

Actividad biológica del hidrolizado HJM3 sobre callos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), cultivados *in vitro*.

Yamilet Alvarez Aragón*, Sergio González Suárez**, Patricia Garbey González ** y Juan C. Cabrera Pino***

*Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA

**Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de la Habana

***Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

RESUMEN

Las oligosacarinas, producto de la degradación parcial de los polímeros constituyentes de la pared celular, son capaces de controlar diversas funciones relacionadas con el crecimiento, desarrollo, organogénesis y defensa de los vegetales. Ellas están estrechamente relacionadas con los mecanismos de defensa de la plantas contra el ataque de patógenos y plagas y se consideran inductoras de la producción de grandes cantidades de fitoalexinas. En este trabajo se evaluó el efecto biológico de la oligosacarina HJM3 sobre callos de una variedad de caña de azúcar, para lo cual se determinó la elicitación de las enzimas peroxidadas y fenilalanina amonio liasa (PAL), importantes por ser de las primeras que se activan durante la puesta en marcha de las estrategias de defensa de las plantas. Se emplearon callos de caña de azúcar de la variedad Cuba 87-51 obtenidos por cultivo de tejidos *in vitro*. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete de programas TONYSSTAT.

Palabras clave: Oligosacarinas, caña de azúcar, peroxidadas, fenilalanina amonio liasa, HJM3

ABSTRACT

Oligosaccharins, product of partial degradation from polymers that constitute cell wall, are able to control several functions that deals with growing, developing, organogenesis and plant defense mechanism. They are closely related to plant defense mechanism against pathogenic and pests, so, they elicit large quantities of phytoalexins. The biological activity of HJM3 oligosaccharin was evaluated on sugar cane callus by peroxidase and phenyl alanine ammonia lyase elicitation, both of them important because they are the first enzyme induced during defense mechanism activation. Sugar cane callus form Cuba 87-51 variety obtained by *in vitro* tissue culture technics were employed. Data were processed by TONYSSTAT Statistic programs.

Key words: Oligosaccharins, sugarcane, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, HJM3

INTRODUCCIÓN

Los procesos de elicitación provocan reacciones específicas que tienen que ver con los mecanismos defensivos de las plantas, fenómenos consistentes en alteraciones producidas en la pared celular que desencadenan diferentes procesos y sustancias inespecíficas como las fitoalexinas, metabolitos secundarios y alcaloides indólicos, entre otros. Los elicitores son moléculas capaces de inducir actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) y, por tanto, de inducir activos mecanismos de defensa en las plantas (De Lorenzo *et al.*, 1987; Taiz y Zeiger, 1991).

La naturaleza química de los elicitores es extremadamente heterogénea: moléculas tan diferentes como polisacáridos, glicoproteínas, péptidos simples y ácidos grasos, han mostrado que poseen actividad elicitora (De Wit, 1992). Los fragmentos pépticos (alfa-D-galacturonidos) enzimáticamente liberados desde la pared celular de plantas, también muestran actividad de inducción (Nothnangel, 1983).

Las oligosacarinas, producto de la degradación parcial de los polímeros constituyentes de la pared celular, son capaces de controlar diversas funciones relacionadas con

el crecimiento, desarrollo, organogénesis y defensa contra plagas y enfermedades (Albersheim *et al.*, 1992).

Las enzimas peroxidadas se han utilizado como marcadores bioquímicos de la inducción de respuestas defensivas de las plantas mediada por oligogalacturonidos (Mader *et al.*, 1980). De esta misma forma puede ser considerada la PAL. Las dos enzimas son imprescindibles en la respuesta de la planta ante el ataque de patógenos, en el proceso de formación de fitoalexinas (Dey y Harborne, 1997), de aquí su importancia para conocer si estos procesos se activan por la presencia de elicitores oligosacáridos.

Por tales motivos, el objetivo de este trabajo fue la determinación del efecto biológico de las oligosacarinas presentes en el hidrolizado HJM3 sobre callos de caña de azúcar obtenidos por cultivo *in vitro*, mediante el estudio de la actividad de las enzimas peroxidadas y PAL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Se emplearon callos de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. de la variedad Cuba 87-51 obtenidos por técnicas de cultivo *in vitro* a partir de las hojas enrolladas del cogollo, en el medio de Murashige y

Skoog (1962).

Medios de cultivo: Se empleó el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 3.0 mg/L, kinetina 1.0 mg/L y ácido 3-indolacético (AIA) 1.0 mg/L (medio MS-1). Además, se empleó la oligosacarina HJM3 (0.1; 1.0 y 3.98 mg/L) para conformar los distintos tratamientos.

El compuesto HJM3 es una oligosacarina que se produce a partir de la hidrólisis, durante 3 horas, del polisacárido HASI proveniente de hemicelulosas de Uva de Palomino (Igartuburu, 1994).

Se añadió el hidrolizado HJM3 en concentraciones de 0.1, 1.0 y 3.98 mg/L, en presencia y ausencia de kinetina, al medio de cultivo MS-1. Las muestras se tomaron a las 24, 48 y 72 horas. Se desarrollaron 7 tratamientos con 6 réplicas y N=42.

Preparación del extracto: Se preparó el extracto con muestras de callos colectados cada 24 horas, pesados y macerados con arena sílice calidad reactivo en solución tampón Tris-HCl 0.01 N, pH=7.2 en frío. Luego fueron centrifugados bajo un campo gravitacional de 1750g durante 15 minutos y finalmente se colectó el sobrenadante al cual se le determinó la actividad peroxidasa y PAL.

Determinación de actividad enzimática peroxidasa: La determinación de la actividad enzimática peroxidasa se realizó en cubetas de cuarzo de 1.0 cm, con un volumen de reacción de 1.565 mL conteniendo 1.5 mL de solución tampón Tris-HCl 0.01N, pH=7.2; guayacol 0.01 mg/mL; 25 μ L; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% 20 μ L; agua destilada 10 μ L y 10 μ L del extracto. La variación de la densidad óptica fue medida a una longitud de onda de 470 nm, a intervalos de cinco segundos durante dos minutos en un espectrofotómetro Spekol II (González y García, 1989).

La actividad enzimática fue expresada en: μ moles de guayacol oxidado/min.mLenz.

Determinación de actividad enzimática fenilalanina amonio liasa (PAL): La medición de la actividad enzimática PAL se realizó con un espectrofotómetro UV-visible al cabo de una hora de comenzada la reacción, a una longitud de onda de 290 nm, en cubetas de cuarzo de 1.0 cm y en un volumen total de 6.25 mL. Para ello se utilizaron 0.9 mL del sustrato L-fenilalanina (Phe), disuelto en buffer borato 0.1M, pH=8.8 y 0.1mL del extracto preparado. La mezcla fue incubada bajo una temperatura de 40°C durante una hora, al cabo de la cual se procedió a detener la reacción añadiendo HCl 5N 0.25 mL y agua destilada 5 mL (Bolwell *et al.*, 1985).

La actividad enzimática fue expresada en μ g ácido cinnámico/h.mLenz.

Análisis biométrico: Para iniciar el procesamiento estadístico de los datos se comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Bartlett. Para la variable actividad enzimática peroxidasa se empleó un análisis de varianzas de clasificación simple modelo de efectos fijos y para comparar las medias la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. La otra variable, fue procesada mediante métodos no paramétricos: la prueba de Kruskal-Wallis y para comparar los rangos la prueba de Student-Newman-Keuls. En ambos casos se empleó el paquete de programas TONYSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar el efecto inductor de las oligosacarinas presentes en el hidrolizado HJM3 sobre los callos de caña de azúcar, se evaluó la actividad de las enzimas peroxidasa y PAL.

Actividad peroxidasa en callos: Al analizar la figura 1 observamos que los controles presentaron valores diferentes de actividad de la enzima, esto pudo ser debido a la necesidad de practicar cortes para realizar la siembra y por tanto, se haya inducido dicha actividad peroxidasa. Según Svalheim y Robertsen (1990) y Svalheim (1994) incrementos en los niveles de peroxidasa pueden ser observados ante heridas o daños mecánicos como respuesta defensiva de las plantas.

Se comprobó que el HJM3 indujo actividad peroxidasa por encima del control respectivo en el tratamiento que contenía HJM3 0.1 mg/L, a las 24 horas, el resto se mantuvo por debajo de los controles.

Autores como Ryan y Farmer (1991) y Creelman y Mullet (1997) plantean que los oligogalacturónidos interactúan de forma negativa con las auxinas que forman parte del medio de cultivo. Esto quizás pueda ser la explicación de que sólo para la menor concentración en este caso, de la oligosacarina y al menor tiempo (24 h) se haya elicitado actividad de la enzima y para el resto de los tratamientos la combinación de concentraciones usadas haya propiciado una interacción negativa, pues el medio de cultivo basal para cada tratamiento contenía AIA y 2,4 D.

Al evaluar el efecto del compuesto en estudio sobre las peroxidases y al compararlo con el Pectimorf, oligopectato evaluado por (Benítez, 1998; González *et al.*, 2000) también en callos de caña de azúcar y utilizando el mismo diseño experimental; se observan resultados similares, en ambos el mejor tratamiento correspondió a la menor concentración evaluada, hecho que permite plantear que ambos reguladores ejercen una acción positiva una vez

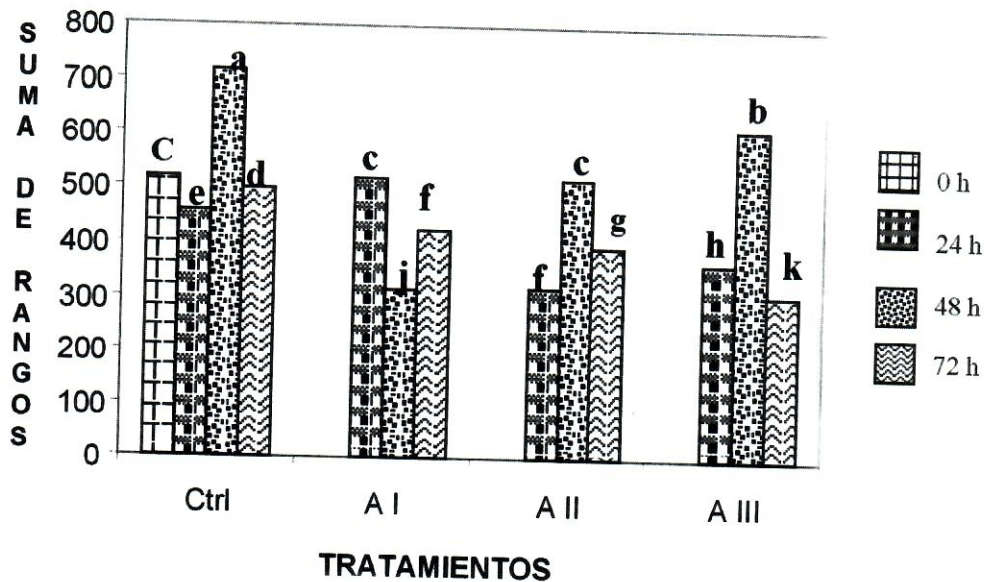


Fig. 1. Actividad enzimática peroxidasa en callos de la variedad C87-51 cultivados en medio MS-1, en presencia del oligosacárido HJM3. (Ctrl.: Control; A: HJM3 0.1, 1.0 y 3.98 mg/L. $F=2.57$, $n=5$. Datos transformados $\log x$. Letras iguales no difieren entre sí).

presentes en el medio de cultivo y que además resultaron más efectivos a las concentraciones menores, esto corrobora los planteamientos de Aldington *et al.* (1991) al ubicar a las oligosacarininas en el grupo de reguladores del crecimiento que actúan a muy bajas concentraciones.

A diferencia de los resultados obtenidos por Garbey (1997), Benítez (1998) y González *et al.* (2000) donde la actividad peroxidasa se incrementó con el tiempo para cada tratamiento en presencia del Pectimorf, en este experimento el comportamiento de la enzima frente al compuesto HJM3 puede ser catalogado como heterogéneo, lo que significa que no siguió una cinética como la descrita por los autores anteriormente citados.

Actividad enzimática PAL en callos: El compuesto HJM3 fue capaz de promover incrementos de la actividad de la enzima PAL a la concentración de 1.0 mg/L y el valor máximo se produjo a las 72 horas (Fig. 2).

El comportamiento de esta enzima frente a las tres concentraciones del compuesto evaluado se caracterizó por un incremento de su actividad en la medida que aumentó el tiempo de exposición de los callos a este, aunque no al mismo nivel.

Similar respuesta de inducción fue anteriormente observada por Benítez (1998) en uno de los tratamientos

aplicados, al evaluar el efecto del Pectimorf sobre la enzima PAL, en callos de caña de azúcar de la misma variedad, obteniendo una mayor actividad con el tiempo, pero para la concentración más elevada. Es de destacar que el Pectimorf es un oligopectato producido a partir de la degradación de las pectinas, mientras que el HJM3 se produce a partir de la hidrólisis de hemicelulosa, por tanto ambos compuestos tienen estructura diferente (Igartuburu, 1994; Cabrera, 2000).

Sin embargo, según estos resultados y lo descrito en la literatura, esta enzima no se comporta de igual forma frente a cada elicitador. De Lorenzo *et al.* (1987) plantearon una cinética transiente de la PAL en suspensiones celulares de *Daucus carota* una vez inducida su actividad frente a oligogalacturónidos.

Tanto la enzima PAL como las peroxidases son imprescindibles en la respuesta de la planta ante el ataque de patógenos, en el proceso de formación de fitoalexinas (Dey y Harborne 1997), de aquí su importancia para conocer si estos procesos se están activando por el compuesto que estamos estudiando.

En ambas enzimas fueron detectados incrementos de su actividad en dependencia del tiempo y de la concentración del inductor, con lo que se demostró el efecto biológico de este producto sobre callos de caña de azúcar. Esta es

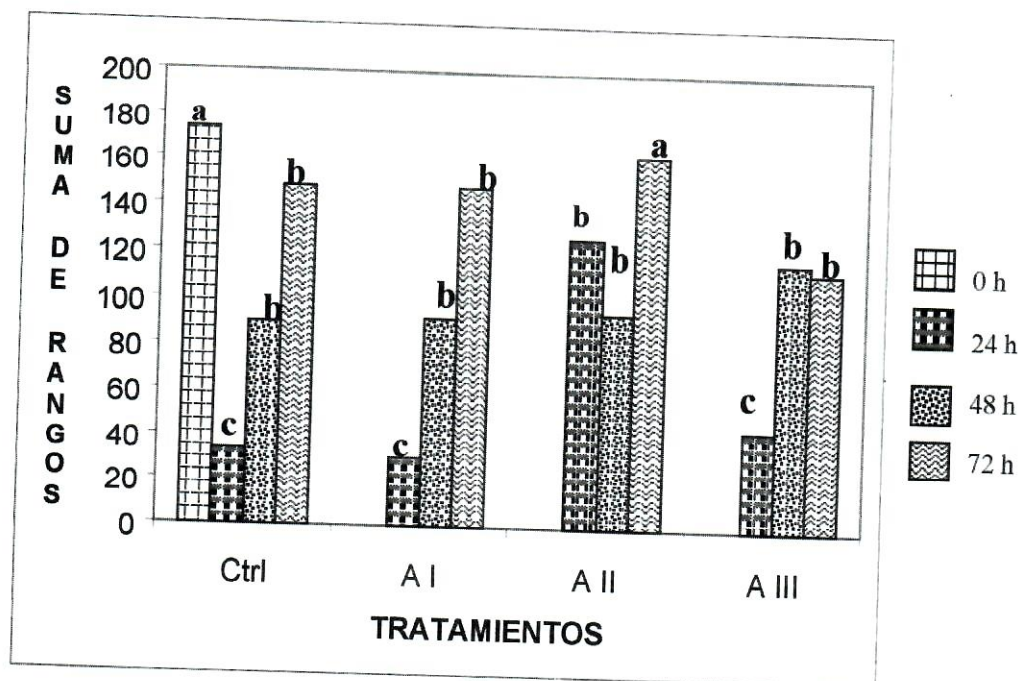


Fig. 2. Actividad enzimática PAL en callos de la variedad C 87-51 cultivados en medio MS-1, en presencia del oligosacárido HJM3. (Ctrl.: Control; A: HJM3 0.1, 1.0 y 3.98 mg/L. H=30", n=5. Letras iguales no difieren entre sí).

la primera evidencia que se tiene de la actividad biológica de este compuesto.

CONCLUSIONES

El compuesto HJM3 fue capaz de inducir la actividad de las enzimas peroxidasas y PAL, lo que evidencia la actividad biológica de éste en callos de caña de azúcar cultivados *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Albersheim P, Darvill AG, Augur C, Cheong JJ, Eberhard S, Hahn HG, Marfa V, Mohnen D, Oneil MA, Spiro MD and York WS. 1985. Oligosaccharins: Oligosaccharides regulatory molecules. *Acc. Chem. Res.* 25: 77-83.

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

Benítez D. 1998. Actividad biológica del Pectimorf sobre el desarrollo de callos de *Saccharum officinarum* L. de la variedad C-8751. Tesis de Diploma. Fac. Biol. U.H.

Bolwell GP, Bell JN, Cramer CL, Schuch W, Lamb CJ and

Dixon RA. 1985. L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: characterization and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 149: 411-419.

Cabrera JC. 2000. Obtención de una mezcla de (1-4)-alfa-D-oligogalacturonidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. Tesis PhD en Ciencias Químicas. Instituto de Ciencias Agrícolas, La Habana, 100p.

Creelman RA and Mullet JE. 1997. Oligosaccharines, Brasinolides and Jasmonates: Nontraditional Regulators of Plant Growth, Development and Gene Expressions. *The Plant Cell* 9: 1211-1223.

Dey PM and Harborne JB. 1997. *Plant Biochemistry.* Academic Press, London 554p.

De Lorenzo G, Ranucci A, Bellincampi D, Salvi G and Cervone F. 1987. Elicitation of Phenylalanine Ammonia-Lyase in *Daucus carota* by oligogalacturonides released from Sodium Polypectate by Homogeneous Polygalacturonase. *Plant Sciences* 51: 147-150.

De Wit PJGM. 1992. Molecular characterization of gene-

- for-gene systems in plants-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30:391-418.
- Garbey P. 1997. Estudio del efecto del oligopectato Dp>12 en callos de *Saccharum officinarum* L.. Tesis de diploma. Fac. Biol. U. H. 47 pp.
- González S y García E. 1989. Isoenzimas peroxidadas en callos de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico. *Rev. JBN. Univ. Habana*; X, 2: 193-199.
- González S, Garbey P, Alvarez Y, Benítez D y Cabrera JC. 2000. Actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar tratados con un oligopectato. *Rev. JBN. Univ. Habana*, XXI, 1: 89-94.
- Igartuburu J. 1994. Estudio de subproducto de la vinificación. Fibra alimentaria y carbohidratos de las semillas y del hollejo de la Uva Palomino. Tesis doctoral. Univ. de Cádiz.
- Mader M, Ungemach J and Schloss P. 1980. The role of peroxidase isozyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta*. 147: 467-470.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys. Plantarum*. Vol. 15, 473-497 p.
- Nothnangel EA. 1983. Host pathogen interactions XXII. A galacturonic acid oligomer from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol*. 71, 916-926.
- Ryan C and Farmer EF. 1991. Oligosaccharide signal in plants: a current assesment. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42: 651-674.
- Svalheim O. 1994. Elicitation of lignification, peroxidase activity and hydrogen peroxide production in cucumber hypocotyls. Doctoral Degree Thesis. Univ. of Tromso, Norway.
- Svalheim O and Robertsen B. 1990. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiol. Plantarum* 78: 261-267.
- Taiz L and Zeiger E. 1991. *Plant Physiol*. Eds. The Benjamin/Cummings. Publ. Co., Inc. California, New York, p 559.
- Recibido:** 23 de noviembre de 1999.
- Direcc. de los autores:** *Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Carretera de Varona Km 3 1/2, Capdevila, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. **Laboratorio de Biología Vegetal, Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba. ***Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.