

# Análisis inmunoquímico de la embriogénesis somática en cultivos celulares de la caña de azúcar

Mayra Rodríguez, Esperanza Niubó y Rodolfo Maribona.

Departamento de Bioplasmas. Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de diciembre de 1997. Aceptado: 30 de septiembre de 1998.

Palabras clave: caña de azúcar, embriogénesis somática, proteínas extracelulares, suspensiones celulares, ácido 2,4-diclorofenoxiacético.  
Key words: sugar cane, somatic embryogenesis, extracellular proteins, cellular suspensions, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

**RESUMEN.** Se realizó un estudio de las proteínas extracelulares (EP) en suspensiones celulares de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido). El proceso embriogénico se siguió por métodos inmunoquímicos con anticuerpos específicos para las proteínas extracelulares EP1, EP2, EP3 y EP4 a diferentes tiempos del cultivo celular en presencia y ausencia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se demostró que la proteína EP1 está presente solamente en la etapa de inducción con la auxina 2,4-D. La detección de la proteína EP4 fue cualitativamente menor con relación al control positivo tanto en presencia y ausencia de la auxina, aunque la mayor señal se observó antes de eliminar el 2,4-D del medio. Las proteínas EP2 y EP3 estuvieron presentes durante el proceso de diferenciación morfológica. La máxima reacción se observó durante la fase globular del desarrollo embriogénico. El comportamiento de las proteínas embriogénicas EP2 y EP3 presentes en la suspensión celular indicaron el carácter embriogénico del cultivo. Se sugiere la utilización de estas proteínas como marcadores bioquímicos de la embriogénesis somática en caña de azúcar.

**ABSTRACT.** Extracellular proteins (EP) in sugarcane (*Saccharum* spp. híbrido) cell suspension cultures were studied. The embryogenic process was immunohistochemically monitored using specific antibodies for the extracellular proteins EP1, EP2, EP3 and EP4, at different times of the cell culture either in presence or absence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) acid. It was demonstrated that EP1 protein is only present in the induction phase with 2,4-D auxin. The EP4 protein detection was lower than positive control in all the process even without the auxin. The higher signal was observed before 2,4-D was retired from the culture. The EP2 and EP3 proteins were present during the morphological differentiation process and the highest reaction was observed in the globular embryos phase. The behavior of the embryogenic proteins EP2 and EP3 showed the embryogenic character of the culture. The use of these proteins as biochemical markers for sugarcane somatic embryogenesis is suggested.

## INTRODUCCION

El proceso de embriogénesis somática, en su etapa inicial está acompañado por cambios en la composición y concentración de diferentes proteínas secretadas al medio por las células presentes en el cultivo.<sup>1,2</sup> El medio condicionado de un cultivo de células vegetales contiene un conjunto de moléculas principalmente derivadas de la pared celular, incluyendo polisacáridos, proteoglicanos y polipéptidos. Entre las proteínas

existe una amplia cantidad de enzimas, las cuales se clasifican entre dos clases principales: hidrolasas (glicosidasas, quitinasas, endoglucanasas, etc.) y oxidorreductasas.<sup>3</sup> Recientes estudios de la embriogénesis somática revelan que este proceso es altamente dependiente de las proteínas que promueven la formación del embrión somático.<sup>4,7</sup>

La embriogénesis somática de zanahoria (*Daucus carota* L.) es ampliamente usada como sistema mo-

delo del desarrollo temprano en plantas.<sup>8</sup> Se han caracterizado las proteínas presentes en las suspensiones celulares de zanahoria, llamadas proteínas extracelulares (EP). Se han reportado proteínas que son sólo secretadas por las células embriogénicas como la proteína de transferencia de lípidos (EP2) que realiza la función de transportar moléculas apolares hacia la superficie epidérmica exterior para la formación de una capa de cutícula que mantiene el pequeño tamaño de las células embriogénicas<sup>9</sup> y las proteínas extracelulares de 32 kD (EP3) que son un conjunto de proteínas con actividad quitinasa 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 estado globular del desarrollo.<sup>10,11</sup>

Otras proteínas son derivadas solamente de células no embriogénicas como las proteínas EP1<sup>12</sup> y la glicoproteína EP4.<sup>13</sup> Las proteínas EP1 están compuestas por un conjunto de proteínas que difieren entre sí en el peso molecular. Se ha demostrado que las parejas de proteínas EP1 de 31/32 kD y 52/54 kD son proteínas extracelulares que forman parte de la pared celular de las células vacuoladas no embriogénicas. Esta unión a la pared es muy débil, por lo que con simples lavados con el medio de cultivo se desprenden. El gen que codifica las proteínas EP1 sólo se expresa en la epidermis de las células no embriogénicas, estando ausentes en las masas proembrio-

génicas y en los embriones tanto somáticos como zigóticos.<sup>12,14</sup> La proteína EP4 es una glicoproteína de 47 kD que está presente en la pared celular de los agregados celulares de moderado tamaño y se localiza en la pared intercelular. No es una proteína estructural, su función está ligada a la división celular de las células no embriogénicas.<sup>13</sup>

Las auxinas constituyen el factor más importante para la regulación de la inducción y el desarrollo de la embriogénesis. La presencia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) u otras auxinas es necesaria para la formación de agregados celulares embriogénicos a partir de células.<sup>15,16</sup> Esto indica que las auxinas son esenciales para la inducción de la embriogénesis, o sea, son necesarias para que las células expresen la totipotencia. Sin embargo, después de formados los agregados celulares, las auxinas inhiben la embriogénesis.<sup>17,18</sup> Se ha demostrado que en cultivos celulares de varias especies la presencia prolongada del 2,4-D, bloquea el desarrollo embriogénico.<sup>19,20</sup>

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar inmunquímicamente el proceso de la embriogénesis somática en cultivos celulares de caña de azúcar, mediante la inmunodetección de las proteínas extracelulares EP1, EP2, EP3 y EP4, utilizando anticuerpos específicos para cada una de estas proteínas.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención de las suspensiones celulares de caña de azúcar

Para la formación de embriones somáticos en caña de azúcar se cultivaron explantes de hojas jóvenes de la variedad C87-51 en medio sólido Murashige y Skoog (MS)<sup>21</sup> solidificados con agar, al que se le adicionaron 3 mg · L<sup>-1</sup> de 2,4-D y se subcultivaron tres veces con un intervalo de 4 semanas. Los callos nodulares (embriogénicos, Fig.1) se desagregaron en medio de cultivo líquido MS en zaranda a 150 r/min, en la oscuridad y a (25 ± 2) °C, con lo que se liberaron diferentes poblaciones celulares, entre ellas, las pequeñas células embriogénicas que posteriormente dieron origen a los agregados celulares. Después de tres semanas de desagregación, las suspensiones se filtraron por mallas de 500 µ, se ajustó el volumen a 50 mL en frascos de 250 mL y se colocaron en una zaranda por un período de 21 d para permitir el crecimiento celular en presencia de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Pasados los 21 d, se dejaron precipitar las suspensiones y se decantó la mayor cantidad de sobrenadante posible, siendo reemplazado por medio MS que no contenía 2,4-D. Cada cinco días se retiraron 10 mL de medio, volumen que se renovó con medio MS fresco.

Se tomaron muestras de las suspensiones a los 10, 17 y 21 d posteriores al comienzo del cultivo, en presencia del 2,4-D. A los 21 d, se eliminó este de la suspensión celular y a partir de aquí, se tomaron muestras a los 10, 14, 17 y 20 d. Las muestras se filtraron hasta la obtención de un medio libre de células y se les determinó la concentración de proteínas.<sup>22</sup>

### Transferencia de proteínas (Dot blot) y detección inmunquímica

Se aplicaron 20 µL (1 µg/µL) de las muestras sobre la membrana Hybond PVDF y 20 µg de una mezcla de proteínas extracelulares de la suspensión celular de zanahoria (ECP) como control positivo de la reacción inmunquímica. La inmunodetección se realizó según lo descrito por Burnette.<sup>23</sup> La membrana se bloqueó con amortiguador Tris 10 mmol/L, pH 7,5, gelatina 0,5 %, durante una hora a 37 °C y se incubó con el anticuerpo específico de cada proteína a detectar diluido 1:5 000, dos horas a 37 °C. Se realizaron tres lavados por 5 min con amortiguador Tris 100 mmol/L, pH 7,5, gelatina 0,2 % y se incubó con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:5 000, una hora a 37 °C. La membrana se lavó como se describió anteriormen-

te y se incubó con 33 µL de azul de nitrotetrazolio y 16,5 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en 5 mL de amortiguador Tris 100 mmol/L, pH 9,5. El cambio de color que se produjo al finalizar la detección inmunquímica, permitió realizar la evaluación cualitativa de las proteínas con relación al control positivo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 2 muestra los embriones en etapa globular a los 20 d de retirarse el 2,4-D del medio de cultivo.

La figura 3 muestra los resultados de la detección inmunquímica de las proteínas extracelulares embriogénicas EP2 y EP3 al igual que las no embriogénicas EP1 y EP4 en las suspensiones celulares de caña de azúcar.

La proteína EP1 se detectó a los 10, 17 y 21 d de iniciado el cultivo celular cuando aún estaba presente el 2,4-D. La reacción más intensa se observó a los 10 d en comparación con el control positivo, mientras que no se detectó al eliminarse el 2,4-D. Este resultado demuestra que la proteína EP1, que es secretada por las células no embriogénicas, no está presente al comenzar la diferenciación de las distintas fases del desarrollo embriogénico.

De forma similar en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa* L.), se detectaron dos proteínas de 67 y 50 kD homólogas a las EP1 de zanahoria que disminuyeron considerablemente su concentración al retirarse el 2,4-D del medio para dar lugar al desarrollo de las estructuras embriogénicas.<sup>24</sup> También en cultivos de cí-

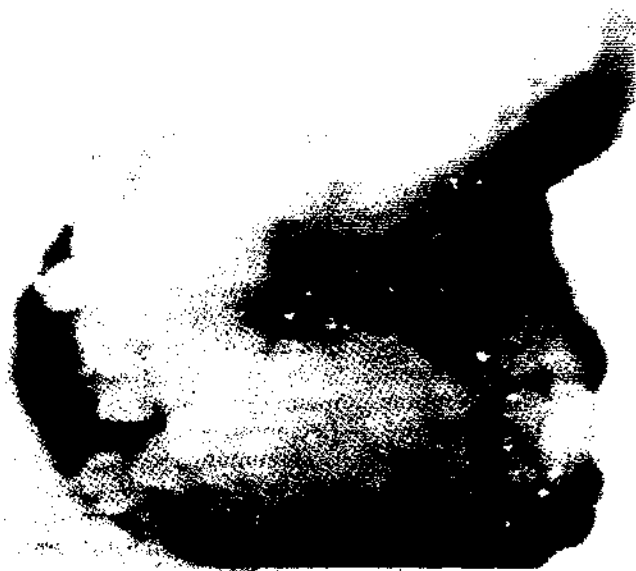


Fig. 1. Callo embriogénico de caña de azúcar cultivados en medio sólido MS con 3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

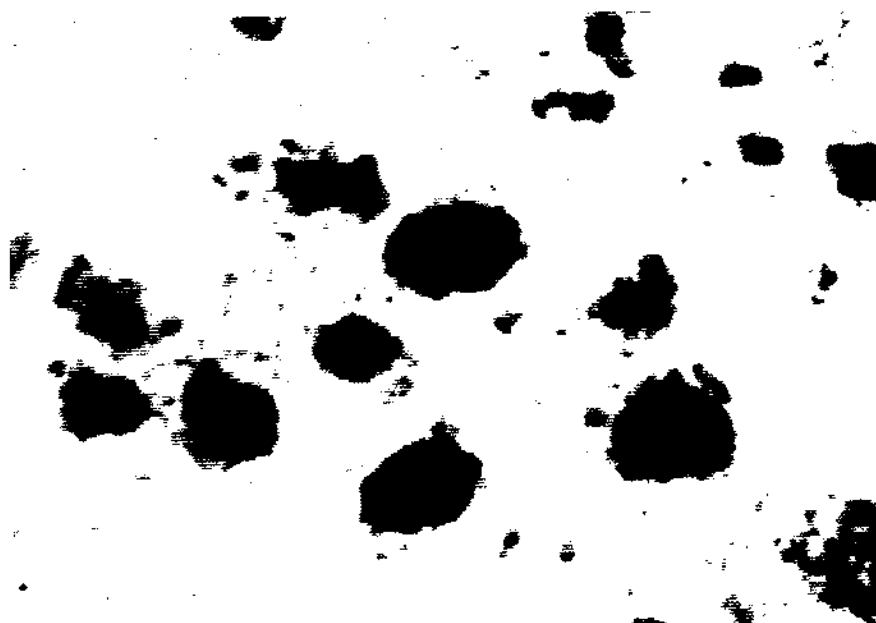


Fig. 2. Embriones somáticos de caña de azúcar en estado globular, cultivados en medio líquido MS sin 2,4-D.

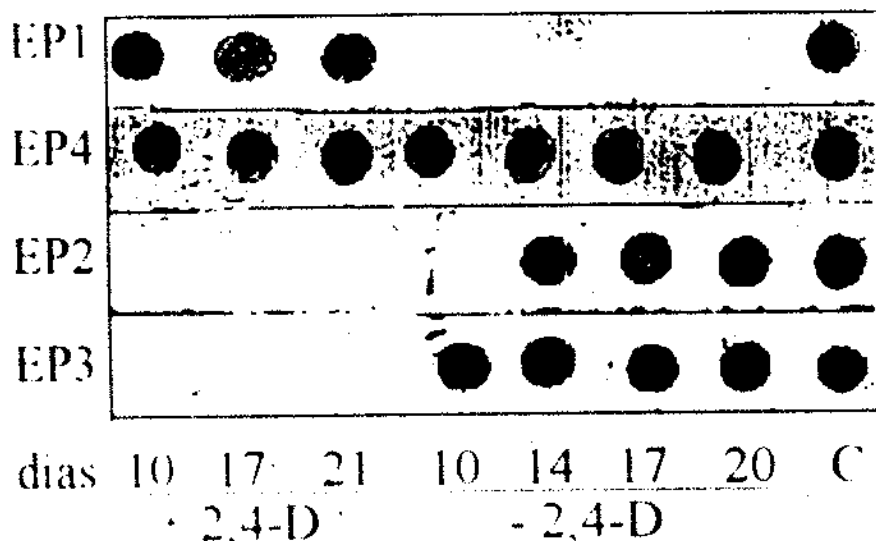


Fig. 3. Dot Blot y detección inmunocitométrica de las proteínas extracelulares secretadas al medio. Se analizaron las proteínas EP1, EP2, EP3 y EP4 presentes a los 10, 17 y 21 d de iniciado el cultivo celular en presencia de 2,4-D y a los 10, 14, 17 y 21 d de retirarse el 2,4-D del medio. Se utilizaron anticuerpos específicos a cada una de estas proteínas y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina. C: control positivo, proteínas extracelulares de suspensiones celulares de zanahoria.

tricos (*Citrus aurantium* L.), se han identificado glicoproteínas secretadas al medio que desaparecen después de iniciada la embriogénesis.<sup>25</sup> Satoh reportó una proteína glicosilada de 57 kD (GP57) que es secretada por células embriogénicas y no embriogénicas de zanahoria en dependencia de la presencia de auxinas en el medio de cultivo.<sup>26</sup> Otra proteína de 65 kD (GP65) es secretada por las células embriogénicas de zanahoria en ausencia de la auxina 2,4-D.<sup>27</sup>

La detección de la glicoproteína EP4 fue cualitativamente menor

con relación al control positivo tanto en presencia y ausencia de la auxina, aunque la mayor señal se observó, antes de eliminar el 2,4-D del medio. Según Van Engelen, esta proteína es específica de las células no embriogénicas.<sup>13</sup> Su pobre detección en las suspensiones de caña de azúcar que se trabajaron, sugiere el predominio de las estructuras embriogénicas.

Hendriks reportó que la proteína EP4 está presente en líneas celulares embriogénicas y no embriogénicas de zanahoria, aunque son secretadas por una subpoblación de

células no embriogénicas diferentes a las células que producen las proteínas EP1.<sup>28</sup>

La proteína de transferencia de lípidos (EP2) se detectó a partir de los 14 d de eliminada la auxina, momento en que la suspensión es rica en agregados celulares embriogénicos. La detección fue cualitativamente mayor a los 20 d de comenzada la diferenciación celular cuando el cultivo celular está enriquecido con embriones globulares. Resultados similares encontró Poulsen en cultivos de alfalfa, en los que detectó, de forma significativa, una proteína de 7 kD homóloga a la EP2 de zanahoria después de cambiar el medio que contenía 2,4-D mediante embriogénesis.<sup>24</sup> El aumento significativo de esta proteína durante el desarrollo embriogénico evidencia su papel relevante en la embriogénesis somática.

La proteína EP3 estuvo presente durante toda la diferenciación celular. La máxima señal se observó a los 20 d cuando predominan los embriones en fase globular. Esta proteína, al parecer, condiciona el medio para el progreso de la embriogénesis somática. De forma similar, se reportó una proteína de 32 kD que está presente durante todo el proceso de embriogénesis somática de trigo (*Triticum aestivum*).<sup>15</sup> Además, se han reportado quitinasas cuyos genes son abundantes en tejidos embriogénicos, los cuales son regulados durante el desarrollo de la embriogénesis somática en coníferas (*Picea glauca*).<sup>29</sup> También en cultivos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) se caracterizaron cinco isoenzimas quitinasas (EP3) del medio condicionado, de las cuales, dos promovieron la transición del estado globular al de corazón durante el desarrollo embriogénico.<sup>30</sup>

Es de destacar la importancia de la coincidencia de estas proteínas, aisladas y caracterizadas de cultivos celulares de zanahoria, en las suspensiones de caña de azúcar. Si se tiene en cuenta que además, se encontraron quitinasas relacionadas con la embriogénesis somática en el medio extracelular de cultivos de cebada y coníferas, se puede sugerir que esta proteína es esencial en el proceso embriogénico de varios cultivos, lo que indica su posible universalidad y el elevado conservadurismo de los genes que codifican para estas proteínas.

Estos resultados demuestran que la suspensión celular de caña de azúcar en estudio es mayormente embriogénica debido al comporta-

miento de las proteínas extracelulares EP1, EP2 y EP3 en las fases del desarrollo del embrión somático. Estas proteínas se pueden emplear como marcadores bioquímicos de la embriogénesis somática de la caña de azúcar.

### CONCLUSIONES

Se detectaron, por primera vez en caña de azúcar, las proteínas extracelulares EP1, EP2, EP3 y EP4, las cuales están estrechamente relacionadas con la embriogénesis somática.

Se corroboró el carácter embriogénico de las suspensiones celulares de caña de azúcar mediante el comportamiento de las proteínas EP2 y EP3 durante el desarrollo embriogénico.

El estudio de la proteína EP1, indicadora de las células no embriogénicas, permitió verificar su carácter no embriogénico en las suspensiones celulares de caña de azúcar al detectarse únicamente antes de comenzar la diferenciación de los distintos estados del desarrollo embriogénico.

La proteína EP4 no ofreció información relacionada con la embriogénesis somática en caña de azúcar.

### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. S.C. de Vries, Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda, quien gentilmente facilitó a los autores las proteínas extracelulares de las suspensiones celulares de zanahoria, así como sus anticuerpos.

### BIBLIOGRAFIA

1. De Vries S.C., Booij H., Janssens R., Vogels R., Saris L., Lo Schiavo F., Terzi M. and Van Kammen A. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular protein. *Genes Dev.*, **2**, 462, 1988.
2. Nielsen K. and Hansen I. Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) *J. Plant Physiol.*, **139**, 489, 1992.
3. Van Engelen F. and De Vries S.C. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.*, **8**, 66, 1992.
4. De Jong A., Cordewener J., Lo Schiavo F. and Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammen A. and De Vries S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell*, **4**, 425, 1992.
5. Cordewener J., Booij H., Van der Zadnt H., Van Engelen F., Van Kammen A. and De Vries S.C. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, **184**, 478, 1991.
6. Kreuger M. and Van Holst G.J. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, **189**, 243, 1993.

7. Gavish H., Vardi A. and Fluhr R. Suppression of somatic embryogenesis in citrus cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, **186**, 511, 1992.
8. Nomura K. and Komamine A. Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. *Oxford Surv. Plant Molec. Biol.*, **3**, 456, 1986.
9. Sterk P., Booij H., Gerard A., Schellekens A., Van Kammen A. and De Vries S.C. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, **3**, 907, 1991.
10. De Jong A., Cordewener J., Lo Schiavo F. and Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammen A. and De Vries S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell*, **4**, 425, 1992.
11. De Jong A., Hendriks T., Meijer E., Penning M., Lo Schiavo F., Terzi M., Van Kammen A. and De Vries S.C. Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant ts11. *Develop. Genet.*, **16**, 332, 1995.
12. Van Engelen F.A., Sterk P., Booij H., Cordewener J., Kook W., Van Kammen A. and De Vries S.C. Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiol.*, **96**, 705, 1991.
13. Van Engelen F., De Jong A., Meijer E., Kuil C.W., Meyboon J., Booij H., Hartog M., Vandekerckhove J., Van Kammen A. and De Vries S.C. Purification immunological characterization and cDNA cloning of a 47 glycoprotein secreted by carrot suspension cells. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 901, 1995.
14. Van Engelen F.A., Hartog M., Thomas T., Taylor B., Sturm A., Van Kammen A. and De Vries S.C. The carrot secreted glycoproteins gen EP1 is expressed in the epidermis and has sequence homology to brassica S-locus glycoproteins. *The Plant Journal*, **4**, 855, 1993.
15. Nato A., Mirshahi A., Tichtinski G., Mirshahi M., Faure J-P., Lavergne D., De Buyser J., Jean C., Ducreux G., and Henry Y. Immunological detection of potential transduction proteins expressed during wheat somatic tissue culture. *Plant Physiol.*, **113**, 801, 1997.
16. Fujumura T. and Komamine A. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Letters*, **5**, 359, 1975.
17. Ho W.J. and Vasil I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.*, **51**, 719, 1983.
18. Sterk P. and De Vries S.C. Molecular markers for plant embryos. In *Syn-Seeds: Application of synthetic seeds to crop improvement*. K.Redenbaugh (ed.) CRC Press, Wageningen, The Netherlands, 1-23, 1992.

19. Guiderdoni E., Merot B., Eksomtramage T., Paulet F., Feldmann P. and Glaszmann. Somatic embryogenesis in sugarcane. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. YPS Bajaj (ed.) Springer-Verlag Berlin. Vol 31, 1995.
20. De Vries S.C., Booij H., Meyerink P., Huismann G., Wilde H., Thomas T. and Van Kammen A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension culture. *Planta*, **176**, 196, 1988.
21. Murashige T., Skoog, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, **15**, 473, 1962.
22. 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.*, **72**, 248, 1976.
23. 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.*, **112**, 195, 1981.
24. Poulsen G.B., Frugis G., Albrechtsen M. and Marotti D. Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non-embryogenic cell cultures of alfalfa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **44**, 257, 1996.
25. Gavish H., Vardi A. and Fluhr R. Extracellular proteins and early embryo development in citrus micellar cells cultures. *Physiol. Plant*, **82**, 606, 1991.
26. Satoh S., Kamada H., Harada H. and Fuji T. Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. *Plant Physiol.*, **81**, 931, 1986.
27. Satoh S. and Fuji T. Purification of GP57, an auxin regulated extracellular glycoprotein of carrots and its immunocytochemical localization in dermal tissues. *Planta*, **175**, 364, 1988.
28. Hendriks T. and De Vries S.C. The role of secreted proteins in carrot somatic embryogenesis. In: Terzi M., Cella R., Falavigna A. (eds.): *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, pp 359-368. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 1995.
29. Dong J. and Dunstan D. Endochitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*, **201**, 2, 1997.
30. Kragh K.M., Jacobsen S., Mikkelsen J.D. and Nielsen K.A. Purification and characterization of three chitinases and one  $\beta$ -1,3-glucanase from the medium of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.*, **76**, 65, 1991.
31. Kragh K.M., Hendriks T., De Jong A., Lo Schiavo F., Bucherna N., Højrup P., Mikkelsen J. and De Vries S.C. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant ts11. *Plant Molec Biol.*, **31**, 631, 1998.