

Eventos morfogénéticos y enzimáticos asociados a la actividad biológica de la oligosacarina HM.

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

* Facultad de Biología, Universidad de La Habana

** Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA

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

RESUMEN

Las oligosacarinas forman un grupo de sustancias que producen cambios marcados en el crecimiento y el metabolismo de la célula, por lo que son catalogadas como reguladores del proceso del crecimiento y la diferenciación. Además, están estrechamente ligadas a los mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de patógenos e insectos y elicitan grandes cantidades de fitoalexinas. En este trabajo se evaluó el efecto biológico de la oligosacarina HM en callos y brotes obtenidos a partir de callos provenientes de una variedad de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. var. Cuba 87 – 51 mediante técnicas biotecnológicas, para lo cual se evaluó la elicitación de las enzimas peroxidasa y fenilalanina amonio liasa, en callos y brotes, ambos sistemas enzimáticos son importantes, por ser de los primeros que se activan durante la puesta en marcha de las estrategias de defensa de las plantas. También se evaluó el número y tamaño de los brotes. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete de programas TONYSTAT. El compuesto HM estimuló el incremento del tamaño de los brotes cultivados estimuló la actividad de las enzimas peroxidasa y fenilalanina amonio liasa en callos y brotes.

Palabras clave: Oligosacarinas, caña de azúcar, peroxidasa, fenilalanina amonio liasa

ABSTRACT

Oligosaccharins are a group of compound that produce marked changes in growing and metabolism of plant cells. They are catalogued as a new group of plant growth regulators. Besides, they are very linked to plant defense mechanism against pathogens and pests, and they elicit large quantities of phytoalexins. In this paper we evaluated the biological effect of HM oligosaccharin on callus and shoots production obtained by tissue culture technics from callus of sugar cane *Saccharum officinarum* L. variety Cuba 87-51. We measured both variables: on callus and shoots produced, the elicitation of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase enzyme activities, both of them very important because they are the first enzymatic systems which are activated during the defense mechanism in plants. Data were processed through TONYSTAT Statistic programs. The HM compound stimulated the increasing of shoot large and elicit the peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities by sugarcane callus and shoots.

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

INTRODUCCIÓN

Las oligosacarinas son consideradas un nuevo grupo de reguladores del crecimiento, que se producen a partir de la degradación de la pared celular de las plantas. Una vez que estas son liberadas, son capaces de controlar diversas funciones relacionadas con el crecimiento, desarrollo, organogénesis y defensa contra plagas y enfermedades (Albersheim y Darvill, 1985; Aldington, 1991 ; Ryan y Farmer, 1991; Creelman y Mulet, 1997).

Hasta el momento son numerosas las evidencias experimentales acerca de la regulación de procesos organogénéticos a través de la acción de estos compuestos y de la elicitación de respuestas que tienen que ver con la defensa de las plantas que incluyen la inducción de la actividad de algunas enzimas importantes por el papel que juegan en el desarrollo vegetativo (Ridley *et al.*, 2001).

Las enzimas peroxidases se han utilizado como marcadores bioquímicos de la inducción de respuestas defensivas de la planta mediada por oligogalacturonidos

(Mader *et al.*, 1980; Svalheim y Robertsen, 1990; Svalheim, 1994). De esta misma forma puede ser considerada la fenilalanina amonio liasa. 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 elicitors oligosacáridicos.

En estos últimos años nuestro equipo de trabajo ha dirigido sus investigaciones hacia la evaluación de la actividad biológica de este nuevo grupo de sustancias biorreguladoras, sobre callos y/o brotes de algunas variedades de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. Se han realizado estudios de elicitación de la actividad de las enzimas peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amonio liasa, isoenzimas peroxidases y se ha evaluado el crecimiento en longitud y el incremento en número de los brotes. En cada caso se obtuvo un efecto positivo de los compuestos utilizados (Cabrera *et al.*, 1995; Benítez, 1998; González *et al.*, 2000; Cabrera, 2000; Alvarez *et al.*, 2001).

Por tales motivos, en este trabajo se estudia la caracterización de la actividad biológica de la oligosacarina HM en los procesos de regeneración de brotes obtenidos por cultivo *in vitro* a partir de callos de caña de azúcar variedad C 87-51 y el estudio de la actividad de las enzimas peroxidasa y fenilalanina amonio liasa en dichos brotes.

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* en medio MS-1 (Murashige y Skoog, 1962).

Medios de cultivo

Se empleó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 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) y el medio de regeneración MS-2 con kinetina 1.0 mg/L y ácido 3 indolacético (AIA) 1.0 mg/L (Heinz *et al.*, 1977).

HM: Oligosacarina obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de una fracción de hemicelulosa de caña de azúcar soluble en KOH. Su caracterización parcial indica que está compuesta por oligosacáridos del tipo arabinodilanos que tienen un grado de polimerización menor que 10 (Hernández, 1996).

Preparación del extracto enzimático

Se preparó con muestras de brotes, 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 1750 g durante 15 minutos y finalmente se colectó el sobrenadante al cual se le determinó la actividad peroxidasa y fenilalanina amonio liasa.

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) 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

La medición de la actividad enzimática fenilalanina amonio

liasa 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, disuelto en buffer borato 0.1M, pH8.8 y 0.1 mL del extracto preparado. La mezcla fue incubada a una temperatura de 40^o C durante una hora. Posteriormente 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 cinámico/h.mLenz.).

Montaje del experimento

En el experimento con callos se desarrollaron 13 tratamientos con 6 réplicas y N=78. Se le añadió al medio de cultivo MS-1 la oligosacarina HM a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 5.0 mg/L en presencia y ausencia de la kinetina a las 24, 48 y 72 horas. Se evaluó la actividad peroxidasa y fenilalanina amonio liasa en los callos.

En el experimento con brotes se desarrollaron 7 tratamientos con 6 réplicas y N=42. Se le añadió al medio de cultivo MS-2 la oligosacarina HM a las concentraciones 0.1, 1.0 y 5.0 mg/L en presencia y ausencia de kinetina a las 24, 48 y 72 horas.

Se determinó el número y tamaño de los brotes y se realizó un estudio de la actividad enzimática peroxidasa y fenilalanina amonio liasa en los brotes.

Análisis biométrico

Para realizar el procesamiento estadístico de los datos se comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett.

Ambas variables: tamaño y números de brotes, cumplieron con las premisas anteriores por lo que se empleó un análisis de varianza de clasificación simple modelo de efectos fijos y para comparar las medias, la prueba de Rangos Múltiples de Duncan (Sigarroa, 1985). El resto de las variables fueron procesadas mediante métodos no paramétricos mediante la prueba de Kruskal-Wallis y para comparar rangos, la prueba de Student-Newman-Keuls. En ambos casos se empleó el paquete de programas TONYSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se presentan los resultados del efecto de la HM sobre la inducción de actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar variedad C 87-51.

Los rangos muestrales de la variable actividad enzimática peroxidasa para dicha oligosacarina en callos de la variedad de caña de azúcar C 87-51, resultaron significativamente diferentes incluyendo a los controles.

Tomando en cuenta las tres concentraciones del oligosacárido en los tres tiempos, se puede comprobar que a las 24h la HM a 0.1 mg/L indujo prácticamente la misma cantidad de actividad enzimática que los tratamientos 2, 4 y 5, a una concentración de 1.0 mg/L disminuyó dicha actividad y a 10.0mg/L se activó excediendo los valores de dichos controles.

A las 48 h la concentración de 0.1 y 1.0 mg/L tuvieron valores por debajo del control; sin embargo a 10.0 mg/L se incrementó este valor, excediendo también al control.

Los valores más elevados correspondieron a la concentración de 5.0 mg/L a las 24 y 48 horas (h), éstos sobrepasaron a los respectivos controles. A las 72 h y 5.0 mg/L la actividad peroxidasa resultó menor que los dos tratamientos anteriores, pero a su vez fue mayor que su control (Trat. 4).

Es decir, la actividad de esta enzima fue inducida por la oligosacarina HM a una concentración 0.1 mg/L, se obtuvo la mayor actividad a las 24 horas pero disminuyó en los otros dos tiempos. A una concentración de 1.0 mg/L ocurrió la misma tendencia. Sin embargo, a 5.0 mg/L la actividad que se obtuvo a las 24 h se mantuvo a las 48 h, pero tendió a disminuir a las 72 h, aunque fueron las mas altas, sin kinetina en el medio de cultivo.

Esto demostró que la actividad de la enzima peroxidasa en los callos de la variedad de caña de azúcar C 87-51 tratados con la HM, se incrementó con la mayor

concentración de dicha oligosacarina, pero disminuyó a las 72 h.

Al hacer un análisis de los resultados se observó una respuesta diferencial en cuanto a actividad, que experimentó la enzima peroxidasa ante la oligosacarina en estudio HM (González *et al.*, 2000) y el oligopectato Pectimorf utilizado por Benítez (1998) si se tiene en cuenta que el efecto de ambos fue evaluado en callos de la misma variedad de caña de azúcar C 87-51 y en las mismas condiciones, es decir, se hizo uso del mismo diseño experimental.

Con el Pectimorf ocurrió una inducción de actividad peroxidasa en el tiempo, pero fue inversamente proporcional a la concentración del oligopectato en el medio de cultivo.

Se hace necesario señalar que la HM es una oligosacarina obtenida a partir de hemicelulosas del tallo de caña de azúcar y que cuenta con un grado de polimerización menor que diez (DP < 10). Por otra parte el Pectimorf proviene de las paredes celulares de la corteza de cítricos y su grado de polimerización se encuentra entre doce y catorce (DP 12 – 14), condiciones para presentar una actividad biológica (Ridley *et al.*, 2001).

Sin embargo, a pesar de que la HM proviene de la caña de azúcar y el Pectimorf de cítricos, este último resultó ser más activo en callos y brotes de caña de azúcar que el primero, pues a 0.1 mg/L fue capaz de incrementar la actividad de la enzima, mientras que la HM necesitó una

TABLA I

Efecto del oligopectato HM en la actividad peroxidasa (PER) y fenilalanina amonio liasa (PAL) de callos de caña de azúcar (H: Estadígrafo de Kruskal-Wallis y resultados SNK). Las letras iguales no son significativamente diferentes ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$)

TRAT	Kinetin (0.1 mg/L)	HM (mg/L)	Tiempo (horas)	PER	PAL
1	+	-	0	262.0 c	90.0 b
2	+	-	24	259.0 c	44.0 e
3	+	-	48	305.0 b	43.5 e
4	+	-	72	243.5 c	81.0 b
5	-	0.1	24	280.0 c	114.0 a
6	-	+	48	154.5 e	55.0 d
7	-	+	72	85.0 f	94.5 b
8	-	1.0	24	183.5 d	43.5 e
9	-	+	48	147.5 e	69.5 c
10	-	+	72	121.0 e	36.0 e
11	-	5.0	24	359.5 a	40.0 e
12	-	+	48	356.5 a	64.5 c
13	-	+	72	324.5 b	35.0 e
				H: 32.11	H: 25.36
				**	*
				n=6	n=6

concentración de 5.0 mg/L. El efecto desigual que ejercen ambas oligosacarinas se debe en primer lugar a una estructura diferente. Pueden existir diferencias entre las dos orientaciones (alfa o beta) que puede adoptar el enlace glucosídico entre los azúcares que forman los monosacáridos que constituyen a su vez a las oligosacarinas. Según Darvill y Albersheim (1985) aunque la diferencia entre ambos tipos de enlace pueda parecer pequeña, dos azúcares iguales dan lugar a disacáridos radicalmente distintos según estén unidos por un enlace de un tipo u otro.

Por otra parte Aldington *et al.* (1991) afirman que los oligogalacturónidos con un grado de polimerización (DP) entre 12 y 14 son considerados los más activos. Esto pudiera explicar además que la oligosacarina HM con DP < 10 sea menos activa que el oligopectato Pectimorf con DP entre 12 y 14. (Ridley *et al.*, 2001).

En la tabla I se presentan los resultados obtenidos al evaluar la actividad fenilalanina amonio liasa en callos de caña de azúcar tratados con HM. Se obtuvo diferencias significativas al aplicar el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Los tratamientos donde se evaluó la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en callos de la variedad de caña de azúcar C 87-51 resultaron estadísticamente diferentes.

Los controles usados en el experimento presentaron diferencias significativas entre ellos al igual que el resto de los tratamientos. Las diferencias significativas ente los tratamientos indican que la HM fue capaz de inducir la actividad de la enzima.

Cuando se hace un análisis para cada uno de los tratamientos sin kinetina y las tres concentraciones de la oligosacarina, se obtiene que a las 24 h de estar las células en contacto con el medio que la contiene a una concentración de 0.1 mg/L, se indujo el máximo de actividad enzimática. Esta fue menor a las 48 h y se incrementó a las 72 h, pero con un valor inferior al de las 24 h.

A una concentración de 1.0 mg/L a las 24 h los valores de actividad fenilalanina amonio liasa no sobrepasaron a su respectivo control (C 24 h), a las 48 h sí se sobrepasó el valor de su control, pero a las 72 h disminuyó por debajo del control a las 72 h.

A 5.0 mg/L ocurre exactamente lo mismo que para la concentración de 1.0 mg/L.

En los tratamientos donde la concentración de la oligosacarina es de 1.0 y 5.0 mg/L a las 24 h, la actividad fenilalanina amonio liasa presentó un comportamiento

similar al experimentado por peroxidases frente a otros elicitores evaluados por otros autores. Garbey (1997) al estudiar el efecto del Pectimorf sobre callos de la variedad de caña de azúcar C 87-51, encontró que a las 24 h de estar en contacto el material biológico con el oligopectato, no había ningún tratamiento que superara el valor de actividad peroxidasa obtenido para el control.

Según Soriano-Richard (1998) el elicitador requiere de un tiempo para inducir la síntesis u acumulación de la enzima para lograr superar los niveles existentes en el control. Esta síntesis viene activada directamente por fitoalexinas inducidas a su vez por el elicitador.

A las 48 h, para ambas concentraciones se registró el máximo valor de actividad el cual disminuyó a las 72 h incluso por debajo de su control. En estos dos casos estamos en presencia de una cinética transiente de la enzima fenilalanina amonio liasa, la que no se comporta de igual manera durante todo el experimento.

La mayor actividad de esta enzima ante la presencia de la oligosacarina HM en el medio de cultivo, correspondió a la concentración de 0.1 mg/L a las 24 y 72 horas de iniciado el tratamiento, aunque en este último periodo de tiempo en menor proporción.

Como los resultados obtenidos difieren para cada tratamiento se torna difícil establecer una cinética general de la enzima para estos como lo hicieron De Lorenzo *et al.* (1987) en suspensiones celulares de *Daucus carota*. Dichos resultados permitieron caracterizar la actividad de la fenilalanina amonio liasa como transiente, ya que los valores después de alcanzar un máximo de actividad a las 20 horas disminuyeron a un nivel basal a las 50 horas.

En este experimento, una parte de los tratamientos se caracterizaron por tener una cinética transiente de la enzima fenilalanina amonio liasa, el resto no se comportó de tal forma, es decir, en el primer intervalo de tiempo se obtuvo un máximo de actividad de la enzima que disminuyó en el segundo intervalo y ya en el tercero volvió a incrementarse aunque no a valores tan elevados como en el primer caso.

Estas diferencias, dentro de un mismo experimento, pudieron deberse a la forma en que fueron tratados los callos, pues no todas las células se encontraban en contacto directo con el medio, en el cual estuvo presente el elicitador a una determinada concentración y de hecho la actividad de la enzima pudo verse afectada.

No ocurre así en las suspensiones celulares, donde las células en principio se desagregan y se encuentran en condiciones más homogéneas, todas pueden estar en contacto directo con el elicitador que forma parte de un medio

líquido, entonces la enzima desarrolla una actividad que responde a una misma cinética.

Al analizar comparativamente el efecto de la oligosacarina HM y el oligopeptato Pectimorf en cuanto a la inducción de fenilalanina amonio liasa en callos de caña de azúcar, como se hizo para las peroxidasas, se obtuvo que mientras que la HM indujo la mayor actividad de esta enzima a la menor concentración (resultado inverso a las peroxidasas), con el Pectimorf se obtienen dos efectos diferentes. Según Garbey (1997) el efecto del oligopeptato coincide esta vez con la oligosacarina en estudio, la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa se incrementa a la menor concentración utilizada. Sin embargo, Benítez (1998) encontró que en estas mismas condiciones el Pectimorf indujo un máximo de actividad de la enzima a la mayor concentración.

Tanto la HM como el Pectimorf fueron capaces de estimular un incremento de actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa a la menor concentración en ausencia de kinetina, pudiera pensarse que existe una contradicción en el efecto de ambos cuando se analizan las peroxidasas, pero en realidad las diferentes enzimas que se inducen no tienen por qué responder de una misma forma ante diferentes concentraciones del inductor ni desarrollar la misma cinética de inducción.

En la tabla II se relacionan los resultados del análisis estadístico para el tamaño y el número de los brotes.

El producto de la prueba estadística aplicada revela la acción de la oligosacarina HM sobre la organogénesis de los callos, o sea la formación de brotes y el crecimiento en longitud de éstos. El ANOVA de clasificación simple aplicado a las 2 variables seleccionadas arrojó diferentes resultados en ambos casos.

Al hacer el análisis del número de brotes, se encontró que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, incluyendo al control. De esta misma forma respondió dicha variable frente al Pectimorf oligosacarina producida a partir de la degradación de las pectinas de frutos de cítricos (Cabrera *et al.*, 1995; Cabrera, 2000).

Es de señalar que en los tratamientos 5, 6 y 7 se obtuvo una respuesta de inducción de brotes similar al control y esto es un resultado positivo si se tiene en cuenta que en el control está presente la kinetina y en dichas variantes este compuesto se sustituye por la oligosacarina HM. La ausencia de la citoquinina no afectó la respuesta de estos tratamientos en cuanto a la formación de nuevos brotes. Con las concentraciones probadas para la combinación citoquinina-oligosacarina y oligosacarina en ausencia de la citoquinina no se obtiene un buen efecto en la formación de nuevos brotes.

Este regulador del crecimiento pudo provocar una estimulación en la diferenciación celular al ser añadido en el medio donde se cultivaron los callos a partir de los cuales crecieron los brotes, es decir, éste estimuló la diferenciación de las células que pudieron completar su ciclo de división.

En cuanto a la variable tamaño de brotes, el ANOVA refleja diferencias significativas entre tratamientos y control (Tabla II).

Tanto los tratamientos, donde existe la combinación citoquinina-oligosacarina, como en los que se añadió solo la HM se obtuvo una respuesta positiva de morfogénesis.

Merece atención especial el bloque de tratamientos (5, 6 y 7) en los que está ausente la fitohormona tradicional kinetina y donde el material biológico se desarrolló bajo la influencia de la oligosacarina HM en estudio.

TABLA II

Efecto de la oligosacarina HM sobre la regeneración de brotes obtenidos a partir de callos de caña de azúcar de la variedad C 87-51. Resultados del ANOVA de clasificación simple (Letras iguales no difieren entre sí). Medio MS-2 con concentraciones combinadas de kinetina y HM.

Tratamientos	Kinetina (mg/L)	HM (mg/L)	Regeneración de brotes	
			Número de Brotes x Callo	Tamaño (mm)
1	1.0	-	1.176	1.323 ab
2	1.0	0.1	1.126	1.21 b
3	1.0	1.0	1.190	1.205 b
4	1.0	5.0	1.066	1.374 a
5	-	0.1	0.953	1.42 a
6	-	1.0	0.995	1.198 b
7	-	5.0	0.989	1.305 ab
			F=2.037 (ns)	F=5.212 ***

La mejor respuesta en el desarrollo de los brotes ocurre cuando la HM está a una concentración de 0.1 mg/L en el medio de cultivo. A 1.0 mg/L disminuye un poco hasta igualarse al control, pero a 5.0 mg/L vuelve a incrementarse.

De estos resultados se puede inferir que a pesar de la importancia que reviste la presencia de kinetina en el medio de cultivo para la inducción y el crecimiento de los brotes, la HM por sí sola fue capaz de impulsar el incremento del tamaño de los brotes de tal forma que superó los tratamientos donde la oligosacarina y kinetina aparecían en concentraciones combinatorias. Es por ello que se puede afirmar que este nuevo compuesto puede sustituir el papel de la kinetina en la regeneración y crecimiento de los brotes. Según Albersheim y Darvill (1985) las oligosacarinas regulan los procesos de morfogénesis en los tejidos vegetales. ^

Al observar el bloque de tratamientos (2, 3 y 4) que se refieren a la combinación oligosacarina-citoquinina, se notó que el tratamiento 4 (kinetina 1.0 mg/L y HM 5.0 mg/L) se destaca por encima del resto, de tal manera que no presentó estadísticamente diferencias significativas con respecto al tratamiento 2 (HM 0.1 mg/L) y de hecho presentó un valor por encima del control. Los tratamientos 3 y 4 no presentan diferencias significativas con el control.

El producto de la combinación de kinetina con la oligosacarina HM a la mayor concentración que se estableció para el experimento nos lleva a pensar que justamente para estas condiciones ocurre una aditividad de efectos entre ambos que se caracteriza por ser la más positiva.

Es importante comentar que para la variable tamaño de los brotes tanto la oligosacarina HM como el oligopeptato Pectimorf evaluado por Benítez (1998) inducen una respuesta significativa a la menor concentración (0.1 mg/L) en ausencia de la citoquinina. Esto reafirma la posibilidad que tienen las oligosacarinas estudiadas y en estudio, de desempeñar el importante papel de las citoquininas en la regulación de procesos morfogénicos **in vitro**.

Quizás la concentración de la oligosacarina HM 0.1 mg/L sea la óptima a la que estos reguladores inducen respuestas positivas, no obstante se hace necesario experimentar con concentraciones menores y por tanto más económicas.

En la figura 1 se puede apreciar el efecto biológico de la oligosacarina HM sobre la regeneración de brotes a partir de callos cultivados en medio que lo contenían, donde se evidencia el papel desempeñado por la oligosacarina en la regulación del crecimiento y la morfogénesis.

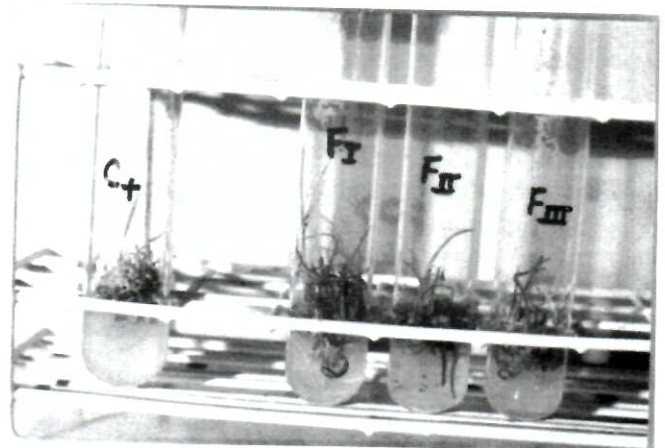


Fig. 1. Experimento de regeneración de brotes **in vitro** a partir de callos de la variedad de caña de azúcar C 87-51 en presencia de diferentes concentraciones de la oligosacarina HM. C: control, F: medio sin kinetina; concentraciones de HM: I: 0.1 mg/L, II: 1.0 mg/L, III: 5.0 mg/L.

Actividad enzimática peroxidasa en brotes

La actividad peroxidasa en brotes obtenidos a partir de callos de caña de azúcar, variedad C 87-51, en presencia de la oligosacarina HM mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 2).

Al observar la actividad de esta enzima, se pudo apreciar que la mejor respuesta de los callos se localiza en los tratamientos 5 y 6 en los que la HM ejerce su acción en ausencia de la kinetina, e incluso se logran valores por encima del control.

Al examinar el bloque de tratamientos 2, 3 y 4, en los cuales aparecen combinados la HM y la kinetina a determinadas concentraciones, se puede ver que el tratamiento 4 en el que se encuentra el compuesto en estudio a la concentración de 5.0 mg/L y la kinetina a 1.0 mg/L, no muestra diferencias significativas con respecto a los que prueban a la HM en ausencia de la citoquinina.

Resulta interesante que el efecto de la HM en la inducción de actividad enzimática peroxidasa en brotes coincide con el logrado en uno de los procesos morfogénicos investigados en el epígrafe anterior.

En ambos experimentos la HM por sí sola es capaz de lograr los mayores valores sin que sea imprescindible la presencia de kinetina para lograrlo.

Estas evidencias permiten plantear que la oligosacarina HM es capaz de regular procesos morfogénicos y regular actividades enzimáticas como la de peroxidasa.

El hecho de que el tratamiento con la HM 5.0 mg/L y la kinetina 1.0 mg/L sea estadísticamente igual a los tratamientos donde la HM está sola, puede tener relación con la probabilidad que las concentraciones de uno y otro

sean óptimas para que ocurra una similitud de efectos entre oligosacarina y kinetina de manera que se alcance tal nivel.

Del estudio de los tratamientos 2 y 3 para los cuales la actividad peroxidasa quedó por debajo del control, se puede inferir que quizás las combinaciones usadas en lo que a actividad enzimática se trata, presentaron un cierto antagonismo que impidió mejores efectos. Este antagonismo entre oligosacarina y citoquinina no se ha descrito en la literatura; Bellincampi *et al*, (1996) lo plantearon entre oligogalacturónidos y auxina, al estudiar la rizogénesis en plantas de tabaco transformadas encontraron que los oligogalacturónidos fueron capaces de inhibir la formación de raíces en explantes de hojas transgénicas mediada por un gen denominado rolB y la expresión de éste, inducida por la auxina.

Aunque HM siguió un comportamiento tipo citoquinina no se puede descartar que en otras condiciones sea capaz de promover otro tipo de respuesta en presencia de la kinetina.

Actividad enzimática fenilalanina amonio liasa en brotes.

Al evaluar la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa de los brotes obtenidos *in vitro* en presencia de la oligosacarina HM, se registraron valores muy por encima del valor de actividad encontrado en el control y por tanto con diferencias significativas entre ellos (Fig. 3).

El comportamiento de la fenilalanina amonio liasa se asemeja al de la enzima peroxidasa ante las mismas condiciones en experimentos anteriores, es decir, la mayor actividad fenilalanina amonio liasa se localiza en los tratamientos en los que la oligosacarina no se combina con la kinetina.

Las tres concentraciones de la oligosacarina HM que se incorporaron al medio donde se cultivaron los callos resultaron efectivas, la enzima mantuvo valores altos de actividad. Esto constituye una prueba más de la efectividad de la oligosacarina.

Se han obtenido evidencias de incrementos de fenilalanina amonio liasa por varias causas, entre ellas; De Lorenzo *et al*, (1987) observaron un incremento en los niveles de la enzima posterior a la infección microbiana y tratamientos con elicitores presentes en las paredes celulares de hongos y filtrados de cultivo. En nuestro caso se evidencia un incremento de la actividad de dicha enzima por fragmentos pécticos provenientes de las paredes celulares de caña de azúcar. Según Nothnangel (1983) los fragmentos pécticos (alfa-D galacturónidos) también indujeron actividad enzimática fenilalanina amonio liasa.

El análisis de los tratamientos con kinetina y concentraciones 0.1, 1.0 y 5.0 mg/L HM muestra que la combinación que corresponde a 0.1 mg/L HM y 1.0 mg/L de kinetina, no es estadísticamente diferente a los máximos valores reportados para 0.1, 1.0 y 5.0 mg/L HM sin kinetina. Además los 2 tratamientos con kinetina y 1.0 y 5.0 mg/L HM se ubicaron por encima del control aunque por debajo del resto. Por tanto, oligosacarina y kinetina juntas son capaces de generar un incremento de la actividad de esta enzima, con mayor éxito a la menor concentración de la oligosacarina.

Es notable, al hacer referencia a las combinaciones entre oligosacarina y citoquinina, como no existe un mismo efecto de éstos para las dos enzimas en estudio. Por ejemplo, cuando se analizó la actividad peroxidasa en brotes, se obtuvo que las concentraciones de HM y kinetina más efectivas fueron 5.0 mg/L y 1.0 mg/L respectivamente.

Benítez (1998) cuando estudió el efecto del oligopectato Pectimorf bajo las mismas condiciones experimentales usadas en este estudio, encontró para la actividad peroxidasa en hojas, que la combinación más eficiente fue la de 1.0 mg/L de kinetina y 10.0 mg/L de Pectimorf y en cuanto a la enzima fenilalanina amonio liasa, la concentración de 1.0 mg/L para ambas.

Al hacer este mismo análisis para aquellos tratamientos que corresponden a concentraciones exclusivas de la oligosacarina, en nuestra investigación se obtuvo que ambas actividades enzimáticas responden de igual manera; se obtienen altos valores estadísticamente sin diferencias frente a las tres concentraciones de la HM, es decir, que las concentraciones evaluadas tienen la misma capacidad de promover un incremento de las actividades de las enzimas peroxidasa y fenilalanina amonio liasa. Por lo que se hace necesario probar concentraciones menores en pos de encontrar la más efectiva pero la más económica también.

Por otra parte el Pectimorf induce la mayor actividad peroxidasa en brotes a la concentración de 0.1 mg/L, mientras que la FENILALANINA AMONIO LIASA no logra incrementar su actividad por encima del control a ninguna de las tres concentraciones probadas del oligopectato (Benítez, 1998).

La oligosacarina HM estimuló el incremento del tamaño de los brotes obtenidos a partir de callos en medio de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de ésta y describió un comportamiento tipo citoquinina.

Se evidencia que la oligosacarina HM ha desarrollado un efecto positivo en cuanto a inducción de actividad peroxidasa y fenilalanina amonio liasa en brotes

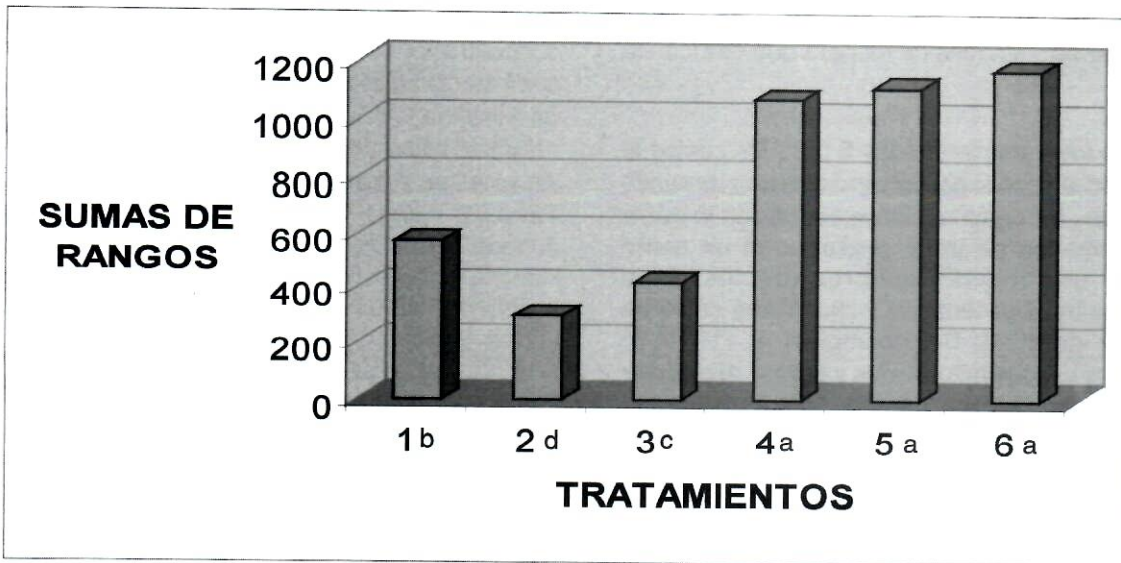


Fig. 2. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en brotes de la variedad de caña de azúcar C 87-51 cultivados en medio MS-2, en presencia de diferentes concentraciones de la oligosacarina HM. (1: Control; 2: KIN, 0.1 HM; 3: KIN, 1.0 HM; 4: KIN, 5.0 HM; 5: 0.1 HM; 6: 5.0 HM. (concentraciones de HM en mg/L) H:6178***, n=6. (Letras iguales no difieren entre sí.)

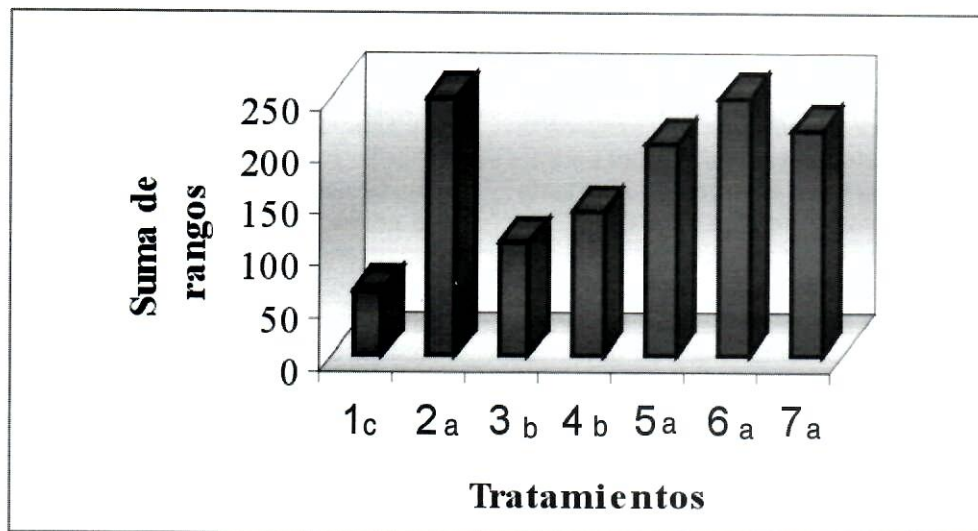


Fig. 3. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en brotes de la variedad de caña de azúcar C 87-51 cultivados en medio MS-2, en presencia de diferentes concentraciones de la oligosacarina HM. (1: Control; 2: KIN, 0.1 HM; 3: KIN, 1.0 HM; 4: KIN, 5.0 HM; 5: 0.1 HM; 6: 1.0 HM; 7: 5.0 HM. (concentraciones de HM en mg/L) H=20.30***, n=6. (Letras iguales no difieren entre sí.)

provenientes de callos cultivados en medio MS-2 y dicho efecto resultó elevado a las tres concentraciones utilizadas. Cuando se compara la HM y el Pectimorf evaluados en las mismas condiciones, el primer regulador mostró ser más activo (González *et al.*, 2000).

Esta es la primera evidencia que se tiene de la actividad biológica de esta oligosacarina probada lo que hace a estos resultados novedosos y constituyen el punto de partida para investigaciones futuras.

Es importante tener presente que el efecto de las oligosacarinas en caña de azúcar *in vitro* ha sido poco estudiado a nivel mundial en general, por lo que no existe una disponibilidad de literatura de referencia, de ahí la importancia y necesidad de estos estudios, con vistas a la incorporación de dichos compuestos en los medios de cultivo, sustituyendo fitohormonas las cuales son mucho más caras que el compuesto en estudio y para tratar de lograr un mayor vigor y tamaño en las vitroplantas que se obtengan.

BIBLIOGRAFÍA

- Albersheim P, Darvill AG, Augur C, Cheong JJ, Eberhard S, Hahn HG, Marfa V, Moneen D, O'Neill MA, Spiro MD and York WS. 1992. Oligosaccharins: Oligosaccharides regulatory molecules. *Acc. Chem. Res.* 25: 77-83.
- Aldington S, Mc Dougall GJ and Fry Sc. 1991. Structure-activity relationships of biologically active oligosaccharides. *Plant Cell and Environment.* 14: 625-636.
- Alvarez Y, González S, Garbey P y Cabrera JC. 2001. Actividad biológica del hidrolizado HJM₃ sobre callos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivados **in vitro**. *Revista Jard. Bot. Nac. (La Habana)* 22 (2): 279-284.
- 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. p 45.
- Bellincampi D, Cardarelli M, zaghi D, gerini G, Salvi G, Gatz C, Cervone F, Altamura MM, Constantino P, De Lorenzo G., 1996. Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in rolB- transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the rol-B gene. *Plant Cell* 8, 477-487.
- Bolwell GP, Bell JN, Cramer CL, Schuch Lamb CJ and Dixon DA. 1985. L-Pheny alanine – 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, Gutierrez A, Falcon A and Gonzalez S. 1995. Highly pure pectic acid and bioactive oligogalacturonides. 7th Cell Wall Meeting, Abstracts and Programine p. 72, Santiago de Compostela, España.
- Cabrera JC. 2000. Obtención de una mezcla de (1-4)-a-D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. Tesis Ph D 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.
- Darvill AG and Albersheim P. 1985. Oligosaccharins. *Sci. American* 253, 3:58-64.
- Dey PM and Harborne JB. 1997. *Plant Biochemistry*. Department of Botany, Plant Sciences Laboratories, Univ. of Reading, Whiteknights, Reading RG 6 2AS, UK. ISBN 0-12-2146-3. 554 p.
- De Lorenzo, G, Ranusi A, Bellincampi D, Salvi G and Cervone F. 1987. Elicitation of Phenylalanine Amonia Lyase in *Daucus carota* by Oligogalacturonides released from Sodium Polypectate by Homogeneous Polygalacturonase. *Plant Science*, 51: 147-150.
- 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. *Revista Jard. Bot. Nac. (La Habana)* 10 (2): 193-199.
- González S, Garbey P, Álvarez Y, Benítez D y Cabrera JC. 2000. Actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar tratados con un oligopectato. *Revista Jard. Bot. Nac. (La Habana)* 21 (1): 89-94
- Heinz DJ, Krishnamurthi M, Nickell LG and Maretzki A. 1997. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. Ch 1.1, p. 3 – 17. tomado de Reinert J and Bajaj YPS., *Palnt Cell, Tissue and organ Culture*, Springer Verlag, Berlin.
- Hernández M. 1996. Oligosacáridos de pared celular de caña de azúcar con actividad necrosante en plantas. Tesis de Maestría, Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana, 50 p.
- 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.
- Ridley BL, O' Neill MA and Mohnen D. 2001. Pectins: structure biosynthesis, and oligogalacturonide – related signaling. *Phytochemistry* 57, 929 – 967.
- Ryan C and Farmer EF. 1991. Oligosaccharide signal in plants: a current assesment. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42: 651-674.
- Sigarroa A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana. Pueblo y Educación. 793 p.
- Soriano – Richards E. 1998. Las oligosacarinas como elicitoras de defensas naturales contra las enfermedades

vegetales. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana, México. Conferencia impartida en el XI- Seminario Científico del INCA, La Habana, Cuba.

Svalheim O and Robertsen B. 1990. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiol. Plantarum*. 78: 261-267.

Svalheim O. 1994. Elicitation of lignification, peroxidase activity and hydrogen peroxide production in cucumber hypocotyls. Doctoral Degree Thesis. Univ. of Tromso, Norway p 97.

Recibido: 18 de enero del 2001.

Direcc. de los autores: *Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba. ** Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA. Carretera Varona km 3 1/2, Capdevila, Boyeros, Ciudad Habana.*** Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Carretera Tapaste km 3, San José de Las Lajas, La Habana.

Revista del
**Jardín Botánico
Nacional**

El Consejo de Redacción de la Revista del Jardín Botánico Nacional y la Dirección de la Institución, agradecen la desinteresada colaboración y la rapidez en la revisión de trabajos correspondientes al Vol. XXII (2001) a los siguientes especialistas:

Dra. Esther Diosdado Salces
Dra. Angela T. Leiva Sánchez
M.Sc. Esperanza Peña García
Dr. Víctor R. Fuentes Fiallo
Dra. Xonia Xiquéz Martín
Dra. Clara González Arencibia

Dr. Sergio González Suárez
Dr. Alberto Álvarez de Zayas
Dr. Rosalina Berazaín Iturralde
Dr. Jorge Gutiérrez Amaro
Dr. Miguel Rodríguez Hernández
Tec. Wildee Alonso Broche