

Senescencia en hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain. Efecto de bloqueantes del metabolismo energético

Luna, C.M. y V.S. Trippi

RESUMEN

En este trabajo se analiza la relación entre el agregado de sustancias bloqueantes del metabolismo energético, cambios en permeabilidad y nivel de oxidaciones celulares. Como sistema experimental *in vitro*, los segmentos foliares de hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain fueron incubados previamente durante 4 hs. en oscuridad con bloqueantes del metabolismo energético como DCMU, KCN, DNP, EDTA y Tritón X-100.

Los resultados muestran que todos los bloqueantes ensayados aumentaron los síntomas de senescencia medidos como cambios en permeabilidad, degradación de clorofilas y proteólisis; apoyando la idea de una relación entre disminución de la energía y aceleración de la senescencia. El hecho de que el uso de los bloqueantes del metabolismo energético fuera acompañado por un estímulo en el contenido de MDA, sugiere que el efecto de la disminución del metabolismo energético estaría mediado por un aumento en el nivel de oxidaciones celulares. Además, dado que cisteína, sustancia protectora de grupos SH, retardó la evolución de todas las variables en estudio, sugiere que el daño por oxidaciones implicaría un ataque a grupos SH de proteínas celulares.

Palabras clave: Metabolismo energético, Permeabilidad, Oxidaciones, Senescencia.

Celina M. Luna y Victorio S. Trippi, 1993. Senescence of *Avena sativa* leaves. cv. Suregrain. Effects of inhibitors of energy metabolism, its relation with membrane permeability and level oxidations. Agriscientia, X : 27-32.

SUMMARY

The relationship among energy metabolism, changes in membrane permeability and oxidation levels were analyzed using *Avena* leaves incubated *in vitro* with a medium containing inhibitors of energetic metabolism, such as EDTA, KCN, DCMU, DNP and Tritón X-100.

Results showed that all of energetic metabolism inhibitors increased senescence parameters, measured as changes in permeability, chlorophylls degradation and proteolysis, so the relationship between energy decrease and senescence was confirmed. The fact that energetic metabolism inhibitors were accompanied by stimulation of MDA content, suggested that the effect of energy metabolism

decrease could be mediated by an increased in cell oxidation levels. As cistein, a SH group protector, delayed development of all the parameters measured, oxidation damages would involved an attack of SH group of proteins cells

Key words: Energy metabolism, membrane permeability, oxidations, senescence

Celina, M Luna y Victorio S Trippi, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba Casilla de correo 395. (5000) Córdoba República Argentina

Abreviaturas: DCMU, diclorometilurea; DNP, dinitrofenol, EDTA ácido etilendiaminotetraacético, KCN, cianuro de potasio; MDA, malondialdehído, ME, metabolismo energético

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones realizadas sobre el metabolismo energético (ME) y la senescencia (Malik and Thimann, 1980, Trippi *et al.*, 1989), sugieren que dicho proceso está relacionado con la producción y utilización de la energía (Trippi *et al.*, 1989). En tal sentido, la senescencia fue retardada en oscuridad, con el agregado de fuentes de energía como azúcares (Luna and Trippi, 1986). Por el contrario, se produjo una aceleración del síndrome luego del tratamiento con un bloqueante de la fotofosforilación como el CINH_4 (Malik and Thimann, 1980).

Una característica de la senescencia de hojas y flores es el aumento de permeabilidad de las membranas (Trippi and Thimann, 1983; Trippi and Paulin, 1984). Algunas evidencias sugieren que dichos cambios en permeabilidad pueden estar relacionados con el ME. Así, la disminución de energía por anoxia o condiciones de oscuridad, fue acompañada por un aumento en la salida de iones (Trippi and Thimann, 1983, Trippi and De Luca d'Oro, 1985). Más aún, tratamientos con bloqueantes del ME como KCN (Kinraide and Etherton, 1982), DNP (Jeanjean, 1976) y tritón X-100 (Enami and Kura-Hotta, 1984) demuestran que la disminución del contenido de ATP fue acompañada por cambios en la permeabilidad.

Por otra parte, el ME es regulado por niveles endógenos de O_2 , como lo evidencia la disminución de los niveles de ATP y carga energética durante un estrés oxidativo (Trippi *et al.*, 1989). En tal sentido, se ha sugerido que el desarrollo de la senescencia podría resultar de la combinación entre el fenómeno oxidativo y la disminución del ME (Trippi and Paulin, 1984).

Estos hechos llevan a postular que la disminución del ME induciría la aparición de síntomas de senescencia en hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain. Tal

efecto podría relacionarse con el estímulo en los cambios de permeabilidad y un aumento en el nivel de oxidaciones celulares. Por lo tanto, el uso de sustancias de reconocida acción bloqueante del ME, reproducirán condiciones de menor contenido energético en hojas de *Avena*. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de dichas sustancias sobre los cambios en la permeabilidad de las membranas y otras variables de senescencia, a fin de establecer su relación con el nivel de oxidaciones celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plántulas de *Avena sativa* cv. Suregrain crecidas en vermiculita, luz continua de 40 W m^{-2} y 24 a 26° C. A los 7 días, de la primer hoja de 8 cm de longitud se cortaron segmentos de 3 cm de longitud descartándose los 0,5 cm apicales (Luna and Trippi, 1986). Diez segmentos de hojas se colocaron en 10 ml de agua destilada o en sustancias de reconocida acción bloqueante del ME, como KCN 1 mM (Avron, 1989, Solomos, 1977) y DCMU 250 μM (Renger, 1973; Hachimori *et al.*, 1968), los cuales son inhibidores del transporte electrónico fotosintético y respiratorio o bien desacoplantes como DNP 300 μM (Moreland, 1980) y tritón X-100 (Enami and Kura-Hotta, 1984) 0.01 % y un inhibidor de transferencia de energía como EDTA 50 mM (Jagendorf, 1977). Las concentraciones de los bloqueantes fueron elegidas en base a experiencias previas, cuidando que los tejidos, luego del tratamiento con bloqueantes, se mostraran siempre turgentes, lo cual fue considerado como síntoma de vitalidad (Satler and Thimann, 1980). Las soluciones permanecieron a pH 7, a excepción de KCN, cuyo pH se mantuvo a 7 con KOH. Los segmentos foliares se preincubaron con bloqueantes y un control agua. Para mantener el estado reducido del tejido, a los tratamientos con bloqueantes se les adicionó cisteína 5 mM, una sustancia protectora de grupos

Tabla 1. Efecto de los bloqueantes del metabolismo energético sobre la actividad fotosintética de hojas de *Avena sativa* sp.

Valor inicial 0 hs. PS mg/seg	Tratamiento	+ 24 hs. luz & PS mg/seg
1,4	Control	+0,36
	EDTA	+0.03
	KCN	+0.02
	DCMU	+0.07
	DNP	-0.04
	Tritón	-0.10

La actividad fotosintética ha sido expresada como & PS mg/segmento tomando como valor inicial el contenido en PS a la 0 hs. de iniciado el tratamiento. Los segmentos se incubaron con los bloqueantes (4 hs. en oscuridad) y luego se trasladaron a agua destilada (24 hs. en luz), y se midió el PS final. Por cada variante se utilizaron 50 segmentos.

SH. Todos los tratamientos permanecieron 4 hs. en oscuridad para asegurar la disminución del ME. Luego, los segmentos se lavaron y colocaron en agua

destilada, permaneciendo bajo luz continua (40 Wm⁻²) durante 24 hs., al cabo de ese tiempo se realizaron las mediciones correspondientes

Los cambios en permeabilidad se midieron por la salida de iones al medio de incubación, con conductímetro Horizon modelo 1984. Un extracto etanólico de segmentos de hoja (Luna and Trippi, 1986) fue utilizado para mediciones de clorofila (Tetley and Thimann, 1974), aminoácidos solubles (Moore and Stein, 1948) e hidroperóxidos como MDA (Heatch and Packer, 1968). Cada experiencia se repitió al menos 5 veces y los resultados se expresaron como porcentaje del control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los segmentos incubados en agua aumentaron el PS luego de 24 hs. en luz. Por el contrario, la preincubación con bloqueantes del ME no promovió cambios en el contenido de PS, lo que comparado con la evolución del control, sugeriría un retardo de la actividad fotosintética y en consecuencia, un menor contenido energético en los tratamientos con bloqueantes (Tabla 1).

En los segmentos foliares pretratados con bloqueantes, se observó en todos los casos, un aumento de salida de iones luego de 24 hs. en luz (Fig. 1),

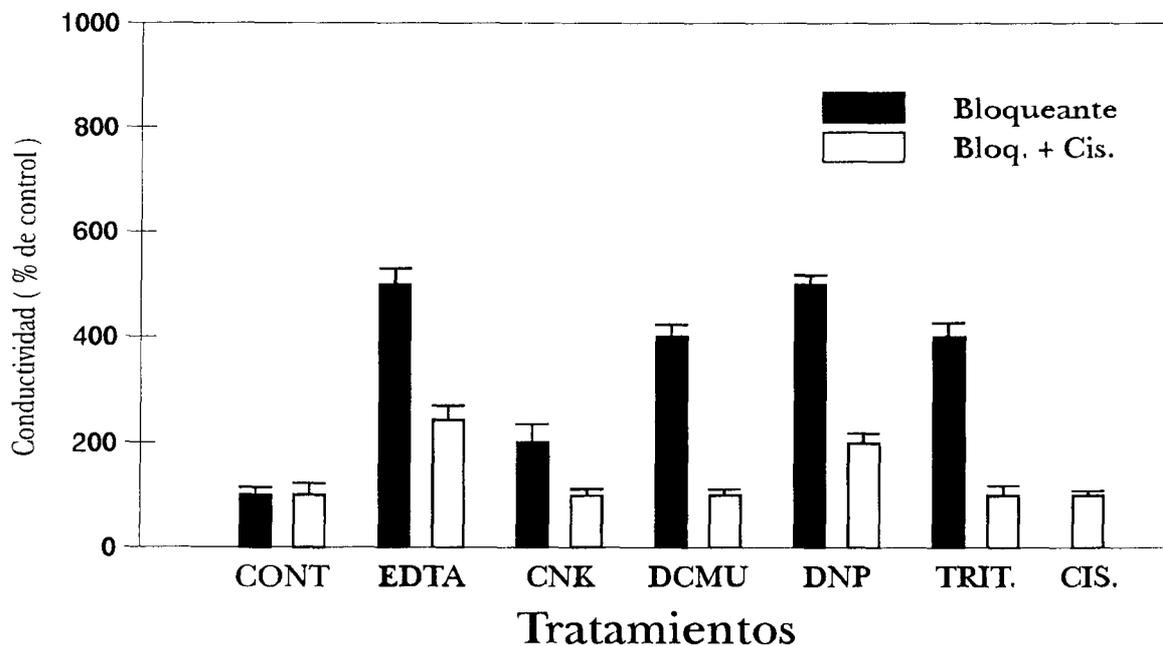


Figura 1. Efecto de los bloqueantes del metabolismo energético sobre permeabilidad de membranas celulares de hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain de 7 días de edad. Las concentraciones de los tratamientos fueron EDTA 50 mM, KCN 1 mM, DCMU 250 μ M, DNP 300 μ M y Tritón x-100 0.01 % y cisteína 5 mM. Las barras verticales representan el error estándar.

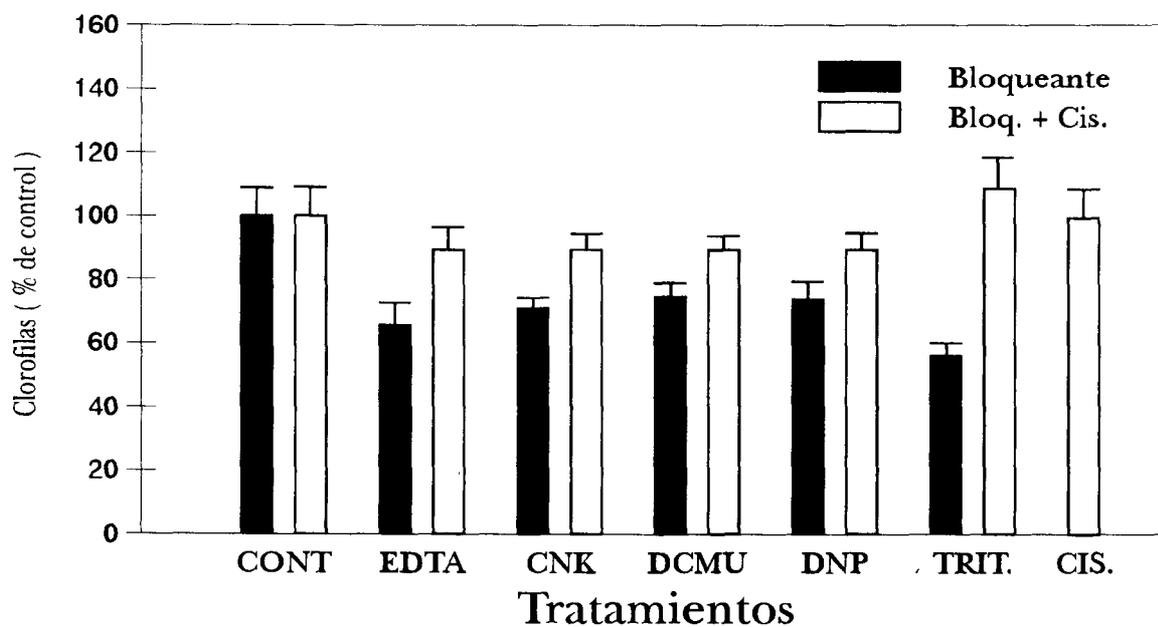


Figura 2. Efecto de los bloqueantes del metabolismo energético sobre la degradación de clorofilas de hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain. Detalles en Fig. 1.

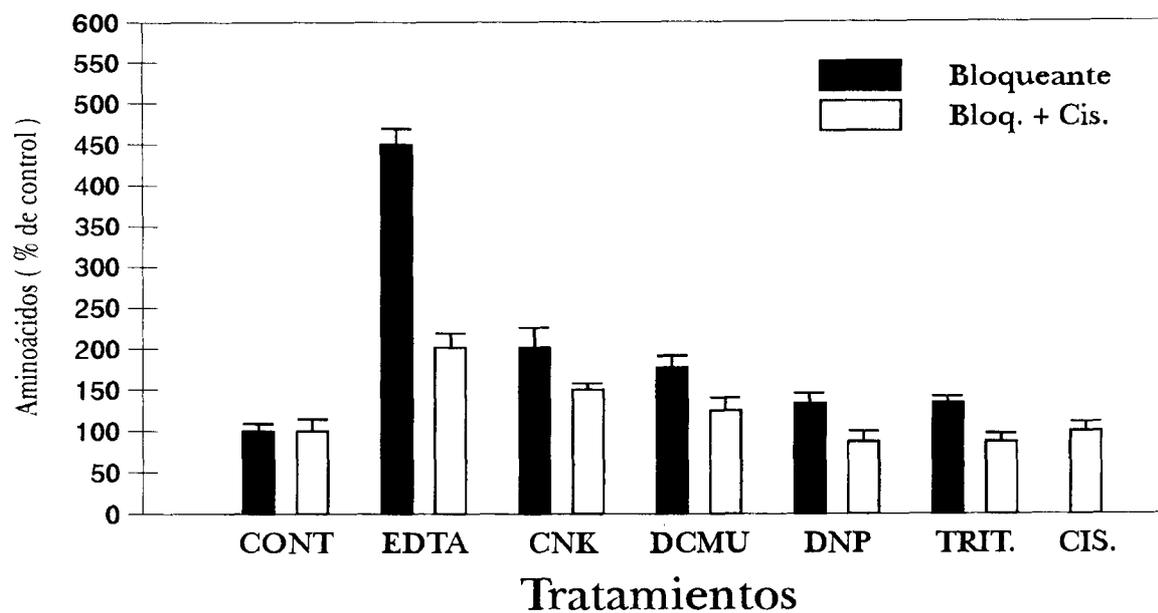


Figura 3. Efecto de los bloqueantes del metabolismo energético sobre la degradación de aminoácidos solubles de hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain. Detalles en Fig. 1.

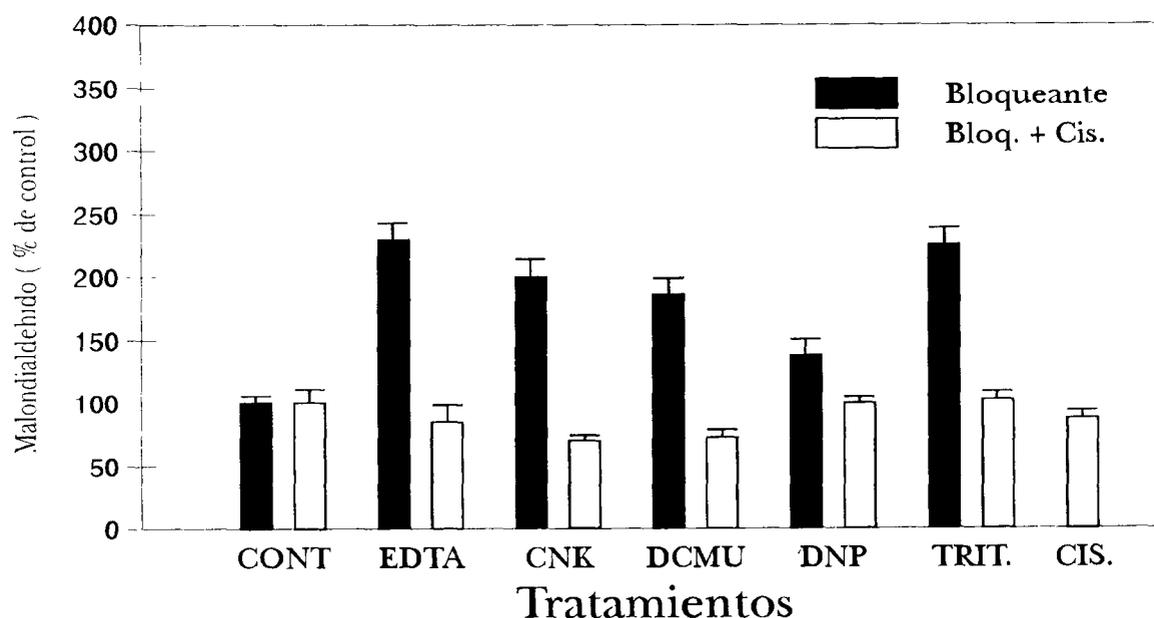


Figura 4. Efecto de los bloqueantes del metabolismo energético sobre el contenido de MDA de hojas de *Avena sativa* cv. Suregrain. Detalles en Fig. 1

por lo tanto la disminución del ME en condiciones de senescencia *in vitro* estaría asociada a cambios en la permeabilidad de las membranas celulares. Otros autores, usando los mismos bloqueantes: DNP (Jeanjean, 1976); KCN (Kinraide and Etherton, 1982) y tritón X-100 (Enami and Kura-Hotta, 1984), observaron que una disminución de ATP era acompañada por cambios en la permeabilidad.

En los segmentos foliares pretratados con bloqueantes también se aceleró la aparición de otras variables de senescencia, tales como degradación de clorofilas (Fig. 2) y aumento de proteólisis (Fig. 3). Esto concuerda con Malik and Thimann (1980), quienes utilizando un inhibidor de la fotofosforilación como el CINH_4 (Arnon and Chain, 1975) observaron un estímulo en la senescencia, medida como aumento en la degradación de clorofilas. Asimismo, Dean and Pollak (1985), Woolhouse (1984) y Arntzen *et al.* (1982), señalan que la utilización de bloqueantes como KCN, DCMU y DNP, estimularon proteólisis. En consecuencia, el hecho que todos los bloqueantes del ME ensayados promovieron aumentos de permeabilidad (Fig. 1) acompañados de estímulos en otras variables de senescencia (Figs. 2 y 3) apoya la idea de la existencia de una relación entre la disminución de la energía y aceleración de senescencia, lo cual fue previamente observado en

hojas de Avena (Trippi *et al.*, 1989) y en flores (Trippi *et al.*, 1988).

El tratamiento previo con los distintos bloqueantes del ME fue acompañado por estímulos en el nivel de MDA, luego de 24 hs. en luz (Fig. 4). Esto sugeriría que el efecto acelerante de la senescencia, promovido por el uso de bloqueantes, estaría mediado por un aumento en el nivel de oxidaciones celulares. En tal sentido, Trippi *et al.* (1989) observaron en la misma sp., *Avena sativa*, que la disminución del ME era acompañada por aumentos en el nivel de MDA y aceleración del resto de las variables de senescencia. Estos efectos fueron notablemente estimulados por atmósfera de O_2 al 100% (Trippi *et al.*, 1989) apoyando la idea de la participación del O_2 y sus formas tóxicas. Posiblemente, el uso de bloqueantes, guarda relación con un aumento en la formación de radicales libres (Dean and Pollak, 1985; Woolhouse, 1984 y Arntzen *et al.*, 1982). En tal sentido, el mantenimiento de condiciones reductoras en el tejido foliar por cisteína 5 mM, sustancia protectora de grupos SH (Murphy, 1984), disminuyó el nivel de oxidaciones celulares, comparado con los bloqueantes sin cisteína (Fig. 4). Tal efecto fue acompañado por un retardo en la evolución de las variables de senescencia. Así, el agregado de cisteína, retardó los cambios en permeabilidad (Fig. 1), la degradación de clorofilas (Fig. 2) y la proteólisis (Fig. 3).

En base a lo analizado se puede concluir que la utilización de bloqueantes del ME se correlaciona con aumentos de permeabilidad de las membranas celulares y aceleración de variables de senescencia. Tales fenómenos se asocian con un estímulo en el nivel de oxidaciones celulares, cuyos daños, ocurrirían, entre otros efectos, a nivel de grupos SH.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Juan Argüello la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnon, D.I. and R.K. Chain, 1975. Regulation of ferredoxin catalyzed photosynthetic phosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 : 4961-4965.
- Arntzen, C.J., S.C. Darr, J.E. Mullat, K.E. Steinback and K. Pfister, 1982. Polypeptid determinants of plastoquinone function in photosystem II of chloroplasts in Function of quinones in Energy conserving systems, edited by B.L. Trumpower. Academic Press, New York pp. 443-452.
- Avron M., 1981. Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. In The Biochemistry of plants. Photosynthesis. Edited by M.D. Hatch and N.K. Boardman. pp. 163-191. Academic Press. New York.
- Dean R.T. and J.K. Pollak, 1985. Endogenous free radical generation may influence proteolysis in mitochondria. Biochemical and Biophysical Research communications 126 (3) : 1082-1089.
- Enami J. and M. Kura-Hotta, 1984. Effect of intracellular ATP levels on the light-induced H⁺ efflux from intact cells of *Cyanidium caldarium*. Plant Cell Physiol. 25(7) : 1107-1113.
- Hachimori A., Y. Nosoh and N. Sone, 1968. Effects of the photosynthetic inhibitors on the respiration of yeast mitochondria. J. Biochem. Tokyo 64 : 119-121.
- Heath R.L. and L. Packer, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125 : 189-198.
- Jagendorf A.T., 1977. Photophosphorylation. In Photosynthesis. Edited by A. Trebst and M. Avron. pp. 307-336. Springer Verlag, New York.
- Jeanjean R., 1976. The effect of metabolic poisons on ATP level and on active phosphate uptake in *Chlorella pyrenoidosa*. Physiol. Plant. 37 : 107-110.
- Kinraide T.B. and B. Etherton, 1982. Energy coupling in H⁺ amino acid cotransport. Plant Physiol. 69 : 648-652.
- Luna C.M. and V.S. Trippi, 1986. Membrane permeability. Regulation by exogenous sugars during senescence of Oat leaf in light and darkness. Plant Cell Physiol. 27 : 1051-1062.
- Malik N.S.A. and K.V. Thimann, 1980. Metabolism of Oat leaves during senescence. VI Changes on ATP_i levels. Plant Physiol. 65 : 855-858.
- Moreland D.E., 1980. Mechanisms of action of herbicides. Ann. Rev. Plant. Physiol. 31 : 597-638.
- Moore S. and W.H. Stein, 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176 : 367-388.
- Murphy T.M., 1984. Effect of sulphhydryl reagents on K⁺ efflux from rose cells. Plant Physiol 75 : 138-141.
- Renger G., 1973. The action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea on the water-splitting enzyme system of photosynthesis. Biochem. Biophys. Acta 314 : 113-116.
- Satler S.O. and K.V. Thimann, 1980. The influence of aliphatic alcohols on leaf senescence. Plant Physiol 66 : 395-399.
- Solomos T., 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 28 : 279-297.
- Tetley R.M. and K.V. Thimann, 1974. The metabolism of Oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins. Plant Physiol. 54 : 294-303.
- Trippi V.S. and K.V. Thimann, 1983. The exudation of solutes during senescence of Oat leaves. Physiol Plant. 58 : 21-28.
- Trippi V.S. and A. Paulin, 1984. The senescence of cut carnations: A phasic phenomenon. Physiol. Plant. 60 : 221-226.
- Trippi V.S. and G.M. De Luca d'Oro, 1985. The senescence process in Oat leaves and its regulation by oxygen concentration and light irradiance. Plant Cell Physiol. 26 (7) : 1303-1311.
- Trippi V.S., A. Paulin and A. Pradet, 1988. Effect of oxygen concentration on the senescence and energy metabolism of cut carnation flowers. Physiol. Plant. 73 : 374-379.
- Trippi V.S., X. Gidrol and A. Pradet, 1989. Effects of oxidative stress caused by oxygen and hydrogen peroxide on energy metabolism and senescence in Oat leaves. Plant Cell Physiol. 30 (2) : 157-162.
- Woolhouse H.W., 1984. The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. Can. J. Bot. 62 : 2934-2942.