.87	0.94 ± 0.03	23.41 ± 0.68
70	-	38.33 ± 3.21	1.64 ± 0.05	34.53 ± 0.69
	+	32.50 ± 2.78	0.78 ± 0.02	18.71 ± 0.28
80	-	28.00 ± 4.20	1.70 ± 0.30	17.00 ± 0.4
	+	37.50 ± 2.75	1.26 ± 0.05	16.22 ± 0.22

Mean ± standard error. *Without (-) or with (+) Casein hydrolyzate (250 mg l⁻¹) and L- glutamine (250 mg l⁻¹). Means in column with same letters are not significantly different by Tukey's multiple range test at P < 0.05. [†], ^{††} 60 days of cultures; ^{†††} 120 days of culture. Data is from 10 treatments with 12 replicates of 10 explants per replicate.

DISCUSSION

Although the regeneration of *A. angustifolia* via indirect somatic embryogenesis has previously been reported (Arzate-Fernández and Mejía-Franco, 2011). Availability of the sugar in the culture medium has been found to affect somatic embryogenesis in many plant species (Mehta *et al.*, 2000; Huang and Liu, 2002; Kim and Kim, 2002). In this study, increasing sucrose concentration enhanced induction of embryogenic callus and somatic embryos. Plant cell, tissue or organ culture normally requires the incorporation of a carbon source to the culture medium (George, 1993) and sucrose has been used as the major carbon source in tissue culture. Sucrose can serve as a carbon source during somatic embryogenesis (Kim and Kim, 2002) and also as an osmotic regulator (Biahoua and Bonneau, 1999). However, it is a common knowledge that the role of high sugar concentration in somatic embryogenesis may impact the cell osmolarity (Hazarika, 2003). Therefore, the role of sucrose in the present study could be interpreted as both nutritional and osmotic regulatory functions of this carbohydrate.

The result of this study showed that higher concentrations of sucrose improve maturation of somatic embryos. Increasing sucrose concentration in the medium may create the osmotic stress, but helps to improve somatic embryogenesis. Therefore, it could be suggested that, osmotic effect of sucrose may cause normal development of somatic embryos. The positive effect of high osmolarity may mimic the osmolarity alterations that occur surrounding the embryo in nature (Merkle *et al.*, 1995).

On the other hand, casein hydrolysate and L-glutamine have been the principal sources of nitrogen utilized in tissue culture and the growth of *A. angustifolia* callus tissue was significantly affected by the addition of amino acids specifically glutamine and casein. This answer suggested that organic nitrogen was a growth-limiting factor in agave cultures. Also, the type and concentration of amino acid significantly affected the expression of *A. angustifolia* somatic embryos, as concentration increases the development decreases.

In conclusion, induction of embryogenic callus on zygotic embryos explants and the production of somatic embryos from embryogenic calli could be controlled by changes in sucrose concentration and is affected by the addition of sources of amino acids. The results of this study also showed that the high percentages of somatic embryos could successfully be regenerated to form entire normal plants. Establishment of conditions required for the high frequency of regeneration via somatic embryogenesis would facilitate protoplast culture, somatic hybridization, genetic transformation and artificial seed production in *A. angustifolia*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author is grateful to Mexican National Council for Science and Technology (CONACyT) for the scholarship granted to undertake his postgraduate studies. This work was supported by the Universidad Autónoma del Estado de México (3888/2016).

LITERATURE CITED

- Arzate-Fernández, A. M., and R. Mejía-Franco. 2011. Embryogenic capacity of induced calli on zygotic embryonic axis of *Agave angustifolia* Haw. Rev. Fitotec. Mex. 34(2):101-106.
- Biahoua, A., 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, 185–190.
- George, E.E. 1993. Plant Micropropagation of Tissue Culture, Sugars Nutritional and Regulatory Effects. Exegetics. (3): 322-336.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue cultured plants. Curr. Sci. (85): 1704-1711.
- Huang, W., and F. L. Liu. 2002. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. Bot. Bull. Acad. Sci. (43): 107-113.

- Kim, S. H., and S. K. Kim. 2002. Effect of sucrose level and nitrogen source on fresh weight and anthocyanin production in cell suspension culture of 'Sheridan' Grape (*Vitis* spp). *J. Plant Biotech.* (4): 2327-2330.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A., Flin, B.S., 1995. Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. In: *Torpedoed in vitro embryogenesis in plant*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 155–203.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* (15): 473-497.
- Mehta, U. J., V. K. Krishnamurthy, and S. Hazra. 2000. Regeneration of plant via adventitious bud formation from zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica*). *Curr. Sci.* (78): 1231-12.
- Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., Ito, A., 2001. Effect of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Hort.* 90, 85–92.
- Phillips, G. C., and G. B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.* (19): 59–64.
- Smeekens, G.S.M., 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49–81.

7.3. Efecto del complejo vitamínico: Inositol, B6 y B1 en la inducción de embriones somáticos de *Agave angustifolia*

Artículo enviado

- **Efecto del complejo vitamínico: Inositol, B6 y B1 en la inducción de embriones somáticos de *Agave angustifolia*.** Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia José-Luis, Norman –Mondragón Tomás-Héctor. Fitotecnia Mexicana (*En revisión con clave R2017050*).



**EFECTO DEL COMPLEJO VITAMÍNICO: INOSITOL, B6 Y B1 EN LA
INDUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Agave angustifolia***

**EFFECT OF THE VITAMINIC COMPLEX: INOSITOL, B6 AND B1 IN THE
INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS OF *Agave angustifolia***

Jesús Ignacio Reyes-Díaz¹, Amaury-Martín Arzate-Fernández^{1*},

José Luis Piña-Escutia¹ y Tomás Héctor Norman-Mondragón¹

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 11.5, Campus Universitario “El Cerrillo” 50200, Toluca, Estado de México, México. Tel. + 52 1 722 2965518.

* *Autor de correspondencia* (amaury1963@yahoo.com.mx)

RESUMEN

Se evaluó el efecto del inositol, la vitamina B6 (piridoxina) y la vitamina B1 (tiamina) en la inducción de embriones somáticos (ES), a partir de ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia*. En el medio que contenía los tres compuestos se observó el mayor número promedio de ES (35,7). Sin embargo, los callos obtenidos en los medios con tiamina (sola o en combinación) tuvieron una mejor respuesta embriogénica mostrando que la tiamina posiblemente es un compuesto esencial para la inducción de ES en esta especie. La frecuencia de conversión a plántulas varió del 95-100%, con 100 % de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, embriogénesis somática, cultivo *in vitro*, vitaminas, inositol, piridoxina, tiamina.

SUMMARY

The effect of inositol, vitamin B6 (pyridoxine) and vitamin B1 (thiamine) on the induction of somatic embryos (SE) from zygotic embryonic axes of *Agave angustifolia*, has been evaluated. In the medium containing the three compounds the higher number of

somatic embryos (SE) was observed (35.8) and they vigorously grown. However, the calluses cultured in medium with thiamine (alone or in combination) had a better embryogenesis response, showing that thiamine is an essential compound in the somatic embryogenesis of *A. angustifolia*. Conversion frequency to plantlets ranged from 95-100%, with 100% survival under *ex vitro* conditions.

Index words: *Agave angustifolia*, somatic embryogenesis, *in vitro* culture, vitamins, inositol, piridoxine, thiamine.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* tiene su centro de origen en México, comprende muchas especies de importancia económica debido a que representan fuentes de alimentos, fibras, productos farmacéuticos, plantas ornamentales y bebidas, entre otros (Portillo *et al.*, 2007).

Una de esas especies es el *Agave angustifolia* Haw, utilizada en diferentes estados de la República Mexicana para la elaboración de mezcal; en los últimos años, el incremento en la producción de esta bebida ha ocasionado la sobreexplotación de esa especie que, junto con la recolección de plantas y semillas, y la destrucción de su entorno natural, han reducido significativamente sus poblaciones (Nikam *et al.*, 2003),

A. angustifolia puede ser multiplicado vegetativamente ya sea a través de bulbillos o estolones (hijuelos). En condiciones ambientales óptimas este agave florece sólo una vez en su vida (8-15 años de edad), pero cada vez se obtienen menos semillas viables debido a su depresión endogámica (Tejavathi *et al.*, 2007).

Por lo anterior, la urgente necesidad de obtener un gran número de individuos uniformes de genotipos *élite*, ha llevado al desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para propagar masivamente a *A. angustifolia* vía embriogénesis somática (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011; Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

La embriogénesis somática *in vitro* se produce como resultado de la reprogramación del desarrollo de células somáticas hacia la vía embriogénica; este proceso forma la base

de la totipotencia celular en las plantas superiores y puede ser inducido por diferentes señalizaciones bioquímicas o moleculares causadas por factores exógenos como los reguladores de crecimiento vegetal, macro y micro nutrientes, aminoácidos, azúcares y vitaminas, todos ellos adicionados al medio de cultivo.

En nuestro laboratorio, estudios previos han sugerido que la formulación del complejo vitamínico utilizado en la fase de inducción de callo está correlacionada con la adquisición de la competencia embriogénica en células somáticas de *A. angustifolia* (datos no mostrados); así por ejemplo, se ha visto que con el uso del complejo vitamínico L2 (CVL2) (Phillips y Collins, 1979), se obtiene un mayor número de embriones somáticos en comparación con el complejo vitamínico MS (CVMS) (Murashige y Skoog, 1992). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de los componentes del CVL2: inositol, vitamina B6 (piridoxina) y vitamina B1 (tiamina), sobre la obtención de callo y la inducción de ES (Fase I) y se probaron seis concentraciones diferentes de tiamina para valorar su efecto particular en el grado de expresión de estas variables respuesta (Fase II).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en el Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, Estado de México.

Material vegetal. Como explante inicial se utilizaron ejes embrionarios cigóticos maduros de *A. angustifolia* (Figura 1A), obtenidos a partir de semillas silvestres colectadas en el municipio de Zumpahuacán, Estado de México.

Obtención de callo embriogénico. Los explantes se establecieron en un medio de cultivo para la obtención de callo (MO) (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

En la Fase I, se evaluó el efecto de los componentes del complejo vitamínico L2: inositol, vitamina B6 (piridoxina) y vitamina B1 (tiamina) (Phillips y Collins, 1979). En

total se ensayaron ocho tratamientos (Cuadro 1). En la Fase II, se evaluó el efecto de seis concentraciones de tiamina (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mg L⁻¹) sobre la obtención de callo embriogénico y la inducción de embriones somáticos (ES) de *A. angustifolia* (véase también el Cuadro 1).

En ambas fases, se utilizó un diseño completamente al azar y cada tratamiento tuvo 20 repeticiones, cada repetición (caja Petri) contó con 20 ejes embrionarios, considerando a cada eje embrionario cigótico como una unidad experimental. Todos los tratamientos se mantuvieron durante 60 días en oscuridad a 25 ± 2°C.

Inducción de embriones somáticos (ES) y regeneración de plántulas (RP). Los callos obtenidos en las fases anteriores, se transfirieron al medio de expresión (ME) para la inducción de embriones somáticos durante 60 días, es decir 120 días después de iniciado el cultivo (ddic). El ME consistió en las sales MS (Murashige y Skoog, 1972), reducidas al 50% de su concentración original, suplementado con 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 30 g L⁻¹ de sacarosa.

La germinación de los ES maduros (en estado cotiledonar) se realizó en un medio MS sin reguladores del crecimiento vegetal; las plántulas obtenidas se transfirieron a macetas que contenían un sustrato compuesto por agrolita, composta y arena (1:1:1), para finalmente trasladarse a condiciones de invernadero para su adaptación.

Variables evaluadas. En ambas fases se evaluó el porcentaje de obtención de callo a los 60 ddic y el número de embriones somáticos inducidos por callo a los 120 ddic. (sólo se consideraron embriones en estado cotiledonar).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos sobre el porcentaje de obtención de callo y el número de ES inducidos por callo se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software *Stathgraphics* versión 5.0 y, en donde hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

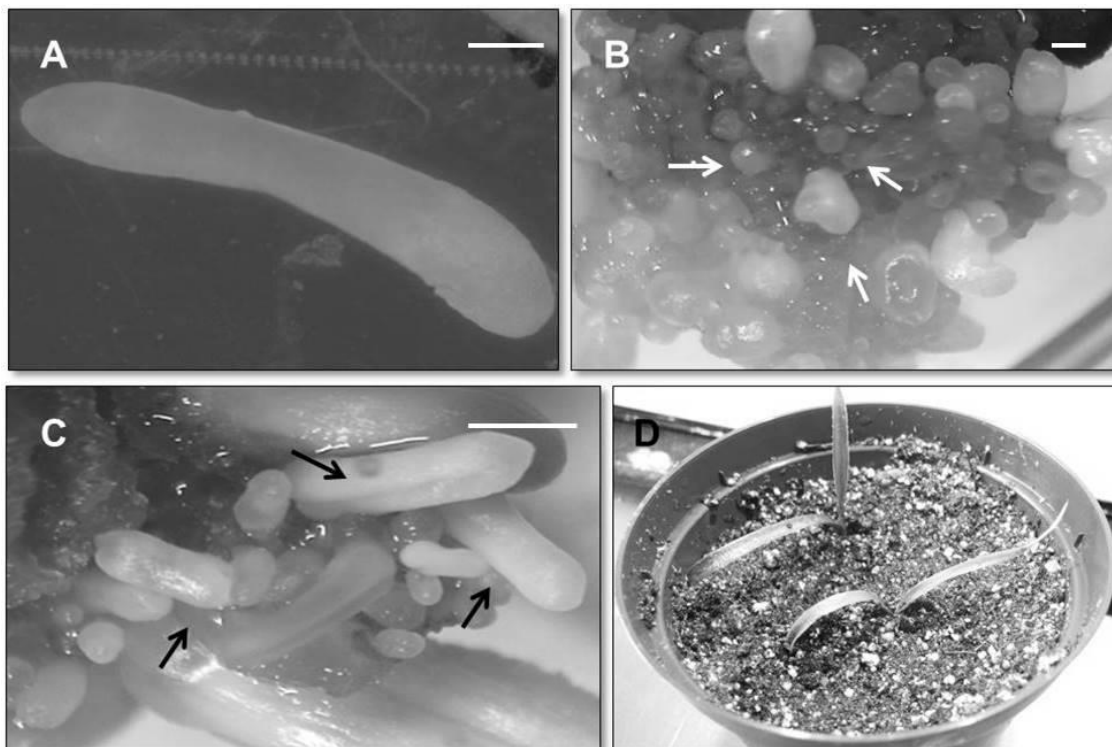


Figura 1. Embriogénesis somática en *Agave angustifolia*. A. Eje embrionario cigótico utilizado como explante, B. Callo con embriones somáticos en estado globular-torpedo (flechas) a los 60 días después de iniciado el cultivo (ddic) en el tratamiento 1, C. Embriones somáticos en estado cotiledonar (flechas) a los 120 ddic, D. Plántulas adaptadas en invernadero a los 200 ddic.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es bien sabido que en los procesos de regeneración *in vitro* de especies vegetales, los medios de cultivo a menudo se suplementan con complejos vitamínicos (formulaciones de medios estándar y/o modificaciones de las mismas) para mejorar la respuesta de los explantes a los procesos de organogénesis o embriogénesis somática (Al-Khayri, 2001). Al respecto, se ha sugerido que la inducción de callo está correlacionada con la adquisición de la competencia embriónica de las células somáticas, por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de los componentes del CVL2: inositol, vitamina B6 (piridoxina) y vitamina B1 (tiamina), sobre la obtención de callo y la inducción de ES de *A. angustifolia* a partir de ejes embrionarios cigóticos.

Obtención de callo embriogénico e Inducción de embriones somáticos (ES).***Fase I***

En el presente estudio, con la adición del complejo vitamínico L2, la desdiferenciación de los ejes embrionarios cigóticos se observó a los 5 ddc; sin embargo, la obtención de masas callosas embriogénicas (con un diámetro entre 0.5 y 1.5 cm) se evidenció a partir de los 20 y hasta los 60 ddc cuando fue posible observar la presencia de ES en estado globular-torpedo (Fig. 1B) (Cuadro 1). Cabe destacar que en esta etapa es posible identificar el tipo de callo; a saber, si un callo es friable y de color amarillo se considera como un callo embriogénico. De lo contrario, si un callo es compacto y de color blanco se considera como un callo no embriogénico.

De igual manera, en la Fase I, al evaluar el efecto del inositol, la piridoxina y la tiamina en la obtención de callo e inducción de ES, se observaron diferencias altamente significativas, ya que en el tratamiento 1 que contenía los tres componentes del CVL2, se obtuvo el mayor porcentaje promedio de formación de callo (60 %) y el mayor número de ES en estado cotiledonar (35.8), a los 120 ddc (Figura 1C), en comparación con los tratamientos que contenían sólo dos componentes vitamínicos (tratamientos 3, 4 y 6) o que carecían de ellos (tratamiento 8) (Cuadro 1). En este sentido, tanto Phillips y Collins (1979) como Myers *et al.* (1989), obtuvieron un mayor número de brotes en *Trifolium pratense* a partir de callo cultivado en un medio suplementado con el complejo vitamínico L2 (CVL2), en comparación con los medios adicionados con el complejo MS (CVMS), o con ausencia de vitaminas. Al respecto Shils *et al.*, (2001) indican que los complejos vitamínicos contienen elementos orgánicos nitrogenados no sintetizables por el organismo (con algunas excepciones), esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal, así como para mantener un adecuado metabolismo, pues cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento como se pudo observar en el tratamiento 8 del presente estudio.

La actividad fundamental de las vitaminas es actuar como cofactores enzimáticos en diversos procesos metabólicos, por ejemplo, el inositol que es parte integral de varios

tipos de membranas de algunas organelas celulares, es utilizado por las plantas como un suplemento de la sacarosa llevando a cabo un aporte energético considerable durante la etapa de reprogramación celular; de igual manera, la piridoxina (vitamina B6), aunque no es considerada esencial en el cultivo de tejidos (como se demostró en el tratamiento 7) se ha evidenciado que participa en reacciones de transaminación y descarboxilación de aminoácidos (biosíntesis proteica) (Murray, 2010).

Por otra parte, al analizar la respuesta de los ejes embrionarios cigóticos de *A. angustifolia* en los tratamientos adicionados con tiamina (sola o en combinación), tratamientos 1, 2, 3 y 4, se observó que fue posible la inducción de un mayor número de ES, en contraste con los tratamientos que carecían de ella (tratamientos 5, 6, 7 y 8) (Cuadro 1). Esto permite suponer que la tiamina es un compuesto indispensable en la inducción de la embriogénesis somática en *A. angustifolia*.

Fase II

Como ya se mencionó más arriba, con el tratamiento que contenía los tres componentes del complejo vitamínico L2 (Fase I), se obtuvo el mayor número promedio de ES en estado cotiledonar (35.8), sugiriendo que la tiamina juega un rol fundamental para la adquisición de la competencia embriogénica de células somáticas de *A. angustifolia*. Para comprobar más aun la veracidad de esta suposición, en la Fase II de este trabajo se evaluó el efecto de seis concentraciones de tiamina (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mg L⁻¹) en combinación con 250 mg L⁻¹ de inositol y 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina, sobre la formación de callo embriogénico y la inducción de ES (Cuadro 1).

En el Cuadro I se puede observar que la inducción de ES se logró en los seis tratamientos evaluados; sin embargo, también se puede notar que al reducir o incrementar la concentración de tiamina en el medio de cultivo (tratamientos 1 y 6), el número de ES disminuye respecto a los inducidos en la concentración original (2.0 mg L⁻¹). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Goyer (2010) quien indica que bajas y altas concentraciones de difosfato de tiamina afectan negativamente a la cantidad de mRNA y en consecuencia la biosíntesis de proteínas en la etapa de reproducción celular.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados y su efecto sobre la respuesta embriogénica en *Agave angustifolia*.

Fase Tratamiento	Vitaminas (mg L ⁻¹) [†]			Formación de callo ⁺ (%)	Tipo de callo ⁺⁺	Embriones somáticos en estado cotiledonar por explante ^{+++,*}		
	Inositol	Piridoxina (B6)	Tiamina (B1)					
I	1	250.0	0.5	2.0	60.0	E	35.8 ± 0.3	a
	2	0.0	0.0	2.0	55.0	E-NE	14.6 ± 0.6	c
	3	250.0	0.0	2.0	25.0	E-NE	15.8 ± 0.0	c
	4	0.0	0.5	2.0	15.0	E-NE	17.2 ± 0.9	b
	5	250.0	0.0	0.0	20.0	NE	0.0 ± 0.0	e
	6	250.0	0.5	0.0	30.0	E-NE	3.6 ± 0.7	d
	7	0.0	0.5	0.0	10.0	NE	0.0 ± 0.0	e
	8	0.0	0.0	0.0	15.0	NE	0.0 ± 0.0	e
II	1	250.0	0.5	1.5	60.0	E	23.2 ± 2.17	d
	2	250.0	0.5	2.0	60.0	E	36.0 ± 2.32	c
	3	250.0	0.5	2.5	80.0	E	50.5 ± 2.48	a
	4	250.0	0.5	3.0	70.0	E	44.9 ± 2.00	b
	5	250.0	0.5	3.5	60.0	E	24.9 ± 2.15	d
	6	250.0	0.5	4.0	40.0	E	16.1 ± 0.63	e

[†]Phillips y Collins, 1979; ⁺, ⁺⁺ 60 y ⁺⁺⁺ 120 días después de iniciado el cultivo; E= embriogénico, NE= No embriogénico. *Letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa al 5% ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey.

Por otro lado, en los tratamientos 3 y 4 no se observaron diferencias significativas, lo cual sugiere que al aumentar la concentración de tiamina hasta 2.5 y 3.0 mg L⁻¹ en el medio de cultivo, es posible inducir un mayor número de ES por explante (50.5 y 44.9 respectivamente) comparado con los 35.8 ES inducidos con la concentración original de tiamina (2.0 mg L⁻¹) (Fase I). Una explicación posible de estos resultados radica en que la tiamina es la vitamina del complejo B con el mayor espectro de actividades metabólicas, es decir, es un cofactor enzimático fundamental que participa en reacciones de descarboxilación oxidativa, interviene en el metabolismo de carbohidratos (piruvato deshidrogenasa), en el ciclo del ácido cítrico (α -cetoglutarato deshidrogenasa), en la vía de las pentosas fosfato (transcetolasa) y en el metabolismo de la isoleucina, leucina y valina (α -cetoácido deshidrogenasa); además, esta vitamina es esencial en el ciclo de Krebs para la producción de energía y la asimilación de nitrógeno. Aunado a todo esto, en los últimos años se le han atribuido funciones específicas en la regulación de la expresión génica primordial en la etapa de reproducción celular, capacidad que anteriormente se consideraba más propia de los macro nutrientes (Bunik y Fernie, 2009; Goyer, 2010; Murray, 2010).

Finalmente, la frecuencia de conversión a plántulas varió del 95-100%, con un porcentaje de sobrevivencia del 100% a los 200 ddc (Figura 1D).

Los resultados de esta investigación contribuyen a un mejor entendimiento de la adición de las vitaminas (especialmente la vitamina B1) al medio de cultivo para lograr inducir un mayor número de ES en ejes embrionarios cigóticos de *A. angustifolia*, lo que puede coadyuvar a la conservación *ex situ* de la especie e iniciar programas de mejoramiento genético, asimismo sienta las bases para la clonación masiva de plantas de agave que garantice a los productores interesados contar con material vegetativo suficiente para establecer plantaciones comerciales, y con ello lograr la explotación más racional del recurso.

CONCLUSIONES

- Fue necesaria la presencia de todos los componentes del complejo vitamínico L2 (inositol, piridoxina y tiamina) para obtener un mayor número de embriones somáticos por explante a los 120 ddic.
- Se determinó que la vitamina B1 (tiamina) es un compuesto esencial para que las células de callos embriogénicos de *A. angustifolia* adquieran su capacidad totipotente.
- Al aumentar la concentración de tiamina a 2.5 mg L⁻¹ se logró inducir el mayor número de embriones somáticos (50.5) por explante.
- La frecuencia de conversión a plántulas varió del 95-100%, con un porcentaje de sobrevivencia del 100% a los 200 ddic.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Khayri and J.M. (2001) Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 37:453-456, <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-001-0079-x>

Arzate-Fernández, A. M. y R. Mejía-Franco. (2011) Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Revista Fitotecnia Mexicana 34(2):101-106, <http://www.redalyc.org/html/610/61018842004/>

Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., Norman-Mondragón, T. M., Reyes-Díaz, J. I., Guevara-Suárez, K. L. y Vázquez-García, L. M. (2016) Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) a partir de embriones somáticos encapsulados. Revista Fitotecnia Mexicana Vol. 39 (4): 359 – 366, <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61049142004>

Bunik, V.I., and A. R. Fernie. (2009) Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. Biochemistry Journal (422): 405–421, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20090722>

- Goyer, A. (2010)** Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*. (71):1615–1624.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Murray, R. K. (editor). (2010)** Harper. *Bioquímica ilustrada*. 28a edición. México: Mac Graw-Hill.
- Myers, J. R., Grosser, J. W., Taylor N. L. and G. B. Collins. (1989)** Genotype-dependent whole plant regeneration from protoplasts of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 113-127,
- Nikam, T. D., Bansude, G. M. A. and K. C. Aneesh-Kumar (2003)** Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Reports* 22:188–194.
- Phillips, G. C. and G. B. Collins. (1979)** *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.* 19: 59–64.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A. and B. Rodríguez-Garay. (2007)** Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43:569–575, <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>
- Shils, E., Olson, J. A., Shike, M. y A. C. Ross AC (ed). (2002)** *Nutrición en salud y enfermedad*. 9ª edición. México. McGraw-Hill, 443-541.
- Tejavathi, D. H., Rajanna, M. D., Sowmya, R. and K. Gayathamma. (2007)** Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43:423–428, <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-007-9088-8>

7.4. Isolation and molecular characterization of an *Agave angustifolia* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (AaSerk) gene

Artículo enviado

- **Isolation and molecular characterization of an *Agave angustifolia* Haw. somatic embryogenesis receptor like-kinase (AaSerk) gene.** Reyes-Díaz Jesús-Ignacio, Arzate-Fernández Amaury-Martín, Piña-Escutia. Botanical Sciences (*En revisión con clave 856*)

El Jueves, 7 de julio, 2016 15:01:22, Juan Núñez-Farfán <editor_botsci@ieecologia.unam.mx> escribió:

Amaury M. Arzate-Fernández:

Gracias por enviar el manuscrito "Isolation and molecular characterization of an *Agave angustifolia* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (AaSerk) gene" a Botanical Sciences. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial.

URL del manuscrito:

<http://www.botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/author/submission/856>

Nombre de usuario/a: amauryarzate

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Juan Núñez-Farfán
Botanical Sciences

Editor responsable: Juan Núñez Farfán
Sociedad Botánica de México A.C., Lab. de Ecología s.n., Altillo
Universidad, Delegación Coyoacán, C.P. 04350, México, D.F. México,
www.botanicalsciences.com.mx.

Accesión publicada

- *Somatic embryogenesis receptor-like kinase, partial [Agave angustifolia]:* proteína 327 aminoácidos, Accesoión: APX18295.1, GenBank, NCBI. Publicada en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1134518461>).

**ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AN
Agave angustifolia SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE
(AaSerk) GENE**

Jesús I. Reyes-Díaz¹, Amaury M. Arzate-Fernández^{1*} and José L. Piña-Escutia¹

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México.

*Corresponding author's e-mail address: amaury1963@yahoo.com.mx

Abstract

Background. Somatic embryogenesis (SE) has a primary role in *in vitro* plant regeneration. However, it is also a model system to explore the regulatory and morphogenetic events in the life of a plant. To date, a group of genes that play important roles in SE have been isolated and identified, including the Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK) genes, they are well known to be a molecular marker of SE in several plant species. *Hypothesis.* SERK genes have been identified during SE in many species, but they will be present and could be expressed in the *Agave angustifolia* SE?. *Study site and years of study.* The assay was performed at Plant Molecular Biology Lab, Universidad Autónoma del Estado de México from March 2015 to April 2016. *Methods.* To isolate AaSerk, DNA was extracted from *A. angustifolia* embryogenic callus. Degenerated primers designed on conserved SERK regions were used, PCR products were sequenced and the amino acid sequence was deduced and subjected to BLASTn algorithm to search for identity with known SERK sequences. *Results.* A novel gene designated as AaSerk was isolated from *Agave angustifolia*. Sequence and structural analysis determined that the AaSerk protein, which encodes 327 amino acids, belongs to the SERK gene family. AaSerk shared all the characteristic domains of the SERK family, including five Leucine-Rich Repeats (LRR), one Serine-Proline-Proline (SPP) motif, a transmembrane domain (TM), and kinase domain. *Conclusions.*

In this study, a partial SERK gene from *A. angustifolia* (called AaSERK) was identified and characterized for the first time.

Keywords: Somatic embryogenesis, Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase gene, *Agave angustifolia*

Resumen

Antecedentes. La Embriogénesis somática (SE) juega un papel preponderante en la regeneración *in vitro* de plantas. Sin embargo, también es un sistema modelo para explorar los eventos de regulación y morfogénica en la vida vegetal. Hasta ahora, un conjunto de genes con roles fundamentales durante la SE se han aislado e identificado, incluyendo los genes *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase* (SERK), conocidos por ser un marcador molecular de la SE en varias especies de plantas. *Hipótesis.* Se han identificado genes SERK durante el proceso de SE en muchas especies, pero ¿estarán presentes y podrían expresarse en la SE de *Agave angustifolia*? *Sitio de estudio y fechas.* El ensayo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Universidad Autónoma del Estado de México de marzo de 2015 a abril de 2016. *Métodos.* Para aislar el AaSERK, se extrajo DNA de callo embriogénico de *A. angustifolia*. Se utilizaron cebadores degenerados diseñados en regiones conservadas, los productos de PCR fueron secuenciados, la secuencia de aminoácidos fue deducida y se sometió al algoritmo de BLASTn para determinar la identidad con secuencias SERK ya conocidas. *Resultados.* Se identificó y caracterizó un nuevo gen designado como AaSERK en *Agave angustifolia*. Su secuencia y análisis estructural indicaron que la proteína AaSERK, codifica para 327 aminoácidos y comparte todos los dominios característicos de la familia SERK, incluyendo cinco Repeticiones Ricas en Leucina (LRR), un motivo Serina-Prolina-Prolina (SPP), un dominio transmembrana (TM) y un dominio quinasa. *Conclusiones.* En este estudio, se identificó y caracterizó por primera vez un gen parcial SERK de *A. angustifolia* (llamado AaSERK).

Palabras clave: Embriogénesis somática, gen *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*, *Agave angustifolia*.

Introduction

The genus *Agave* of the subfamily Agavoideae (Asparagaceae, Asparagales) includes 204 species, 163 of them occur in Mexico and 123 are endemic. For this reason, the area is considered the center of origin and diversification of the genus. These species are highly important ethnobotanically, ecologically and economically because of their many uses: live fences, food, fibers, material for construction, medicine, cosmetics, fodder, and alcoholic beverages such as bacanora, pulque, tequila, mescal and others (Delgado-Lemus *et al.* 2014). However, the over-exploitation of some agave species and the unplanned extraction of their products increase the risk of extinction because the plants are extracted before flowering, and sexual reproduction does not occur (Delgado-Lemus *et al.* 2014). The urgent need for a large number of individuals of selected genotypes has led to the development of *in vitro* culture techniques (including somatic embryogenesis) to accelerate the process of vegetative propagation as an alternative for the conservation of *Agave* species (Arzate-Fernández and Mejía-Franco 2011).

Somatic embryogenesis (SE) is a tool for mass propagation or genetic transformation of various species. In this system, it is well accepted that the developmental switch is triggered in cells transiently exposed to the activity of genes that determine and maintain the meristematic status, level of endogenous hormones, sensitivity to exogenous plant regulators (PGR), as well as on the activity other genes that control different stages of plant morphogenesis or SE. According to a generally accepted model, the inducing conditions result in the dedifferentiation of somatic plant cells followed or paralleled by the reacquisition of developmental totipotency. At this totipotent stage, the cells are competent to perceive appropriate developmental signal(s) that prompt the commitment toward embryogenesis. It is evident that the study of genetic control of totipotency is important for both development and improvement of plant biotechnology and better understanding of plant physiology (Schmidt *et al.* 1997, Ezhova 2003).

In this sense, identification and characterization of genes involved in SE offer the possibility of determining the embryogenic potential of somatic cells in early development stages and of providing information on molecular regulation of this process (De Oliveira *et al.* 2005).

According to Becraft (1998, 2002), the family Receptor-Like Kinases (RLKs) with Leucine-Rich Repeats (LRRs) have important functions during the cellular signaling pathway of plant development, disease resistance, microsporogenesis, vascular tissue differentiation, embryo pattern formation, cell death control and self-incompatibility. The role of RLKs in developmental process is to transduce external signals and/or information from neighbouring cells and to trigger specific responses, in the case of SE process, the embryogenic responses of cultured cells depends on the cell type and the composition of the culture medium (Baudino *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2002, Fisher and Turner 2007, Nodine *et al.* 2007, He *et al.* 2007, Ma *et al.* 2012).

Guzzo *et al.* (1994) pointed out that the establishment of cell and/or tissue polarity and embryo development in the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the culture medium induces the expression of encoding flavin monooxygenases those enzymes are key in auxin biosynthesis resulting in increased endogenous indolacetic acid (IAA) level, this increase is a key step in meristem formation underlying embryo development. On the other hand, by tracking cells was possible to follow the development of individual carrot cells in culture (with presence of 2,4-D) and confirmed that cells or cell clusters originating from provascular cells formed most of the somatic embryos. The embryogenic commitment of the cells was confirmed through the expression of a RLK, called Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK) making of the expression of this gene an accepted marker of embryogenic competence (Schmidt *et al.* 1997).

As shown in Figure 2a, the main feature distinguishing SERK from other RLKs is the presence of a Serine-Proline-Proline motif (SPP) located between five LRR and the transmembrane (TM) domain (Hecht *et al.* 2001, De Oliveira *et al.* 2005, Santos *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011, Cueva *et al.* 2012).

It is well known that SERK genes play a crucial role in signal transduction in embryogenic cell development and are expressed during early embryogenesis stages and that expression decreases gradually during subsequent developmental stages of SE: in *Daucus carota* and *Arabidopsis thaliana*, the SERK gene is only expressed in

embryogenic structures but not in the non-embryogenic cultures (Schmidt *et al.* 1997, Hecht *et al.* 2001, Salaj *et al.* 2008).

It have been reported the role of SERK genes in many plant species. However, in *Agave* genus, the SE molecular aspects have not been studied and those genes related with that process have not been identified. In this study, a partial SERK gene from *A. angustifolia* (called AaSerk) was characterized for the first time. Our results could serve to optimize SE regeneration rate and genetic transformation process.

Materials and methods

Establishment of embryogenic culture. Aseptic mature zygotic embryos were dissected from *Agave angustifolia* seeds and used as initial explants for callus induction (Fig. 1a). Embryogenic callus (Fig. 1b) cultures were induced on quarter-strength Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog 1962) with 3.0 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1.0 mg L⁻¹ 6-benzyladenine (BA) as plant growth regulators and incubated over a period of 60 days (Arzate-Fernández and Mejía-Franco 2011). *In vitro* cultures were incubated in 16 h/8 h light/dark cycles, with cool white light (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25 \pm 2 °C. After 120 days of culture initiation, mature somatic embryos were observed (Fig. 1c).

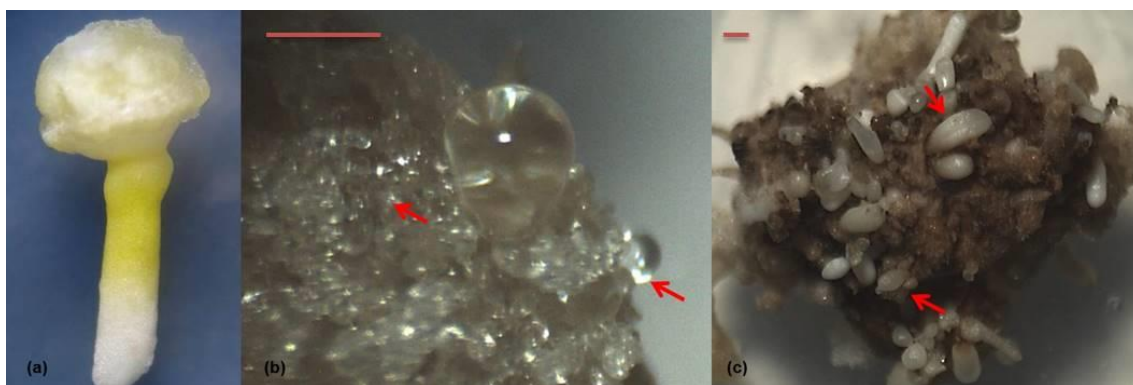


Figure 1. *Agave angustifolia* somatic embryogenesis process. (a) Callus at the initial stage of induction (10 days after the induction). (b) Callus with some globular somatic embryos (arrows) (60 days after the induction), embryogenic callus used for SERK gene isolation. (c) Callus with mature somatic embryos (arrows) (120 days after the induction). Bar = 5mm.

Cloning and sequencing of Agave angustifolia SERK (AaSERK) gene. Genomic DNA was extracted from 60 day old embryogenic callus (Fig. 1b) following the method of CTAB (Doyle and Doyle 1990). The DNA was dissolved in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0). The quality and concentration of the extracted DNA was checked by agarose gel electrophoresis and biophotometry (Eppendorf AG, Germany), respectively.

To amplify *Agave angustifolia* SERK fragment, degenerated primers were designed based on consensus maize, rice, carrot, Arabidopsis and *Cyrtocilum loxense* SERK sequences stored in the NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) database. Primers were designed from conserved regions and had the following sequences: forward 5'NTGGTGAGGTGGCGGAGG3' and reverse 5'TGTHACRTGGGTRTNCTTCTARTCCAT3'. Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out with those primers. Amplification reactions were set at a final volume of 10 µl containing 10 ng genomic DNA, 6.3 µl Taq DNA polymerase buffer, 5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂, 1 U My Taq DNA Polymerase (Bioline, USA) and 0.4 µM each of forward and reverse primers (Sigma, USA). The thermal amplification parameters for the PCR reaction were as follows: an initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of amplification (95 °C for 30 s, 47.5 °C for 30 s, 72 °C for 2 min) and a final extension step at 72 °C for 10 min. Amplifications were carried out in a Thermal Cycler (Multigene Optimax, Labnet, USA). The PCR products were subjected to 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis and visualized in a gel documentation system (UVP Transilluminator 95-0403-01, UK).

The fragment of AaSERK, amplified from genomic DNA, was purified using GenElute™ PCR Clean-up Kit (Sigma, USA) essentially abiding by the manufacturer's instructions and sequenced twice (from both directions with forward and reverse primers) at the Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) and at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). BLASTn and BLASTx were used to compare nucleotides and translated sequences, respectively. Sequences showing the most significant nucleotide and amino acid sequence homology were used in multiple sequence alignments with Mega 6.0 and conserved domains were identified.

To analyze the relationship between AaSERR protein and known SERR protein sequences of other six phylogenetic closer (according to identity percentage) species, a consense and unrooted phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method as provided by the Mega program (version 6.06).

Results

A partial fragment of AaSERR gene (968 nucleotides long, which encodes a protein of 327 amino acids) was obtained after sequencing. The sequence obtained was submitted to the GenBank with accession number APX18295.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1134518461).

In our study, the obtained amino acid sequence of AaSERR had a high percentage of identity with other SERR proteins (more than 80%), the maximum similarity was observed with *Cyrtochilum loxense* C1SERR (97%, 619 amino acids, CBV98085.1), *Dendrobium catenatum* DcSERR (97%, 633 amino acids, AKN89445.1), *Cattleya maxima* CmSERR (89%, 357 amino acids, CCD32850.1), *Ananas comosus* AcSERR (85%, 629 amino acids, AEC46975.1), *Cocos nucifera* CnSERR (82%, 629 amino acids, AAV58833.2) and *Phoenix dactylifera* PdSERR (82%, 621 amino acids, XP_008780820.1).

The identity of AaSERR was confirmed by the fact that the predicted protein included the domains observed in SERR proteins of other species (Fig. 2). These domains consist of a Signal Peptide (SP) and a Leucine Zipper (ZIP), which has been proven to be involved in the oligomerization of proteins (Shah *et al.* 2001).

Also, the protein carries five LRR domains exposed at the cell membrane that should be responsible for the interaction with other signal molecules (brassinosteroid receptors), external signal perceptions (auto- and transphosphorylation events between the respective intracellular kinase domains) and signal transduction during induction of somatic embryogenesis (Kobe and Deisenhofer 1994, Schwessinger and Rathjen 2015).

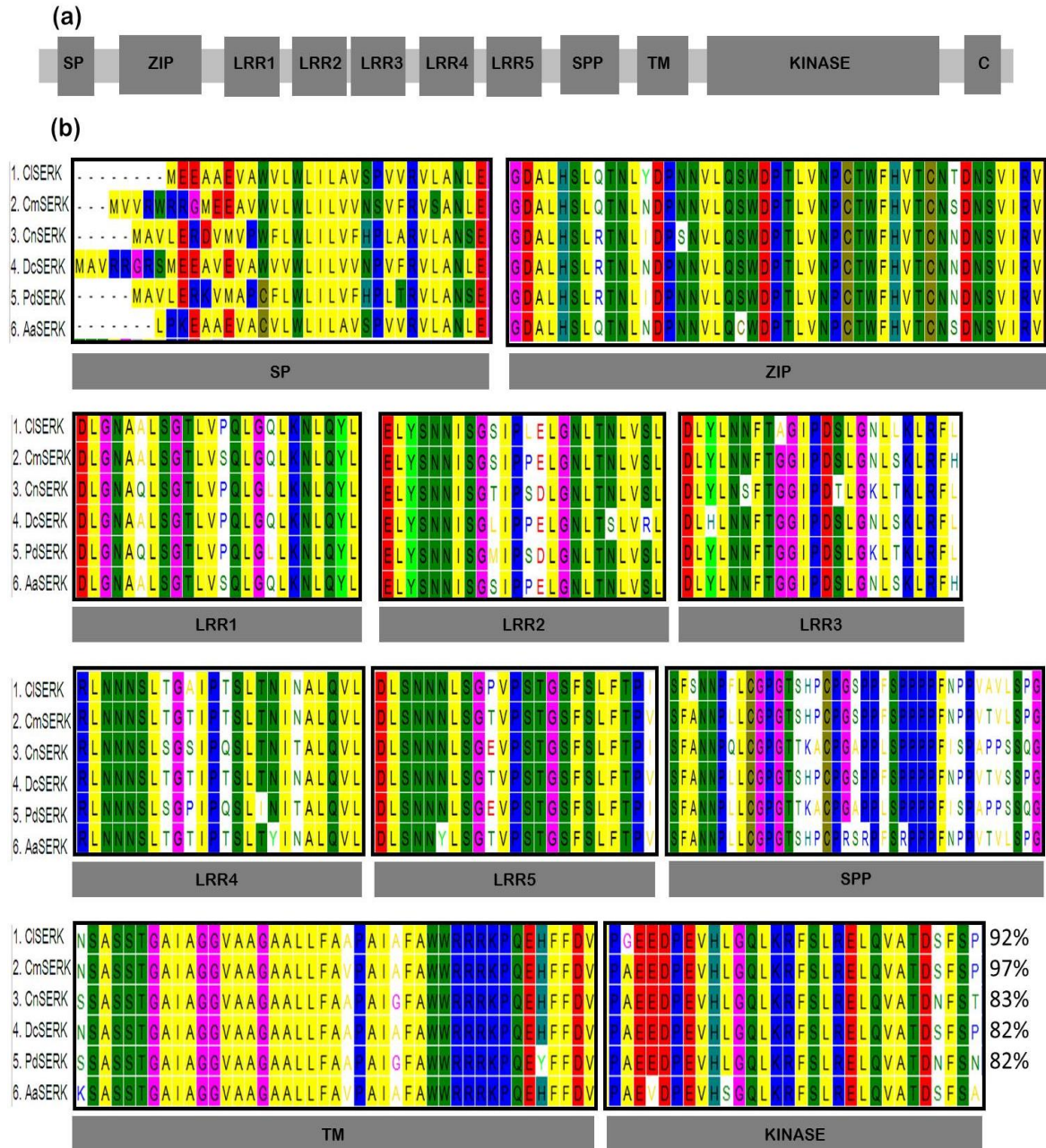


Figure 2. (a). Schematic drawing of the typical domains in a Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK) gene. SP signal peptide, ZIP leucine zipper, LRR leucine-rich repeat, SPP serine-proline-proline motif, TM transmembrane motif, C C-terminal region. **(b).** Structure of the identified *Agave angustifolia* SERK (AaSERK) and alignment of predicted amino acid sequence with some members of SERK family protein kinases (1. *Cyrtochilum loxense* SERK, C1SERK, 97%; 2. *Cattleya maxima* SERK, CmSERK, 89%; 3. *Cocos nucifera* SERK CnSERK, 82%; 4. *Dendrobium catenatum* SERK, DcSERK, 97%; 5. *Phoenix dactylifera* SERK, PdSERK, 82%; 6. AaSERK. Identical amino acid residues in all the listed proteins are highlighted.

Different reports indicate that the length of SERK proteins ranks between 600 and 650 amino acids, however they coincide that the motif SPP, is the distinctive domain of all SERK proteins and is absent in other LRR-RLKs (Schmidt *et al.* 1997, Hecht *et al.* 2001, Salaj *et al.* 2008). It is well known that SPP domain provides flexibility to the extracellular part of the receptor or as a region for interaction with the cell wall (Hecht *et al.* 2001). In our study, it was possible to identify this domain with a high percentage of identity with respect to other SERK proteins of species phylogenetically close to *Agave angustifolia* (Fig. 2b).

Finally, a transmembrane and a kinase domain are highly conserved due to structural restraints imposed by catalytic requirements (Schwessinger and Rathjen 2015).

In the phylogenetic tree we clearly observed that the SERK proteins were grouped according to the two taxonomic groups, the first cluster included the monocot SERK (*Dendrobium catenatum* DcSERK, *Cattleya maxima* CmSERK, *Cyrtochilum loxense* ClSERK, *Agave angustifolia* AaSerk, *Cocos nucifera* CnSERK and *Phoenix dactylifera* PdSERK) and the second cluster included the dicot SERK (*Arabidopsis thaliana* AtSERK) (Figure 3). Moreover, the maximum similarity of AaSerk was observed with the predicted DcSERK, CmSERK and ClSERK.

Discussion

Somatic embryogenesis forms the basis of cellular totipotency in higher plants. Under *in vitro* conditions, one or a few somatic cells of the explant should be competent to receive a signal (endogenous or exogenous) for the developmental restructuring towards the embryogenic pathway. For the genus *Agave*, somatic embryogenesis protocols have been reported for *A. victoria-reginae*, *A. sisalana*, *A. tequilana*, *A. veracruz* and *A. angustifolia* (Rodríguez-Garay *et al.* 1996, Martínez-Palacios *et al.* 2003, Nikam *et al.* 2003, Portillo *et al.* 2007, Tejavathi *et al.* 2007, Arzate-Fernández and Mejía-Franco 2011). However, no reports on the molecular mechanisms of somatic embryogenesis in *Agave* species are available.

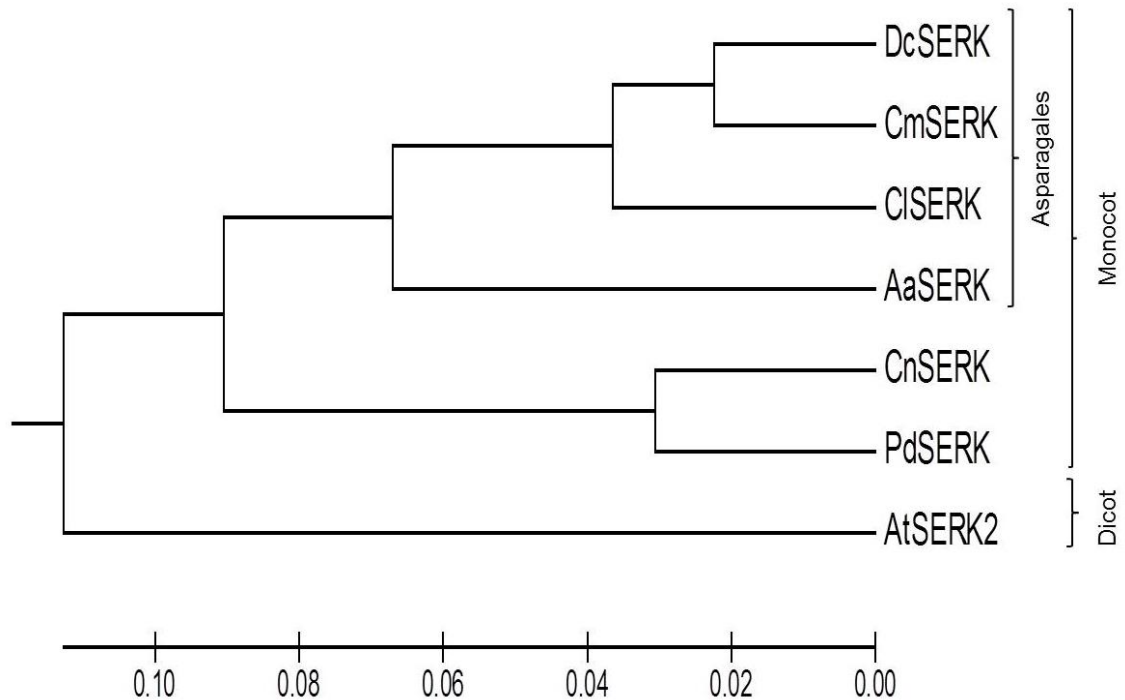


Figure 3. Phylogenetic tree of AaSERK with other reported SERK sequences depicting the interrelationship of different SERKs. *Dendrobium catenatum* SERK (DcSERK), *Cattleya maxima* SERK (CmSERK), *Cyrtochilum loxense* SERK (CIsERK), *Agave angustifolia* (AaSERK), *Cocos nucifera* SERK (CnSERK), *Phoenix dactylifera* SERK (PdSERK) and *Arabidopsis thaliana* SERK (AtSERK).

An understanding of somatic embryogenesis regulation during tissue and organ culture could aid in the development of more effective regeneration and transformation protocols, Schmidt *et al.* (1997) reported the correlation between the expression of SERK gene and the potential of cells to be embryogenic (in the presence of 2,4-D like totipotency-promoter).

The role of SERK in the induction of somatic embryogenesis has been demonstrated in both dicot and monocot plants, however, a partial Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase gene from *Agave angustifolia* (AaSERK) embryogenic callus encoded by a leucine-repeat receptor protein kinase was isolated, characterized and reported in the present study for the first time.

The putative amino acid sequence of AaSERK, like other SERKs, indicates that it functions as a LRR-RLK. The model for RLK function is that the plant RLKs exist as monomers until binding of an extracellular signal molecule induces receptor dimerization.

This brings the intracellular kinase domains of individual monomers into close proximity, allowing transphosphorylation which activates the kinase domains and causes the regulation of cellular response (Becraft 1998, 2002). A variety of approaches have been taken to explain the function of LRR-RLKs; it has been determined that they are crucial in the regulation of some physiological processes such as embryo pattern formation, microsporogenesis, vascular tissue differentiation, meristematic cell maintenance, organ shape and inflorescence morphology, brassinosteroid (BR) signaling and cell death control (Hecht *et al.* 2001, De Oliveira *et al.* 2005, Santos *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011, Cueva *et al.* 2012).

As shown in Fig. 2b, the sequence and structural analyses indicate that AaSERK encodes a typical SERK protein that has conservation roles in plant development and shows a high level of sequence and protein domain homology with other SERK proteins. Also, the characteristic SERK protein domain distribution is also found in the AaSERK, including a signal peptide, a ZIP domain, five LRR units, a Pro-rich domain containing the SPP motif, a transmembrane domain and a Ser-Thr protein kinase.

The phylogenetic analysis (Fig. 3) showed the relationship of AaSERK with the SERK sequences of other plant species. The AaSERK protein was grouped in the same cluster with another monocot SERK especially with the species belonging to order Asparagales (DcSERK, CmSERK and ClSERK); this result indicated that SERKs of these four different plants might have originated from a common ancestor during speciation. The close relationship of AaSERK with reported SERK sequences proved that this gene is highly conserved throughout the plant kingdom.

Also, the high similarity between AaSERK and others SERK genes in amino acid sequence and protein structure indicates that these genes are orthologs and it can be deduced that AaSERK acts a key component mediating somatic embryogenesis where the embryogenic competent cell responds to biochemical and phytohormone signals in a culture medium and develops into a somatic embryo. For example, in *Arabidopsis thaliana*, the AtSERK1 gene is highly expressed during early embryogenesis stages (Hecht *et al.* 2001). Likewise, in *Zea mays*, the ZmSERK1 and ZmSERK2 genes are expressed in embryogenic calluses at all stages and, surprisingly, in non-embryogenic callus (Baudino *et al.* 2001). On the other way, in *Solanum tuberosum*, in the presence of

exogenous 2,4-D, the expression of StSERK1 gene increased during embryogenic initiation, suggesting that its expression was triggered by the auxin (Sharma *et al.* 2008).

However, the level expression analysis of the contribution of the SERK gene should be continued in order to determine the embryogenic potential of somatic cells before any morphological changes appear and to provide information on molecular regulation of somatic embryogenesis, as an alternative for mass propagation and conservation of agave species.

Acknowledgments

This research was funded by the Universidad Autónoma del Estado de México (Project 3666/2014UNT-FS). We are grateful to Ph.D. Vázquez-Chagoyán and M.Sc. Gabriel Martínez for their help with the sequence analysis. The first author sincerely acknowledges CONACyT for the financial support.

Literature cited

- Arzate-Fernández A.M. and Mejía-Franco R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Revista Fitotecnia Mexicana **34(2)**:101-106.
- Baudino S., Hansen S., Brettschneider R., Hecht V., Dresselhaus T., Lorz H., Dumas C. and Rogowsky P. 2001. Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* **213**:1–10.
- Becraft P.W. 1998. Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Sci* **3**:384–388.
- Becraft P.W. 2002. Receptor kinase signaling in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**:163–192.
- Cueva A., Conica L. and Cella R. 2012. Molecular characterization of a *Cyrtochilum loxense* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* **31**:1129–1139.

- Delgado-Lemus A., Torres I., Blancas J. and Casas A. 2014. Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **10**:53.
- De Oliveira S.M., Romano E., Clemente K., Penha M., Barreto A.B. and Lima F. 2005. Characterisation of the cacao Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci* **168**:723–729.
- Doyle J.J. and Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**:13–15.
- Ezhova T.A. 2003. Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. *Russian Journal of Developmental Biology* **34(4)**: 197–204.
- Fisher K. and Turner S. 2007. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr Biol* **17**:1061–1066.
- He K., Gou X., Yuan T., Lin H., Asami T., Yoshida S., Russell S.D. and Li J. 2007. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Curr Biol* **17**:1109–1115.
- Hecht V., Vielle-Calzada J.P., Hartog M.V., Schmidt E.D.L., Boutilier K., Grossniklaus U. and De Vries S.C. 2001. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* **127**:803–816.
- Guzzo F., Baldan B., Mariani P., LoSchiavo F. and Terzi M. 1994. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J Exp Bot* **45**:1427–1432
- Hu H., Xiong L. and Yang Y. 2005. Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cells and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**:107–117.
- Kobe B. and Deisenhofer J. 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**:415–421.
- Ma Y., Qin F. and Tran L.S. 2012. Contribution of genomics to gene discovery in plant abiotic stress responses. *Molecular Plant* **5(6)**: 1176-1178.
- Nodine M.D., Yadegari R. and Tax F.E. 2007. RPK1 and TOAD2 are two receptor-like kinases redundantly required for *Arabidopsis* embryonic pattern formation. *Dev Cell* **12**:943–956.

- Salaj J., Recklinghausen I.R., Hecht V., de Vries S.C., Schel J.H.N. and van Lammeren A.A.M. 2008. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Biol* **46**:709–714.
- Santos M.O., Romano E., Vieira L.S., Baldoni A.B. and Aragao F.J.L. 2009. Suppression of SERK gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. *Plant Biol* **11**:83–89.
- Schmidt E.D., Guzzo F., Toonen M.A. and de Vries S.C. 1997. A leucine rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*. **124**:2049–2062.
- Schwessinger B. and Rathjen J.P. 2015. Changing SERKs and priorities during plant life. *Trends Plant Sci* **20(9)**: 531-533.
- Shah K., Gadella T.W., van Erp H., Hecht V. and de Vries S.C. 2001. Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *J Mol Biol* **309**:641–655.
- Sharma S.K., Millam S., Hein I., and Bryan G.J. 2008. Cloning and molecular characterization of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* **228**:319–330
- Zhang S., Liu X., Lin Y., Xie G., Fu F., Liu H., Wang J., Gao S., Lan H. and Rong T. 2011. Characterization of a ZmSERK gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* **105**:29–37.
- Zhao D.Z., Wang G.F., Speal B. and Ma H. 2002. The EXCESSMICROSPOROCTES1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* **16**:2021–2031.