

# FORMAÇÃO DE DI- E POLIAMINAS EM PLANTAS DEFICIENTES EM POTÁSSIO E MAGNÉSIO

*Luiz Carlos Basso*

Auxiliar de Ensino do Departamento de  
Química da Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiróz", da Universidade de  
São Paulo

ORIENTADOR:

*Prof. Dr. Otto J. Crocimo*

Dissertação apresentada à Escola  
Superior de Agricultura "Luiz de  
Queiróz", da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de  
Mestre.

PIRACICABA -  
Estado de São Paulo - Brasil  
- 1974 -

Ao Professor Otto J. Crocomo,

DEDICO E  
OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Otto J. Crocomo pelo incentivo constante e a quem devo minha formação científica.
- Ao Professor Terence A. Smith pela orientação na fase experimental deste trabalho bem como pelas valiosas críticas e sugestões.
- Ao Professor E.J.Hewitt, Chefe da Secção de Fisiologia Vegetal da Long Ashton Research Station (Bristol, Inglaterra), pela acolhida e pelas facilidades oferecidas.
- À Agencia Internacional de Energia Atômica (IAEA, Viena) pela concessão de uma Bolsa de Estudos, durante a qual este trabalho foi realizado.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na pessoa de seu Diretor, Professor Admar Cervellini.
- Ao Projeto PNUD BRA/71/556 na pessoa de seu diretor Inter nacional, Dr. Carl. G. Lamm.

## I N D I C E

página

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| I - INTRODUÇÃO . . . . .              | 01         |
| II - REVISÃO DA LITERATURA . . . . .  | 04         |
| III - MATERIAL E MÉTODOS . . . . .    | 09         |
| IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . . | 17         |
| V - CONCLUSÃO . . . . .               | 28         |
| VI - RESUMO . . . . .                 | 30         |
| VII - SUMMARY . . . . .               | 32         |
| VIII - BIBLIOGRAFIA . . . . .         | 34         |
| IX - APÊNDICE . . . . .               | 40         |
| Tabela 1 . . . . .                    | <i>i</i>   |
| Tabela 2 . . . . .                    | <i>ii</i>  |
| Tabela 3 . . . . .                    | <i>iii</i> |
| Tabela 4 . . . . .                    | <i>iv</i>  |
| Tabela 5 . . . . .                    | <i>v</i>   |
| Tabela 6 . . . . .                    | <i>vi</i>  |
| Gráfico A . . . . .                   | <i>vii</i> |

## I - INTRODUÇÃO

Embora o potássio seja um elemento essencial requerido em quantidades apreciáveis para que as plantas superiores manifestem um crescimento adequado, pouco se sabe a respeito de suas funções metabólicas. É o mais abundante catiônio no suco celular, apresentando-se em concentrações superiores a 0.05 N; supõe-se que todo o potássio se encontre na forma iônica, pois que ainda não foi observado integrando moléculas orgânicas.

Entretanto, nada menos que meia centena de enzimas têm sido relatadas na literatura como sendo ativadas pelo iônio potássio, demonstrando a implicação de tal elemento em diversas reações bioquímicas. Estudos cinéticos, espectrofotométricos, eletroforéticos e outros, tem evidenciado a habilidade do potássio em alterar a conformação espacial das moléculas de enzimas resultando numa maior ou menor exposição dos centros ativos, e a necessidade de uma elevada concentração de potássio no suco celular pode estar relacionada com a não formação de complexos estáveis com moléculas proteicas,

comparáveis com aqueles que se formam com muitos metais de transição (EVANS e SORGER, 1966).

Com o intuito de melhor conhecer o papel metabólico desempenhado pelo potássio na nutrição de plantas superiores, uma série de trabalhos foram efetuados relatando os efeitos ocasionados pela deficiência de tal elemento; o aumento na fração nitrogenada solúvel e a diminuição no teor de proteínas foram as primeiras evidências no sentido de se atribuir ao potássio alguma implicação com a síntese proteica.

Com respeito ao metabolismo dos compostos nitrogenados, a descoberta de que uma amina, putrescina, se acumulava em plantas de cevada deficientes em potássio (RICHARDS e COLEMAN, 1952) se revestiu de algum interesse; isto porque putrescina atingia níveis tóxicos, sendo, pelo menos em parte, responsável pelos sintomas característicos da deficiência do citado elemento (COLEMAN e RICHARDS, 1956). A partir de então, diversos trabalhos foram realizados, evidenciando ser de ocorrência universal no reino vegetal o acúmulo dessa diamina como resposta a um suprimento inadequado de potássio: oito espécies vegetais pertencentes a cinco famílias (SMITH, 1963) e a bactéria *Escherichia coli* (RUBENSTEIN et al., 1972) acumularam putrescina quando cultivadas em meio carente em potássio.

Embora se conheça com bastante detalhes as vias metabólicas pelas quais putrescina é formada, a razão ou razões que levam a célula deficiente em potássio a sintetizar e acumular essa diamina ainda é assunto para algumas especulações. Enquanto alguns pesquisadores lhe atribuem a responsabilidade de manter o equilíbrio iônico, que ter-se-ia alterado devido à deficiência de potássio (COLEMAN e RICHARDS, 1956), outros afirmam que ela pode desempenhar funções relevantes no metabolismo celular, uma vez que já foi evidenciada a essencialidade desta amina nos processos metabólicos de alguns organismos (STEVENS, 1970; COHEN, 1971).

Embora as enzimas envolvidas na síntese de putrescina demonstrem maior atividade em condições de deficiência de potássio, elas não são diretamente afetadas pelo íon potássio (SMITH, 1963; SMITH, 1965); por outro lado, putrescina também se acumula em virtude da deficiência de magnésio em cevada (SMITH, 1973).

Putrescina é precursora imediata das poliaminas espermina e espermidina, amins estas de crescente importância fisiológica, pois que tais substâncias apresentam a faculdade de promover o crescimento de diversos organismos; ainda mais, tais amins estão frequentemente associadas com sistemas de crescimento rápido, normal ou patológico (COHEN, 1971). Assim, putrescina e as poliaminas espermina e espermidina são detectadas em quantidades razoáveis em embrião de cereais (MORUZZI e CALDARERA, 1964) bem como em tumores de plantas (BAGNI et al., 1972) ou de animais (RUSSEL, 1971; COHEN, 1971; WILLIAMS-ASHMAN, 1972), estando ainda relacionadas com a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (COHEN, 1971; STEVENS, 1970). Por outro lado, tanto putrescina como as poliaminas mencionadas, apresentam variações em seus teores quando da deficiência de potássio ou magnésio, quer em microrganismos (VIOTTI et al., 1971) ou em plantas de cevada (SMITH, 1970a; SMITH, 1973).

Tais evidências, acrescidas do fato de que tanto o potássio como o magnésio estão implicados na síntese de proteínas, constituíram suficiente motivação para a realização do presente trabalho, buscando algumas indicações nos teores e intensidade de síntese das amins com o objetivo de melhor compreender o acúmulo de putrescina em plantas sob condições de deficiências dos referidos minerais. Ademais, até o presente momento, não se sabe se o acúmulo de putrescina devido à deficiência de magnésio venha a ser tão generalizado entre as espécies vegetais assim como o é na deficiência de potássio.

## II - REVISÃO DA LITERATURA

A amina putrescina foi relatada ocorrer em quantidades apreciáveis em plantas de cevada submetidas à condição de deficiência de potássio (*RICHARDS e COLEMAN, 1952*) e o caráter tóxico dessa amina foi relacionado com os sintomas característicos daquela deficiência mineral (*COLEMAN e RICHARDS, 1956*).

As vias metabólicas de síntese de putrescina têm sido extensivamente estudadas em plantas superiores, animais e microrganismos. Enquanto que em células animais (*PEGG et al., 1970; KAY e LINDSAY 1973; WYATT et al., 1973*) e microrganismos (*MORRIS e PARDEE, 1966; TABOR e TABOR, 1969*) o aminoácido ornitina, mediante descarboxilação, constitui um caminho de fácil acesso à formação de putrescina, em plantas superiores arginina (*SMITH e RICHARDS, 1962*) e citrulina (*MARETZKI e NICKELL, 1969; CROCOMO et al., 1970; BASSO, 1973*) demonstraram ser os precursores mais imediatos.

Em cevada, espécie vegetal onde melhor foi estudada, a sín-

tese de putrescina se inicia com a descarboxilação enzimática de arginina (*SMITH, 1963*) originando a amina agmatina. A seguir esta amina se transforma em N-carbamilputrescina (N-CP), sendo este composto hidrolisado à putrescina pela enzima N-carbamil-putrescina amidoidrolase (*SMITH, 1965*). Ainda segundo esse autor, esta enzima e a descarboxilase de arginina, exibindo maior atividade em plantas deficientes em potássio, devem se apresentar em concentrações absolutas maiores, pois que o iônio potássio não tem efeito inibitório sobre as mesmas.

Procurando explicar o acúmulo de putrescina em plantas deficientes em potássio, *COLEMAN e RICHARDS (1956)* propuseram um mecanismo, admitindo que a deficiência de potássio altera o balanço interno entre cationios e aniônios inorgânicos, cuja tendência seria de aumentar a acidez do suco celular. Sugeriram então os autores, que o acúmulo de aminas básicas operaria como um mecanismo interno de compensação para manter o pH a um valor fisiologicamente adequado.

Alguns experimentos foram realizados procurando solidificar as bases sobre as quais este mecanismo homeostático se fundamenta. A descoberta de *GALE (1940)*, de que a descarboxilase de arginina em *Escherichia coli* exibia maior atividade quando o microrganismo era cultivado em meio ácido, e ainda o fato de que o pH do suco celular de algumas espécies vegetais era significativamente reduzido devido à deficiência de potássio, estimularam *SMITH e SINCLAIR (1967)* a realizarem um experimento, tentando simular as condições de desequilíbrio iônico (causado pela deficiência de potássio) pelo fornecimento de HCl 0,025 N à plantas de cevada através das raízes. Tal tratamento não alterou o conteúdo de potássio nas folhas, porquanto promoveu aumento nas atividades de descarboxilase de arginina e de N-carbamilputrescina amidoidrolase, duas enzimas responsáveis pela síntese de putrescina a partir de arginina; observou-se ainda elevação nos teores de agmatina e putrescina. Entretanto, o aumento no

teor de putrescina não pôde ser interpretado apenas pela maior atividade das enzimas envolvidas em sua síntese a partir de arginina, pois que o incremento sofrido por este aminoácido foi maior do que aquele ocorrido com a amina putrescina.

Em outra ocasião (*SMITH 1970b*) sugeriu que um sistema envolvido na síntese das enzimas responsáveis pela formação de putrescina fosse estimulado devido a uma redução no pH do suco celular. A deficiência de potássio aceleraria a formação de tais enzimas que produziriam então as aminas básicas, mantendo constante o valor da concentração hidrogeniônica. Este sistema seria de um controle tão preciso que, em folhas de cevada, em extremas condições de deficiência de potássio, nenhuma redução no valor do pH do suco celular poderia ser detectada.

Em condições avançadas de deficiência de potássio, o teor de putrescina chega a superar 1% (com base na matéria seca), representando 10% do nitrogênio total, e ainda compensa até 30% o "deficit" de potássio em termos de equivalentes catiônicos (*MURTY et al. 1971*).

Acúmulo de putrescina também tem sido relatado ocorrer em plantas de cevada deficientes em magnésio (*SMITH, 1973*), e o mecanismo proposto por *COLEMAN e RICHARDS (1956)*, baseado no desequilíbrio iônico, não explica satisfatoriamente o acúmulo desta diamina nesta condição de deficiência. Não se sabe se as enzimas responsáveis pela síntese de putrescina a partir de arginina estejam mais ativas na deficiência de magnésio, embora já tenha sido proposto um segundo mecanismo sugerindo que putrescina seja formada para substituir o magnésio no metabolismo e funções dos ácidos nucleicos (*SMITH, 1973*).

Por outro lado, o acúmulo de putrescina em *Escherichia coli* cultivada em meio deficiente em potássio, parece não ser decorrência do "deficit" catiônico, pois que um decréscimo de 40% na concen

tração interna de catiônio monovalente não acarretou aumento significativo na síntese de putrescina (RUBENSTEIN *et al.*, 1972).

De outra feita, a deficiência de potássio ou de magnésio alteram os conteúdos das poliaminas espermina e espermidina, tanto em microrganismos (VIOTTI *et al.*, 1971; RUBENSTEIN *et al.*, 1972) como em plantas (SMITH, 1970a; SMITH, 1973), e estas poliaminas juntamente com putrescina, têm demonstrado certa atividade fisiológica, constituindo fator de crescimento para microrganismos, tecidos de plantas e de animais (SMITH, 1971).

Putrescina tem sido demonstrada como sendo o precursor imediato para a biossíntese das poliaminas espermina e espermidina (TABOR *et al.*, 1958; WILLIAMS-ASHMAN, 1972).

Foi observado que em um mutante auxotrófico de *Escherichia coli*, mesmo crescendo em condições de um suprimento restrito de ornitina e arginina, parte substancial destes aminoácidos entrando nas células eram utilizados na formação de poliaminas, evidenciando a necessidade fisiológica dessas aminas (TABOR e TABOR, 1969).

Ademais, tem sido demonstrado que as poliaminas parecem ser essenciais à divisão celular em *Escherichia coli*; experimentos conduzidos por INOUE e PARDEE (1970) sugerem que a relação molar entre putrescina e espermidina constitua um fator crítico para a divisão das células.

Muito da habilidade dessas aminas de se apresentarem fisiologicamente ativas, parece estar relacionada com a interação dessas substâncias com ácidos nucleicos. Assim as poliaminas se aderem fortemente às cadeias de DNA ou de RNA por meio de ligações eletrostáticas envolvendo o grupamento fosfato do ácido nucleico e o nitrogênio das aminas. Desse modo as poliaminas estabilizam a dupla hélice do DNA bem como permitem que uma cadeia única de RNA se dobre em uma configuração mais compacta tornando-o menos susceptível à a-

ção da ribonuclease. Apresentam também as poliaminas a faculdade de estimular as atividades de DNA e RNA polimerases, bem como de promover a associação das subunidades ribossômicas e ainda efetuar a ligação entre o aminoacil-tRNA e o ribossoma (STEVENS, 1970; COHEN, 1971).

O fato de que as poliaminas estimulam o crescimento de microrganismos e de tecidos de plantas e de animais é de particular interesse, e a interação dessas poliaminas com os ácidos nucleicos provavelmente forneça um mecanismo para esse estímulo. Este efeito foi primeiramente observado em 1949, quando HERBST e SNELL (citado por SMITH, 1972) identificaram no suco de laranja um fator necessário ao crescimento da bactéria *Hemophilus parainfluenzae* o qual foi demonstrado como sendo a diamina putrescina. A partir de então, diaminas e poliaminas se mostraram como sendo capazes de estimular o crescimento de bactérias (*Lactobacillus*, *Neisseria*, *Pasteurella* e *Veillonella*), fungos (*Aspergillus* e *Saccharomyces*), insetos (*Orizae phylus*) e culturas de células de cobaia e de plantas superiores. Além do mais, a habilidade da droga Talidomida de formar complexos com as poliaminas pode explicar as suas propriedades teratogênicas (SMITH, 1972).

Especialmente com referência às plantas superiores, COCUCCI e BAGNI (1968) demonstraram que putrescina e espermidina estimulam a incorporação de fenilalanina em uma preparação ribossômica obtida de tubérculos de *Helianthus tuberosus*, usando um sistema de síntese de proteínas com ácido poliuridílico. Observaram também os autores, que o teor de poliaminas rapidamente se eleva quando explantes de tubérculos foram incubados com ácido indolacético (AIA), e sugerem ainda a possibilidade de que, pelo menos em parte, o efeito do AIA em promover o crescimento e a síntese de proteínas depende da indução promovida pela auxina em ativar a síntese das poliaminas.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Material

Sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L., cultivar Zephyr), fava (*Vicia faba* L., cultivar Aquadulce Claudia) e espinafre (*Spinaceae oleracea* L., cultivar Noorman) foram semeadas em areia lavada contida em recipientes plásticos em casa de vegetação. O material foi dividido em vários lotes os quais eram diariamente umidificados com soluções nutritivas cuja composição é apresentada no Quadro nº 1, obtendo-se assim os diversos tratamentos. Os seguintes micronutrientes foram adicionados em cada tratamento na forma dos compostos e concentrações (em µg/ml) que se seguem: Fe-EDTA, 5,6;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0,5;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,06;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,07;  $H_3BO_3$ , 0,66;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,05; NaCl, 1,45;  $CoSO_4$ , 0,01;  $NaVO_3$ , 0,01 (SMITH, 1973).

As drogas químicas utilizadas, como sais minerais, reagentes analíticos e solventes cromatográficos, apresentavam a especifici

cação de pureza "p.e".

Nos ensaios com traçadores foram empregados L-arginina- $^{14}\text{C}$  (336 mCi/mM) e putrescina-1,4- $^{14}\text{C}$  (18.3 mCi/mM) obtidos do Radiochemical Centre (Amersham) e testados quanto à pureza radioquímica mediante a técnica cromatográfica.

Quadro nº 1 - Composição das soluções nutritivas em concentração milimolar.

| Componentes                        | tratamentos |      |      |      |      |      |      |
|------------------------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|
|                                    | 1           | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$            | 2.0         | -    | -    | -    | -    | 2.0  | -    |
| $\text{MgSO}_4$                    | 1.5         | 1.5  | -    | -    | 1.5  | -    | -    |
| $\text{CaCl}_2$                    | 4.0         | 4.0  | 4.0  | -    | 4.0  | 5.5  | 5.5  |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ | 1.33        | 1.33 | 1.33 | 1.33 | 1.33 | 1.33 | 1.33 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$      | 0.07        | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$           | 6.0         | 4.0  | 4.0  | 4.0  | 6.0  | 6.0  | 6.0  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$       | -           | 2.0  | 2.0  | 2.0  | -    | -    | -    |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4$           | -           | -    | -    | -    | 2.0  | -    | 2.0  |

## 2. Métodos

### 2.1. Ensaios

#### 2.1.1. Efeito das deficiências combinadas de catiões metálicos no teor de putrescina em cevada

Objetivando observar o efeito de deficiências de K, Ca e Mg combinadas ou não, realizou-se um ensaio no qual plantas de cevada

foram crescidas em casa de vegetação utilizando-se as soluções nutritivas apresentadas no Quadro nº 1. Como se observa, em alguns tratamentos foram efetuadas as substituições do  $K^+$  pelo  $Na^+$  e do  $Mg^{++}$  pelo  $Ca^{++}$ . Após 4 semanas de crescimento, quando eram visíveis os sintomas de deficiências (amarelecimento das folhas e redução no crescimento), a parte aérea foi colhida e amostras de 10 g foram rapidamente submetidas à dosagem de putrescina. Outra porção de folhas (5 g) foram utilizadas para determinação da matéria seca. A amostragem foi realizada com duas repetições.

### 2.1.2. Efeito das deficiências de K e de Mg nos conteúdos de putrescina e poliaminas

Plantas de cevada, fava e espinafre foram crescidas em casa de vegetação utilizando-se soluções nutritivas completa, deficiente em potássio e deficiente em magnésio (tratamento 1, 5 e 6 respectivamente, do Quadro nº 1). As folhas de cevada foram colhidas com as idades de 1, 4, 5 e 7 semanas, de fava com 5 semanas e de espinafre com 9 semanas. As amostras foram colhidas em duplicata. Porções de 10 g de folhas foram utilizadas para a dosagem de putrescina, espermina e espermidina, enquanto que a matéria seca era estimada em amostras de 5 g de folhas.

### 2.1.3. Efeito das deficiências de K e de Mg na biosíntese de agmatina e putrescina em cevada

Com a finalidade de se observar alterações na síntese das aminas agmatina e putrescina, a partir do aminoácido arginina por ocasião das deficiências de K e de Mg, realizou-se um ensaio utilizando-se de plantas de cevada com 16 dias de idade, alimentadas com soluções nutritivas correspondentes aos tratamentos 1, 5 e 6 do Quadro nº 1. As plantas tinham suas raízes descartadas e a parte aérea (5 g) com sua extremidade inferior mergulhada em um pequeno fras

co com 2 ml de solução aquosa contendo 2.5  $\mu\text{Ci}$  de L-arginina- $U-^{14}\text{C}$  constituía uma amostra.

Após absorção completa da solução radioativa (2 horas) o material foi deixado em casa de vegetação mantido em água destilada. Amostras correspondentes às 5 g foram tomadas após os períodos de 2 e 24 horas e no material vegetal foram determinadas as radioatividades em agmatina e putrescina. Outras amostras (10 g), tomadas em duplicata, não tratadas com arginina radioativa, foram utilizadas para as dosagens dos teores de arginina, agmatina e putrescina.

#### 2.1.4. Efeito das deficiências de K e de Mg na biosíntese de espermidina e espermina em cevada

Neste ensaio, porções da parte aérea (5 g) de plantas de cevada com 16 dias de idade, correspondentes aos tratamentos 1, 5 e 6, absorveram 2.0  $\mu\text{Ci}$  de putrescina-1,4- $^{14}\text{C}$  dissolvidos em 2.0 ml de água destilada. Como anteriormente descrito, a parte aérea com a extremidade inferior mergulhada na solução radioativa constituía uma amostra. O ensaio foi conduzido com duas repetições.

Após absorção da solução radioativa que se completou após um período de 2 horas, as folhas foram mantidas por 24 horas com água destilada em casa de vegetação. O material foi então colhido e submetido à dosagem de putrescina, espermina e espermidina, tanto no que se refere aos seus teores em massa bem como às suas radioatividades.

#### 2.2. Determinações de arginina e agmatina

Amostras de 10 g de folhas foram extraídas com etanol 80% (v/v) em homogeneizador Virtis durante 1 minuto. Ao homogeneizado foram adicionados 10 ml de ácido acético glacial e o material foi centrifugado a 5.600 x g durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi

evaporado até resíduo sêco, sob vácuo a 60°C e retomado em 10 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.1 N, sendo em seguida cromatografado por agitação durante 1 hora em presença de 1 g de resina Amberlite IRC-50 ( $\text{H}^+$ ) contida em frasco de 250 ml com tampa esmirilhada.

Após lavagem da resina com 10 ml de água destilada, arginina foi eluída pela agitação da resina com 10 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4 N, durante 30 minutos. Uma segunda fração contendo a amina agmatina, foi obtida pela agitação da resina com 10 ml de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , durante 30 minutos (SMITH, 1973). A seguir as soluções foram evaporadas até resíduo sêco e retomadas em água destilada de cujas soluções alíquotas foram submetidas às dosagens de arginina e agmatina pela reação de Sakaguchi segundo método descrito por SMITH (1963). As leituras de densidade ótica a 490 nm foram efetuadas em espectrofotômetro Unican e transformadas em concentrações com auxílio de retas padrões previamente elaboradas com os compostos a serem estimados.

### 2.3. Determinações de putrescina, espermidina e espermina

O método empregado consistia em uma adaptação feita por SMITH (1973). O material vegetal foi extraído com ácido tricloroacético a 5% (8 ml/g de matéria fresca) pela maceração em homogeneizador Virtis durante 1 minuto. Após centrifugação a 5.600 x g durante 5 minutos o sobrenadante foi agitado durante 1 hora em presença de 1 g de resina DOWEX 50 W x 8 ( $\text{H}^+$ ), 20-50mesh. A seguir a resina foi lavada com 20 ml de água destilada, sendo as aminas (putrescina, espermidina e espermina) extraídas pela agitação da resina com 10 ml de HCl 12 N durante 2 horas. A fração contendo as aminas foi evaporada até resíduo sêco, a 60°C sob vácuo e dissolvida em 1 ml de HCl 0.1 N. Desta solução alíquotas de 0.1 ml foram transferidas para tubos de ensaio com tampa esmirilhada, de 5 ml de capacidade, juntamente com 50 mg de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,2 ml de solução de cloreto de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonila (300 mg em 10 ml de aceto

na). A reação se processou por 16 horas à temperatura ambiente quando então 15 mg de prolina dissolvidos em 0,1 ml de água destilada foram adicionados. Após 60 minutos os derivados fluorescentes das aminas eram extraídos em 2.5 ml de tolueno por agitação mecânica durante 15 segundos. Os tubos eram então centrifugados e alíquotas de 10  $\mu$ l da camada de tolueno eram submetidas à cromatografia em camada delgada.

Foram empregadas placas de 20 x 20 cm com camada de gel de sílica (250  $\mu$  de espessura) que haviam sido ativadas a 100°C por 2 horas. Como solventes cromatográficos foram empregadas as misturas ciclohexana: acetato de etila (3:2) para a separação de putrescina, e ciclohexana: acetato de etila (1:1) para a separação de espermina e espermidina.

Logo após a separação cromatográfica que era acompanhada mediante iluminação da placa com luz ultra violeta, as mesmas eram retiradas da câmara e pulverizadas com 25 ml de uma mistura de trietanolamina: isopropanol (1:4). Após evaporação do isopropanol as placas eram mantidas sob vácuo em presença de gel de sílica como desidratante durante 20 horas.

A seguir as placas eram submetidas à análise usando-se um densitômetro Vitraton TLD 100. Media-se assim a intensidade de fluorescência a 507 nm de cada derivado de amina pela ativação dos compostos com luz de 365 nm. Como padrões, 0.1  $\mu$ moles de cada amina eram submetidos à reação para formação de derivados fluorescentes, e igualmente submetidos à cromatografia em camada delgada. Para se contornar o problema da desuniformidade das placas, juntamente com as amostras eram cromatografados os padrões. Respostas lineares eram observadas até a concentração de 5 mM de cada composto na fração amina.

#### 2.4. Determinação da radioatividade das aminas

O material vegetal tratado com arginina- $^{14}\text{C}$  (ensaio 2.1.3) foi extraído com ácido tricloroacético a 5% (8 ml/g de matéria verde) e segundo técnica descrita no item anterior a fração contendo as aminas (agmatina, N-carbamilputrescina, putrescina, espermidina e espermina) foi retomada em 0.5 ml de HCl 0.1 N. Alíquotas dessa solução foram cromatografadas em placas de camada delgada (200  $\mu$  de espessura) preparada com celulose em pó (Whatman CC-41) contendo 10% de amido solúvel. Como solventes cromatográficos as seguintes misturas foram empregadas: n-butanol:metietilcetona:amônia:água (5:3:1:1), n-butanol:ácido acético:água (4:1:1) e metilcelosolve:ácido propiônico:água (70:15:15) saturado com NaCl. Padrões das aminas eram aplicados juntamente com as amostras e a identificação das substâncias eram efetuadas após reação com solução de ninhidrina 0.5% em acetona. As regiões correspondentes às aminas eram removidas da placa e a celulose dispersa em 5 ml de tolueno contendo 50 mg de PPO (2,5-difeniloxazole) e 0,75 mg de POPOP (1,4-bis-(5-feniloxazol-2-il-benzeno) e submetido à contagem em cintilador líquido (sistema de cintilação líquida da Panax). Radioatividade em N-carbamilputrescina, espermina e espermidina foram desprezíveis (<3%) em comparação com aquela encontrada em putrescina.

A fração contendo as aminas referentes ao ensaio 2.1.4. após transformação de seus componentes nos derivados fluorescentes foi cromatografada em placas de camada delgada de gel de sílica como descrito no item 2.3. usando-se os sistemas de solventes ciclohexano:acetato de etila (3:2 e 1:1). As regiões fluorescentes correspondentes às aminas putrescina, espermidina e espermina, após serem removidas da placa e introduzidas em frascos de cintilação contendo 5 ml de mistura cintiladora, foram submetidas à contagem de sua radioatividade como anteriormente descrito.

A radioatividade das amostras foram sempre superiores ao do

bro daquela correspondente ao "back-ground" (50 cpm), a qual foi medida mediante contagem de uma área idêntica do cromatograma. A radioatividade detectada entre as regiões fluorescentes equiparava-se à do "background".

## 2.5. Determinação da atividade de descarboxilase de ornitina

A parte aérea de plantas de cevada deficientes em potássio (tratamento 5 do Quadro nº 1), com 16 dias de idade foi extraída em almofariz com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (2 ml/g de matéria verde) e o homogenizado centrifugado a 12.500 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi dividido em 3 porções que foram dializadas durante 20 horas contra tampão fosfato de valores de pH de 4.5, 6.5 e 8.5. Durante as preparações a temperatura foi mantida entre 2 e 3°C. Aliquotas de 2 ml dessas soluções foram incubadas com 0.5 ml de L-ornitina 25 mM em presença e em ausência de 100 µg de piridoxal fosfato, a 30°C. Após período de incubação de 0, 24 e 48 horas o material foi submetido à dosagem de putrescina por cromatografia de gás segundo SMITH (1970c). Nenhuma atividade de descarboxilase de ornitina pôde ser detectada.

#### IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 1. Efeito de deficiências minerais sobre os teores de aminos

O efeito de deficiências minerais sobre os teores de putrescina, espermidina e espermina foram estudados em cevada, fava e espinafre e os dados estão dispostos nas Tabelas 1 e 2.

O teor de putrescina se eleva em todos os tratamentos deficientes, sendo que o maior valor é observado em folhas deficientes em K, Ca e Mg simultaneamente. A substituição do K pelo Na não suprimiu o acúmulo de putrescina como fora observado por *COLEMAN e RICHARDS (1956)*; ao contrário, o teor dessa diamina é aumentado se expresso com base na matéria seca (Tabela 1).

O efeito da deficiência de magnésio em aumentar o conteúdo de putrescina é observado em cevada, espinafre e fava (Tabelas 1 e 2).

Deficiências de potássio ou magnésio alteram também os conteúdos das poliaminas espermina e espermidina. É particularmente interessante a observação de que tais deficiências acarretam diminuição nos teores de espermidina e espermina enquanto que o conteúdo de putrescina é aumentado (Tabelas 2 e 4). Entretanto tais observações não foram constatadas de maneira consistente em plantas de cevada com 28 e 49 dias de idade (Tabela 1); é conveniente ressaltar que tais plantas já exteriorizavam severos sintomas de deficiência (amarelecimento, necrose foliar e redução no crescimento), sugerindo profundas modificações celulares e conseqüentemente os teores das aminas no referido tecido podem não refletir as primeiras alterações bioquímicas ocorridas.

A observação de que o teor de putrescina se eleva enquanto que o conteúdo de espermidina é diminuído à medida que a folha envelhece (Tabelas 1 e 3), pode estar relacionada com a translocação de nutrientes para as porções mais novas da planta (CARR e PATE, 1967), ocasionando condições de deficiências minerais.

HOFFMAN e SAMISH (1971) observaram que uma redução de 50% no conteúdo de potássio nas folhas, induz um aumento no teor de putrescina de 15 vezes em macieira e de 20 vezes em videira. Concluíram os autores que o teor de putrescina é um indicador mais sensível para se avaliar o nível de potássio do que o teor do próprio elemento em questão. Entretanto, observações de MURTY et al. (1971) trabalhando com uva de corinto (*Ribes nigrum* L.) e NOWAKOWSKI e BYERS (1972) utilizando "falso centeio" (*Lolium multiflorum*), demonstraram que a formação de putrescina coincide com o aparecimento dos sintomas visuais da deficiência de potássio. Igualmente em cevada existe uma estreita relação entre o teor de amina (putrescina mais agmatina) e a proporção de brotos mortos, sugerindo que o teor de aminas não é melhor que os sintomas visuais na diagnose da deficiência de potássio (HACKETT et al., 1965).

No presente trabalho, as folhas de fava deficientes em potássio ou magnésio não mostraram nenhum sintoma visual por ocasião da colheita, embora os teores de putrescina já fossem significativamente elevados em ambos os tratamentos. O mesmo foi observado, neste ensaio, com folhas de ervilha (*Pisum sativum* L. cultivar Meteor) com 34 dias, que apresentaram teores de putrescina 270, 1230 e 2030 nmoles/g correspondentes aos tratamentos completo, deficiente em magnésio e deficiente em potássio respectivamente. Estes resultados sugerem que o teor de putrescina venha a ser um bom guia para se avaliar o *status* de potássio pelo menos nestes legumes. Entretanto o incremento no teor de putrescina não é característica exclusiva da deficiência de potássio: deficiência de magnésio igualmente acarreta elevação no conteúdo dessa diamina, e este fato deve ser considerado quando da pretensão de se avaliar o nível de potássio na planta pela dosagem de putrescina.

## 2. Efeito de deficiências minerais na síntese de aminas

COLEMAN e HEGARTY (1957) demonstraram a incorporação de radioatividade em putrescina quando D,L-ornitina-<sup>14</sup>C foi ministrada à plantas de cevada deficientes em potássio. Entretanto a rápida marcação de citrulina e arginina avanta a possibilidade de uma via indireta na formação de putrescina, independente da descarboxilação de ornitina.

Sabe-se que em gergelim (*Sesamum indicum*) a via preferencial de formação de putrescina é mediante descarboxilação de citrulina (CROCOMO et al., 1970; BASSO, 1973), enquanto que em cevada tem sido demonstrado que arginina vem a ser o precursor mais imediato (SMITH e RICHARDS, 1962).

No presente trabalho, extratos livres de células obtidos de folhas de cevada deficientes em potássio, dializados contra tampão fosfato de valores de pH correspondentes a 4.5, 6.5 e 8.5 não exibi

ram atividade de descarboxilase de ornitina. Entretanto, em extratos semelhantes a pH 6.5, a descarboxilase de arginina é ativa como já demonstrou *SMITH (1963)*. É, pois, bastante provável que arginina seja muito mais importante do que ornitina na formação de putrescina, desde que agmatina, o produto da descarboxilação de arginina, é rapidamente transformada em putrescina quando fornecida à plantas de cevada (*SMITH e RICHARDS, 1962*).

É então, de boa conveniência a utilização de L-arginina- $U-^{14}C$  para se aquilatar a intensidade de síntese das aminas agmatina e putrescina nas condições do presente experimento. Após correção dos valores devido à menor absorção de arginina radioativa pelas plantas correspondentes aos tratamentos deficientes e ainda pela diluição isotópica na arginina endógena, os dados relativos às atividades específicas, bem como formação líquida das aminas estão dispostos na Tabela 5. Um valor elevado para a atividade específica de agmatina, após um período de incubação de 2 horas, a despeito do maior teor dessa amina em plantas deficientes em potássio (Tabela 4) indica uma maior intensidade na formação de agmatina a partir de arginina.

Ainda pelos dados da Tabela 5, observa-se uma queda acentuada na atividade específica de agmatina entre 2 e 24 horas de metabolização, sugerindo intensa reciclagem dessa amina em plantas deficientes em potássio. Por outro lado, a atividade específica de putrescina neste mesmo período, permaneceu praticamente inalterada. Isto estaria indicando uma maior dificuldade de transformação deste composto devido à deficiência de potássio, contrastando bastante com a queda brusca na atividade específica de putrescina correspondente à testemunha. Assim também, a deficiência de magnésio retarda, porém com menor intensidade, a utilização de putrescina em posteriores transformações.

Entretanto, uma análise dos dados segundo este critério (de

atividade específica), pode estar comprometida devido à elevada concentração de putrescina, o que, por si só, teria o efeito de manter constante a atividade específica dessa diamina nos tratamentos deficientes.

Apesar desta limitação na interpretação dos resultados, observa-se pela Tabela 5, maior formação líquida de putrescina nos tratamentos deficientes, e ainda uma maior formação de agmatina na deficiência de potássio. Estes dados, cujos cálculos independem do teor de putrescina, interpretam satisfatoriamente os teores dessas aminas no material de trabalho (Tabela 4).

O não aparecimento de radioatividade em quantidade apreciável em N-carbamilputrescina (N-CP), que pudesse ser detectada pela técnica empregada, foi de certo modo inesperado, pois que há evidências de que esta amina é um intermediário na conversão de agmatina em putrescina em cevada (SMITH e GARRAWAY, 1964); plantas de cevada quando alimentadas com agmatina acumulam N-CP, o qual sob ação da enzima N-carbamilputrescina amidohidrolase se transforma em putrescina (SMITH, 1965). N-carbamilputrescina tem sido encontrada em quantidades consideráveis em cultura de células de cana-de-açúcar (MARETZKI e NICKELL, 1969) e em folhas de gergelim deficientes em potássio (CROCOMO et al., 1970). O fato de que no presente trabalho esta amina não pode ser detectada pelo método utilizado (cujo limite de sensibilidade dera de 50 nmoles/g), mesmo em condições de deficiência de potássio, sugere que este composto seja de existência efêmera em cevada.

Diversos experimentos têm demonstrado que putrescina é precursora das poliaminas espermina e espermidina em mamífero (PEGG e WILLIAMS-ASHMAN, 1969; PEGG et al., 1970), ave (RAINA, 1963), planta (SMITH, 1970b) e em *Escherichia coli* onde foi evidenciado que putrescina marcada simultaneamente com  $^{14}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  é incorporada integralmente nas moléculas de poliaminas (TABOR et al., 1958).

No presente experimento, putrescina-1,4- $^{14}\text{C}$  foi utilizada para se observar a formação de espermidina e espermina em plantas de cevada deficiente em potássio e deficiente em magnésio. A Tabela 6 mostra os dados, depois de corrigidos pela menor absorção de putrescina radioativa pelos tratamentos deficientes, e ainda devido à diluição isotópica desigual na putrescina endógena. Os resultados de monstram incorporação de radioatividade nas poliaminas espermina e espermidina. Observa-se ainda uma menor intensidade na formação de espermina principalmente em condições de deficiência de potássio.

Quanto à formação líquida de espermidina (Tabela 6) convém salientar que tais resultados, embora mostrando valores mais elevados para os tratamentos deficientes, merecem uma análise mais cuidada. Isto porque, os dados obtidos correspondem à uma amostragem tomada 24 horas após o fornecimento de putrescina- $^{14}\text{C}$ , e que, durante esse período, a atividade específica de putrescina em plantas deficientes em potássio permaneceu praticamente constante, enquanto que para a testemunha esse valor caiu bruscamente (Tabela 5). Tal efeito na atividade específica de putrescina resultaria em dados aparentes. Assim, o valor para a formação líquida de espermidina a partir de putrescina seria na realidade, para o tratamento controle, mais elevado do que aquele apresentado na Tabela 6. Os resultados seriam mais reais se a cinética do sistema fôsse estudada em menores intervalos de tempo, embora a possibilidade da existência de compartimentalização de *pools* metabólicos ainda dificultasse a interpretação dos dados.

### 3. Possíveis mecanismos para o acúmulo de putrescina em condições de deficiências minerais

Embora o mecanismo baseado no equilíbrio iônico, proposto por *COLEMAN e RICHARDS (1956)*, possa explicar razoavelmente o acúmulo de putrescina em plantas deficientes em potássio, ocorre certa dificuldade em se conceber o acúmulo dessa diamina em condições de

deficiência de magnésio. Isto porque a deficiência de magnésio não provoca diminuição no teor de potássio e ainda pelo fato do magnésio representar uma pequena proporção do total de cátions no suco celular (SMITH, 1973), a despeito do elevado teor de putrescina nestas condições (Tabela 1). Neste particular, é conveniente salientar que as substituições do potássio pelo sódio, e do magnésio pelo cálcio, nas soluções nutritivas, não foram eficientes em diminuir os teores de putrescina (Tabela 1).

O acúmulo de putrescina em folhas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) deficientes em potássio parece ser decorrência de uma diminuição na síntese protéica; nestas condições, o aminoácido arginina não utilizado na síntese de peptídeos, tem o seu teor aumentado, o qual, por efeito de massa e indução em sua descarboxilase contribui para a formação de putrescina (BASSO, 1973).

Sendo o magnésio necessário à síntese de proteínas (WEBSTER, 1961; BOULTER, 1970), o acúmulo de putrescina em plantas deficientes em tal nutriente, pode ser interpretado segundo o mecanismo anteriormente mencionado, em concordância com o aumento no conteúdo de arginina observado no presente experimento (Tabela 4).

A íntima relação entre putrescina e as poliaminas espermina e espermidina, e ainda a crescente importância fisiológica atribuída a essas aminas, demonstradas em recentes trabalhos com microrganismos, permite uma outra especulação sobre as razões metabólicas pelas quais plantas superiores acumulam putrescina em condições de deficiências de potássio ou magnésio.

Seria o acúmulo de putrescina realmente e tão somente para a manutenção do equilíbrio iônico e tornar constante o valor do pH do suco celular em condições de deficiência de potássio? Se a resposta é positiva, porque então ocorre o acúmulo dessa diamina em quantidades igualmente apreciáveis na deficiência de magnésio? Ora, a síntese de putrescina propicia a formação de dois íons amônio

( $\text{NH}_4^+$ ) por molécula de arginina degradada conforme o esquema apresentado no Gráfico A. O fato do  $\text{NH}_4^+$  substituir o  $\text{K}^+$  na ativação de uma série de reações enzimáticas em plantas superiores (*EVANS e SORGER, 1966*), sugere a possibilidade de que esses iônios formados possam, em parte, atenuar a carência de potássio em diversas reações bioquímicas. Mais ainda, a ligação não enzimática entre o aminoacil-tRNA e o complexo mRNA-ribossoma, em presença de extrato de *Escherichia coli*, requer  $\text{K}^+$  ou  $\text{NH}_4^+$  como demonstrou *NAKAMOTO et al. (1963)* (citado por *NITSOS e EVANS, 1966*). *LUBIN e ENNIS (1964)* estudaram os efeitos do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  na síntese de proteínas *in vitro* utilizando o sistema ácido poliuridílico com ribossomas de *Escherichia coli*; esses autores observaram que enquanto o  $\text{Na}^+$  tinha efeito antagônico ao  $\text{K}^+$  na síntese de proteína, o  $\text{NH}_4^+$  promovia uma incorporação de fenilalanina- $^{14}\text{C}$  de 2 a 4 vezes maior do que aquela obtida com  $\text{K}^+$ . Mais recentemente, *NAKAMOTO e HAMEL (1968)* demonstraram que  $\text{K}^+$  ou  $\text{NH}_4^+$  são efetivas na ativação dos ribossomos de *Escherichia coli* para a síntese de polifenilalanina.

Por outro lado, a atividade inadequada das enzimas responsáveis pela síntese das poliaminas espermidina e espermina a partir de putrescina, pode colaborar para o acúmulo desta última, pois que tais enzimas requerem potássio ou magnésio como metais ativadores. O produto da descarboxilação de S-adenosilmetionina doa um ou dos resíduos de propilamina à molécula de putrescina para formar espermidina e espermina respectivamente em *Escherichia coli* (*TABOR et al. 1958*). Embora pouco se saiba a respeito da enzima responsável pela formação de S-adenosilmetionina (S-adenosilmetionina sintetase) em plantas superiores, esta enzima isolada de leveduras ou de fígado de ratos, mostrou necessidade de um cátionio univalente que poderia ser igualmente satisfeita por  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{Rb}^+$  ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  e  $\text{Na}^+$  não eram efetivos), havendo ainda necessidade de elevada concentração de  $\text{Mg}^{++}$  para a mesma exibir ótima atividade (*MUDD e CANTONI, 1958*). Ainda mais, a enzima descarboxilase de S-adenosilmetionina isolada de brotos de feijoeiro tem sua atividade marcadamente aumentada quando

da adição de  $Mg^{++}$  ao meio de reação (COPPOC *et al.*, 1971). Portanto, uma redução na atividade dessas enzimas, devido à deficiência de potássio ou de magnésio, poderia acarretar acúmulo de putrescina com uma redução simultânea nos conteúdos de espermidina e espermina, como demonstram os dados das Tabelas 2 e 4.

Já é bem conhecida a habilidade "in vitro" demonstrada pelo magnésio em associar as subunidades ribossômicas 30S e 50S para formar a partícula 70S ativa na síntese protéica (GOLDBERG, 1966, citado por HURWITZ e ROSANO, 1967). Entretanto uma série de trabalhos têm evidenciado a intercambiabilidade entre  $Mg^{++}$  e espermidina em manter a estrutura dos ribossomas; em diversos organismos, espermidina tem sido demonstrada ser capaz de transferir  $^{14}C$ -aminoacil-tRNA para ribossomas em concentrações subótimas de  $Mg^{++}$  (COHEN, 1971). MARTIN e AMES (1962) demonstraram que o estímulo na incorporação dos aminoácidos nesta reação de transferência, pode ser atribuída à agregação das subunidades ribossômicas efetuada por espermidina e putrescina. Em concordância com resultados desta natureza, HURWITZ e ROSANO (1967) sugeriram que as funções atribuídas ao magnésio "in vitro" na síntese de proteínas, sejam desempenhadas pela espermidina quando aquele elemento se encontra em concentrações subótimas. Ainda neste particular, foi observado que em um "strain", de *Pseudomonas* deficiente em espermidina, a agregação das subunidades ribossômicas e a síntese de polifenilalanina foram propiciadas pela adição de putrescina (COHEN, 1971).

Mais interessante ainda foram os resultados de RUBENSTEIN *et al.* (1972), concluindo que a intensificação na síntese de putrescina verificada em *Escherichia coli*, cultivada em meio deficiente em potássio, serviria tanto para manter a força iônica adequada para a atividade de RNA polimerase, bem como estabilizar as moléculas de RNA recém sintetizadas, substituindo assim a espermidina no desempenho de suas funções. O fato de no presente trabalho ter sido observado (Tabelas 2 e 4) elevação nos teores de putrescina e diminuição

nos conteúdos de espermidina, em condições de deficiências de potássio ou magnésio, permite sugerir que putrescina desempenhe em plantas superiores funções idênticas àquelas observadas em *Escherichia coli*.

Em posse de tais evidências e considerações, pode-se admitir, conforme esquema proposto (Gráfico A), que a medida que a disponibilidade de potássio ou magnésio vão se tornando restritas, devido às condições de deficiência desses minerais, a síntese de proteínas fica afetada, quer diretamente pela falta desses metais ativadores no processo de incorporação dos aminoácidos em peptídeos, ou indiretamente devido ao bloqueio na síntese de espermidina. A formação de uma maior quantidade de iônios  $\text{NH}_4^+$  torna-se interessante, pois que estes podem atenuar a carência de  $\text{K}^+$  em diversas etapas na síntese protéica e mesmo favorecer a síntese de espermidina mediante ativação da enzima S-adenosilmetionina sintetase. A degradação de arginina, além de propiciar o aparecimento de iônios  $\text{NH}_4^+$ , leva à formação de putrescina, que possivelmente possa substituir a poliamina espermidina no desempenho de suas funções na síntese protéica, em condições de um suprimento inadequado de potássio ou magnésio.

Neste particular, é interessante salientar o efeito benéfico da adição de pequenas quantidades de  $\text{Rb}^+$  à plantas deficientes em potássio, quer em prevenir os sintomas de toxidês bem como em diminuir o conteúdo de putrescina e ainda permitir o crescimento nos primeiros estágios de desenvolvimento (WALL, 1940; COLEMAN e RICHARDS, 1956; BARKER e BRADFIELD, 1963). Embora o  $\text{Rb}^+$  não seja considerado elemento essencial às plantas, ele pode ativar a formação enzimática de S-adenosilmetionina (MUDD e CANTONI, 1958) para a síntese de espermidina e ainda, positiva e diretamente afetar a síntese protéica, pois que tal elemento demonstrou efetividade semelhante ao potássio em propiciar, "in vitro", a incorporação de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanina na presença de ácido poliuridílico e ribossomas de *Escherichia coli* (LUBIN e ENNIS, 1964).

Dada a universalidade com que plantas superiores respondem à deficiência de potássio e possivelmente à de magnésio, acumulando putrescina, é provável que durante o processo evolucionário, espécies hoje existentes adquiriram a capacidade de suportar condições de suprimento inadequado de determinados nutrientes. Parece, pois, razoável acreditar que a intensa formação de putrescina constitua um adequado mecanismo para a célula vegetal atenuar os efeitos das deficiências de potássio ou magnésio.

## V - CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente experimento permitem apresentar as observações e conclusões que se seguem.

A amina putrescina se acumula em plantas sob condições de deficiências de potássio ou magnésio, acúmulo este que parece ser de ocorrência generalizada entre as espécies vegetais.

A descarboxilase de ornitina parece não estar presente, pelo menos em cevada, onde putrescina é formada mediante descarboxilação de arginina. O acúmulo de putrescina se verifica com diminuição no conteúdo de espermidina.

O fato de que o potássio e o magnésio estão implicados na síntese de proteínas e ainda a observação de que em ambas as deficiências ocorre elevação nos teores de arginina, permitem a formulação de um único mecanismo para o acúmulo dessa diamina nestas condições de deficiências. Assim a deficiência de potássio ou magnésio

comprometeriam a síntese protéica, quer diretamente no processo de incorporação de aminoácidos em peptídeos, ou indiretamente, afetando a síntese de espermidina; resultaria, pois, o acúmulo de arginina e conseqüentemente de agmatina e putrescina. Para o acúmulo de putrescina, poderia ainda contribuir a dificuldade de sua utilização na síntese das poliaminas espermina e espermidina.

Pode-se então supor que a via metabólica pela qual putrescina seria sintetizada, constitui um dispositivo adequado, aperfeiçoado durante o processo evolucionário, para se atenuar os efeitos de tais deficiências minerais, no sentido de propiciar à célula vegetal alguma capacidade para realizar a síntese protéica em condições de um suprimento inadequado de potássio ou magnésio.

## VI - RESUMO

Com o objetivo de melhor compreender o significado e a razão do acúmulo de putrescina em plantas sob condições de deficiências de potássio ou magnésio, realizou-se o presente experimento, em busca de alguma relação com o metabolismo de poliaminas biogênicas de certa atividade fisiológica.

Para tal, plantas de cevada (*Hordeum vulgare*), fava (*Vicia faba*), espinafre (*Spinaceae oleracea*) e ervilha (*Pisum sativum*), foram crescidas em casa de vegetação, com soluções nutritivas completa e deficientes em potássio e/ou magnésio. Em alguns tratamentos foram efetuadas as substituições do potássio pelo sódio e do magnésio pelo cálcio. As folhas dessas plantas foram colhidas em diferentes tempos do seu desenvolvimento, e submetidas às determinações de arginina, agmatina, putrescina, espermina e espermidina.

Outros ensaios foram realizados, ministrando-se arginina-U-

$^{14}\text{C}$  à folhas jovens de cevada, procurando medir alterações na intensidade de degradação de arginina em agmatina e putrescina, devido às deficiências de potássio e de magnésio. No mesmo material vegetal procurou-se aquilatar a intensidade de síntese das poliaminas espermina e espermidina, empregando-se putrescina  $1,4\text{-}^{14}\text{C}$  como precursor.

Os aminoácidos e as amins foram extraídos das folhas com etanol 80% ou ácido tricloroacético a 5% e fracionados em resina de troca catiônica (DOWEX 50W-X8 e Amberlite IRC-50). Determinações colorimétricas foram empregadas para as dosagens de arginina e agmatina, enquanto que putrescina e as poliaminas espermina e espermidina foram estimadas pela técnica da fluorometria. As radioatividades dos compostos foram dosadas pela cintilação líquida.

Os dados demonstraram aumento na intensidade de síntese da amina putrescina nas deficiências de potássio ou magnésio, amina essa que é produzida mais pela degradação de arginina do que mediante a descarboxilação de ornitina.

Embora muitos aspectos bioquímicos e fisiológicos de tais amins ainda não estejam bem compreendidos, algumas considerações são apresentadas, no sentido de se propôr um único mecanismo para o acúmulo de putrescina em plantas deficientes em potássio ou magnésio, fundamentando-se na interação de di- e poliaminas em determinados processos metabólicos, principalmente os relacionados com a síntese de proteínas.

## VII - SUMMARY

The present study was carried out to better understand the significance of putrescine accumulation in plants under potassium or magnesium stress. A search was made for some relationship between putrescine accumulation and the metabolism of naturally occurring polyamines of certain physiological activity.

With this objective, plants of barley (*Hordeum vulgare*) broad bean (*Vicia faba*), spinach (*Spinaceae oleracea*) and pea (*Pisum sativum*) were grown in a greenhouse in nutrient solutions either complete or deficient in potassium and/or magnesium. In some experiments potassium was substituted with sodium, and magnesium with calcium.

At different times the leaves were harvested and the levels of arginine, agmatine, putrescine, spermine and spermidine determined.

Other experiments were set up in which arginine-U-<sup>14</sup>C was

applied to young barley leaves in order to test the effect of potassium and magnesium deficiencies on the rate of degradation of arginine to agmatine and putrescine. With the same experimental material an attempt was made to estimate the rate of spermine and spermidine synthesis using putrescine-1,4-<sup>14</sup>C as precursor.

Amino acids and amines were extracted from the leaves with either 80% ethanol or 5% trichloroacetic acid, and separated on cationic exchange resins (DOWEX, 50W-X8 and Amberlite IRC-50). Arginine and agmatine were determined colorimetrically whereas putrescine, spermine and spermidine were determined fluorimetrically. Radioactivity of the compounds was measured by liquid scintillation counting.

The data show that under potassium or magnesium stress there was an increase in putrescine synthesis, and that the formation of this amine was mainly through degradation of arginine rather than decarboxilation of ornithine.

Although much of the biochemistry and physiological significance of these amines is not as yet fully understood, some possibilities are discussed and a single mechanism is proposed for the accumulation of putrescine in both potassium and magnesium deficient plants, based on the interaction of di- and polyamines with certain metabolic process, mainly the protein synthesis.

### XIII - BIBLIOGRAFIA

- BAGNI, N., D.S.FRACASSINI e E.CORSINI (1972). Tumors of *Scorzonera hispanica*: Their Content in Polyamines. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 67: 19-23.*
- BARKER, A.V. e R.BRADFIELD (1963). Effect of Potassium and Nitrogen on the Free Amino Acid Content of Corn Plant. Agronomy Journal, 55: 465-470.*
- BASSO, L.C. (1973). Significado Bioquímico da Deficiência de Potássio na Formação de Aminas em Gergelim (*Sesamum indicum L.*). Tese apresentada à F.C.M.B.B. para obtenção do Título de Doutor em Ciências; 60 pág. mimeogr., Botucatu (SP).*
- BOULTER, D. (1970). Protein synthesis in Plants. Annual Review of Plant Physiology, 21: 93-114.*
- CARR, D.J. e J.S.PATE (1967). Ageing in the Whole Plant. Symposia of the Society for the Experimental Biology, 21: 559-600.*

- COCUCCI, S. e N.BAGNI (1968)*. Polyamine-induced Activation of Protein Synthesis in Ribosomal Preparation from *Heliantus tuberosus*. *Life Science*, 7: 113-120.
- COHEN, S.S. (1971)*. Introduction to the Polyamines. Printice-Hall Inc., Englewood Cliffs. N.J., 178 páginas.
- COLEMAN, R.G. e F.J.RICHARDS (1956)*. Physiological Studies in Plant Nutrition. XVIII - Some Aspects of Nitrogen Metabolism in Barley and other Plants in Relation to Potassium Deficiency. *Annals of Botany*, 20: 393-409.
- COLEMAN, R.G. e M.P.HEGARTY (1957)*. Metabolism of DL-ornithine-2-<sup>14</sup>C in Normal and Potassium Deficient Barley. *Nature*, 179: 376-377.
- COPPOC, G.L., P.KALLIO e H.G.WILLIAMS-ASHMAN (1971)*. Characteristics of S-adenosyl-L-methionine Decarboxylase from Various.. Organisms. *International Journal of Biochemistry*, 2: 673-681.
- CROCOMO, O.J., L.C.BASSO e O.G.BRASIL (1970)*. Formation of N-carbamylputrescine from citruline in *Sesamum*. *Phytochemistry*, 9: 1487-1489.
- EVAN, H.J. e G.J.SORGER (1966)*. Role of Mineral Elements with Emphasis on the Univalent Cations. *Annual Review of plant Physiology*, 17: 47-76.
- GALE, E.F. (1940)*. The Production of Amines by Bacteria. I. The Decarboxylation of Amino Acids by Strains of *Bacterium coli* *Biochemical Journal*, 34: 392-413.
- HACKETT, C., C.SINCLAIR e F.J.RICHARDS (1965)*. Balance between Potassium and Phosphorus in the Nutrition of Barley. I. The influence on Amine Content. *Annals. of Botany*, 29: 331-345.

- HOFFMAN, M. e R.M.SAMISH (1971)*. Free Amine Content in Fruit Tree Organs as an Indicator of the Nutritional Status with respect to Potassium. Em Recent Advances in Plant Nutrition pág. 189-204. Gordon e Breach Science Publishers Inc.
- HURWITZ, C. e C.L.ROSANO (1967)*. The Intracellular Concentration of Bound and Unbound Magnesium Ions in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 242: 3719-3722.
- INOUYE, M. e A.B.PARDEE (1970)*. Requirement of Polyamines for Bacterial Division. Journal of Bacteriology, 101: 770-776.
- KAY, J.E. e V.J.LINDSAY (1973)*. Control of Ornithine Decarboxylase Activity in Stimulated Human Lymphocytes by Putrescine and Spermidine. Biochemical Journal, 132: 791 - 796.
- LUBIN, M. e H.L.ENNIS (1964)*. On the Role of Intracellular Potassium in Protein Synthesis. Biochimica et Biophysica Acta, 80: 614:631.
- MARTIN, R.G. e B.N.AMES (1962)*. The Effect of Polyamines and of Poly-U Size on Phenylalanine Incorporation. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 48: 2171-2178.
- MARETZKI, A.M.T. e L.G.NICKELL (1969)*. Products of Arginine Catabolism in Growing Cells of Sugarcane. Phytochemistry, 8: 811-818.
- MORUZZI, G. e C.M.CALDARERA (1964)*. Occurrence of Polyamines in the Germs of Cerals. Archives of Biochemistry and Biophysics, 105: 209-210.
- MORRIS, D.R. e A.B.PARDEE (1966)*. Multiple Pathways of Putrescine Biosynthesis in *Escherichia coli* . The Journal of Biological Chemistry, 241: 3129-3135.
- MUDD, S.H. e G.L.CANTONI (1958)*. Activation of Methionine for Transmethylation. III - The Methionine-Activating Enzyme of Bakers' Yeast. The Journal of Biological Chemistry, 231: 481-492.

- MURTY, K.S., T.A.SMITH e C.BOULD (1971). The relation between the Putrescine Content and Potassium Status of Black Currant Leaves. *Annals of Botany*, 35: 687-695.
- NITSOS, R.E. e H.J.EVANS (1966). Effects of Univalent Cations on the Inductive Formation of Nitrate Reductase. *Plant Physiology*, 41: 1499-1504.
- NAKAMOTO, T. e E.HAMEL (1968). The Activation of 50S and 30 S. E. coli Ribosomes for Polyphenylalanine Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 59: 238-245.
- NOWAKOWSKI, T.Z. e M.BYERS (1972). Effects of Nitrogen and Potassium Fertilisers on Contents of Carbohydrates and Free Amino Acids in Italian Ryegrass. II- Changes in the Composition of the Non-protein Nitrogen Fraction and the distribution of Individual Amino Acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 1313-1333.
- PEGG, A.E. e H.G.WILLIAMS-ASHMAN (1969). On the role of S-adenosyl-L-methionine in the Biosynthesis of Spermidine by Rat Prostate. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 682-693.
- PEGG, A.E., D.H.LOCKWOOD e H.G.WILLIAMS-ASHMAN (1970). Concentrations of Putrescine and Polyamines and their Enzymic Synthesis during Androgen-Induced Prostatic Growth. *Biochemical Journal*, 117: 17-31.
- RAINA, A. (1963). Studies on the determination of Spermidine and Spermine and their Metabolism in the Developing Chick Embryo. *Acta Physiologica Scandinavica*, 60: 1-81.
- RUSSEL, D.H. (1971). Increased Polyamine Concentrations in the Urine of Human Cancer Patients. *Nature New Biology*, 233: 144.
- RICHARDS, F.J. e R.G.COLEMAN (1952). Occurrence of Putrescine in Potassium Deficient Barley. *Nature* 170: 460.

- RUBENSTEIN, K.E., E.STREIBEL, S.MASSEY, L.LAPI e S.S.COHEN (1972).  
Polyamine Metabolism in Potassium Deficient Bacteria.  
Journal of Bacteriology, 112: 1213-1221.
- SMITH, T.A. (1963). L-arginine Carboxy-lyase of Higher plants and  
its Relation to Potassium Nutrition. Phytochemistry, 2:  
241-252.
- SMITH, T.A. (1965). N-carbamylputrescine Amidohydrolase of Higher  
Plants and its Relation to Potassium Nutrition. Phytochemis-  
try, 4: 599-607.
- SMITH, T.A. (1970a). Putrescine, Spermidine and Spermine in Higher  
Plants. Phytochemistry, 9: 1479-1486.
- SMITH, T.A. (1970b). The Biosynthesis and Metabolism of Putrescine  
in Higher Plants. Annals of the New York Academy of  
Sciences, 171: 988-1001.
- SMITH, T.A. (1970c). The Quantitative Estimation of Putrescine by  
gas Chromatography. Analytical Biochemistry, 33: 10-15.
- SMITH, T.A. (1971). The Occurrence, Metabolism and Functions of  
Amines in Plants. Biological Reviews, 46: 201-241.
- SMITH, T.A. (1972). The Physiology of the Polyamines and related  
Compounds. Endeavour, 31: 22-28.
- SMITH, T.A. (1973). Amine Levels in Mineral-Deficient *Hordeum  
vulgare* leaves. Phytochemistry, 12: 2093-2100.
- SMITH, T.A. e C.SINCLAIR (1967). The Effect of Acid Feeding on  
Amine Formation in Barley. Annals of Botany, 31: 103-111.
- SMITH, T.A. e F.J.RICHARDS (1962). The Biosynthesis of Putrescine  
in Higher Plants and its Relation to Potassium Nutrition.  
Biochemical Journal, 84: 292-294.
- SMITH, T.A. e J.L.GARRAWAY (1964). N-carbamylputrescine- An Inter-  
mediate in the Formation of Putrescine by Barley. Phytoche-  
mistry, 3: 23-26.

- STEVENS, L. (1970).* The Biochemical Role of Naturally Occurring Polyamines in Nucleic Acid Synthesis. *Biological Reviews*, 45: 1-27.
- TABOR, H., S.M.ROSENTHAL e C.W.TABOR (1958).* The Biosynthesis of Spermidine and Spermine from Putrescine and Methionine. *The Journal of Biological Chemistry*, 233: 907-914.
- TABOR, H. e C.W.TABOR (1969).* Formation of 1,4-Diaminobutane and of Spermidine by an Ornithine Auxotroph of *E.coli* Grown on Limiting Ornithine or Arginine. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 2286-2292.
- VIOTTI, A., N.BAGNI, E.STURANI e F.A.M.ALBERGHINA (1971).* Magnesium and Polyamine Levels in *Neurospora crassa* Mycelia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 244: 329-337.
- WALL, M.E. (1940).* The Role of Potassium in Plants: III. Nitrogen and Carbohydrate Metabolism in Potassium-Deficient Plants Supplied with either Nitrate or Ammonium Nitrogen. *Soil Science*, 49: 393-408.
- WEBSTER, G. (1961).* Protein Synthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 12: 113-132.
- WILLIAMS-ASHMAN, H.G. (1972).* Control Mechanisms in the Biosynthesis of Aliphatic Amines in Eukaryotic Cells. In *Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells*; Kun, E. e S.Grisolia (ed.), Wiley Intersci..
- WYATT, G.R., K.ROTHAUS, D.LAWLER e E.J.HERBST (1973).* Ornithine Decarboxylase and Polyamines in Silkworm Pupal Tissue: Effects of Ecdysone and Injury. *Biochimica et Biophysica Acta*, 304: 482-494.

IX - APENDICE

Tabela 1 - Efeito de deficiências minerais no teor de aminas em folhas de cevada (planteda em 09/02/73).

| idade (dias)            | tratamento   | ionio su-primido | ionio com-pensador | Teor de amina (nmol/g mat. verde) |      |     | matéria seca (%) |
|-------------------------|--------------|------------------|--------------------|-----------------------------------|------|-----|------------------|
|                         |              |                  |                    | PUT                               | SPD  | SPN |                  |
| 28                      | 1 (controle) | -                | -                  | 280                               | 92   | 50  | 9.5              |
| "                       | 2            | K                | -                  | 1710*                             | -    | -   | 16.0             |
| "                       | 3            | K, Mg            | -                  | 1210                              | -    | -   | 13.0             |
| "                       | 4            | K, Mg, Ca        | -                  | 3070*                             | -    | -   | 10.0             |
| "                       | 5            | K                | Na                 | 1720*                             | 79   | 30* | 11.0             |
| "                       | 6            | Mg               | Ca                 | 2023*                             | 110  | 56  | 10.8             |
| "                       | 7            | K, Mg            | Na, Ca             | 1660*                             | -    | -   | 13.6             |
| 49                      | 1 (controle) | -                | -                  | 1470                              | 46   | 49  | 22.0             |
| "                       | 5            | K                | Na                 | 3960*                             | 78   | 6*  | 21.0             |
| "                       | 6            | Mg               | Ca                 | 4090*                             | 120* | 34* | 15.0             |
| Coeficiente de variação |              |                  |                    | 15%                               | 11%  | 14% |                  |

(\*) - diferem significativamente do controle ao nível de 5% de probabilidade (teste Tukey)

PUT = putrescina; SPD = espermidina; SPN = espermidina

Tabela 2 - Efeito das deficiências de potássio e de magnésio nos teores de di- e poliaminas em fava e espinafre.

| espécie                 | Tratamento   | Teor de amina (nmol/g de matéria verde) |             |           | matéria seca (%) |
|-------------------------|--------------|---|-------------|-----------|------------------|
|                         |              | putrescina                              | espermidina | espermina |                  |
| fava                    | 1 (controle) | 110                                     | 164         | 41        | 10.0             |
| "                       | 5            | 1120*                                   | 110*        | 25*       | 9.1              |
| "                       | 6            | 350*                                    | 86*         | 11*       | 11.0             |
| espinafre               | 1 (controle) | 270                                     | 217         | 57        | 12.0             |
| "                       | 5            | 860*                                    | 137*        | 4*        | 13.6             |
| "                       | 6            | 240                                     | 196         | 54        | 16.0             |
| Coeficiente de variação |              | 16%                                     | 7.4%        | 9.0%      |                  |

(\*) - diferem significativamente do controle ao nível de 5% de probabilidade (teste Duncan)

Tabela 3 - Efeito da idade no teor de aminas nas folhas de cevada (plantada em janeiro de 1973)

| Idade<br>(dias)         | Tratamento | Teor de amina (nmol/g mat. verde) |             |           |
|-------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|-----------|
|                         |            | Putrescina                        | Espermidina | Espermina |
| 7                       | 1          | 294                               | 345         | 44        |
| 35                      | 1          | 396*                              | 196*        | 95*       |
| Coeficiente de variação |            | 12%                               | 16%         | 12%       |

(\*) - diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade (Teste Duncan)

Tabela 4 - Teores de arginina e aminas em folhas de cevada, com 16 dias de idade, utilizadas nos ensaios com radiocarbono (plantadas em 09/04/73).

| Tratamento              | n moles/g de matéria verde |          |            |                          | matéria<br>seca<br>(%) |      |
|-------------------------|----------------------------|----------|------------|--------------------------|------------------------|------|
|                         | arginina                   | agmatina | putrescina | espermidina<br>espermina |                        |      |
| (controle) 1            | 120                        | 250      | 870        | 41                       | 47                     | 10.2 |
| 5                       | 360*                       | 630*     | 2530*      | 36                       | 27*                    | 9.8  |
| 6                       | 230                        | 290      | 1130       | 28*                      | 45                     | 11.0 |
| Coeficiente de variação |                            | 19%      | 20%        | 12%                      | 13%                    | 15%  |

(\*) - diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade (Teste Duncan).

Tabela 5 - Atividade específica e índice de formação líquida de agmatina e putrescina referente ao ensaio com L-arginine-U-<sup>14</sup>C.

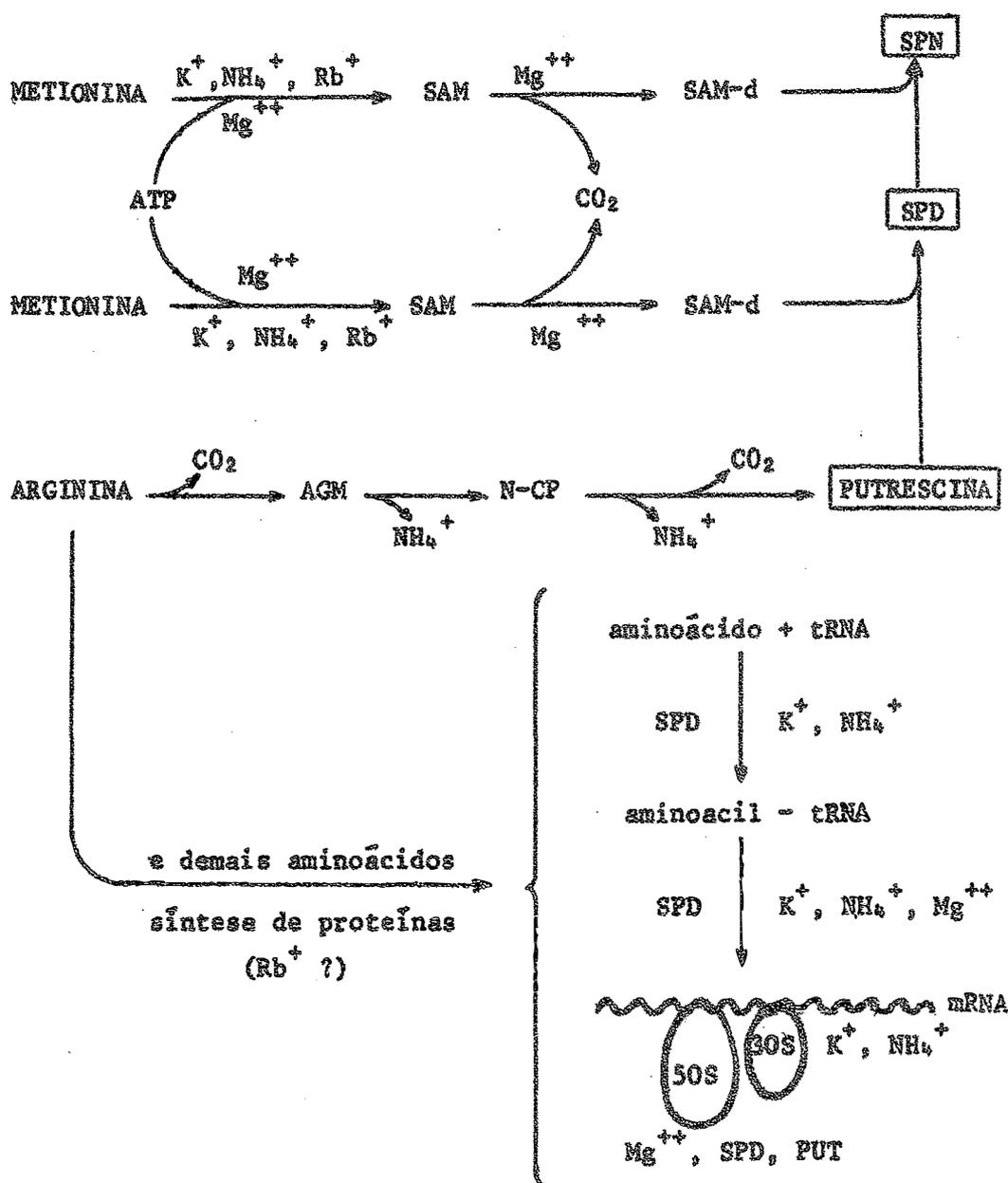
| Tratamento | Período de<br>incu-<br>bação | cpm/ $\mu$ m |            | Formação Líquida* |            |
|------------|------------------------------|--------------|------------|-------------------|------------|
|            |                              | agmatina     | putrescina | agmatina          | putrescina |
| 1          | 2 h                          | 20.440       | 16.260     | 3.1               | 8.5        |
| 5          | 2 h                          | 64.300       | 6.280      | 24.0              | 30.0       |
| 6          | 2 h                          | 22.550       | 13.820     | 3.9               | 18.0       |
| 1          | 24 h                         | 9.400        | 2.110      | -                 | -          |
| 5          | 24 h                         | 10.050       | 6.450      | -                 | -          |
| 6          | 24 h                         | 25.070       | 3.420      | -                 | -          |

(\*) - nmoles de amina formados a partir de arginina por grama de tecido verde no final do período de incubação ( 2 horas)

Tabela 6 - Atividade específica e índice de formação líquida de poliaminas, referente ao ensaio com putrescina, 1,4-<sup>14</sup>C

| Tratamentos             | cpm/ $\mu$ M |             |           | Formação Líquida* |           |
|-------------------------|--------------|-------------|-----------|-------------------|-----------|
|                         | putrescina   | espermidina | espermina | espermidina       | espermina |
| 1                       | 50.110       | 66.330      | 42.800    | 54                | 30        |
| 5                       | 28.890       | 87.700      | 48.040    | 110               | 15        |
| 6                       | 35.550       | 72.730      | 37.170    | 61                | 23        |
| Coeficiente de variação |              | 26%         | 15%       | 10%               |           |

(\*) - nmoles de amina formados a partir do precursor imediato por grama de tecido no final do período de incubação (24 horas).



**Gráfico A:** Relações entre a formação de aminas e a síntese proteica. MET = metionina; ATP = trifosfato de adenosina; SAM = S-adenosilmetionina; SAM-d = produto da descarboxilação de SAM; SPD = espermidina; SPN = espermina; PUT = putrescina; AGM = sgmatina; N-CP = N-carbamilputrescina; 30S e 50S = subunidades ribossômicas.