

LA RESPIRACION INSENSIBLE AL CIANURO Y SU RELACION CON LA PRODUCTIVIDAD DE LAS PLANTAS

R. A. Sánchez (1)

INTRODUCCION

En años recientes se ha propuesto una serie de lineas de trabajo tendientes a aumentar la productividad de las plantas. Muchas de esas lineas están dirigidas a aumentar la eficiencia del sistema fotosintético, otras tienden a reducir los gastos por respiración. Una parte del carbono fijado mediante la fotosíntesis debe necesariamente ser utilizado por la respiración ya que de este proceso depende la producción de ATP y de varios precursores de componentes celulares indispensables para el crecimiento y mantenimiento de los tejidos. Sin embargo, se ha sugerido que una parte de la respiración podría no estar acoplada a procesos sintéticos.

Si una fracción importante de la respiración fuera poco eficiente en producir ATP, su eliminación podría tener un impacto positivo sobre la productividad. Es dentro de este contexto que se le ha prestado atención a aquella fracción de la respiración que es insensible al cianuro, la antimicina y otros inhibidores del transporte de electrones por la cadena de citocromos (Zelitch, 1975; Day, 1977).

LA RESPIRACION INSENSIBLE AL CIANURO Y LA OXIDASA ALTERNATIVA

La sensibilidad al cianuro varía mucho según los tejidos y su estado fisiológico. En algunos casos se observa una inhibición casi total de la respiración, mientras que en otros, es pequeña o nula y existen tejidos cuyo consumo de O_2 es estimulado por el cianuro (Beevers, 1961).

Se ha establecido que en las mitocondrias vegetales existe una componente de la respiración que es insensible al cianuro y la antimicina (Hacrett *et al.*, 1960; Solomos, 1977), y que en aquellos tejidos cuya respiración es resistente a esos inhibidores, también lo es el consumo de O_2 de las mitocondrias aisladas de ellos (Beevers, 1961; Solomos, 1977), Cuadro 1. Es frecuente que las mitocondrias sean más sensibles al cianuro que los tejidos de donde provienen, lo que sugiere la participación de sistemas extramitocondriales de consu-

(1) *Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía de la U.B.A. 1417. Avda. San Martín 4453 - Buenos Aires.*

CUADRO 1: Efecto del cianuro sobre la respiración de tejidos y mitocondrias aisladas.

	TEJIDOS		MITOCONDRIAS	
	ul O ₂ min ⁻¹ . g ⁻¹ (peso fresco)		nmol . O ₂ min ⁻¹ . mg prot ⁻¹	
	- CNK	+ CNK	-CNK	+ CNK
Secciones de tubérculos de mandioca				
cv. Llanera	58	59,7	68	44,9
cv. Bitter	30	34,8	78	23,4
Secciones de tubérculos de papa				
sin incubar	35	7,0	100	5
incubados 24 horas	110	113,5	120	80

Datos tomados de: Passam, 1976; Boveris et al, 1978 y Theologis y Laties, 1978.

mo de O₂ (Beevers, 1961; Sánchez et al, 1979).

También se ha demostrado que en aquellas mitocondrias cuya respiración es insensible al cianuro coexisten la vía de transporte de electrones que termina en la citocromo oxidasa, con otra vía, resistente al cianuro. Esta última se denomina vía alternativa y la reducción del oxígeno es atribuida a la actividad de una oxidasa alternativa. (Solomos, 1977, Sánchez et al, 1979).

La vía alternativa tampoco es sensible a la antimicina, pero puede ser inhibida mediante al ácido salicilhidroxámico (SHAM) (Fig. 1). Como el SHAM no afecta a la citocromo oxidasa, se ha utilizado un método para evaluar la contribución de cada oxidasa que consiste en titular la respiración con cianuro y SHAM (Bahr y Bonner, 1973; Theologis y Laties, 1978).

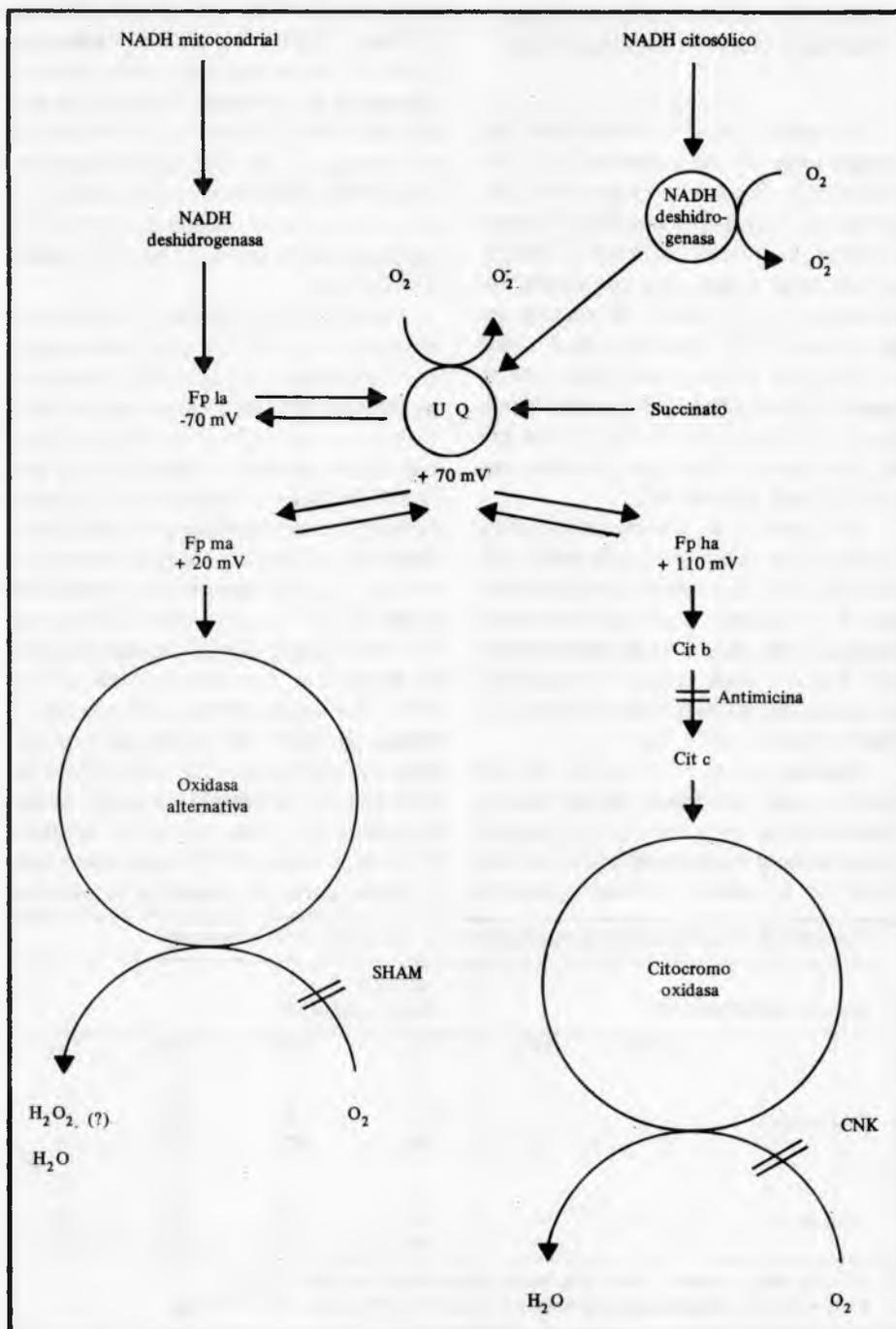
Experiencias realizadas con mitocondrias aisladas de numerosas especies han llevado al esquema de transporte de electrones representado en la Figura 1. Uno de los hechos más importantes que pone de manifiesto ese esquema es que cuando

los electrones llegan al oxígeno por la oxidasa alternativa pasan, a lo sumo, por un sólo sitio de fosforilación, mientras que cuando lo hacen por la citocromo oxidasa, pasan por 2 ó 3, según cual sea el sustrato.

De manera que la respiración por la oxidasa alternativa consume mucho más sustrato para producir una misma cantidad de ATP que la respiración por la citocromo oxidasa. Es decir, la respiración insensible al cianuro es un proceso muy poco eficiente en cuanto a la conservación de la energía, por lo que no sorprende que se haya pensado en eliminarlo para aumentar la productividad (Zelitch, 1975; Day, 1977).

Para que la supresión de la oxidasa alternativa tenga un efecto favorable se tienen que dar dos circunstancias:

- (1) que la participación de la oxidasa alternativa en la respiración de las plantas sea cuantitativamente importante, y
- (2) que la actividad de la oxidasa alternativa no esté ligada a algún proceso fisiológico importante.



LA PARTICIPACION DE LA OXIDASA ALTERNATIVA EN LA RESPIRACION DE LAS PLANTAS

En primer lugar conviene hacer una consideración de orden general. En el esquema de la Figura 1, vemos que el potencial redox de la Fpma es 50 mV menos positivo que el de la ubiquinona. Esta diferencia implica que, para que los electrones vayan por la oxidasa alternativa, los citocromos tienen que estar en un nivel de reducción relativamente alto. Esta situación se puede dar cuando existe una limitación al transporte de electrones por los citocromos, como por ejemplo, una baja concentración de ADP.

De manera que, aunque las mitocondrias de algún tejido posean la oxidasa alternativa, esa vía puede o no utilizarse según si la situación fisiológica del tejido determina una mayor o una menor reducción de los transportadores de electrones en la zona de la Ubiquinona-citocromo b. (Bahr y Bonner, 1973, b.).

Aunque no es el propósito de este trabajo tratar problemas metodológicos, conviene tener en cuenta que el procedimiento más usado para estimar la participación de la oxidasa alternativa, consiste

en determinar la inhibición del consumo de O_2 por el CNK y el SHAM (Teologis y Laties, 1978) y, se sabe, que ambos inhibidores pueden afectar a otras enzimas además de la citocromo oxidasa y la oxidasa alternativa (Rich *et al*, 1978; Parrish y Leopold, 1978). Esta falta de especificidad de los inhibidores puede introducir errores de distinta magnitud, según la importancia cuantitativa de las otras oxidاس afectadas.

Se han hecho estimaciones de la contribución de la oxidasa alternativa en tejidos reservantes y en tejidos en crecimiento. Se han estudiado varios tejidos reservantes y en el cuadro 2 se resumen algunos de los resultados obtenidos con secciones de frutos de bananero y de raíces de batata. Las conclusiones más importantes que se pueden extraer de esos datos son: (1) en ausencia de un inhibidor de la vía de los citocromos (CNK) o de un desacoplante (CCCP) la contribución de la oxidasa alternativa es cero, (2) el efecto del desacoplante en el caso de los frutos, depende del estado de maduración. Los resultados con otros tejidos de reserva como tubérculo de papa, frutos de palto, etc, han sido muy similares (Teologis y Laties, 1978). Aparentemente, la mayor parte del consumo de oxígeno

CUADRO 2: Componentes de la respiración en secciones de frutos de bananero.

ESTADO FISIOLÓGICO	ul $O_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$					
	TRATAMIENTO		V_t	V_{alt}	V_{cit}	V_{res}
	CCCP	CNK				
Preclimaterio	-	-	53	0	38	15
	+	-	115	34	60	20
	-	+	62	42	10	20
Climaterio	-	-	54	0	43	11
	+	-	60	0	45	15
	-	+	49	11	27	11

V_t = respiración total V_{cit} = respiración debida a la citocromo oxidasa

V_{alt} = respiración atribuida a la oxidasa alternativa $V_{res} = V_t - (V_{alt} + V_{cit})$

Tomado de Theologis y Laties, 1978.

de esos tejidos, en condiciones normales, se debe a la citocromo oxidasa. La circunstancia de que los desacoplantes tengan tanto efecto sobre el consumo de O_2 y que el efecto del cianuro sea similar al de la antimicina (Teologis y Laties, 1978) indica que, en su mayor parte, la respiración de esos tejidos es mitocondrial y aumenta la confianza en las estimaciones de la actividad de la oxidasa alternativa.

En cuanto a tejidos en crecimiento, se han encontrado diferencias entre las raíces y la parte aérea. En los tallos y hojas de *Senecio aquaticus*, ni el CN^- ni el SHAM aplicados individualmente tienen

efecto; en cambio, se nota que hay efecto cuando ambos se aplican a la vez. (Cuadro 3). Estos resultados sugieren la presencia de la oxidasa alternativa y además indican que su contribución al consumo de O_2 , en ausencia de inhibidores, debe ser pequeña. (Lambers, 1979).

En las raíces, la participación de la oxidasa alternativa parecería ser mayor y, en algunos casos, el consumo de O_2 se reduce hasta en un 70% mediante tratamientos con SHAM. (Lambers, 1979). La variación entre especies, en cuanto a la actividad respiratoria de las raíces que puede atribuirse a la oxidasa alternativa, es muy grande. En algunas, como las arvejas, parece tener un valor muy bajo. En casi todos los casos estudiados se han detectado diferencias importantes entre distintos estados fisiológicos (Cuadro 4).

En síntesis, la información disponible, hasta ahora, indica que la contribución de la oxidasa alternativa a la respiración sólo podría alcanzar valores importantes en las raíces y en las inflorescencias de algunas especies, y que se encuentran variaciones muy grandes según el estado fisiológico del tejido en cuestión.

CUADRO 3: Efecto del cianuro y el ácido salicil-hidroxiámico sobre la respiración de la parte aérea de plantas de *Senecio aquaticus*

	Respiración ul $CO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ (peso seco)
Control	960
CNK 0,40 mM	1,070
SHAM 33,3 mM	880
SHAM + CNK	230

Tomado de Lambers, 1979.

CUADRO 4: Respiración y sensibilidad al ácido salicil hidroxiámico de raíces jóvenes y adultas de tres especies.

ESPECIE	Peso seco mg/raíz	Respiración mg $O_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$	% de la respiración total que es inhibida por el SHAM
<i>Daucus carota</i> (joven)	4	21	50
<i>Daucus carota</i> (adulta)	170	3,6	25
<i>Cichorium intibus</i> (joven)	5	14,1	74
<i>Cichorium intibus</i> (adulta)	79	7,9	28
<i>Beta vulgaris</i> (joven)	45	7,8	53
<i>Beta vulgaris</i> (adulta)	390	4,0	25

Las raíces adultas ya acumulaban reservas.

Tomado de Lambers, 1979.

Esta variación se observó tanto en la capacidad potencial de la oxidasa alternativa (que puede cambiar desde valores insignificantes hasta hacerse mayor que la de la citocromo oxidasa) como en la fracción de esa capacidad potencial que es utilizada. Son varios los casos en los que se ha encontrado que las mitocondrias tienen una capacidad potencial apreciable de transporte de electrones por la vía alternativa, pero que, en condiciones fisiológicas consideradas normales, la respiración de esas células puede atribuirse en su mayor parte, a la citocromo oxidasa. Aparentemente, la actividad de la oxidasa alternativa sólo podría alcanzar niveles importantes cuando se sobrepasa la capacidad de transporte de los citocromos.

LA RELACION ENTRE LA OXIDASA ALTERNATIVA Y ALGUNOS PROCESOS FISIOLÓGICOS

Hasta ahora se ha encontrado una relación funcional muy estrecha entre la oxidasa alternativa y un sólo proceso fisiológico importante: la termogénesis. En las flores de las aráceas en los momentos próximos a la fecundación se produce una cantidad considerable de calor. El calor producido es suficiente para mantener la temperatura de esos tejidos por encima de la temperatura del aire durante varias horas. Se han medido diferencias de hasta 18° C (Meeuse 1975). En esos tejidos se encuentra una gran cantidad de reservas (almidón o lípidos) que son rápidamente degradadas durante la producción de calor. Las mitocondrias de las inflorescencias de las aráceas presentan en esos momentos (no antes) una gran actividad de la oxidasa alternativa, y está desacoplado el transporte de electrones de la producción de ATP. De esa manera, no se conserva la energía proveniente de la oxida-

ción de los sustratos si no que se disipa como calor. El aumento de temperatura favorece la volatilización de sustancias que atraen a los insectos responsables de la polinización de esas plantas y es, por esta razón, que se le atribuye a la termogénesis, y a la oxidasa alternativa, por su asociación con ella, un considerable valor adaptativo.

Sin embargo, se sabe que la oxidasa alternativa se encuentra en algunos tejidos que no producen calor. En mitocondrias extraídas de varios tejidos de reserva (Teologis y Laties, 1978; Boveris *et al*, 1978) y en hipocotilos de varias especies se ha encontrado actividad de la oxidasa alternativa y, en algunos casos, se ha observado una correlación entre cambios en la respiración insensible al cianuro y cambios fisiológicos en el tejido. Por ejemplo, cortando secciones de tubérculo de papa y manteniéndolas durante 24 ó 48 horas en un ambiente húmedo y aireado, se produce una serie de profundas alteraciones funcionales, por ejemplo: aumento en el ritmo respiratorio (se duplica), aumento en la capacidad de transporte de iones, readaptación de capacidad mitótica, etc. (Kahl, 1973). Concomitantemente, aumenta en forma notable la actividad de la oxidasa alternativa en las mitocondrias de esos tejidos (Boveris *et al*, 1978). Aunque todavía no se disponga de una explicación acerca del papel que podría jugar la respiración insensible al cianuro en esas alteraciones, llama la atención el paralelismo entre las variaciones en las condiciones fisiológicas de los tejidos y en la capacidad de la vía alternativa en las mitocondrias.

Se ha sugerido también, que la oxidasa alternativa podría jugar un papel importante en la ruptura de la dormición y la germinación de las semillas. Esta proposición tiene su fundamento en el efecto estimulante que el CN⁻, la azida sódica y

otros inhibidores, tienen sobre la germinación de semillas dormidas, en contraste con el efecto antagónico del SHAM (Hendricks y Taylorson, 1975) y en la observación de que, en los primeros momentos de la germinación de las semillas de soja, la respiración es mucho más sensible al SHAM que al cianuro, situación que se invierte luego de varias horas de incubación (Yentur y Leopold, 1978). Sin embargo, se ha visto que el efecto del SHAM sobre la germinación puede ser complejo (Sánchez *et al*, 1978), que en las semillas de soja existen otras oxidasas insensibles al cianuro y sensibles al SHAM (Parrish y Leopold, 1978) y que la actividad de la oxidasa alternativa en las mitocondrias de semillas de soja no cambia mucho durante las primeras 16 horas de incubación (Becconi *et al*, 1979), por lo que, esta hipótesis no parece, por el momento, estar sólidamente fundamentada.

CONCLUSION

Si bien se ha demostrado la existencia de una vía alternativa a la de los citocromos para el transporte de electrones, desde los sustratos al O_2 en las mitocondrias vegetales, y que su eficiencia en cuanto a la producción de ATP es baja, todavía no puede afirmarse con certeza que valga la pena intentar su eliminación. Esta incertidumbre deriva, en gran parte, de la carencia de información suficiente para evaluar su importancia cuantitativa. Por lo que se sabe, su contribución a la respiración varía mucho según las especies, los órganos y el estado fisiológico y, aparentemente, adquiere valores considerables sólo en algunas circunstancias. Lambers (1979), por ejemplo, ha calculado que, aunque hasta un 50% de la respiración en las raíces de maíz podría atribuirse a la oxidasa alternativa, el gasto diario de carbono por esta vía sería equivalente

a un 2,4% del incremento diario en materia seca. Suprimir la vía alternativa en un sistema como ese no parece que pudiera producir un gran impacto en la economía del carbono, aunque el mismo autor señala que en otras especies las cifras podrían ser mayores.

Por otra parte, en algunas especies la oxidasa alternativa está relacionada con la producción de calor por los tejidos florales que, a su vez, se vincula con la polinización por lo que, en esos casos, está cumpliendo una función importante en la reproducción. En otras especies cambios en la actividad de la oxidasa alternativa están asociados a cambios fisiológicos importantes, como la maduración de los frutos o el llamado "envejecimiento" que se produce al incubar en condiciones aeróbicas secciones de tejidos.

También en las raíces se han encontrado valores altos para la respiración insensible al cianuro y sensible al SHAM. Dado que todavía no se conoce con certeza la función que cumple en esos órganos, es prematuro un juicio acerca de las consecuencias que tendría su eliminación. Son muchos los aspectos importantes de la actividad de la oxidasa alternativa que quedan por aclarar y que ayudarían a comprender su función; entre ellos, se destaca la incógnita acerca de si el producto de la reducción del O_2 por esta vía es H_2O_2 ó H_2O . (Rich *et al*, 1976, Huq y Palmer, 1978).

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1) Bahr, J. T. and Bonner, W. D. 1973 (a) Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. *J. Biol. Chem.* **248**, 3441-3445.
- 2) Bahr, J. T. and Bonner, W. D. Jr. 1973. (b). Cyanide-insensitive respiration II. Control of the alternate path-

- way. *J. Biol. Chem.* **248**, 3446-3450.
- 3) Beconi, M. T., Sánchez, R. A. y Boveris, A. 1979. La oxidasa alternativa de las mitocondrias vegetales y su relación con la respiración. XV Reunión Nacional, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica. Bermejo. Pcia. de Mendoza.
 - 4) Beevers, H. 1961. Respiratory metabolism in plants. Harper and Row Publ. New York and London.
 - 5) Boveris, A., Sanchez, R. A. and Beconi, M. T. 1978. Antimycin and cyanide resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.* **92**, 333-338.
 - 6) Day, P. R. 1977. Plant Genetics: Increasing crop yield. *Science*, **197**, 1334-1339.
 - 7) Hackett, D. P., Haas, D. W., Griffiths, S. K. and Niederpruem, D. J. 1960. Studies on the development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol.* **35**, 8-19.
 - 8) Hendricks, S. B. and Taylorson, R. B. 1975. Breaking seed dormancy by catalase inhibition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **72**, 306-309.
 - 9) Huq, S. and Palmer, J. M. 1978. Superoxide and hydrogen peroxide production in cyanide resistant *Arum maculatum* mitochondria. *Plant Sc. Lett.* **11**, 351-358.
 - 10) Kahl, G. 1973. Genetic and metabolic regulation in differentiating plant storage tissue cells. *Bot. Rev.* **39**, 274-299.
 - 11) Lambers, H. T. 1979. Energy metabolism in higher plants in different environments. PhD Thesis Univ. of Groningen. The Netherlands.
 - 12) Meeuse, B. H. 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 117-126.
 - 13) Parrish, A. and Leopold, C. 1978. Confounding lipoxygenase activity with alternate respiration. *Plant Physiol.* **62**, 635-637.
 - 14) Passam, A. C. Cyanide-insensitive respiration in root tubers of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) *Plant Sci. Lett.* **7**, 211-218.
 - 15) Rich, P. R., Boveris, A., Bonner, W. D. Jr and Moore, A. L. 1976. Hydrogen peroxide generation by the alternate oxidase of higher plants. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **71**, 695-703.
 - 16) Sanchez, R. A., Boveris, A., Beconi, M. T. y Hunau, R. 1978. Relación entre la actividad de la oxidasa alternativa y la germinación. 7a. Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal. Mar del Plata. Argentina.
 - 17) Sanchez, R. A., Beconi, M. T. and Boveris, A. 1979. The alternative oxidase of plant mitochondria. *Rev. Microscop. Electr. Biol. Cel.* (en prensa).
 - 18) Solomos, T. 1977. Cyanide resistant respiration in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 279-297.
 - 19) Theologis, A. and Laties, G. 1978. Relative contribution of cytochrome-mediated and cyanide resistant electron transport in fresh and aged potato slices. *Plant Physiol.* **62**, 232-237.
 - 20) Yentur, S. and Leopold, A. C. 1976. A respiratory shift during seed germination. *Plant Physiol.* **57**, 274-276.
 - 21) Zelitch, I. 1975. Improving the efficiency of photosynthesis. *Science*, **188**, 626-633.