

EFFECTE D'INHIBIDORS DE LA SINTESI DE PUTRESCINA SOBRE LA MORFOGENESI "IN VITRO" DE CALLS DE ZEA MAYS L.

J.M.Torné, I.Claparols, M.Marcé, A.M.Guergué i M.A.Santos
Lab. Cultius Vegetals "in vitro", Dpt. Agrobiologia, C.I.D.
(C.S.I.C.), Jordi Girona 18-26. 08034-BARCELONA.

SUMMARY

The effect of short treatments with 10mM D,L- α -difluoromethylornithine (DFMO) and D,L- α -difluoromethylarginine (DFMA), irreversible inhibitors of putrescine synthesis on growth, plant regeneration, polyamine and amino acid contents of maize callus cultures was investigated. All the treatments used increased the total soluble protein of the calluses. The DFMO increased the number of buds with respect to the control and maintained the capacity to regenerate plants. By contrast, DFMA increased the number of regenerated plants versus control but it did not maintain any calluses at the end of the differentiation period. Differences in endogenous polyamine (especially putrescine) and amino acid (especially His and GABA) contents depending on the pretreatment were also observed. These findings provide information about the incidence of polyamine metabolism in differentiation processes and may be useful in improving the yield of maize cultures and other plant biotechnological systems.

Les diamines, triamines i tetraamines més correntment anomenades poliamines (PA) són essencials per al creixement i la diferenciació de les cèl.lules vegetals. La síntesi de les PA es divideix en dues etapes: síntesi de la putrescina (Put) i formació de l'espermidina (Spd) i de l'espermina (Spm). En els vegetals la Put pot ésser formada per la via de l'ornitina descarboxilasa (ODC) i per la via de l'arginina descarboxilasa (ADC), (Galston and Kaur-Sawhney, 1990). Merrell-Dow Pharmaceutical ha produït inhibidors específics i irreversibles dels dos enzims, el DFMO i el DFMA respectivament. L'ús d'aquests enzims ja té aplicacions biotecnològiques en els vegetals.

En treballs anteriors vàrem estudiar l'efecte de dosis baixes d'ambdós inhibidors, (Tiburcio i col.l., 1991) i de dosis creixents de DFMO (Torné i col.l., 1993), sobre calls de blat de moro (*Zea mays* L.). En els dos casos poguèrem comprovar l'efecte estimulador que tenien aquests inhibidors, a determinades dosis, sobre la diferenciació "in vitro".

En aquest nou treball, s'estudia la seva influència en la diferenciació i en el contingut endògen de poliamines i aminoàcids, mitjançant tractaments breus (20 dies) amb dosis altes (10mM) de DFMO i DFMA i amb calls organogènics de blat de moro (en el seu medi de manteniment amb auxina).

Per a cada tractament es disposaren de 45 calls (amb un mínim de 0,5 grams/call) cultivats en tubs amb medi MS+auxina (Torné i col.l., 1980). Els tractaments foren: 10mM DFMO, 10mM DFMO+1mM Put, 10mM DFMA, 10mM DFMA+1mM Put, Control (sense inhibidor) i Control+1mM Put. Després de 20 dies de cultiu, es congelaren amb nitrogen líquid 15 calls/assaig per fer les corresponents anàlisis; la resta es va passar a medi de diferenciació. Passats 5 dies més, es van congelar altres 15 calls/assaig i la resta es deixà tres mesos per concloure el

procés de diferenciació i així determinar el nombre d'estructures regenerades.

Les anàlisis de PA es varen fer pel mètode de dansilació directa i cromatografia en capa fina (TLC) i les anàlisis d'aminoàcids amb el sistema de HPLC.

Els resultats mostren una tendència a incrementar el contingut total de proteïnes solubles en tots els tractaments i especialment després de cinc dies de diferenciació, on arriben a duplicar-se.

Els valors de la diferenciació ens mostren una òptima resposta al tractament amb DFMO (T=324) seguit de Put (T=238), i on el Control té T=196. L'índex de regeneració (Rr) més alt també correspon a DFMO seguit de Put, i el més baix és per al DFMA+Put. Els tractaments amb DFMO donen un bon índex de manteniment (Mr=1,93) si bé el DFMA fa el contrari, s'esgoten completament els calls (Mr=0). Segons les dades tots els tractaments milloren el nombre de plantes regenerades respecte al control especialment el de Put; la tendència del DFMO és incrementar el nombre de brots (B), arribant a quasi el doble del Control.

La Put és majoritària en aquests calls, i la inhibició indueix baixades significatives d'aquesta diamina. L'addició de Put exògena sobretot fa augmentar la Put i molt menys la Spd i la Spm. Els tractament amb DFMA són els que produeixen una davallada mes forta en l'índex Put/Spd+Spm dels calls.

S'han observat variacions en els nivells d'aminoàcids segons els tractaments. DFMO i DFMO+Put incrementen la His i baixen l'Ala. DFMA i DFMA+Put augmenten el GABA. La presència de Put en general fa augmentar els nivells d'aminoàcids. En canvi, durant els cinc primers dies de la diferenciació, baixen el total d'aminoàcids.

La tendència del DFMO a induir un increment en la formació de brots ha estat també descrita en calls de tabac tractats amb DFMO (Burtin et al. 1989). Els tractaments amb aquest inhibidor, creiem que tenen un doble interès, d'una banda incrementar la taxa de regeneració dels calls i d'altra mantenir-los amb plena capacitat de regeneració. Per contra, el DFMA acaba esgotant el call al termini del procés de diferenciació, si ve facilitada la formació de plantes. Aquesta resposta diferencial dels dos inhibidors sospitem que té a veure amb la incidència de la via biosintètica de la Put i per tant pot estar relacionat amb les activitats de ADC i ODC modulades per la presència d'auxines en el medi de cultiu. Dades no presentades sobre les activitats de la ADC i ODC apunten cap a aquesta hipòtesi; així com també la suposada compartimentació de la Put segons sigui aquesta sintetitzada via Arg o Orn (Hiatt, 1989).

Aquest treball pot contribuir a conèixer millor els lligams entre les poliamines i els processos de diferenciació en blat de moro, alhora que pot facilitar una significativa millora de la regeneració en altres espècies d'interès biotecnològic.

- Galston i Kaur-Sawhney. 1990. *Plant Physiol.* 94,406-410.
Tiburcio i col.l. 1991. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 27,27-32.
Torné i col.l. 1993. *Plant Cell Physiol.* 34(2),371-374.
Torné i col.l. 1980. *Plant Sci. Lett.* 17,339-344.
Burtin i col.l. 1989. *Plant Physiol.* 89,104-110.
Hiatt. 1989. *Plant Physiol.* 90,1378-1381.