

Potencial embriogénico y la expresión de las arabinogalactanoproteínas (AGPs) en agregados celulares embriogénicos de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo bajo la influencia del CO₂

Raúl Barbón-Rodríguez^{1*}, Walter Preil², Elio Jiménez González¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: barbon@uclv.edu.cu

²Inst. Zierpflanzenzüchtung, Ahrensburg, Germany.

RESUMEN

El establecimiento y optimización de sistemas de regeneración vía embriogénesis somática se ha centrado tradicionalmente en el estudio de los componentes del medio de cultivo, prestándosele poca atención a otros factores del ambiente *in vitro* como es la composición de la atmósfera gaseosa. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el potencial embriogénico y la expresión de arabinogalactanoproteínas (AGPs) en agregados celulares embriogénicos de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo bajo la influencia del dióxido de carbono (CO₂). Se demostró que con concentraciones de 2.5% y 5.0% de CO₂ se estimuló en medios de cultivo semisólidos una mayor formación y desarrollo de los embriones somáticos, 307 ES/50mgMF y 277 ES/50mgMF respectivamente, con resultados superiores a los controles con intercambio pasivo y ventilación forzada (195 ES/50mgMF y 107 ES/50mgMF) mientras que a una concentración de 10.0% de CO₂ se inhibió el proceso de embriogénesis somática (95 ES/50mgMF). En suspensiones celulares fue mayor la formación de embriones somáticos a una concentración de 2.5% de CO₂ (130x10³ ES.l⁻¹) en comparación con 5.0% y 10.0% de CO₂ (116x10³ ES.l⁻¹ y 15x10³ ES.l⁻¹) y los controles con intercambio pasivo y ventilación forzada. Con una concentración de 2.5% de CO₂ hubo una mayor síntesis de Arabinogalactanoproteínas (AGPs) a nivel celular (0.068 mg.gMF⁻¹) y de excreción en el medio de cultivo (2.10 mg.l⁻¹), lo cual coincidió con los valores mas altos de producción de embriones somáticos.

Palabras clave: atmósfera *in vitro*, embriogénesis somática, embrión somático, marcadores moleculares, suspensiones celulares embriogénicas

ABSTRACT

The establishment and optimization of regeneration systems via somatic embryogenesis has centered traditionally on the study of the culture medium components, with little attention to other factors of the *in vitro* environment like the composition of the gaseous atmosphere. This work was realized with the aim to determine the embryogenic potential and the expression of arabinogalactanproteins (AGPs) in embryogenic cell aggregates of *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo under influence of carbon dioxide (CO₂). Concentrations of 2.5% and 5.0% of CO₂ stimulated a greater formation of somatic embryos (307 ES/50mgMF and 277 ES/50mgMF respectively) in semisolid culture medium with better results to the controls with passive interchange and forced ventilation (195 ES/50mgMF and 107 ES/50mgMF) whereas a concentration of 10.0% of CO₂ inhibited the process of somatic embryogenesis (95 ES/50mgMF). In cell suspensions the formation of somatic embryos was greater with a concentration of 2.5% of CO₂ (130x10³ ES.l⁻¹) in comparison with 5.0% and 10.0% of CO₂ (116x10³ ES.l⁻¹ and 15x10³ ES.l⁻¹) and the controls with passive interchange and forced ventilation. With a concentration of 2.5% CO₂ there was a greater synthesis of Arabinogalactanproteins (AGPs) at the cellular level (0.068 mg.gMF⁻¹) and the excretion in the culture medium (2.10 mg.l⁻¹), which coincided with the highest values of production of somatic embryos.

Key Words: embryogenic cell suspensions, *in vitro* environment, molecular markers, somatic embryo, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

El estudio y optimización de la embriogénesis somática se ha centrado en los últimos tiempos en los componentes fundamentales del medio de cultivo, prestándosele poca atención a la atmósfera gaseosa dentro del frasco de cultivo (Auboiron *et al.*, 1990).

Dentro de las variables físicas que conforman el ambiente *in vitro*, el efecto del oxígeno disuelto en la

multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas ha sido el más estudiado en diferentes cultivos como *Daucus carota* (Jay *et al.*, 1992; Shimazu y Kurata, 1999), *Picea abies* (Kvaalen y Arnold, 1991), *Cyclamen persicum* (Hohe *et al.*, 1999) y café (de Fera, 2000), pero una menor atención se ha centrado en otros gases, como dióxido de carbono, etileno y etanol producidos por el tejido en crecimiento *in vitro*, gases propios también de la embriogénesis cigótica. Los objetivos del siguiente trabajo fueron el

estudio de la influencia de diferentes concentraciones del gas dióxido de carbono (2.5; 5.0 y 10.0%) sobre la embriogénesis somática de la variedad de café Caturra rojo en medios de cultivo semisólidos y líquidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron las experiencias con suspensiones embriogénicas establecidas a partir de callos con embriogénesis de alta frecuencia de la variedad Caturra rojo. Los Erlenmeyers y frascos de cultivo fueron modificados con filtros estériles para ser adaptados al sistema de aireación, utilizándose tres mezclas de gases o variantes, a) 2.5% CO₂ + 21.0% O₂, b) 5.0% CO₂ + 21.0% O₂ c) 10.0% CO₂ + 21.0% O₂. Se empleó un control con un suministro de 21.0% O₂ (Ventilación forzada) y otro bajo condiciones normales de cultivo *in vitro* (Intercambio pasivo). Se empleó un detector infrarrojo de CO₂ (Horiba, APBA-250E), para controlar la estabilidad en la concentración de la mezcla y analizar el incremento de la concentración de CO₂ en los frascos de cultivo sin suministro de mezcla de gases (Control). La fase de diferenciación en medio de cultivo líquido se realizó empleando una densidad de inóculo de 0.5 gMF.l⁻¹ y en medio de cultivo semisólido (Agar 7.0 g.l⁻¹) se colocaron cuatro grupo de agregados celulares de 50.0 mg por cada frasco de cultivo modificado, medios de cultivo conformado por sales MS + 5.0 mg.l⁻¹ 6-BAP + 3% sacarosa. En las experiencias tanto en medios de cultivo semisólidos como líquidos se evaluó el momento de aparición y número de los embriones somáticos durante el cultivo, además del incremento en masa fresca y masa seca. Para la determinación de la presencia de arabinogalactanoproteínas se empleó la metodología propuesta por Saare (1997) cualitativa y cuantitativamente mediante radialdifusión y electroforesis de cohete por precipitación con reactivo de Yariv.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cualitativamente se observaron diferencias entre los tratamientos. Con 2.5% y 5.0% de CO₂ se observó el mayor número de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido (Figura 1A); mientras que, en el control con ventilación forzada y el tratamiento con 10.0% CO₂ se produjo un proceso de inhibición de la embriogénesis somática, que no sólo se manifestó en el bajo número de embriones producidos sino también en la pérdida del aspecto compacto de los agregados celulares embriogénicos con 10.0%, mientras que en el tratamiento con ventilación forzada se observó un incremento en la multiplicación de la biomasa y poca tendencia a la inducción y diferenciación de los agregados celulares embriogénicos.

En el control con intercambio pasivo hubo un incremento de la concentración de dióxido de carbono, de 0.4% a los 15 días hasta 2.4 % a los 60 días de cultivo, partiendo cada medición desde cero a

partir de cada renovación de medio de cultivo cada 15 días. (Figura 1B).

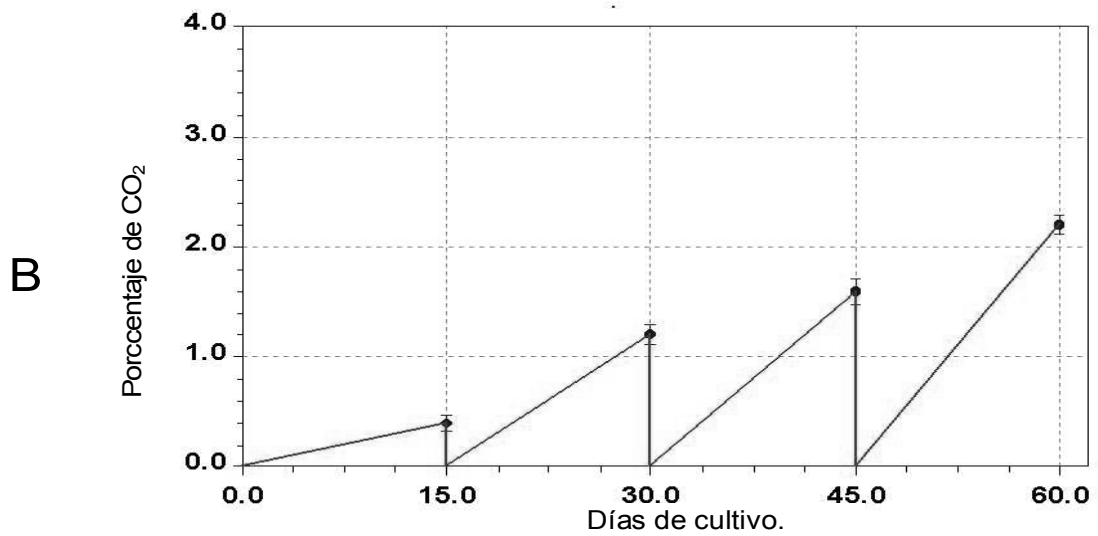
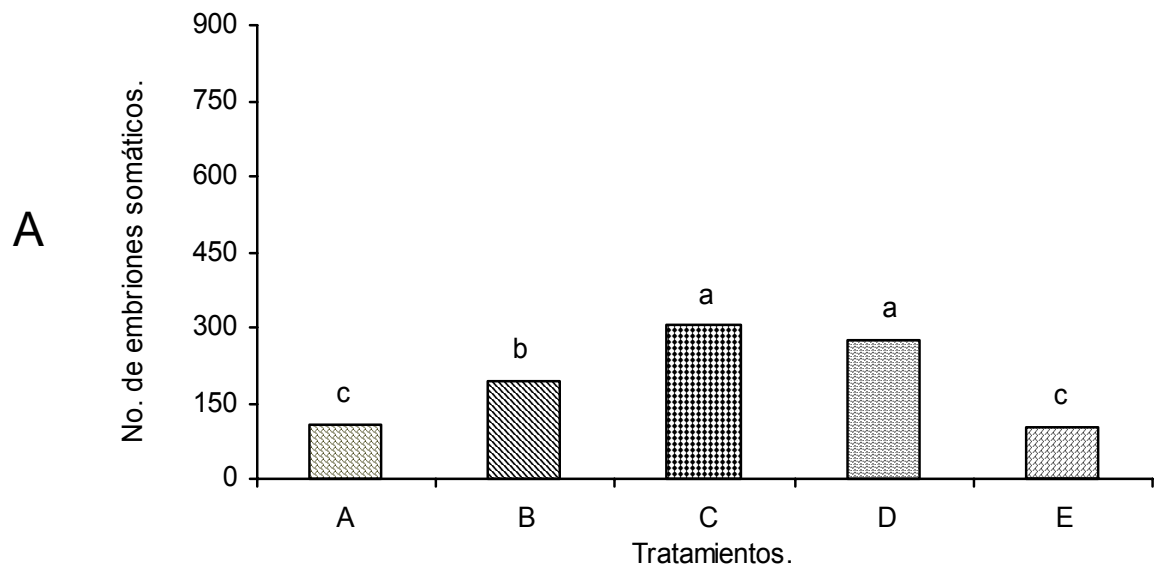
El papel beneficioso del CO₂ quedó demostrado al comparar los resultados obtenidos en los controles con intercambio pasivo y ventilación forzada. En el tratamiento con intercambio pasivo, en el cual hubo una acumulación progresiva de CO₂, la producción de embriones fue superior a la de los frascos ventilados donde hubo una renovación constante de la atmósfera interna y la concentración de CO₂ fue la del aire atmosférico (0.035%).

Al igual que en medios de cultivos semisólidos, en las suspensiones celulares fue la formación de embriones más temprana en los tratamientos con 2.5 y 5.0% de CO₂, aunque en un período más corto de tiempo (19 y 21 días, respectivamente), mientras que en los restantes tratamientos este suceso pudo apreciarse entre los 23 y 24 días de cultivo. La mayor producción de embriones se obtuvo con 2.5% de CO₂ (Figura 2A).

El tratamiento con 10.0% de CO₂ tuvo un efecto negativo marcado sobre la formación y diferenciación de embriones, pues a diferencia del experimento en medios de cultivo semisólidos los resultados fueron inferiores al control con ventilación forzada.

También a nivel de suspensiones celulares se manifestaron diferencias entre los controles con intercambio pasivo y ventilación forzada, que se correspondieron con una mayor acumulación de CO₂ en el tratamiento con intercambio pasivo en comparación con el experimento en medios de cultivo semisólidos, alcanzándose un valor máximo de 3.8% al final del experimento (Figura 2B).

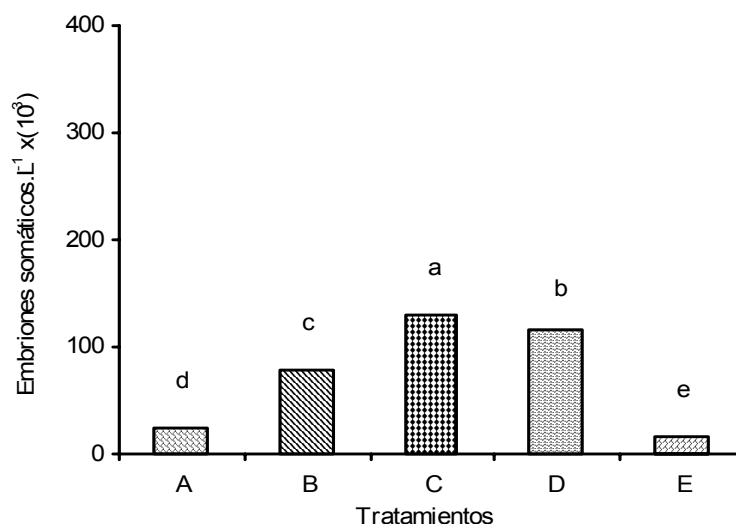
En las células de cafeto, bajo el efecto de diferentes concentraciones de CO₂, se pudo determinar que a los 15 días, período antes de la formación de los embriones somáticos, ya existían diferencias entre los tratamientos en cuanto a la síntesis de arabinogalactanoproteínas. Cualitativamente se pudo determinar que para el cafeto la mayor presencia de AGPs se observó en el tratamiento con 2.5% de CO₂, coincidiendo con el tratamiento donde mayor número de embriones somáticos totales se obtuvo. Aunque en todos los tratamientos se observó la presencia de AGPs, se debe señalar que esta fue menor en el tratamiento con 10.0% de CO₂, con resultados similares al tratamiento con ventilación forzada e inferior al control con intercambio pasivo. No obstante, se debe tener en cuenta que en el control con ventilación forzada existe la presencia de AGPs en pequeñas cantidades; estas AGPs son de orden estructural fundamentalmente, las cuales se encuentran a nivel de la membrana citoplasmática y de la pared celular, además del tipo funcional, que pudieran ser sintetizados por estimulación de componentes del medio de cultivo para la inducción y la diferenciación de la embriogénesis somática (Gao *et al.*, 1999).



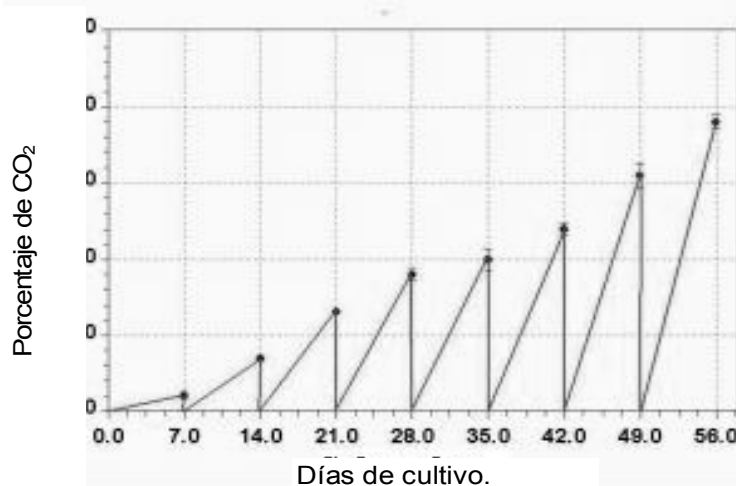
Tratamientos	
A	Ventilación forzada
B	Intercambio pasivo
C	2.5% CO ₂
D	5.0% CO ₂
E	10.0% CO ₂

Figura 1. (A). Número de embriones somáticos totales de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo obtenidos en medio de cultivo semisólido gaseado con diferentes concentraciones de CO₂ y (B) el porcentaje de dióxido de carbono acumulado cada 15 días en los frascos con intercambio pasivo durante la fase de diferenciación después de 60 días de cultivo.

A



B



Tratamientos

A Ventilación forzada

B Intercambio pasivo

C 2.5% CO₂D 5.0% CO₂E 10.0% CO₂

Figura 2. (A). Número de embriones somáticos totales de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo obtenidos en medio de cultivo líquido gaseado con diferentes concentraciones de CO₂ y (B) el porcentaje de dióxido de carbono acumulado cada 7 días en los Erlenmeyers con intercambio pasivo durante la fase de diferenciación después de 56 días de cultivo.

En cafeto, en los tratamientos con 2.5% y control con intercambio pasivo se observaron los mayores valores de concentración de AGPs de 0.068 y 0.051 mg.gMF⁻¹ respectivamente, mientras que una menor cantidad de AGPs (0.017 mg.gMF⁻¹) se obtuvo en los agregados celulares bajo el efecto de la ventilación forzada de la atmósfera gaseosa, aunque la expresión de proteínas a nivel celular fue mayor con respecto a los otros tratamientos (Tabla 1). Es probable que el CO₂ tenga un papel completamente independiente en el metabolismo, el cual puede ser esencial para cambiar la respuesta morfogénica de los agregados celulares. Según Kumar *et al.* (1987), puede que exista un incremento de la fijación no

fotosintética del dióxido de carbono, debido a que se ha observado un incremento de la actividad fosfoenolpiruvatocarboxilasa durante el proceso de diferenciación de *Pinus radiata* D. Es probable que se incremente la síntesis de glicoproteínas, ya que según Hammel *et al.* (1997), la fijación de CO₂ en la oscuridad está muy relacionada con la presencia del ión amonio, evidenciando un crecimiento del tejido embriogénico. El CO₂ pudiera estar involucrado con vías metabólicas relacionada con la biosíntesis de proteínas (Ziv, 2000). En los medios de cultivos líquidos también fue determinada la cantidad de AGPs, lo cual coincidió con los tratamientos en los cuales se expresó una mayor concentración de AGPs a nivel celular.

Tabla1. Cantidad de AGPs y proteínas totales en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo bajo el efecto de diferentes concentraciones de CO₂.

Tratamientos	Contenido celular		Medio de cultivo	
	AGP (mg.gMF ⁻¹)	Proteína (mg.gMF ⁻¹)	AGP (mg.l ⁻¹)	Proteína (mg.l ⁻¹)
V. Forzada	0.017 d	0.76 a	1.10 c	4.01 c
I. Pasivo	0.052 b	0.73 b	1.70 b	4.62 b
2.5% CO ₂	0.068 a	0.74 ab	2.10 a	5.33 a
5.0% CO ₂	0.051 b	0.78 a	1.45 b	4.95 a
10.0% CO ₂	0.021 c	0.48 d	1.18 c	4.56 b
±E.E	±0.001	±0.008	±0.094	±0.170
C.V.	2.56%	1.24%	6.31%	3.64%

Letras distintas difieren estadísticamente para p <0.05 según la comparación basada en la prueba de Duncan (n=4).

REFERENCIAS

Auboiron, E, Carron M-P, Michaux-Ferrière, N (1990) Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tiss. Org.Cult.* 21, 31-37

de Fera, M (2000) Empleo de bioreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. 105 p.

Gao, M, Kielisyewski MJ, Lamport DTA, Showalter AM (1999) Isolation, characterization, and immunolocalization of novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *Plant J.* 18:43-55

Hammel, EM, Lamb JC, Howe A (1997) Effects of CO₂ in cell division in *Dactylis glomerata*. *Journal of Experimental Botany* 47: 94

Hohe, A, Winkelmann T, Schwenkel H-G (1999) CO₂ accumulation in bioreactors suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. And its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 18: 863-867

Jay, V, Genestier S, Courduroux J C (1992) Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. En: Kozłowski, T. T. (Ed). *Flooding and plant growth*. Academic Press, 47-128 New York

Kumar, P P, Reid D M, Thorpe T A (1987) The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pino radiata* *in vitro*. *Physiol. Plant.* 69: 244-252

Kvaalen, H, y von Arnold S (1991) Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell and Organ Culture.* 27: 49-57

Saare-Surmisinski (1997) Quantitative und qualitative Bestimmung von Arabinogalaktan-Proteinen in embryogenen *in vitro*-Kulturen und adulten Pflanzen von *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch. Dissertation. 153 p.

Shimazu, T y Kurata K (1999) Relationship between production of carrot somatic embryos and dissolved oxygen concentration in liquid culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 57: 29-38

Ziv, M (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. En: Janick, J. (Eds). *Horticultural reviews* 24: 2-30