

CULTIVO "IN VITRO" DE TEJIDOS DE *DIPLOTAXIS TENUIFOLIA* (L.) D.C.

I. EFECTO DEL ACIDO MALICO

POR MARIA R. GUITMAN¹ Y O. H. CASO²

SUMMARY

Tissue cultures of *D. tenuifolia* were established according to the technique developed by C. O. Miller with soybean cotyledons. In order to maintain an optimum growth through several subcultures, these cultures required malic acid (100 or 200 ppm) besides the nutrientes described for the Murashige-Skoog medium.

The effect of malic acid was shown in the increase of fresh, dry weight, and protein content of the callus. It must be noted too, that the tissue was less friable than in absence of this metabolite.

The histological study showed a predominance of cells in active division, arranged in meristematic nodules and submarginal layers. The control cultures showed only the first type of meristematic structure. Although there is no definite explanation for this effect of malic acid, it is suggested that the increase of growth was due to a greater source of organic acids available to the transamination processes, as well as a higher concentration of NADH required for the NO₃ reduction.

INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha desarrollado profusamente la técnica del cultivo in vitro de tejidos vegetales con el objeto de estudiar distintos aspectos fisiológicos y bioquímicos (Gautheret 1959; Street, 1970). Por lo general los medios de cultivo empleados para especies y tejidos muy diferentes son semejantes en sus componentes (macro y macronutrientes, vitaminas, hormonas, fuente hidrocarbonada, etc.), contándose con pocos medios básicos muy utilizados (White, Murashige-Skoog, Miller, etc.) con unos pocos agregados o cambios (Gautheret 1959, Street, 1970). No se

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Univ. de Buenos Aires.

² Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Univ. de Buenos Aires. Miembro de la Carrera del Investigador (CONICET). Este trabajo fue parcialmente financiado mediante un subsidio otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

conocen estudios sistemáticos para determinar los requerimientos nutritivos de algún tejido, para obtener su crecimiento óptimo.

Como parte de un programa de investigación sobre la fisiología de la regeneración de *Diploaxis tenuifolia* (L.) D. C. se encaró el cultivo in vitro de tejidos obtenidos a partir de los cotiledones de esta maleza. Si bien en un primer momento se obtuvo un relativo éxito en el cultivo continuado, utilizando el medio de Miller o el de Murashige-Skoog, se notó que el callo obtenido adquiría al cabo de 3-4 semanas un color pardo oscuro y mostraba un ritmo de crecimiento muy pobre. Si un trozo de este callo era subcultivado en un medio fresco, el ritmo de crecimiento no se recuperaba y las nuevas áreas crecidas presentaban un color amarillo blanquecino que poco a poco se oscurecía. Considerando que ese cambio era un síntoma de envejecimiento del explanto, se hicieron diversos agregados al medio intentando retardar ese proceso al mismo tiempo que lograr un mayor crecimiento. La incorporación de extracto de levadura y/o hidrolizado de caseína no dió mejores resultados. En estudios sobre la influencia de distintos compuestos carbonados sobre el crecimiento de tejidos cultivados in vitro, Hildebrandt y Riker (1949) y Hildebrandt, Riker y Waterator (1954), encontraron que algunos ácidos del ciclo de Krebs (e.g. málico, succínico, fumárico) podían estimular el crecimiento de tejidos tumorales de girasol y *Tagetes erecta* L. cv Sunset Giant cuando se lo agregaba al medio en dosis que oscilaban entre 0,015 y 0,125 %; sin embargo dichos ácidos dicarboxílicos no podían reemplazar a la sacarosa como fuente hidrocarbonada. Además Bouriquet (1958) encontró un sinergismo acentuado entre 2,4-D y los ácidos málico y tartárico en cultivos de tejidos normales de topinambur.

Con el objeto de obtener un mejor crecimiento de los tejidos de *D. tenuifolia* en un medio definido, se decidió estudiar el efecto de la incorporación al medio de cultivo de estos compuestos del metabolismo intermedio, comenzando por el ácido málico.

MATERIAL Y METODOS

Semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5 % y lavadas con agua de bromo al 0,4 %, se colocaron a germinar sobre agar al 1 % a 28° C. Al cabo de 5-7 días se separaron los cotiledones los que, previa una incisión en cada extremo, fueron sembrados en frascos que contenían un medio de cultivo compuesto por los macro, micronutrientes y vitaminas del medio Murashige-Skoog (1962), con 200 mg/l de mio-inositol, 2 g/l de sacarosa, 0,5 mg/l de cinetina y 2 mg/ de ácido β -naftalenacético. En los primeros repiques fue esencial el agregado de leche de coco (10 % v/v), pero ella fue suprimida a partir del noveno repique. El agregado de ácido málico, en distintas concentraciones, se realizó conjuntamente con

las demás soluciones, ajustándose posteriormente el pH a 5,5 antes de agregar el agar.

Los cultivos se mantuvieron en un ambiente controlado, con una temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e iluminación constante proveniente de dos tubos fluorescentes de 40 W, colocados a 40 cm de distancia de los frascos, siendo repicados cada 28-30 días utilizando fragmentos de callo, con un peso fresco entre 200 y 300 mg.

Con el objeto de determinar el efecto del ácido málico (AM) se efectuaron mediciones de los pesos frescos y seco iniciales y al cabo del período de sub-cultivo. El crecimiento obtenido se expresó por medio de un índice del incremento del crecimiento (Klein, 1964), que consiste en la diferencia entre el peso final y el peso inicial del explanto dividido por el peso inicial. También se analizó el contenido de proteínas utilizando el método de Lowry et al. (1951), expresándolas en mg/g de peso fresco. Para el estudio histológico fueron fijados en FAA trozos representativos de los diferentes explantos, luego se los incluyó en Paraplast, para seccionarlos a $15 \mu\text{m}$ de espesor, siendo teñidos con safranina-fast green, siguiendo la técnica usual.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se presentan los resultados de una determinación del incremento del crecimiento de cultivos luego de un segundo repique en medios con contenido diferente de ácido málico. El explanto que sirvió de partida a estos subcultivos había sido mantenido durante un año y medio sin dicho metabolito, siendo repicado regularmente.

Se observa que el agregado de AM determinó un mayor crecimiento del cultivo, que llegó a ser 8 veces mayor en el caso de medios con un contenido de 100 y 200 ppm. En lo que se refiere al contenido de proteínas, los explantos mantenidos en medios con 400 ppm, presentaron un incremento del 77 % con respecto a los testigos, mientras que las otras dosis no causaron variaciones significativas en dicho contenido.

Además de este estímulo en el crecimiento, fue notoria la diferencia de color, aspecto externo y textura que se observó en explantos del mismo subcultivo y con el mismo peso inicial sometidos a las distintas concentraciones de AM. A medida que transcurrió el período de subcultivo, el color del explanto varió de amarillento hacia tonalidades más oscuras, llegando a color pardo oscuro al cabo de 4 semanas. Como se aprecia en la figura 2, el agregado de AM hizo que los explantos retuviesen ese color inicial durante un lapso más prolongado. Asimismo los explantos cultivados con el agregado del metabolito indicado, eran menos friables, con una compacidad mayor.

El estudio histológico reveló algunas posibles causas de las diferencias indicadas. Tanto en cultivos con AM o sin él se observaron dos tipos de células: unas alargadas o globosas, vacuoladas, con bordes irregulares, cuyas dimensiones eran $60 \mu\text{m}$ por $41 \mu\text{m}$ y otras con paredes más regulares, isodiamétricas, con núcleos bien visibles y con un tamaño menor, que era diferente según que el medio contuviese o no AM. En el primer caso, las dimensiones de estas células eran $19,6 \mu\text{m}$ por $13 \mu\text{m}$, mientras que en el medio sin AM medían $30,2 \mu\text{m}$ por $23 \mu\text{m}$. En ambos casos se trata del promedio de la medición de 25 células. Es posible que estas células

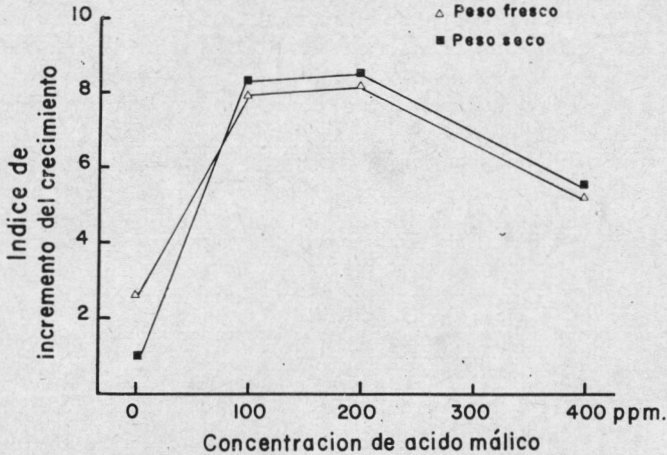
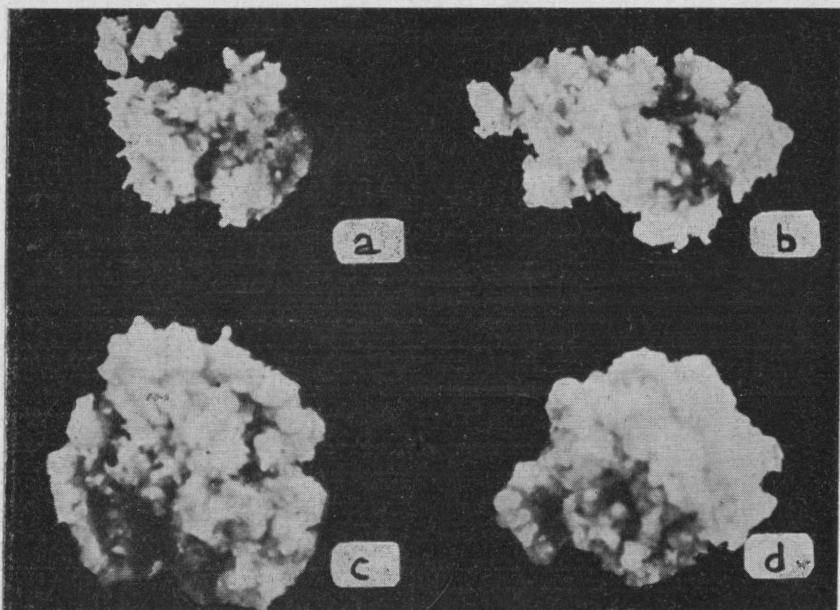


Fig. 1. — Efecto de diferentes concentraciones de ácido málico sobre el crecimiento de cultivos de tejidos de *D. tenuifolia*. Para la determinación del índice del incremento de crecimiento. Véase el texto.

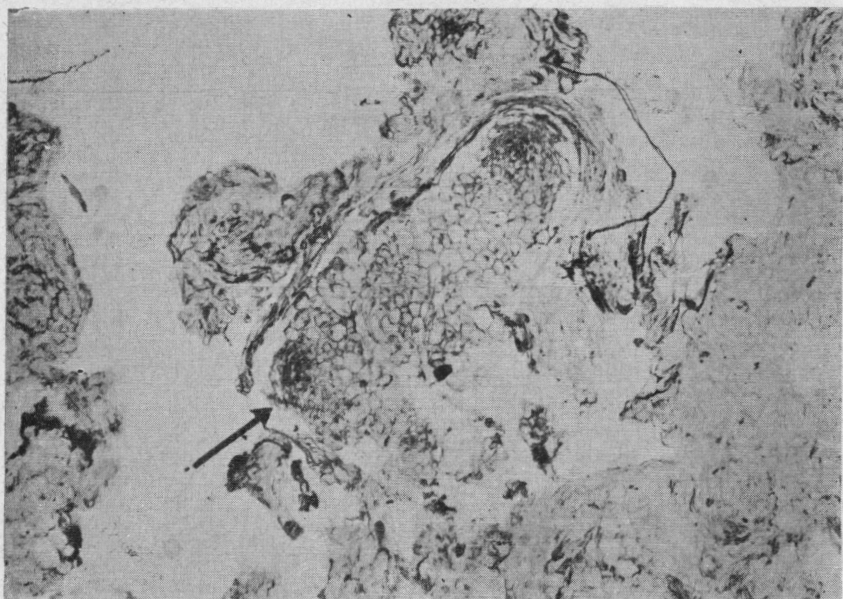
de menores dimensiones sean las que se hallaban en división celular y crecimiento activo al fijarse el material. En los cultivos con AM existe un predominio de las células de menor tamaño, mientras que lo inverso ocurre en los cultivos controles. Además, en los primeros existen grupos de células de tamaño intermedio a los citados anteriormente, lo que no se observa en los cultivos sin AM.

Los tejidos cultivados in vitro pueden crecer por medio de nódulos meristemáticos o por bandas o capas meristemáticas (Street, 1970). Los cultivos de *D. tenuifolia* sin el agregado de AM muestran nódulos meristemáticos superficiales, separados por áreas de células adultas, que no muestran signos de división celular (Fig. 3). Por otro lado los explantos mantenidos en medio con AM, presentan bandas meristemáticas bien definidas, submarginales, de apreciable espesor y nódulos del mismo carácter ubicados en el seno del tejido (Fig. 4). Aquellas bandas no se observaron,

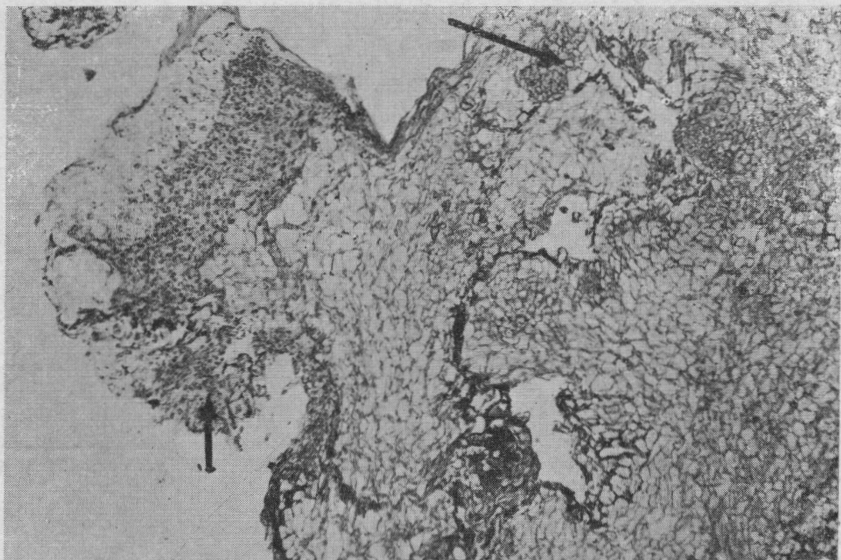


2

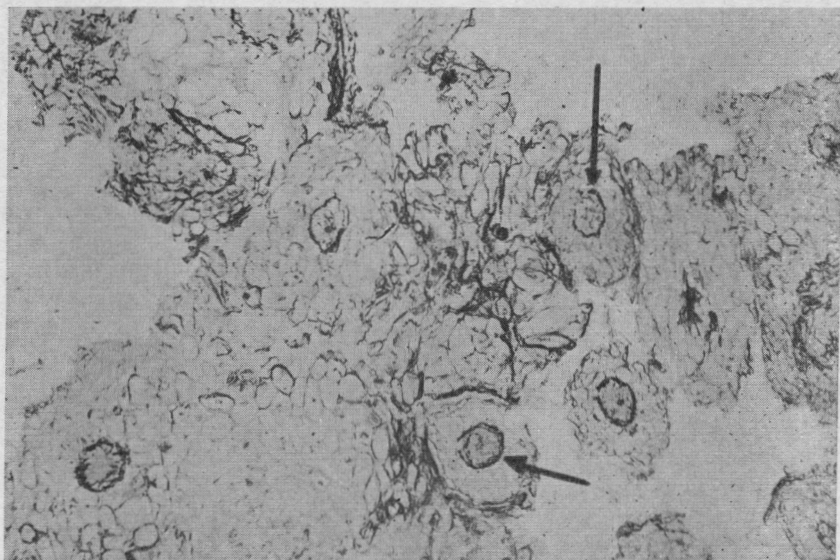
3



Figs. 2 y 3. — 2. Efecto de concentraciones crecientes de ácido málico sobre el crecimiento y aspecto externo de callos. *a*, 0 ppm ; *b*, 100 ppm ; *c*, 200 ppm ; *d*, 400 ppm. 3, corte histológico de un callo cultivado en medio sin AM. La flecha indica un nódulo meristemático.



4



5

Figs. 4 y 5. — 4, corte de un cultivo en un medio con 200 ppm de AM. Las flechas indican la presencia de una banda y un nódulo meristemáticos. 5, nódulos cribo-vasculares en el seno del callo.

en ningún caso, en cultivos sin AM. Teniendo en cuenta estas diferencias histológicas puede explicarse el mayor crecimiento de los cultivos con AM. Es decir, que esa mayor proporción de células meristemáticas sería la determinante del mayor crecimiento y compacidad del callo. En cuanto a otras características histológicas, en todos los cultivos se observaron elementos traqueales largos o cortos, con engrosamientos anulares. Estos se encuentran distribuidos en forma desordenada dentro de nódulos cribo-vasculares (Gautheret, 1959); en ellos las células marginales presentan paredes engrosadas que se tiñen fuertemente con safranina, lo que indicaría paredes con estructura secundaria (Fig. 5).

Hasta el momento no se cuenta con una explicación definitiva para este efecto del AM. Es claro que las bajas concentraciones utilizadas no permiten pensar en un efecto directo por aumento de la fuente energética hidrocarbonada. A la misma conclusión llega Gautheret (1959) al comentar los trabajos de Hildebrandt y colaboradores ya citados. También es poco probable que estos metabolitos tengan una acción morfogénica directa.

Existe una evidente relación de dependencia entre la respiración y los procesos biosintéticos que, como los de formación de aminoácidos, dependen de compuestos del metabolismo de los ácidos del ciclo de Krebs. Asimismo el proceso de incorporación del nitrógeno inorgánico a aquellos compuestos orgánicos necesita un alto nivel de nucleótidos de piridina reducidos. Gamborg y Shyluk (1970) demostraron que las suspensiones celulares de soja podían ser cultivadas utilizando NH_4^+ como fuente nitrogenada única siempre que al medio se le adicionara algunos ácidos del ciclo de Krebs. Estos autores consideraron aplicable en sus resultados la hipótesis de Croft (1967) según la cual una de las funciones de estos ácidos en el crecimiento de las células vegetales sería proveer un sistema de flujo de electrones adecuado que facilitaría la absorción del nitrógeno.

En el caso descrito, ocurriría que la mayor disponibilidad de AM no solo permitiría un adecuado flujo de electrones y una mayor provisión de NADH, necesarios para la reducción de los nitratos (Gamborg y Shyluk, 1970), sino que posibilitaría destinar una mayor proporción de ácidos a los procesos de transaminación. Esto se vería reflejado en una mayor síntesis de proteínas, que llega a valores significativos en cultivos con 400 ppm de AM, y en un período de división celular activa más extendido. Es decir, que el efecto de AM sería indirecto o sea metabólico, sin intervención directa en los procesos de crecimiento de los tejidos. Esta hipótesis requiere ser confirmada por nuevas experiencias.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada por la Dra. Ofelio Barreiro en las determinaciones de proteínas, así como la ayuda técnica de la Sra. G. M. de Planas.

BIBLIOGRAFIA

- BOURIQUET, R., 1958. Recherches sur l'action de quelques facteurs de croissance à l'égard des tissus végétaux cultivés in vitro. *Tesis*. Paris (citado por R. J. Gautheret, lcc. cit.).
- CROFT, A. R., 1976. Amino uncoupling of energy transfer in chloroplasts. I. Relation to ammonium ion uptake. *J. Biol. Chem.*, 242: 3352-3359.
- GAMBORG, O. y J. P. SHYLUK, 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol.*, 45: 596-600.
- GAUTHERET, R. J., 1959. La culture des tissus végétaux, Masson y Cia. Paris.
- HILDEBRANDT, A. C. y A. J. RIKER, 1949. The influence of various compounds on the growth of marigold, paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissues in vitro. *Amer. Jour. Bot.*, 36: 74-85.
- HILDEBRANDT, A. C. y A. J. RIKER y J. L. WATERTON, 1954. Growth and inhibition of tissue cultures on media with different concentrations of organic acids. *Phytopathol.*, 44: 422-428.
- KLEIN, R., 1964. Repression of tissue culture growth by visible and near visible radiation. *Plant. Physiol.*, 39: 536-539.
- LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N., FARR, L., RANDALL, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, 15: 473-497.
- STREET, H. E., 1970. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants en Plant Physiology (ed. F C. Steward), VB: 3-224. Acad. Press. New York.