

EFEECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE HIERRO SOBRE LA PEROXIDACION LIPIDICA EN EJES Y PLANTULAS DE SOJA

por Andrés Caro y Susana Puntarulo

Cátedra de Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113
Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCION

La función primaria del hierro en plantas es participar en reacciones redox (1). A pesar de que el hierro ocupa el cuarto puesto en cuanto a grado de abundancia en la corteza terrestre, la deficiencia de hierro es una de las carencias en micronutrientes más reconocidas en el mundo, incluso en suelos que contengan cantidades adecuadas de hierro (10^{-8} a 10^{-6} M) (2).

Los mecanismos asociados a membrana para la absorción de hierro en plantas superiores no están completamente aclarados (3). La reducción obligatoria de Fe^{3+} (el estado de oxidación predominante en suelos bien aireados) a Fe^{2+} libre, previo al transporte dentro de la raíz, parece ser un requerimiento esencial en dicotiledóneas y en monocotiledóneas no-gramíneas (4). El mecanismo principal por el cual las plantas reducen Fe^{3+} en la solución exterior, podría involucrar un sistema de reductasas unido a la membrana plasmática de la raíz (4-7), ya que la reducción de Fe^{3+} por parte de reductores liberados (un mecanismo alternativo) se demostró que jugaría un papel secundario (6,8). El sistema de reductasas de Fe^{3+} podría transferir electrones provenientes de NADPH (9) o más probablemente NADH citoplasmáticos (7), a través de la membrana. Alternativamente, la reducción de hierro podría realizarse catalizada por enzimas de la pared, usando NADH generado por la oxidación de malato, también en la pared (10).

Datos obtenidos sobre el requerimiento de hierro en varias plantas indican que las

necesidades difieren notablemente entre especies (11). Estas diferencias parecerían no estar asociadas a las distintas cantidades de hierro requeridas para el óptimo crecimiento, sino a la eficiencia en la absorción de hierro por la planta.

Recientemente, se ha indicado que diversos cambios metabólicos y fallas asociadas con el deterioro de las semillas pueden ser resultado de la desorganización de las membranas biológicas (12). En términos del modelo que adjudica un efecto causal del envejecimiento de las semillas a la peroxidación lipídica (13), se ha sugerido que la ruptura de peróxidos lipídicos durante la imbibición podría exacerbar el daño produciendo un aumento en radicales libres y productos tóxicos que inhibirían la respiración y la síntesis de proteínas y DNA. El hierro, como activo catalizador de estas reacciones podría contribuir a incrementar el daño, sin embargo, Hailstones y Smith (14) mostraron un aumento de la capacidad germinativa de semillas debido a la presencia de sales de hierro.

En el presente trabajo se presentan estudios realizados sobre la peroxidación lipídica durante la imbibición de semillas de soja, en presencia de concentraciones variables de hierro en el medio.

MATERIALES Y METODOS

Se usaron semillas de soja (*Glycine max*, var Hood) recientemente cosechadas con un contenido de humedad del 13 al 17%, exhibiendo un porcentaje de germinación superior al 95% a 25°C. Las semillas fueron in-

cubadas en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 ó 7 días, según se indique. El medio de cultivo empleado fue la solución de Steinberg modificada (1/5), pH 7.0, cuya composición es la siguiente: calcio 51 mg/l, magnesio 6.6 mg/l, nitrógeno 59 mg/l, fósforo 3 mg/l, potasio 44 mg/l, azufre 5 mg/l, manganeso 0.13 mg/l, boro 0.07 mg/l, zinc 0.04 mg/l, cobre 0.01 mg/l y molibdeno 0.01 mg/l (15). El hierro fue suplementado como Fe-EDTA, en concentración 1 a 500 μ M. Para la preparación del medio se empleó agua destilada y filtrada a través de resina Chelex 100, a fin de separar los metales contaminantes.

Al cabo de 1 día de imbibición, los ejes embrionarios fueron aislados de la semilla por separación manual de los tegumentos y los cotiledones. En plántulas de soja germinadas durante 7 días, los hipocotilos y las raíces fueron seccionados. Los homogeneizados fueron preparados en buffer fosfato 100 mM, pH 7.0, empleando un homogeneizador Potter-Elyjhem. El sobrenadante, obtenido luego de una centrifugación a 750 x g durante 10 minutos (homogeneizado) y mantenido a 4°C, fue empleado para las determinaciones.

El contenido de hierro en ejes, raíces e hipocotilos fue determinado en muestras llevadas a sequedad (8 h a 80°C) y tratadas sucesivamente con HNO₃ concentrado y HCl 5% v/v (16). Previa reducción con ácido tioglicólico, se empleó batofenantrolina a los efectos de determinar el contenido total de Fe (17).

La velocidad de reducción de Fe por los homogeneizados se determinó espectrofotométricamente a 510 nm ($E = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) empleando 2-2' bipyridilo 10 mM, NADPH 100 mM, Fe-EDTA 50 μ M, en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7.4 (17).

La velocidad de reducción de Fe por sistemas radiculares intactos de plántulas germinadas durante 7 días, fue determinada en un medio de reacción conteniendo Fe-EDTA 0.1 mM, batofenantrolina 0.3 mM en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7.0 (17).

La producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por los homogeneizados fue determinada según Buege y Aust (19). Se procedió a la preparación de los homogeneizados en presencia

de TCA 30% y luego de la separación del precipitado proteico por centrifugación, se procedió a la incubación con TBA 0.73%-BHT 0.1% a 100° C durante 15 minutos. Se determinó la absorbancia a 535 nm ($E = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los resultados se expresaron como equivalentes de malondialdehído (nmol MDA/mg proteína).

El peso fue determinado empleando una balanza Mettler Type H6. El método de Lowry fue empleado para la determinación del contenido de proteínas (20).

Los datos se indican como el valor medio \pm ESM y reflejan el promedio estadístico de los resultados de al menos 4 experimentos individuales, realizados con preparaciones provenientes de 100 plántulas.

Todos los reactivos empleados fueron de la máxima calidad disponible.

RESULTADOS

Semillas de soja recientemente cosechadas fueron expuestas a medios de cultivo suplementados con concentraciones crecientes de Fe-EDTA. El contenido de Fe en los ejes al cabo de 24 horas, resultó dependiente en forma lineal con la concentración del metal en el medio, en el rango 3 a 100 μ M (Fig. 1). Paralelamente, se determi-

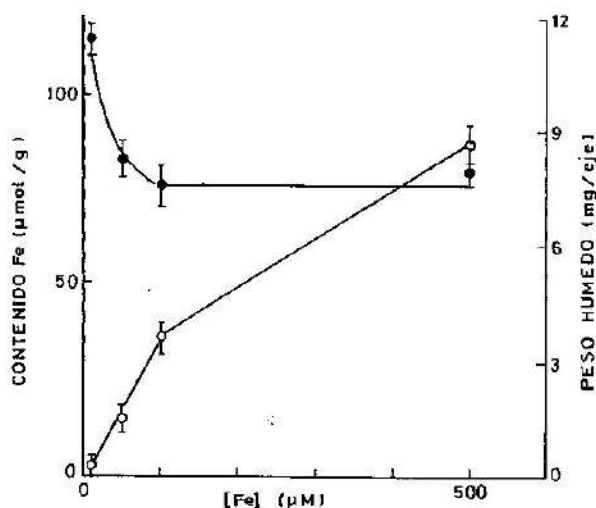


Fig. 1.-- Efecto de la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo sobre el contenido de hierro (O) y el peso húmedo (●) de los ejes embrionarios de soja incubados durante 24 hs. El medio de cultivo, cuya descripción figura en Materiales y Métodos, fue suplementado con Fe-EDTA (1:2).

nó el peso alcanzado por los ejes (índice de vigor), obteniéndose una disminución significativa en el rango 3 a 50 μM Fe-EDTA en el medio de cultivo, sin embargo, el peso de los ejes no mostró alteraciones frente a niveles externos de hierro 50 a 500 μM (Fig. 1).

Dado el papel clave del Fe en la catálisis de la peroxidación lipídica, se evaluó la velocidad de reducción de Fe y el contenido de TBARS por homogeneizados de ejes de soja provenientes de semillas expuestas a concentraciones crecientes de Fe durante 24 hs. Según se indica en la Tabla 1, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros.

No se observaron variaciones significativas en el peso alcanzado por las raíces e hipocotilos de plántulas de soja desarrolladas durante 7 días en medios suplementados con concentraciones crecientes de Fe (Tabla 2). El contenido de Fe de la raíz aumentó 11 veces y del hipocotilo 4 veces cuando se incrementó

la concentración de Fe-EDTA en el medio de 3 a 500 μM (Tabla 2).

La velocidad de reducción de Fe por sistemas radiculares intactos de plántulas de 7 días fue medida en presencia de Fe-EDTA 100 μM . Dado que el Fe^{3+} debe ser reducido a Fe^{2+} a fin de ser incorporado, la velocidad de reducción de Fe *in vivo* puede ser considerada como una estimación de la incorporación de Fe. Las plántulas incubadas en presencia de concentraciones de Fe-EDTA superiores a 100 μM , mostraron una drástica disminución de la velocidad de reducción de Fe, sugiriendo una menor incorporación (Fig. 2).

Homogeneizados de raíces e hipocotilos de plántulas imbibidas durante 7 días mostraron un incremento significativo en la velocidad de reducción de Fe-EDTA, en función de la concentración de hierro del medio de cultivo (Tabla 3).

El aumento en la disponibilidad de Fe (0 a 50 μM) en el medio de cultivo resultó en

Tabla 1.-- Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la velocidad de reducción de hierro y el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en ejes embrionarios de soja incubados durante 24 hs

Fe (μM)	Reducción Fe-EDTA (nmol/min. mg)	TBARS (nmol MDA/mg)
0	1,09 \pm 0,10	1,55 \pm 0,25
10	1,11 \pm 0,15	1,30 \pm 0,08
50	1,10 \pm 0,12	1,54 \pm 0,20
100	1,08 \pm 0,06	1,36 \pm 0,15

Tabla 3.-- Efecto de la disponibilidad de hierro en el medio, sobre la velocidad de reducción de Fe-EDTA por homogeneizados de raíces e hipocotilos provenientes de plántulas de soja, al cabo de 7 días de incubación

Fe (μM)	Reducción Fe-EDTA (nmol/min. mg proteína)	
	Raíz	Hipocotilo
10	2,41 \pm 0,03	0,89 \pm 0,09
50	4,75 \pm 0,18	0,93 \pm 0,09
100	6,76 \pm 0,34	1,78 \pm 0,05
500	7,20 \pm 0,20	6,03 \pm 0,49

Tabla 2.-- Efecto de la disponibilidad de hierro en el medio, sobre el contenido de hierro y el peso húmedo en raíz e hipocotilo de plántulas de soja, al cabo de 7 días de incubación

Fe (μM)	Contenido de hierro ($\mu\text{mol/g}$)		Peso húmedo (g)	
	raíz	hipoc	raíz	hipoc
3	0,41 \pm 0,02	0,20 \pm 0,05	0,16 \pm 0,01	0,57 \pm 0,09
50	3,62 \pm 0,41	0,57 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,60 \pm 0,04
100	4,66 \pm 0,43	0,79 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,69 \pm 0,04

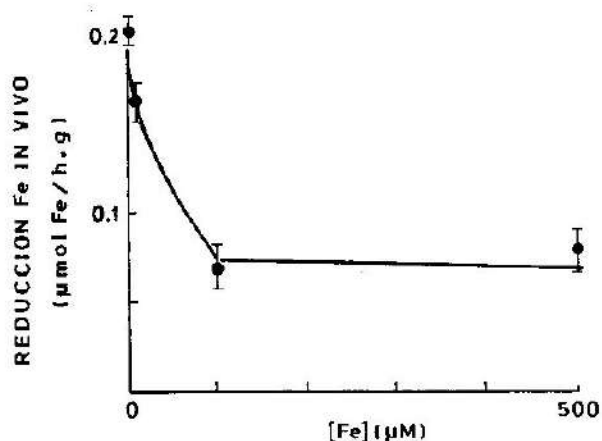


Fig. 2.-- Efecto de la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo sobre la velocidad de reducción de hierro, por sistemas radiculares intactos de plántulas de soja incubadas durante 7 días. La velocidad de reducción de hierro se registró durante 30 minutos, en el medio de medida indicado en Materiales y Métodos.

Tabla 4.-- Efecto de la disponibilidad de hierro en el medio, sobre el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en raíces provenientes de plántulas de soja, al cabo de 7 días de incubación

Fe (μM)	TBARS (nmol MDA/mg proteína)
0	0,72 ± 0,04
50	2,42 ± 0,38
100	2,45 ± 0,10

un aumento superior al 200% en el contenido de TBARS en las raíces de plántulas de soja al cabo de 7 días de incubación (Tabla 4).

DISCUSION

El Fe es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plántulas. El nivel de Fe caracterizado en base a la determinación del contenido total en el tejido, puede no ser el mejor reflejo de la situación a nivel celular, ya que en ciertos casos de deficiencia, el contenido del metal en las hojas puede ser idéntico en plantas deficientes y en plantas adecuadamente suplemen-

tadas con Fe (1). Este hecho ha generado un largo debate sobre el concepto de Fe *activo*, es decir el Fe que está fisiológicamente disponible y que en ciertas condiciones puede no estar directamente relacionado con el Fe total (Fe no metabólicamente activo + Fe *activo*) del tejido.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que semillas de soja incubadas en medios suplementados con cantidades variables de Fe por períodos breves (24 horas) incrementan significativamente el contenido de Fe en el eje embrionario sin verificarse cambios drásticos en la velocidad de crecimiento de los mismos.

Experimentos *in vitro*, en sistemas tanto vegetales (21) como animales (22), indican que la peroxidación lipídica es catalizada eficientemente por la presencia de Fe en el medio de reacción. Sin embargo, el Fe catalíticamente activo es aquél que se encuentra en el citosol celular ligado a agentes quelantes de bajo peso molecular (ADP, ATP, citrato, etc), mientras que el hierro que es secuestrado por las proteínas de almacenamiento constituyen formas relativamente más inertes. En los ejes embrionarios de soja imbibidos durante 24 h con concentraciones de Fe de hasta 100 μM, la peroxidación lipídica evaluada como el contenido de TBARS, no se vio incrementada sugiriendo que el exceso de Fe puede ser eficientemente almacenado para minimizar el efecto nocivo del Fe catalíticamente activo. La velocidad de reducción de Fe medida en homogeneizados de ejes de soja, no fue afectada por la presencia de concentraciones crecientes de Fe durante la imbibición sugiriendo que las actividades enzimáticas no resultaron modificadas durante el período en estudio.

La imbibición de las semillas de soja durante 7 días en presencia de Fe 3 a 100 μM llevó a un aumento de 3 veces en el contenido de Fe en el hipocotilo, mientras que el aumento en la raíz resultó 11 veces. Esta respuesta a nivel de la raíz se relaciona con la condición de la misma de ser órgano primario de absorción. El hipocotilo mostró un discreto aumento en el peso húmedo, en las plántulas expuestas a Fe 100 μM. Hailstones y Smith (14) propusieron un efecto promotor de la germinación por la presen-

cia de Fe en el medio, sin embargo, en el rango de concentraciones estudiadas este efecto no fue observado.

Los resultados obtenidos en plántulas de soja expuestas a Fe 10 a 500 μM indican que tanto la raíz como los hypocotilos muestran un aumento significativo de la velocidad de reducción de Fe *in vitro*. Probablemente esta respuesta se deba a un incremento en la actividad de las enzimas responsables de la reducción de Fe, que constituye el proceso previo al almacenamiento del exceso de Fe. El aumento de la oferta, podría contribuir a la inducción de las enzimas responsables de controlar la concentración de Fe *activo* en el citosol.

Sin embargo, la velocidad de reducción de Fe por parte de la plántula intacta (*in vivo*) se redujo a medida que la concentración de Fe disponible en el medio aumentó. Observaciones previas de Bienfait y col (23) indican que el contenido de Fe en el espacio libre de las raíces aumenta de 220 ± 90 a 1800 ± 200 nmol/planta en plantas cultivadas en ausencia o presencia de Fe, respectivamente. El diferente perfil de respuesta *in vivo* e *in vitro* podría deberse a una adaptación frente a un contenido intracelular elevado de Fe disminuyendo la velocidad de reducción a los efectos de disminuir la captación.

Actualmente, se acepta ampliamente la hipótesis que asigna un papel prioritario a la reducción de hierro en la iniciación de la peroxidación de lípidos. Los datos obtenidos en relación al aumento en el contenido de TBARS en raíces de plántulas de 7 días de imbibición, sugieren que concentraciones de Fe en el rango 50-100 μM actuarían como pro-oxidantes catalizando la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos producidos durante el almacenamiento.

Tomados en conjunto, los datos presentados en este trabajo indican la participación activa del Fe en la peroxidación lipídica durante las etapas tempranas del desarrollo de la plántula. Estudios posteriores serán necesarios a los efectos de explorar el papel del Fe como nutriente esencial y como catalizador de procesos generadores de radicales oxidativos que podrían conducir a daño celular y alteración del eficiente crecimiento de las plántulas, como así también la posible participación del Fe en el proce-

so de daño por imbibición y el envejecimiento de las semillas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con subsidios de la International Foundation for Sciences (IFS), la Universidad de Buenos Aires y la Fundación Antorchas. SP es miembro de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

REFERENCIAS

1. LONGNECKER, N., 1988. SIS Atlas of Sciences: Animal and Plant Sciences 86-3353, 144.
2. ROMHELD, V. y H. MARSCHNER, 1986. Adv. Plant Nutr. 2, 155.
3. GRUSAK, M. A., R. M. WELCH y L.V. KOCHIAN, 1990. Plant Physiol. 93, 976.
4. CHANEY, R. L., J. C. BROWN y T. O. TIFFIN, 1972. Plant Physiol. 50, 208.
5. BIENFAIT, H. F., 1985. J. Bioenerg. Biomembr. 17, 73.
6. BIENFAIT, H. F., R. J. BINO, A. M. van der BLIEK, J. F. DUIVENVOORDEN y J. M. FONTAINE, 1983. Plant Physiol. 59, 196.
7. BLUCKHOUT, T. J., P. F. BELL, D. G. LUSTER y R. L. CHANEY, 1989. Plant Physiol. 90, 151.
8. ROMHELD, V. y H. MARSCHNER, 1983. Plant Physiol. 71, 949.
9. SIJMONS, P. C., W. van den BRIEL y H. F. BIENFAIT, 1984. Plant Physiol. 75, 219.
10. TIPTON, C. L. y J. THOWSEN, 1985. Plant Physiol. 79, 432.
11. CHRIST, R. A., 1974. Plant Physiol. 54, 582.
12. HAILSTONES, M. D. y M. T. SMITH, 1991. J. Plant Physiol. 137, 307.
13. WILSON, D. O. y M. B. Mc DONALD, 1986. Seed Sci. Technol. 14, 269.
14. HAILSTONES, M. D. y M. T. SMITH, 1989. S. Afr. J. Sci. 85, 670.
15. TIFFIN, L. O., 1986. Plant Physiol. 41, 510.
16. LAWRIE, S., N. TANCOCK, S. Mc GROWTH y J. ROGER, 1991. J. Exp. Bot. 42, 509.
17. BRUMBY, P. E. y V. MASSEY, 1967. Meth. Enzymol. 10, 464.
18. EGYED, A., A. MAY y A. JACOBS, 1980. Biochem. Biophys. Acta 629, 391.
19. BUEGE, J. A y S. D. AUST, 1978. Meth. Enzymol. 52, 302.
20. LOWRY, O. H., N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR y R. J. RANDALL, 1951. J. Biol. Chem. 193, 265.
21. SIMONTACCHI, M. S. y S. PUNTARULO, 1991. Anal. Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat., Tomo 43, 153.
22. PUNTARULO, S. y A. I. CEDERBAUM, 1988. Arch. Biochem. Biophys. 264, 482.
23. BIENFAIT, H. F., W. van den BRIEL y N. T. MESLAND-MUL. 1985. Plant Physiol. 78, 596.

Manuscrito recibido en Diciembre 1992