

Variaciones de la glutamato descarboxilasa en semillas de *Lupinus albus* durante la germinación

M. J. Sendino, M. Cascales y A. Santos-Ruiz

Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Madrid

(Recibido el 4 de agosto de 1969)

M. J. SENDINO, M. CASCALES and A. SANTOS-RUIZ, *Variations In the Glutamate Decarboxylase Activity of the Lupinus albus Seeds During Germination*. R. esp. Fisiol., 26, 31-36, 1970.

Changes on glutamate decarboxylase activity on germinating *Lupinus albus* seeds have been investigated. The variations found along the first nine days. Enzymic activity in the 3th day was twice higher than the initial values and afterwards this activity decreased to very low values on 5th to 6th days. The results presented in embryo and cotyledons demonstrate the important role of this enzyme on glutamic acid metabolic pathways, not only because the remarkable proportions of this enzyme in the dry seed but also in the growing plant. Potassium nitrate and phosphate increased the observed changes.

El metabolismo nitrogenado es muy activo en semillas en germinación y se caracteriza principalmente por un intenso *turnover* de proteínas. Se sintetizan proteínas nuevas a partir de los compuestos nitrogenados solubles, que se encuentran en la célula procedentes de la degradación de proteínas ya existentes en la semilla seca como material de reserva. Los cambios metabólicos que tienen lugar en procesos previos a la germinación han sido ampliamente estudiados en nuestro Laboratorio, en semillas de pino durante la estratificación por frío, por GIMÉNEZ-SOLVES *et al.* y SANZ-MUÑOZ *et al.* (8). Las proteínas de reserva que se encuentran en la semilla seca, son primeramente activadas, según GHETIE (1), por acción de proteinasas, y una vez activadas pueden ser posteriormente atacadas y desdobladas en

péptidos y aminoácidos. MARCUS y FEELEY (5) han estudiado cinéticamente la capacidad de síntesis proteica de embriones posterior a la imbibición y han observado que el incremento de tal síntesis va acompañado de un aumento de polisomas. Estos experimentos demuestran una vez más la estrecha relación existente entre la cantidad de RNA en las partículas microsomales y la capacidad de sintetizar proteínas (7). La presencia de la glutamato descarboxilasa (L-glutamato-1-carboxilasa E.C. 4.1.1.15) en plantas superiores, especialmente en semillas, donde se encuentra ampliamente difundida, y de donde, a partir de las de *Lupinus albus*, fue purificada en nuestro Laboratorio por MAYOR (6), nos ha llevado a investigar sobre la actividad enzimática de la descarboxilasa glutámica en semillas de *Lupinus albus* a lo

largo del proceso germinativo producido en diversas condiciones. Por otra parte, se han hecho ensayos de tal actividad enzimática en las diferentes partes de la semilla: embrión y cotiledones, y en semillas germinadas en presencia de luz (durante 10 horas diarias) o en total oscuridad.

Material y métodos

Los reactivos empleados han sido principalmente de las marcas Analema, Probus y Panreac. El ácido glutámico fue suministrado por la firma comercial Light y el piridoxal-5-fosfato por Roche.

Las semillas se dispusieron para su germinación sobre vermiculita humedecida, en recipientes de poco fondo y cubiertas de tal forma que, sin estar privadas del aire, se redujese al máximo la evaporación de la humedad, evitando así que las semillas pudiesen quedar secas. Cada día se regaron las semillas con ayuda de una pipeta, con una cantidad equivalente de agua. En algunos casos la solución de riego fue de nitrato potásico o fosfato potásico 0,1 M. A tiempo cero y cada día se tomaron muestras donde se ensayó la actividad enzimática. Las muestras de un número determinado de semillas, una vez pesadas, se trituraron en mortero, usando arena fina para obtener una mejor disgregación de los tejidos y células, con adición de tampón fosfato potásico 0,2 M pH 5,7. El extracto así obtenido se centrifugó durante 20 minutos a 6.000 y a 0°. En el sobrenadante se midieron la actividad enzimática, siguiendo el método manométrico, y las proteínas solubles según la técnica de LOWRY *et al.* (4).

La determinación manométrica de la actividad se llevó a cabo en un aparato de Warburg S-85-G Braun Melsungen, con controles de temperatura y agitación (en amplitud y frecuencia). El homogenado obtenido fue adicionado de glutamato potásico pH 5,7 (30 μ moles), piridoxal-5-fosfato, coenzima de la reacción (0,4 μ moles)

y tampón fosfato potásico pH 5,7 (400 μ moles), en un volumen final de 4 ml. El glutamato, sustrato de la reacción, se colocó en la rama lateral del vaso de reacción, y una vez equilibrada la temperatura, por incubación del baño termostático a 37° durante 10 minutos con una leve agitación, se mezcló con el resto de los componentes de la reacción. A partir de este momento, considerado como tiempo cero, se hicieron lecturas cada dos minutos. La actividad enzimática se expresó por los μ litros de CO₂ desprendidos en diez minutos. La actividad específica se calculó como la actividad enzimática por miligramo de proteína.

Resultados

En tres series diferentes de ensayos se dispusieron para la germinación semillas de *Lupinus albus*, que fueron regadas, respectivamente, con agua y soluciones de nitrato potásico y de fosfato potásico ambas 0,1 M. En cada una de las series, y a los tiempos señalados, se midieron las actividades enzimáticas de la forma señalada anteriormente. En la tabla I se expresan los valores obtenidos por cálculo de la actividad específica de la glutamato descarboxilasa en las semillas en germinación en cada una de las series.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos de los valores de esta actividad enzimática en la semilla total y en sus diferentes partes: embrión y cotiledones. Las semillas se dispusieron para germinar de la forma ya descrita y se regaron con agua. Cada día se tomó un número de semillas en las que se separaron el embrión y los cotiledones. Con uno y otros por separado, se prepararon extractos, respectivamente, siguiendo el método utilizado en el caso de las semillas completas. Un tercer extracto se preparó en este experimento, con semillas totales como control de ensayo.

En ella se indican los valores obtenidos en los dos lotes de semillas ensayados, uno

Tabla I. Efecto del nitrato potásico y del fosfato potásico sobre las variaciones de la glutamato descarboxilasa en semillas de *Lupinus albus* durante la germinación.

Las semillas fueron regadas, respectivamente, con agua, solución 0,1 M de nitrato potásico y solución 0,1 M de fosfato potásico, en las tres series que se presentan, e iluminadas durante 10 horas diarias. A tiempo 0 y cada día se tomaron 8 semillas, que se trituraron en 30 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 5,7. El homogenado obtenido por centrifugación y eliminación del precipitado del extracto anterior, en cantidad de 1 ml, fue adicionado de glutamato sódico pH 5,7 (30 μ moles), piridoxal-5-fosfato (0,4 μ moles) y tampón fosfato pH 5,7 (400 μ moles), hasta un volumen final de 4 ml. La medida de la actividad se llevó a cabo en un aparato de Warburg a 37°, por valoración del CO₂ desprendido en 10 minutos. Las actividades específicas fueron calculadas según los μ l de CO₂ desprendidos por mg de proteína. Las proteínas se calcularon por el método de LOWRY *et al.* (4).

Tiempo días	Actividad específica		
	Agua	Nitrato potásico	Fosfato potásico
0	13,5	13,5	13,5
1	14	17	17
2	25	27	32
3	24	28	31
4	11	13,5	12
5	8	6	6
6	8,5	4	-
7	-	-	-
8	10	-	9
9	12	10	15

germinado en presencia de luz (durante 10 horas diarias), mientras que en el otro las semillas fueron dispuestas para la germinación en oscuridad total. De esta forma se ha intentado ver si la presencia o ausencia de luz puede afectar de alguna forma la actividad enzimática estudiada.

Discusión

Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental que presentamos — con las variaciones de la actividad enzimática de la glutamato descarboxilasa y que pueden referirse a las de la cantidad de esta proteína enzimática específica — deben estar estrechamente relacionados con la presencia de ácidos nucleicos y de aminoácidos libres a los cuales se supe- dita la biosíntesis proteica.

En la tabla I, donde aparecen los valores obtenidos de la actividad enzimática, se demuestra cómo la actividad glutamato descarboxilante experimenta variaciones muy notables a lo largo del proceso germinativo. Durante los nueve primeros días de germinación, esta actividad experimenta un incremento muy marcado, que empezando desde el primer día, después de la imbibición de la semilla, tiene su máximo hacia el segundo y tercer días, para descender bruscamente a partir de aquí, y presentar un mínimo alrededor del quinto día, justamente en el momento en el que la germinación comienza a hacerse visible. A partir del quinto día se registra una elevación débil y paulatina de la actividad, que se mantiene al noveno día. El incremento inicial de actividad enzimática parece realizarse simultáneamente al proceso de imbibición, el cual trae consigo una activación de los enzimas hidrolíticos que se encuentran en la semilla seca al estado de *rest* por falta de agua. Por lo tanto, una vez que estas hidrolasas empiezan a actuar sobre la fracción proteica de reserva de la semilla, pueden originar la hidrólisis de una proteína preenzimática, dando lugar a la enzima activa. Este momento coincidiría con el máximo de actividad encontrado al segundo y tercer días, donde a la actividad encontrada en la semilla seca se sumaría la procedente de la hidrólisis del preenzima. A partir de este momento nuevas hidrolasas pueden continuar en su proceso demoleedor y atacar a la propia proteína enzimática que estu-

Tabla II. Variaciones de la glutamato descarboxilasa en las diferentes partes de la semilla de *Lupinus albus* durante la germinación.

Las condiciones de experimentación fueron las mismas que las descritas en la tabla I, exceptuando en el caso de las distintas partes de la semilla, donde fue necesaria la separación de cada una de ellas: embrión y cotiledones, cada día, después de haber dispuesto la semilla completa en las condiciones ya citadas de germinación y regándolas con agua. Un grupo de semillas fue sometido a 10 horas diarias de iluminación, durante la experiencia, y el otro se mantuvo en completa oscuridad. La actividad específica fue calculada según los μl de CO_2 desprendidos en cada ensayo, por miligramo de proteína

Tiempo días	A c t i v i d a d e s p e c í f i c a					
	O s c u r i d a d			I l u m i n a c i ó n		
	Embrión	Cotiledón	Semilla	Embrión	Cotiledón	Semilla
0	50	46	46	50,0	40	44,5
1	35	54	55	37,0	42	43,5
2	5	38	48	23,0	49	50,0
3	0	32	41	3,5	35	30,0
4	5	25	21	11,0	17	25,0
5	17	26	28	20,0	13	11,0
6	21	30	29	26,0	9	9,0
7	-	-	-	-	-	-
8	27	-	23	20,5	13	13,0
9	-	-	-	23,0	11	12,0
10	30	19	19	29,0	15	14,0

diamos, originando en su destrucción aminoácidos libres y energía necesarios para la nueva planta. Experimentos simultáneos (3) demuestran cómo la fracción de aminoácidos libres se encuentra muy incrementada en este quinto día, en el cual, como ya anteriormente se indicó, se inicia la germinación en forma visible. La nueva actividad enzimática encontrada en días sucesivos debe ser consecuencia del proceso de una síntesis *de novo* de las proteínas que han de formar la nueva planta, y las cuales serán formadas a partir de la energía liberada en los procesos hidrolíticos en general de todas las sustancias de reserva de la semilla y de los aminoácidos liberados en la degradación de las proteínas viejas. Esta síntesis *de novo* de las proteínas de la nueva planta parece afec-

tar a la proteína responsable de la actividad enzimática que estudiamos, la glutamato descarboxilasa, pues el momento de mínima actividad y el incremento registrado en posteriores días coincide con un metabolismo muy activo en la fracción de aminoácidos libres.

En la tabla II se expresan los valores de la glutamato descarboxilasa en las diferentes partes de la semilla, durante el proceso de la germinación de semillas iluminadas durante 10 horas diarias, y en semillas en ausencia total de luz. La diferencia de actividad enzimática en uno y otro caso es apenas perceptible, si acaso los procesos hidrolíticos iniciales que se registran en el embrión son más rápidos cuando las semillas se dispusieron para germinar en oscuridad total. El hecho de que la glutamato

descarboxilasa no resulte afectada por la presencia o ausencia de luz quizás pueda explicarse teniendo en cuenta que esta enzima se encuentra particularmente difundida en tejidos y órganos como semillas y tubérculos (en el caso de vegetales) y en cerebro (en animales), donde los procesos bioquímicos se verifican en ausencia de luz.

Las distintas partes de la semilla, embrión y cotiledones se comportan de forma totalmente distinta al analizar en cada uno de ellos por separado la actividad enzimática objeto de nuestro estudio. Es posible observar (tabla II) cómo en el embrión la actividad enzimática experimenta una caída tan brusca que prácticamente se anula al tercer día. En días posteriores esta actividad aumenta, presentando al sexto día un valor medio. En los cotiledones, en cambio, la actividad sube, presentando su máximo al tercer día y un mínimo hacia el quinto y sexto. Es posible observar, según estos resultados, cómo los procesos hidrolíticos en el embrión son muy intensos y destruyen rápidamente las viejas proteínas de reserva, en este caso la enzima responsable de la descarboxilación del ácido glutámico, la cual, a partir de entonces, se sintetizaría *de novo* como proteína originaria de la nueva planta. En los cotiledones la acción hidrolítica destructiva está retrasada. Parece ser como si los tejidos del cotiledón estuvieran a la espera de que el embrión quemara su propia reserva para suministrar entonces a la nueva planta y en el momento oportuno, todo lo necesario para su crecimiento y desarrollo.

Nuestros resultados parecen demostrar que la semilla cuenta inicialmente con una cantidad de enzima glutamato descarboxilante y otra de preenzima. La preenzima podría ser hidrolizada y originar enzima libre, que sumado al nivel inicial enzimático, produciría el mayor aumento observado en las semillas regadas con nitrato y fosfato potásicos, será debido a que estos iones activan de alguna manera, bien a la

glutamato descarboxilasa o bien a las hidrolasas que la producen a partir de la preenzima, ya que los máximos y mínimos de esta actividad enzimática coinciden exactamente en las tres series ensayadas. La caída de la actividad observada el quinto día puede ser originada por una completa hidrólisis proteica, puesto que este momento coincide con un marcado incremento en la fracción de aminoácidos libres. Determinaciones ulteriores señalan cómo a partir del quinto día la actividad descarboxilante va haciéndose más ostensible en el embrión, mientras que en los cotiledones se registran valores mínimos. Posiblemente la causa reside en una síntesis en el embrión de la proteína enzimática específica, durante el proceso de biosíntesis proteica necesario para el desarrollo de la nueva planta, que se inicia hacia el quinto día del proceso germinativo y a partir de los aminoácidos libres que han sido transportados desde los cotiledones.

La síntesis de nuevas proteínas está supeditada a la presencia de ácidos nucleicos, DNA y RNA y se ha demostrado que ambos se incrementan durante la germinación. La elevación del DNA se debe a la reduplicación celular. El metabolismo del RNA es muy intenso y va acompañado de un aumento de la actividad RNásica. Este RNA se sintetiza nuevamente, a medida que la reduplicación celular tiene lugar, y origina la síntesis de nuevas proteínas en la planta en desarrollo. Diversos autores han demostrado que los cotiledones de semillas maduras contienen una considerable cantidad de RNA, que se acumula como reserva durante la maduración de la semilla. Con el comienzo de la germinación, el nivel de este RNA disminuye a causa de una degradación rápida, la cual es contrarrestada por un marcado incremento en RNA en el axis de la semilla en crecimiento, durante los tres primeros días. Estos hechos hacen suponer la existencia de una rápida emigración del RNA desde los tejidos senescentes del cotiledón a los más jóvenes del embrión,

donde a partir de él se inicia la síntesis de nuevas proteínas.

Nuestros ensayos sobre la diferente actividad de la glutamato descarboxilasa en el embrión y en los cotiledones están de acuerdo con el hecho de que ambas partes de la semilla se comportan de forma distinta, ya que existe un transporte activo de sustancias desde los cotiledones, cuya única misión consiste en nutrir al embrión en neoformación.

Resumen

La actividad de la glutamato descarboxilasa ha sido investigada en semillas de *Lupinus albus* durante los primeros estadios del proceso germinativo. Las variaciones encontradas a lo largo de los nueve primeros días indican que esta proteína enzimática sufre cambios metabólicos muy intensos que hacen que la actividad inicial se incremente más de dos veces al tercer día y luego disminuya a valores casi insignificantes hacia el quinto y sexto días. Las diferencias halladas en las actividades correspondientes al embrión y cotiledones ponen de manifiesto que esta enzima juega un papel de im-

portancia en el metabolismo, primeramente en la semilla seca y posteriormente en la planta en desarrollo. El nitrato y fosfato potásicos activan o incrementan directa o indirectamente esta acción enzimática.

Bibliografía

1. GHETIE, V.: *Rev. Rom. Biochim.*, **3**, 353, 1966.
2. GIMÉNEZ-SOLVES, A., GONZÁLEZ, P. y SANZ-MUÑOZ, M.: *Actas VIII Jorn. Bioquím. Latinas*, p. LXXX, n.º 131. Lisboa, 1965.
3. GONZÁLEZ, P., CASCALES, M. y SANTOS-RUIZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 37, 1970.
4. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
5. MARCUS, A., FEELY, J. y VOLCANI, T.: *Plant. Physiol.*, **41**, 1167, 1966.
6. MAYOR, F.: *Anal. Real Acad. Farm.*, **25**, 219, 1959.
7. OOTA, Y. y OSAWA, S.: *Biochem. Biophys. Acta*, **15**, 163, 1954.
8. SANZ-MUÑOZ, M., GONZÁLEZ, P., GIMÉNEZ-SOLVES, A. y SANTOS-RUIZ, A.: *Proc. XII Intern. Congress of Refrigeration*, **3**, 1049, 1969.