

RELACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON LA CAPACIDAD REGENERATIVA DE SUSPENSIONES CELULARES HOMOGÉNEAS EN CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* sp), CULTIVAR CP52-43

María A. Blanco✉, R. Castillo, Margelys Sánchez, Janet Quiñones, Iris Capote, Nadina Nieves y J. L. González

ABSTRACT. The morphological and biochemical characteristics of embryogenic and non-embryogenic cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp) CP52-43 cv, established from immature inflorescence calluses are evaluated. Morphological and chemical differences in both lines related to fresh weight, meristematic cell number and protein concentration were observed. Homogeneous cell suspension growth on a solid regeneration medium formed a type 4 non-embryogenic callus, from which plants could not be regenerated. The relative amount of intra and extracellular proteins during an undifferentiated growth showed changes in extracellular protein patterns.

Key words: sugarcane, somatic embryogenesis, proteins

RESUMEN. En el trabajo se evalúan las características morfológicas y bioquímicas de suspensiones celulares embriogénicas y no embriogénicas de caña de azúcar (*Saccharum* sp) de la variedad CP52-43, a partir de callos obtenidos de inflorescencias inmaduras. Se observaron diferencias morfológicas y químicas en ambas líneas en relación con la masa fresca, el número de células meristemáticas y la concentración de proteínas. El crecimiento de las suspensiones celulares homogéneas sobre un medio sólido de regeneración formó un callo del tipo 4 no embriogénico, a partir del cual las plantas no pueden ser regeneradas. La cantidad relativa de proteínas intra y extracelulares durante el crecimiento no diferenciado demostró cambios en los patrones de proteínas extracelulares.

Palabras clave: caña de azúcar, embriogénesis somática, proteínas

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un fenómeno complejo en el tejido de plantas. Factores tales como el genotipo, las condiciones de crecimiento de la planta donadora, la concentración de auxinas, el medio nutriente y el estado de desarrollo de los explantes contribuyen al desarrollo del embrión (1). Se considera en la actualidad el mejor camino para expresar la totipotencia en cultivo de tejidos de monocotiledóneas. La iniciación y el mantenimiento del cultivo embriogénico se ha estudiado para varias gramíneas, incluida la caña de azúcar (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). El callo embriogénico crece rápidamente y da lugar a plantas con orígenes en la embriogénesis somática, mientras que el callo no embriogénico crece lentamente de una manera desorganizada y por organogénesis forma brotes/raíz que pue-

den ser visualmente distinguibles. La capacidad regenerativa de estos callos implica las diferencias en la expresión de genes (12).

A pesar de los esfuerzos hechos en los últimos cinco años en las investigaciones sobre los marcadores de la embriogénesis, se han identificado pocos genes que se expresan específicamente durante los estados tempranos de la embriogénesis y sus funciones aún no están claras (13, 14). Las principales razones son las dificultades técnicas asociadas con la razón de masa del embrión y el tejido materno que lo rodea, y la falta de competentes marcadores moleculares y celulares (15).

Para desarrollar un profundo conocimiento de la regulación de la embriogénesis, es necesario investigarla a nivel molecular. Se ha demostrado en numerosas especies que las proteínas están asociadas con el potencial embriogénico y la regeneración de plantas en sus correspondientes cultivos. Teniendo en cuenta los pocos conocimientos bioquímicos que se tienen sobre la embriogénesis somática en la caña de azúcar, este trabajo se propone relacionar el contenido de proteínas con la capacidad morfogenética de suspensiones celulares homogéneas en caña de azúcar cultivar CP52-43.

Ms.C. María A. Blanco, Investigador Titular; R. Castillo, Investigador Agregado; Margelys Sánchez, Profesor Asistente; Janet Quiñones e Iris Capote, Especialistas; Nadina Nieves, Investigador Auxiliar y Dr.C. J. L. González, Investigador Titular del Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), carretera a Morón km 9½, Ciego de Ávila, CP 69 450.

✉ mblanco@bioplantitas.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material vegetal. En los experimentos se utilizaron plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp) cv CP52-43, las cuales se obtuvieron de la Estación Provincial de Investigación de la Caña de Azúcar (EPICA), Ciego de Avila. Las plantas se seleccionaron sin síntomas visibles de enfermedades.

Composición del medio de cultivo. Como medio basal se emplearon las sales y vitaminas del medio Murashige y Skoog (MS) (16). Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1.2 kg.cm⁻² de presión. El pH se ajustó a 5.8 previo a la esterilización.

Todos los medios de cultivo utilizados en los experimentos tenían un suplemento de cisteína (50 mg.L⁻¹) como antioxidante.

Condiciones de crecimiento. La manipulación de los cultivos en medio sólido y de las suspensiones celulares, se realizó en condiciones de esterilidad con el empleo de una cámara de flujo laminar.

El establecimiento tanto de los callos como de las suspensiones celulares se realizó en condiciones controladas de temperatura (27±2.0°C) y en la oscuridad. Las suspensiones celulares se cultivaron en erlenmeyers sobre una zaranda orbital (RETOMED, Modelo 20001) a 100 rpm.

Establecimiento de callos embriogénicos y no embriogénicos. Para el establecimiento de los callos se utilizaron segmentos de inflorescencias inmaduras (3-5 mm) de caña de azúcar (*Saccharum* sp) var. CP52-43 como fuente de explante. El cultivo de callos embriogénicos se inició sobre un medio MS suplementado con 2,4-D (13.5 µM) durante 30 días. Los callos se subcultivaron cada 15-20 días en un medio MS suplementado con arginina (50 mg.L⁻¹), prolina (500 mg.L⁻¹) y 2,4-D (4.5 µM). **Clasificación morfológica de los callos.** La clasificación de los callos en embriogénicos y no embriogénicos se realizó de acuerdo con su morfología; así, se agruparon en callos embriogénicos (CE) aquellos con características nodulares y compactos, y callos no embriogénicos (CNE) con características friables (17).

Establecimiento de suspensiones celulares homogéneas embriogénicas y no embriogénicas. Para el establecimiento de las suspensiones homogéneas se partió de callos embriogénicos y no embriogénicos de dos meses de edad y se realizó de acuerdo al protocolo descrito (2). Las suspensiones se tomaron siete días después de estar establecidas (42 días) en la fase de crecimiento rápido, con las siguientes características: suspensión fina con un alto porcentaje de células meristemáticas (60-70 %). El número de células se determinó de acuerdo con el método establecido por King (18).

Regeneración de plantas. Se tomó 1 mL del cultivo y se colocó sobre placas de Petri (9x50 mm) que contenían medio MS sólido suplementado con CH (caseína hidrolizada) (500 mg.L⁻¹) y 2,4-D (4.5 µM). Las placas se incubaron en la oscuridad a 25±2°C. Los callos obtenidos se transfirieron a medio MS para el posterior creci-

miento y formación de plantas. Las suspensiones no embriogénicas se usaron como control.

Determinación de proteínas. Para ello se tomaron 10 mL de cada una de las suspensiones embriogénicas y no embriogénicas, y se centrifugaron a 4000 g por 10 min a 4°C para separar las células del medio.

Proteínas intracelulares (PI). Las células se lavaron con medio fresco por tres veces y se filtraron al vacío, y 50 mg se maceraron en nitrógeno líquido hasta polvo fino. La extracción de las proteínas se realizó por el procedimiento descrito por Altherr (19). El extracto se conservó a -20°C hasta su cuantificación.

Proteínas extracelulares (PE). El medio (10 mL) se liofilizó en un concentrador (SAVANT) y el material liofilizado se disolvió en agua para su cuantificación.

Cuantificación de proteínas. La cuantificación de las proteínas se realizó según el método propuesto por Bradford (20), para la aplicación de igual concentración en la electroforesis.

Electroforesis en SDS-PAGE. La electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio se llevó a cabo de acuerdo con Laemmli (21). La corrida se realizó a voltaje constante (100 v). Las proteínas a una concentración de 20 µg.mL⁻¹ se aplicaron sobre un gel al 12 % de acrilamida y se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue R-250* (1 %) en una solución de metanol: ácido acético: agua (10:10:80). En cada carril se aplicó la misma concentración de proteínas. El kit de masa molar utilizado fue: 67 kDa albúmina de suero bovino (BSA); 45 kDa Ovo albúmina; 25 kDa quimotripsinógeno; 17 kDa mioglobina equina; 12 kDa citocromo C.

Para los análisis se utilizaron tres líneas celulares de cada una de las suspensiones (tres repeticiones). La variabilidad de los resultados se expresó como la media ± el error estándar. Para el conteo de células y las mediciones de masa fresca de las suspensiones se hicieron tres repeticiones y para la cuantificación de las proteínas se realizaron seis análisis.

La electroforesis se repitió hasta la obtención de un gel repetitivo.

Análisis estadístico. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos tipos de suspensiones celulares homogéneas analizadas, obtenidas a partir de callos embriogénicos y no embriogénicos, presentan diferentes características en cuanto a: número y porcentaje de células meristemáticas, masa fresca, proteínas intracelulares (PI) y extracelulares (PE) (Tabla I). El número de células meristemáticas en las suspensiones embriogénicas fue casi tres veces superior al de las no embriogénicas, mientras que la masa fresca fue superior en las no embriogénicas. La concentración de proteínas intra y extracelulares fue también superior en las suspensiones embriogénicas.

Tabla I. Características de las suspensiones celulares homogéneas var. CP 52-43

Cultivo de suspensiones	Número de células meristemáticas (x 10 ⁻⁷)	Porcentaje de células meristemáticas (%)	Masa fresca (g)	Proteínas (mg.g ⁻¹ MF)	
				PI	PE
SE	14.594±0.37	69±0.29	0.62±0.09	2.7±0.06	78.61±0.63
SNE	4.812±0.23	42±0.15	1.73±0.07	1.6±0.09	10.09±0.52

SE: Suspensión embriogénica

SNE: Suspensión no embriogénica

PI: Proteínas intracelulares

PE: Proteínas extracelulares

Las suspensiones celulares no embriogénicas para el cultivar CP52-43 constaron de células vacuoladas de gran tamaño (Figura 1A), mientras que las suspensiones celulares embriogénicas presentaron células pequeñas, con denso citoplasma y en activa división celular; por ello, con prominente núcleo y compactas con tendencia a la formación de agregados celulares (Figura 1B).

Al transferir un mililitro de la suspensión a un medio sólido, se observó la formación de un callo friable de tipo 4 (Figura 1C) (2). La transferencia de este callo a un medio sólido libre de auxinas produjo pequeñas raíces finas, pero no se desarrolló ningún proembriode ni brote meristemático.

En la búsqueda de una respuesta al comportamiento anteriormente referido, se realizó el barrido de los geles, donde se comparan las cantidades relativas de proteínas intra y extracelulares durante el crecimiento no diferenciado (Figura 1D). Los principales cambios ocurrieron en los perfiles de proteínas extracelulares. Como se puede observar en la línea 2, se detectó una banda en los 44.85 kDa y dos bandas a 25.06 y 22.60 kDa en las suspensiones celulares no embriogénicas, las cuales estuvieron ausentes en las suspensiones embriogénicas (línea 3). Los perfiles de proteínas intracelulares fueron bastante similares en ambos tipos de suspensiones. Sin embargo, las suspensiones no embriogénicas exhibieron una banda a los 67 kDa y otra a los 28.5 kDa (línea 4), las cuales no se detectaron en las embriogénicas (línea 5).

Aunque se ha informado la regeneración de plantas *in vitro* en varias especies monocotiledóneas, como la caña de azúcar (3), también lo es la pérdida de la capacidad embriogénica de las suspensiones celulares después de un prolongado cultivo en un medio que contiene auxinas (22), lo que pudo provocar la nula regeneración de plantas en este experimento. Además, la falta de potencial de regeneración puede tener otras explicaciones a partir de a) tipo de cultivar, b) que no se alcance una densidad crítica de células, para sustentar un rápido crecimiento en los subcultivos iniciales a partir de suspensiones heterogéneas. Esto permite la secreción de macromoléculas asociadas con el potencial embriogénico y la capacidad de regeneración o c) la composición del medio, debido a una alta concentración de prolina (500 mg.L⁻¹) y/o arginina (50 mg.L⁻¹). Aunque ninguno de ellos es excluyente.

Al analizar la primera hipótesis a) tipo de cultivar, se conoce que en otras variedades de caña de azúcar (B43-62) se ha logrado regenerar plantas a partir de cultivo de suspensiones divididas finamente y con rápido crecimiento del cultivar (23). También, algunos autores (17) estable-

cieron suspensiones a partir de callos embriogénicos de 18 clones comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* sp). Los agregados celulares a partir de cultivo de suspensiones celulares heterogéneas regeneraron un callo amarillo, friable (tipo 4) y en menor extensión un callo embriogénico blanco, globular, compacto (tipo 3). Las plantas se regeneraron solamente a partir de este tipo de callo en los cultivares MQ72-4157, MQ72-2011 y B-4362. En 1996, se informó el potencial de regeneración de líneas celulares homogéneas embriogénicas a partir de callos blancos compactos o verdes globulares para el cultivar Col-54 (3).

Sobre la segunda hipótesis, b) papel del medio condicionado, se ha demostrado que las proteínas extracelulares son esenciales para la embriogénesis somática en zanahoria (24), así como la importancia de la matriz extracelular en este sistema. Los contenidos de proteínas extracelulares varían en dependencia de la concentración de fitohormonas (25). La adición de proteínas extracelulares a líneas celulares embriogénicas incompetentes, restauran parcialmente la embriogénesis. Estas proteínas extracelulares en el medio se han usado en la caracterización del potencial embriogénico, en el sistema de modelo de la zanahoria y de otras especies, como la alfalfa (26), la uva (27), el abedul (28) el girasol (29), el trigo (30) y la caña de azúcar (11, 31). Finalmente la tercera hipótesis, c) la composición nitrogenada en el medio es un factor importante en el control de la embriogénesis somática de zanahoria. Los aminoácidos aplicados externamente como la leucina, isoleucina, lisina e histidina inhiben fuertemente la embriogénesis somática. Estos podrían ser transformados en otros aminoácidos. Así, la glutamina, el ácido glutámico, el ácido aspártico y la asparagina proveen una fuente adecuada de nitrógeno durante la embriogénesis somática en este cultivo. Así, se ha demostrado el papel de los aminoácidos en la iniciación y el mantenimiento de callos embriogénicos de sorgo (32). De estos estudios se ha demostrado claramente que la clase de fuente nitrogenada en el medio de cultivo juega un factor importante en el control de la embriogénesis somática.

Poca información se tiene sobre los perfiles de polipéptidos por SDS-PAGE durante el mantenimiento de suspensiones celulares de caña de azúcar. En el experimento se encontraron pocos cambios en los perfiles de proteínas intra y extracelulares. Solo cinco proteínas están presentes en las suspensiones no embriogénicas, a diferencia de las suspensiones embriogénicas. No obstante, parece que estas no están relacionadas con la capacidad regenerativa o la falta de potencial embriogénico en estas suspensiones homogéneas, ya que no se logró la regeneración de plantas.

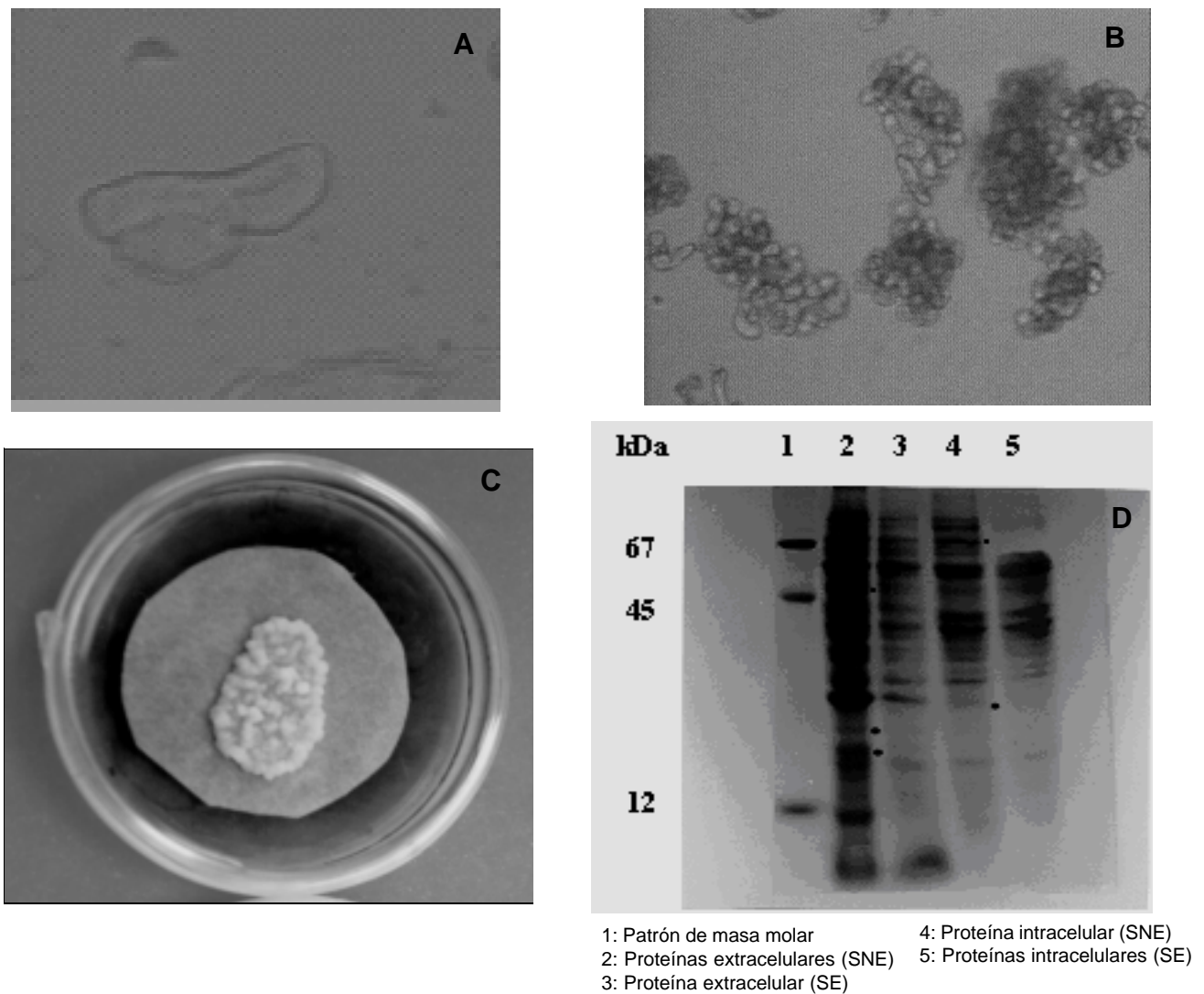


Figura 1. Relación de las proteínas con la capacidad regenerativa de suspensiones celulares homogéneas. A) Suspensión no embriogénica (12.5X); B) Suspensión embriogénica (60.5X); C) Formación de callo friable después del plaqueo de la suspensión celular embriogénica; D) Perfil electroforético de suspensiones celulares no embriogénicas y embriogénicas

Comparando los patrones de proteínas de suspensiones embriogénicas y no embriogénicas regenerables y no regenerables de cebada, se identificó un polipéptido de 85 kDa (pI 5.8), que se acumula solamente en los cultivos no regenerables y la pérdida del potencial de regeneración estuvo asociada a un polipéptido de 17,4 kDa. (33).

La embriogénesis somática a partir del cultivo de suspensiones es el camino morfológico que permite el estudio de la embriogénesis a los niveles celular y molecular, y es también una manera de regenerar células vegetales simples manipuladas genéticamente. Para obtener este objetivo es prerequisite mantener el cultivo de suspensiones y que regeneren plantas fértiles. De ahí se hace evidente la necesidad de probar el comportamiento de suspensiones celulares heterogéneas y evaluar su potencial embriogénico, además de profundizar en aspectos moleculares relacionados con las proteínas extracelulares, lo cual se encuentra en estudio.

REFERENCIAS

1. Fellers, J. P. /et al./ Marker proteins associated with somatic embryogenesis of wheat callus cultures. *Journal Plant Physiology*, 1997, vol. 151, p. 201-208.
2. Castillo, R. /et al./ Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en variedades comerciales de caña de azúcar. *Centro Agrícola*, 1994, vol. 23, p. 73-84.
3. Aftab, F. /et al./ Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) cv. CoL-54. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, vol. 44, p. 71-78.
4. Matsuoka, M. y Sugimoto, A. Plant regeneration from protoplast-derived callus of sugarcane. *Breeding Science*, 1997, vol. 47, no. 3, p. 301-305.
5. Matsuoka, M. Efficient plant regeneration from protoplasts of sugarcane. *Plant Biotechnology*, 1998, vol. 15, no. 3, p. 135-137.

6. Blanco, M. A. /et al./ Changes protein associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, vol. 51, no. 3, p. 153-158.
7. Colmenares, M. /et al./ Proteínas extracelulares secretadas en el medio de cultivo de suspensiones celulares embriogénicas y no embriogénicas de caña de azúcar. *Acta Científica Venezolana*, 1998, vol. 49, p. 17-21.
8. Blanco, M. A. /et al./ Storage proteins in sugarcane (*Saccharum* sp. hybrid): an interesting exception in monocots. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 1999, vol. 59, no. 3, p. 217-218.
9. Blanco, M. A. /et al./ Proteínas durante el establecimiento de suspensiones celulares en caña de azúcar (*Saccharum*, sp) cultivar CP52-43. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 4, p. 29-33.
10. Blanco, M. A. /et al./ Proteínas y poliaminas en la embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum* sp) a partir de callos de la variedad CP52-43. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 69-74.
11. Oropeza, M. /et al./ Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*, 2001, vol. 37, p. 211-216.
12. Chen, D. J. y Luthe, D. S. Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.*, 1987, vol. 48, p. 181-188.
13. Giroux, R. y Pauls, K. P. Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 1997, vol. 33, p. 393-404.
14. Schrader, S. /et al./ Expresión de novel genes during somatic embryogenesis of suspension-culture carrot cells (*Daucus carota*). *J. Plant Physiol.*, 1997, vol. 150, p. 63-68.
15. Thomas, T. L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell*, 1998, vol. 5, p. 367-377.
16. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
17. Taylor, P. W. /et al./ Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension culture of sugarcane *Saccharum* spp hybrids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1992, vol. 28, p. 69-78.
18. King, P. J. Induction and maintenance of cell suspension culture. Cell culture and somatic cell genetics of plant. New York:Academic Press, 1984. 137 p.
19. Altherr, S. /et al./ Immunobiochemical analysis of a nuclear protein marker for regeneration potential in higher plants. *J. Plant Physiol.*, 1993, vol. 141, p. 415-422.
20. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Bioch.*, 1976, vol. 72, p. 248-254.
21. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
22. Kiyosue, T. /et al./ Somatic embryogenesis in higher plants. *J. Plant Res. Special Issue*, 1993, vol. 3, p. 75-82.
23. Ho, W. J. y Vasil, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L). II. Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Botany*, 1983, vol. 51, p. 719-726.
24. De Vries, S. C /et al./ Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, 1988, vol. 176, p. 196-204.
25. Shiviavo, M. y van Kammen, T. A. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled expression of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev.*, 1988, vol. 2, p. 462-476.
26. Poulsen, G. B. /et al./ Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non-embryogenic cell cultures of alfalfa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, vol. 44, p. 257-260.
27. Maes, O. /et al./ Influence of extracellular proteins, proteases and protease inhibitors on grapevine somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, vol. 50, p. 97-105.
28. Hvolstleif-Eide, A. K. y Corke, F. M. K. Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 1997, vol. 51, p. 35-41.
29. Mita, G. /et al./ Secreted heat shock proteins in sunflower suspension cell cultures. *Plant Cell Reports*, 1997, vol. 16, p. 792-796.
30. Nato, A. /et al./ Immunological detection of potential-transduction protein expressed during wheat somatic tissue culture. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 113, p. 801-807.
31. Rodríguez, M. /et al./ Análisis inmunoquímico de la embriogénesis somática en cultivos celulares de la caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 1999, vol. 30, no. 2, p. 83-96.
32. Elkonin, L. A. /et al./ Initiation and maintenance of friable, embryogenic callus of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by amino acids. *Maydica*, 1995, vol. 40, p. 153-157.
33. Stirn, S.; Mordhorst, A. P.; Fuchs, S. y Lorz, H. Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regenerative capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell cultures. *Plant Sci.*, 1995, vol. 106, p. 195-206.

Recibido: 2 de enero del 2002

Aceptado: 18 de noviembre del 2002