

GRADIENTES EN LA PLANTA MADURA DE *WEDELIA GLAUCA*.
III. DISTRIBUCION DE COMPUESTOS AMINADOS SOLUBLES
E INSOLUBLES EN HOJAS E INTERNODIOS SUCESIVOS. (*).

Por S. O. TRIONE, H. MARTÍNEZ y J. M. HINOJO

SUMMARY

Gradients in the mature plant of Wedelia Glauca, III. Distribution of soluble and insoluble nitrogenous compounds in the successive leaves and internodes.

The patterns of distribution of soluble and insoluble amino acids and amides in the successive leaves and internodes of the *Wedelia glauca* mature plant were studied.

The spectre of free and bound nitrogenous compounds showed a zig-zag pattern, with concentration gradient more or less gradual in the sense base apex and viceversa. Such distribution are discussed in relation to the age of the analysed organs, the direction of translocation, and in the different metabolic activity that accompany them.

The accumulation of beta-alanine and gamma-aminobutyric acid in basal organs, i.e. aged, are interpreted as an increase in the activity of aspartic and glutamic acids decarboxylases. The presence of the amides asparagine and glutamine, in middle-aged organs, are correlative with a decrease in the content of their precursors aspartic and glutamic acids, as well as their decarboxylation products beta-alanine and gamma-aminobutyric acid. This shows, indirectly, a localized activity of the respective synthetases.

The nitrogen soluble and insoluble complement of inflorescence and first rizomal internode, taken as "poles" of the plant, were also studied. The size of the soluble and insoluble nitrogen pools were bigger in the apical pole than in the basal one. The composition of the bulk protein moiety of the upper pole show a porcentaje increase in the aromatic and dicarboxylic amino acids, while that of basal pole the increase is in the neutral and basic compounds.

(*) Trabajo realizado en los laboratorios de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNC), gracias a una Pasantía otorgada por la Facultad de Agronomía y Zootecnia (U.N. Tucumán) a los entonces alumnos (H. M. y J. M. H.), quienes trabajaron bajo la dirección de uno de nosotros (S. O. T.).

Estudios previos en esta serie (6,7) mostraron la existencia de diferentes tipos de gradientes en las sucesivas hojas e internodios de *Wedelia glauca*. Resultó aparente que las interrelaciones cambiantes que normalmente se opera entre los órganos analizados —homólogos y no homólogos—, variaban no solamente en sentido espacial sino fisiológico. Dichos cambios, inevitablemente, debían reflejarse en el ambiente interno de las regiones interrelacionadas, aunque no hubiesen variaciones notables en su morfología externa. Los cambios en el ambiente interno incluyen, entre otros, aquellos relacionados con la síntesis y distribución de diferentes metabolitos. El conocimiento de los modelos de distribución de los compuestos individuales en la planta, sin duda alguna, constituye una etapa importante en el entendimiento de una determinada actividad metabólica.

El trabajo aquí presentado tuvo por finalidad la determinación de modelos de distribución de compuestos nitrogenados libres y ligados, de tejidos de hojas e internodios sucesivos, y de regiones morfológicas consideradas como “polos” de la planta de *Wedelia glauca* en estado reproductivo, e.g., inflorescencia e internodios rizomatosos.

MATERIAL Y METODOS

Muestra: El material vegetal y manera de extracción de las distintas regiones morfológicas, fueron las mismas que las indicadas en un trabajo anterior ⁷, vale decir, se tomaron plantas de *Wedelia glauca* en estado de floración, crecidas en las condiciones normales de campo, que presentaban 7 internodios y 7 pares de hojas, sin existir ramificaciones. Hojas, internodios, inflorescencia y primeros internodios del rizoma fueron separados de acuerdo a su posición sucesiva en el eje de la planta.

Análisis: Los amino ácidos y amidas, libres o ligados, se extrajeron y analizaron de acuerdo a la técnica descrita por THOMPSON y STEWARD (10), i.e., los compuestos nitrogenados solubles se extrajeron con alcohol 80% y los insolubles se obtuvieron por hidrólisis clorhídrica del residuo. Ellos fueron purificados a través de resina de intercambio, y separados por cromatografía bi-direccional. Luego de ser revelados con ninhidrina, se evaluaron cuantitativamente al espectrofotómetro.

Datos: Cada compuesto nitrogenado soluble o insoluble, está expresado por su contenido porcentual de nitrógeno con respecto al total (soluble o insoluble) reactivo a la ninhidrina, el que se obtiene por sumatoria del contenido absoluto en nitrógeno de cada compuesto expresado en microgramos de nitrógeno por unidad de órgano, o por gramo de tejido seco.

RESULTADOS

La progresión de los cambios en la composición de los ácidos amidados solubles e insolubles de los sucesivos internodios y pares de hojas, están representados en las figuras 1-4.

En el conjunto de las respectivas regiones morfológicas, la distribución de los metabolitos individuales de cada fracción nitrogenada, responde a un modelo en forma de "zig-zag", el cuál es más aparente en los componentes de la fase soluble.

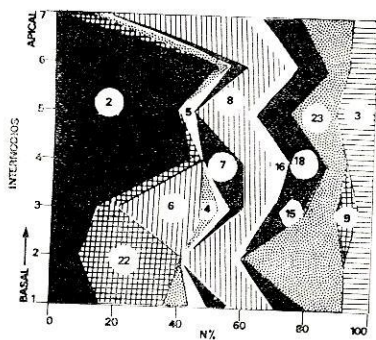
La composición porcentual del compartimiento nitrogenado soluble de los sucesivos internodios está dominado, en los segmentos más apicales (4to., 5to. y 6to.) por el ácido aspártico, mientras que en los inferiores (1ro., 2do. y 3ro.) los compuestos predominantes son beta-alanina, asparagina y ácido gamma-aminobutírico. El resto de los metabolitos aumenta o disminuye su proporción relativa en forma más bien alternada en la sucesión.

La composición del mismo compartimiento en las hojas difiere del de los internodios en varios aspectos. Los amino ácidos gamma-aminobutírico, aspártico, alanina y leucina predominan en forma más uniforme a través de la secuencia foliar. Beta-alanina es característica de los pares de hojas más apicales y basales (6to., 7mo. y 1ro., 2do.); asparagina está ausente, mientras glutamina aparece en los pares de hojas 5to. y 7mo. Glicina, serina, treonina y valina acusan mayor proporción relativa que sus similares internodiales.

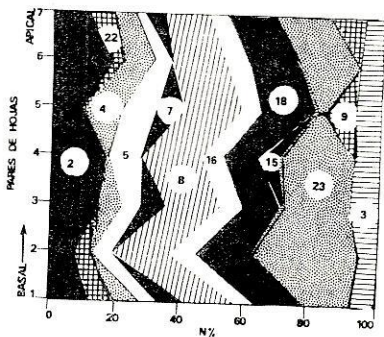
El espectro de compuestos en la fase insoluble, mayormente proteína global, muestra más uniformidad. En internodios, la calidad del grueso de la fracción proteica va sufriendo variaciones graduales. En el sentido base-ápice hay un enriquecimiento en ácido aspártico, lisina, arginina, tirosina, prolina, y una disminución progresiva de alanina, leucina, serina, treonina. La fenilalanina representa un porcentaje bastante apreciable en todos los internodios, excepto el 5to. En hojas, tal variación no es tan gradual. La fracción proteica de los pares basales está más enriquecida en ácido aspártico y fenilalanina, la de los pares apicales lo está en ácido glutámico y lisina, mientras que la proteína global de los pares de hojas centrales son más ricas en leucina y arginina.

En la figura 6, puede apreciarse que el nitrógeno soluble total configura un porcentaje relativamente pequeño del nitrógeno total (soluble + insoluble). viz., 0.4 - 5.6 % en hojas, y 0.2 - 14.0 % en internodios. El N - soluble total tiende a aumentar en los internodios centrales y apicales, mientras que en las hojas es mayor en los pares centrales y basales. El N - insoluble total de internodios se incrementa a medida que los mismos se acercan a la inflorescencia, y lo contrario ocurre en los pares de hojas sucesivos.

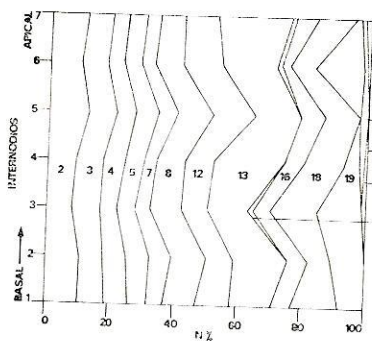
1.



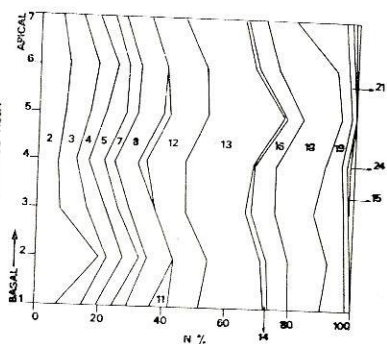
2.



3.

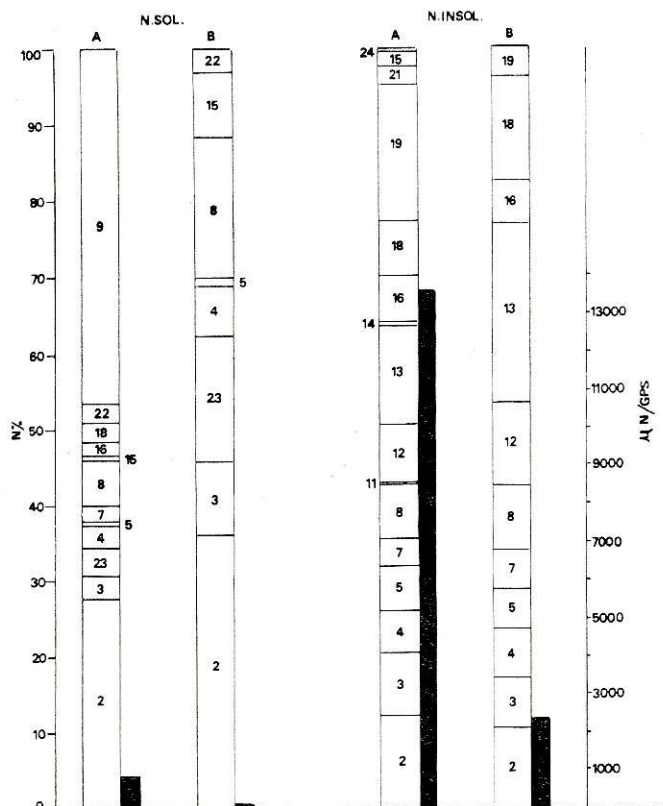


4.



Figuras 1 - 4. Modelos de distribución de los amino ácidos y amidas en los sucesivos internodios y pares de hojas de la planta de *Wedelia glauca*. (nitrógeno en cada compuesto expresado como porcentaje del total soluble o insoluble). 1: amino ácidos y amidas libres en internodios. 2: idem en hojas. 3: amino ácidos constituyentes del complemento nitrogenado proteico de internodios. 4: idem de hojas. *Clave de los números*: 2: ácido aspártico, 3: ácido glutámico, 4: serina, 5: glicina, 6: asparagina, 7: treonina, 8: alanina (alfa), 9: glutamina, 11: histidina, 12: lisina, 13: arginina, 14: metionina (sulfóxido), 15: prolina, 16: valina, 18: leucinas (leucina + isoleucina), 19: fenilalanina, 21: tirosina, 22: beta-alanina, 23: ácido gamma-aminobutírico, 24: hidroxiprolina.

5.



6.

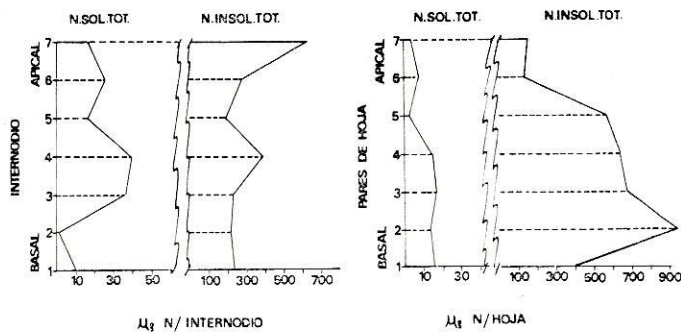


Figura 5. Contraste en la calidad y tamaño de los compartimentos nitrogenados soluble e insoluble de la inflorescencia (A) y primeros internodios del rizoma (B) tomados como "polos" de la planta de *Wedelia glauca*. (nitrógeno en cada compuesto expresado como porcentaje del total respectivo).

Figura 6. Comparación entre la distribución del nitrógeno soluble total e insoluble total, reactivo a la ninhidrina, en los sucesivos internodios y pares de hojas de la planta de *Wedelia glauca*.

En la figura 5 se han contrastados los "polos" de la planta, i.e., inflorescencia vs Iros. internodios del rizoma. Puede notarse el mayor tamaño de compartimiento nitrogenado, soluble o insoluble, medido en microgramos de nitrógeno por gramo de tejido seco, que acusa el polo apical; la diferente composición porcentual de amino ácidos integrantes del grueso de la proteína; y sobre todo, la muy distinta calidad del compartimiento nitrogenado soluble de los órganos analizados, e.g., predominio de glutamina y ácido aspártico en inflorescencia; predominio leve de ácido aspártico con alanina, leucina y prolina en internodios del rizoma.

DISCUSION

Es aparente que las variaciones más o menos graduales, observadas en los diferentes metabolitos nitrogenados a lo largo de la secuencia foliar e internodal resultan, en gran parte, de las distintas direcciones de movilización de tales compuestos durante la ontogenia, i.e., cada hoja o internodio pasa por un estado en el cual principalmente importa asimilados, a través de una fase de sucesiva importación y exportación, a un estado en el cual la exportación se hace prominente.

Los distintos tipos de gradientes, producto de la cambiante actividad metabólica mostrada para las diferentes partes de esta especie (6, 7) y de otras (8, 9), parecen estar asociados con las edades de dichas regiones morfológicas. No se puede discutir la influencia de las hojas viejas sobre el crecimiento y desarrollo de las jóvenes; el cambio de la actividad metabólica en la transición de los órganos del estado juvenil al adulto (11); o las variaciones en dicha actividad influenciada por la sexualidad. Así, la mayor acumulación de ácido gamma-aminobutírico en hojas e internodios basales (figuras 1 y 2), más viejos, coincide con lo determinado para otras especies por otros autores (5, 12), quienes encontraron, junto con la acumulación de tal compuesto en hojas de más edad, un aumento correlativo en la actividad de ácido glutámico decarboxilasa. Del mismo modo podemos explicar la acumulación de beta-alanina, producto de decarboxilación del ácido aspártico, en los internodios basales. Otra indicación de actividad metabólica localizada, está dada por la presencia de las amidas glutamina y asparagina a nivel del 3er. internodio, i.e., de mediana edad, que coincide respectivamente, con la disminución de los ácidos glutámico y gamma-aminobutírico por un lado, y con ácido aspártico y beta-alanina por el otro, lo que demuestra, indirectamente, una mayor actividad de las sintetasas correspondientes. En fin, otro tanto se puede decir de las variaciones correlativas entre glicina y su precursor serina (4), según la posición de los órganos analizados.

Tanto en hojas como en internodios, el contenido de nitrógeno libre es comparativamente pequeño. La mayor parte del nitrógeno total

está desplazado hacia la fracción proteica, la cuál a su vez varía de acuerdo a la posición del órgano. Este hecho, y la presencia constante de alanina en la fase soluble, refleja la persistencia de un dinamismo metabólico, en el sentido de la reutilización del N-libre en la síntesis de proteína, de acuerdo al esquema propuesto por BIDWELL ET AL. (1).

Por su parte, los gradientes de concentración de N insoluble en ambas regiones morfológicas parece estar regulado hormonalmente. Debido a que la actividad radical normalmente decae cuando una planta llega a la floración (3), los requerimientos en nitrógeno, entre otros compuestos, por parte de los órganos reproductivos, son satisfechos en su mayor parte a través de la movilización de las reservas nitrogenadas del tallo y hojas. Por lo tanto, los órganos vegetativos al comportarse como "fuentes" de nitrógeno, hidrolizan su proteína global con distinta velocidad provocando gradientes de concentración hacia las regiones que se comportan como "depósito" de nitrógeno, en este caso inflorescencia y, muy probablemente más tarde, rizomas, que constituyen los órganos de resistencia de esta especie (2), pues no hay que olvidar que esta planta presenta una delimitación de la senescencia, ya que únicamente muere, al final de la estación, el vástago aéreo pero no los rizomas. La zona alta de tal gradiente se encuentra para hojas, a nivel del 2do. par y para internodios, órganos especializados en la traslación, a nivel de 4to. y 7mo. Estas fluctuaciones pueden ser expresiones de diferencias transitorias entre velocidad de exportación, importación y distribución.

El estudio de la distribución de los compuestos nitrogenados no es del todo completo, si no se considera la composición de aquellas regiones morfológicas que se ubican como "polos" de la planta, e.g., inflorescencia, polo apical, e internodios del rizoma, polo basal. Estos extremos tan diferentes morfológica como fisiológicamente, también presentan una composición nitrogenada cuali y cuantitativa distinta. Los amino ácidos de características ácidas: aspártico y glutámico, y los aromáticos fenilalanina y tirosina que integran la proteína global, son más prominentes en el polo superior, mientras que los de características básicas: lisina y arginina, y los neutros alanina y leucina lo son de la zona basal. En adición, un tamaño de compartimiento nitrogenado insoluble seis veces mayor caracteriza al polo aéreo.

La inflorescencia recibe a su vez, casi diez veces más N-soluble que el polo opuesto, y su nitrógeno se resuelve en mayor número de compuestos que son dominados por N-glutamina y N-ácido aspártico. En el extremo basal, el N-soluble se resuelve en poco compuestos con predominio menos acentuado de N-ácido aspártico, N-ácido gamma-aminobutírico- N-prolina.

Esta polaridad de distribución de los metabolitos dominantes puede ser debida, o bien a que son sintetizados o catabolizados "in

situ", a que son importados desde otras regiones, o a una combinación de estas posibilidades.

Por lo tanto, las diferencias apuntadas parecen ser el resultado de diferencias en la actividad de enzimas que conciernen al metabolismo de los amino ácidos y sus amidas, según la ubicación en el tiempo y en el espacio de las distintas regiones morfológicas.

RESUMEN

En la planta madura (estado de floración) de *Wedelia glauca*, se estudian los modelos de distribución de amino ácidos y amidas, libres y ligados, en las sucesivas hojas e internodios, y en inflorescencia y primeros internodios del rizoma considerados como "polos" de la planta.

El espectro de los compuestos nitrogenados solubles e insolubles, mostró un modelo de distribución en forma de "zig-zag", con gradientes de concentración, más o menos gradual en sentido base-ápice y viceversa. Tal distribución se discute en relación a la edad de los órganos analizados, a las diferentes direcciones de traslación de los metabolitos, y a los cambios de actividad metabólica que a ellos acompañan.

La acumulación de beta-alanina y ácido gamma-aminobutírico en órganos basales, i.e., de mayor edad, se interpreta como incremento en actividad de las respectivas decarboxilasas de los ácidos aspártico y glutámico. La presencia de las amidas asparagina y glutamina, en órganos de mediana edad, coincide con una disminución de sus precursores aspártico y glutámico, y de sus productos de decarboxilación beta-alanina y gamma-aminobutírico, lo que muestra en forma indirecta, una actividad localizada de ambas sintetetasas.

Los tamaños de los compartimientos nitrogenados solubles e insoluble, fueron mucho mayores en el polo apical que en el basal. En este, la composición de la proteína global está incrementada en los amino ácidos de características básicas y en los neutros, mientras que en aquel, lo está en los compuestos de características ácidos y aromáticos.

RECONOCIMIENTO

Los autores desean agradecer la amable colaboración prestada por los idóneos del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, señores Horacio Morales y Cruz A. Guzmán.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BIDWELL, R. G. S.; BARR, R. A. and F. C. STEWARD. 1964. Protein synthesis and turnover in cultured plant tissue. Sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products. *Nature*. 203 (4943): 367-373.
- 2 — BURKART, A. y M. N. CARERA. 1953. Estudios sobre malezas. Morfología vegetativa y germinación del "Sunchillo" (*Wedelia glauca*). *Darwiniana*. 10 (2): 113-144.
- 3 — CARR, D. J. and J. S. PATE. 1967. Ageing in the whole plant. *Symp. Soc. exp. Biol.* 21: 559-600.
- 4 — FOWDEN, L. 1965. Amino acid biosynthesis. En *Biosynthetic pathways in higher plants*. Ed. J. B. Pridham y T. Swain. Academic Press. London y New York. pp. 73-99.
- 5 — FREIBERG, S. R. and F. C. STEWARD. 1930. Physiological investigation on the banana plant. III. Factors which affect the nitrogen compounds of the leaves. *Ann. Botany* (London). 24: 147-157.
- 6 — HINOJO, J. M.; MARTÍNEZ, H. y S. O. TRIGONE. 1970. Gradientes en la planta madura de *Wedelia glauca*. II. Heterogeneidad de los internodios según su altura caulinar, y contraste entre polos de la planta. *Rev. Agr. Nord. Arg.* (Tucumán). (en prensa).
- 7 — MARTÍNEZ, H.; HINOJO, J. M. y S. O. TRIGONE. 1970. Gradientes en la planta madura de *Wedelia glauca*. I. Heterogeneidad de las hojas de acuerdo a su posición en el tallo. *Ibid.* (en prensa).
- 8 — MJOHLÁLYFI, J. P. 1966. Fás növények lombleveleiben mért kataláz-aktivitás évi dinamizmusa és gradiensei. *Bot. Közlem.* 53 (4): 233-236.
- 9 — PRAT, H. 1948. Histo-physiological gradient and plant organogenesis. (Part. I). *Bot. Rev.* 14 (10): 603-643.
- 10 — THOMSON, J. F. and F. C. STEWARD. 1951. Investigations of nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. *Plant Physiol.* 26: 421-440.
- 11 — TRIGONE, S. O. 1969. Cambios en la composición de los compartimientos nitrogenados soluble e insoluble del pericarpio y semilla de la vid desde antes a maduración. *Phyton* (Bs. As.). 26 (2): 135-150.
- 12 — WEINBERGER, P. and S. GODIN. 1964. Glutamic decarboxylase in relation to leaf ontogeny and vernalization. *Canad. J. Botany*. 42: 389-632.