

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FUNDACION E INSTITUTO MIGUEL LILLO

LILLOA

TOMO XXXIII: 7

S. O. TRIONE y G. ALMELA PONS - AMINO ACIDOS EN LA SAVIA XILEMATICA
("LLORO") DE LA VID. I. CAMBIOS DIARIOS EN EL COMPLEMENTO
NITROGENADO SOLUBLE

(págs. 137-148 - 2 figs.)

TUCUMAN
REPUBLICA ARGENTINA

1972

AMINO ACIDOS EN LA SAVIA XILEMATICA ("LLORO") DE LA VID. I.

CAMBIOS DIARIOS EN EL COMPLEMENTO NITROGENADO SOLUBLE

por S. O. TRIONE y G. ALMELA PONS

SUMMARY

Amino acids in the bleeding sap of the grapevine. I. Daily changes in the soluble nitrogen complement.- By two-directional paper chromatography the amino acid composition of the bleeding sap of *Vitis vinifera L. cv. Vigne de Michel* was determined, and their daily fluctuation followed during 7 days of the bleeding period. It was shown that the free amides and amino acids composition changes quanti and qualitatively during the successive days of exudation prior to the bud burst of the pruned plants. Glutamine, glutamic and aspartic acids, and eventually arginine, in that order, were the most abundant nitrogenous compounds. In addition, ten more amino acids were determined. The total soluble nitrogen content showed three peaks, one on the 1st, one on the 5th, and one on the 7th day (in increasing order). Such changes were in dependent of the daily exuded sap. In another cultivar, e.g., *Malbeck*, grown under different conditions, it was shown again that glutamine and glutamic acid were the dominant soluble N compounds.

The possible causes accounting for the daily changes observed were discussed.

El análisis del jugo xilemático constituye un aspecto interesante en el estudio de la actividad metabólica del sistema radical de una especie. Algunos de los problemas importantes, en relación al metabolismo global del nitrógeno de una planta superior, concierne al movimiento de sustancias nitrogenadas entre los diversos órganos, y en la repercusión que ello provoca en el metabolismo de cada región morfológica (22).

En la vid ocurre, al final del invierno, que cuando las plantas salen del período de dormición, coincidentemente, las temperaturas del suelo comienzan a activar los procesos metabólicos de la raíz, lo que provoca indirectamente la absorción activa de agua, cuya consecuencia, la presión radical, se hace aparente en forma del típico "llanto" o savia xilemática que fluye por las heridas de la poda. Dicho fluido conforma un material útil para el estudio del metabolismo de los compuestos nitrogenados libres, fundamentalmente amino ácidos y amidas, en la obligada relación existente

entre la actividad de la raíz y la de las yemas, i.e., interacciones metabólicas raíz-yemas.

Escasos trabajos existen (12, 17, 20) sobre los constituyentes nitrogenados solubles del "llanto" de la vid, y menos aún (17) en lo que concierne a sus fluctuaciones periódicas. Este informe muestra cómo los amino ácidos libres, presentes en la savia xilemática de la vid, varían cuali y cuantitativamente durante los días sucesivos de exudación previo al fenómeno de brotación en las plantas podadas; y que la mayoría de estos cambios se centralizan alrededor de la glutamina, que conjuntamente con el ácido glutámico, constituye uno de los principales metabolitos nitrogenados que se movilizan en el xilema.

MATERIAL Y METODOS

Extracción de las muestras. Las muestras de fluido xilemático se obtuvieron de plantas de *Vitis vinifera L. cv. Vigne de Michel*, conducidas en parral, y perteneciente a la Colección Ampelográfica que el Instituto de Viticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias, posee en el campo experimental de Chacras de Coria, Mendoza. Para colectar el "llanto" se procedió a seccionar un sarmiento por cada planta elegida (3 en total), recibiendo el mismo en frascos conteniendo algunas gotas de cloroformo para prevenir contaminaciones. Durante 7 días (desde el 3 al 10 de setiembre de 1968) y cada 24 horas a partir de las 11 horas de cada día, se fue recibiendo y juntando el líquido obtenido de las 3 plantas. En cada período de extracción se registró el volumen colectado.

Procesamiento de las muestras. Los jugos así obtenidos fueron evaporados a sequedad en corriente de aire bajo campana. El residuo, tomado con agua destilada, se centrifugó a 20.000 r.p.m., pasándose el sobrenadante a través de columna de resina de intercambio (Dowex 50 W) forma hidróxica, para liberarlo de azúcares y ácidos orgánicos. Los compuestos nitrogenados adsorbidos fueron eluidos de la columna con hidróxido de amonio aprox. 1 N, y llevados a sequedad en corriente de aire, disolviéndose luego en un volumen conocido de agua destilada.

Los amino ácidos y amidas libres fueron determinados cuantitativamente, bajo condiciones cuidadosamente standardizadas, por el método de Thompson y Steward (21), i.e., separación por cromatografía bi-direc

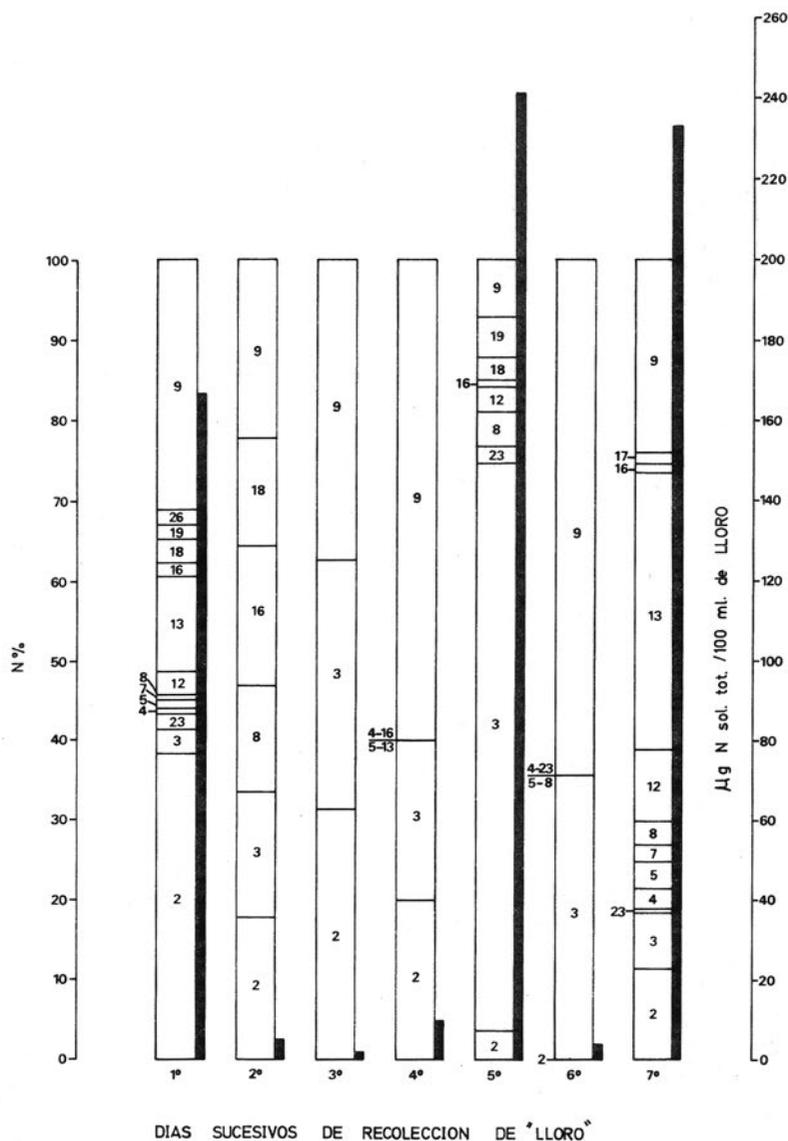


FIGURA 1. Variación de la composición y tamaño del compartimento nitrogenado soluble en la savia xilemática exudada por plantas de *Vitis vinifera* cv. *Vigne de Michel*, durante los días sucesivos de una semana de su período de "lloro".

cional sobre papel, empleando como solventes de corrido, primero fenol: agua y luego n-butanol: ácido acético: agua, o colidina: lutidina: agua. La revelación se hizo con ninhidrina y la evaluación de cada compuesto por espectrofotometría.

Datos. El nitrógeno soluble total se expresa en $\mu\text{g}/100$ ml de savia, o por volumen de savia exudada en cada período. Cada compuesto está representado, en un histograma, por su contenido de nitrógeno en relación al nitrógeno soluble total, e identificado por un número convencional de acuerdo a la siguiente clave:

2 - ácido aspártico	12 - lisina
3 - ácido glutámico	13 - arginina
4 - serina	16 - valina
5 - glicina	18 - leucina
7 - treonina	19 - fenilalanina
8 - alanina	23 - ácido gamma-aminobutírico
9 - glutamina	26 - ácido pipercolico

RESULTADOS

Cualquiera sea la forma de expresión del nitrógeno soluble total, i.e., por 100 ml de fluido o por volumen total exudado (fig. 1; Tabla I), la mayor cantidad se encontró en los días 1^o, 5^o y 7^o de la recolección del "llanto". Durante los días intermedios la cantidad de nitrógeno total registrada fue mínima.

Las concentraciones de amino ácidos varían menos cuando se las expresa por su contenido en nitrógeno como porcentaje del total soluble (histogramas), que cuando se lo hace en base a volumen de exudado. De esta manera se puede apreciar claramente que los principales compuestos nitrogenados que se acumulan son glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico y eventualmente arginina. El resto de los amino ácidos consiste principalmente de alanina, leucina, fenilalanina, valina, lisina, serina, glicina, treonina, ácido gamma-aminobutírico y ácido pipercolico.

Glutamina y ácido aspártico son los metabolitos que, en partes más o menos iguales, se acumulan durante el primer día del flujo. En conjunto responden por el 70% del N-total reactivo a la ninhidrina. Cuando el contenido de nitrógeno cae al mínimo (días 2^o, 3^o, 4^o y 6^o) la fracción nitrogenada

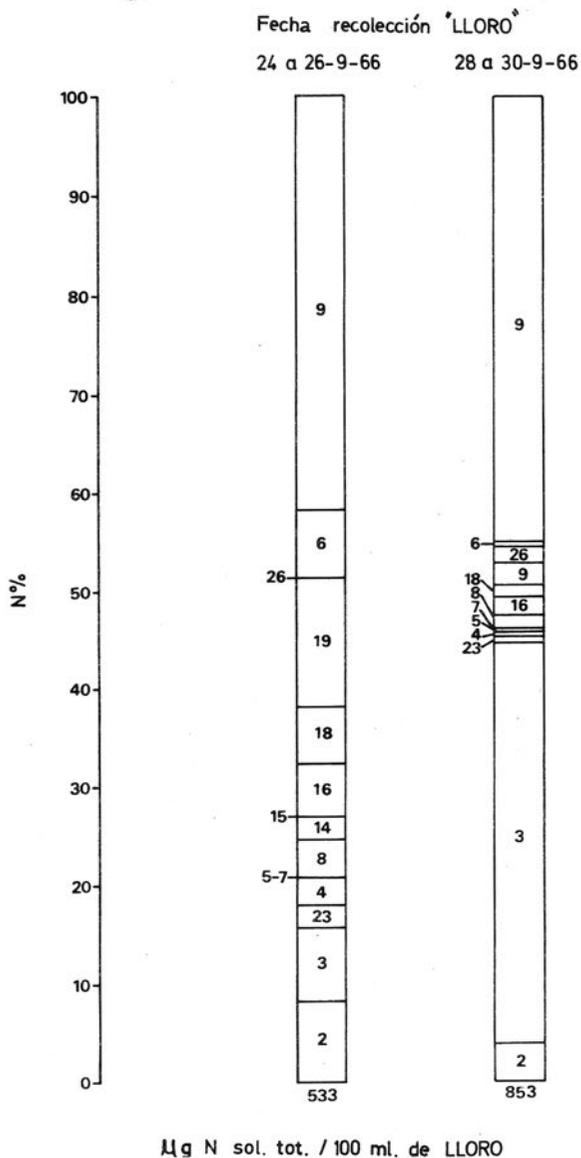


FIGURA 2. Variación de la composición y tamaño del compartimento nitrogenado soluble en la savia xilemática exudada por plantas de *Vitis vinifera* cv. Malbeck, en dos fechas de su período de "lloro".

está constituida por pocos compuestos y restringida casi enteramente a glutamina, glutámico y aspártico. Hacia el 5º día, en que se produce el pico máximo del contenido de nitrógeno total, el glutámico es el compuesto dominante, contribuyendo con más del 70% del nitrógeno. En el último día examinado aparece nuevamente arginina, que junto con glutamina representan los principales metabolitos nitrogenados (35% y 25% de nitrógeno respectivamente).

Las variaciones en el contenido diario de N-soluble total son independientes del volumen de líquido exudado en cada período (Tabla I), ya que el aumento o disminución del nitrógeno no se correlaciona, por fenómeno de dilución, con la disminución o incremento del volumen exudado.

TABLA I

Fluctuaciones diarias en el volumen de savia xilemática; N-total por volumen exudado y N-total por 100 ml de savia exudada por plantas de *Vitis vinifera L. cv. Vigne de Michel* durante el curso de la 1ª semana.

	DIAS DE LA SEMANA						
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Volumen de savia exudada (ml)	425	500	525	475	375	250	250
µg N-Total/vol. exudado	710	23	9	48	905	10	586
µg N-Total/100 ml exudados	167	5	2	10	241	4	233

La fig. 2 muestra para otro cultivar, e.g., *Malbeck*, con otro sistema de conducción (contraespaldera), con distinta edad y en otro período vegetativo (setiembre de 1966), que glutamina y glutámico son las formas más importantes en que se moviliza el nitrógeno por el xilema.

DISCUSION

En primera instancia, estos resultados confirman la idea (2) que el nitrógeno raramente se traslada en forma inorgánica desde las raíces a los diversos órganos en la mayoría de las plantas, pues a juzgar por los primeros análisis realizados en el "llanto" de la vid (11), la cantidad de nitratos o amonio presentes es muy exigua.

Si bien, en nuestro caso, la mayor parte del nitrógeno se traslada vía xilema principalmente en forma de glutamina-glutámico y otros compuestos

aminados, la fuente de tales amino ácidos y amidas no está del todo aclarada. Ellos se pueden originar tanto en las raíces como en el parénquima xilemático del tronco, pudiendo ser sintetizados "de novo", o liberados de almace naje.

Si se originan en las raíces, como aparentemente ocurre en la mayoría de las plantas superiores (22), dichos órganos deben poseer todas las enzimas y coenzimas requeridas para la transformación del N-inorgánico en N-orgánico. Los esqueletos carbonosos necesarios para la aminación y transaminación pueden ser provistos en forma de azúcares, los cuales se movilizarían de su zona de acumulación, i.e., tronco (3, 4) donde están depositados como almidón. Aunque en vid este modelo metabólico no está íntegramente probado en todos sus pasos, resulta sintomático que el glutámico y glutamina, considerados como amino ácidos primarios de la asimilación del amonio (6), sean los compuestos nitrogenados más abundantes en la savia xilemática.

Por otra parte, es muy posible que los mismos metabolitos nitrogenados que son prominentes en el "llanto", sean los que se acumulen cuando la planta entra en dormición. Ha sido demostrado (9) que la concentración de cada amino ácido y del N-soluble total en las raíces de vid aumentan durante el período de dormición, alcanzando un máximo, justo antes de la brotación. En la liberación de dichos compuestos podrían estar implicadas hormonas del tipo de las citocininas y giberelinas, bien determinadas en el "llanto" de la vid y otras especies (10, 13, 14, 15, 16, 18), cuyos roles como regula dores de la síntesis proteica están indicados (15). Además, la presencia de abundante glutamina haría pensar en un desdoblamiento de proteínas asociado al proceso respiratorio los cuales suministrarían, respectivamente, los grupos amino y el ATP necesario para la síntesis de esta amida.

Otro aspecto a discutir, y no fácil de explicar, es la irregularidad del contenido de nitrógeno total que fluye diariamente durante el período semanal examinado y la variación de volumen de savia que manan las plantas día a día. El fenómeno de exudación parece ser un proceso autónomo (5, 7, 8), y el "llanto" se desencadena tan pronto la temperatura del suelo, al final del invierno, supera un valor mínimo (5° - 10°C) característico para cada variedad y tipo de suelo. Una vez que el proceso se inicia ya no se interrumpe, pero las subsiguientes fluctuaciones de temperatura inciden evidentemente en el volumen exudado por la planta (1, 16).

Entre las posibles causas que puedan explicar las variaciones de la concentración de N-soluble total en la savia xilemática se pueden considerar,

entre otras cosas, a) que sea debida, en cierta medida, a un fenómeno de dilución, e.g., que la zona de absorción de agua de la raíz sea mayor, o trabaje a un ritmo más acelerado que la zona de secreción de los metabolitos nitrogenados a las células del xilema; b) que durante el movimiento ascensional, a lo largo del xilema pueda ocurrir una migración de dichos metabolitos hacia las células vivas adyacentes; c) en fin, que la concentración de nitrógeno sea una función del estado salino (contenido de nitratos) de la raíz, y que dicha cantidad resulte temporariamente limitante de la actividad de las enzimas implicadas en la reducción de los nitratos.

Es evidente que, en condiciones de campo, resulta muy difícil caracterizar algunas de estas causas. Cualquiera sea el proceso que regule dichas fluctuaciones, lo interesante en estos momentos, es poner de relieve que la presencia de compuestos nitrogenados libres, en el jugo xilemático, indica que los bloqueos del metabolismo han sido liberados y que, compuestos como el ácido glutámico, y muy especialmente glutamina, que acarrea grupos aminos extra, pueden servir de fuentes inmediatas de nitrógeno para atender el requerimiento de fuentes inmediatas de nitrógeno para atender el requerimiento proteico necesario para el crecimiento de las yemas a muy breve plazo.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - ALLEWELDT, G. 1965. Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Blutung von Reben.- *Vitis* 5: 10-16.
- 2 - BOLLARD, E. G. 1960. Transport in the xylem.- *A. Rev. Pl. Physiol.* 11: 141-166.
- 3 - BOUARD, J. 1967. Variations de la teneur en glucides de la base des sarments de vigne au cours d'un cycle végétatif complet: existence d'un rythme endogène.- *C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris* 264: 1860-1863.
- 4 - 1969. Influence de l'accumulation des réserves glucidiques sur l'arrêt de la végétation de la vigne.- *C. R.* 86^e Congress A.F.A.S. Fsc. IV: 2040-2041.
- 5 - FENSOM, D.S. 1958. The bio-electric potentials of plants and their functional significance. II. The patterns of bio-electric potential and exudations rate in excised sunflower roots and stems.- *Can. J. Bot.* 36: 367-383.
- 6 - FOWDEN, L. 1965. Amino acids biosynthesis. En: *Biosynthetic pathways in higher plants*. Ed. por J.B. Pridham y T. Swain. Academic Press: 73-99.
- 7 - GROSSENBACHER, K.A. 1938. Diurnal fluctuations in roots pressure.- *Pl. Physiol., Lancaster* 13: 669-676.
- 8 - 1939. Autonomic cycle of rate of exudation in plants.- *Am. J. Bot.* 26: 107-109.
- 9 - KLIEWER, W. M. 1967. Annual cyclic changes in the concentrations of free

- amino acids in grapevines.- Amer. J. Enol. Vitic. 18 (3): 126-137.
- 10 - LOEFFLER, J.E. and Van OVERBEEK, J. 1963. Kinin activity on coconut milk. En: Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S. Paris: 77-82.
 - 11 - MARCILLA ARRAZOLA, J. 1942. Tratado práctico de la viticultura española. Tomo I. Ed. Saeta. España.
 - 12 - MAROUTYAN, S.A. et A.D. DOGRAMADJYAN. 1967. Particularités biochimiques des pleurs de différentes variétés de la vigne (original en ruso, visto el resumen en Bull. de L'O.I.V. 1967, 40: 628).
 - 13 - NANDA, K.K. and H.N. PUROHIT. 1965. Effect of gibberellin on mobilization of reserve food and its co-relation with extension growth.- Planta 66: 121-125.
 - 14 - NITSCH, J.P. et C. NITSCH. 1965. Présence de phytoquinines et autres substances de croissance dans la sève d'Acer saccharum et de Vitis vinifera.- Bull. Soc. bot. Fr. 112 (1-2): 11-18.
 - 15 - OSBORNE, D.J. 1962. Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in Xanthium leaves during senescence.- Pl. Physiol., Lancaster 37: 595-602.
 - 16 - REID, D.M. and W.J. BURROWS, 1968. Cytokinin and gibberellin-like activity in the spring sap of trees.- Experientia 24: 189.
 - 17 - REUTHER, G. and A. REICHARDT, 1963. Temperatureinflüsse auf Blutung, und Stoffwechsel bei Vitis vinifera.- Planta 59 (4): 391-410.
 - 18 - SKENE, K.G.M. 1968. Increases in the levels of cytokinins in bleeding sap of Vitis vinifera after CCC treatment.- Science 159: 1477-1478.
 - 19 - SMITH, H. and N.P. KEFFORD, 1964. The chemical regulation of the dormancy phases of bud development.- Am. J. Bot. 51: 1002-1012.
 - 20 - STOEV, K.D., DOBREVA, S.I. und G. WOSTENINEZ, 1966. Ueber die Synthese Aminosäuren im Wurzelsystem der Rebe.- Vitis 5: 267-287.
 - 21 - THOMPSON, J.F. and F.C. STEWARD, 1951. Investigations of nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. II.- Pl. Physiol., Lancaster 26: 275-297 and 421-440.
 - 22 - WEBSTER, G.C. 1958. Nitrogen metabolism in plants. Harper & Row, New York. 152 pp.

*Instituto de Biología Vegetal,
Facultad de Ciencias Agrarias (U.N.C.),
Mendoza, Argentina.*

Terminóse de imprimir el 16 de agosto de 1972 en Fundación e Instituto Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán (R.A.).