

Contenido de poliaminas y actividades arginina y S-adenosilmetionina descarboxilasas en semillas de *Cicer arietinum*

Polyamine content arginine and S. aderosylmethonine decarbosylases in seeds from *Cicer arietinum*

MUÑOZ DE RUEDA, P.; GALLARDO, M. y SÁNCHEZ-CALLE, I. M.

Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071 Granada. España.

RESUMEN

Las poliaminas son compuestos nitrogenados que intervienen en el crecimiento y el desarrollo de los vegetales. En este trabajo se han determinado los niveles de Put, Spd, Spm y Cad, en su forma libre y conjugada, en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de garbanzo. Por otra parte, se han estudiado las condiciones óptimas de ensayo de algunas de las enzimas implicadas en su biosíntesis: ADC, ODC y SAMDC. Se han encontrado las cuatro poliaminas estudiadas tanto en su forma libre como conjugada, siendo la Spd la más abundante. No hemos encontrado actividad ODC en ninguna de las condiciones ensayadas, mientras que las actividades ADC y SAMDC han sido encontradas en la fracción soluble.

Palabras clave: ADC. Garbanzo. ODC. Poliaminas. SAMDC.

ABSTRACT

Polyamines are nitrogenous compounds implicated in plant growth and development. In this paper we have quantified the levels of free and bound Put, Spd, Spm and Cad, in the embryonic axes and the cotyledons of chick-pea seeds. On the other hand, we have studied the optimal conditions assays for some enzymes of polyamines biosynthesis: ADC, ODC and SAMDC. We have detected the four polyamines in both free and bound forms, being Spd the most abundant. ODC activity was under the limit detection, while ADC and SAMDC were present in the soluble fraction.

Key words: ADC. Chick-pea. ODC. Polyamines. SAMDC.

Recibido: 6-3-1995.

Aceptado: 15-5-1995.

BIBLID [0004-2927(1995) 36:2; 223-236]

Abreviaturas: ADC, arginina descarboxilasa; Cad, cadaverina; ODC, ornitina descarboxilasa; (PH), poliaminas ligadas a macromoléculas; Put, putrescina; (S), fracción libre de poliaminas; SAM, S-adenosilmetiomina; (SH), poliaminas ligadas a moléculas de bajo peso molecular; Spd, espermidina; Spm, espermina.

INTRODUCCIÓN

Poliamina es un término genérico que engloba a las diaminas putrescina (Put) y cadaverina (Cad), la triamina espermidina (Spd) y la tetraamina espermina (Spm) (1).

La biosíntesis de la Spd y Spm se lleva a cabo a partir de la Put y ésta a su vez es formada a partir de la arginina y/u ornitina (2). La ornitina da lugar a la Put directamente por la ornitina descarboxilasa (ODC), mientras que la arginina va a dar lugar a la Put a través de tres pasos, de los cuales el más importante es el catalizado por la arginina descarboxilasa (ADC) (3).

Para que la Put se convierta en Spd, es necesario añadir un grupo aminopropilo que procede originariamente del aminoácido metionina, el cual primero es convertido en S-adenosilmetionina (SAM) por la SAM sintasa y después descarboxilado, en una reacción catalizada por la enzima SAM descarboxilasa (SAMDC) (4). El SAM descarboxilado obtenido será el donador de los grupos aminopropilos necesarios para la síntesis de Spd y Spm. La ruta biosintética de poliaminas está relacionada con la del etileno a través del SAM (5, 6), pudiendo ser éste canalizado hacia una u otra ruta (7, 8, 9). Las poliaminas no sólo se encuentran en la naturaleza en forma libre, sino también ligadas a moléculas de bajo o alto peso molecular (10, 11).

En semillas de garbanzo hemos podido ver que el etileno es necesario para que la germinación se lleve a cabo (12) y debido a que poliaminas y etileno están biosintéticamente relacionadas por tener al SAM como precursor común, nos ha parecido interesante cuantificar el nivel de poliaminas libres y conjugadas, en los ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum*, así como llevar a cabo un estudio de las condiciones óptimas de ensayo de las actividades ADC, ODC y SAMDC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ejes embrionarios procedentes de semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*, L., cv. Castellana), germinadas como ha sido descrito previamente por nosotros (13).

Cuantificación de poliaminas

El material vegetal correspondiente (300 mg) se homogeneizó con ácido perclórico y hexanodiamina (4:1). La mezcla se centrifugó a 27.000 x g durante 12 minutos. El precipitado y una alícuota del sobrenadante se hidrolizó con HCl 12N (1:1; v/v), obteniéndose una fracción insoluble (PH) y otra soluble (SH), respectivamente. Posteriormente, las muestras se filtraron, se secaron con N₂ a 70 °C y se redisolvieron con ácido perclórico 0.2N.

Las muestras fueron dansiladas según ha sido descrito por Muñoz de Rueda y cols. (14). Un volumen de 20 µl de la muestra dansilada se inyectó en HPLC, comparándose con patrones de poliaminas puras, obtenidas comercialmente de Sigma.

Actividades enzimáticas ADC Y ODC

El material vegetal se homogeneizó, con tampón de extracción (150 mM de Tris-HCl, pH 9, 10 mM de DTT, 150 µM de PLP y 10 µM de leupeptina). La mezcla se centrifugó a 27.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo.

La mezcla de reacción contenía 1 mg de proteína y 0.1 µCi de arginina u ornitina (volumen final de 200 µl), incubándose a 37 °C durante 90 minutos, para que se lleve a cabo la fijación del ¹⁴CO₂ liberado en la descarboxilación enzimática de la L-(1-¹⁴C)Ornitina (2.11 GBq mmol⁻¹) y de la L-(1-¹⁴C)Arginina (11 GBq mmol⁻¹) sobre un papel Whatman impregnado con KOH (2N). La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido.

La actividad de las enzimas ADC y ODC se expresó en pmoles de CO₂ desprendido por mg de proteína y por hora.

Actividad SAM descarboxilasa

Los ejes embrionarios se homogeneizaron con tampón de extracción (100 mM de Tris-ClH a pH 8, 30 mM de PLP, 5 mM de DTT y 1 mM de EDTA). El homogenado resultante se centrifugó a 26.000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto enzimático crudo.

La actividad enzimática se analizó por la liberación de ¹⁴CO₂ procedente de la reacción de descarboxilación. La mezcla de reacción contenía 500 µg de proteína y 0.1 µCi de 5-adenosil-L-(carboxil-¹⁴C) metionina (3.7 KBq; 2 GBq mmol⁻¹), en un volumen final de 200 µl, permaneciendo a 30 °C durante 60 minutos, midiéndose la liberación del ¹⁴CO₂ como hemos descrito anteriormente para las enzimas ADC y ODC. Los resultados se expresaron en pmol de ¹⁴CO₂ liberado por miligramo de proteína y por hora.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas, se determinó en todos los casos, siguiendo el método de Bradford (15), usando seroalbúmina bovina como estándar.

RESULTADOS

Se han encontrado las diaminas Put y Cad, la triamina Spd y la tetramina Spm, tanto en los cotiledones como en los ejes embrionarios de semillas de garbanzo. De todas las poliaminas cuantificadas la Spd fue la más abundante, tanto en forma libre como conjugada, seguido de Spm, Put y Cad (Tablas 1, 2, 3 y 4). La semilla de garbanzo presentaba mayor cantidad de poliaminas en el eje embrionario que en los cotiledones durante todo el período germinativo estudiado con la excepción de la Put(PH) y Spd(PH) a las 18 h de germinación, momento en que existía una fuerte conjugación en los órganos de reserva (Tablas 1 y 2).

Tabla 1.—Contenido de putrescina libre [Put(S)], ligada a moléculas de bajo peso molecular [Put(SH)] y unida a macromoléculas [Put(PH)], expresado en g/g de peso fresco, en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante las primeras 24 horas a 25 °C. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm la desviación típica.

	Horas	Ejes	Cotiledones
Put(S)	6	56.96 \pm 5.1	12.55 \pm 2.8
	12	43.96 \pm 3.9	20.04 \pm 1.9
	18	57.37 \pm 4.3	9.36 \pm 0.8
	24	68.44 \pm 5.6	8.35 \pm 1.0
Put(SH)	6	51.48 \pm 4.8	14.86 \pm 2.4
	12	42.14 \pm 3.9	12.14 \pm 3.1
	18	23.64 \pm 2.7	3.86 \pm 1.8
	24	49.39 \pm 4.1	5.98 \pm 2.2
Put(PH)	6	7.61 \pm 0.5	3.56 \pm 0.9
	12	5.02 \pm 0.2	1.21 \pm 0.3
	18	4.18 \pm 0.7	221.91 \pm 7.4
	24	11.06 \pm 1.2	3.63 \pm 0.5

En los ejes embrionarios, las poliaminas libres (S) son las más abundantes seguidas de las conjugadas a moléculas de bajo peso molecular (SH), siendo las poliaminas unidas a macromoléculas (PH) las que se encuentran en menor proporción (Tablas 1, 2, 3 y 4). Las diaminas Put y Cad incrementan, en los ejes embrionarios, desde las 6 a las 24 h de germinación (Tablas 1 y 4), alcanzando la Cad (S) a las 24 h un valor 2 veces superior que a las 6 h (Tabla 4). La

Tabla 2.—Contenido de espermidina libre [Spd(S)], ligada a moléculas de bajo peso molecular [Spd(SH)] y unida a macromoléculas [Spd(PH)], expresado en g/g de peso fresco, en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante las primeras 24 horas a 25 °C. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm la desviación típica.

	Horas	Ejes	Cotiledones
Spd(S)	6	279.43 \pm 8.9	79.69 \pm 5.6
	12	292.18 \pm 8.9	87.77 \pm 4.6
	18	322.49 \pm 9.2	62.43 \pm 3.5
	24	285.62 \pm 7.4	65.40 \pm 4.2
Spd(SH)	6	247.89 \pm 6.8	101.04 \pm 5.9
	12	241.74 \pm 7.2	63.83 \pm 4.7
	18	128.86 \pm 5.6	60.55 \pm 3.9
	24	147.54 \pm 6.2	33.39 \pm 2.5
Spd(PH)	6	25.66 \pm 2.3	94.94 \pm 5.1
	12	29.46 \pm 2.7	5.61 \pm 1.2
	18	12.82 \pm 1.8	199.16 \pm 6.2
	24	24.46 \pm 2.9	7.24 \pm 1.9

Tabla 3.—Contenido de espermina libre [Spm(S)], ligada a moléculas de bajo peso molecular [Spm(SH)] y unida a macromoléculas [Spm(PH)], expresado en g/g de peso fresco, en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante las primeras 24 horas a 25 °C. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm la desviación típica.

	Horas	Ejes	Cotiledones
Spm(S)	6	156.15 \pm 6.7	26.90 \pm 0.9
	12	155.30 \pm 5.8	233.20 \pm 7.2
	18	166.25 \pm 7.2	13.57 \pm 2.4
	24	120.60 \pm 5.3	11.19 \pm 1.8
Spm(SH)	6	125.68 \pm 6.1	24.45 \pm 3.2
	12	110.63 \pm 5.9	13.16 \pm 2.7
	18	55.49 \pm 4.3	5.42 \pm 1.1
	24	38.59 \pm 3.7	5.44 \pm 0.9
Spm(PH)	6	15.65 \pm 3.3	2.24 \pm 0.6
	12	10.92 \pm 2.5	3.53 \pm 0.7
	18	3.36 \pm 1.2	0.00 \pm 0.0
	24	7.29 \pm 2.2	1.51 \pm 0.2

triamina Spd (Tabla 2) y la tetramina Spm (Tabla 3), tanto en sus formas libres (S) como conjugadas (SH y PH), disminuyen durante todo el período germinativo estudiado, destacando la Spm(SH) que presentó a las 24 h un contenido 3.5 veces inferior que a las 6 h (Tabla 3). En los cotiledones todas las poliaminas libres (S) y conjugadas (SH y PH) disminuyen desde las 6 a las 24 h (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Para el estudio de las condiciones óptimas del ensayo de las enzimas ADC,

Tabla 4.—Contenido de cadaverina libre [Cad(S)], ligada a moléculas de bajo peso molecular [Cad(SH)] y unida a macromoléculas [Cad(PH)], expresado en $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante las primeras 24 horas a 25 °C. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm la desviación típica.

	Horas	Ejes	Cotiledones
Cad(S)	6	48.87 \pm 4.7	0.44 \pm 0.1
	12	47.10 \pm 4.2	8.09 \pm 1.7
	18	65.44 \pm 5.3	4.27 \pm 1.1
	24	94.94 \pm 7.2	0.49 \pm 0.1
Cad(SH)	6	43.14 \pm 4.3	0.70 \pm 0.1
	12	47.82 \pm 4.8	0.00 \pm 0.0
	18	26.37 \pm 2.3	1.42 \pm 0.2
	24	66.89 \pm 4.9	0.41 \pm 0.1
	6	5.76 \pm 1.2	0.87 \pm 0.1
Cad(PH)	12	5.68 \pm 1.1	0.75 \pm 0.1
	18	1.87 \pm 0.6	0.97 \pm 0.2
	24	9.26 \pm 2.1	0.92 \pm 0.1

ODC y SAMDC, éstas se cuantificaron en ejes embrionarios de semillas de garbanzo germinadas durante 24 h a 25 °C, momento en que las cantidades de Put (S, SH y PH) eran máximas (Tabla 1). Las enzimas se extrajeron con tampones Tris-HCl, fosfato potásico, MOPS y glicina sódica, obteniéndose los mejores resultados con tampón Tris-HCl, el cual fue utilizado en todos nuestros ensayos. Las enzimas se extrajeron con dicho tampón de extracción en proporciones 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 (p/v), obteniéndose las mayores actividades enzimáticas con la dilución 1:2 (p/v). Las enzimas estudiadas no se detectaron en el precipitado. Bajo nuestras condiciones de ensayo, no hemos detectado actividad enzimática ODC en nuestro material vegetal. En cuanto a la enzima ADC, su actividad incrementó de forma lineal con el tiempo de incubación hasta el minuto 90 (Fig. 1) y con la concentración de proteína hasta 1.2 mg (Fig. 2). El pH óptimo para la actividad enzimática ADC fue de 9 (Fig. 3). La actividad SAMDC incrementó de forma lineal hasta los 120 minutos de incubación (Fig. 4) y con la concentración de proteínas en la mezcla de reacción (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Las poliaminas Put, Spd y Spm se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas superiores. Se ha demostrado experimentalmente que los niveles altos de poliaminas están relacionados con la división celular y con otros procesos del crecimiento y desarrollo (16, 17). Así, se ha observado un incremento en poliaminas durante la fase de crecimiento activo en las células vege-

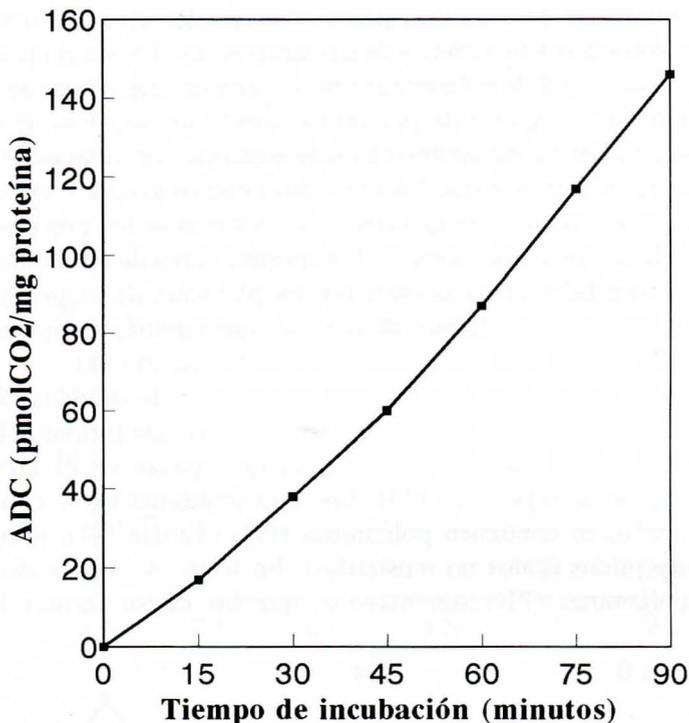


Fig. 1.—Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad ADC en ejes embrionarios de semillas de garbanzo germinadas durante 24 h a 25 °C. La cantidad de proteínas fue 1.2 mg. Cada punto es la media de tres repeticiones, con una desviación típica menor de 5.

tales (18) y durante la interrupción de la dormición de *Helianthus tuberosus* (19). Además, recientes estudios han sugerido que una disminución en los niveles de poliaminas podría indicar el comienzo de la senescencia (20, 21). El crecimiento celular es una parte importante de la germinación de la semilla, aunque se sabe poco acerca de las cantidades de poliaminas que están implicadas o del papel de estas sustancias en dicho proceso, debido fundamentalmente a que existen muy pocos trabajos sobre poliaminas en semillas (22, 23).

La semilla de garbanzo contiene además de Put (Tabla 1), Spd (Tabla 2) y Spm (Tabla 3) la diamina Cad (Tabla 4), poliamina que aunque no está presente en todas las plantas superiores (24), cuando existe se encuentra en grandes cantidades, como ocurre en *Pisum sativum* donde es la poliamina más abundante (25). En los ejes embrionarios la Cad(S) dobla su contenido a lo largo del período germinativo (Tabla 4). En semillas de soja ha sido propuesto un papel para la Cad durante la germinación (26).

Como en las semillas de arroz (27) los ejes embrionarios de las semillas de garbanzo contienen más poliaminas libres y conjugadas que los cotiledones (Tablas 1-4). Sin embargo, en semillas no germinadas de *Acer saccharum* los

cotiledones presentan 4 veces más poliaminas que los ejes embrionarios (23). Cuando a los cotiledones de semillas de garbanzo se les elimina el eje embrionario incrementa el contenido de poliaminas libres y conjugadas (datos no mostrados) lo cual sugiere un transporte de poliaminas desde los órganos de reserva. La existencia de este transporte también ha sido sugerida por otros autores (28); sin embargo, Lin (29) demostró que los ejes embrionarios aislados son capaces por sí mismos de sintetizar poliaminas libres, y recibir sólo los precursores de los aminoácidos desde los cotiledones. El transporte *in vivo* de poliaminas libres en otros órganos vegetales se ha demostrado en plántulas de tomate y maíz (30, 31). Nosotros recientemente hemos demostrado que también existe un transporte de MACC y ACC desde el cotiledón al eje embrionario (13).

Se han descrito dos tipos de poliaminas ligadas: las solubles (SH) e insolubles en ácido (PH), aunque se conoce más acerca de las formas solubles (32), no se sabe cuál es el papel de las poliaminas ligadas en el crecimiento y desarrollo de plantas superiores (33). Los ejes embrionarios y cotiledones de semillas de garbanzo contienen poliaminas (PH) (Tablas 1-4), principalmente unidas a polipéptidos (datos no mostrados). En frutos de *Malus domestica* los niveles de poliaminas (PH) son mayores que los de su formas libres (34).

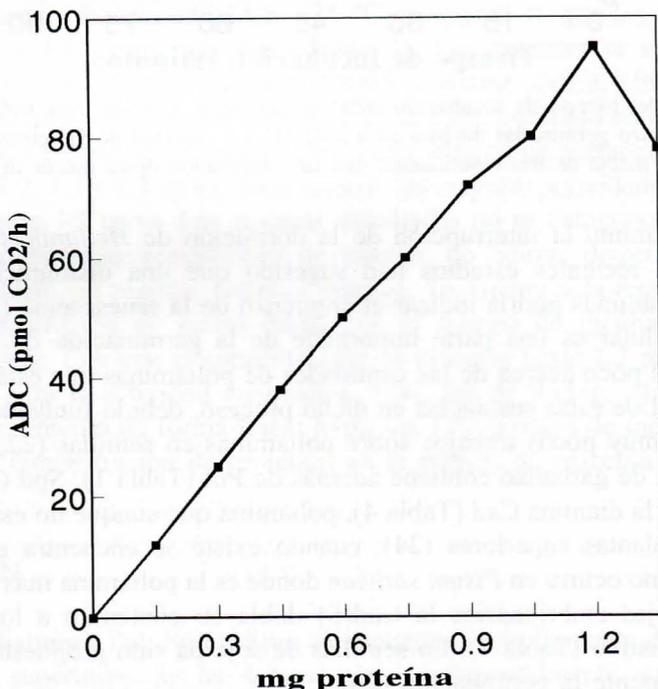


Fig. 2.—Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad ADC en ejes embrionarios de semillas de garbanzo germinadas durante 24 h a 25 °C. El tiempo de incubación fue de 60 min. Cada punto es la media de tres repeticiones, con una desviación típica menor de 3.

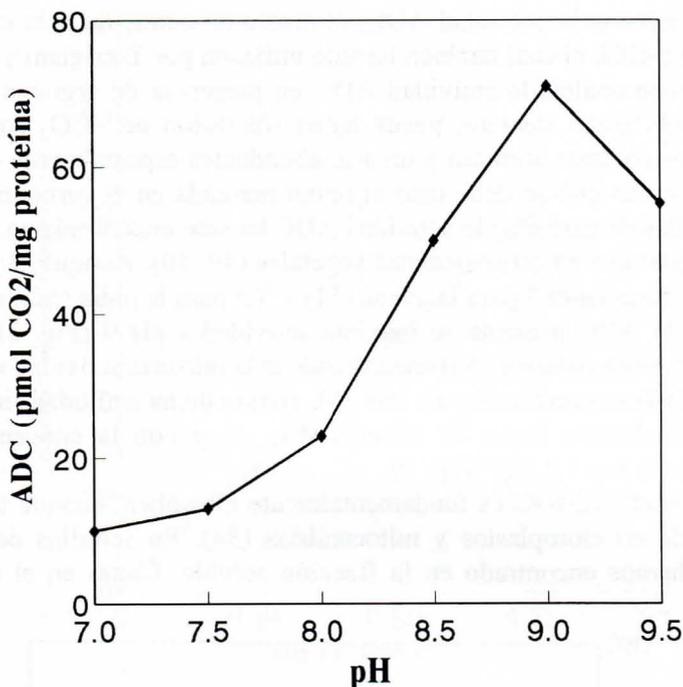


Fig. 3.—Efecto del pH sobre la actividad ADC en ejes embrionarios de semillas de garbanzo germinadas durante 24 h a 25 °C. El tiempo de incubación fue de 60 min y la cantidad de proteína de 1.2 mg. Cada punto es la media de 3 repeticiones, con una desviación típica menor de 4.

Serafini-Fracassini y Mosseti (35, 32) demostraron que los tejidos diferenciados contenían una mayor cantidad de poliaminas (PH) que las zonas de crecimiento activo. Además, también se ha encontrado en plantas una enzima, la transglutaminasa, que es responsable de la unión de poliaminas a polipéptidos (36, 37, 38) sugiriendo así un papel para estas aminas libres en la actividad de ciertas proteínas, como también propusieron Apelbaum y cols. (39) y Metha y cols. (40).

Las poliaminas (SH) también están presentes en las semillas de garbanzo (Tablas 1-4), tanto en los ejes embrionarios como en los cotiledones, siendo su contenido más de 5 veces mayor que el de las PH. Al igual que ocurre en ovarios de plantas de tabaco (41), en nuestro sistema la triamina Spd(SH) es la más abundante. También se han detectado las enzimas que llevan a cabo la conjugación de estas poliaminas (42). Sin embargo, las enzimas responsables de su hidrólisis, no se han determinado hasta el momento.

La última parte del trabajo está dedicada a estudiar las condiciones óptimas de ensayo de las enzimas ADC, ODC y SAMDC. Aunque la actividad ODC ha sido detectada en plantas de guisante, cebada (43), trigo, judía (44), tabaco (45) y tomate (46), en nuestras semillas no hemos podido encontrar dicha actividad bajo ninguna de las condiciones de estudio ensayadas.

En relación con la actividad ADC, el medio de extracción más efectivo fue el tampón Tris-ClH, el cual también ha sido utilizado por Torrigiani y Scocciati (47). Cuando se analiza la actividad ADC en presencia de arginina uniformemente marcada como sustrato, puede haber liberación de $^{14}\text{CO}_2$ como consecuencia de las enzimas arginasa y ureasa, abundantes especialmente en leguminosas (48), por lo que se debe usar arginina marcada en el carbono 1.

En semillas de garbanzo la actividad ADC ha sido encontrada en la fracción soluble, al igual que en otros sistemas vegetales (49, 50). Aunque el pH óptimo para la ADC varía entre 7 para la avena (51) y 8.5 para la judía (52), en semillas de garbanzo la ADC presenta su máxima actividad a pH 9 (Fig. 3). La ADC requiere PLP como cofactor (53) encontrándose la máxima actividad en semillas de garbanzo a la concentración de 150 μM , siendo dicha actividad lineal con el tiempo de incubación hasta 90 minutos (Fig. 1) y con la concentración de proteína entre 0.3 y 1.2 mg (Fig. 2).

La actividad SAMDC es fundamentalmente citosólica, aunque también ha sido detectada en cloroplastos y mitocondrias (54). En semillas de garbanzo nosotros la hemos encontrado en la fracción soluble. Como en el caso de la

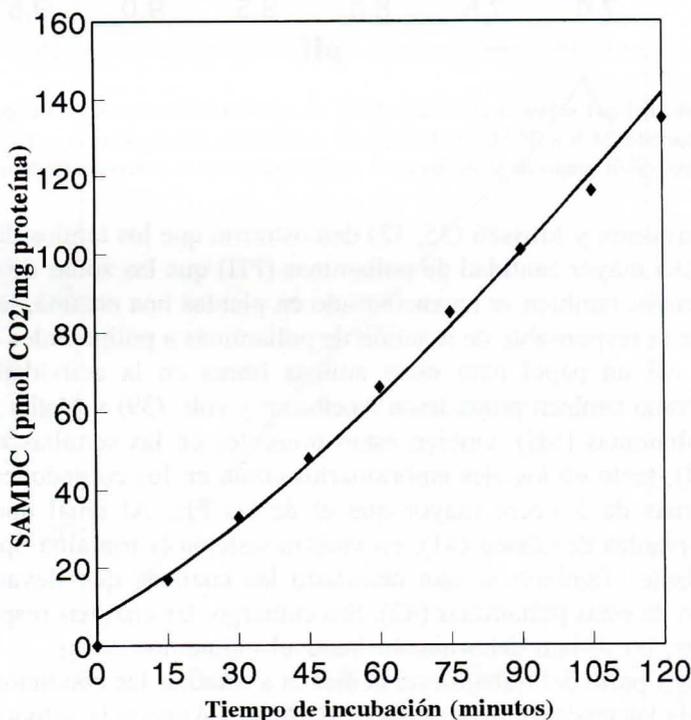


Fig. 4.—Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad SAMDC en ejes embrionarios de semillas de garbanzo germinadas durante 24 h a 25 °C. La cantidad de proteína fue 0.5 mg. Cada punto es la media de 3 repeticiones, con una desviación típica menor de 3.

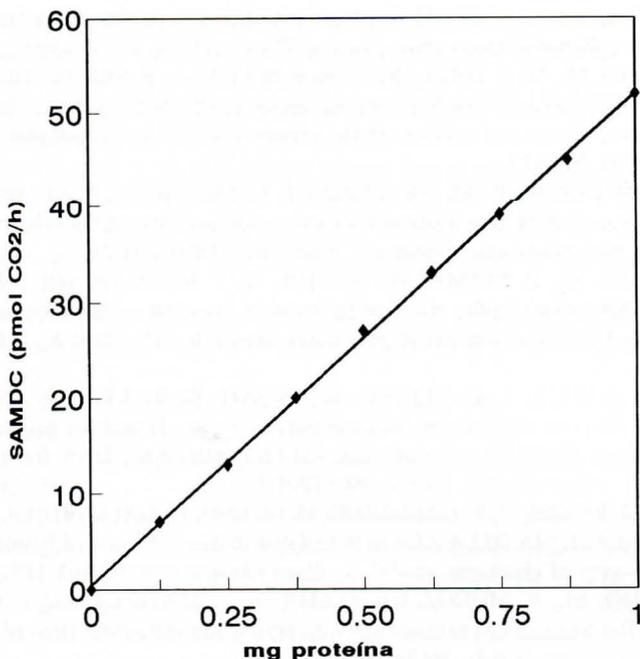


Fig. 5.—Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad SAMDC en ejes embrionarios de semillas de garbanzo germinadas durante 24 h a 25 °C. El tiempo de incubación fue 90 min. Cada punto es la media de tres repeticiones, con una desviación típica menor de 4.

ADC, esta enzima es también dependiente de PLP (3), siendo la concentración óptima en el garbanzo de 30 mM y el pH óptimo de 8 (datos no mostrados). Su actividad es lineal con el tiempo de incubación hasta los 120 minutos y con la concentración de proteína hasta 1 mg (Fig. 5).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) FLORES, H. E.: "Polyamines and plant stress". In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism*. (1990), Wiley-Liss Inc., pp. 217-239.
- (2) SMITH, T. A.: "The di- and polyamine oxidase of higher plants". *Biochem. Soc. Transactions* (1985), **13**:319-322.
- (3) BIRECKA, H. and M. BIRECKI: "Polyamine biosynthesis". In: *Methods in Plant Biochemistry*. (H. Birecka and M. Birecki, eds.), vol. 9, Acad. Press Limited (1993), pp. 447-467.
- (4) SMITH, T. A.: "Plant polyamines-metabolism and function". In: *Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions*. (H. E. Flores, R. N. Arteca and J. E. Shannon, eds.), Amer. Soc. Plant Physiol. (1990), pp. 1-23.
- (5) MIYAZAKI, J. H. and S. F. YANG: "The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis". *Physiol. Plant.* (1987), **69**:366-370.