

Rb⁺ and following inhibition by MAO places the animals in a state of confusion or desorientation increasing the excitability without aggressivity and, in spite of the toxic participation of Rb⁺, they do not die during the following days.

The Actograph «Tedeschi type» in spite of its simplicity, lets establish one parameter from the five animals at the same time, which gives a statistical value to the experiment. Rubidium shows with an interesting projection on behavior.

The Animex equipment registers the activity of the whole group without any discrimination of the kind of movement. This can be one of the cause, why there is no a significative response on the speculation of the biological effect of rubidium.

Acknowledgement: We thank Prof. Dr. J. del Río, Centro de Química Terapéutica, C. S. I. C., Madrid, the facilities and discussions we had in the realization of this work.

BIBLIOGRAPHY

- (1) MELTZER, H. L., TAYLOR, R. M., PLATMAN, S. R. and FIEVE, R. R.: «Nature», 223, 321-322 (1969).
- (2) STOLK, J. M., NOWACK, W. J., BARCHAS, J. D. and PLATMAN, S. R. «Science», 168, 501-503 (1970).
- (3) PÉREZ-CRUET, J., TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P. and GESSA, G. L.: «Life Sciences», 11, 31-39 (1972).
- (4) BRADY, J. V. and NAUTA, W. J. H.: «J. Com. Physiol.», 46, 339-346 (1953).
- (5) EICHELMAN, B. S., THOA, N. B. and PÉREZ-CRUET, J.: «Fed. Proc.», 31, 289, Abstr. (1972).
- (6) CARROLL, B. J. and SHARP, P. T.: «Science», 172, 1355-1357 (1971).
- (7) GRAHAME-SMITH, D. G.: «J. Neurochem», 18, 1053-1066 (1971).
- (8) MATÉ, C., BETES, M., RIBAS, B. and SANTOS-RUIZ, A.: «An. Real Acad. Farm.», vol. XLIV (4), 537-543 (1978).
- (9) GORIDIS, C. and NEFF, N. H.: «J. Neurochem», 18, 1673-1682 (1971).

Acido δ -amino levulínico y actividad δ -ALADehidrasa en semillas de *Pinus pinea*

por

M. MENDEZ MARCO y M. SANZ MUÑOZ

Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense Ciudad Universitaria, Madrid

Premio IBYS

SUMMARY

In embryos and endosperms from non-stratified and stratified *Pinus pinea* seeds δ aminolevulinic acid (δ -ALA) was not synthesized, but it began to be synthesized at beginning of germination and reached its highest level in stratified seeds subjected to germination at 29° C, but before their protrusion. Once the development of seedling and concomitantly the radicle started the δ -ALA decreased significantly. When during the development of seedling the radicle reaches lengths longer than 4 cm and the reserve materials have been exhausted, biosynthesis of δ -ALA disappears entirely.

Enzymatic activity of δ -ALADehidrase has been shown in seedlings from broken seeds, previously stratified and subjected later to germination; but its highest intensity was reached in embryos and endosperms from stratified seeds and verified after the protrusion; when later the seedling increased in size and concomitantly the length of radicle, this activity decreased until it disappeared entirely due to exhaustion of the reserve material of endosperm.

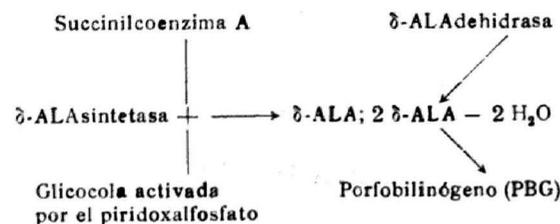
Due to competitive inhibition of δ -ALADehidrase activity, levulinic acid caused an increase of δ -ALA level, which corroborates the occurrence of such enzymatic activity.

INTRODUCCIÓN

En la semilla de *Pinus pinea* durante el curso de la germinación se biosintetiza clorofila porque los embriones actúan como verdaderos aparatos fotosintéticos. La biosíntesis de la clorofila transcurre con arreglo a dos grandes fases; la primera en que se forman diversos compuestos que se originan por reacciones enzimáticas en cadena hasta la biogénesis de protoporfirina IX y la segunda en la que los pasos intermediarios que se producen también por vía enzimática conducen a la formación de la clorofila a partir de la protoporfirina IX (Vernon, 1966).

En este trabajo se pretende establecer en diversos estadios de ger-

minación de la semilla de *Pinus pinea* la presencia de ácido δ -aminolevulínico o δ -ALA; la actividad δ -ALAdehidrásica ejercida por la enzima δ -aminolevulínico dehidrasa sobre el δ -ALA para la formación de porfobilinógeno y la de este compuesto monopirrólico denominado abreviadamente PBG. Las reacciones transcurren con arreglo al siguiente esquema y que se han demostrado ocurren en plantas inferiores, como algas *Chlorella* (Beale, 1971) y bacterias fotosintéticas:



No obstante, en plantas superiores se ha demostrado recientemente la presencia de δ -ALA (Beale y Castelfranco, 1975) (Beale y col., 1975) (Wellburn, 1975) y que puede éste formarse por otras vías metabólicas que la citada, nosotros también pensamos contribuir a su esclarecimiento.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Material y métodos

Como material de partida se utilizó semillas de *Pinus pinea* procedentes de Coca (Segovia), con una capacidad germinativa del 95 por 100.

La estratificación se efectuó colocando las semillas en capas alternantes sobre vermiculita humedecida con agua a 4° C. Las determinaciones en semilla estratificadas se realizaron en semillas sometidas a este proceso durante diversos períodos de tiempo. Para la germinación se usaron semillas completas, es decir con cubierta (epispermo), colocadas en una cámara de germinación Jacobsen a 28-29° C. Las determinaciones se practicaron en semillas, que después de estratificar se pusieron a germinar, o germinadas, considerando su grado de germinación por la longitud de radícula de la plántula.

En todos los experimentos y determinaciones analíticas se operó con semillas privadas de cubierta o epispermo (es decir testa y endopleura).

Para las medidas espectrofotométricas se ha utilizado un espectrofotómetro Beckman modelo DU.

Para las centrifugaciones unas veces se usó una centrífuga Serval Superspeed Centrifuge 33-SS. Automatic, instalada en un cámara refrigerada.

1.1. Determinación del ácido δ -aminolevulínico

Se ha adaptado el método de Mauzerall y Granick y se le ha acoplado a las características del piñón, que es una semilla oleaginosa.

La extracción del δ -ALA se basa en la que verifica Beale y col. (1975), y se realiza a baja temperatura. Después de obtenido el extracto se separan el δ -ALA y el PBG, pasando el líquido de extracción por una columna que contenga Dowex 2-2 \times 8 (200-400 mallas); el PBG queda retenido y el líquido que pasa por la columna y arrastra el δ -ALA se pasa a continuación por otra columna que contiene Dowex 50 W, 200-400. El δ -ALA retenido en esta segunda columna se eluye con acetato amónico 1 M, se lleva a un volumen exacto y determina espectralmente en una parte alícuota según el método de Mauzerall y Granick.

Con diferentes cantidades de patrón δ -ALA y empleando el método anterior se trazó una curva patrón y se comprobó que seguía la ley de Beer.

Por otra parte empleando δ -ALA muy puro a una concentración de $1 \text{mg}/20 \text{ml} = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ se determinó la curva de absorción de la reacción que da el δ -ALA con los reactivos utilizados por Mauzerall y Granick y resultó correcta con un máximo de absorción en 553 nm.

En las determinaciones cuantitativas utilizamos como comparación en cada problema la medida espectrofotométrica resultante de hacer la reacción de Mauzerall-Granick con una cantidad exactamente conocida de δ -ALA.

Para comprobar la bondad del método, se hicieron pruebas de recuperación de δ -ALA con embriones y endospermo de piñones sin estratificar en los cuales es segura la ausencia de δ -ALA. Para los embriones, de 500 μg de δ -ALA adicionado en el momento inicial de la trituración, se recuperó el 103,2 por 100. Error + 3,2 por 100. Y en endospermos de 100 μg adicionados, un 93,7 por 100. Error - 6,3 por 100.

1.2. Determinación de la actividad δ -ALAdehidrásica

Está basada en la actividad de la δ -ALAdehidrasa en condiciones apropiadas de reacción sobre el δ -ALA como sustrato para formar PBG a partir de dos moléculas de aquel compuesto con separación de dos moles de agua. El PBG formado se puede identificar y

determinar cuantitativamente por el color rojo violáceo que da con el reactivo de Ehrlich midiendo su absorción a 553 nm. Después, los cálculos para determinar el PBG se realizaron como en orinas aplicando la fórmula $D_{553} \times 12,6$ (en «Porphyrines et Pophyries Biochimie et Clinique». A. Gajdos y M. Gajdos. T. Masson, Paris, 1969), que da la concentración de PBG en mg por 100 ml de orina.

Antes de realizar las determinaciones espectrofotométricas para la determinación del PBG formado hay que efectuar las extracciones (de embriones o endospermos) las reacciones enzimáticas y el paso por columna.

La extracción se realiza a baja temperatura entre 0 y 4° C triturando con arena y empleando como medio de extracción sorbitol 0,33 M, que por cada 100 ml contiene 200 mM de Hepes a pH 7,8, 25 mM de Cl_2Mg y 0,1 por 100 de isoascorbato sódico. Después se realizan sucesivas operaciones seguidas de decantaciones y extracciones de los residuos. Los líquidos de decantación se filtran por gasa o por papel de filtro de filtrar jarabes y los residuos recogidos en el filtro se exprimen bien y por último, los líquidos de filtración se aforan en un matraz de volumen conocido (25 ml). En 15 ml se determina la actividad enzimática de δ -ALAdhidrasa tomando como sustrato δ -ALA (1 mg en 1 ml de agua) que se le adiciona y el posible que pueda contener; con otros 5 ml se determina la actividad enzimática sobre el δ -ALA propio del problema y que puede servir simultáneamente de blanco. Los 5 ml restantes se utilizan para determinar proteínas según Lowry (1951).

Las reacciones enzimáticas se practicaron realizando las incubaciones a 37° C durante treinta minutos. Al término de este tiempo se paran las reacciones con ácido tricloracético al 5 por 100; se centrifugan los líquidos en centrifuga refrigerada durante veinte minutos a 15.000 r/m, se decanta y filtra por papel húmedo para eliminar la grasa que pueda haber; se reextraen los residuos de centrifugación y reúnen los respectivos sobrenadantes en sendos matraces aforados de 25 ml y después de ajustar el pH a 4,7 se enrasan a este volumen y por último se practica el paso por sendas columnas preparadas con Dowex 2; 2 x 8 (200-800) con lechos de una longitud de 3 cm a flujo de 3 ml por diez minutos. Después de lavadas con agua destilada se eluye cada columna con 2 ml de ácido acético 1 M y dos veces sucesivas con 2 ml de ácido acético 0,2 M y los líquidos de elución se llevan a 10 ml. Por último en los eluatos después de agregar reactivo de Ehrlich se realiza la medida espectrofotométrica.

RESULTADOS

2. Cualitativos

2.1. Identificación del δ -ALA

Se pudo confirmar la presencia de δ -ALA por el color rojo clavel que dan los líquidos finales (de la extracción y purificación por paso por columna de Dowex 50 y elución subsiguiente) con la reacción de Mauzerall y Granick. En los productos finales de determinaciones correspondientes a diversos estadios de germinación se determinaron las curvas de absorción de los productos coloreados confirmando el pico de máxima absorción entre 550 y 555 nm.

2.2. Identificación del PBG resultante de la actividad δ -ALAdehidrásica sobre el δ -ALA

La identificación es un medio indirecto de comprobar si hay actividad enzimática de δ -ALAdhidrasa. El PBG queda identificado en diversos estadios de la germinación no sólo por el color rojo violáceo que dan por fuerte agitación de los eluatos de las columnas de Dowex 2 con igual volumen de reactivo de Ehrlich sino también por el pico de máxima absorción en 555 nm del producto de la reacción.

3. Cuantitativos

3.1. Acido δ -aminolevulínico

La técnica de determinación empleada fue la descrita en el apartado 1.1 (véase tabla I).

Otras determinaciones se efectuaron en un lote de 200 piñones. Los resultados y datos se incluyen en la tabla II.

Otros experimentos se verificaron con un lote de 200 piñones que fueron sumergidos en 100 ml de una solución que contenía ácido glutámico y dimetilsulfóxido. Las demás manipulaciones como en los apartados anteriores. Los resultados y datos de los tratamientos se recogen en la tabla III.

Contenido de δ -ALA: $\mu\text{g/g}$ de peso fresco

Piñones	Embriones	Endospermos
Sin estratificar.....	0	0
Estratificados 40 días.....	0	0
Estratificados 18 días. Puestos a germinar 25 días (sin abrir).....	30,24	3,91
Estratificados 46 días. Puestos a germinar 7 días. Plántulas con radícula de 1,5-3 cm.....	7,13	7,85
Estratificados 75 días. Puestos a germinar 7 días. Plántulas con radícula de más de 4 cm.....	0	7,2

TABLE II

Tratamiento de los piñones	δ -ALA: $\mu\text{g/g}$ de peso fresco
200 piñones con cubierta se sumergieron en 100 ml de una solución que contenía 50 mM de glicocola, 50 mM de succinato sódico, piridoxalfosfato en la proporción de 3,35 mg:100 ml, 5 mM de Cl_2Mg , 50 mM de ácido levulínico y dimetilsulfóxido al 5%. El pH de la solución se llevó a 5 con potasa. Tiempo de inmersión: 48 horas (*): Tiempo de estratificación: 18 días. Puestos a germinar 23 días (sin abrir)..... Puestos a germinar 25 días:.....	Embriones 56,66. Endospermos 21,74. Plántulas de radícula de 1-4 cm. O. Endospermos O.
Tratamiento análogo al anterior pero sin dimetilsulfóxido: Puestos a germinar 25 días (sin abrir)..... Puestos a germinar 25 días. Abiertos y con principio de germinación....	Embriones 63,54. Endospermos 11,43 (de color amarillo-verdoso). Plántulas 2,45. Endospermos 47,19.

(*) Después de la inmersión se sometió el lote de piñones (puestos en un kitasato) a una serie de compresiones y descompresiones con la trompa de vacío, de corta duración para favorecer la introducción del líquido dentro de los piñones. Por último se pusieron a estratificar a 0°C sobre vermiculita humedecida con el mismo líquido de inmersión.

TABLE III

Tratamiento de los piñones	δ -ALA $\mu\text{g/g}$ de peso fresco	
200 Piñones con cubierta se sumergieron en una solución que contenía ácido glutámico y dimetilsulfóxido al 10%. Tiempo de inmersión 48 horas. Tiempo de estratificación 18 días. Puestos a germinar 27 días (sin abrir).....	Embriones 16	Endospermos 6,15
Puestos a germinar 27 días, apuntando la radícula.....	Plántula 13,7	Endospermos 3,43
Tratamiento análogo al anterior pero sin dimetilsulfóxido: Puestos a germinar 30 días (sin abrir)..... Puestos a germinar 30 días, apuntando la radícula.....	Embriones 14,16	Endospermos 5,47
	Plántula 7,32	Endospermos 5,56

3.2. Actividad enzimática δ -ALAdesidrásica

Aplicando la técnica descrita en el apartado 1.2.2, hemos comprobado la actividad enzimática δ -ALAdesidrásica en semillas de *Pinus pinea* en determinadas condiciones, cuyos resultados se incluyen en la tabla IV.

TABLE IV

Actividad δ -ALAdesidrásica

	μg de porfobilinógeno			
	Por g/minuto		Por g/30 minutos	
Piñones estratificados y puestos a germinar.	Embrión o plántula	Endospermo	Embrión	Endospermo
Sin abrir.....	0	0	0	0
Abiertos sin apuntar la radícula...	2,85	0	85,5	0
Germinados con radícula de 0-5 mm (apuntando la radícula).....	4,23	6,7	127	201
Germinados con radic. de 2,5-3 cm.	0,14	0	4,45	0
Germinados con radícula de más de 4 cm y agotadas las reservas del endospermo.....	0	0	0	0

La actividad enzimática específica se refiere a microgramos de PBG contenidos en un gramo de peso de material húmedo de que se parte, a treinta minutos de tiempo y a un mg de las proteínas contenidas en la muestra analizada. Los resultados en la tabla V.

TABLA V

Actividad δ -ALADEHIDRÁSICA ESPECÍFICA

	μg de porfobilinógeno	
	Por $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas/30 min	
	Embriones o plántulas	Endospermos
Piñones estratificados y puestos a germinar.....		
Sin abrir.....	0	0
Abiertos sin apuntar la radícula.....	0,83	0
Germinados con radícula de 0-5 mm. (apuntando la radícula).....	0,75	4,45
Germinados con radícula de 2,5-3 cm.....	0,047	0
Germinados con radícula de más de 4 cm.) Agotadas (las reservas del endospermo).....	0	0

DISCUSIÓN

Por los resultados cualitativos que se consignan en los apartados 2.1 y 2.2 se infiere la evidencia de que en determinadas condiciones seminales se forma δ -ALA como paso intermedio en la secuencia reaccional de la biosíntesis clorofílica y despliegue de actividad δ -ALADEHIDRÁSICA por formación de PBG a consecuencia de su acción sobre el δ -ALA que como sustrato se adiciona a la reacción (apartado 1.2) y, por consecuencia, que por condensación de 2 moles de δ -ALA se forma PBG.

En lo que respecta a los resultados cuantitativos (véase tabla I) en las semillas sin estratificar y en las estratificadas cuarenta días, parece confirmar que el mecanismo de biosíntesis del δ -ALA no se inicia hasta que la semilla se encuentra en condiciones de temperatura, que permita comenzar la biosíntesis de la clorofila. En estas semillas los embriones comienzan a tomar color amarillo predecesor del amarillo verdoso que conduce al verde. En las semillas estratificadas cuarenta y seis y setenta y cinco días con plántulas con radículas de longitud

de 1,5-3 cm y 4 cm, disminuye la cifra de δ -ALA hasta que en las últimas es 0. Esto se puede explicar, con respecto a las anteriores, puesto que al empezar a verificarse la biosíntesis de la clorofila (las plántulas son verdosas) tiende a disminuir el δ -ALA hasta desaparecer, en plántulas de radícula muy larga, de 4 cm o más. Estas plántulas en tales condiciones apenas contienen en sus endospermos material de reserva y por eso no dispone la semilla probablemente de los materiales necesarios para edificar la molécula de δ -ALA.

En las semillas sometidas al tratamiento de inmersión (tabla II) en solución acuosa de sustancias estimulantes de la biogénesis de δ -ALA, acompañadas además de ácido levulínico 50 mM (con objeto de bloquear parcial o totalmente la actividad enzimática de la d-ALADEHIDRASA y seguido de estratificación con el fin de acelerar posteriormente la germinación y que se acumule δ -ALA por la acción competitiva del ácido levulínico sobre el enzima), se ha comprobado, en efecto, que tanto agregando dimetilsulfóxido como sin adicionarlo, la adición de ácido levulínico provoca un aumento notable de δ -ALA en embriones puestos a germinar veinticinco días (piñones sin abrir) con respecto a las semillas sin este tratamiento con ácido levulínico. Esto evidencia que se desarrolla un proceso acumulativo de δ -ALA del endospermo al embrión, porque se ve que comparando el lote sin tratar con dimetilsulfóxido de piñones sin abrir, con el tratado con dimetilsulfóxido, aunque la suma del δ -ALA de los embriones con el de los endospermos es aproximadamente igual, sin embargo es mayor la cantidad encontrada en los embriones del lote sin tratamiento con dimetilsulfóxido que la del lote tratado en piñones sin abrir. En estos lotes referidos los embriones son de color amarillo con viso verdoso y ellos constituyen la antesala de la biosíntesis de la clorofila, y por eso es por lo que creemos que constituyen lo mismo que los estratificados dieciocho días y puestos a germinar veinticinco días (sin abrir) y sin ser sometidos a ningún tratamiento, el estadio de mayor actividad biogénica de δ -ALA.

En los piñones tratados también con ácido levulínico puestos a germinar veinticinco días, abiertos y en los cuales se empieza a ver las radículas incipientes con longitudes de 0,5 mm, las plántulas coloreadas ya de verde, contienen una cantidad muy pequeña de δ -ALA, aunque en endospermos se ha sintetizado todavía en cantidad apreciable. Por último, cuando las plántulas se han desarrollado más y la radícula alcanza longitudes de 1-4 cm desaparece el δ -ALA tanto en embriones como en endospermos, probablemente porque en este último quedan agotadas sus reservas y por consiguiente los sillares básicos para su construcción.

En los lotes de los piñones en los cuales las semillas se tratan con ácido glutámico con y sin dimetilsulfóxido (tabla III), respectivamente, se aprecia también que la suma de las cifras de δ -ALA

halladas en los embriones y endospermos, es mayor en los tratados con dimetilsulfóxido, tanto en los piñones sin abrir como en los que apunta la radícula. Esto, como en los lotes anteriores, confirma que el dimetilsulfóxido favorece la permeabilidad de las membranas celulares; en los piñones del lote tratado con ácido levulínico facilita el paso de ácido levulínico y en los piñones del lote tratado con ácido glutámico el del ácido glutámico. Por otra parte, en estos dos últimos lotes estudiados, se confirma la disminución de δ -ALA desde el piñón sin abrir hasta el piñón que apunta la radícula, tanto en embriones como en endospermos.

Respecto de la actividad enzimática δ -ALAdehidrásica, referida a μ g de porfobilinógeno por gramo de peso y un minuto de tiempo, se puede apreciar (tabla IV) que los piñones estratificados y puestos a germinar (sin abrir) no desarrollan actividad ni en embriones ni en endospermos. En los abiertos pero sin apuntar la radícula, manifiestan ya una significativa actividad, siendo la máxima tanto en plántulas como en endospermos de los piñones germinados de longitud de radícula de 0.5 mm, disminuyendo paulatinamente en plántulas y en endospermos correspondientes a radículas de 2.5-3 cm, hasta desaparecer en plántulas de radícula de más de 4 cm de longitud en cuyos endospermos correspondientes se han agotado totalmente las reservas. La actividad δ -ALAdehidrásica específica, referida a un mg de las proteínas contenidas en un gramo de la muestra que se determina, confirma que la mayor cifra está en plántulas de piñones abiertos sin apuntar la radícula y en las plántulas de los germinados con radícula de 0.5 mm y que en la plántula a medida que se desarrolla y aumenta la longitud de radícula (de 2.5-3 cm) disminuye hasta desaparecer totalmente cuando la radícula incrementa a más de 4 cm, en cuyo estadio las reservas del endospermo desaparecen. Por otra parte el endospermo de semillas germinadas cuyas plántulas poseen radículas de 0-0.5 mm recientemente apuntadas, denotan una actividad enzimática δ -ALAdehidrásica específica mucho más intensa que las de las plántulas del resto de los experimentos.

De estas experiencias y de las verificadas para determinar las cifras de δ -ALA se deduce como consecuencia, que el δ -ALA se forma en máxima cantidad en piñones estratificados y puestos a germinar, pero sin abrir para ir después disminuyendo a medida que prosigue la germinación. Por otra parte coinciden con la actividad enzimática δ -ALAdehidrásica, que se manifiesta ya de manera activa en piñones abiertos sin apuntar la radícula (tabla IV), para ir aumentando y luego descender. Así se explicaría el paso de δ -ALA a porfobilinógeno en estadios en que los piñones se abren y germinan y dan plántulas de 0.5 mm, comenzando éstas a colorearse de verde y formando por tanto clorofila.

BIBLIOGRAFÍA

- BEALE, S. I. (1971). «Plant Physiol.», 48, 316-319.
 BEALE, S. I., GOUGH, S. P. y GRANICK, S. (1975). «Prot. Nat. Acad. Sci.», U. S. A., 72, núm. 7, 2719-2723.
 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N., FARR, N. y RANDALL, R. (1951). «J. Biol. Chem.», 193, 265-275.
 MAUZERALL, D. y GRANICK, S. (1956). «J. Biol. Chem.», 219, 435.
 MAUZERALL, D. y GRANICK, S.: En «Porphyrines et porphiries. Biochimie et Clinique». A. Gajdos y M. Gajdos, Torok. Edit. Mason & Cie., Paris, 1969.
 VERNON, L. P. y SEELEY, G. R. (1966). *The Chlorophylls*. Edit. Academic Press., New York.
 WELLBURN, A. R. (1975). «Phytochemistry», 14, 699-701.