

Actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar tratados con un oligopectato.

Sergio González Suárez*, Patricia Garbey González*, Yamilet Alvarez Aragón*, Dixán Benítez López* y JC. Cabrera Pino**

*Facultad de Biología, Universidad de la Habana

**Laboratorio de Fisiología Vegetal, (INCA)

RESUMEN

Se evaluó el efecto de un oligopectato DP>12, obtenido de la corteza de cítricos, sobre la actividad peroxidasa de callos de caña de azúcar, en medios de cultivo MS con y sin kinetina. Los callos de las variedades Cuba-8751 y Puerto Rico-980 fueron tratados con tres concentraciones del oligopectato, a diferentes tiempos. La actividad peroxidasa se evaluó mediante el método del guayacol. Se detectan diferencias significativas en la actividad peroxidasa de los callos tratados con el oligopectato, con una tendencia de incremento con el tiempo posterior al tratamiento y una mejor respuesta a concentraciones bajas del oligopectato.

Palabras clave: Oligopectato, Oligosacarinas, Caña de azúcar, Cultivo de tejidos, actividad peroxidasa, isoenzimas peroxidasa

ABSTRACT

The effect of an oligopectate (DP>12) from Citrus on the peroxidase elicitation in sugarcane cultivated in different media was evaluated. Three oligopectate concentrations and different times on two sugarcane varieties callus (C-8751 and PR-980) were employed. Peroxidase activity by guayacol method was evaluated. Significant differences on callus peroxidase activity were detected. A direct relation between peroxidase activity with time of application is obtained. The best results with less oligopectate concentrations were obtained.

Key Words: Oligopectate, Oligosaccharins, Sugarcane, Tissue Culture, peroxidase activity, peroxidase isozymes

INTRODUCCIÓN

Entre las sustancias biorreguladoras que se estudian en la actualidad se encuentran los oligopectatos. Estos compuestos son oligosacarinas las cuales se consideran en la actualidad como reguladores endógenos del desarrollo de las plantas (Aldington *et al.*, 1991, Cabrera *et al.*, 1995).

Los oligopectatos son carbohidratos complejos que protegen a la planta ante el ataque de patógenos, ellos son producidos por la degradación parcial de la pared celular vegetal, ya sea producto de la acción de enzimas del patógeno atacante o por las de la planta infectada (Ryan y Farmer, 1991).

Este tipo de sustancia ejerce su efecto a nivel del núcleo, activando genes que codifican enzimas que participan en la vía fenilpropanoide, de manera tal que se produce la síntesis de fitoalexinas las cuales promueven un conjunto de respuestas fisiológicas a nivel celular que permite contrarrestar la infección (Darvill *et al.*, 1992).

Se ha demostrado no sólo el papel del oligopectato en el mecanismo de defensa de las plantas sino también como biorregulador del crecimiento y el desarrollo *in vitro* de callos (Aldington *et al.*, 1991; Côte y Hahn, 1994; Hahn, 1995; Creelman y Mullet, 1997). Otros autores han descrito la elicitación de lignificación, actividad peroxidasa y la producción de peróxido de hidrógeno al tratar los

hipocotilos de pepino con oligogalacturónidos (Robertson y Svalheim, 1990; Svalheim y Robertson, 1990, 1993; Svalheim, 1994).

Este trabajo tiene como objetivo analizar el efecto de un oligopectato (Pectimorf) sobre la actividad peroxidasa y el desarrollo de callos de caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal:

Se emplearon callos de caña de azúcar cultivados *in vitro* de las variedades Cuba 8751 y Puerto Rico 980. Estos callos fueron obtenidos a partir de las hojas enrolladas que forman el cogollo de la caña de azúcar.

Medios de cultivo:

Se empleó el medio de cultivo MS descrito por Murashige y Skoog (1962) suplementado con las fitohormonas 2,4-dicloro fenoxiacético(2,4-D) 3.0 mg/L, 6-furfuril amino purina(KIN) 0.1 mg/L y ácido 3-indol acético(AIA) 1.0 mg/L (medio MS-1).

Oligopectato: Se empleó el Pectimorf (oligo), oligopectato de grado de polimerización mayor que 12 (DP>12) producido por el laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto de Ciencias Agrícolas (INCA), obtenido a partir de la degradación de las pectinas de la corteza de frutos cítricos (Cabrera *et al.*, 1995). Este oligopectato se añadió en distintas concentraciones.

Experimentos:

Se sembraron callos en medio MS-1 suplementado con el oligopectato (oligo) en concentraciones de 1, 10 y 100 mg/L y un control con el medio MS-1 normal. En otro experimento se empleó una variante del medio MS-1 la cual no tenía KIN pero sí el oligopectato en las concentraciones anteriores.

Preparación del extracto:

Los callos colectados cada 24 horas fueron macerados con arena sílice en buffer Tris-HCL 0.01 N pH=7.2, la mezcla se centrifugó a 1000 g; se desechó el precipitado y en el sobrenadante se determinó la actividad enzimática peroxidasa y las isoenzimas peroxidadas.

Actividad Enzimática Peroxidasa:

Se preparó una mezcla con buffer de extracción 1.5 mL, guayacol 0.025 mL, peróxido de hidrógeno al 30% 0.020 mL, agua destilada 0.010 mL y 0.010 mL del extracto preparado. La medición de la actividad peroxidasa del sobrenadante se realizó en un espectrofotómetro SpekoL-11, cada 15 segundos, durante tres minutos a 470 nm, en cubetas de cuarzo de 1 cm y en un volumen total de 1.565 mL. Los valores de actividad están expresados en mmoles de guayacol oxidado / min. mL de extracto, (González y García, 1989).

Análisis Isoenzimático:

Las isoenzimas peroxidadas se separaron en gel de poliácridamida 8.5% en un aparato de electroforesis vertical, con buffer Tris-glicina pH=8.3. Se revelaron con una solución de bencidina dihidroclórica al 2% en una mezcla de 14 mL de ácido acético glacial, peróxido de hidrógeno al 30% 1 mL y agua destilada 86 mL (Iglesias *et al.*, 1974; González y García, 1989).

Análisis Estadísticos:

Los análisis estadísticos de los valores de actividades enzimáticas peroxidadas y fenilalanina amonio-liasa, se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. La comparación de los valores de las sumas de rangos se realizaron mediante la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK). Para ello se empleó el paquete de programas TONYSTAT desarrollado por Sigarrosa (1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunas oligosacarinas, como los oligogalacturónidos (oligopectatos) actúan como elicitores e inducen respuestas de defensa contra el ataque de patógenos. Estas respuestas de defensa incluyen la acumulación de fitoalexinas, inhibidores de proteinasas, ligninas, peroxidadas, lipoxigenasas y glucanasas (Ryan y Farmer, 1991; Darvill *et al.*, 1992; Hahn, 1995; Creelman y Mullet, 1997).

En experimentos con tejidos cultivados *in vitro* de tabaco se ha determinado que las oligosacarinas pécticas (oligogalacturónidos con un grado de polimerización en un rango entre 10 a 17) interactúan con las auxinas y citoquininas. Estos experimentos han sido utilizados para estudiar el papel de los oligogalacturónidos en la morfogénesis. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del papel de estas oligosacarinas pécticas sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Creelman y Mullet, 1997).

En nuestros experimentos hemos utilizado una oligosacarina péctica (Pectimorf) producida en nuestro país a partir de la hidrólisis de la corteza de frutos cítricos para evaluar su posible efecto elicitor en cultivos *in vitro* de caña de azúcar.

El estudio de las peroxidadas constituye un elemento importante para comprender qué ocurre en la fisiología de un material vegetal cuando es tratado con un biorregulador del crecimiento. Las peroxidadas son consideradas marcadores moleculares importantes de la morfogénesis y se han empleado para estudiar el efecto de las oligosacarinas (Svalheim y Robertsen, 1990).

Es por ello necesario estudiar tanto las variaciones en la actividad como en los patrones de isoenzimas, para corroborar si su posible efecto es por producir nuevas isoformas de la enzima o por afectar su concentración.

En las figuras 1 y 2 se muestran los zimogramas de las variedades Cuba 8751 y Puerto Rico 980 donde, como se observa, no existen diferencias en cuanto al patrón isoenzimático entre el control y los tratamientos. Además este patrón se corresponde con el típico de cada variedad en condiciones *in vitro*, así como el número reducido de bandas debido al trabajo con callos, lo cual coincide con los resultados expuestos por otros autores (González y García, 1989).

A pesar de que no se produce inducción de nueva peroxidasa producto del tratamiento del callo con el oligopectato, existen diferencias en la actividad enzimática peroxidasa entre los distintos tratamientos (Tabla I).

En la tabla I, se puede apreciar cuál es el comportamiento de este parámetro, para la variedad Cuba 8751, en el transcurso del tiempo para cada tratamiento.

Si analizamos los resultados por tiempo, podremos ver que al cabo de las 24 horas no hay ningún tratamiento que supere el valor de actividad peroxidasa obtenido para el control inicial (control tiempo 0) o que puede tener su causa en el hecho de que el oligopectato (Pectimorf)

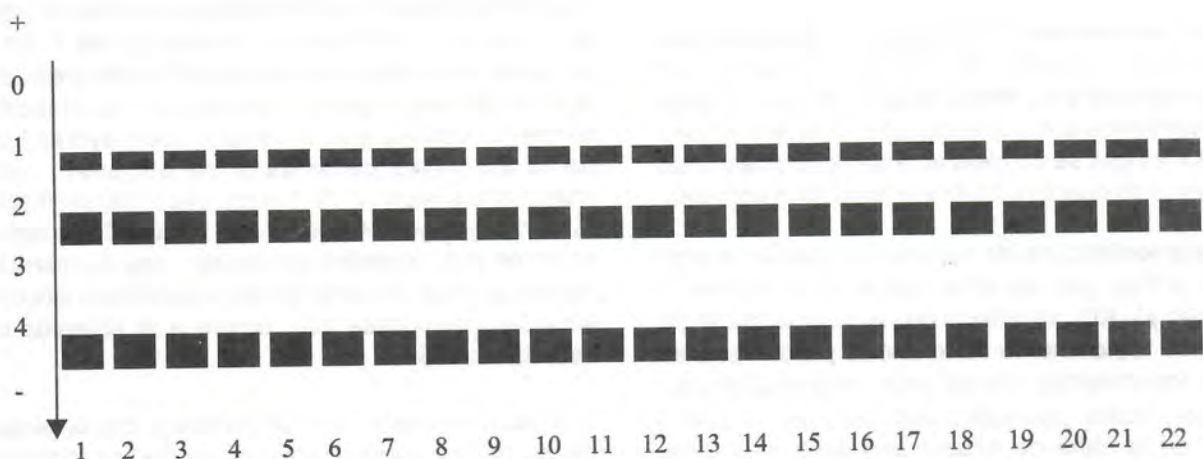


Fig. 1. Zimograma de peroxidasa obtenido para la variedad Cuba 8751.

Leyenda: 1-Control 0, 2-Control 24h, 3-Control 48h, 4-Control 72h, 5-oligo 1 mg/L - KIN (24h), 6- oligo 1 mg/L + KIN (24h), 7-oligo 10 mg/ L - KIN (24h), 8-oligo 10 mg/L + KIN (24h), 9-oligo 100 mg/L - KIN (24h), 10- oligo 100 mg/L + KIN (24h), 11- oligo 1 mg/L - KIN (48h), 12-oligo 1 mg/L + KIN (48h), 13- oligo 10 mg/L - KIN (48h), 14 -oligo 1 mg/L + KIN (48h), 15- oligo 100 mg/L - KIN (48h), 16- oligo 100 mg/L + KIN (48h), 17- oligo 1 mg/L - KIN (72h), 18- oligo 1 mg/L + KIN (72h), 19- oligo 10 mg/L - KIN (72h), 20- oligo 10 mg/L + KIN (72h), 21-oligo 100 mg/L - KIN (72h), 22- oligo 100 mg/L + KIN (72h).

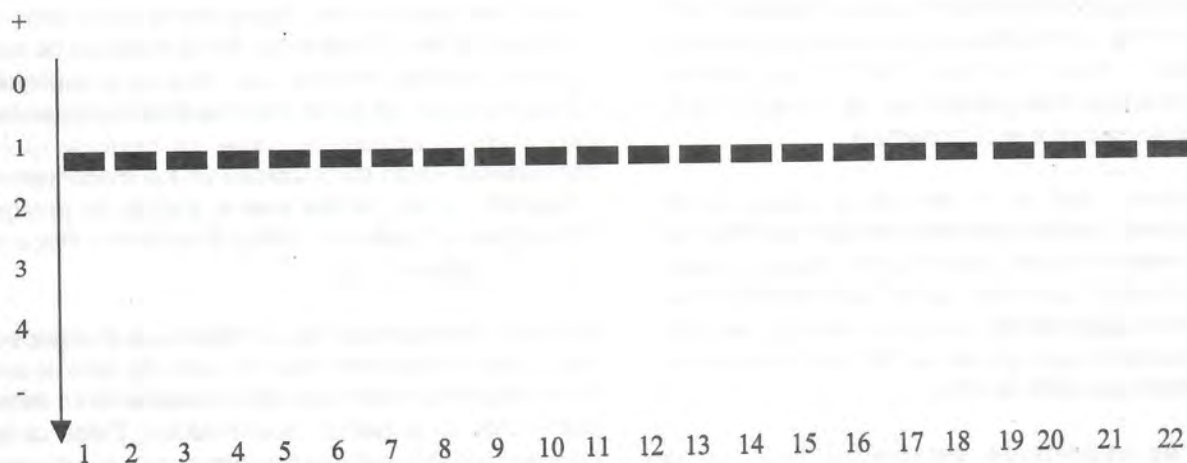


Fig. 2. Zimograma de peroxidasa obtenido para la variedad Puerto Rico 980.

Leyenda: 1-Control 0, 2-Control 24h, 3-Control 48h, 4-Control 72h, 5-oligo 1 mg/L - KIN (24h), 6- oligo 1 mg/L + KIN (24h), 7-oligo 10 mg/ L - KIN (24h), 8-oligo 10 mg/L + KIN (24h), 9-oligo 100 mg/L - KIN (24h), 10- oligo 100 mg/L + KIN (24h), 11- oligo 1 mg/L - KIN (48h), 12- oligo 1 mg/L + KIN (48h), 13- oligo 10 mg/L - KIN (48h), 14 -oligo 1 mg/L + KIN (48h), 15- oligo 100 mg/L - KIN (48h), 16- oligo 100 mg/L + KIN (48h), 17- oligo 1 mg/L - KIN (72h), 18- oligo 1 mg/L + KIN (72h), 19- oligo 10 mg/L - KIN (72h), 20- oligo 10 mg/L + KIN (72h), 21- oligo 100 mg/L - KIN (72h), 22- oligo 100 mg/L + KIN (72h).

necesita de un período de tiempo determinado para lograr inducir la síntesis y acumulación de peroxidasa de tal forma que supere los niveles alcanzados por el control, esta síntesis viene activada directamente por fitoalexinas elicitadas a su vez por el oligopectato.

Se detecta una tendencia al incremento de la actividad peroxidasa con el tiempo para cada tratamiento. Los mayores niveles de actividad se alcanzaron a las 72 horas en los tratamientos con el oligopectato sin la KIN. A partir de las 48 h es que se comienzan a detectar diferencias con el control en cuanto a un incremento de la actividad.

Al comparar los bloques de tratamientos donde no está presente la KIN, con aquellos donde se combinan el oligopectato y la KIN, se detecta que el oligopectato logra inducir más rápidamente la actividad peroxidasa en aquellos tratamientos donde este biorregulador se emplea solo. Estos resultados obtenidos con el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar son diferentes a los resultados descritos en literatura para otros cultivos (Ryan y Farmer, 1991; Hahn 1995; Creelman y Mullet, 1997). Estos autores plantean que el oligopectato interactúa de forma negativa con las auxinas empleadas en el medio de cultivo.

En nuestros experimentos, solo hemos eliminado la KIN del medio de cultivo, ya que el medio también contiene auxinas (AIA y 2,4D) que se mantienen presentes y es en estos casos donde se detecta la mayor elicitación de la actividad peroxidasa.

Lo anteriormente expuesto puede ser una de las causas para las diferencias encontradas entre tratamientos con KIN y sin ella, pero nos parece importante señalar que la ausencia de KIN, al constituirse en un factor estresante para el callo cultivado en esas condiciones, pudiera elicitar también actividad peroxidasa, la cual se sumaría al efecto provocado por el oligopectato.

Para establecer cuál es la verdadera causa de las diferencias encontradas entre tratamientos con KIN y sin ella, es necesario realizar experimentos donde se varíe la concentración de KIN, ante concentraciones constantes del oligopectato, con el objetivo de estudiar el comportamiento que reviste la actividad peroxidasa, ante un déficit creciente de KIN.

También es importante establecer cuál es la concentración mínima óptima a la cual el oligopectato puede ejercer su efecto fisiológico, en este caso sobre la elicitación de actividad peroxidasa.

Al analizar los controles observamos que estos no presentan valores iguales de actividad peroxidasa es

posible que debido a la necesidad de practicar cortes para realizar la siembra se induzca cierta actividad peroxidasa.

En el caso de la variedad PR-980 (Tabla I) se obtienen los valores mayores de actividad peroxidasa al cabo de las 72 horas, como en la variedad Cuba 8751. Sin embargo, en el caso de la variedad PR-980 el estudio de la actividad peroxidasa no permite poder establecer una tendencia definida con el tiempo. Los mayores niveles de la actividad peroxidasa se obtienen con los tratamientos oligo-10 (72 horas), oligo-100 sin KIN (48 y 72 horas) y oligo-100 con Kin (24 horas). Es de destacar como en esta variedad se requiere una concentración del oligopectato (Pectimorf) mayor para lograr inducir una actividad peroxidasa alta, similar a la obtenida en la variedad C-8751.

Al analizar este parámetro se evidencia que la elicitación de actividad peroxidasa en callos de diferentes variedades expuestos al mismo oligopectato puede ser diferencial. Estos resultados constituyen las primeras experiencias del empleo de una oligosacarina (oligopectato) en cultivos *in vitro* de caña de azúcar y coinciden con lo planteado por Spiro *et al.* (1998), quienes trabajando con diferentes líneas celulares de tabaco sugieren que los oligogalacturónidos (oligopectatos) pueden tener efectos diferentes según el sistema de cultivo de tejidos empleado.

Svalheim y Robertsen (1990) obtuvieron resultados similares al trabajar con hipocótilos de pepino elicitados con oligogalacturónidos. Al parecer la presencia de elicitors en el medio no promueve la inducción de nuevas isoenzimas peroxidasa, basta con el incremento de la actividad de las ya presentes. En la literatura no se han encontrado otros trabajos que refieran o expliquen el comportamiento de estas enzimas ante los tratamientos con oligosacarinas, aunque se conoce que las peroxidasa están involucradas en los mecanismos de respuesta de las plantas ante el ataque de patógenos (Robertsen y Svalheim, 1990; Svalheim y Robertsen, 1993 y Svalheim, 1994).

En nuestros resultados se corrobora que el oligopectato altera la actividad peroxidasa de callos de caña de azúcar al ser añadido al medio de cultivo, aunque no se detectan diferencias en el patrón isoenzimático. Estos cambios pueden constituir señales bioquímicas de la actividad de este compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

Aldington S, Mc Dougall GJ and Fry SC. 1991. Structure-Activity relationships of biologically active oligosaccharides. *Plant Cell and Environment* 14: 625-636.

- Cabrera JC, Gutiérrez A, Falcón A and González S. 1995. Highly pure pectic acid and bioactive oligogalacturonides. 7th Cell Wall Meeting, Abstracts and Programme, Santiago de Compostela, España. p. 72.
- Côte F and Hahn MG. 1994. Oligosaccharins: structure and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.
- Creelman RA and Mullet JE. 1997. Oligosaccharins, Brassinolides, and Jasmonates: Nontraditional Regulators of Plant Growth, Development, and Gene Expression. *The Plant Cell* 9:1211-1223.
- Darvill A, Augur C, Bergman C, Carlson RW, Cheong JJ, Eberhar S, Hahn MG, Lo VM, Marfa V, Meyer B, Mohnen D, O'Neil MA, Spiro M, Van Halbeek H, York WS and Albersheim P. 1992. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. *Glycobiology*, 2(3):181-198.
- Fernández J. 1995. Acción *in vitro* de un oligopectato en callos de caña de azúcar. Tesis de Diploma, Facultad de Biología. Universidad de la Habana 28p.
- González S y García E. 1989. Isoenzimas peroxidasas en callos de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*; X, 2: 193-199.
- Hahn MG. 1995. Oligosaccharide Elicitors and Elicitor receptors. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Acad. Press, London, p. 37-58.
- Iglesias L, Lima H and Simon JP. 1974. Isozymes identification of micellar seedlings in Citrus. *J. Heredity* 65: 81-84.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Robertsen B and Svalheim O. 1990. The nature of lignin-like compounds by a-1, 4-linked oligogalacturonides. *Physiol. Plant.* 79: 512-518.
- Ryan CA and Farmer EE. 1991. Oligosaccharide signals in plants: A current assesment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42: 651-674.
- Sigarroa A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana: Ed. Pueblo y Educación.
- Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neil MA, Mohnen D, Guern J, Darvill A and Albersheim P. 1998. Biological Activity of Reducing-End-Derivatized Oligogalacturonides in Tobacco Tissue Cultures. *Plant Phys.* 116: 1289-1298.
- Svalheim O and Robertsen B. 1990. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiol. Plant.* 78: 261-267.
- Svalheim O and Robertsen B. 1993. Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4-a-D-galacturonides and oligo-b-glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. *Physiol. Plant.* 88: 675-681.
- Svalheim O. 1994. Elicitation of lignification, peroxidase activity and hydrogen peroxide production in cucumber hypocotyls. Thesis of Doctor Scientiarium. University of Troms, Norway, 99 p.
- Recibido:** 22 de septiembre 1999.
- Direcc. de los autores:** *Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e l Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba. **Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.

TABLA I

Resultados de la prueba de Student-Neuman-Keuls ($p > 0,05$) para la actividad peroxidasa (mmoles guayacol oxidado /min.mL enz) en callos de caña de azúcar de dos variedades. Sumas de rangos. Letras iguales no difieren entre sí.

TRATAMIENTOS			VARIEDADES	
Kinetina (mg/L)	Pectimorf (mg/L)	Tiempo (hrs)	var. C -8751	var. PR-980
+	-	0	1086.5 h	1824.5 e
+	-	24	482.5 j	1387.5 g
+	1.0	24	673.5 j	842.0 i
+	10.0	24	302.5 k	541.0 k
+	100.0	24	543.5 j	2173.5 c
-	1.0	24	1024.0 h	667.0 j
-	10.0	24	611.0 j	1266.5 g
-	100.0	24	584.5 j	1317.0 g
+	-	48	1997.5 f	935.0 i
+	1.0	48	771.5 i	1412.0 g
+	10.0	48	1699.5 g	2015.5 d
+	100.0	48	2337.5 d	1948.0 d
-	1.0	48	2506.5 c	1424.0 g
-	10.0	48	2140.0 e	519.5 k
-	100.0	48	2315.5 d	2455.5 b
+	-	72	1612.0 g	1673.5 f
+	1.0	72	2281.0 d	1853.0 e
+	10.0	72	2082.5 e	2377.0 b
+	100.0	72	1725.5 g	1844.5 e
-	1.0	72	3016.0 a	1035.5 h
-	10.0	72	2651.5 b	2988.0 a
-	100.0	72	2535.5 c	2480.0 b