

PROTEÍNAS EXTRACELULARES MARCADORAS DEL POTENCIAL EMBRIOGÉNICO EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea* spp.

Mayra Rodríguez, A. M. Cevallos y Silvia Montes

ABSTRACT. Extracellular proteins EP3 and PE32 in *Coffea canephora* var. Robusta and *Coffea arabica* cv. Catimor cell suspension cultures were studied. The embryogenic process was immunochemically characterized by polyclonal antibodies of both proteins. The behavior of extracellular proteins proved the embryogenic character of the culture. The use of these proteins as molecular markers is suggested for coffee somatic embryogenesis.

Key words: *Coffea*, somatic embryogenesis, extracellular proteins, cellular suspensions

RESUMEN. Se realizó un estudio de las proteínas extracelulares EP3 y PE32 en suspensiones celulares de *Coffea canephora* var. Robusta y *Coffea arabica* cv. Catimor. El proceso embriogénico fue caracterizado inmunoquímicamente con la utilización de anticuerpos policlonales de ambas proteínas. El carácter embriogénico del cultivo se corroboró por el comportamiento de las proteínas estudiadas presentes en la matriz extracelular. Se sugiere la utilización de estas proteínas como marcadores moleculares de la embriogénesis somática en cultivos celulares de café.

Palabras clave: *Coffea*, embriogénesis somática, proteínas extracelulares, suspensiones celulares

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un proceso característico de las plantas superiores sin contraparte en el reino animal. La embriogénesis somática se puede desarrollar de forma directa sobre la superficie de un tejido organizado (hoja, tallo, microesporas) o por vía indirecta a través de una etapa intermedia de formación de callos o suspensión celular (1).

En el medio de cultivo de células somáticas en suspensión se encuentran moléculas principalmente derivadas de la pared celular como polisacáridos, glicoproteínas y polipéptidos (2)(3).

La presencia de proteínas extracelulares específicas del desarrollo embriogénico ha sido observada en suspensiones de zanahoria (*Daucus carota* L.) (4), cebada (*Hordeum vulgare* L.) (5), uva (*Vitis vinifera*) (6) y caña de azúcar (*Sacharum officinarum*) (7). Se ha demostrado que algunas de ellas promueven la formación del embrión somático cuando se añaden a líneas celulares no embriogénicas (8)(9)(10), lo que indica que la embriogénesis somática es altamente dependiente de dichas proteínas.

Se han caracterizado las proteínas presentes en la matriz extracelular de las suspensiones celulares de zanahoria llamadas proteínas extracelulares EP, las cuales

se han clasificado en cinco grupos: EP1, EP2, EP3, EP4 y EP5 (11).

Las proteínas EP2 y EP3 son específicas de las células embriogénicas. La proteína de transferencia de lípidos (EP2) participa en la formación de la capa de cutícula que mantiene el tamaño pequeño de las células embriogénicas. Las proteínas extracelulares EP3 son un conjunto de proteínas de 32 kD, algunas de las cuales desempeñan un papel importante durante el desarrollo embriogénico, ya que participan en la formación de la protodermis del embrión en el estadio globular del desarrollo. Las EP1 son proteínas extracelulares que forman parte de la pared celular de las células vacuoladas no embriogénicas y las EP4 son proteínas secretadas también por las células no embriogénicas pero de una población celular diferente a las que secretan las proteínas EP1 (12). Las proteínas EP5 son un grupo de isoenzimas hemoperoxidasas catiónicas capaces de restablecer la embriogénesis en un cultivo inhibido (13).

En cultivos celulares de caña de azúcar se detectaron también las proteínas EP1, EP2, EP3 y EP4 (14). Además, se informó la presencia de la proteína PE32 que está serológicamente relacionada con la proteína EP3 y es utilizada como marcador bioquímico de la embriogénesis somática de la caña de azúcar (7).

El proceso embriogénico en el género *Coffea* está bien documentado desde el punto de vista morfológico; sin embargo, hay pocos informes de estudios bioquímicos y moleculares (15), por lo que la búsqueda de marcadores moleculares del potencial embriogénico es de gran importancia para la predicción de este carácter en el cultivo.

Ms.C. Mayra Rodríguez, Investigador Agregado del Departamento de Bioplantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Gaveta Postal 6990, Ciudad de La Habana; Ms.C. A. M. Cevallos, Ingeniero Agrónomo y Dra.C. Silvia Montes, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento de Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

El objetivo del presente trabajo es el estudio inmunoquímico de la embriogénesis somática del café mediante el análisis de las proteínas extracelulares EP3 y PE32 en las especies *C. canephora* var. Robusta y *C. arabica* cv. Catimor, ya que son las especies de mayor importancia económica del género *Coffea* (16).

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de la muestra de las suspensiones celulares. Se tomaron muestras de las suspensiones de dos líneas celulares de *C. canephora* var. Robusta, establecidas en un medio de inducción de embriones, el cual contenía: MS (10 mL), tiamina (4 mg.L^{-1}), inositol (100 mg.L^{-1}), cisteína (25 mg.L^{-1}), sacarosa (20 g.L^{-1}), ANA (ácido naftalenoacético) ($0.54 \text{ } \mu\text{M}$) y Kinetina ($2.32 \text{ } \mu\text{M}$). El período de muestreo fue desde el momento inicial de la inducción de la embriogénesis hasta la aparición de los diferentes estadios embrionarios. En la línea celular 1 se tomaron muestras a los 43, 58, 74, 81 y 102 días que correspondían a los estadios de células embriogénicas, agregados, preglobulares, globulares y torpedos respectivamente, mientras que en la línea celular 2 se tomaron muestras a los 20, 35, 51, 66 y 79 días, que correspondían a los mismos estadios que en la línea celular 1.

Las suspensiones de *Coffea arabica* cv. Catimor se cultivaron en el mismo medio citado para la otra especie (Robusta). Para la toma de las muestras se siguió el mismo procedimiento y estas correspondieron a los 15, 45, 75 y 90 días.

Se obtuvo un medio libre de células por centrifugación a 300 g por cinco minutos a temperatura ambiente, seguido de filtración por papel Whatman 1 MM y filtros Millipore de $0.22 \text{ } \mu\text{m}$. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (17).

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12.5 % usando el sistema de geles discontinuo (18). Se realizó la electroforesis a 120 V y 20 mA. Los marcadores de peso molecular se visualizaron con Coomassie 0.1 % después de ser transferidos a membranas.

Transferencia de proteínas

Transferencia manual (Dot Blot). Se aplicaron $20 \text{ } \mu\text{L}$ ($1 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$) de las muestras sobre la membrana Hybond PVDF previamente tratada durante cinco segundos con etanol y $20 \text{ } \mu\text{g}$ de una mezcla de proteínas extracelulares de zanahoria y caña de azúcar como controles positivos de la reacción inmunoquímica.

Electrotransferencia (Western Blotting). Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas Hybond-PVDF usando el método semiseco (19). La transferencia se realizó a 0.8 mA/cm^2 durante una hora.

Detección inmunoquímica. La inmunodetección se realizó según lo descrito por Burnette (19). La membrana se bloqueó con *buffer* Tris 10 mM, pH 7.5, gelatina 0.5 %, durante una hora a 37°C y se incubó con el anticuerpo específico de cada proteína (α -EP3 y α -PE32) diluido 1:5000, dos horas a 37°C . Se realizaron tres lavados por cinco minutos con *buffer* Tris 100 mM, pH 7.5, gelatina 0.2 % y

se incubó con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:5000, una hora a 37°C . La membrana se lavó como se describió anteriormente y se incubó con $33 \text{ } \mu\text{L}$ de nitroazul tetrasodio (NBT) y $16.5 \text{ } \mu\text{L}$ de 5-cloro,4-bromo,3-indolfosfato (BCIP) en 5 mL de *buffer* Tris 100 mM, pH 9.5. La reacción de color que se produjo al finalizar la detección inmunoquímica permitió la evaluación cualitativa de las proteínas en relación con el control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los resultados del *Dot Blot* la inmunodetección de las proteínas extracelulares EP3 y PE32 presentes en dos líneas celulares de *C. canephora* var. Robusta. Las proteínas EP3 y PE32 se detectaron a partir del momento en que se expresaron los agregados celulares embriogénicos. Las manchas de hibridación evidencian una concentración mucho mayor en las suspensiones ricas en embriones globulares, tanto en la línea celular 1 como en la 2, siendo un poco menor en la línea celular 1. La detección disminuyó cualitativamente en las etapas correspondientes a la fase de torpedo del desarrollo embrionario.

La presencia de estas dos proteínas durante casi todo el desarrollo del proceso embriogénico al parecer condiciona el medio desde sus etapas iniciales, para el posterior progreso de la embriogénesis somática. Resultados similares han sido informados (20) en cultivos celulares de caña de azúcar. Estudios realizados (8) revelaron que es necesaria la actividad de una o varias proteínas extracelulares para la transición del estadio globular al torpedo del embrión somático. Posteriormente fue identificada esta proteína como una glicoproteína de 32 kDa con actividad quitinasa, llamada EP3 (21) y se demostró que esta proteína es específica de la fase globular y es indispensable para el desarrollo avanzado de la embriogénesis somática (9).

La Figura 2 muestra los resultados del *Western Blotting* y la detección inmunoquímica de las proteínas extracelulares EP3 y PE32 en dos líneas celulares de *C. canephora* var. Robusta. Se encontró que la reacción positiva que se obtuvo en el *Dot Blot* se debe a la presencia de una proteína (peso molecular de 32 kDa) que está serológicamente relacionada con los anticuerpos de EP3 y PE32. Los resultados obtenidos demuestran que tanto la línea celular 1 como la 2 fueron altamente embriogénicas, ya que se observaron las proteínas embriogénicas durante las fases del desarrollo del proceso morfogénico; pudo destacarse también que no existen diferencias relacionadas con la coloración del callo inicial, para que se exprese la capacidad embriogénica; es de destacar también que en la línea celular proveniente de callos cremosos la aparición de los estadios embrionarios fue más temprana (23 días antes).

En las suspensiones de *Coffea arabica* se observó la inmunodetección de las proteínas EP3 y PE32 (Figuras 3 y 4) a partir de los 45 días, donde la suspensión es rica en agregados celulares embriogénicos. La mayor reacción inmunoquímica desde el punto de vista cualitativo (intensidad) se presentó en las suspensiones que contenían los embriones en estadio globular (Figura 3). Esta respuesta coincidió con lo obtenido para *C. canephora* var. Robusta.

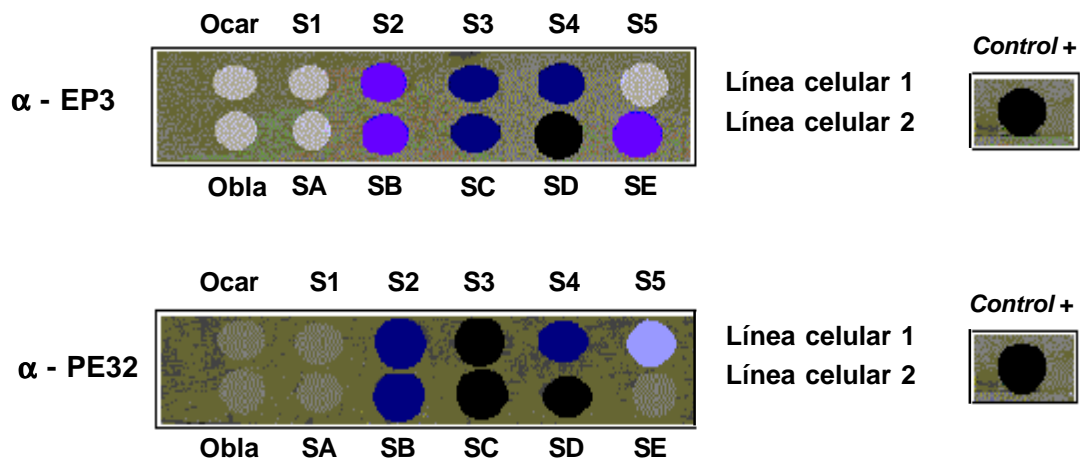


Figura 1. *Dot Blot* y detección inmunoquímica de las proteínas extracelulares de suspensiones de *Coffea canephora* var. Robusta, mediante la utilización de anticuerpos α -EP3 (zanahoria) y α -PE32 (caña de azúcar), control +: proteínas extracelulares de zanahoria y caña de azúcar; Ocar: suspensión inicial (inóculo callo carmelita); S1: suspensión embriogénica (43 días); S2: suspensión con agregados celulares embriogénicos (58 días); S3: suspensión con embriones preglobulares (74 días); S4: suspensión con embriones globulares (81 días); S5: suspensión con embriones torpedos (102 días); Obla: suspensión inicial (inóculo callo cremoso); SA: suspensión embriogénica (20 días); SB: suspensión con agregados celulares embriogénicos (35 días); SC: suspensión con embriones preglobulares (51 días); SD: suspensión con embriones globulares (66 días); SE: suspensión con embriones acorazonados y torpedos (79 días)

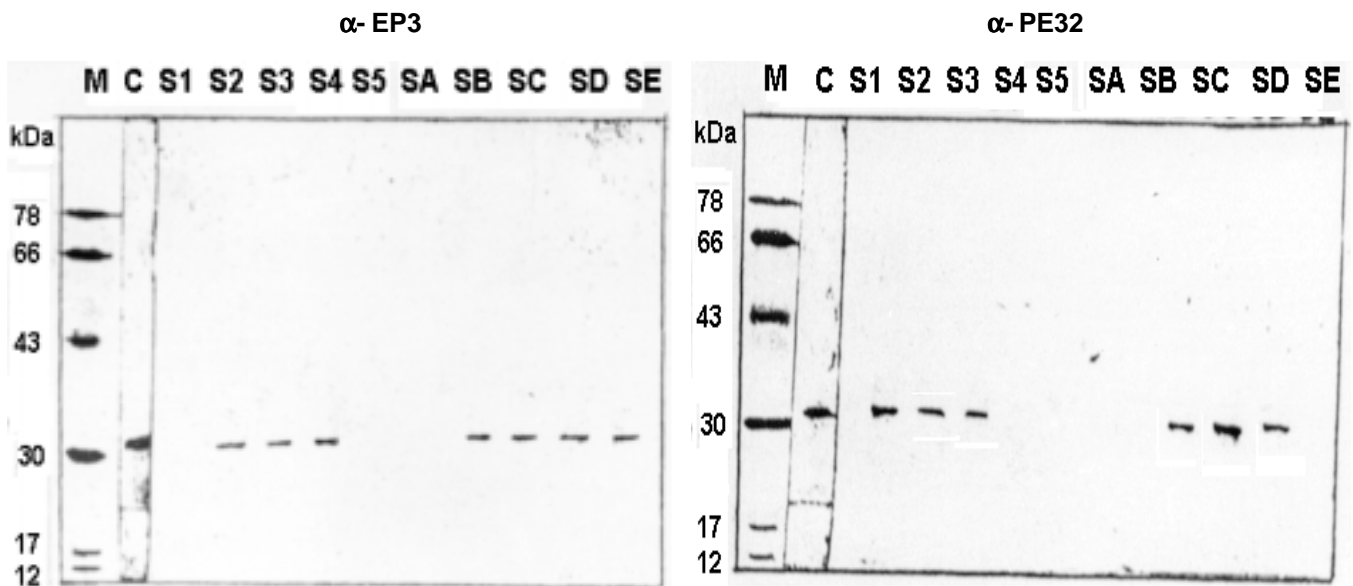


Figura 2. *Western Blotting* y detección inmunoquímica de las proteínas extracelulares de suspensiones de *Coffea canephora* var. Robusta, mediante la utilización de anticuerpos α -EP3 y α -PE32. C: control positivo de proteínas extracelulares de zanahoria y caña de azúcar; S1: suspensión embriogénica (43 días); S2: suspensión con agregados celulares embriogénicos (58 días); S3: suspensión con embriones preglobulares (74 días); S4: suspensión con embriones globulares (81 días); S5: suspensión con embriones torpedos (102 días); SA: suspensión embriogénica (20 días); SB: suspensión con agregados celulares embriogénicos (35 días); SC: suspensión con embriones preglobulares (51 días); SD: suspensión con embriones globulares (66 días); SE: suspensión con embriones acorazonados y torpedos (79 días)

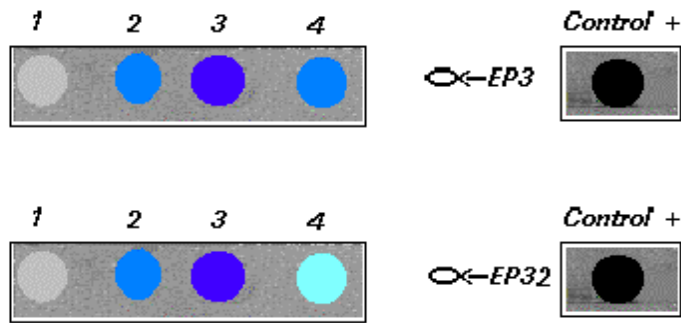


Figura 3. Dot Blot y detección inmunoquímica de las proteínas extracelulares de las suspensiones de *C. arabica* var 9723, mediante la utilización del anticuerpo α -EP3 (zanahoria) y α -EP32 (caña de azúcar) control +: proteínas extracelulares de suspensiones de zanahoria; 1: suspensión celular embriogénica (15 días); 2: suspensión con agregados celulares embriogénicos (45 días); 3: suspensión con embriones globulares (75 días); 4: suspensión con embriones torpedos y cotiledonares (90 días)

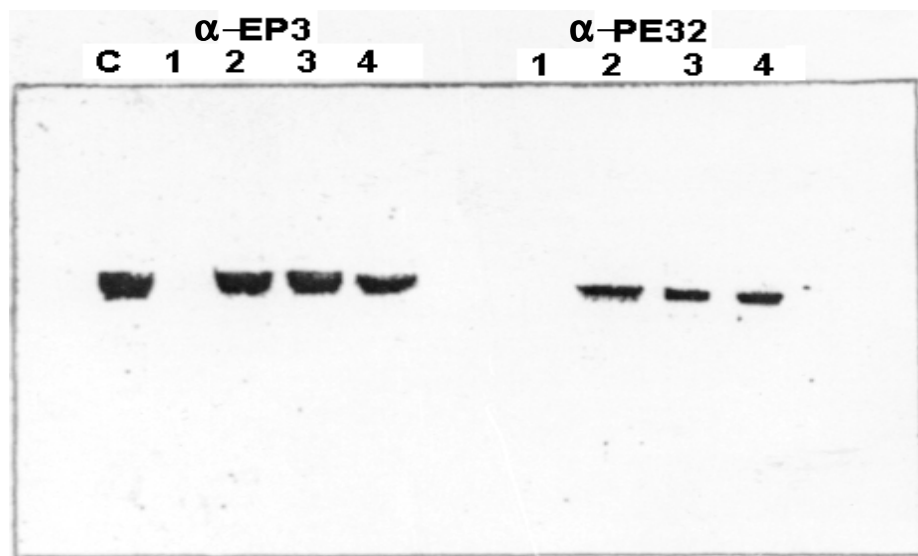


Figura 4. Western Blotting y detección inmunoquímica de las proteínas extracelulares de suspensiones de *Coffea arabica*, mediante la utilización de anticuerpos α -EP3 (zanahoria) y α -PE32 (caña de azúcar), C: control +: proteínas extracelulares de zanahoria y caña de azúcar; 1: suspensiones celulares embriogénicas (15 días); 2: suspensión con agregados celulares embriogénicos (45 días); 3: suspensión con embriones globulares (75 días); 4: suspensión con embriones torpedos y cotiledonares (90 días)

Las proteínas EP3 y PE32 estuvieron presentes durante toda la diferenciación celular. Estas proteínas, al parecer, condicionan el medio para el progreso normal de la embriogénesis somática. De forma similar, se informó una proteína de 32 kD que está presente durante todo el proceso de embriogénesis somática de trigo (*Triticum aestivum*) (22). Además, se han presentado quitinasas, cuyos genes son abundantes en tejidos embriogénicos y son regulados durante el desarrollo de la embriogénesis somática en coníferas (*Picea glauca*) (23). También en cultivos de cebada (*Hordeum vulgare* L.), se caracterizaron cinco isoenzimas quitinasas (EP3) del medio condicionado, de las cuales dos de ellas promovieron la transición del estadio globular al de corazón durante el desarrollo embriogénico (5).

En el presente trabajo se detectaron proteínas marcadoras de los estadios tempranos de la embriogénesis somática del café, con la ayuda de anticuerpos de proteínas extracelulares de cultivos celulares de zanahoria y caña de azúcar. Estas proteínas constituyen marcadores bioquímicos del proceso embriogénico en plantas, lo cual permite predecir la embriogenicidad de un cultivo a los pocos días de ser inducida.

La morfogénesis en el proceso embriogénico de las plantas es altamente conservada, lo cual sugiere que existe una vía común durante el desarrollo embriogénico temprano en plantas (1). Si se tiene en cuenta que las proteínas extracelulares en estudio han sido detectadas en cultivos de zanahoria (9), cebada (2), uva (6), caña de

azúcar (14) y en nuestras suspensiones de *Coffea* spp., se puede sugerir su carácter universal o al menos hablar del alto conservadurismo de los genes que las codifican.

REFERENCIAS

1. Kawahara, R. y Komamine, A. Molecular basis of somatic embryogenesis. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1995, vol. 30, p. 30-40.
2. Nielsen, K. y Hansen, I. Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.*, 1992, vol. 139, p. 489-497.
3. Van Engelen, F. y De Vries, S. C. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.*, 1992, vol. 8, p. 66-70.
4. De Vries, S. C., *et al.* Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular protein. *Genes Dev.*, 1988, vol. 2, p. 462-476.
5. Kragh K. M., *et al.* Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant ts11. *Plant Molec. Biol.*, 1996, vol. 31, p. 631-645.
6. Coutos-Thevenot, *et al.* Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Science*, 1992, vol. 86, p. 137.
7. Rodríguez, M. Purificación de una proteína relacionada con la embriogénesis somática en caña de azúcar. Rev. INICA Memorias del 50 Aniversario de la EPICA de Jovellanos. Soporte magnético, 1997.
8. Lo Schiavo, F., *et al.* A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosilation of extracellular proteins. *Mol. Gen Genet.*, 1990, vol. 223, p. 385-393.
9. De Jong, A., *et al.* Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant ts11. *Develop. Genet.*, 1995, vol. 16, p. 332-343.
10. Kreuger, M. y Van Holst, G. J. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 1993, vol. 189, p. 243-248.
11. Hendriks, T. y De Vries, S.C. The role of secreted proteins in carrot somatic embryogenesis. En Terzi, M., Cella, R., Falavigna A. (eds.): Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Dordrecht-Boston-London : Kluwer Academics Publishers, 1995, p. 359-368.
12. Van Engelen, F., *et al.* Purification, immunological characterization and cDNA cloning of a 47 glycoprotein secreted by carrot suspension cells. *Plant Molecular Biology*, 1995, vol. 27, p. 901-910.
13. Cordewener, J., *et al.* Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 1991, vol. 184, p. 478-486.
14. Rodríguez, M., Niubó, E y Maribona, R. H. Análisis inmunológico de la embriogénesis somática en suspensiones celulares de caña de azúcar. Rev. CNIC: *Ciencias Biológicas*, 1999, vol. 30, no. 2.
15. Cevallos, M. Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* spp.). Determinación de marcadores morfo-histológicos y bioquímicos. [Tesis de Maestría], Universidad de La Habana, 1998.
16. FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentación, Roma, 1996, 330 p.
17. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, p. 248-254.
18. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
19. Burnette, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 112, p. 195-203.
20. Rodríguez, M. Diversidad proteica de la matriz extracelular en la embriogénesis somática. Rev. CNIC, *Ciencias Biológicas*, 1999, vol. 30, no. 2.
21. De Jong, A., *et al.* A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell*, 1992, vol. 4, p. 425-433.
22. Nato, A., *et al.* Immunological detection of potential-transduction proteins expressed during wheat somatic tissue culture. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 113, p. 801-807.
23. Dong, J. y Dunstan, D. Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*, 1997, vol. 201, p. 2.

Recibido: 10 de junio de 1999

Aceptado: 26 de noviembre de 1999