
VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE POLIAMINAS ENDÓGENAS EN FUNCIÓN DE LA EDAD EN MICROTALLOS DE *Pinus caribaea* Mor.

Matilde E. Uribe, María Elena Materán, María Jesús Cañal y Roberto Rodríguez

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la evolución de los contenidos y estados de conjugación de las poliaminas en materiales de pino caribe de diferentes edades en cultivo *in vitro*. Se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa, la concentración individual y total de poliaminas endógenas en porciones apicales y basales de microtallos de *Pinus caribaea*. El origen de los microtallos correspondió a material embrionario, juvenil y adulto revigorizado. Se establecieron diferencias significativas en el contenido endógeno de poliaminas dependientes del desarrollo ontogénico. Sin embargo, se demostró que no existen diferencias

entre microtallos juveniles y adultos revigorizados, respecto al contenido de poliaminas totales y poliaminas individuales. Estas últimas son más abundantes en tejidos embrionarios que en tejidos juveniles y adultos revigorizados, los cuales mostraron niveles similares. Tanto en fracción libre como soluble conjugada, putrescina y espermina son las poliaminas mayoritarias en todos los materiales analizados. Los resultados permiten inferir que el proceso de maduración-envejecimiento de individuos puede estar influenciado por cambios específicos que ocurren durante el metabolismo de las poliaminas.

Introducción

Pino caribe es una especie de gran importancia económica en su área de distribución natural, debido a su rápido crecimiento y por la producción de madera de alta calidad, dura y resistente, muy utilizada para la producción de pulpa, papel, cartón y chapa (David *et al.*, 1995; Akane y Eneobong, 2008; Uribe *et al.*, 2008). Sus buenas cualidades maderables justifican el desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* de materiales embrionarios, juveniles y adultos para su utilización en silvicultura clonal (Webb y Díaz-Santiago, 1983; Meyer, 1998; Uribe *et al.*, 2004).

En especies leñosas los tejidos maduros y por tanto cronológicamente más viejos, generalmente muestran una reducida competencia morfo-

génica, dificultando el desarrollo de programas efectivos de clonación a partir de individuos seleccionados en fase madura (Fraga *et al.*, 2002a, b; Breton *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005). La disminución de la capacidad morfogénica es fuertemente especie específica; por ejemplo, árboles maduros de *Pinus radiata* D. Don, tienen baja capacidad morfogénica, con problemas serios para su establecimiento directo en cultivo *in vitro*, mientras que árboles maduros de *Prunus persica* (L.) Batsch cv. Hakuho, son capaces de ser introducidos *in vitro* sin necesidad de tratamientos de rejuvenecimiento (Fraga *et al.*, 2004). No obstante, en especies vegetales, la maduración es un proceso completamente reversible (rejuvenecimiento) o temporalmente reversible (revigorización). En este sentido,

existe relación entre la reversibilidad de la maduración y las poliaminas (Fraga *et al.*, 2002a, b, 2003; Kusano *et al.*, 2007; Noceda *et al.*, 2009), lo que justifica el estudio acerca de estas biomoléculas.

Las poliaminas actúan como moduladoras del crecimiento y desarrollo en plantas (Galston, 1983; Bais y Ravishankar, 2002; Liu *et al.*, 2006) y han sido implicadas en un amplio rango de procesos biológicos, incluyendo división celular, diferenciación vascular, maduración del fruto, senescencia, estrés ambiental, y muerte celular programada, entre otros (Galston y Kaur-Sawhney, 1995; Thomas y Thomas, 2001; Kaur-Sawhney *et al.*, 2003; Alcázar *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2007; Moschou *et al.*, 2008).

Diferentes autores han puesto de manifiesto la existencia

de relaciones específicas de poliaminas como indicadoras de edad en diversas gimnospermas (Königshofer, 1991; Minocha *et al.*, 1999; Fraga *et al.*, 2002a, 2003, 2004; Klimaszewska *et al.*, 2009; Noceda *et al.*, 2009) y también en angiospermas (Rey *et al.*, 1994; Berros *et al.*, 1997; Paschalidis *et al.*, 2009) estableciendo diferencias en función de la capacidad morfogénica desarrollada (Berros *et al.*, 1997) o de la situación de un determinado órgano dentro de la arquitectura del árbol (Königshofer, 1991). Estudios realizados en *P. nigra*, confirman que el balance putrescina/espermina+espermidina (Put/Spm+Spd) es un indicador de fases de desarrollo y procesos de revigorización (Valledor *et al.*, 2007). En *P. radiata* D. Don, se ha demostrado que existen valores de poliaminas

PALABRAS CLAVE / Edad / Marcadores de fases / Microtallos / *Pinus Caribaea* / Poliaminas / Revigorización /

Recibido: 02/06/2010. Modificado: 11/03/2011. Aceptado: 14/03/2011.

Matilde E. Uribe M. Doctora en Biología, Universidad de Oviedo (UNIOVI), España. Profesora, Universidad de Concepción (UDEEC), Chile. Dirección: Departamento Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales y

Centro de Biotecnología, UDEC. Box 160-C, Concepción, Chile. e-mail: muribe@udec.cl

María Elena Materán O. Ingeniera Agrónoma y M.Sc. en Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Doctora en

Ciencias Forestales, UDEC, Chile. Profesora, Universidad Nacional Experimental de Guayana (UNEG), Venezuela. e-mail: mmateran@uneg.edu.ve

María Jesús Cañal. Bióloga y Doctora en Biología, UNIOVI,

España. Profesora, UNIOVI, España. e-mail: mjcanal@uniovi.es

Roberto Rodríguez. Biólogo y Doctor en Biología, UNIOVI, España. Profesor, UNIOVI, España. e-mail: rrodr@uniovi.es

VARIATION IN ENDOGENOUS POLYAMINE CONCENTRATION AS A FUNCTION OF AGE IN *Pinus caribaea* Mor. MICRO-STEMS

Matilde E. Uribe, María Elena Materán, María Jesús Cañal and Roberto Rodríguez

SUMMARY

The aim of this work was to determine the evolution of the content and degree of conjugation of polyamines in Caribbean pine materials of different ages in *in vitro* culture. Local and total concentrations of endogenous polyamine were studied in the apical and basal portions of *Pinus caribaea* micro-stems by means of reverse phase high performance liquid chromatography. The origin of micro-stems corresponded to embryonary, juvenile, and adult re-invigorated material. Significant differences were found in the endogenous content of polyamines, depending on ontogenetic development. However, it was shown

that there are no differences between juvenile micro-stems and re-invigorated adult, with respect to the total polyamine content and the individual polyamines content. The latter are higher in embryonic tissue than in juvenile tissues and those from re-invigorated adults, which showed similar values. Both in the free as in the soluble conjugated fractions, putrescine and spermine are the most abundant polyamines in all the materials analyzed. The results allow to infer that the individual process of maturation-aging could be influenced by specific changes that take place during the metabolism of polyamines.

VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE POLIAMINAS ENDÓGENAS EM FUNÇÃO DA IDADE EM MICRO-CAULES DE *Pinus caribaea* Mor.

Matilde E. Uribe, María Elena Materán, María Jesús Cañal e Roberto Rodríguez

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a evolução dos conteúdos e estados de conjugação das poliaminas em materiais do pinheiro caribe de diferentes idades em cultivo *in vitro*. Analisou-se mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na fase reversa, a concentração individual e total de poliaminas endógenas em porções apicais e basais de micro-caules de *Pinus caribaea*. A origem dos micro-caules correspondeu a material embrionário, juvenil e adulto revigorizado. Estabeleceram-se diferenças significativas no conteúdo endógeno de poliaminas dependentes do desenvolvimento ontogênico. No entanto, se demonstrou que não existem diferenças entre

micro-caules juvenis e adultos revigorizados, em relação ao conteúdo de poliaminas totais e poliaminas individuais. Estas últimas são mais abundantes em tecidos embrionários que em tecidos juvenis e adultos revigorizados, os quais mostraram níveis similares. Tanto em fração livre como solúvel conjugada, putrescina e espermina são as poliaminas majoritárias em todos os materiais analisados. Os resultados permitem inferir que o processo de amadurecimento-envelhecimento de indivíduos pode estar influenciado por mudanças específicas que ocorrem durante o metabolismo das poliaminas.

libres (PAs-S) y solubles conjugadas (PAs-SH) característicos de estados de madurez y envejecimiento, incluso la tasa PAs-S/PAs-SH permite la determinación de aptitud de floración. Además, los índices de estos marcadores revierten durante procesos de revigorización mediante microinjerto, de tal forma que la recuperación de ciertas aptitudes juveniles va acompañada de cambios en los balances de poliaminas hacia relaciones específicas características de juvenilidad (Fraga *et al.*, 2002a).

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la evolución de los contenidos y estados de conjugación de las poliaminas en materiales de diferentes edades de pino caribe en cultivo *in vitro*. Por

otra parte, se investigó si materiales de diferente edad cronológica continúan manifestando diferencias, dependientes de las fases de desarrollo en cultivo *in vitro*, que permitan validar los marcadores de poliaminas postulados por Fraga *et al.* (2002a; 2004) como indicadores de edad, en condiciones de cultivo *in vitro*, o si bajo estas condiciones se inducen cambios que afectan a estos marcadores.

Materiales y Métodos

Material vegetal

El estudio incluyó material embrionario (E), el que fue establecido a partir de embriones maduros de *Pinus caribaea* var. hondurensis (Sé-

necl.) Barr & Golf. Las semillas, de 98,6% de pureza, fueron donadas por la Corporación Venezolana de Guayana, Venezuela. Material juvenil (J), establecido a partir de semillas germinadas y mantenidas durante dos años en huerto semillero propiedad del CIMA, Vitoria, España, y material adulto revigorizado (AA-R, clon N° 256) establecido a partir de individuos seleccionados dentro de un Programa de Mejora de CVG-PROFORCA (Corporación Venezolana de Guayana-Productos Forestales de Oriente S.A), Venezuela. El material fue revigorizado en campo mediante macroinjertos y aplicaciones de citoquinina (250mg·l⁻¹) por el Centro Biotecnológico de Guayana, Uni-

versidad Nacional Experimental de Guayana, Venezuela.

Cultivo *in vitro*

El establecimiento *in vitro* se realizó de acuerdo a Uribe *et al.* (2008) y la fase de proliferación se realizó utilizando una secuencia de medios QLP (Quoirin y LePoivre, 1977) tal como sigue: QLP₂ suplementado con 8,87µM 6-bencilaminopurina (BAP) y 0,49µM ácido 3-indolbutírico (AIB); QLP₁ suplementado con 4,44µM BAP más 0,49µM AIB; QLP libre de hormonas. El periodo de cultivo en cada medio fue de 45 días.

Análisis de poliaminas

Se utilizaron microtallos de material embrionario, juvenil

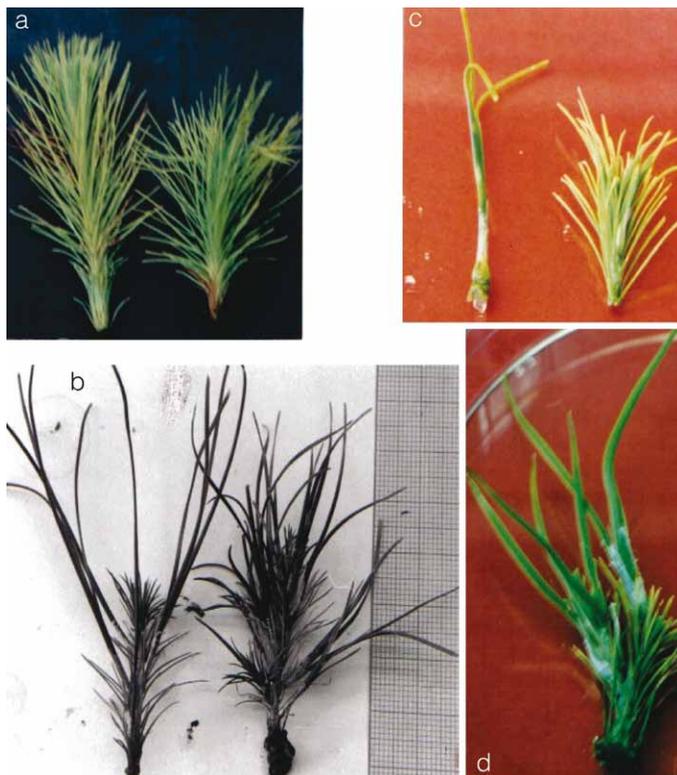


Figura 1. Microtallos de *Pinus caribaea* tras 45 días de cultivo en medio QLP. a: microtallos de origen embrionario, b: microtallos de material juvenil (nótese gran proliferación de braquiblastos), c: braquiblasto y microtallos de material adulto revigorizado, d: microtallos de material adulto revigorizado.

y adulto revigorizado procedente de las cadenas proliferativas descritas. Los microtallos fueron tomados siempre después del último subcultivo (medio QLP), sin reguladores de crecimiento (Figura 1) y se dividieron en región apical (A) y basal (B) de 1,5-2,5 cm de longitud, pesado y procesado después de un enfriamiento rápido en N₂ líquido, triturado en mortero de porcelana y liofilizado por 48 h. El material fue mantenido a -80°C hasta su utilización.

La extracción, purificación, dansilación y cuantificación de putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) y el producto de degradación 1,3-diamino propano (DAP) se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa de acuerdo al método descrito por Marcé *et al.* (1995) con algunas modificaciones (Fraga *et al.*, 2002a). Los análisis se realizaron en un equipo Waters Chromatography S.A.,

compuesto de bomba 600 E, controlador de flujo 600, detector de fluorescencia 474 e autoinector 717 Plus, conectado al procesador de datos Millennium 2010™. Se utilizó una columna Kromasil C18 de fase reversa. Se tomaron 25 mg de peso seco/ml de material vegetal, el que fue extraído en 1 ml de ácido perclórico 5% y centrifugado a 15000 g durante 20 min a 4°C. Se separó el sobrenadante, que contiene las poliaminas libres (PAs-S) y solubles conjugadas (PAs-SH) del precipitado que contiene las poliaminas insolubles conjugadas (PAs-PH). Después de la dansilación, las poliaminas fueron redisoluidas y cuantificadas por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (ver Uribe *et al.*, 2008).

Para corregir las pérdidas en el proceso de

extracción y dansilación de las muestras, se añadieron 0,925 KBq de [¹⁴C]Spm (Amersham) al extracto inicial. Aliquotas de 25 µl fueron tomadas en cada etapa, midiéndose la radiactividad en las muestras antes de su análisis por HPLC mediante un contador de centelleo Wallac 1409. Los resultados de cuantificación obtenidos con el análisis por HPLC se corrigieron con el factor de pérdidas obtenido en cada caso.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y se hicieron tres replicas por cada una de las muestras. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para las diferencias entre medias se utilizó el método de diferencias mínimas significativas (LSD) a un nivel de confianza de 95%.

Resultados y Discusión

El análisis de poliaminas realizado, después de 18 subcultivos en microtallos de materiales de diferente edad

cronológica (E: embrionario, J: juvenil, y AA-R: adulto revigorizado), en regiones apicales y basales, permitió constatar que, en condiciones de cultivo *in vitro*, no es posible establecer diferencias entre microtallos de J y de AA-R respecto al contenido de poliaminas totales (PAs-t= S+SH+PH)* y poliaminas totales individuales (Tabla I). Los microtallos embrionarios presentan los contenidos de poliaminas más elevados para las tres poliaminas cuantificadas, diferenciándose en todos los aspectos estudiados de los microtallos J y AA-R. En general, en todos los materiales existe mayor contenido de poliaminas en regiones apicales. Aunque tanto la región A como la región B en pino caribe son competentes en la síntesis de poliaminas, se observa que los tejidos de la zona apical presentan los contenidos más elevados de

* Poliaminas totales (S+SH+PH): EA 5244,1a; EB 2849,9a; JA: 1374,2b; JB: 1179,3b; AA-RA: 1572,6b; 1331,3a.

TABLA I
CONTENIDO ENDÓGENO (nmol·g⁻¹ PF) DE POLIAMINAS Y DAP DE LAS DIFERENTES FRACCIONES, EN REGIÓN APICAL Y BASAL DE MATERIAL EMBRIONARIO, JUVENIL Y ADULTO REVIGORIZADO DE *Pinus caribaea*

Fracción	M	R	DAP	Put	Spd	Spm	Totales
PAs-S	E	A	0	1777,8 a	892,1 a	1598,5 a	4268,4 a
		B	0	663,1 b	142,0 a	646,7 a	1451,8 a
	J	A	0	931,2 b	0 b	33,3 c	964,5 c
		B	0	732,8 b	0 b	24,5 c	757,3 b
	AA-R	A	0	936,6 b	0 b	136,6 b	1073,2 b
		B	0	815,1 a	0 b	70,7 b	885,8 a
PAs-SH	E	A	39,8 a	391,2 a	179,6 a	375,8 a	946,6 a
		B	121,1 a	609,6 a	239,0 a	519,3 a	1367,9 a
	J	A	0 b	196,7 b	54,6 c	137,2 b	388,5 c
		B	0 b	206,5 b	85,1 b	108,2 b	399,8 b
	AA-R	A	0 b	275,5 ab	70,3 b	122,6 b	468,4 b
		B	0 b	231,1 b	64,0 c	120,6 ab	415,7 b
PAs-PH	E	A	19,2 b	13,0 b	7,5 a	8,6 b	29,1 a
		B	22,1 b	13,7 a	6,9 a	9,6 a	30,2 a
	J	A	12,1 b	14,5 b	3,0 b	3,7 c	21,2 b
		B	33,3 a	14,0 a	3,4 b	4,8 c	22,2 b
	AA-R	A	54,6 a	17,5 a	3,8 b	9,7 a	31,0 a
		B	19,2 b	17,2 a	4,1 b	8,5 b	29,8 a

M: material, E: embrionario, J: juvenil, AA-R: adulto revigorizado, R: región, A: apical, B: basal, DAP: 1,3-diaminopropano, Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: espermina, PAs-S: poliaminas fracción libre, PAs-SH: poliaminas fracción soluble conjugada, PAs-PH: poliaminas fracción insoluble conjugada. Letras distintas entre las mismas regiones de individuos de diferentes edades indican diferencias significativas (95%).

síntesis de las tres poliaminas analizadas. En este contexto, los meristemas de la región apical de los tejidos más jóvenes (E) y en división activa tienen también los contenidos más elevados de poliaminas, descendiendo fuertemente en la región basal, especialmente en material embrionario (1,8 veces), mientras que en material juvenil como adulto revigorizado el contenido de poliaminas desciende 1,1 veces.

Estos resultados concuerdan con lo reportado para tabaco por Paschalidis y Roubelakis-Angelakis (2005), donde la distribución de poliaminas sigue una reducción desde zonas de acumulación o sumidero a la fuente en hojas y la mayor reducción coincide con la senescencia. De esta manera las poliaminas podrían actuar como reservas de C/N o como moléculas de señalización, regulando senescencia y probablemente relaciones sumidero-fuente Paschalidis y Roubelakis-Angelakis (2005). De acuerdo con Paschalidis *et al.* (2009) podría indicarse que la biosíntesis de poliaminas totales sigue un decrecimiento basipétalo a lo largo del eje del microtallo de pino caribe, lo que se traduce en un anabolismo decreciente con la edad.

La semejanza en los niveles de poliaminas de material J y AA-R resaltan tanto el efecto de los tratamientos revigorizantes como, posiblemente, del propio cultivo *in vitro*. Ambos factores son quizá responsables de los contenidos similares de poliaminas. Pero, aún admitiendo que existe revigorización del material adulto, ésta revigorización no es comparable a material juvenil, pues el comportamiento *in vitro* de ambos materiales durante la micropropagación es distinto (datos no mostrados). Además, el material AA-R fue de difícil adaptación a la secuencia de medios utilizada. Por otra parte, tanto material J como AA-R presentan características macromorfológicas muy similares, entre ellas, engrosamiento de

acículas y constitución de fascículos aciculares con brácteas prominentes (Figura 1).

Podría pensarse que materiales juveniles y adultos revigorizados llegan a un estado característico de “cultivo *in vitro*”, donde prácticamente igualan sus contenidos de poliaminas endógenas. Sin embargo, los individuos embrionarios, o no experimentando estos cambios, o los experimentarán a más largo plazo. Estos resultados podrían justificarse además por: i) catabolismo diferencial, reflejado por la cuantificación de los niveles totales de DAP, que experimentan una inversión zonal en materiales embrionarios de B-A a materiales adultos revigorizados de A-B (Tabla I) y, ii) contribución relativa de la vía ornitina o de la vía arginina en la biosíntesis de poliaminas, cuestión conflictiva debido a la interferencia producida por el proceso de interconversión arginina-ornitina, a través del ciclo de la ornitina. Algunos autores proponen que mientras la arginina decarboxilasa (ADC) regularía la biosíntesis de poliaminas durante la elongación celular y procesos metabólicos como la síntesis de alcaloides, la ornitina decarboxilasa (ODC) participaría predominantemente en procesos de división celular en tejidos en crecimiento activo (Tiburcio *et al.*, 1997; Bais y Ravishankar, 2002).

Existen evidencias moleculares de que los tejidos mantenidos en cultivo *in vitro* presentan un estado de expresión génica diferente al que muestran tanto individuos juveniles como adultos de campo (Rey *et al.*, 1994; Fraga *et al.*, 2004). También es posible pensar que los niveles elevados de poliaminas en material embrionario indiquen que, las condiciones de cultivo *in vitro* no permiten que la vía ODC deje de expresarse, con lo cual ambas vías permanecen activas.

Los niveles de poliaminas totales individuales de cada una de las fracciones analizadas, ponen de manifiesto que

Put y Spm son las poliaminas más abundantes (Tabla I). En las fracciones libre y soluble conjugada, presentan una dinámica similar a la evolución comentada para poliaminas totales; es decir, niveles de poliaminas endógenas más elevados en individuos en estadio E, e inferiores y similares en individuos J y AA-R. Es de destacar que en la fracción PAS-S siempre existe mayor contenido de poliaminas en las porciones A, observándose la mayor diferencia en microtallos embrionarios, resultados que concuerdan con los obtenidos en *Pinus radiata* D. Don (Fraga *et al.*, 2004) y *Corylus avellana* L. (Rey *et al.*, 1994), donde a medida que los individuos alcanzan la madurez se reduce el contenido de Put de la fracción PAS-S, indicando que estos cambios son dependientes de la edad cronológica. En masas embriogénicas en proliferación de *Picea abies* y *P. rubra*, también se determinó que Put-S es la poliamina más abundante (Minocha *et al.*, 1993; Sarjala *et al.*, 1997). En *Pinus nigra*, tanto el contenido de Put como el contenido de PAS-tot fue más elevado en líneas no embriogénicas con capacidad callogénica que en las líneas con capacidad embriogénica, las que presentan niveles inferiores de poliaminas (Noceda *et al.*, 2009). Por otro lado, en especies herbáceas se ha demostrado que la poliamina Put aumenta con la edad de la planta u órgano, y que todas las fracciones de Spd y Spm disminuyen alcanzando niveles muy bajos en la senescencia (Paschalidis *et al.*, 2009).

Basados en la relación entre poliaminas libres y crecimiento activo, la presencia de altas concentraciones de poliaminas libres y la ausencia de DAP en pino caribe embrionario, podría estar asociado con una tasa de crecimiento activo. Se ha demostrado que los tejidos embrionarios son más competentes, presentando mayor capacidad de respuesta *in vitro*. Ésta podría estar relacionada con los elevados contenidos de Put que presentan estos teji-

dos, dado que esta poliamina ha sido relacionada con distintas respuestas morfogénicas en otras especies con distintas respuestas morfogénicas (Smith, 1985; Tiburcio *et al.*, 1997; Minocha *et al.*, 1999; Uribe *et al.*, 2004).

Para la fracción de las poliaminas solubles conjugadas (PAS-SH) es de señalar que en microtallos E y J los niveles de poliaminas son más elevados en la región B, mientras que en microtallos AA-R es mayor en región A. Por otra parte, en la fracción insoluble conjugada no se detectan grandes diferencias entre los estados de desarrollo E y AA-R.

La función de la fracción PAS-SH durante la división y diferenciación celular aún está en discusión; podrían ser formas de almacenamiento y que por hidrólisis pueden suministrar a las células poliaminas adicionales que podrían influir en la división de la célula y/o en su expansión (Martin-Tanguy, 2001). Dado que las PAS-SH presentan diferencias entre material embrionario y el bloque J/AA-R con distinta competencia morfogénica, sería lógico pensar que esta fracción permita definir marcadores cronológicos de juvenilidad. Este hecho se ve corroborado por la evidencia de que las poliaminas solubles conjugadas están implicadas en inducción floral, evocación floral y procesos reproductivos (Bais y Ravishankar, 2002).

En pino caribe los contenidos de PAS-PH son inferiores a los que se cuantifican en las fracciones S y SH; sin embargo, su fluctuación es prácticamente opuesta a estas últimas fracciones en relación a los conjugados de Put, y esto podría estar indicando una fluctuación envejecimiento-dependiente. Por otra parte, la unión covalente de poliaminas a proteínas de naturaleza enzimática supone cambios importantes, tanto a nivel de función como de actividad, que se traducen en regulaciones metabólicas concretas (Andersen *et al.*, 1998). Es posible que el incremento de conjugados insolubles de Put en individuos adul-

TABLA II
TASA PUT/SPM (nmol·g⁻¹ PF) EN
MICROTALLOS DE INDIVIDUOS
EMBRIONARIOS, JUVENILES
Y ADULTOS REVIGORIZADOS
DE *Pinus caribaea*

M/R	Fracción		
	PAs-S	PAs-SH	PAs-PH
EA	1,11	1,04	1,51
EB	1,03	1,17	1,43
JA	27,96	1,43	3,91
JB	29,91	1,91	2,93
AA-RA	6,85	2,25	1,81
AA-RB	11,52	1,92	2,02

M: material vegetal, R: región, EA: embrionario apical, EB: embrionario basal, JA: juvenil apical, JB: juvenil basal, AA-RA: adulto revigorizado apical, AA-RB: adulto revigorizado basal, PAs-S: poliaminas fracción libre, PAs-SH: poliaminas fracción soluble conjugada, PAs-PH: poliaminas fracción insoluble conjugada.

tos revigorizados esté relacionado con los cambios metabólicos que tienen lugar durante el envejecimiento y, en último término, con la menor competencia morfogénica que presentan los individuos AA-R. Martín-Tanguy *et al.* (1990) demostraron una relación inversa entre el nivel de cambios fenotípicos y el nivel de poliaminas y sus conjugados: cuando los cambios fenotípicos aumentan, el contenido de poliaminas decrece (transición vegetativo-reproductivo).

El rol metabólico de los conjugados de poliaminas aún no ha sido bien elucidado. Bais y Ravishankar (2002) sugirieron que los niveles de poliaminas libres en plantas pueden ser regulados por la formación de poliaminas conjugadas reversibles. También se ha sugerido que la combinación de poliaminas con ácido cinámico y fenoles podría regular el pool de poliaminas libres en las células de plantas (Mader y Hanke, 1997).

Por otro lado, en todas las fracciones de poliaminas existe una síntesis relativamente baja de espermidina, siendo ésta la poliamina que presenta las menores concentraciones, y llama la atención su ausencia en la fracción de PAs-S en microtallos juveniles y adultos revigorizados (Tabla I). En relación a ello, una alta síntesis

de Spd ha sido correlacionada con división celular, y una baja síntesis de Spd es correlacionada con expansión celular (Paschalidis y Roubelakis-Angelakis, 2005). También se ha demostrado que concentraciones elevadas de Spd en material adulto estaría relacionado con la madurez reproductiva del material vegetal. En este contexto, en pino caribe la concentración total de Spd en la región apical decrece más de 14,6 veces desde microtallos de origen embrionario a microtallos de origen adulto revigorizado, mientras que en región basal hay un decrecimiento de 5,7

veces en función de la edad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Paschalidis *et al.* (2009) en *Vitis vinifera*, donde todas las fracciones de Spd y Spm disminuyen con la edad de la planta y alcanzan niveles bajos en senescencia. Similares resultados fueron obtenidos en *Pinus pinaster* (Klimaszewska *et al.*, 2009) en masas embriogénicas adultas comparadas con juveniles, donde estas últimas presentaron altos niveles de Spd y Spm.

Con respecto al DAP, éste no se detecta en la fracción S y en fracción PH solo es cuantificable en individuos embrionarios, presentando niveles considerables en región basal (Tabla I). En fracción insoluble conjugada, DAP presenta valores diferenciales en ambas regiones en individuos J y AA-R, siendo el contenido más elevado en región B y A respectivamente, mientras que microtallos E no presentan diferencias significativas respecto de DAP entre ambas regiones. La falta de este metabolito también fue detectada en cultivos embriogénicos y no embriogénicos de *P. radiata* (Noceda *et al.*, 2009), lo que podría ser indicativo del metabolismo rá-

TABLA III
RELACIONES DE POLIAMINAS (nmol·g⁻¹ PF) EN
PORCIONES APICALES Y BASALES DE MICROTALLOS
DE *Pinus caribaea* DE DIFERENTES EDADES

M/R	Put-S/Total PAs-S	Spd-S/Total PAs-S	Spm/Total PAs-S	Put-tot/Spd-tot +Spm-tot
EA	0,42	0,21	0,37	0,71
EB	0,46	0,10	0,45	0,49
JA	0,97	0	0,03	4,9
JB	0,97	0	0,03	4,2
AA-RA	0,98	0	0,13	3,58
AA-RB	0,92	0	0,08	4,0

M: material vegetal, R: región, EA: embrionario apical, EB: embrionario basal, JA: juvenil apical, JB: juvenil basal, AA-RA: adulto revigorizado apical, AA-RB: adulto revigorizado basal PAs-S: poliaminas fracción libre, Put-tot: putrescina total, Spd: espermidina, Spm: espermina.

pido de poliaminas en células en cultivo de pino.

Los contenidos de cada PA se traducen en relaciones específicas de PAs. En este contexto, la relación Put/Spm en las diferentes fracciones y materiales analizados alcanza valores máximos en el bloque J/AA-R, no existiendo grandes diferencias entre regiones apicales y basales (Tabla II). Los materiales embrionarios exhiben una baja tasa de Put-tot/Spd-tot+Spm-tot, comparados con tejidos juveniles y adultos revigorizados (Tabla III). Esta tasa ha sido correlacionada negativamente con la actividad de biosíntesis de macromoléculas (Lin y Mullin, 1999) y de espermidina. La espermina, en particular, interactúa iónicamente con las cargas negativas de sustancias pépticas, las cuales son conocidas por afectar la morfogénesis en plantas. Debido a la naturaleza policatiónica de las poliaminas, ellas tienen capacidad de unirse a polianiones, especialmente en

el caso de la tetramina (Spm). La mayoría de la Spm puede unirse a cromatina (Kusano *et al.*, 2007), hecho que podría explicar, al menos en parte, los bajos niveles de Spm en material J y AA-R.

Las poliaminas están implicadas en fenómenos asociados a maduración de órganos en vegetales (Rey *et al.*, 1994), y se han estudiado los cambios que presentan durante procesos morfogénicos *in vitro* (Rey *et al.*, 1994; Berros *et al.*, 1997; Noceda *et al.*, 2009; Uribe *et al.*, 2008; Klimaszewska *et al.*, 2009). Por tanto, los niveles de poliaminas observados en AA-R podría ser la causa, al menos en parte, del aumento relativo de capacidades morfogénicas y adquisición de caracteres macromorfológicos juveniles durante el proceso de revigorización. A falta de haber analizado el material adulto original y el hecho que el material AA-R se asemeje progresivamente al J respecto al contenido de poliaminas y en sus

TABLA IV
CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA EN BASE A
LOS CONTENIDOS DE PAS EN MATERIALES EMBRIONARIOS,
JUVENILES Y ADULTOS REVIGORIZADOS DE *Pinus caribaea*

PAS	<i>P. radiata</i>		<i>P. caribaea</i>			Marcador	Validación
	J	A	E	J	AA-R		
PAs-t	-	-	↑	↓	↓	E-M	-
PAs-S	↑	↓	↑	↓	↓	E-M	Validado
Put(S)	↑	↓	↑	↓	↓	E-M	Validado
PAs-SH	↓	↑	↑	↓	↓	CvCr	No validado
PAs-S/SH	>1	<1	>1	>1	>1	E-M, CvCr	No validado

PAs: poliaminas, PAs-t: poliaminas totales, PAs-S: poliaminas fracción libre, Put: putrescina, PAs-SH: poliaminas fracción soluble conjugada, J: juvenil, A: adulto, E: embrionario, AA-R: adulto revigorizado, E-M: envejecimiento-maduración, CvCr: crecimiento vegetativo-reproductor.

características macromorfológicas, no es posible establecer marcadores fisiológicos para todos los estados de desarrollo estudiados (Tabla IV), pero si se validan algunos marcadores fisiológicos/bioquímicos propuestos para *P. radiata* (Fraga *et al.*, 2004).

En conclusión, se sugiere que el proceso de maduración-envejecimiento puede estar relacionado con cambios específicos en la evolución del metabolismo de poliaminas. Los efectos que las poliaminas libres tienen sobre la capacidad de crecimiento de un tejido (Rey *et al.*, 1994), también podrían estar determinando la ontogenia propia dado que estados embrionarios presentan un rango de respuestas morfogénicas superiores a las observadas en individuos juveniles y adultos revigorizados (datos no mostrados).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto FAIR3-CT96-1445 y la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, Chile. Matilde Uribe Moraga agradece a ICI, España por su beca Doctoral. Los autores agradecen a Freddy Mora, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile, por su aporte en el análisis estadístico. María Elena Materán agradece a la Universidad Nacional Experimental de Guayana, Venezuela.

REFERENCIAS

- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patrón M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF (2006) Involvement of polyamines in plants response to abiotic stress. *Bio-technol. Lett.* 28: 1867-1876.
- Akaneme FI, Eneobong EE (2008) Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. *Hondurensis* Barr. and golf. II. Effects at two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 757-765.
- Andersen SC, Bastola DR, Minocha SC (1998) Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Physiol.* 116: 299-307.
- Bais HP, Ravishankar GA (2002) Role of polyamine in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 1-34.
- Berros B, Álvarez C, Rodríguez R (1997) Effect of putrescine synthesis inhibitors on somatic embryogenesis in hazelnut. *Angew. Bot.* 71: 90-93.
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2005) High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in Maritime pine. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 494-504.
- David A, Lainé E, David H (1995) Somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*. En Jain S, Gupta P, Newton R (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 145-181.
- Fraga M, Cañal MJ, Rodríguez R (2002a) *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 139-145.
- Fraga M, Rodríguez R, Cañal MJ (2002b) Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol.* 22: 813-816.
- Fraga M, Rodríguez R, Cañal MJ (2003) Reinvigoration of *Pinus radiata* is associated with partial recovery of juvenile-like polyamine concentrations. *Tree Physiol.* 23: 205-209.
- Fraga M, Berdasco M, Borja D, Rodríguez R, Cañal MJ (2004) Changes in polyamine concentration associated with aging in *Pinus radiata* and *Prunus persica*. *Tree Physiol.* 24: 1221-1226.
- Galston AW (1983) Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 33: 382-388.
- Galston AW, Kaur-Sawhney R (1995) Polyamines as endogenous growth regulators. En Davies PJ (Ed.) *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 158-178.
- Kaur-Sawhney R, Altabella T, Tiburcio AF, Galston AW (2003) Polyamines in plants: an overview. *J. Cell. Mol. Biol.* 2: 1-12.
- Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodríguez R, Lelu-Walter MA (2009) Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 45: 20-33.
- Königshofer H (1991) Distribution and seasonal variation of polyamines in shoot axes of spruce *Picea abies* (L.) Karst.). *J. Plant Physiol.* 137: 607-612.
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J. Plant Res.* 120: 345-350.
- Lin S, Mullin CA (1999) Lipid, polyamide and flavonol phagostimulants for adults western corn rootworm from sunflower (*Helianthus annuus* L.) pollen. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1123-1129.
- Liu JH, Honda Ch, Moriguchi T (2006) Involvement of polyamine in floral and fruit development. *Jarq* 40: 51-58.
- Mader JC, Hanke DE (1997) Polyamine sparing may be involved in the prolongations of cell division due to inhibition of phenylpropanoid synthesis in cytokinin starved soybean cells. *J. Plant Growth Regul.* 16: 89-93.
- Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF (1995) Rapid High-performance Liquid Chromatography method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr. B* 666: 329-335.
- Martin-Tanguy J (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Reg.* 34: 135-148.
- Martin-Tanguy J, Tepfer D, Paynot M, Burtin D, Heisler I, Martin C (1990) Inverse relationship between polyamine levels and the degree of phenotypic alteration induced by the root-inducing left-hand transferred DNA from *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol.* 92: 912-918.
- Meyer HJ (1998) *In vitro* formation of adventitious buds on mature embryos of *Pinus elliotti* Engelm. x *Pinus caribaea* Morelet. *S. Afr. J. Bot.* 64: 220-225.
- Minocha R, Kvaalen H, Minocha SC, Long S (1993) Polyamines in embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiol.* 13: 365-377.
- Minocha R, Smith DR, Reeves C, Steele KD, Minocha SC (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* 105: 155-164.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008) Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant Sign. Behav.* 3: 1061-1066.
- Noceda C, Salaj T, Pérez M, Viejo M, Cañal MJ, Salaj J, Rodríguez R (2009) DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees* 23: 1285-1293.
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2005) Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* 138: 142-152.
- Paschalidis KA, Moschou PN, Toumi I, Roubelakis-Angelakis KA (2009) Polyamine anabolic/catabolic regulation along the woody grapevine plant axis. *J. Plant Physiol.* 166: 1508-1519.
- Quoirin M, LePoivre P (1977) Études de mileux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 78: 437-442.
- Rey M, Díaz-Sala C, Rodríguez R (1994) Polyamines as markers for juvenility in filbert. *Acta Hort.* 351: 233-238.
- Rodríguez R, Castañón S, Uribe ME (2005) Biotecnología: Presente y futuro. En Sánchez-Olate M, Ríos D (Eds.) *Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal*. Austral. Concepción, Chile. pp. 5-16.
- Sarjala T, Häggman H, Aronen T (1997) Effect of exogenous polyamines and inhibitors of polyamine biosynthesis on growth and free polyamine contents of embryogenic Scots pine callus. *J. Plant Physiol.* 150: 597-602.
- Smith TA (1985) Polyamines in plants. En Galston AW, Smith TA (Eds.) *Polyamines in Plants*. Nijhoff/Junk. Boston, MA, EEUU. pp. 129-136.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrel A, Masgrau C (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* 100: 664-674.
- Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Uribe ME, Cañal MJ, Noceda CA, Ríos D, Fraga MF, Ferrando AM, Altabella TA, Tiburcio AF, Rodríguez R (2004) Polyamines in herbaceous and woody plants. *Curr. Topics Plant Biol.* 5: 53-62.
- Uribe ME, Materán ME, Cañal MJ, Rodríguez R (2008) Specific polyamine ratios as indicators of *Pinus caribaea* microshoots rooting phases. *Plant Biosyst.* 142: 446-453.
- Valledor L, Hasbún R, Meijón M, Rodríguez JL, Santamaría E, Viejo M, Berdasco M, Feito I, Fraga M, Cañal MJ, Rodríguez R (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 91: 75-86.
- Webb DT, Diaz-Santiago O (1983) Cytokinin-induced bud formation on caribbean pine (*Pinus caribaea* Mor.) embryos *in vitro*. *Plant Sci. Lett.* 32: 17-21.