

LOS COMPUESTOS NITROGENADOS EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA DE LA CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum spp*).

Nieves, N.; Cid, M.; González, R.; Sagarra, F.; Lezcano, Y.; Blanco, M.; Castillo, R.

Centro de Bioplantas, UNICA, Carret. Morón, Km. 9, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba. E-mail: nnieves@bioplantas.cu

RESUMEN

El objetivo del trabajo es evaluar la dinámica de compuestos nitrogenados (proteínas solubles totales, prolina libre y poliaminas) en el explante, la fase de histodiferenciación en callos y las plántulas obtenidas a partir de los embriones somáticos germinados de caña de azúcar, variedad CP 52-43. *Es conocido que el nitrógeno* es, de todos los nutrientes de las plantas, el que juega el papel más importante en el crecimiento de las mismas. Consecuentemente, se ha puesto mucha atención en el metabolismo de este elemento, así como los compuestos relacionados, los cuales influyen marcadamente en los procesos fisiológicos y por tanto en la calidad de las plantas. Algunos se han identificado como discriminantes entre tejidos embriogénicos y no embriogénicos. Entre ellos están las proteínas (Sung y Okimoto, 1981; Komamine *et al.*, 1992), la prolina (Phang, 1985) y las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) (Waie y Rajam, 2003). Los métodos y materiales empleados fueron: Para la obtención de callos se trabajó con segmentos de hojas de plantas cultivadas en campo que se implantaron en medio semisólido en dos variantes: con arginina y sin arginina como fuente aminoacídica sobre un medio MS. En los *resultados* se encontró una marcada influencia de la arginina sobre todos los indicadores evaluados. En los callos procedentes del medio enriquecido con arginina se encontraron los mayores valores de proteínas solubles, prolina libre y poliaminas. Los momentos de mayor incremento para las proteínas y prolina libre fue a los 14 y 21 días del proceso de histodiferenciación. De las tres poliaminas evaluadas (Putrescina, Espermidina y Espermina) la Putrescina alcanzó los mayores valores y la espermina los menores, principalmente en el medio carente de arginina. La razón Put/Spd + Spm fue menor en los callos procedentes del medio con arginina. El explante es rico en todos los indicadores evaluados y las plántulas tuvieron una marcada influencia de la arginina del medio. El mayor número de embriones se encontró en la línea de callos establecida en el medio enriquecido con el aminoácido. La influencia de la arginina se vio reflejada también en las plántulas obtenidas a partir de los embriones germinados, con un comportamiento similar al encontrado en los callos.

Palabras clave: *Compuestos nitrogenados, embrión somático, histodiferenciación.*

ABSTRACT

The objective of the work is to evaluate the nitrogen compound dynamics (total soluble proteins, free proline and polyamines) in the explant source, the histodifferentiation phase in calluses and plantlets from sugarcane var. CP-5243 somatic embryos germinated. It is known that nitrogen is the all nutrients of the plants, which plays the most important role in plant growth and develop. Consequently, much attention has been put in the metabolism of this element, as

well as the other related compounds, which influence noticeably in the physiological processes and therefore in the quality of the plants. Some have been identified as discriminated between embryogenic and nonembryogenic calluses. Among them are the proteins (Sung and Okimoto, 1981; Komamine *et al.*, 1992), the proline (Phang, 1985) and the polyamines (putrescine, spermidine and spermine) (Waie and Rajam, 2003). For the obtaining of calluses was worked with segments of leaves of plants cultivated in field, that were implanted on semisolid medium in two variants: with arginine and without arginine as aminoacidic source. During the course of the experiment were evaluated soluble protein, free proline and polyamines. Was found a noticeable influence of the arginine on all the evaluated indicators. In the calluses coming from medium enriched with arginine were observed the greater values of soluble proteins, free proline and polyamines. The moments of greater increase for proteins and free proline was at 14 and 21 days in the histodifferentiation process. Of the three evaluated polyamines (putrescine, spermidine and spermine) the putrescine reached the greater values and the spermine the minors, mainly in medium devoid of arginine. The Put/Spd + Spm reason was smaller in the calluses coming from medium with arginine. The explants are rich in all the evaluated indicators and plantlets had a noticeable influence of the arginine of means. The greater number of embryos was in the line of calluses established in medium enriched with the amino acid. The influence of the arginine was also reflected in plantlets obtained from the germinated embryos, with a similar behaviour found in calluses.

Key words: *Histodifferentiation, nitrogen compounds, somatic embryo.*

INTRODUCCIÓN

Algunas variables bioquímicas se han identificado como discriminantes entre tejidos embriogénicos y no embriogénicos. Entre ellas están las proteínas. Las mismas son valiosos indicadores de la diferenciación y podrían ser útiles para identificar estados específicos del desarrollo del embrión somático (Menéndez *et al.*, 1994). La prolina ocupa un papel central en el metabolismo de las plantas. Es un activador efectivo de algunas enzimas del ciclo de Krebs y se considera como un compuesto de almacenaje de nitrógeno. (Phang, 1985).

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) se consideran reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas, por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular a bajas concentraciones. Por su capacidad de unirse a macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos pueden alterar la expresión génica, la actividad de ciertas enzimas, así como variar la fluidez y permeabilidad de las membranas biológicas (Waie y Rajam, 2003).

En caña de azúcar no se ha establecido aún un protocolo repetitivo mediante el cual se logre una elevada producción de embriones somáticos de forma sincrónica y con elevada calidad, así como existe muy poca información acerca de los procesos bioquímicos que ocurren en el transcurso de éstos y que puedan utilizarse como herramientas para el manejo de los mismos.

El objetivo del trabajo es evaluar la influencia del suplemento de arginina en la histodiferenciación y regeneración de callos de caña de azúcar y relacionar su efecto con la dinámica de las poliaminas, las proteínas solubles totales y la prolina libre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo: El trabajo se realizó en caña de azúcar en la variedad CP52-43, un híbrido proveniente de CP43-64 x CP38-34, Canal Point, FL, USA. Para la obtención de callos se utilizó la hoja más interna, enrollada, la cual se cortó en secciones de 1 cm de largo, para su implantación en placas de Petri que contenían 25 ml de medio de formación de callos compuesto por el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con 30 g/l de sacarosa y 50 mg l⁻¹ de arginina, en dos variantes: con arginina y sin arginina como fuente aminoacídica. Durante toda la marcha del experimento se mantuvieron ambas líneas de callos hasta la fase de diferenciación.

Los callos se subcultivaron tres veces en un medio similar, con el 2,4-D reducido a 1 mg l⁻¹. Posteriormente se pasaron a un medio de diferenciación-maduración según Tapia et al. (1999). A los catorce días se realizó el conteo y clasificación de los embriones (globular, escutelar temprano y escutelar tardío). A los 21 días se pasaron a un medio de endospermo (Nieves et al. 1998).

En el momento del montaje de la experiencia (tiempo 0) y a los 7, 14, y 21 días se tomaron muestras para la determinación de los indicadores bioquímicos. A los 35 días se evaluaron las características de las plantas obtenidas a partir de los embriones somáticos. Para el experimento se emplearon 12 placas de Petri con 8 callos cada una, de las cuales se tomaron tres réplicas para cada momento evaluado (7, 14 y 21 días) y se mantuvieron las tres restantes para la evaluación de las plántulas a los 35 días.

Determinaciones bioquímicas: Proteínas solubles: Se trituraron 50 mg de tejido y se extrajeron en buffer borato- salino pH=8.5. La cuantificación se realizó según el método propuesto por Bradford (1976).

Prolina libre: Se realizó con 100 mg de tejido y se siguió el método descrito por Bates et al. (1973) tanto para la extracción como la cuantificación.

Poliaminas: Se utilizaron 100 mg de tejido fresco los que se extrajeron acorde al método de Flores y Galston (1982). Los contenidos se determinaron por HPLC.

Procesamiento estadístico: Se utilizaron las pruebas paramétricas (ANOVA) y no paramétricas (Kruskal-Wallis y Student Newman Keuls) por el paquete estadístico SPSS (Versión 8.0 para Windows). Para las poliaminas se realizó análisis de regresión para establecer curvas de juste. Los datos en porcentaje se transformaron: $x' = 2 * \text{Arcsen} \sqrt{(n/100)}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el efecto de la arginina en el comportamiento de las proteínas solubles en el explante, la dinámica de crecimiento de los callos y las plántulas a los 35 días de la diferenciación.

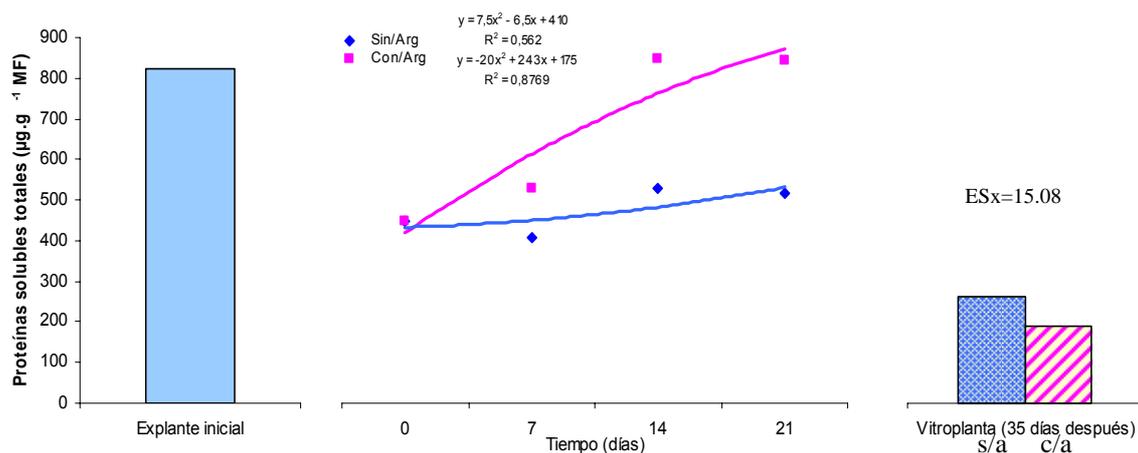


Fig 1. Proteínas solubles totales en el explante, etapa de diferenciación y las plantas germinadas a partir de medios enriquecidos o no con arginina.

La dinámica de los callos fue evaluada por análisis de regresión para establecer las curvas de ajuste. *Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Student Newman Keuls) para $p < 0.05$.*

El comportamiento de las proteínas solubles siguió la misma dinámica en ambas líneas de callos, aunque en aquellos que no recibieron el suplemento de arginina los valores fueron muy bajos. En ambos casos los mayores niveles de proteínas se observaron a los 14 y 21 días. El explante mostró altos contenidos de proteínas, similares a los presentados por los callos cultivados en medio con arginina a los 14 y 21 días. Las plántulas, a los 35 días, de germinadas presentaron los valores más bajos de todos los momentos evaluados, sin diferencias estadísticas entre ellas.

La acumulación de productos de reserva en la fase de maduración juega un papel esencial en la posterior supervivencia de la plántula al proveer compuestos que son utilizados por el embrión para la germinación y hasta el desarrollo de la autotrofia. Dentro de ellos se encuentran las proteínas, ellas proveen carbono, nitrógeno y azufre (Sánchez-Romero et al., 2002). La dinámica seguida por las proteínas estuvo regulada por la acción de la arginina como fuente de nitrógeno para su proceso biosintético. Los máximos valores encontrados de los 14 a los 21 días del curso del experimento, coincidente con la formación de los estados más desarrollados del embrión somático, mientras que la decadencia en las plantulitas denota su utilización en los procesos metabólicos asociados con el crecimiento y desarrollo de las mismas.

En la figura 2 se muestra el comportamiento seguido por la prolina libre en el explante, la fase de callo en la histodiferenciación y las plántulas a los 35 días.

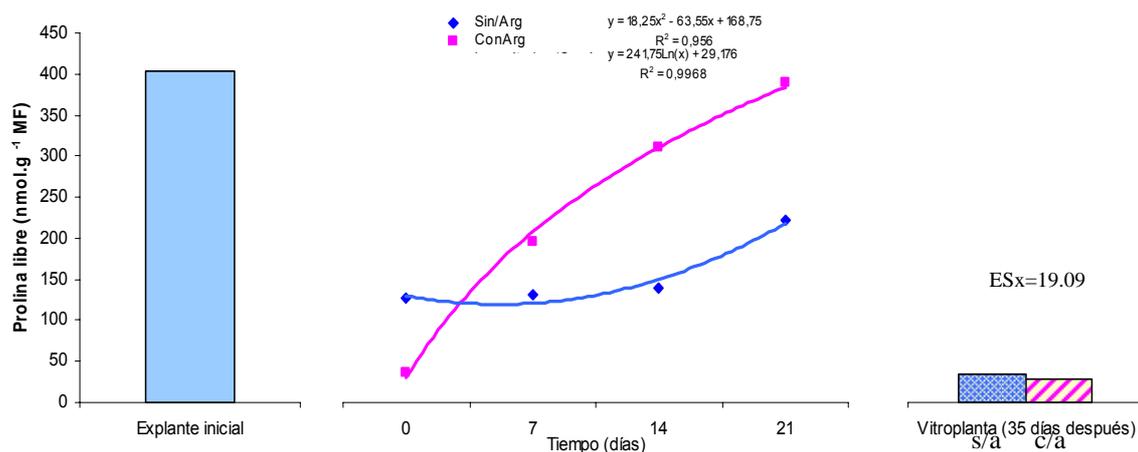


Fig 2. Prolina Libre en el explante, en la fase de histodiferenciación y regeneración de callos de caña de azúcar y las plantulas cultivadas en medios enriquecidos o no con arginina.

La dinámica de los callos fue evaluada por análisis de regresión para establecer las curvas de ajuste. *Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Student Newman Keuls) para p<0.05.*

La prolina libre evaluada durante el proceso mostró un incremento constante en el tratamiento suplementado con arginina, mientras que en el tratamiento carente del aminoácido los valores se mantuvieron estables hasta los 14 días con un ligero incremento en la etapa final de germinación de los embriones. Los contenidos de prolina libre en el tejido del explante fueron muy similares a los encontrados en las etapas finales de esta fase en el medio enriquecido con arginina, no así en las plantas *in vitro*.

Uno de los factores que modula los mecanismos de formación de embriones en plantas es la prolina. Una estimulación del metabolismo de la prolina puede consumir NADPH y estimular el ciclo de las pentosas fosfato para sintetizar la ribulosa, un requisito previo para la síntesis de purina y posteriormente los ácidos nucleicos. La arginina puede contribuir a la biosíntesis de prolina vía ornitina como un resultado de la actividad catalítica de la arginasa (Lin *et al.*, 2002).

Las diferencias en los niveles de prolina en el explante y las plantas *in vitro* parecen estar asociadas las condiciones en que se encuentran, las primeras bajo condiciones ambientales y las segundas en un ambiente controlado donde el estrés es mínimo. En ambas líneas de callos la presencia de la arginina favoreció las vías metabólicas de la prolina.

En la figura 3 se muestra la dinámica de las poliaminas totales en los callos sometidos a tratamientos diferenciados por el suplemento de arginina, así como el contenido de las mismas en la fuente de explante y las plantas obtenidas a través de la germinación de los embriones somáticos.

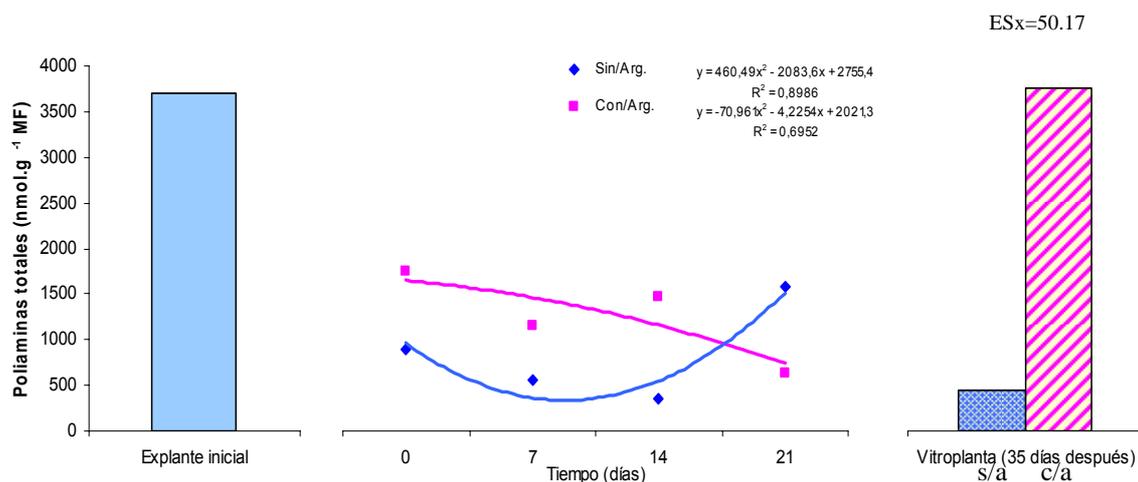


Fig 3. Poliaminas totales en el explante, los callos cultivados con y sin arginina en la fase de histodiferenciación y en las plántulas obtenidas a partir de los embriones somáticos.

La dinámica de los callos fue evaluada por análisis de regresión para establecer las curvas de ajuste. *Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Student Newman Keuls) para $p < 0.05$.*

Los callos suplementados con arginina presentaron los valores más elevados de poliaminas totales desde cero hasta los 14 días, aunque en la etapa final de germinación de los embriones disminuyeron sus contenidos. En el caso de los callos carentes del aminoácido los niveles de poliaminas fueron muy bajos, principalmente a los 7 y 14 días, con un incremento marcadamente a los 21 días, llegando a ser superiores a la línea tratada con dicho aminoácido. Los contenidos de poliaminas totales en el tejido de las plantas *in vitro* fue similar al del explante en el tratamiento suplementado con arginina.

En los últimos años se ha puesto considerable atención al papel de las poliaminas, principalmente la putrescina, la espermidina y la espermina en diferentes procesos del desarrollo de las plantas (Martin-Tanguy, 2001; Couée et al., 2004), en la embriogénesis cigótica (Nieves et al., 1997) y en la somática en particular (Yadav y Rajam, 1998). Ellas modulan algunos procesos de crecimiento y desarrollo tales como división celular, diferenciación, floración, maduración del fruto, senescencia, embriogénesis y rizogénesis (Kakkar et al. 2000). Las poliaminas y sus precursores son considerados esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y microorganismos (Quan et al., 2002).

Los resultados encontrados en el trabajo muestran la marcada presencia de estos compuestos en los tejidos de caña de azúcar, tanto en el material adulto como en la fase de histodiferenciación en callos y en las plántulas logradas a partir de los embriones somáticos germinadas. Se hace evidente además la influencia de la arginina como precursor primario de las poliaminas en la embriogénesis somática del cultivo, lo cual se puede ver reflejado en la posterior manifestación de la diferenciación de los embriones.

En la tabla 1 se muestra el conteo y clasificación de embriones a los 14 días del experimento.

Tabla 1. Conteo y clasificación de embriones en los callos tratados o no con arginina. Letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA, Duncan, $p \leq 0.05$).

Tratamientos	Globular	Esc.Temp	Esc.Tard	Germ.	Raíces	Emb/50 mg De callo
C/Arginina	0,50a	5,38a	5,50 ^a	4,00a	0,50a	15,75a
S/Arginina	0,19b	2,94b	4,87 ^a	2,06b	0,50a	10,56b

Los callos procedentes del medio con arginina produjeron mayor número de embriones que los que se cultivaron en el medio no enriquecido con este suplemento. En el tratamiento sin arginina el mayor número de embriones se concentró principalmente en el estado escutelar tardío, mientras que en la línea con arginina se ubicaron en los tres estadios superiores (escutelar temprano, escutelar tardío y germinados) proporcionalmente.

En la tabla 2 se muestra la evaluación de las plantas a los 35 días de la diferenciación de los embriones.

Tabla 2. Estado de desarrollo de las plantas a los 35 días de los tratamientos. Letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA, Duncan, $p \leq 0.05$).

	C/Arginina	S/Arginina
Plantas/50 callo	mg 12,30a	7,40b
Altura	2,56a	2,41a
No. de hojas	3,34a	3,99a
No. de raíces	2,98a	1,76a

El estado de desarrollo de las plantas, evaluado a los 35 días, muestra que el suplemento o la restricción de la arginina no influyó estadísticamente en las variables de crecimiento, aunque sí en el número de plantas, en lo cual el tratamiento con arginina casi duplica al que no contó con este aminoácido.

Es bien conocido que la arginina es provee un alto nivel de nitrógeno reducido y que puede jugar un papel en el desarrollo de las plantas por su conversión desde la putrescina hasta espermidina y espermina, lo cual ha sido implicado en la regulación del crecimiento y desarrollo celular (Slocum, *et al.*, 1984).

CONCLUSIONES

La arginina influyó en el proceso a través de los mecanismos de síntesis de los compuestos nitrogenados, lo cual se reflejó en el comportamiento de las proteínas, la prolina libre y las poliaminas, que en los momentos claves de la diferenciación presentaron niveles superiores a los mostrados en el tratamiento carente del aminoácido.

REFERENCIAS

- Bates, LS.; Waldron, RP.; Teare, LD. (1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39(1): 205-207.
- Bradford, MM. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Ann. Bioch.* 72: 248-254.
- Couée, I.; Hummel, I.; Sulmon, C.; Gouesbet, G.; El Amrani, A. 2004.** Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.76: 1–10, 2004. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*
- Flores, HE.; Galston, AW. 1982.** Analysis of polyamines in higher plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69:701-706.
- Kakkar, RK.; Bhaduri, S.; Rai, VK.; Kumar, S. 2000.** Amelioration of NaCl stress by arginine in rice seedlings: changes in endogenous polyamines, *Biol. Plant* 43: 419-422.
- Lin, CC.; Hsu, YT.; Kao, CH. 2002.** The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 36: 275–285.
- Martin-Tanguy, J. 2001.** Metabolism and function of polyamines in plants: Recent development (new approaches). *Plant Growth Regul.* 34: 135–148.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Nieves, N.; Lorenzo, JC.; Blanco, MA.; González, JL.; Peralta, H.; Hernández, M.; Santos, R.; Concepción, O.; Borroto, E.; Borroto, CG.; Tapia, R.; Martínez, M.; Fundora, Z. (1998).** Artificial endosperm by zygotic embryos of Cleopatra tangerine (*Citrus reshni* Hort ex Tan). A model by somatic embryos encapsulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 52 (2): 77-78.
- Nieves, N.; Martínez, ME.; Blanco, MA; González, JL; Borroto, E.; Lorenzo, JC.; Portilla, Y. 1997.** Changes in soluble proteins and polyamines during citrus seed germination. *Fruits* 53(1): 25-30.
- Phang, JM. (1985).** The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr. Top. Cell Regul.*, 25 92-132.
- Quan, Y. Minocha, S.; Minocha, C. 2002.** Genetic manipulation of polyamine metabolism in poplar II: Effects on ethylene biosynthesis *Plant Physiol. Biochem.* 40: 929–937.
- Sánchez-Romero, C. Perán-Quesada, R. Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F. 2002.** Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1043–1049.
- Santos, M.; Claparols, I.; Torné, JM. 1993.** Effect of exogenous arginine, ornithine, methionine and -amino butiric acid on maize (*Zea mays* L.) embryogenesis and polyamine content. *J.Plant Physiol.* 142:74-80.
- Slocum, R.D.; Kaur-Sawhney, R.; Galston, AW. 1984.** The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235:283-303.
- Tapia, R.; Castillo, R.; Nieves, N.; Blanco, M.A.; González, J.L.; Sánchez, M.; Rodríguez, Y. (1999).** Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) var. CP 5243. *Biología Aplicada.* 16(1): 20-23.
- Waie, B.; Rajam, MV. 2003.** Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine Gene. *Plant Science* 164 727-734.
- Yadav, JS.; Rajam, MV. 1998.** Temporal Regulation of Somatic Embryogenesis by Adjusting Cellular Polyamine Content in Eggplant. *Plant Physiol.* 116: 617–625.