

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FUNDACION E INSTITUTO MIGUEL LILLO

LILLOA

TOMO XXXIII: 9

S.O TRIONE, G. ALMELA PONS y H. MORALES - AMINO ACIDOS EN LA
SAVIA XILEMATICA ("LLORO") DE LA VID. III. EFECTO DE LA APLICACION DE
COMPUESTOS RICO-NITROGENADOS SOBRE LOS NIVELES DIARIOS DE LA
COMPOSICION AMINADA

(págs. 161-172 — 1 fig. en 4 partes)

TUCUMAN
REPUBLICA ARGENTINA

1972

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

EFFECTO DE LA APLICACION DE COMPUESTOS RICO-NITROGENADOS SOBRE LOS NIVELES DIARIOS DE LA COMPOSICION AMINADA

por S.O. TRIONE, G. ALMELA PONS y H. MORALES

SUMMARY

Amino acids in the bleeding sap of the grapevine. III. The effect of nitrogen-rich compounds on the daily fluctuations of the amino acid composition.- Changes in the daily composition of the soluble nitrogen fraction in the bleeding sap of *Vitis vinifera* L. cv. *Criolla Grande* were studied. Compounds with a high nitrogen content (e.g. asparagine, glutamine, arginine) had been previously added to the sap by direct inoculation into the xylem. Glutamine was found to be the main compound of the soluble nitrogen fraction in the bleeding sap collected during the first three days. From the next day onwards, however, glutamic acid turned out to be the dominant nitrogen soluble compound of the daily samplings. Glutamine concentration and total soluble nitrogen levels gave correlated results.

The patterns of total soluble nitrogen and those of the amino acids under varying conditions were closely correlated, with the exception of arginine where slight differences were observed. No parallelism was found when the percentage of nitrogen furnished as glutamine, asparagine and arginine was compared with the percentage of the nitrogen content corresponding to these same compounds on the first day of bleeding sap sampling.

The implication of added nitrogen compounds is discussed from a metabolic point of view, in relation to the delayed growth of the buds observed during a fortnight after bud burst.

En publicaciones previas de este laboratorio (14), (15), se mostró que la composición de la fracción nitrogenada soluble de la savia xilemática, colectada de plantas de vid en época del "lloro", variaba cuali y cuantitativamente a través de los días y durante el curso de un mismo día. Se supuso que dichas variaciones podían ser debidas a varias causas, entre ellas, la posibilidad de que los compuestos que integran el espectro de amino ácidos acumulados en los tejidos de raíz y tallo, se metabolizaran vía glutamina y/o ácido glutámico para ser secretados al xilema y transportados hacia arriba, donde servirían de donadores de nitrógeno para la síntesis de amino ácidos proteicos, comprometidos en el crecimiento inmediato de las yemas.

Para obtener más información referente al papel que dichos compuestos aaminados desempeñan como constituyentes de la savia xilemática que exuda la planta podada, pareció interesante intentar variar cuali y cuantitativamente la contribución nitrogenada que naturalmente realizan los tejidos de la raíz y tallo, inyectando compuestos rico-nitrogenados, e.g., asparagina, glutamina, arginina, directamente al xilema.

Con ese fin, en la presente investigación, se determinó la composición de la fracción amídica y amínica de la savia xilemática de la vid reforzada con dichos metabolitos, siguiéndose su variación diariamente.

Por otro lado, la información respecto a la variación de dicha composición podía ser de valor en el entendimiento del proceso fisiológico-bioquímico del crecimiento de las yemas, en relación a los factores hormonales que controlan su dormición (7), (9), (11), (12).

MATERIAL Y METODOS

El ensayo se llevó a cabo sobre plantas de *Vitis vinifera* L. cv. *Criolla Grande*, que crecen en un parral irrigado, perteneciente a la Colección Ampelo gráfica del Instituto de Viticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias, en Chacras de Coria, Mendoza. Dos plantas se tomaron por cada tratamiento. Estos consistieron en inyectar directamente el xilema de cada planta, 25 ml de una solución 100 ppm de, según los casos, asparagina, glutamina y arginina, recibiendo el testigo igual volumen de agua destilada. Vale decir, cada planta tratada recibió 2,5 mg del compuesto que le correspondió. Dicha cantidad equivale a 530 μ g de N-asparagina, 480 μ g N-glutamina y 805 μ g N-arginina. El tratamiento se efectuó en plantas no podadas, 6 días antes de colectar el "lloro". Esto se realizó seccionando 4 sarmientos por planta, en cuyos extremos heridos se adaptaron frascos para la recolección del líquido. Las muestras se tomaron con intervalos de 24 horas durante el curso de 8 días, al cabo de los cuales, las plantas se podaron en su forma habitual.

Tanto la manera de procesar las muestras, como la evaluación cuantitativa de los diferentes amino ácidos y la forma de expresión de los resultados son las mismas descritas en un trabajo previo (14). Cualquier alteración del fenómeno de brotación y alargamiento posterior de las yemas por causa de los tratamientos, fue observada y registrada.

RESULTADOS

(figura 1 A, B, C y D)

Puede apreciarse que durante los primeros tres días de exudación xilemática, el contenido de nitrógeno soluble total de dicho fluido sufre un aumento sostenido, registrándose los más altos niveles en plantas no tratadas (testigo). Desde el 3º día en adelante la tendencia del nitrógeno total es a decrecer en todas las variables, a excepción del tratamiento con arginina que muestra, aunque con cierta irregularidad, un incremento durante los días subsiguientes.

Los compuestos predominantes, por su proporción relativa de nitrógeno, son glutamina y ácido glutámico (Nº 9 y Nº 3, respectivamente, en los histogramas), el resto de los compuestos, cuya contribución a esta fracción nitrogenada es normalmente pobre, están señalados con un número de acuerdo a la siguiente convención:

1 - ácido cisteico	13 - arginina
2 - ácido aspártico	13 - metionina (sulfóxido)
3 - ácido glutámico	15 - prolina
4 - serina	16 - valina
5 - glicina	18 - leucina
6 - asparagina	19 - fenilalanina
7 - treonina	21 - tirosina
8 - alanina	23 - ácido gamma-aminobutírico
9 - glutamina	26 - ácido pipecólico
12 - lisina	? - compuesto no identificado

Cualquiera sea el tratamiento, glutamina domina la fracción nitrogenada durante los tres días iniciales del "lloro", coincidente con el aumento sostenido de N-soluble total. Durante los días subsiguientes, con decrecimiento de nitrógeno, el ácido glutámico es el metabolito que toma el lugar dominante de la glutamina en todas las variables, con excepción del tratamiento de arginina, en el cual glutamina vuelve a ser el más abundante en el 5º día y bastante apreciable en el 6º día del flujo xilemático.

Es útil señalar que si bien la brotación ("rompimiento de las yemas") se produjo simultáneamente en plantas tratadas y no tratadas, hubo una disminución en el número de yemas brotadas, en aquellas plantas que recibieron los compuestos rico-nitrogenados. Además, en esas mismas plantas, el

crecimiento posterior de las yemas quedó demorado por más de 15 días en relación al testigo, de manera que durante las dos semanas que siguieron a la brotación, el panorama que se presentó fue el siguiente: Testigo: uniformemente brotado, con brotes de más de 5 cm de largo; Plantas tratadas: aproximadamente con un 65% de sus yemas brotadas, con una longitud de brote inferior a 2 cm. El orden decreciente de manifestación vegetativa foliar fue así: Testigo > tratamiento Glutamina > tratamiento Arginina > tratamiento Asparagina. Posteriormente desaparecieron las diferencias de dicha manifestación vegetativa entre plantas tratadas y no tratadas.

DISCUSION

Un rasgo sobresaliente de este ensayo es la ausencia, dentro del espectro de amino ácidos, de cantidades apreciables de N-asparagina y N-arginina que paralelen los porcentajes de N-suministrados con los de N-encontrados, sobre todo, al 1er día de recolección del "lloro" (tabla 1). Si se analiza esta tabla se ve que el porcentaje de recuperación de nitrógeno suministrado como asparagina o arginina es nulo. El nitrógeno suministrado como glutamina no se puede determinar aquí, ya que este compuesto forma el grueso de la fracción nitrogenada soluble. Estos datos sugieren que los compuestos rico-nitrogenados inyectados han sido metabolizados en el mismo jugo xilemático, durante el período previo al primer día examinado, o bien, quedaron fijados a nivel de las yemas y posteriormente fueron metabolizados en ese lugar. La actividad de enzimas en el "lloro" de vid no es desconocida(6). Por otro lado, el lento crecimiento de las yemas observado, aunque no estadísticamente analizado, pudo haberse debido a un fenómeno de presión por fijación o acumulación de las sustancias inyectadas(2). Se ha demostrado que muchos metabolitos de bajo peso molecular, como la arginina, actúan reprimiendo procesos por un mecanismo de "realimentación" (feedback) (16), y que las amidas se acumulan cuando la síntesis proteica está arrestada(13). Dichas sustancias pueden luego metabolizarse y el proceso de-reprimirse (desaparición de las diferencias en la manifestación foliar observada con posterioridad a los 15 días de haberse producido la brotación poco uniforme, de las plantas tratadas). Así, la arginina por acción de la arginasa y ureasa se degrada *in situ* (1).

Se puede decir que el modelo global, fundamentalmente con respecto a los dos compuestos nitrogenados más abundantes en el "lloro" de la vid, no es alterado mayormente por los tratamientos, durante los días sucesivos examinados. Las pocas variaciones constatadas pueden atribuirse al azar, o a una leve alteración en el orden de las reacciones enzimáticas (desfasa

miento momentáneo) provocadas por el suministro exógeno de los compuestos en cuestión.

Las implicaciones fisiológicas y bioquímicas de la composición y los cambios en los principales metabolitos nitrogenados en el "lloro" de la vid, quedan todavía por determinarse. Es un hecho comprobado por prácticos (5), que cuando una planta de vid pierde mucha savia xilemática a consecuencia de podas severas y tardías, la brotación se retrasa y, si en cambio se practican podas livianas y tempranas, la planta casi no "llora" y la brotación se adelanta. Uno se pregunta: tienen implicancia en este fenómeno las sustancias (nitrogenadas) contenidas en el jugo xilemático?, y si la tienen: es ésta

TABLA I

Comparación porcentual, en el primer día de recolección del "lloro", entre la forma de nitrógeno suministrado y la misma forma de nitrógeno analizado, en el jugo xilemático de *Vitis vinifera* cv. *Criolla Grande*.

TRATAMIENTOS (N-inyectado)	NITROGENO ANALIZADO		
(Nitrógeno en cada compuesto suministrado, como % del N-sol.total)	(nitrógeno en cada compuesto analizado, como % del N-sol.total)		
	N-asparagina	N-glutamina	N-arginina
Testigo (0 %)	2.2 %	82.0 %	3.7 %
N-asparagina (12 %)	1.6 %	90.0 %	0 %
N-glutamina (13 %)	2.3 %	85.0 %	2.5 %
N-arginina (26 %)	2.2 %	82.0 %	3.8 %

cuantitativa o cualitativa? Desde el punto de vista cuantitativo la pérdida de savia no parece ser importante. Con respecto al nitrógeno soluble podemos calcular que una planta con 2 cargadores y pitones, "llorando" 20 litros en un período de 10 días, pierde tan sólo 20 mg de N. Sin embargo, lo no aclarado todavía es la importancia que pueda tener la calidad de los amino ácidos como sustancias que interactúen con estimulantes de la brotación, presentes en el mismo jugo (4), (8), (11), regulando así la manifestación de la expresión foliar de la planta al reiniciarse el período vegetativo. La eliminación de un amino ácido de este tipo evitaría su acumulación a nivel de las yemas, lo que provocaría un retraso en el crecimiento de éstas. Por otra parte, se ha constatado que con "lloro" reducido, la concentración de glucosa y levulosa en el jugo xilemático es alta (10).

A través de estos ensayos se hace evidente que las raíces de la vid se especializan, sobre todo, en la síntesis y/o acumulación de un complemento grande de amino ácidos (3), casi enteramente confinados a la familia del glutamato, que son luego secretados al xilema y elevados a lo largo de gradientes de presión hidrostática hasta nivel de las yemas; son justamente estos compuestos los que vinculan el metabolismo del nitrógeno de la raíz con el de las yemas, armando, por así decirlo, su crecimiento ya estimulado hormonalmente (9).

BIBLIOGRAFIA

- 1 - DURANTON, H., DURST, F. et C. LAMBERT, 1965. Action de la lumière sur le métabolisme de l'arginine dans les tissus du Topinambour cultivés in vitro.- C. r. Séanc. Soc. Biol. 159 (6): 1431.
- 2 - KLEPPER, B. and M.R. KAUFMANN, 1966. Removal of salt from xylem sap by leaves and stems of guttating plants.- Pl. Physiol., Lancaster 41 (10): 1743-1747.
- 3 - KLIEWER, W.M. 1967. Annual cyclic changes in the concentration of free amino acids in grapevine.- Amer. J. Enol. Vitic. 18 (3): 126-137.
- 4 - LOEFFLER, J.E. and J. Van OVERBEEK, 1963. Kinin activity in coconut milk. En: Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S. Paris: 77-82.
- 5 - MARCILLA ARRAZOLA, J. 1942. Tratado práctico de viticultura española. Tomo I. Ed. Saeta. España.
- 6 - MAROUTYAN, S.A. et A.D. DROGAMADJYAN, 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: 629).
- 7 - 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.
- 8 - NITSCH, J.P. et C. NITSCH, 1965. Présence de phytokinines et autres substances de croissance dans le sève d'Acer saccharum et de Vitis vinifera.- Bull. Soc. bot. Fr. 112 (1-2): 11-12.
- 9 - REID, D.M. and W.J. BURROWS, 1968. Cytokinin and gibberellin-like activity in the spring sap of trees.- Experientia 24: 189.
- 10 - REUTHER, G. und A. REICHARDT, 1963. Temperatureinflüsse auf Blutung und Stoffwechsel bei Vitis vinifera.- Planta 59 (4): 391-410.
- 11 - SKENE, K.G.M. 1968. Increases in the levels of cytokinins in bleeding sap of Vitis vinifera after CCC treatment.- Science 159: 1477-1478.
- 12 - SMITH, H. and N.P. KEFFORD, 1964. The chemical regulation of the dormancy phases of bud development.- Am. J. Bot. 51: 1002-1012.

- 13 - STEWARD, F.C. and D.J. DURZAN, 1965. Metabolism of nitrogenous compounds. En: Plant Physiology, a treatise. Ed. F.C. Steward. Vol. IV-A: 379-636. Acad. Press, New York.
- 14 - TRIONE, S.O. y G. ALMELA PONS, 1972. Amino ácidos en la savia xilemática ("lloro") de la vid. I. Cambios diarios en el complemento nitrogenado soluble.- Lilloa 33, 7: 137-147.
- 15 - TRIONE, S.O., G. ALMELA PONS y J.S. MOYANO, 1972. II. Fluctuaciones horarias en la composición aminada durante un ciclo de 24 horas.- Lilloa 33, 8: 149-159.
- 16 - VOGEL, H.J. 1961. Control by repression. En: Control mechanisms in cellular processes. Ed. D.M. Bonner: 23-65. The Ronald Press Co, New York.

*Instituto de Biología Vegetal,
Facultad de Ciencias Agrarias (UNC),
Mendoza, Argentina.*

LEYENDA FIGURA 1 A, B, C, D

Espectro de amino ácidos y amidas libres encontrados en el jugo xilemático de *Vitis vinifera* cv. *Criolla Grande*, en días sucesivos después de inyectar al xilema:

A: agua destilada (testigo); B: asparagina; C: glutamina; D: arginina.



