
LAS PROTEÍNAS ARABINOGALACTANOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS VEGETALES

ARIANNA MICHELLE HERNÁNDEZ SÁNCHEZ,
JACQUELINE CAPATAZ TAFUR, MARIO RODRÍGUEZ-MONROY
y GABRIELA SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ

RESUMEN

Las proteínas arabinogalactanos (AGPs) son macromoléculas que se encuentran prácticamente en todos los órganos de las plantas, siendo asociadas con varios aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal. Estas moléculas se caracterizan bioquímicamente por contener carbohidratos y proteínas en relación 9:1. El carbohidrato está compuesto principalmente por arabinogalactanos tipo II; mientras que la parte proteica está organizada en dominios que definen a las AGPs como clásicas o no clásicas. Las primeras se caracterizan además por presentar una secuencia C-terminal que predice la incorporación de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GFI), que permite su unión a la membrana plasmática. En cultivos de células vegetales se reportan varias especies que liberan AGPs al medio de cultivo. Se presenta una revisión de las características bioquímicas de las AGPs liberadas

al medio y de las propuestas sobre los mecanismos bioquímicos y celulares por los cuales las AGPs participan en la diferenciación y crecimiento de las células vegetales. Los cultivos de células liberan al medio de cultivo AGPs clásicas y no clásicas, y se propone que podrían provenir de la membrana plasmática o la pared celular. Las AGPs intervienen en el control del crecimiento celular, además de estar relacionadas con la embriogénesis somática y la organogénesis, procesos de diferenciación celular importantes en los sistemas de micropropagación de plantas. El mecanismo bioquímico por el cual las AGPs participan en el crecimiento celular y la diferenciación implica que éstas, o los productos de su degradación, quizás actúen como moléculas de señalización.

Las proteínas arabinogalactanos (AGPs) son macromoléculas glicosiladas, distribuidas ampliamente en el reino vegetal, que se encuentran prácticamente en todos los órganos de las plantas. Las AGPs están implicadas en varios aspectos del crecimiento y el desarrollo de las plantas, tales como la diferenciación de tejidos reproductivos y vegetativos, la expansión y la proliferación celular, y la muerte celular programada (Figura 1). A nivel celular, estas glicoproteínas se localizan principalmente en la membrana plas-

mática, en la pared celular, o como secreciones en el espacio intercelular (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000; Rumyantseva, 2005). El carbohidrato de las AGPs consiste en arabinogalactanos del tipo II, de donde reciben el nombre estas glicoproteínas. Las AGPs pertenecen a la familia de las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), que también incluye a las extensinas, a las proteínas ricas en prolina y a las lectinas (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Desde un punto de vista práctico, las AGPs se pueden diferenciar de las otras HRGPs por su capacidad de

unirse a un colorante sintético conocido como el reactivo β -glicosil Yariv (Yariv *et al.*, 1967). Asimismo, el reactivo de Yariv y anticuerpos monoclonales que reconocen a las AGPs son usados para conocer la participación de las AGPs en los procesos de crecimiento y desarrollo (Seifert y Roberts, 2007).

Las AGPs son componentes abundantes de gomas y exudados, y muestran propiedades funcionales relevantes para la industria de alimentos; por ejemplo, la goma arábiga de *Acacia senegal* es usada por sus propiedades de emul-

PALABRAS CLAVE / AGPs / Cultivo de Células / Embriogénesis Somática / Proteínas Extracelulares /

Recibido: 20/05/2008. Modificado: 21/02/2009. Aceptado: 26/02/2009.

Arianna Michelle Hernández Sánchez. Maestra en Ciencias, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional (CeProBi-IPN), México. e-mail: amichellehs@yahoo.com.mx

Jacqueline Capataz Tafur. Estudiante de Doctorado en Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi-IPN), México. e-mail: jacquecapataz@hotmail.com

Mario Rodríguez-Monroy. Doctor en Ciencias, Universidad Autónoma de México (UNAM), México. Investigador, CeProBi-IPN, México. e-mail: mrmonroy@ipn.mx

Gabriela Sepúlveda Jiménez. Doctora en Ciencias, UNAM, México. Investigador, CeProBi-IPN, México. Dirección: Departamento de Biotecnología, CeProBi-IPN. Apdo. Postal 24. Carretera Yautepec-Jojutla Km. 8.5. Yautepec, Morelos. México. C.P. 62730. e-mail: gsepulvedaj@ipn.mx

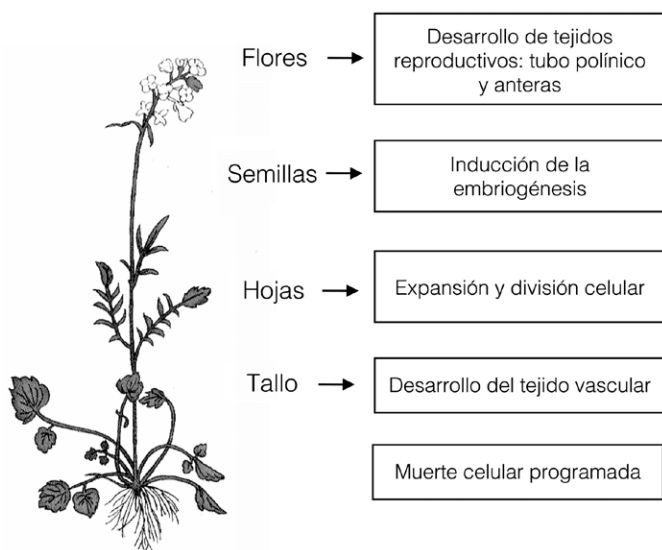


Figura 1. Distribución de las AGPs en las plantas y algunos de los procesos biológicos en los que participan.

sión y su capacidad de prevenir la cristalización de azúcares (Verbeke *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2007). Las AGPs, por su componente de carbohidratos podrían ser usadas como inmunoestimulantes, ya que en forma similar a los arabinogalactanos de plantas medicinales son polisacáridos que muestran esta actividad biológica (Nergard *et al.*, 2004; Mellinger *et al.*, 2008).

En cultivos de células vegetales, las AGPs son secretadas al medio y se han relacionado con eventos fundamentales del desarrollo de las células y tejidos vegetales *in vitro*, como son el crecimiento y la diferenciación celular. El crecimiento celular es uno de los parámetros más importantes para el establecimiento de un cultivo de células productoras de metabolitos secundarios de importancia para el hombre, como lo son colorantes y fármacos. La liberación de las AGPs es un evento que tiene lugar durante el crecimiento de los cultivos *in vitro* y la adición en el medio de cultivo del reactivo de Yariv causa una suspensión del crecimiento y de la división celular (Langan y Nothnagel, 1997; Darjeniar *et al.*, 2002). La reducción de la acumulación de estas glicoproteínas a través de su precipitación con el reactivo de Yariv genera cambios en la fisiología celular y que repercuten en el crecimiento de las células cultivadas *in vitro*. Este efecto es dependiente de la concentración del reactivo de Yariv, del tiempo y de la etapa de desarrollo del cultivo, pero si el tratamiento es severo puede llevar a la inducción de la muerte celular programada (Chaves *et al.*, 2002).

La liberación de las AGPs al medio puede facilitar su recuperación y análisis bioquímico y funcional. Dicho co-

nocimiento es de particular interés por las posibles aplicaciones biotecnológicas que podrían tener en sistemas de micropropagación de plantas. La adición de AGPs al medio puede inducir la embriogénesis en cultivos que no son embriogénicos y aumentar el rendimiento en cultivos embriogénicos (Kreuger *et al.*, 2000; Pereira-Netto *et al.*, 2007). La aplicación de AGPs obtenidas del medio de cultivos embriogénicos induce la formación de brotes a partir de callos derivados de protoplastos (Wiśniewska y Majewska-Sawka,

2007). Sin embargo, es escaso el conocimiento del mecanismo por el cual las AGPs participan en estos cambios de diferenciación, como también si tales efectos son atribuidos a un solo tipo de AGP o una mezcla de AGPs y cuáles características bioquímicas particulares presentan. Por ello, en este trabajo se presentan los avances en cuanto a las características bioquímicas de las AGPs liberadas al medio de cultivo de células vegetales cultivadas *in vitro* y se revisan las propuestas de los mecanismos bioquímicos y celulares por los que las AGPs participarían en la diferenciación y el crecimiento de las células vegetales.

Composición, Clasificación y Síntesis de las AGPs

Las AGPs son glicoproteínas que contienen en general 91,0-98,5% de carbohidratos y 1,5-9,0% de proteína, y su peso molecular es de 60-300kDa. El carbohidrato está compuesto por arabinogalactanos del tipo II y su tamaño varía de 30 a 150 residuos de azúcares (Serpe y Nothnagel, 1999). Los arabinogalactanos poseen una cadena lineal de D-galactosas unidas mediante enlaces $\beta(1-3)$ sustituida en el C(6) por cadenas laterales de $\beta(1-6)$ D-galactosas. Estas cadenas laterales presentan a menudo residuos terminales de L-arabinosa, L-fucosa, L-ramnosa o D-ácido glucurónico (Nothnagel, 1997; Gaspar *et al.*, 2001). El carbohidrato generalmente se une a la proteína a través de la hidroxiprolina; sin embargo, también se reportan uniones a la proteína vía serina o treonina (Figura 2a). De acuerdo a su composición de aminoácidos, las AGPs son clasificadas como clásicas y no clásicas (Figura 2b). Las clásicas presentan dominios ricos en

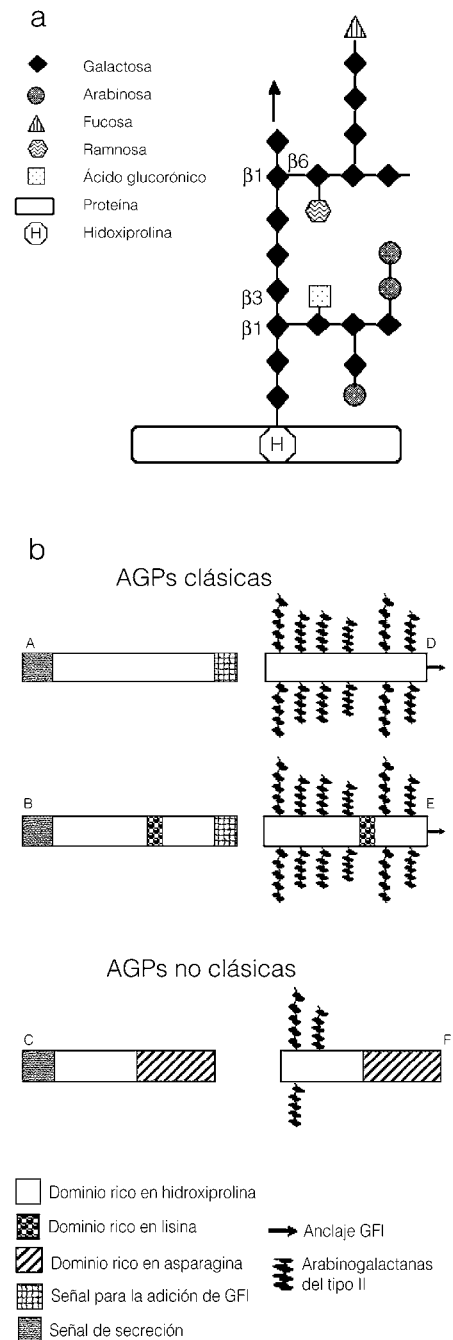


Figura 2. Representación esquemática de la estructura (a) y de la composición de las AGPs clásicas y no clásicas (b). En A, B y C se muestran los dominios de las proteínas y en D, E y F se indica la estructura nativa de las AGPs.

hidroxiprolina, alanina, serina, treonina y glicina, mientras que las no clásicas tienen dominios pobres en hidroxiprolina y ricos en cisteína o asparagina (Nothnagel, 1997). Otra diferencia bioquímica es la presencia en el dominio C-terminal de una señal para la unión de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GFI), que se encuentra en las AGPs clásicas y está ausente en las no clásicas. Desde el punto de vista estructural, la función del GFI es permitir la unión de

las AGPs a la membrana plasmática (Youl *et al.*, 1998; Oxley y Bacic, 1999), por lo cual las AGPs no clásicas, que carecen de GFI, probablemente estén como moléculas solubles en la superficie de la pared celular o en el espacio periplasmático (Gaspar *et al.*, 2001).

La biosíntesis de las AGPs es un proceso coordinado, donde una vez que se sintetiza la parte proteica, los residuos de prolina se modifican a hidroxiprolina y son glicosilados. La enzima que cataliza la modificación a hidroxiprolina es la peptidilprolina hidroxilasa, que se encuentra en el retículo endoplasmático (Wojtaszka *et al.*, 1999). La glicosilación de los residuos de hidroxiprolina tiene lugar en el aparato de Golgi y en ella participan galactosil transferasas responsables de la síntesis de β -(1,6)-D-galactano (Rumyantseva, 2005). Las AGPs sintetizadas son secretadas hacia la superficie celular a través de vesículas, para ser depositadas en el periplasma, en la pared celular o liberadas al apoplasto (Lamport *et al.*, 2006). En el caso de las AGPs clásicas, se propone que la eliminación del dominio C-terminal hidrofóbico ocurre en coordinación con la adición del GFI en un aminoácido específico. El GFI está formado por etanolamina unida a través de un oligosacárido a un lípido inmerso en la membrana plasmática. Esto implica que la liberación de la AGP con GFI de la membrana a la pared celular, o al espacio extracelular, requiere de la actividad de al menos una fosfolipasa (Rumyantseva, 2005).

Características Bioquímicas de las AGPs de Cultivos de Células Vegetales

Las AGPs son en forma natural componentes importantes de secreciones vegetales tales como gomas, lo que podría explicar que sean liberadas en forma activa al medio de cultivo de las células crecidas *in vitro*. Muchos de los estudios realizados están orientados a conocer la estructura y la composición de las AGPs liberadas al medio de cultivo de células desarrolladas en recipientes cerrados tipo matraces Erlenmeyer (Tabla I). En general, los pesos moleculares de las AGPs varían entre 45 y 224kDa, y por su composición de aminoácidos son clasificadas como clásicas y no clásicas, aunque la pertenencia de algunas a un grupo u otro no ha sido definida.

Las células de *Rosa* sp. liberan al medio de cultivo dos AGPs clásicas con pesos moleculares de 60 y 75kDa. En ambas AGPs, los aminoácidos más frecuentes fueron alanina, hidroxiprolina, serina y asparagina. Galactosa y arabinosa fueron los carbohidratos mayoritarios, pero su contenido es mayor en la AGP de 60kDa que en la de 75kDa (Komalavilas *et al.*, 1991). Las células de *N. tabacum* producen

una AGP clásica de 224kDa y, como en otras AGPs clásicas, los azúcares principales fueron arabinosa, galactosa, ácido glucurónico y ramnosa (Akiyama y Kato, 1981). Otras AGPs clásicas (Tabla I) han sido reportadas para cultivos de *L. multiflorum* (Anderson *et al.*, 1977), *L. esculentum* (Gao *et al.*, 1999), *E. purpurea* (Classen, 2007) y *P. communis* así como de *Silybum marianum* (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2008).

TABLA I
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS ARABINOGALACTANOS SECRETADAS AL MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES

Especie	Clase de AGP	PM (kDa)	Carbohidratos	% mol	Aminoácidos	% mol	Referencia
^a <i>Daucus carota</i> L. Cultivos embriogénicos	Clásica	45	Galactosa	60	Prolina	17	Immerzeel <i>et al.</i> (2004)
			Arabinosa	28	Alanina	10	
			Ác. glucurónico	6	Hidroxiprolina	9	
			Ramnosa	5	Glicina	8	
<i>Daucus carota</i> L. Cultivos embriogénicos	N. D	100	Galactosa	56	Prolina	15	Immerzeel <i>et al.</i> (2004)
			Ác. glucurónico	20	Glutamina	10	
			Ramnosa	11	Serina	9	
			Xilosa	5	Asparagina	9	
<i>Daucus carota</i> L. Cultivos no embriogénicos	N. D	45	Galactosa	50	ND		Immerzeel <i>et al.</i> (2004)
			Arabinosa	23			
			Ác. Urónico	19			
			Ramnosa	5			
<i>Rosa</i> sp.	Clásica	60	Galactosa	51,3	Alanina	23,7	Komalavilas <i>et al.</i> (1991)
			Arabinosa	32,2	Serina	14,7	
			Ác. glucurónico	6,3	Hidroxiprolina	11,9	
			Ramnosa	4,5	Asparagina	10	
<i>Rosa</i> sp.	Clásica	75	Galactosa	49,8	Alanina	20,7	Komalavilas <i>et al.</i> (1991)
			Arabinosa	27,9	Hidroxiprolina	17,8	
			Ác. glucurónico	7,6	Serina	14,6	
			Ramnosa	6,7	Asparagina	6,9	
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Clásica	224	Arabinosa,	40	Hidroxiprolina	16,5	Akiyama y Kato (1981)
			Galactosa	36,2	Alanina	13	
			Ác. glucurónico	10	Serina	10,7	
			Ramnosa	0,8	Asparagina	9,9	
<i>Lolium multiflorum</i>	Clasica	220	ND		Alanina	22,5	Anderson <i>et al.</i> (1977)
					Hidroxiprolina	14,8	
					Serina	9,8	
					Glicina	6,8	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Clásica	ND	ND		Hidroxiprolina	29	Gao <i>et al.</i> (1999)
					Alanina	21	
					Serina	12	
					Treonina	10	
<i>Echinacea purpurea</i>	Clásica	ND	Galactosa	61 ^a	Alanina	12,4 ^a	Classen (2007)
			Arabinosa	35	Hidroxiprolina	11	
			Ác. glucurónico	2	Glutamina	9,7	
					Serina	9	
<i>Acacia senegal</i>	No clásica	ND	Arabinosa	43	Alanina	14,8	Mollard y Joseleau (1994)
			Galactosa	37,8	Serina	14,8	
			Ramnosa	8,8	Asparagina	12,9	
			Glucosa	2,5	Glutamina	11,5	
<i>Pyrus communis</i> L.	Clásica	ND	ND		Hidroxiprolina	28,4	Oxley y Bacic (1999)
					Serina	20,4	
					Alanina	18,5	
					Treonina	10,1	
<i>Daucus carota</i> L.	No clásica	70-100	Galactosa	40,2	Alanina	12,2	Baldwin <i>et al.</i> (1993)
			Ác. glucurónico	25,1	Glicina	11,3	
			Arabinosa	18,7	Asparagina	10,7	
			Manosa	6	Glutamina	9,2	

ND: No determinado. ^a Los valores de porcentaje de carbohidratos y aminoácidos están dados en % p/p.

Baldwin *et al.* (1993) aislaron de cultivos de *Daucus carota* una AGP no clásica con un peso molecular de 70-100kDa constituida principalmente por alanina, glicina, asparagina, glutamina, leucina, serina y valina, pero con ausencia de hidroxiprolina. Los autores sugirieron que en este tipo de AGP el carbohidrato se encontraba unido al grupo hidroxilo de la serina de la proteína central. La unión de las AGPs secretadas por los cultivos de *D. carota* a las pectinas mediante iones Ca^{2+} , indica que estas moléculas podrían formar parte de la matriz extracelular. La AGP aislada del cultivo de *A. senegal* por Mollard y Joseleau (1994) presentó una composición de aminoácidos también carente de hidroxiprolina y podría exhibir un mecanismo de unión similar al propuesto para la AGP de *D. carota*.

Las características bioquímicas de las AGPs pueden cambiar con las propiedades biológicas de los cultivos. Immerzeel *et al.* (2004) reportaron que en cultivos de *D. carota* existen diferencias estructurales en las AGPs secretadas al medio por cultivos embriogénicos y no embriogénicos. El contenido total de carbohidratos de las AGPs de los cultivos embriogénicos resultó 2,5 veces mayor al de los cultivos no embriogénicos. Además, en los cultivos embriogénicos se identificaron dos AGPs, una clásica de 45kDa y otra de 100kDa no definida como clásica o no clásica. Por su parte, los cultivos no embriogénicos secretaron sólo una AGP de 45kDa que tampoco fue definida como clásica o no clásica. El mayor contenido de carbohidratos de las AGPs en los cultivos embriogénicos sugirió que el carbohidrato es el componente químico de las AGPs implicado en la inducción de la embriogénesis de *D. carota*. Sin embargo, en cultivos embriogénicos y no embriogénicos de *Beta vulgaris* L, solamente se encontró una AGP en los medios, con propiedades electroforéticas similares pero diferente capacidad de unión a los anticuerpos JIM7 y LMS contra pectinas y contra los epítopes JIM 14 y JIM15 (Wiśniewska y Majewska-Sawka, 2007), lo cual sugiere que durante la biogénesis de las AGPs en los cultivos hay cambios dinámicos en la composición y estructura de los dominios estructurales que son detectados por los anticuerpos específicos.

Iraki *et al.* (1989) reportaron que las características bioquímicas de las AGPs también cambian ante una condición de estrés, como es el estrés osmótico. En dicho estudio se muestra que los cultivos de *N. tabacum* crecidos bajo estrés salino impuesto por la presencia de NaCl, u osmótico con Polietilenglicol (PEG), secretan una AGP con un contenido de arabinosa y galactosa mayor al de aquella secreta-

da por los cultivos crecidos sin NaCl o PEG. Sin embargo, la diferencia en el contenido de carbohidratos no muestra una relación clara con los cambios en los pesos moleculares de las glicoproteínas. Las AGPs liberadas en condiciones sin estrés y con un estrés salino, mostraron un peso molecular de 35kDa, mientras que la AGP liberada por los cultivos crecidos con PEG presentó un peso molecular <17kDa.

Por otra parte, los estudios de las características bioquímicas de las AGPs en cultivos de mayor volumen, como en biorreactores, son escasos. Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) encontraron que los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en un biorreactor tipo tanque agitado secretan proteínas al medio de cultivo. Los estudios preliminares mostraron una reacción positiva del material secretado con el reactivo de Yariv, indicando la presencia de AGPs. Los cultivos de embriones somáticos de *S. album* crecidos en un biorreactor tipo *air-lift* presentaron una acumulación máxima de AGPs de $35\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Pal *et al.*, 2003). Webster *et al.* (2008), reportaron que células de *P. communis* crecidas en un biorreactor tipo *air-lift* secretaron al medio polisacáridos de alto peso molecular. El análisis químico del compuesto mostró la presencia de AGPs, con galactosa y arabinosa como principales carbohidratos e hidroxiprolina, serina, alanina, glutamina y ácido glutámico, como aminoácidos más abundantes.

Origen y Dinámica de Síntesis de AGPs en Cultivos

Los cultivos de células vegetales en suspensión secretan tanto AGPs clásicas como no clásicas. Por ello se propone que el origen de tales AGPs pudiera ser la membrana plasmática o bien la pared celular. Cabe destacar que las AGPs que son liberadas al medio por las células pueden presentar cambios en sus propiedades bioquímicas a lo largo del crecimiento del cultivo de células. Por ejemplo, Darjania *et al.* (2002) señalan que cultivos de *A. thaliana* liberaron AGPs con un peso molecular >250kDa durante las primeras 8h de cultivo, mientras que AGPs de 100-250kDa fueron secretadas en tiempos posteriores. Es probable que las AGPs del final del cultivo pudieran provenir de un proceso de recambio y/o de la síntesis de nuevas AGPs involucradas en el crecimiento o diferenciación celular.

Para que las AGPs clásicas se depositen en el medio de cultivo se requiere su liberación de la membrana plasmática a través de la degradación de su anclaje GFI mediante la acción de una fosfolipasa C o D (Youl *et al.*, 1998; Oxley y Bacic, 1999). Al respecto Darjania *et al.* (2002), utilizaron cultivos de *A. thaliana*

que secretaron al medio una mezcla de ~15 AGPs clásicas. Para conocer la dinámica de síntesis y secreción de dichas AGPs, se realizó el marcaje radiactivo de la fracción de carbohidratos y/o del anclaje GFI de estas glicoproteínas. Los resultados señalaron que el 85% de estas moléculas fueron sintetizadas y secretadas al medio a través de un proceso que involucró la degradación de su anclaje GFI, su depósito en la pared celular y finalmente su liberación al medio de cultivo. La secreción de AGPs clásicas, que involucra la ruptura del anclaje GFI posibilita la existencia de un control diferencial de la liberación de las AGPs y permite proponer la participación de estas moléculas como señales químicas implicadas en el crecimiento o la diferenciación celular requeridos en las diferentes etapas del crecimiento del cultivo.

Participación de las AGPs en el Crecimiento y Diferenciación de los Cultivos

Una característica distintiva de las AGPs es su capacidad para reaccionar con fenilglucósidos sintetizados químicamente y conocidos como reactivo de Yariv (Yariv *et al.*, 1967). Se conocen con este nombre a cuatro moléculas diferentes de fenilglucósidos: β -(D-glucosil)₃, β -(D-galactosil)₃, α -(D-galactosil)₃ y β -(D-manosil)₃. De estos cuatro fenilglucósidos, solo el β -(D-glucosil)₃ y el β -(D-galactosil)₃ reaccionan con las AGPs, mientras que los dos restantes, α -(D-galactosil)₃ y β -(D-manosil)₃ no reaccionan con las AGPs; sin embargo, son usados como controles negativos en los estudios de la búsqueda de la función de estas glicoproteínas. El mecanismo de reacción entre las AGPs y el reactivo de Yariv no es conocido, pero se ha sugerido que para que esta reacción se lleve a cabo se requiere tanto de la proteína como del carbohidrato de las AGPs (Nothnagel, 1997).

La formación del precipitado AGP-Yariv es una forma de inactivar a las AGPs en el cultivo de células vegetales y permite conocer la repercusión de la ausencia de las AGPs en los procesos biológicos. La inhibición del crecimiento causada por la adición del reactivo de Yariv al medio podría asociarse tanto con la inhibición total de la expansión, como de la proliferación celular. Serpe y Nothnagel (1994) reportaron que al agregar $50\mu\text{M}$ del reactivo de Yariv al medio de cultivo de *Rosa* sp. se inhibió el crecimiento celular. En vista de que el tamaño de las células tratadas con el reactivo de Yariv y el control fue el mismo, se sugirió que la inhibición del crecimiento fue debida a la supresión de la división celular. Así mismo se determinó que el 95% del reactivo se

encontraba asociado a la pared celular, mientras que el 5% restante se asoció a la superficie externa de la membrana plasmática, por lo cual la inhibición de la división de las células de *Rosa* sp. podría ser consecuencia de la interacción del reactivo de Yariv con las AGPs de la pared celular, de la membrana plasmática o de ambas. Estos resultados son consistentes con los reportados por Shibaya y Sugawara (2007), quienes mostraron que las AGPs son moléculas fundamentales en la regeneración de la pared celular en cultivos de protoplastos de *Marchantia polymorpha*. En dicho estudio, la adición del reactivo de Yariv indujo una disminución del índice de supervivencia de los protoplastos y una reducción de la acumulación callosa en las membranas de las células regeneradas.

Los mecanismos celulares propuestos por los que el reactivo de Yariv inhibiría el crecimiento celular son varios. Se ha sugerido que la interacción de las AGPs con el reactivo causa la ruptura de la unión de la membrana plasmática con la pared celular, llevando a la desorganización de la membrana plasmática, evento que sería una señal para detener la división celular. Otro mecanismo propone que la unión del reactivo con las AGPs de la pared celular afecta la extensibilidad de la membrana, lo que limita el crecimiento celular (Kreuger y van Holst, 1996). La inhibición de la división celular por la interacción AGPs-Yariv es dependiente de la etapa del ciclo celular. Langan y Nothnagel *et al.* (1997) encontraron en cultivos de *Rosa* sp. que la inactivación de las AGPs con el reactivo de Yariv indujo que las células detuvieran su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular. El mecanismo molecular propuesto es que las AGPs son moléculas señal de elementos regulatorios del ciclo celular, como son las ciclinas o las proteinasas dependientes de ciclina. Las AGPs son importantes en los procesos de expansión celular, como lo muestran los trabajos hechos con cultivos de células de *N. tabacum* (Vissenberg *et al.*, 2001) y *D. carota* (Willats y Knox, 1996). Las células de los cultivos de ambas especies presentan una morfología alargada, pero la adición del reactivo de Yariv provoca que las células cambien a una forma esférica. Los autores señalan que la adición del reactivo pudiera estar interfiriendo con el depósito de celulosa en la pared celular, o bien con el control direccional de este proceso. Al respecto Lampion *et al.* (2006), señalan que las AGPs podrían estar actuando como pectinas plastificantes de la pared celular, pero no indican cómo podrían estar modulando la expansión de la pared celular.

Los estudios realizados por Immerzeel *et al.* (2005) con cultivos de *D. carota* indican que las AGPs contro-

lan la embriogénesis, ya que las AGPs secretadas por cultivos embriogénicos son capaces de inducir este proceso en cultivos no embriogénicos de esta misma especie. Resultados similares fueron reportados por Pereira-Netto *et al.* (2007), quienes demostraron que una AGP clásica aislada de *Anacardium occidentale* puede estimular el desarrollo de embriones somáticos de cultivos de *D. carota* en un período de 2 a 3 semanas, además de que favorece la conversión de embriones a plántulas. Mediante el uso de técnicas de tinción inmunofluorescentes se ha observado que las AGPs de un cultivo embriogénico de un híbrido de *Abies alba* × *Abies cephalonica* se acumulan en la periferia de los embriones y células suspensorias, acumulación que no se observó en cultivos no embriogénicos (Samaj *et al.*, 2008). Además de la participación de las AGPs en el proceso de embriogénesis, también se ha reportado que estas moléculas pueden mejorar la respuesta de organogénesis en cultivos de protoplastos de *B. vulgaris* que fueron llevados a la formación de brotes (Wiśniewska y Majewska-Sawka, 2007). La adición de AGPs provenientes de goma arábiga comercial es capaz de prevenir la muerte de los cultivos de microsporas de *Triticum aestivum* L., permitiendo la obtención de embriones somáticos en cultivos haploides y el desarrollo de las plantas obtenidas (Letarte *et al.*, 2006). La diferenciación de embriones somáticos de *Zea mays* L. derivados de microsporas también fue mejor cuando se adicionaron AGPs al medio de cultivo (Borderies *et al.*, 2004). Estos resultados son interesantes desde el punto de vista tecnológico, puesto que uno de los problemas en los programas de obtención de plantas haploides se presenta en la supervivencia de las microsporas, en la inducción de embriones y en la regeneración de plantas, por lo que el uso de AGPs comerciales, podría ayudar a solucionar esta problemática. Las evidencias acumuladas en torno a la participación de las AGPs en los procesos de embriogénesis somática y organogénesis, permite proponer el uso de estas moléculas como una estrategia potencial para mejorar la tasa de conversión de embriones y regeneración de plantas en programas de mejoramiento genético y de micropropagación.

Los mecanismos bioquímicos por los que las AGPs llevan a cabo su función no están completamente descritos. Existen diversas propuestas que están sujetas a comprobación, ya que aún es limitada la información con que se cuenta. Estas propuestas se basan en los modos de acción de las glicoproteínas de células animales que participan en los procesos de crecimiento y diferenciación celular (Sho-walter, 2001; Romyantseva, 2005). Así

mismo, se fundamentan en la composición, las características estructurales y la localización celular de las AGPs. Al respecto, se ha sugerido que las AGPs o los productos de su degradación funcionan como moléculas señal en los procesos de crecimiento y diferenciación de las células vegetales.

Los carbohidratos de las AGPs podrían ser el origen de la molécula señal que desencadena la diferenciación celular. Dichos carbohidratos, al ser degradados por enzimas darían lugar a oligosacáridos, que al unirse a receptores de la membrana plasmática iniciarían un sistema de transducción de señales. Este mecanismo podría ser el que controla la embriogénesis somática, donde las AGPs con N-acetilglucosamina o glucosamina posiblemente sean las moléculas portadoras de la señal. Además de las AGPs, los cultivos de *D. carota* también secretan endoquitinasas requeridas para la embriogénesis. Las AGPs secretadas por los cultivos embriogénicos de *D. carota* contienen N-acetilglucosamina o glucosamina. Las AGPs secretadas por los cultivos embriogénicos de *D. carota*, al contener dichos aminoazúcares, podrían ser el sustrato de las endoquitinasas secretadas por los cultivos (Kreuger *et al.*, 2000). Sin embargo, los estudios mostraron que las AGPs tratadas con quitinasas pero que mantienen el carbohidrato intacto son más activas que las AGPs no tratadas para promover la embriogénesis de protoplastos con capacidad embriogénica reducida. Esto significa que las AGPs modificadas con quitinasas son capaces de controlar la embriogénesis (van Hengel *et al.*, 2001). Los estudios futuros podrían encaminarse a conocer si las AGPs tratadas con endoquitinasas son las que interactúan con el receptor de la membrana plasmática o desencadenan un mecanismo de transducción de señales que conlleva la inducción de la embriogénesis.

Otra propuesta indica que el GFI podría ser el origen de moléculas como el glicosilfosfatidilinositol, el inositol fosfoglicano o ceramidas que funcionarían como mensajeros intracelulares (Fischer *et al.*, 2004). Estas moléculas pueden ser liberadas del GFI por la actividad de fosfolipasas C y D. Por su parte, la fracción de la AGP liberada del GFI puede actuar como señal soluble para las células vecinas. Esta propuesta se basa en los estudios que muestran que las AGPs liberadas al medio de cultivo de células embriogénicas mantienen la capacidad de estimular la embriogénesis en cultivos no embriogénicos (McCabe *et al.*, 1997). Así como por el hecho que las AGPs, que se encuentran en forma abundante en la matriz extracelular, podrían provenir de la membrana plasmática (Du *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994). Sin embargo, no hay evidencias directas

que apoyen que estas AGPs sean señales solubles de las células vecinas.

Las AGPs también podrían ser moléculas de adhesión celular necesarias para el crecimiento y el desarrollo. Ellas participan en la conexión de la membrana plasmática con la pared celular (Kreuger y van Holst, 1996; Showalter, 2001). En vista de que son moléculas muy higroscópicas, podrían estar relacionadas con la organización física de la matriz extracelular o actuar como moléculas de protección, como sucede con las AGPs secretadas por los árboles de *A. senegal* como respuesta a las heridas.

Adicionalmente, las AGPs podrían ser una señal bioquímica que participe en la regulación de la producción de metabolitos secundarios. Cheng *et al.* (2008) reportaron que la producción de taxol y de AGPs esta fuertemente asociada en cultivos de células de *Taxus cuspidata*, y la acumulación de ambas moléculas responde a la inducción con metil jasmonato.

Conclusion

Los cultivos de células vegetales liberan al medio de cultivo AGPs clásicas y no clásicas que podrían proceder de la membrana plasmática o de la pared celular. El mecanismo bioquímico de liberación depende de la presencia o no del GFI. Las AGPs o sus derivados quizás participan como moléculas de señalización en los procesos de crecimiento y diferenciación de los cultivos de células. Es necesario intensificar los estudios de la estructura y composición de las AGPs, con énfasis en su participación como moléculas efectoras, así como para conocer otros elementos del mecanismo de la traducción de la señal por el que las AGPs o sus derivados participan en el crecimiento celular y la inducción de la embriogénesis y organogénesis. Tales estudios son importantes en el desarrollo de procesos biotecnológicos de micropropagación vegetal o de producción de compuestos con actividad inmuoestimulante y de interés medicinal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT (49950-Z) y SIP (20080146 y 20080388). Arianna M. Hernández Sánchez y Jacqueline Capataz, son becarias CONACYT y PIFI-IPN para estudios en el CEPROBI.

REFERENCIAS

Akiyama Y, Kato K (1981) An extracellular arabinogalactan-protein from *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 20: 2507-2510.
Anderson RL, Clarke AE, Jermyn MA, Knox RB, Stone BA (1977) A carbohydrate-binding ara-

binogalactan-protein from liquid suspension cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 143-158.
Baldwin TC, McCann MC, Roberts K (1993) A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. Purification and partial characterization. *Plant Physiol.* 103: 115-123.
Borderies G, Béhec M, Rossignol M, Lafitte C, Deunff E, Beckert M, Dumas C, Matthys-Rochon E (2004) Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *Eur. J. Cell Biol.* 83: 205-212.
Chaves I, Regalado AP, Chen M, Pinto C, Showalter A (2002) Programmed cell death induced by (β -D-galactosyl)₃ Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiol. Plant.* 116: 548-553.
Chen CG, Pu ZY, Moritz RL, Simpson RJ, Bacic A, Clarke AE, Mau SL (1994) Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 10305-10309.
Cheng JS, Lei C, Wu J, Yuan Y (2008) Expression of arabinogalactan proteins involved in taxol production by immobilized *Taxus cuspidata* cells. *J. Biotechnol.* 133: 96-102.
Classen B (2007) Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88: 267-275.
Darjania L, Ichise N, Ichikawa S, Okamoto T, Okuyama H, Thompson GA (2002) Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arapidopsis* cells. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 69-79.
Du H, Simpson RJ, Moritz RL, Clarke AE, Bacic A (1994) Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *Nicotiana glauca* and characterization of a corresponding cDNA. *Plant Cell* 6: 1643-1653.
Fischer U, Men S, Grebe M (2004) Lipid function in plant cell polarity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 670-676.
Gao M, Kieliszewski MJ, Lampion DT, Showalter A (1999) Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *Plant J.* 18: 43-55.
Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.* 47: 161-176.
Immerzeel P, Schols HA, Voragen AG, de Vries SC (2004) Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds. *Physiol. Plant.* 122: 181-189.
Immerzeel P (2005) *Characterization of carrot arabinogalactan-proteins*. Tesis. Wageningen University. Holanda. pp. 25-43.
Iraki NM, Bressan RA, Carpita NC (1989) Extracellular polysaccharides and proteins of tobacco cell cultures and changes in composition associated with growth-limiting adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol.* 91: 54-61.
Komalavilas P, Zhu JK, Nothnagel EA (1991) Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. *J. Biol. Chem.* 266: 15956-15965.

Kreuger M, van Holst GJ (1996) Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol. Biol.* 30: 1077-1086.
Kreuger M, van Holst GJ, de Vries S (2000) Effect of arabinogalactan-proteins and chitinases on somatic embryogenesis. En Nothnagel EA, Bacic A, Clarke A (Eds.) *Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins*. Kluwer/Plenum. New York, NY, EEUU. pp. 109-119.
Lampion DT, Kieliszewski MJ, Showalter (2006) Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytol.* 169: 479-492.
Langan KJ, Nothnagel EA (1997) Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma* 96: 87-98.
Letarte J, Simion E, Miner, M, Kasha KJ (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep.* 24: 691-698.
Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* 122: 3-9.
McCabe PF, Valentine TA, Forsberg LS, Pennell RI (1997) Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* 9: 2225-2241.
Mellinger CG, Cipriani TR, Noletto GR, Carbonero ER, Oliveira MB M, Gorin PAJ, Iacomini M (2008) Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *Int. J. Biol. Macromol.* 43: 115-120.
Mollard A, Joseleau JP (1994) *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline deficient arabinogalactan-protein. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 703-709.
Nergard CS, Diallo D, Michaelsen TE, Malterud KE, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H, Paulsen BS (2004) Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *J. Ethnopharmacol.* 91: 141-152.
Nothnagel EA (1997) Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 174: 195-291.
Oxley D, Bacic A (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14246-14251.
Pal S, Das S, Dey S (2003) Peroxidase and arabinogalactan protein as by-products during somatic embryo cultivation in air-lift bioreactor. *Proc. Biochem.* 38: 1471-1477.
Pereira-Netto AB, Pettolino F, Cruz-Silva CT, Simas FF, Bacic A, Carneiro-Leao AM, Iacomini M, Maurer JBB (2007) Cashew-nut tree exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 173: 468-477.
Rodríguez-Monroy M, Galindo E (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enz. Microbiol. Technol.* 24: 687-693.
Rumyantseva NI (2005) Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. *Biochemistry* 70: 1301-1317.

- Šamaj J, Salaj T, Matúšová R, Salaj J, Takáč T, Samajová O, Volkman D (2008) Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Rep.* 27: 221-229.
- Sánchez-Sampedro MA, Peláez R, Corchete P (2008) An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Carbohydr. Polym.* 71: 634-639.
- Seifert GJ, Roberts, K (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 137-161.
- Serpe MD, Nothnagel EA (1994) Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193: 542-550.
- Serpe MD, Nothnagel EA (1999) Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface. *Adv. Bot. Res.* 30: 207-289.
- Shibaya T, Sugawara Y (2007) Involvement of arabinogalactan proteins in the regeneration process of cultured protoplasts of *Marchantia polymorpha*. *Physiol. Plant.* 130: 271-279.
- Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1399-1417.
- van Hengel A, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries S (2001) N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 125: 1880-1890.
- Verbeke D, Dierckx S, Dewettinck K (2003) Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 10-21.
- Vissenberg K, Feijó JA, Weisenseel MH, Verbelen JP (2001) Ion fluxes, auxin and the induction of elongation growth in *Nicotiana tabacum* cells. *J. Exp. Bot.* 52: 2161-2167.
- Webster JM, Oxley D, Pettolino F, Bacic A (2008) Characterization of secreted polysaccharides and (glyco) proteins from suspension of *Pyrus communis*. *Phytochemistry* 69: 873-881.
- Willats WG, Knox JP (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of β -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 9: 919-925.
- Wiśniewska E, Majewska-Sawka A (2007) Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. *Plant Cell Rep.* 26: 1457-1467.
- Wojtaszek P, Smith CG, Bolwell GP (1999) Ultrastructural localization and further biochemical characterization of prolyl 4-hydroxylase from *Phaseolus vulgaris*: comparative analysis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 463-477.
- Yadav MP, Igartuburu M, Yan Y, Nothnagel EA (2007) Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food Hydrocoll.* 21: 297-308.
- Yariv J, Lis H, Katchalshi E (1967) Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem. J.* 195: 1c-2c.
- Youl JJ, Bacic A, Oxley D (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 7921-7926.

ARABINO GALACTAN PROTEINS IN PLANT CELL CULTURES

Arianna Michelle Hernández Sánchez, Jacqueline Capataz Tafur, Mario Rodríguez-Monroy and Gabriela Sepúlveda-Jiménez

SUMMARY

The arabinogalactan proteins (AGPs) are macromolecules found in practically all plant organs, being associated with several aspects of the plant growth and development. These molecules contain carbohydrates and proteins in a 9:1 relation. The carbohydrate moiety is composed mainly of type II arabinogalactans, whereas the protein has particular amino acid domains that allow classifying the AGPs into two groups, classical and non-classical. In addition, the former are characterized by a C-terminal tail that predicts the incorporation of a glycosylphosphatidylinositol group (GPI) that allows the attachment of the AGPs to the plasma membrane. Plant cell cultures of several species release AGPs into the culture medium. The biochemical characteristics of the AGPs released into the medium, and the

proposed biochemical and cellular mechanisms by which AGPs participate in plant cell differentiation and growth are reviewed. The plant cells release classical as well as non-classical AGPs into the culture medium. The origin of these AGPs could likely be the plasma membrane or the cell wall. They are involved in the control of cellular growth and differentiation processes, aspects that have fundamental importance in the induction of somatic embryogenesis and organogenesis, key steps in plant micropropagation programs. The biochemical mechanism by which the AGPs participate in cell growth and differentiation implies that the AGPs or their degradation products participate like signal molecules.

AS PROTEÍNAS ARABINO GALACTANOS EM CULTIVOS DE CÉLULAS VEGETAIS

Arianna Michelle Hernández Sánchez, Jacqueline Capataz Tafur, Mario Rodríguez-Monroy e Gabriela Sepúlveda-Jiménez

RESUMO

As proteínas arabinogalactanos (AGPs) são macromoléculas que se encontram praticamente em todos os órgãos das plantas, sendo associadas com vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal. Estas moléculas se caracterizam bioquimicamente por conter carboidratos e proteínas em relação 9:1. O carboidrato está composto principalmente por arabinogalactanos tipo II; enquanto que a parte protéica está organizada em domínios que definem as AGPs como clássicas ou não clássicas. As primeiras se caracterizam, além disso, por apresentar uma sequência C-terminal que prediz a incorporação de um grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), que permite sua união à membrana plasmática. Em cultivos de células vegetais se relatam várias espécies que liberam AGPs ao meio de cultivo. Apresenta-se uma

revisão das características bioquímicas das AGPs liberadas ao meio e das propostas sobre os mecanismos bioquímicos e celulares pelos quais as AGPs participam na diferenciação e crescimento das células vegetais. Os cultivos de células liberam ao meio de cultivo AGPs clássicas e não clássicas, e se propõe que poderiam provir da membrana plasmática ou da parede celular. As AGPs intervêm no controle do crescimento celular, além de estar relacionadas com a embriogênese somática e a organogênese, processos de diferenciação celular importantes nos sistemas de micropropagação de plantas. O mecanismo bioquímico pelo qual as AGPs participam no crescimento celular e a diferenciação, implica que estas, ou os produtos de sua degradação, talvez atuem como moléculas de sinalização.