ACCION DEL CLOROPROPHAM EN LA ACTIVIDAD ARGININADECARBOXILASA DE SEMILLAS DE ARVEJA EN GERMINACION

Ceferina R. Ordóñez (1)

Recibido: 24/5/82
Aceptado: 15/2/83

RESUMEN

Se comprobó actividad argininadecarboxilasa en semillas de arveja (*Pisum sativum* L.) en germinación, la que fue determinada por respirometría en un respirómetro de Warburg. El Cloropropham (CIPC) a concentraciones 2,39x 10^{-3}M exalta dicha actividad en las semillas tratadas. La arginina se cataboliza vía agmatina. Las radículas de las semillas tratadas evidencian un desarrollo inferior al de las semillas testigo, medido por el índice de desarrollo (ID = peso de radícula x 100/peso de cotiledones). La necrosis observada en los ápices de las semillas tratadas se asociaron con las alteraciones en la respiración tisular por influencia del herbicida (Moreland, 1980).

INFLUENCE OF CHLOROPROPHAM (CIPC) IN THE ARGININEDECARBOXYLASE ACTIVITY OF GREEN PEAS GRAIN IN GERMINATION

SUMMARY

It was demostrated argininedecarboxylase activity in germinating pea-seeds (*Pisum sativum* L.) and it was determined in a Warburg respirometer. Chloropropham (CIPC) 2,39 x 10^{-3}M concentration increased the enzymic activity in treated seeds. Arginine is catabolized by agmatine path way. Radicles from treated seeds grown little than normal seeds (without CIPC). Its development were measured by the development index (ID = radicle wheight/cotyledons wheight x 100). It always was higher in normal seeds. CIPC influenced not only the enzymic activity but it determined necrotics zones in apex-radicles as well. Probably it was due by disorders in tissular respiration, influenced by this herbicide (Moreland, 1980).

INTRODUCCION

El Cloropropham, isopropilN(3clorofenil) carbamato o CIPC se utiliza como herbicida de pre y post emergencia. Además, se lo emplea como inhibidor de la brotación de tubérculos de papa, con la finalidad de asegurar su perdurabilidad durante almacenamiento prolongado (Corsini *et al.*, 1978; Kokkalos, 1975; Mondy, 1978; Schippers, 1975); como así también otros productos, vegetales: frutillas, ciruelas, manzanas (Salimen *et al.*, 1971).

Se ha estudiado la acción del CIPC sobre el metabolismo intermedio, investigando en tubérculos de papa los efectos de este inhibidor en las actividades amilolítica y sacarolítica (Ordóñez y Contreras, 1970); su acción en el proceso respiratorio, controlando la

(1) Cátedra de Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

pérdida de peso durante la conservación (Ordóñez, 1971) y la incidencia en el metabolismo del glutamato, a través de la actividad glutámicodecarboxilasa (Ordóñez y Alonso, 1971).

Posteriormente, en semillas de arveja en germinación se consideraron otros aspectos de la acción del CIPC. Referente a la utilización de los hidratos de carbono, se investigaron la actividad fitásica (por su relación con los "fosfatos de reserva" del ácido fítico) y la movilización de los fosfatos solubles (Ordóñez y Alonso, 1973). También se estudió el efecto del CIPC en la distribución de los fosfatos y de la arginina en cotiledón y radícula de semillas tratadas y el desarrollo de las radículas (Ordóñez y Alonso, 1976).

Estos antecedentes motivaron el presente estudio, en el cual se consideró la actividad argininadecarboxilasa de semillas en germinación para dilucidar aspectos relacionados con el desarrollo deficitario de las radículas de semillas tratadas. Esta actividad fue medida por respirometría.

MATERIALES Y METODO

Se utilizaron semillas de arveja *Pisum sativum* L., procedentes de la EERA-INTA San Pedro, provincia de Buenos Aires sin ningún tratamiento fitosanitario.

Para la germinación las semillas se esterilizaron superficialmente, remojándolas en solución de hipoclorito de sodio 1%V/V (a partir de lavandina comercial 40 g de cloro/litro) por 30 minutos, lavando luego con agua corriente varias veces. Un posterior remojo por 12 horas con agua corriente aseguró la eliminación de inhibidores. Se usaron cajas de Petri como germinadores, disponiendo según se estila.

Las semillas se colocaron sobre el papel de filtro, el líquido de irrigación se agregó al espacio fondo-tapa ascendiendo por capilaridad y tomado por las semillas.

Como líquido de irrigación para testigo se usó solución de Hoagland-Arnon (1938) y para problema, solución de Hoagland con CIPC, concentración final $2{,}39 \times 10^{-3}$M del herbicida.

La incubación se efectuó en estufa bacteriológica a 20°C ± 0,5°C hasta 7 días como máximo, evitándose la deshidratación al irrigar diariamente con los correspondientes líquidos. En el gabinete de la estufa se colocó un recipiente humidificador del ambiente.

La determinación de la actividad argininadecarboxilasa se realizó según Najaar (1957) utilizando el respirómetro de Warburg Braun, modelo 495.

Los reactivos usados fueron:

- Sustrato: solución de monoclorhidrato de L-arginina 0,5 M.
- Solución reguladora de acetatos 0,5 M, ajustada a pH 5,2.
- Enzima: no se la extrajo, estaba contenida en las semillas.

Aproximadamente 2 g de semillas se pesaron en balanza Mettler S4, luego se trozaron en finas rebanadas, espesor 0,5 mm aproximadamente. Las rebanadas se trasvasaron cuantitativamente a los vasitos de reacción y se les adicionaron 2 ml de solución reguladora. En la rama lateral se colocaron 0,5 ml del sustrato. El período de equilibración fue de 10 minutos, luego se verificó la reacción según técnica habitual. Las lecturas se realizaron cada 10 minutos y hasta 70 minutos de iniciada la reacción. Se montaron los sistemas testigo y problema, por triplicado, dos termobarómetros y un blanco, en cada uno de los días estudiados (1°, 3°, 4°, 5°, 6° y 7°). Se operó a 28,5°C.

RESULTADOS

Los volúmenes del dióxido de carbono (CO_2) producidos por la decarboxilación de la arginina se indican en la Figura 1 (valores expresados en microlitros de dióxido de carbono por gramo de material vegetal: µl CO_2/g). Son valores promedio de triplicados de cada caso y de 30 series de experimentos

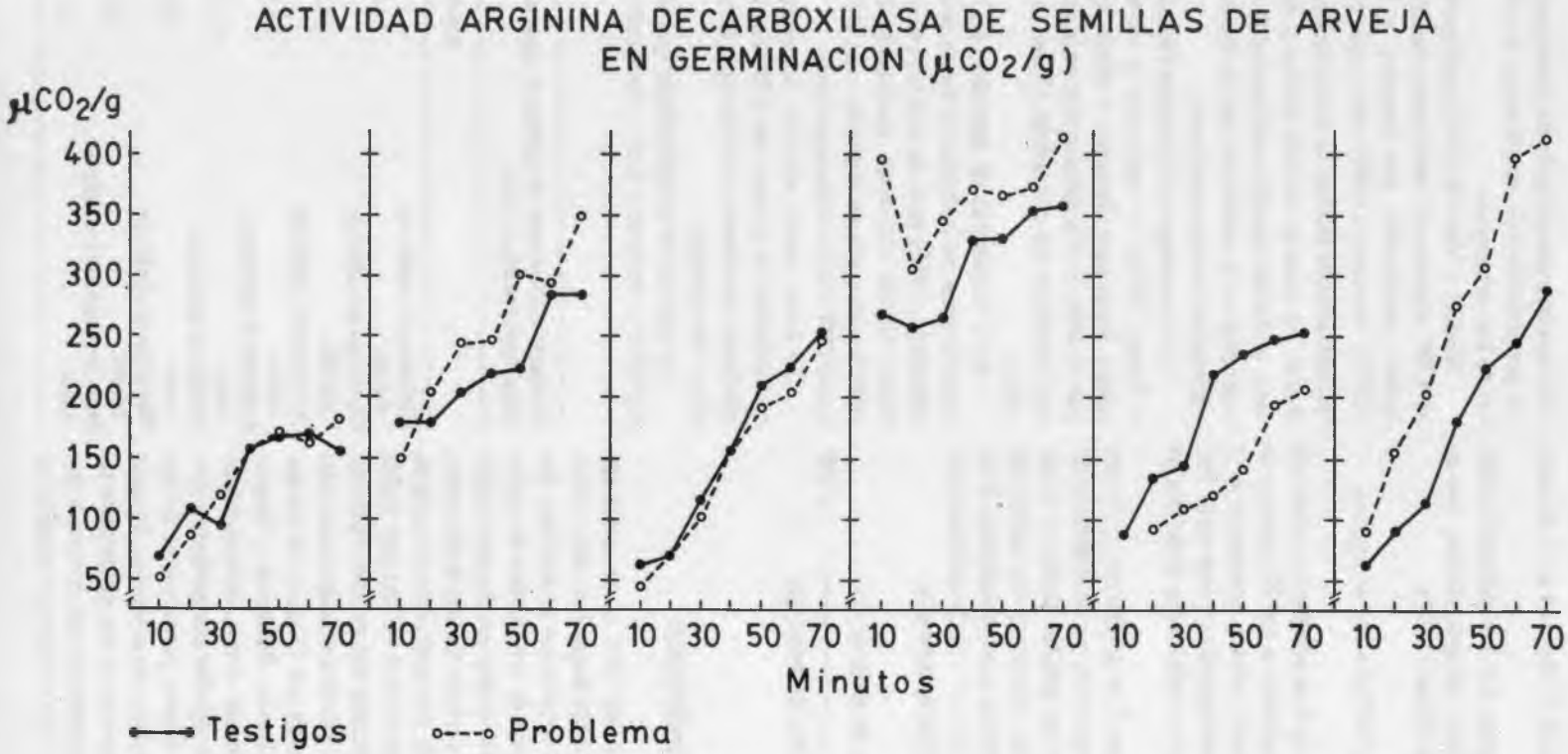


Figura 1: Valores de los volúmenes correspondientes a la evolución del CO_2 de semillas testigos y tratadas hasta 70 minutos, tiempo máximo del experimento.

realizados desde el 1º de abril al 31 de octubre de 1973.

En los Cuadros 2 y 3 se indican los miligramos de arginina decarboxilados, que se calcularon según Najaar (1957);

$$\text{ul } CO_2 \times 1{,}74/22{,}4 = \text{mg de arginina}$$

En el Cuadro 4 se señalan los valores de arginina decarboxilados a los 70 minutos de reacción, es decir, valores acumulativos y porcentuales considerándose como valor 100 por ciento el que se adicionara al sistema de reacción.

En la Figura 2 se graficaron en forma comparativa los pesos de los cotiledones y de las radículas de las semillas testigo y de las semillas problema, además de los valores del índice de desarrollo correspondientes a los días 3º, 4º, 5º, 6º y 7º. Se denomina índice de desarrollo (ID) a la expresión:

$$ID = \frac{\text{peso de radícula (g)}}{\text{peso de cotiledón (g)}} \times 100$$

DISCUSION

Las acciones del CIPC sobre metabolismo intermedio y fisiología han sido objeto de estudio y aún se prosigue en esa línea. Sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, Jandus (1964) señala que deprime la glucolisis con desvíos hacia el ciclo de las pentosas-fosfato (CPP), con inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CTA) por influir en las oxidoreductasas del mismo. Tanto sacarosa como los glúcidos reductores solubles (GRS) se aumentan por bloqueo de sus respectivos metabolismos. Wilkinson y Harcastle (1971) estudiando el metabolismo lipídico en semillas de algodón comprobaron alteraciones de los valores porcentuales de ácidos grasos saturados y no saturados. Salimen *et al.* (1970) demostraron un significativo retardo de la biosíntesis de los carotenos por efecto del CIPC. Los numerosos estudios en este área han intensificado las investigaciones de permeabilidad de membrana y la influencia de los carbamatos.

Wassink y Van Elk (1961) indicaron que el CIPC deprime el fenómeno respiratorio, hecho corroborado por Sweeney y Mash (1971). Moreland (1980) señaló que los N-fenilcarbamatos inhiben la fosforilación oxidativa. En casos de división celular y de mitosis, el déficit energético del microtúbulo se traduciría en la inhibición del movimiento y orientación de los cromosomas.

La fotosíntesis se disminuye (Woodford y Evans, 1963), lo cual sería la causa del efecto fitotóxico (Sweeney y Mash, 1971) que se debería a la disminución de la capacidad fotolítica del cloroplasto (Wilson *et al.*, 1981).

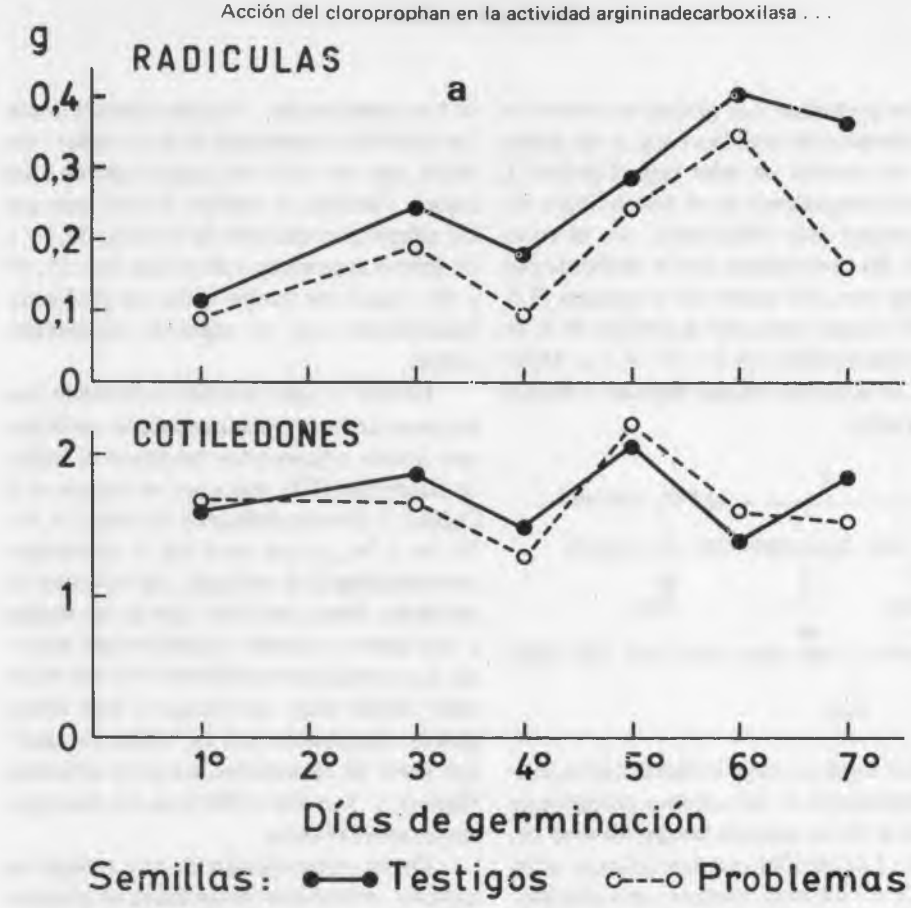
En la biosíntesis de proteínas los N-fenilcarbamatos no influyen en forma acusada (Moreland, 1980) pero en vegetales se determinan figuras mitóticas anormales. Diehl (1977) indica que en animales y en el hombre el CIPC tiene acción teratógena.

La breve reseña anterior demuestra la multiplicidad de acciones del CIPC en el metabolismo intermedio y en fisiología (respiración y fotosíntesis).

La arginina es un aminoácido que en los vegetales se encuentra libre y formando par-

CUADRO 1: Contenido de arginina de algunas proteínas vegetales (Pace, 1955).

	arginina %
Globulinas de semilla de zapallo	14,44
Globulinas de semilla de algodón	13,51
Globulinas de semilla de castor	13,19
Legumina de semilla de arveja	11,73
Vicilina de semilla de arveja	8,91
Phaseolina de semilla de poroto	4,87
Zeína (prolamina) de semilla de maíz	1,55



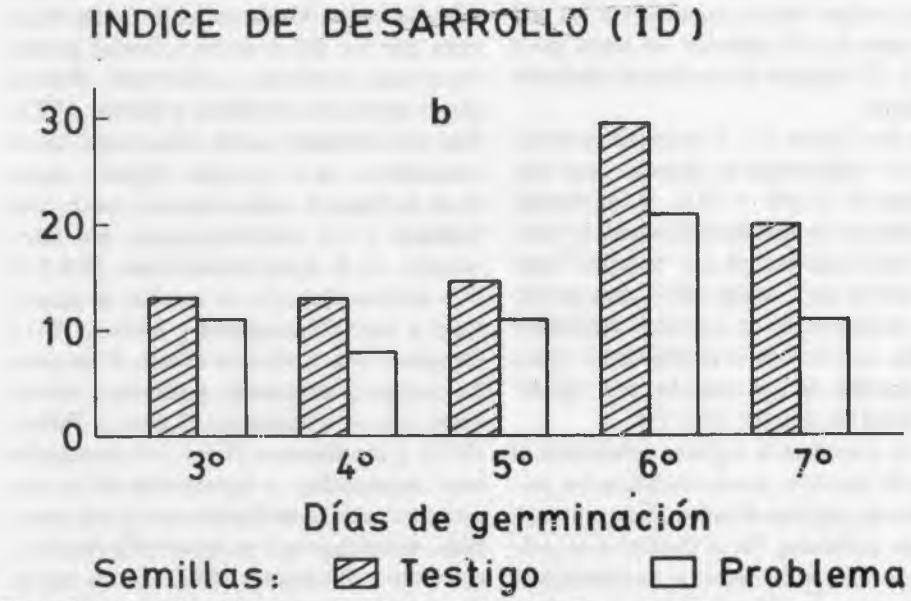
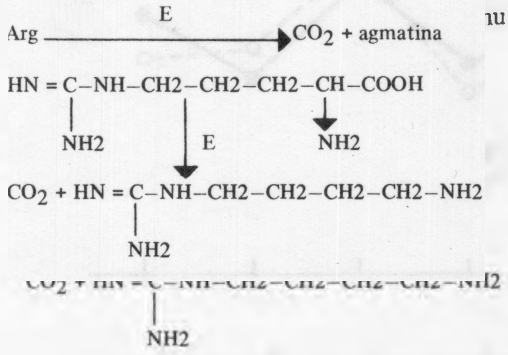


Figura 2: a) Pesos de cotiledones y de radículas. b) Indice de Desarrollo (ID)

te de las proteínas. Las globulinas tienen tenores elevados de arginina (Arg) y las prolaminas de cereales un valor bajo (Cuadro 1). La Arg es importante en el metabolismo vegetal porque está relacionada con el crecimiento. Su catabolismo puede realizarse por distintas vías, por acción de la arginasa (3.5. 3.1 EC) origina urea; con la catálisis de la argininadecarboxilasa (4.1.1.19 EC) se trans-



De la Figura 1 surge evidente que la actividad enzimática de las semillas problema es superior al de las semillas testigo los días 3º, 5º y 7º. Los perfiles correspondientes a los días 1º y 4º son muy similares, con una levísima superioridad de valores de las semillas problema, a los 70 minutos. El día 6º presentó un comportamiento anómalo pues las semillas testigo fueron superiores a las problema hasta los 50 minutos, en tanto que a los 60 y 70 minutos las problema superaron a las testigo.

En los Cuadro 2 y 3 están indicados los valores de miligramos de arginina cuya descarboxilación brindó el CO_2. Si los mismos se interpretan en sentido horizontal, se infiere que para cada uno de los "tiempos" estudiados (tanto para testigo como para problema) la evolución de la actividad enzimática se realiza acorde con el metabolismo típico de las semillas en germinación, con "picos" de actividad los días 3º, 5º y 7º.

Si se considera la arginina adicionada al sistema de reacción, puede calcularse los porcentuales de arginina decarboxilada por testigo y por problema. En el Cuadro 4 se indican estos valores de arginina decarboxilada acumulativo, a los 70 minutos, tiempo final de los experimentos. Resulta evidente la mayor actividad enzimática de las semillas problema que en todos los casos superan a las testigo. También se verificó en este caso que los valores porcentuales de los días 3º, 5º y 7º fueron superiores a los de los días 1º, 4º y 6º, tanto en testigo como en problema, concordando con lo expuesto precedentemente.

Durante la germinación se determinaron los pesos de los cotiledones y de las radículas que fueron relacionados mediante el Indice de Desarrollo (ID), datos que se anotan en el Cuadro 2. Se contabilizaron los días 3º, 4º, 5º, 6º y 7º, ya que en el día 1º no siempre se evidenciaba la la radícula. Las radículas de problema fueron menores que las de testigo y sus pesos promedio sensiblemente menores. Los cotiledones problema tuvieron en general menor peso que testigo y este hecho podría relacionarse con la "toma de agua" por parte de las semillas, como lo señalaran Wassink y Van Elk (1961) en sus investigaciones sobre el tema.

En los experimentos de este trabajo las mayores actividades enzimáticas se acompañaron con valores más bajos del ID, con excepción del día 6º que exhibió un comportamiento diferente. Además de verificarse esta diferencia entre los datos del ID, pudo observarse que los ápices de las radículas problema estaban necróticos, confirmando observaciones anteriores (Ordóñez y Alonso, 1973). Esta circunstancia podría relacionarse con el metabolismo de la agmatina. Según se observa en la Figura 3, esta substancia puede catabolizarse a 1-4 diaminopropano, por intervención de la agmatina-hidrolasa (3.5.3.12 EC), enzima descripta en semillas de girasol, maní y maíz (Yamagisawa y Suzuki, 1981). De actuar esta enzima en el caso de las semillas testigo se originarían poliaminas relacionadas con el crecimiento (Talbor y Talbor, 1976). Las poliaminas (PAs): 1-4 diaminobutano, espermidina y espermatina en los animales han sido identificados en tejidos tumorales, embrionarios y en hipertrofia hepática, entre otros (Moreland, 1980). En los vegetales, las PAs se encuentran relacionadas con

CUADRO 2: Actividad argininadecarboxilasa de las semillas testigo.

a- volúmenes de anhidrido carbónico liberados por gramo de semilla (µl CO_2/g)

Días de germinación	10	30	40	50	60	70
Tiempo/minutos						
10	68 ± 30	176 ± 105	59 ± 21	285 ± 103	82 ± 33	59 ± 20
20	105 ± 30	176 ± 82	63 ± 30	256 ± 121	130 ± 29	89 ± 32
30	91 ± 42	202 ± 11	113 ± 62	263 ± 143	139 ± 32	111 ± 40
40	155 ± 48	216 ± 72	157 ± 62	325 ± 184	213 ± 56	178 ± 52
50	161 ± 64	220 ± 53	206 ± 76	328 ± 150	231 ± 46	222 ± 64
60	164 ± 78	281 ± 90	223 ± 73	350 ± 107	245 ± 106	242 ± 90
70	154 ± 33	276 ± 77	243 ± 91	350 ± 107	250 ± 79	286 ± 68
b- miligramos de arginina decarboxilados: µlCO_2 xl 74/22,4 (Najaar, 1957)						
10	5,28	13,66	4,58	22,14	6,37	4,58
20	8,16	13,66	4,89	19,88	10,09	6,91
30	7,07	15,69	8,78	20,43	10,41	8,62
40	12,04	16,78	12,19	25,24	16,54	13,83
50	12,51	17,09	16,00	25,48	17,94	17,24
60	12,73	21,82	17,32	27,19	19,03	18,79
70	11,96	21,43	18,87	27,19	19,41	22,21

CUADRO 3: Actividad argininadecarboxilasa de semillas problema.

a- volúmenes de anhidrido carbónico liberados por gramo de semilla

Días de germinación	10	30	40	50	60	70
Tiempo/minutos						
10	49 ± 14	152 ± 54	42 ± 9,8	395 ± 47	34 ± 14	85 ± 20
20	85 ± 33	208 ± 73	73 ± 22	306 ± 158	95 ± 15	154 ± 34
30	120 ± 25	239 ± 58	101 ± 36	344 ± 140	119 ± 32	227 ± 67
40	156 ± 49	240 ± 65	156 ± 69	372 ± 137	143 ± 36	274 ± 75
50	161 ± 54	307 ± 136	198 ± 65	369 ± 124	189 ± 80	329 ± 97
60	170 ± 58	290 ± 79	236 ± 69	372 ± 110	290 ± 98	402 ± 103
70	174 ± 51	357 ± 165	250 ± 87	434 ± 98	318 ± 110	420 ± 86
b- miligramos de arginina decarboxilados * µl CO_2 xl, 74/22,4 (Najaar, 1957)						
10	3,80	11,80	3,26	30,68	2,64	6,60
20	6,60	16,16	5,67	23,30	7,38	11,96
30	9,32	18,56	7,84	26,72	9,24	17,63
40	12,12	18,64	12,12	28,89	11,11	21,28
50	12,50	23,84	15,38	28,66	14,68	25,55
60	13,20	22,53	18,33	28,89	22,52	31,22
70	13,51	27,74	19,43	33,71	24,70	32,59

* Acumulativo.

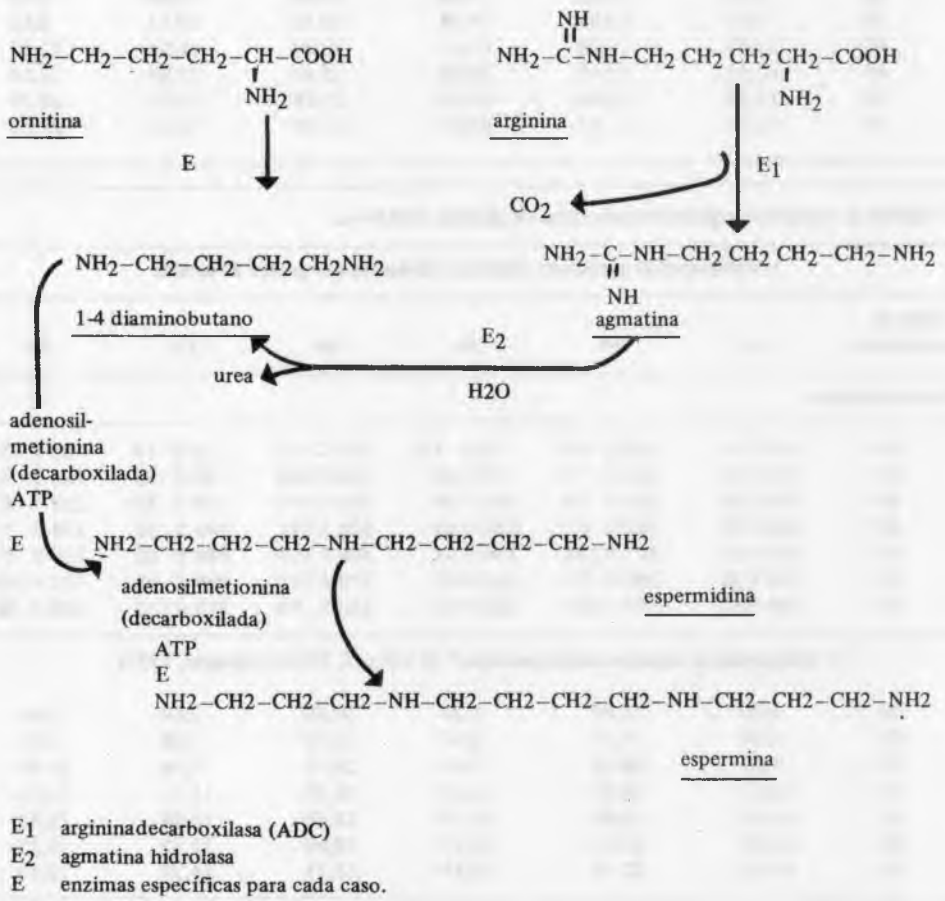
CUADRO 4: Valores porcentuales de argininadecarboxilasa a los 70 minutos de iniciada la reacción.

Semillas	Testigo	Problema
Días de germinación		
1o	27,49	31,06
3o	49,29	63,77
4o	43,39	44,65
5o	62,50	77,49
6o	44,62	56,78
7o	51,06	74,92

Calculados considerando como 100% el contenido de arginina presente en los 0,5 ml de solución 0,5M de sustrato.

las hormonas vegetales: GA_3 y etileno (Yao Ren Dai *et al.*, 1982; Even Chen *et al.*, 1982, respectivamente).

En las semillas problema, si se produce la acumulación de la agmatina, ésta podría actuar desacoplando la cadena respiratoria, por su naturaleza amina (Moreland, 1980) y la alteración de la respiración tisular podría ser la causa de la necrosis observada. Dado que en las semillas problema se verificó un retardo de desarrollo, y que los ápices de las radículas se presentaban necróticos, se estima que la agmatina no debe catabolizarse en dichas semillas con la misma intensidad que en las testigo.



E_1 argininadecarboxilasa (ADC)
E_2 agmatina hidrolasa
E enzimas específicas para cada caso.

Figura 3: Esquema de la biosintesis de poliaminas.

CONCLUSIONES

Los experimentos realizados permitieron comprobar actividad argininadecarboxilasas en semillas de arveja en germinación.

El Cloropropham (CIPC) influye en el catabolismo de la arginina, vía agmatina, determinando, además, alteraciones en el crecimiento de las radículas, lo cual se manifiesta en los valores del índice de desarrollo (ID).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la técnica Sra. Zelmira Galasso de Jacquet por sus asistencia técnica en las determinaciones respirométricas. Al agrónomo Pablo Bianchini de la EERA-INTA San Pedro por suminitrar en 1973 el material usado ese mismo año.

BIBLIOGRAFIA

1) Corsini, D., G. Stallknecht and W. Spark, 1978. A simplified method for determing sprout inhibiting levels of Chloropropham (CIPC) in potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (4): 990-996.
2) Diehl, J. F., 1977. Preparation for marketing irradiated potatoes and onions in the Federal Germany Republic. Food preservation by irradiation. Vol. I-Proceeding of Symposium, Wageningen, nov. 1977. IAEN, Holanda.
3) Even-Chen, Z., A. K. Matoo and R. Goren, 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxivinylglicines and by poliamines shunts label from 3,4 (^{14}C) methionine into spermidine in aged oranges peel discs. *Plant Physiol.*, 69: 385-388.
4) Hoagland, D. R. and D. Arnon, 1938. Cultivating water for growth plants without earth. Circ. 347 Univ. California, Agric. Exptl Stat. Berkeley, California.
5) Jandus, L., 1964. The Physiology and Biochemistry of Herbicides. Ed. Academic Press. N.Y.
6) Kokkalos, T. L., 1975. Control of potato sprouting. Agric. Res. Inst. Ministery of Agric. and Nat. Resources Nicosia Cypress. Techn. paper Nº 8, 7 pág.
7) Mondy, N., 1978. The effect of sprout inhibition on the quality of potatoes. International Congress of Food Sci. and Techn. Abstracts p. 281.
8) Moreland, D., 1980. Mechanism of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 597-638.
9) Najaar, V. A., 1957. Determination of aminoacids by specific bacterial decarboxylases in the Warburg apparatus. Methods in Enzymology, Vol. IIII, pág. 462 (eds Colowick S.P. and Kaplan N.O.). Ed. Academic Press N.Y.
10) Ordóñez, C. R. y S. Contreras, 1970. Papas chips-I-Conservación del tubérculo y aplicación de inhibidores. *Tecnología Alimentaria*, 4 (23): 35-36.
11) Ordóñez, C. R., 1971. Acción del Cloropropham y factores ambientales sobre la conservación de papas. *Rev. Inst. Bolsa de Cereales*, 96 (2839): 35-37.
12) Ordóñez, C. R. y S. A. Alonso, 1971. Determinación por respirometría de la actividad glutámicodecarboxilasa en tubérculos de papas tratados con Cloropropham. *Rev. ABA*, 36 (194-195): 132-135.
13) Ordóñez, C. R. y S. A. Alonso, 1973. Influencia del Cloropropham en la actividad fitásica de semillas de arveja en germinación. *Rev. ABA*, 38 (209-210): 260-265.
14) Ordóñez, C. R. y S. A. Alonso, 1976. Influencia del Cloropropham (CIPC) en el metabolismo del fósforo y de la arginina en semillas de arveja en germinación. *Rev. ABA*, 41 (227): 227-232.
15) Pace, J. "Seed Protein" in Peach K. and Tracey M. V., "Modern Methods of Plant Analysis" t IV, pág. 83 (1955).
16) Salimen, K., A. Karinpaa and P. Koivoistoinen, 1970. Chemistry of plant commodities and modified by post-harvest application of isopropyl N - (3 chlorophenyl) carbamate (Chloroproham, CIPC). *Acta Agri. Scand.*, 20: 35-48.
17) Sanwal, B. and Madhu Lata,1965. Enzymes of aminoacids metabolism, citado en Peach K. and Tracey M. V., t VII, 290-360.
18) Schippers, A., 1975. Influence of storage conditions on chip colour of potatoes. *Pot. Res.*, 18: 479-494.
19) Sweeney, J. P. and A. C. Marsh, 1971. Effect of selected herbicides on provitamin A content of vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 19 (5): 854-856.
20) Talbor, C. W. and H. Talbor, 1976. 1-4diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.*, 45: 295-306.
21) Wassink, E. C. and B. C. M. Van Elk, 1961. An apparent inhibition by CIPC of respiration in germinanting pea-seeds simulated by a morphogenetic reaction. *Med. Land. Wageningen. Nehertland*, 61 (17): 1-14.

22) Wiekison, E. R. and W. S. Hardcastle, 1971. Influence on-cotton seed oil quality. *J. Agr. Food. Chem.*, 19 (5): 851-853.

23) Wilson, A. M., A. A. Bushway and J. R. Bushway, 1981. Residue analysis of isopropyl-N (3-chlorophenyl) carbamato in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (4): 746: 749.

24) Woodford, E. R. and S. A. Evans, 1963. Weed Control Handbook, 3erd ed., Ed Blackwell B. H., pág. 356.

25) Yao-Ren Dai, R. Kaur-Sawhney and A. W. Galston, 1982. Promotion by gibberellic acid of polyamine biosynthesis in internodes of light-grown ward peas. *Plant Physiol.*, 69 (1): 103-106.

26) Yanagisawa, H. and J. Suzuki, 1981. Corn Agmatine Iminohydrolase purification and properties. *Plant Physiol.*, 67 (4): 697-700.