

Efecto de la oxidación de glicina y de sustratos del ciclo de Krebs en la actividad de las vías citocrómica y alternativa de mitocondrias de hojas de *Pisum sativum* L.

J. Azcón-Bieto *

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
08028 Barcelona

(Recibido el 11 de junio de 1985)

J. AZCON-BIETO. *Effect of the Oxidation of Glycine and Krebs Cycle Substrates on the Activity of the Cytochrome and Alternative Pathways in Mitochondria of Pisum sativum L. Leaves.* Rev. esp. Fisiol., 42, 91-98. 1986.

Isolated mitochondria from adult leaves of *Pisum sativum* had the capacity to oxidize simultaneously glycine and several substrates of the Krebs cycle (e.g. malate, succinate, citrate, 2-oxo-glutarate), either in the presence of ADP (state three) or in the absence of ADP (state four). The sensitivity of the mitochondrial respiration to inhibitors of the cytochrome (e.g. antimycin A) and the alternative (e.g. salicyl-hydroxamic acid, SHAM, and tetraethylthiuram disulfide, disulfiram) pathways varied depending on the substrate(s) being used. For instance, the rate of oxygen uptake resistant to antimycin A, which is an estimate of the capacity of the alternative pathway, varied depending on whether glycine was added or not to a medium with malate and succinate. The state four rate of oxygen consumption in the presence of malate or succinate was greatly stimulated by the addition of glycine, and *viceversa*. This stimulation was apparently mediated by the alternative pathway. The results suggest that part of the electron transport capacity (including the alternative pathway) of these mitochondria is specifically associated with glycine oxidation, and therefore with photo-respiration.

Key words: Alternative pathway, Cytochrome pathway, Glycine oxidation, Leaf mitochondria, *Pisum sativum*.

Las mitocondrias de hojas presentan la notable capacidad de transformar dos moléculas de glicina en una de serina y en una de CO₂; esta reacción está cata-

lizada por un complejo multienzimático asociado con la membrana interna mitocondrial (9) y se considera que constituye la principal fuente de CO₂ producido en la fotorrespiración. Otros productos de esta reacción son NH₃ y NADH. No se conoce con certeza cuál es el principal mecanismo de reoxidación de este

* Dirección actual: Cátedra de Fisiología General, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona.

NADH *in vivo* (es necesario que se produzca esta reoxidación para que siga funcionando la fotorrespiración), aunque podría ser que el NADH se reoxidara a través de la cadena respiratoria, asociándose a formación de ATP y consumo de O₂ (9). Sin embargo, los equivalentes reductores del NADH también podrían exportarse al citoplasma a través de sistemas de «lanzadera» (3).

En mitocondrias aisladas, la tasa de oxidación de NADH, tanto si proviene de la oxidación de glicina como de la oxidación de sustratos del ciclo de Krebs, está controlada por la disponibilidad de ADP. Es decir, en presencia de ADP (estado 3) la tasa de consumo de O₂ es más rápida que en ausencia de ADP (estado 4). De forma similar, la oxidación conjunta de ambos tipos de sustratos, como podría ocurrir *in vivo* si el ciclo de Krebs y la fotorrespiración funcionaran simultáneamente, estaría limitada por la disponibilidad de NAD⁺. En vista de la creciente evidencia de que el ciclo de Krebs continúa funcionando en las hojas iluminadas (6), es interesante estudiar los posibles efectos competitivos entre la glicina y los sustratos del ciclo de Krebs por el acceso a la cadena respiratoria.

Las mitocondrias de las plantas, y las hojas no son una excepción, tienen la notable particularidad de poseer, además de la clásica vía citocrómica, una vía adicional de transporte de electrones que no es inhibida por los inhibidores de la vía citocrómica (cianuro, antimicina A) (1, 7, 8). Esta *vía alternativa* resulta inhibida por los ácidos hidroxámicos (por ejemplo, el ácido salicilhidroxámico, SHAM) y por el disulfiram (abreviación de tetractiltiuram disulfuro) (7, 8). La participación de ambas vías en la respiración puede determinarse con el uso de los citados inhibidores (1, 7). La naturaleza química de los componentes de la vía alternativa no ha sido aún determinada, pero se sabe con certeza que esta vía

se ramifica de la cadena de transporte de electrones convencional a nivel de la ubiquinona, que tiene una afinidad menor para el O₂ y que no se asocia a síntesis de ATP; es decir, la energía del transporte de electrones a través de esta vía se disipa como calor (8). La función de la vía alternativa es desconocida en la mayoría de los casos, excepto en los espádice de las aráceas donde funciona como un mecanismo termogénico.

El objetivo principal de este trabajo es el de estudiar las posibles interacciones entre la oxidación de glicina y la de sustratos del ciclo de Krebs en mitocondrias de hojas de guisante, y determinar la importancia de la vía alternativa en este contexto.

Materiales y Métodos

Las plantas de *Pisum sativum* L., variedades Alaska y Massey, se desarrollaron en solución hidropónica durante 4-5 semanas en una cámara de ambiente controlado. La solución nutritiva empleada fue la de Hewitt, una variante de la de Hoagland, cuya composición ha sido descrita anteriormente (7). La densidad de flujo cuántico fotosintético fue aproximadamente 600-700 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. El régimen diario de temperatura fue de 25 °C durante el período de luz (13 h) y de 20 °C durante el período de oscuridad. La humedad relativa osciló entre 60 y 80 %.

Las mitocondrias fueron aisladas mediante un primer paso de homogenización de las hojas adultas con un Polytron (modelo K, Kinematica GmbH, Suiza), y posterior centrifugación diferencial. La tasa de consumo de O₂ fue medida con un electrodo polarográfico de O₂ del tipo Rank (Rank Brothers, Reino Unido). Los detalles de estos procedimientos, así como los métodos empleados en la determinación de clorofilas y proteínas, han sido previamente descritos (1).

Resultados y Discusión

Las mitocondrias aisladas a partir de hojas adultas de dos variedades de guisante oxidaron sustratos del ciclo de Krebs (malato, succinato, citrato, 2-cetoglutarato) y también glicina, importante intermediario de la fotorrespiración, con elevadas tasas de consumo de O₂, en presencia de ADP (estado 3) (tablas I, exp. 1, y II). El sustrato que por separado permitía las tasas más elevadas fue en todos los casos la glicina; el NADH externo también fue oxidado con rapidez

(tabla II). Es destacable el hecho de que mitocondrias aisladas de otras partes de la planta que no contienen clorofila, no tienen la capacidad de oxidar glicina por la cadena respiratoria (5). Estas mitocondrias de hojas presentaron un buen control respiratorio y valores aceptables del cociente ADP/O (leyendas de las tablas y figura).

La oxidación simultánea de dos o más sustratos resultó en tasas de consumo de O₂ superiores a las observadas en presencia de un único sustrato, como también han observado otros autores (2,

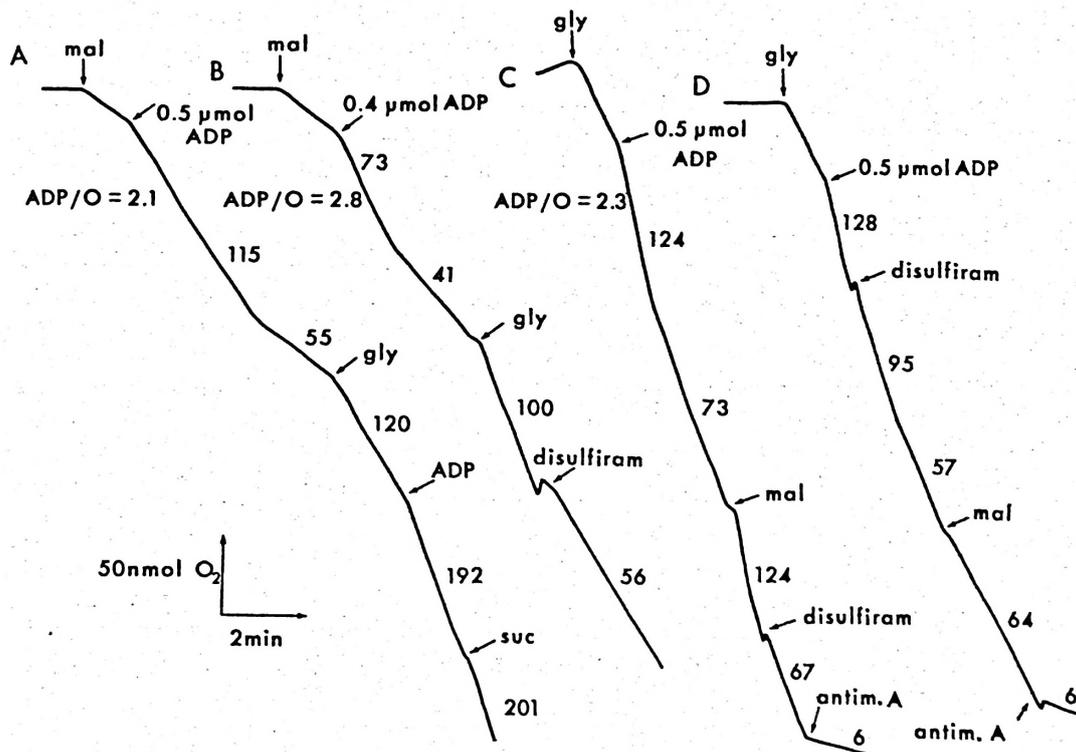


Fig. 1. Oxidación simultánea de malato y glicina en mitocondrias de hojas de guisante en ausencia de ADP (estado 4).

A: variedad Alaska; B, C, D: variedad Massey. C y D son experimentales realizados utilizando la misma preparación de mitocondrias. Las condiciones experimentales han sido descritas en la tabla I. Los números sobre los trazos se refieren a nmol O₂ · min⁻¹ · mg⁻¹ prot. Abreviaturas: mal: malato; suc: succinato; gly: glicina; antim. A: antimicina A; disulfiram: tetractiltiuram disulfuro.

Tabla I. Efecto de la oxidación de diversos sustratos en la tasa de consumo de O_2 ($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} \cdot prot.$) en estado 3 de mitocondrias aisladas a partir de hojas adultas de guisante, variedad Alaska.

Concentración de cada sustrato, 10 mM. Cuando fue usado malato, también se añadieron al medio glutamato (10 mM) y tiamina pirofosfato (0,1 mM). La cantidad inicial de ADP fue 2 μmol . Antimicina A (Ant A) y SHAM fueron usados a 10 μM y 1,5 mM, respectivamente. El valor del control respiratorio, con glicina, fue 1,7. El pH del medio de reacción fue 7,1, y la temperatura de 23°C. Los valores entre paréntesis representan las tasas de consumo de O_2 sensibles, o inhibidas, por SHAM (se verifica que $v_{alt} = V - V_{cyt} - V_{res}$). Los resultados corresponden a dos experimentos distintos y son la media de 2-3 determinaciones. Símbolos: V_{cyt} = actividad vía citocrómica, V_{alt} = capacidad vía alternativa, v_{alt} = actividad vía alternativa, V_{res} = respiración residual.

Sustratos*	Estado 3 (+ ADP)	+ SHAM		+ Ant A	+ SHAM y + Ant A	ρ
	V	$V_{cyt} + V_{res}$	(v_{alt})	$V_{alt} + V_{res}$	V_{res}	v_{alt}/V_{alt}
Experimento 1:						
Mal	116	93	(23)	72	8	0,36
Succ	103	79	(24)	59	2	0,42
Gly	163	118	(45)	63	7	0,80
Mal + Succ	184	—	—	—	—	—
Mal + Succ + Gly	245	179	(66)	121	2	0,55
Experimento 2:						
Mal + 2-cetoglut + Cit	62	—	—	—	—	—
Mal + 2-cetoglut + Cit + Gly	136	—	—	—	—	—

* Mal = malato; Succ = succinato; Gly = glicina; Cit = citrato; 2-cetoglut = 2-cetoglutarato.

3, 11) en mitocondrias de diversos tejidos; este efecto aditivo de los sustratos fue especialmente importante cuando la glicina fue añadida en presencia de malato, succinato, citrato y/o 2-cetoglutarato (tabla I, exps. 1 y 2, y tabla II).

La tasa de consumo de O_2 en estado 3 que resulta inhibida por SHAM (o disulfiram), la cual es una estima de la actividad de la vía alternativa (v_{alt}), fue mayor cuando el sustrato utilizado era la glicina que cuando se oxidaba malato o succinato (tablas I, exp. 1 y II). Cuando eran oxidados simultáneamente malato, succinato y glicina, la tasa de consumo de O_2 inhibida por SHAM o disulfiram fue mayor que con cualquiera de los sustratos individuales; es decir, más electrones circularon a través de la vía alternativa en presencia de varios subs-

tratos, siendo uno de ellos la glicina. La actividad de la vía citocrómica (V_{cyt}), estimada como la tasa de consumo de O_2 resistente al SHAM o al disulfiram, aunque debe tenerse en cuenta la respiración residual —ver más adelante—, también aumentó significativamente cuando glicina fue usada como sustrato, tanto individualmente como en combinación con otros sustratos (tablas I, exp. 1, y II).

La capacidad de la vía alternativa (V_{alt}) se estima mediante la tasa de consumo de O_2 resistente a la antimicina A, un inhibidor de la vía citocrómica a nivel de los citocromos *b*. Sin embargo, cuando existe cierta respiración residual de naturaleza incierta — V_{res} ; resistente al efecto conjunto de la antimicina A y el SHAM o disulfiram (tablas I y II), ésta

debe deducirse de la tasa de consumo de O_2 resistente a la antimicina A para el cálculo preciso de V_{alt} , lo mismo debe hacerse para el cálculo de V_{cyt} . En general, V_{res} fue muy reducida, aunque ligeramente superior en la variedad Massey (tablas I, exp. 1, y II). La tasa de consumo de O_2 resistente a la antimicina A fue similar cuando fueron oxidados por separado por mitocondrias de dos variedades de guisante, malato, succinato y glicina; la oxidación simultánea de malato y succinato prácticamente no afectó la tasa de consumo de O_2 resistente a la antimicina A observada en presencia de uno sólo de los dos substratos (tabla II). Sin embargo, la adición posterior de glicina estimuló considerablemente esta tasa (tablas I, exp. 1, y II). Resultados similares se obtuvieron con mitocondrias de hojas de trigo y de espinaca (resultados no publicados).

El grado de expresión de la vía alternativa en mitocondrias de hojas de guisante fue estimado por el cociente entre V_{alt} y V_{alt} (parámetro ρ), es decir, por el cociente entre la actividad y la capacidad de la vía alternativa. Se encontró

que ρ fue significativamente mayor cuando la glicina era usada como sustrato, tanto individualmente como en combinación con malato y succinato (tablas I, exp. 1, y II). De hecho, con glicina la vía alternativa se expresaba casi totalmente, especialmente en la variedad Massey.

En un tipo de experimento diferente, el consumo de O_2 con malato (fig. 1 A) y succinato (no se muestra) en ausencia de ADP (estado 4) fue también estimulado substancialmente por la adición de glicina; sin embargo, la tasa estimulada fue muy sensible al disulfiram (fig. 1 B). El estado 4 del consumo de O_2 con glicina fue también estimulado por la adición de malato (o succinato), pero de nuevo el incremento fue sensible al disulfiram (fig. 1 C). Tal como podía esperarse, la adición de malato no tuvo prácticamente ningún efecto en la tasa de consumo de O_2 en estado 4 con glicina cuando disulfiram fue añadido previamente al malato (fig. 1 D). Los efectos del disulfiram sugieren que la estimulación del consumo de O_2 en ausencia de ADP por adición de un segundo sub-

Tabla II. Efecto de la antimicina A ($6 \mu M$) y el disulfiram ($150 \mu M$) en la tasa de consumo de O_2 ($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} prot.$) de mitocondrias de hojas de guisante, variedad Massey, adultas, de 4 semanas de edad.

El valor del cociente respiratorio (con glicina) fue 1,7. El resto de detalles son los mismos que en la tabla I.

Substratos*	Estado 3 V	+ disulfiram** $V_{cyt} + V_{res}$	(V_{alt})	+ Ant A $V_{alt} + V_{res}$	+ disulfiram y + Ant A V_{res}	ρ V_{alt}/V_{alt}
Gly	171	131	(40)	47	7	1
Mal	95	78	(17)	55	11	0,40
NADH 1 mM	169	144	(25)	37	12	1
Mal + Succ	122	102	(20)	55	11	0,45
Mal + Succ + Gly	205	141	(64)	77	11	1
Mal + Succ + NADH	189	—	—	—	—	—
Mal + Succ + NADH + Gly	222	—	—	70	17	—

* Gly = glicina; Mal = malato; Succ = succinato. ** Los mismos resultados fueron obtenidos usando SHAM.

trato fue debida a la participación de vía alternativa adicional de transporte de electrones.

El análisis conjunto de los resultados indica que las mitocondrias de hojas de guisante pueden oxidar simultáneamente glicina y sustratos del ciclo de Krebs a través de la cadena respiratoria, en presencia (en estado 3) o en ausencia de ADP (en estado 4). Sin embargo, el hecho de que la tasa de consumo de O₂ en estado 3 resultante en presencia de varios sustratos sea algo inferior a la suma de las tasas observadas con los sustratos individuales (tablas I y II), sugiere que puede existir saturación de la cadena respiratoria y, por tanto, existe un cierto grado de competición entre los distintos sustratos por el acceso a la cadena de transporte de electrones. Diversos autores han estudiado más a fondo esta competición, y han observado que la tasa de oxidación de glicina no resulta inhibida cuando se añade a la suspensión de mitocondrias malato u otros sustratos del ciclo de Krebs. Por el contrario, la oxidación de malato en estado 3 se inhibe ligeramente cuando se añade glicina en el medio (3, 4, 10). Estas observaciones sugieren, en conjunto, que las mitocondrias de las hojas oxidan preferencialmente la glicina en presencia de diversos sustratos.

Posibles mecanismos para evitar, en parte, la competición entre los sustratos del ciclo de Krebs y de la fotorrespiración (glicina), pueden incluir vías de transporte de electrones independientes, tanto vías citocrómicas como alternativas, para ambos tipos de sustratos. Los presentes resultados no permiten saber si esta citada compartimentación de la oxidación de glicina y de sustratos del ciclo de Krebs tiene lugar en una misma clase de mitocondrias, o en dos distintas poblaciones, una de ellas implicada principalmente en fotorrespiración, y la otra más estrechamente asociada con el ciclo de Krebs. Lo que sí parece claro es que

en las mitocondrias de hojas de guisante existe una fracción adicional de la cadena respiratoria, incluyendo la vía alternativa, accesible únicamente a la glicina, es decir, al metabolismo fotorrespiratorio, pero no a los sustratos del ciclo de Krebs.

Agradecimientos

Agradezco a la «Australian National University, Canberra», y a la «Fundación Juan March» la ayuda económica recibida.

Resumen

Mitocondrias aisladas a partir de hojas adultas de *Pisum sativum* presentan la capacidad de oxidar simultáneamente glicina y diversos sustratos del ciclo de Krebs (malato, succinato, citrato, 2-cetoglutarato), tanto en presencia de ADP (estado 3) como en su ausencia (estado 4). La sensibilidad de la respiración de las mitocondrias aisladas a inhibidores de las vías citocrómica (antimicina A) y alternativa (ácido salicilhidroxámico, tetraetiluram disulfuro) es distinta, dependiendo de si los sustratos usados son la glicina o intermediarios del ciclo de Krebs. Así, la tasa de consumo de O₂ resistente a la antimicina A, la cual es una estima de la capacidad de la vía alternativa, varía dependiendo de si se añade o no glicina a un medio con malato y succinato. La tasa de consumo de O₂ en estado 4 en presencia de malato o succinato es fuertemente estimulada por la adición de glicina y viceversa, aparentemente por mediación de la vía alternativa. Los resultados sugieren en conjunto que existe una parte de la capacidad de transporte de electrones de estas mitocondrias, incluyendo la vía alternativa, que está específicamente asociada con la oxidación de glicina, y por tanto, con la fotorrespiración.

Bibliografía

1. Azcón-Bieto, J., Lambers, H. y Day, D. A.: *Aust. J. Plant Physiol.*, **10**, 237-245, 1983.
2. Day, D. A. y Wiskich, J. T.: *Phytochemistry*, **16**, 1499-1502, 1977.
3. Day, D. A. y Wiskich, J. T.: *Plant Physiol.*, **68**, 425-429, 1981.

4. Dry, I. B., Day, D. A. y Wiskich, J. T.: *FEBS Lett.*, **158**, 154-158, 1983.
5. Gardstrom, P., Bergman, A. y Ericson, I.: *Plant Physiol.*, **65**, 389-391, 1980.
6. Graham, D.: *The Biochemistry of Plants* (Davies, D. D., ed.), Academic Press, Nueva York, 1980, Vol. 2, pp. 525-579.
7. Lambers, H., Day, D. A. y Azcón-Bieto, J.: *Physiol. Plant.*, **58**, 148-154, 1983.
8. Laties, G. G.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 519-555, 1982.
9. Moore, A. L., Jackson, C., Haliwell, B., Dench, J. E. y Hall, D. O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 483-491, 1977.
10. Walker, G. H., Oliver, D. J. y Sarojini, G.: *Plant Physiol.*, **70**, 1465-1469, 1982.
11. Wiskich, J. T. y Day, D. A.: *Plant Physiol.*, **70**, 959-964, 1982.

