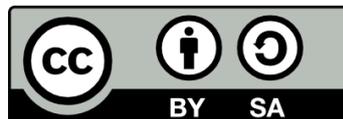




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Efecto de los elementos Li, Na, K, Rb y Cs sobre el metabolismo aminoácido-proteico y la síntesis de nicotina en *Nicotiana rustica* L.

Rosa M<sup>a</sup> Cusidó Vidal



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

EFFECTO DE LOS ELEMENTOS Li, Na, K, Rb y Cs

SOBRE EL METABOLISMO AMINOACIDO-PROTEICO Y LA

SINTESIS DE NICOTINA EN NICOTIANA RUSTICA L.

R. 454.778

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE FISILOGIA VEGETAL

Memoria presentada por  
Rosa M<sup>a</sup> Cusidó Vidal para optar  
al grado de Doctor en Farmacia,  
por la Universidad de Barcelona.

Dirigida por el Catedrático  
Dr. Manuel Serrano Garcia  
y la P<sup>r</sup>fra. Dra. M<sup>a</sup> Teresa Piñol  
Serra.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083893

Barcelona, septiembre de 1.980

Agradezco profundamente al Prof. Dr. Manuel Serrano Garcia y a la Prfra. Dra. Ma Teresa Piñol Serra su valiosa ayuda y el gran interés con que han dirigido el desarrollo de esta memoria.

También expreso mi sincero agradecimiento a la Prfra. Dra. Carmen Morales Pujol, por los consejos y ayuda que en todo momento me ha prestado.

Asimismo deseo expresar mi gratitud a Dn. José Ma Moret Oliveras, quien con extraordinario interés y a costa de su tiempo, ha realizado las representaciones gráficas de este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento y en especial al Prof. Dr. Carlos Codina Mahrer y a la Prfra. Dña. Concepción Aiguadé Ballus por su desinteresada colaboración y ayuda.

A mis padres

# I N D I C E

## 1 - INTRODUCCION

1.1 - Concepto general .....	4
1.2 - Papel de los alcaloides en la planta ...	7
1.3 - Modificaciones metabólicas de los alcaloides .....	13
1.4 - Curso de crecimiento y variación de las fracciones nitrogenadas .....	24
1.5 - Aminoácidos y proteínas y su control biosintético .....	27
1.5.1 - Control de la biosíntesis de aminoácidos .....	34
1.5.2 - Control de la biosíntesis de proteínas .....	38
1.6 - Lugar de formación de nicotina y alcaloides afines .....	40
1.7 - Biosíntesis de nicotina y regulación de sus pasos metabólicos .....	44
1.7.1 - Regulación de los pasos metabólicos .....	51
1.8 - Influencia ambiental y nutritiva sobre la producción de alcaloides .....	57
1.8.1 Influencia de la luz, el agua y las condiciones climáticas generales .....	58

1.8.2 - Influencia de los nutrientes minerales .....	62
1.9 - Efecto de los elementos alcalinos en la fisiología de la planta .....	66
1.9.1 - Potasio .....	69
1.9.2 - Litio .....	80
1.9.3 - Sodio .....	83
1.9.4 - Rubidio .....	90
1.9.5 - Cesio .....	93
2 - <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
2.1 - Obtención del cultivo de <u>Nicotiana</u> <u>rustica</u> .....	95
2.2 - Toma de muestras y preparación para su análisis .....	97
2.3 - Determinación del meso seco .....	98
2.4 - Determinación colorimétrica de las pro- teínas por el método de Lowry .....	99
2.5 - Análisis de los aminoácidos proteicos libres e integrados en proteína, por cam- bio iónico .....	104
2.6 - Determinación colorimétrica de la ni- cotina .....	111
3 - <u>RESULTADOS Y SU INTERPRETACION</u>	
3.1 - Consideraciones previas .....	115

3.2 - Valores indicadores del crecimiento	
de las plantas .....	117
3.2.1 - Número de hojas y sus medidas ..	117
3.2.2 - Crecimiento del tallo en longi- tud .....	118
3.2.3 - Crecimiento de la raíz en longi- tud .....	120
3.3 - Pesos de hojas, tallo y raíz .....	127
3.3.1 - Peso fresco y peso seco de las hojas .....	127
3.3.2 - Peso fresco y peso seco del ta- llo .....	128
3.3.3 - Peso fresco y peso seco de la raíz .....	129
3.4 - Proteínas .....	137
3.4.1 - Proteínas en las hojas .....	137
3.4.2 - Proteínas en el tallo .....	140
3.4.3 - Proteínas en la raíz .....	142
3.4.4 - Consideraciones finales .....	144
3.5 - Aminoácidos .....	156
3.5.1 - Aminoácidos en hojas, tallo y raíz .....	157
Serina, Glicina y Cistina en estado proteico:	
Hojas .....	157
Tallo .....	158
Raíz .....	159

Serina, Glicina y Cistina en estado libre .....	162
Fenilalanina y Tirosina en estado proteico :	
Hojas .....	187
Tallo .....	188
Raíz .....	189
Fenilalanina y Tirosina en estado libre .....	192
Alanina, Valina y Leucina en estado proteico:	
Hojas .....	211
Tallo .....	213
Raíz .....	214
Alanina, Valina y Leucina en estado libre .....	217
Ac. Aspártico, Metionina, Lisina, Treonina e Isoleucina en estado proteico:	
Hojas .....	243
Tallo .....	245
Raíz .....	247
Ac. Aspártico, Metionina, Lisina, Treonina, Isoleucina en estado libre .....	251
Ac. Glutámico, Prolina y Arginina en estado proteico:	

Hojas .....	289
Tallo .....	290
Raíz .....	292
Ac. Glutámico, Prolina y Argini- na en estado libre .....	294
Histidina en estado proteico ....	319
Histidina en estado libre .....	319
3.5.2 - Consideraciones generales sobre los aminoácidos .....	332
Aminoácidos en estado proteico:	
Valores absolutos .....	334
Porcentajes .....	338
Aminoácidos en estado libre:	
Valores absolutos .....	341
Porcentajes .....	344
3.6 - Nicotina .....	354
3.6.1 - Valores absolutos de nicotina:	
Hojas .....	354
Tallo .....	355
Raíz .....	355
3.6.2 - Valores de nicotina expresados en porcentaje de peso seco de órgano .....	356
3.6.3 - Consideraciones finales .....	359
4 - <u>CONCLUSIONES</u> .....	374
5 - <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	384

La capacidad de una planta para la producción de sustancias, particularmente de aquellas que la distinguen de las plantas de otra especie, o dentro de la misma especie de otra raza o variedad, está determinada genéticamente. Pero probablemente, la planta en cuestión puede, sin desvirtuar su naturaleza genética, formar una sustancia secundaria propia de su metabolismo a partir de diferentes precursores, sobre todo bajo ciertas condiciones experimentales, es decir, mediante un proceso inducido. Así Nicotiana rustica producirá siempre nicotina, como alcaloide principal, y no hiosciamina e incluso anabasina, porque así está determinado genéticamente.

En la actualidad, el estudio de la biosíntesis de un producto natural no puede limitarse a la aplicación de precursores, marcados o no, y a su reconocimiento en el compuesto elaborado. Spencer (1970), indica que es necesario el conocimiento de: a) todo intermediario en el camino de biosíntesis del compuesto; b) todos los enzimas y cofactores necesarios, que catalizan los pasos individuales, y c) la estequiometría, la cinética y el mecanismo químico de cada paso catalizado por un enzima. Interesa además el conocimiento de la información genética y su puesta en acción por el estímulo hormonal. En definitiva, la relación hormona - enzima de acuerdo con el "dogma de la biología molecular".

Todo lo expuesto, y todavía otros saberes, son necesarios para conocer como se forma un producto natural; pero es evidente que interesan también los factores físicos o ambientales, que contribuyen o permiten el desarrollo nor-

mal de la especie. Basándonos en lo expuesto, hemos realizado experiencias, a fin de estudiar la relación que puede existir entre las fracciones nitrogenadas proteica y aminoácido y la nicotina, en raíz, tallo y hojas de Nicotiana rustica L., durante el período del ciclo vegetativo estudiado, en un medio en el que el K, imprescindible en gran cantidad para la nutrición de la planta, se ha sustituido por Li, Na, Rb ó Cs, de los que, a lo más, la planta tendrá unas necesidades catalíticas o ultracatalíticas. Una de las consecuencias más conocidas de la deficiencia de K en los tejidos vegetales es la disminución de la síntesis de proteínas y la acumulación de aminoácidos proteicos en estado libre (Webster, 1956).

El trabajo se ha dividido en cinco partes fundamentales:

Introducción

Parte experimental

Resultados y su interpretación

Conclusiones

Bibliografía

En la introducción se ha recogido la revisión bibliográfica acerca del crecimiento y metabolismo nitrogenado, particularmente el alcaloídico, de Nicotiana, y de los efectos que sobre ellos ejercen los elementos minerales considerados.

En la parte experimental se describen detalladamente las condiciones para el cultivo, la toma de muestra del material vegetal y los métodos analíticos utilizados.

El apartado de resultados y su interpretación se ha dividido en dos partes, en la primera se describen los re-

sultados expresados en forma de tablas y gráficas; en la segunda se resaltan e interpretan aquellos hechos que indican el efecto de la sustitución parcial del K por los elementos monovalentes indicados.

Por último, los apartados referentes a conclusiones y bibliografía.

## 1 . INTRODUCCION

### 1.1 Concepto general

Los alcaloides se conocen desde finales de la segunda década del siglo pasado, aunque de modo empírico se habían utilizado plantas alcaloídicas prácticamente desde que el hombre se sirvió de las plantas con fines terapéuticos y/o tóxicos. El estudio de los alcaloides ha pasado por diferentes etapas, y en la actualidad se vislumbran otras nuevas, ya que al interés farmacológico y toxicológico clásico de estas sustancias se ha sumado el que tienen como factores para el conocimiento de la situación filogenética y taxonómica de las especies que las contienen.

Los alcaloides constituyen un grupo de productos naturales muy heterogéneos, por lo que el concepto de alcaloide es todavía ambiguo. Como alcaloide, en el sentido clásico, se comprende sustancias de origen vegetal, que contienen N, usualmente heterocíclico aunque no siempre, y por ello son bases débiles (la palabra alcaloide ya indica álcali vegetal), y además tienen moléculas complejas, proceden de aminoácidos, están restringidos a grupos taxonómicos reducidos, tienen estabilidad metabólica y son activos sobre el sistema nervioso. Algunos de los caracteres indicados, difícilmente pueden sostenerse en la actualidad, ya que hay moléculas que tienen una constitución química dentro del concepto de alcaloide que ni remotamente lo son, como la Vit B<sub>1</sub>. Hay además una serie de compuestos, tenidos por algunos autores como alcaloides, que son aminas o aminas sustituidas; en este último caso tenemos la efedri-

na, narceína y mezcalina; hay además otros compuestos, como las bases cuaternarias, que también tienen una situación dudosa.

El origen vegetal de los alcaloides tampoco puede ser sostenido, ya que algunos se hallan en animales. Quizá podamos sostener todavía hoy que las plantas superiores son más ricas en alcaloide que las inferiores y que los animales. Y que, hasta cierto punto, existe una relación en las plantas entre su desarrollo filogenético y su contenido alcaloídico.

La procedencia de aminoácidos no puede sostenerse tampoco hoy en términos absolutos, ya que conocemos alcaloides que son producidos por lo menos parcialmente de polícétidos, y otros que tienen origen terpénico y constitución esteroídica.

Un último aspecto indicado en el concepto de alcaloide, se refiere a la estabilidad metabólica. Se ha comprobado que al dar alcaloides de origen externo y marcados radiactivamente a plantas alcaloídicas, el metabolismo de éstas los convierte no solamente en otros alcaloides de su mismo grupo sino también en aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, etc. Lo cual indica que estos compuestos no son tan inertes o de desecho como se había supuesto.

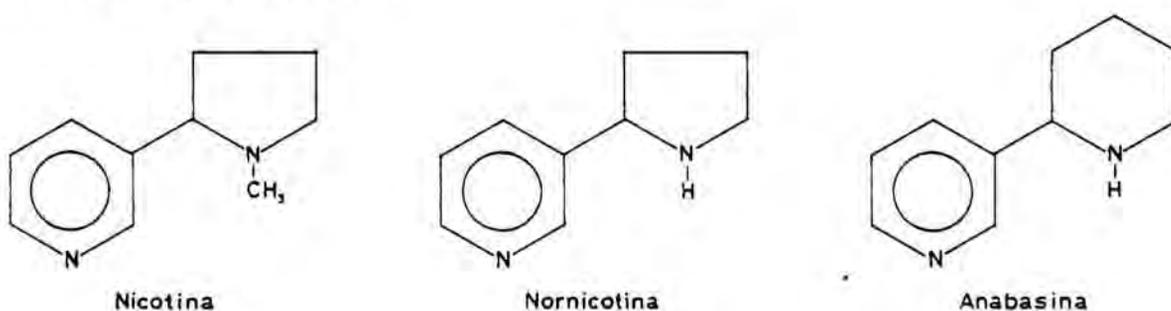
A partir de los años cincuenta, con la introducción de los isótopos radiactivos en la investigación biológica, se han realizado enormes progresos en el conocimiento de los precursores e intermediarios metabólicos, y de los caminos de síntesis de los alcaloides. En la actualidad está iniciada la investigación sistemática de la distribución de los alcaloides en todo el reino vegetal, y el problema

ya no es solo de precursores y de caminos de síntesis, sino también del potencial genético, que dirige y controla la formación de los sistemas enzimáticos que catalizan las reacciones todas del metabolismo de la planta, y de los factores internos y externos, naturales y artificiales, que actúan sobre los genes y los enzimas que ponen en acción y dirigen el metabolismo secundario.

De acuerdo con la finalidad de nuestro trabajo, y para la información teórica correspondiente, trataremos, además del concepto general expuesto, los siguientes aspectos, referidos particularmente a Nicotiana : papel de los alcaloides en la planta; modificaciones metabólicas de los alcaloides; curso de crecimiento y variaciones de las fracciones nitrogenadas; aminoácidos y proteínas, y su control biosintético; lugar de formación de nicotina y alcaloides afines; biosíntesis de nicotina y regulación de sus pasos metabólicos; influencia ambiental y nutritiva sobre la producción de alcaloides; efecto de los elementos alcalinos en la fisiología de la planta.

## 1.2 Papel de los alcaloides en la planta.

La mayoría de los alcaloides del género Nicotiana son derivados de la piridina. Los más importantes son, en el orden en que se indican: nicotina, nornicotina y anabasina. Constan, además del anillo de piridina, del de pirrolidina para nicotina y nornicotina, y del de piperidina para anabasina.



En N. tabacum y N. rustica, el alcaloide principal es nicotina, mientras que en otras muchas especies de Nicotiana lo es nornicotina (Smith y Smith, 1942). En Nicotiana verde y en tabaco curado, así como en raíces, se han encontrado otros varios alcaloides y compuestos no alcaloídicos derivados todos ellos de la piridina (Tso y Jeffrey, 1959; Kisaki, Mizusaki y Tamaki, 1968). Además, se han encontrado también en Nicotiana, en pequeña cantidad, alcaloides indólicos (harmano y norharmano) (Poindexter y Carpenter, 1962).

Los papeles propuestos para los alcaloides en el metabolismo, catabolismo, o fisiología vegetal son: 1) productos finales o desechos del metabolismo, 2) reservorios de nitrógeno, 3) agentes protectores de la planta frente al ataque de predadores y 4) reguladores del crecimiento.

La noción más común es que los alcaloides son productos de desecho que juegan un papel sin importancia como compuestos protectores de las plantas, y que se acumulan en ésta, debido a la falta de un órgano excretor comparable a los riñones animales. Sin embargo, las plantas tienen un sistema sorprendentemente efectivo -el envejecimiento de la hoja-, y es curioso que este sistema no sea ampliamente reconocido (Nowacki y Waller, 1973). Cada planta, mientras crece, produce nuevas hojas y deja caer otras viejas. Antes de que la hoja esté preparada para caer, todos los metabolitos que pueden serle útiles son translocados, y solamente quedan verdaderos desechos. Si los alcaloides fueran desechos, estarían concentrados en las hojas muertas, como tales o convertidos en otras formas, como sucede con alcaloides introducidos y extraños para la planta.

Parece más convincente, que puesto que el carácter alcaloídico está bien establecido en algunas plantas, es necesario para aquellas especies producir y salvar alcaloides en, por ejemplo, las semillas, así como trazas en otras partes. En Nicotiana la presencia de nicotina en las semillas depende del grado de madurez, y de la especie o variedad. En semillas madurantes de Nicotiana tabacum disminuye la nicotina hasta desaparecer, cuando han completado la maduración (Il'in y Lovkova, 1959); en Nicotiana glutinosa, las semillas maduras contienen nicotina y ácido nicotínico (Tso y Jeffrey, 1956), y también en Nicotiana rustica (Schmid y Serrano, 1948; Serrano, 1948 a).

El papel de un alcaloide puede ser diferente en plantas diferentes, y en plantas libres de alcaloides puede ser cumplido por otros compuestos como los aminoácidos no usua-

les, otros metabolitos, etc.; pero la función protectora presente y pasada, puede ser la razón de ser para la mayoría de los alcaloides. Sin embargo, dado que, en la mayoría de los casos, la protección de plantas frente a infecciones fúngicas y bacterianas se debe a diferencias en la estructura de la pared celular, a la acumulación de compuestos fenólicos, o a la capacidad para formar capas de suberina en torno al punto de infección, parece que los alcaloides nunca han jugado un papel importante en la protección de plantas frente a este tipo de infecciones. Otro caso sería frente a las infecciones víricas, la resistencia a un virus en una cierta planta puede ser causada por dos factores principales: 1) el medio celular de la planta puede no proporcionar material apropiado para la duplicación de los ácidos nucleicos y proteínas víricas, y 2) la planta es evitada por el vector, usualmente un insecto, debido a ciertas propiedades químicas o mecánicas.

Se sabe que los virus se desarrollan muy bien en plantas ricas y pobres en alcaloides, pero en algunos casos solo los padecen plantas con un definido grupo alcaloídico. Se conoce la especificidad del huésped de la mayoría de los virus vegetales. La mayor parte de la raza del virus del mosaico del tabaco (VMT) infectan a las especies del género Nicotiana; sin embargo, los síntomas de la enfermedad son muy diferentes en N. tabacum y N. glauca. Nicotiana tabacum se pone rápidamente pálida, la infección se extiende por toda la planta, y se forma el modelo de mosaico típico. Por el contrario, Nicotiana glauca desarrolla sólo manchas necróticas restringidas y la planta queda aparentemente sana; tampoco retarda el desarrollo y producción de semillas. Un caso similar se encontró en altramuces de las especies

mediterráneas. L. digitatus y L. albus eran víctimas de la infección viral que causa el estrecho follaje en lupinas amarillas. Las plantas infectadas tenían un alto contenido de arginina libre y usualmente morían antes de producir semillas; mientras que el mismo virus no producía síntomas claros en L. mutabilis, una especie sudamericana que tiene un juego diferente de alcaloides (Nowacki y Waller, 1973). En ambos casos, Nicotiana y Lupinus, podían infectar no sólo los géneros dados sino un número de otras plantas huésped no relacionadas estrechamente, como era el caso de algunas solanáceas, a las que el VMT causaba daño manifiesto.

Extrañamente, sólo N. glauca parece resistente a los virus. No hay evidencia de que los alcaloides estén realmente implicados en la resistencia ; pero el hecho de que ciertos alcaloides sean activos mutagénicos, carcinógenos y agentes antitumor, es lo suficientemente grande para sugerir que los alcaloides presentes en la célula, pueden interferir la replicación de las moléculas de ácido nucleico vírico. Dawson y Dsdene (1972) proponen la hipótesis de la posibilidad de que la nicotina y anabasina estén ligadas a un polinucleótido como parte integral de las macromoléculas de ADN y ARN. Aunque hay poderosos argumentos en favor de la existencia de ADN o ARN-t que contienen nicotina y anabasina, no han sido aislados hasta el momento. Lógicamente hay que suponer la existencia también de un sistema para discriminar entre alcaloides y bases de ácidos nucleicos, o entre alcaloides y aminoácidos proteicos en las plantas que toleran una gran cantidad de alcaloides. Este caso parece estar suficientemente explicado mediante la experiencia de Fowden (1974), en la que no encontró incorporación de homólogos no-usuales de aminoácidos ( o al-

caloides, en su más amplia definición) en proteínas de las especies vegetales que los producen, mientras que en plantas que no los producen, estos compuestos no usuales, son incorporados en lugar de los propios.

Es bien conocida la acción mutágena de un número de alcaloides en células de plantas, bacterias, insectos y mamíferos, pero no hay prueba de que un alcaloide produzca una mutación en la planta donde se produce. Esto puede atribuirse al hecho de que los alcaloides propios se pueden depositar fuera de los centros activos de las células, como usualmente sucede; los alcaloides se depositan principalmente en la vacuola. Por el contrario, los alcaloides introducidos artificialmente se pueden distribuir de modo diferente en las células. Por ejemplo, en las células de plantas ricas en alcaloides, éstos se desplazan de los centros metabólicamente activos a las vacuolas, y cuando la células está infectada por un virus hay bastante alcaloide disponible para perturbar el sistema de replicación del virus. Este concepto necesita comprobación experimental, pero está claro que en géneros en que se dan un número de especies infectadas por virus y otras aparentemente inmunes, existe simultáneamente en las especies infectadas e inmunes un espectro alcaloídico diferente. Es interesante, al respecto, la evidencia de actividades de alcaloides en la duplicación de ADN. Algunos alcaloides son usados como drogas para la inhibición del desarrollo, por ejemplo, tumores cancerosos animales, incluyendo humanos (Kupchan y By, 1968; Kupchan, 1975).

En cuanto a los insectos que se nutren de plantas ricas en alcaloides, el hecho de que sean huéspedes para un número de insectos fitófagos, que aparentemente no pa-

decen daño de los alcaloides que ingieren, indujo a algunos científicos a concluir que los alcaloides no tienen propiedades protectoras. Sin embargo, los mismos alcaloides cuando nutrían a insectos no especializados se probaban violentos venenos; por ejemplo, la nicotina nutría a Periplaneta americana (Yamamoto, 1965), pero todas las plantas que contienen nicotina son fuertemente tóxicas para la larva de Leptinotarsa decemlineata, el escarabajo común de la patata de Colorado que se dá en un número de Solanaceas. La existencia de predadores especializados indica el papel de los alcaloides como agentes protectores de plantas. Probablemente los insectos han ejercido una gran influencia sobre el establecimiento del caracter alcaloídico en algunas familias. Otros animales superiores, en general vertebrados herbívoros, sólo serían responsables de la preservación de este caracter. Para los animales una simple planta venenosa diluida por otras no tóxicas causará poco o ningún efecto, por ello, en este caso, un principio que puede proteger una especie tiene que volverla desagradable, como amarga, picante, mal oliente, ó de algún modo repelente.

### 1.3 Modificaciones metabólicas de los alcaloides.

El problema aquí es lo que sucede al alcaloide después de sintetizado. Además de la interconversión de formas "libres" y "ligadas" que pueden ayudar a comprender el papel de los alcaloides en las plantas que los producen, los alcaloides experimentan reacciones catabólicas o degradatorias. Algunos hechos conocidos, y quizá algunos hallazgos futuros de catabolismo alcaloídico, podrán ayudar a explicar porque algunas especies de plantas están libres de alcaloides, otras tienen un bajo nivel y otras un alto nivel; aunque los bajos niveles podrían ser debidos a la rapidez de las reacciones catabólicas.

Está claro que los alcaloides no son productos finales inertes, sino participantes bastante activos en las reacciones metabólicas dinámicas. Fluctúan en la concentración total y en la proporción de cambio durante el ciclo de desarrollo de la planta, y por ello hay un tiempo óptimo para la recolección de la planta, en cuanto a su contenido alcaloídico, que normalmente coincide cuando está en su principal estado de crecimiento, y rara vez cuando comienza la senescencia. Esta es una clara indicación de que el contenido alcaloídico tiende a incrementar, y entonces declina con respecto al estado fisiológico de las plantas.

La intensidad del metabolismo alcaloídico se puede medir mediante el uso de moléculas marcadas. Con esta técnica se puede determinar la proporción de cambio de un compuesto, incluso si la cantidad total permanece constante. Dar un alcaloide a una planta, no está libre de obje-

ciones, puesto que cualquier compuesto introducido en el organismo puede comportarse de modo diferente debido a las barreras de membrana y a la compartimentación de las células y tejidos, respecto al mismo compuesto formado dentro. Así, los resultados obtenidos por "administración" de un compuesto pueden no reflejar un proceso completamente natural, sino, en cierto modo, "aberrante" (Leete, 1969).

Robinson (1974) calculó que cerca de 35 mmol de  $\text{CO}_2$  eran fijados por planta y por día en la planta de tabaco de 60 días de edad, que contiene 250 mg de nicotina. De los datos de cambio, se concluyó que 92 mg tienen que ser catabolizados y biosintetizados en un día de 10 horas; esto equivale a 0,6 mmol (P.M.=162; 1 mM=0,162). Puesto que hay 10 átomos de carbono en nicotina, se requieren 6 mmol de  $\text{CO}_2$  para reemplazar aquella cantidad de nicotina degradada. Si el 30% de la cantidad de  $\text{CO}_2$  se pierde por fotorrespiración (una estimación razonable para tabaco), son metabolizados cerca de 50 mmol de nicotina. Esto es un resultado sorprendente, particularmente si se tiene la idea de que el metabolismo alcaloídico (o más concretamente el catabolismo) es una parte trivial de la actividad metabólica total de la planta.

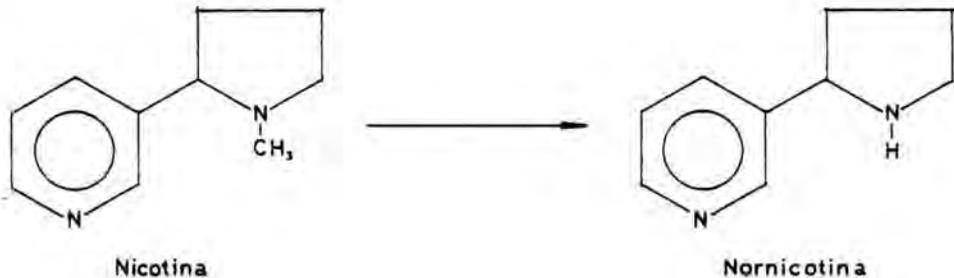
Hay que considerar que la nicotina que desaparece puede contribuir al  $\text{CO}_2$  expirado y a la biosíntesis de otros productos por la planta; por ello Robinson estima ambiguas las consideraciones precedentes, puesto que los 0,6 mmol de nicotina solo reemplazan otros 0,6 mmol que desaparecen. Sin embargo, el punto principal es que la proporción de cambio de nicotina es completamente apreciable, en comparación con la acción principal de la planta, la fi-

jación de dióxido de carbono.

La introducción de grupos metilo constituye uno de los tipos de reacción importantes en la biosíntesis alcaloídica. La metilación se considera un tipo de reacción de desintoxicación. Generalmente se piensa que la metilación disminuye la reactividad de un compuesto (Mothes, 1966). La reacción opuesta, la desmetilación, es el proceso degradatorio más frecuentemente descrito en el catabolismo alcaloídico, y parece tener alguna conexión con el transporte de alcaloides dentro del cuerpo vegetal. En varios alcaloides, por ejemplo nicotina, (Kisaki y Tamaki, 1966) la desmetilación probablemente inicia procesos más extensos de degradación de la molécula. La N-desmetilación se ha observado que está conectada con la senescencia en Nicotiana; Mothes (1928) relacionó el proceso desmetilante activo de la nicotina en plantas de tabaco (N. tabacum) con la senescencia de la hoja. Similarmente Mothes y colab en 1957 y Schroeter (1966) observaron en homogeneizados brutos que las hojas más viejas desmetilaban nicotina mucho más ampliamente que hojas jóvenes. La N-desmetilación de nicotina a nornicotina ha sido una de las reacciones biodegradatorias en plantas más extensamente estudiadas; se han utilizado diferentes técnicas (isotópicas recientemente y no-isotópicas en estudios más antiguos), los materiales vegetales han sido muy diferentes y sujetos a muy distintos tratamientos, antes y durante los experimentos. La desmetilación de nicotina, se ha encontrado, que se produce principalmente en las hojas (Schütte, 1969). Dawson, (1952), trabajando con Nicotiana glutinosa, en la que nornicotina es el principal alcaloide, observó intensa desmetilación de nicotina, vía corriente de transpiración,

en hojas separadas y nutridas con nicotina. El proceso químico ocurre en el tejido (laminar) de la hoja y del tiempo de retardo de producción de nornicotina, el autor opina que se debe al transporte por el sistema venoso de nicotina, puesto que discos cortados de hojas infiltrados con nicotina, bajo presión reducida, no mostraban tiempo de retardo.

N-desmetilación se ha observado también en Nicotiana alata, una especie que tiene muy poca nicotina en sus hojas. Schroeter (1958) y Griffith and Griffith, (1964) experimentaron con Nicotiana rustica, especie que normalmente contiene muy poca nornicotina, y encontraron que la desmetilación de nicotina ocurre en la raíz y más rápidamente en el tallo.



#### N-desmetilación de la nicotina

Ill'in y Serebrovskaya (1958) encontraron que en las variedades de Nicotiana que muestran nicotina, la desmetilación de nicotina administrada ocurría paralelamente con la toma de oxígeno. Como posible intermediario en el proceso oxidativo entre nicotina y nornicotina, se sugirió nicotina-1'-óxido, por Wenkert (1954). En experimentos en los que nicotina-1'-óxido radiactiva era inyectada en hojas libres de nicotina de Nicotiana tabacum, previamente injertada en patrón de tomate, la nicotina-1'-óxido era ineficientemente desmetilada para producir nicotina, mien-

tras que era ampliamente reducida a nicotina (Kisaki y Tamaki, 1964 a). Alworth y colab, (1969) han probado que nicotina-1'-óxido no era intermediario en la desmetilación de nicotina en Nicotiana glutinosa.

Los resultados de Leete y Bell (1959) apoyaban fuertemente la opinión de que el proceso era una transmetilación; pero publicaciones ulteriores no podían probar esto. Sin embargo, Kisaki y Tamaki (1964 b), quienes básicamente mostraron la implicación de la oxidación en el proceso de desmetilación, demostraron que también existe el camino de transmetilación, especialmente en hojas jóvenes. Las discrepancias parecen causadas por el uso de diferentes condiciones experimentales y materiales vegetales.

Algunos autores se refieren al carácter no específico de la desmetilación. Dawson (1951) ha encontrado que no sólo nicotina, sino también N-etil-nornicotina, N-metil-anabasina y N-etil-anabasina eran dealquiladas por hojas de Nicotiana glutinosa en proporciones comparables. Ligeira pero definida desmetilación de nicotina administrada, se observaba también en la planta de tomate (Tso y Jeffrey 1959) que normalmente está libre de nicotina. Neuman y Tschoepe (1966) han demostrado que sólo especies de Nicotiana sino también otras varias plantas de Solanáceas desmetilaban la nicotina administrada, aunque este alcaloide no se encuentre usualmente en sus tejidos.

Es de destacar un hallazgo de Gruetzmann y Schroeder, (1966), quienes buscaban un sistema para realizar la producción biológica de codeína y morfina a partir de tebaína, de menos uso farmacológico. Lograron con un cultivo de tejidos de Papaver somniferum, y sorprendentemente también con un cultivo de tejidos de Nicotiana glauca, la

O-desmetilación y reducción de tebaina para producir codeína y morfina. No se ha publicado detalles, probablemente debido al valor práctico del procedimiento.

También se ha demostrado que nicotina marcada con  $C^{14}$  en el grupo metilo actuaba como donadora de metilo en plantas de tabaco, puesto que se podía aislar colina radiactiva (Leete y Bell, 1959). La posibilidad de que nicotina pueda actuar como donadora de metilo, por lo menos en limitada extensión, ha sido probada por otros investigadores.

Tso y Jeffrey (1959) fueron los primeros en mostrar de modo convincente que la nicotina experimenta una degradación más intensa que la N-desmetilación. La administración de anabasina, nornicotina y nicotina marcadas con  $N^{15}$ , y de nicotina doblemente marcada con  $N^{15}$  y  $C^{14}$ , a N. rustica, glauca y glutinosa mostraba que se producía la interconversión de todos los alcaloides. Se sugirió, por ello que esta interconversión probablemente ocurría más directamente que por el pool metabólico general. Sin embargo, porciones significantes de los isótopos de los alcaloides administrados eran encontradas en otros compuestos orgánicos no identificados, particularmente en el residuo insoluble de las plantas.

Yoshida (1962) inyectó nicotina marcada con  $N^{15}$  en N. tabacum en varios estados de desarrollo y encontró que en plantas jóvenes se degradaba hasta el 80% de la nicotina marcada durante dos semanas después de la administración. En plantas más viejas la degradación ascendía a 50% y en plantas desmochadas sólo el 20% durante el mismo periodo de tiempo. El autor no estudió los productos de de-

gradación, pero demostró, de modo convincente, que la nicotina puede ser translocada de las hojas a otras partes de la planta. Las altas proporciones de degradación en plantas jóvenes parecen estar correlacionadas con niveles de nicotina comparativamente bajos en los primeros estados de desarrollo.

Durante el curado al aire de las hojas de tabaco, la pérdida de nicotina (27-52%) decrecía con la madurez de la hoja, y la pérdida iba acompañada por el pardeamiento de las hojas durante el curado (Yoshida, 1971).

Una contribución sustancial al problema de degradación de nicotina, fué el aislamiento de ácido nicotínico radiactivo de Nicotiana rustica, después de nutrir las plantas con nicotina radiactiva. El ácido nicotínico aislado contenía una cantidad significativa del isótopo. Así, el ácido nicotínico fué el primer metabolito específico conocido de la extensiva degradación de nicotina.

Después de una más larga nutrición de Nicotiana rustica, con nicotina marcada con  $C^{14}$ , Tso y Jeffrey (1961), mostraron que era detectable radiactividad en aminoácidos, pigmentos, ácidos orgánicos y azúcares; partes importantes del isótopo  $N^{15}$  nicotina uniformemente marcada, administrada simultáneamente se encontraba en la fracción aminoácido (libres y después de hidrólisis). Los autores demostraron que la nicotina en la planta está en un estado dinámico, conectado con los pasos metabólicos primarios.

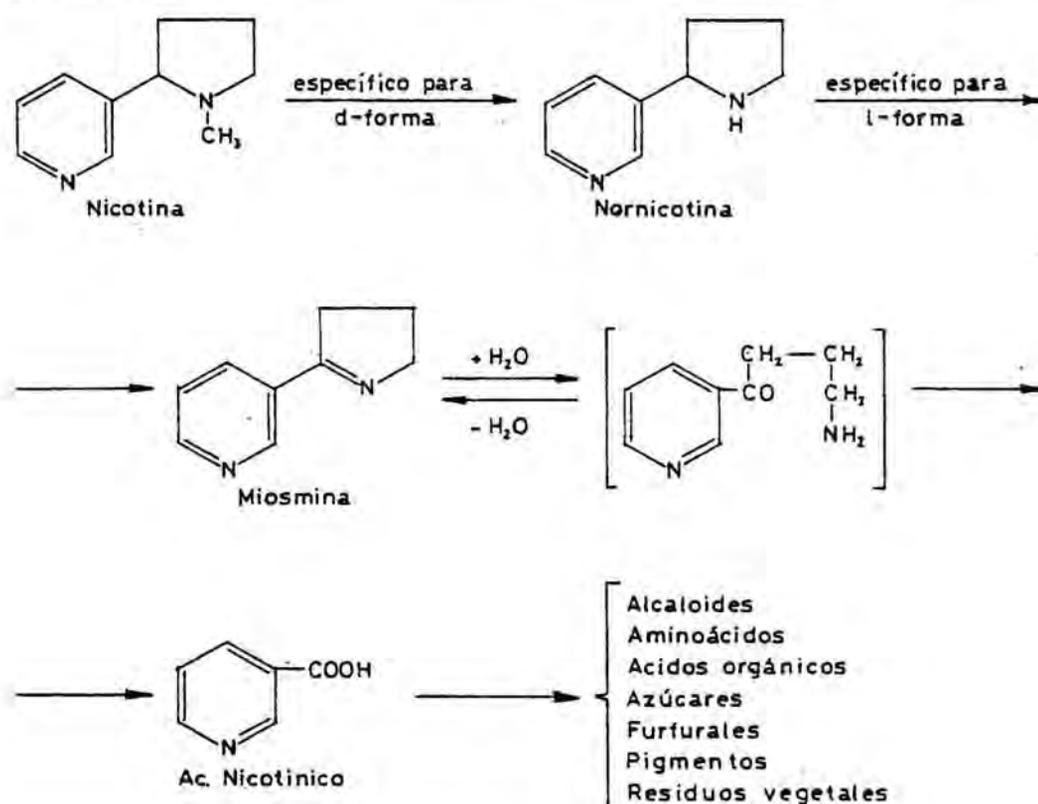
Lovkova (1964) administró  $C^{14}$  nicotina uniformemente marcada a N. tabacum, y después de 4 días, recuperaba sólo el 3,5% de la radiactividad administrada en nicotina. Cerca del mismo porcentaje de la radiactividad total se re-

cuperó en la fracción aminoácido libre. Ill'in, (1966), revisó su concepto referente a la aparición de nicotina especialmente en semillas germinantes y su desaparición durante el proceso de maduración, y su posible relación con el metabolismo de las proteínas y sus constituyentes, y también que la nicotina no es sólo un producto de desecho metabólico. Para apoyar esta hipótesis, administró  $C^{14}$  nicotina uniformemente marcada a frutos madurantes de plantas de Nicotiana; después de 14 días, se aisló una fracción proteica radiactiva, pero debido a las pequeñas cantidades de nicotina en las semillas y a una alta concentración de proteína, la radiactividad específica total de la proteína aislada permanecía muy baja. Tal incorporación de radiactividad en proteínas era prevenida por cloranfenicol. La nicotina radiactiva utilizada para la nutrición fué biosintetizada a partir de diferentes precursores ( $C^{14}$  glutamato,  $C^{14}$  aspartato y  $C^{14}$  acetato), de modo que el marcado en la molécula de nicotina estaba localizado, o predominantemente en el anillo de pirrolidina, o en ambos anillos de piridina y pirrolidina. Diferencias en el marcado de los aminoácidos ligados a proteína, después de la nutrición con los tres tipos de nicotina radiactiva, conducía a algunas suposiciones preliminares acerca de los caminos de degradación de nicotina en semillas de tabaco madurantes.

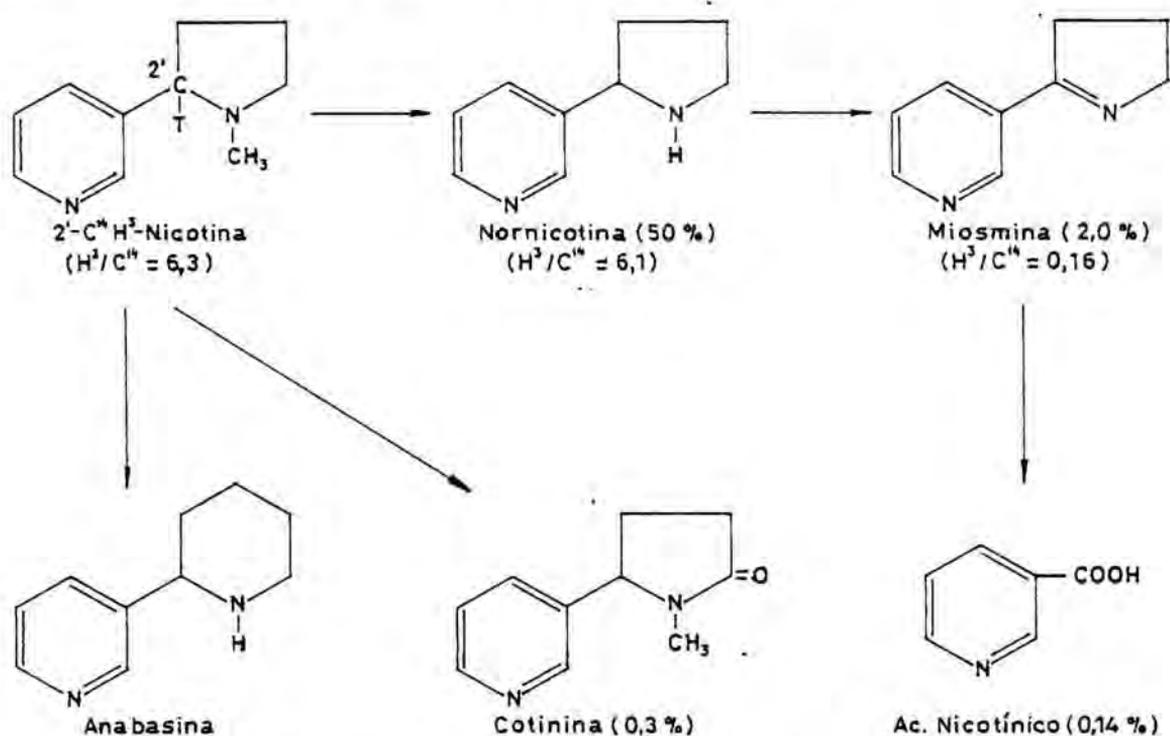
Leete (1968) informó acerca de la degradación de  $2-C^{14}$  nicotina en N. glauca. No encontró anabasina como metabolito de nicotina; sin embargo, el 5,7% de la radiactividad se encontró en nornicotina. Esto podría ser debido a que la nicotina puede no ser un precursor directo de anabasina en tallos separados de N. glauca; quizá  $2-C^{14}$  nico-

tina podía degradarse a 7-C<sup>14</sup> ácido nicotínico, si este era reincorporado en anabasina, no aparecía radiactividad en la anabasina. La 2-C<sup>14</sup> nicotina experimentó extenso metabolismo, según se muestra por el hecho de que sólo 0,41% se recuperó después de 5 días.

Kisaki y Tamaki (1966) encontraron miosmina (1'-2'-dihidronornicotina) como metabolito de nornicotina en Nicotiana tabacum. Los resultados (junto con anteriores publicaciones de los mismos autores) muestran un modelo bastante complicado de rotaciones ópticas de todos los alcaloides en la planta de tabaco. Para explicar esto, los autores suponen que la nornicotina podía ser sintetizada como un racemato y ulteriormente ser activada ópticamente por deshidrogenación estereoespecífica para formar miosmina. Esta suposición está apoyada por el hecho de que la proporción de degradación de (-)-nornicotina en las plantas es varias veces más rápida que el (+)-isómero. Los autores propusieron el siguiente camino para la degradación de nicotina:



Leete (1973) y Leete y Chedelkel (1974), de la administración de una mezcla de (2'-H<sup>3</sup>) (-) nicotina y (2'-C<sup>14</sup>) (+) nicotina a N. glauca, lograron una serie de observaciones similares a aquellas de Kisaki y Tamaki (1966), pero pudieron llegar más lejos que los científicos japoneses, debido a sus materiales de partida y a sus procedimientos de degradación. Desarrollaron un método por el que podían degradar específicamente (2'-C<sup>14</sup>, H<sup>3</sup>) nornicotina. El camino principal es nornicotina (50%), miosmina (2,05%), cotinina (0,30%) y ácido nicotínico (0,14%).



Miosmina, (un componente del humo del tabaco) probablemente se forma de nicotina, vía nornicotina; sin embargo, dando (2'-C<sup>14</sup>) miosmina a N. glauca se ha demostrado que la deshidrogenación no era reversible; se suponía al ácido nicotínico un metabolito de miosmina, puesto que, toda su actividad estaba localizada en el carbono carboxílico. También informaron acerca de la despreciable radiactividad en anabasina y 3-acetil-piridina, un meta-

bolito del tabaco curado. Cotinina, un metabolito de nicotina en seres humanos y otros animales, es también marcada; probablemente procede de un camino diferente directamente de nicotina.

Son de destacar los pasos biodegradatorios observados en Nicotiana; tal sería el caso de la conversión del anillo de metilpirrolidina de nicotina en el anillo de piperidina de anabasina y posiblemente anatabina. Esta posibilidad fué apoyada por Alworth y Rapaport (1965), quienes nutrieron a Nicotiana glutinosa con  $C^{14}O_2$  y estudiaron la proporción y la extensión de incorporación del isótopo en los alcaloides. Más recientemente Lovkova y colab (1973) han probado la conversión de nicotina en anabasina nutriendo tallos de Nicotiana glauca con  $C^{14}$  nicotina marcada al azar. Encontraron que el 83% era metabolizada durante los tres días inmediatamente siguientes a la nutrición. Toda la radiactividad administrada se encontró en el grupo de alcaloides: nicotina 4%, anabasina 1,5%, anatabina 0,1% y nornicotina 0,02%. Así, parece que anatabina sea un metabolito de anabasina.

#### 1.4 Curso de crecimiento y variaciones de las fracciones nitrogenadas.

El curso de crecimiento de una planta de Nicotiana, desde el estado de plántula hasta la maduración de la semilla, toma la forma de una curva de tipo sigmoideo, cuando se expresa gráficamente. El crecimiento de la planta como un total, puede dividirse grosso modo en tres períodos. Durante el primer período, que comprende de 3 a 4 semanas, la planta se establece en el sustrato, e incrementa poco de peso. La materia seca y el nitrógeno en todas sus formas incrementan en cantidad absoluta por planta, pero la distribución relativa del nitrógeno experimenta cambios considerables. Calculado en porcentaje de nitrógeno, el nitrato baja muy acusadamente, y también disminuyen las fracciones amonio, amido y amino. La nicotina aumenta. El segundo período se caracteriza por el rápido crecimiento de la planta, y corresponde al tiempo comprendido entre la 4ª y 11ª semanas siguientes. Se produce una rápida acumulación de sustancias orgánicas e inorgánicas. En el metabolismo nitrogenado son de señalar grandes fluctuaciones de las fracciones nitrato, amonio y amido. En general el nitrógeno amónico y amido aumenta en las hojas y el tallo. La nicotina aumenta en las hojas y permanece constante en el tallo, pero las proporciones relativas de nicotina total en las hojas y tejido del tallo quedan invariables. El tercer período se denomina reproductivo. Durante él disminuyen los pesos frescos y seco de las hojas; los tallos mantienen su peso fresco y seco. El nitrógeno total de la planta parece decrecer algo al final del período de

reproducción, pero es necesaria evidencia adicional para confirmarlo. En las hojas incrementan los nitratos y en los tallos permanecen constantes; las amidas y el amoníaco disminuyen en ambos órganos. La cantidad de nitrógeno nicotínico disminuye agudamente en los tejidos de hoja y tallos. Finalmente, la proporción relativa de nitrato disminuye; la de amidas y amoníaco incrementa, y la nicotina incrementa en las hojas y queda constante en tallos (Tso, 1972).

El rasgo más sorprendente del período final es, por supuesto, la translocación de sustancias orgánicas e inorgánicas desde otras partes de la planta, particularmente de las hojas, a los frutos en desarrollo. Al final, en el fruto se ha acumulado un tercio del nitrógeno total de la planta entera; una gran parte en la proteína de la semilla (Vickery y colab, 1940). Se transforman así materiales de las hojas y también de los tallos, en reservas para la siguiente generación (Vickery y colab, 1940).

Es de destacar, que en un estudio de los compuestos nitrogenados de jugo de tabaco, Noguchi y colab (1961) observaron lo siguiente:

- El N - nitrato corresponde entre el 40 y el 70% de N total, y el resto está compuesto principalmente de N - amino y alcaloídico.
- Las amidas y aminoácidos básicos, constituyen una gran parte del N - amino y amido. Entre los aminoácidos y amidas del jugo de tabaco, glutamina representa el más alto contenido de nitrógeno, y sigue asparraguina, lisina, leucina y serina.

- El desmochado incrementaba notablemente el contenido alcaloídico en el jugo, pero disminuía el N - aminoácido, en comparación con el encontrado en el jugo de la planta sin desmochar.

### 1.5 Aminoácidos y proteínas, y su control biosintético.

La cantidad y clase de aminoácidos libres y proteínas en tabaco varía con la variedad de planta, estado de crecimiento, condiciones ambientales y métodos de manipulación.

Los aminoácidos glicina, alanina, serina, treonina, valina, metionina, cistina (cisteína), leucina e isoleucina, ácido aspártico y ácido glutámico, lisina, arginina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, prolina e hidroxiprolina, están presentes en tabaco.

Acido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina y leucinas constituyen el 65% de los aminoácidos presentes en la proteína de la hoja. Michl y Kuhn (1954) encontraron apreciables cantidades de  $\alpha$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido aspártico y ácido glutámico libres en todos tipos de hoja de tabaco. La cantidad de otros aminoácidos difería entre los tipos de tabaco.

Burde, Poindexter y Bell (1963) efectuaron un estudio comparativo de los aminoácidos en varios tipos de tabaco. En todos ellos, (tipos bright, burley y turkish) encontraron que leucina, isoleucina, serina, tirosina y lisina están presentes en cantidad.

Los aminoácidos principales de tabaco bright, son prolina, asparraguina, ácido glutámico y ácido aspártico. En tabaco burley la concentración de prolina es baja, siendo los principales asparraguina, ácido aspártico y ácido

glutámico. En tabaco turkish, la composición y distribución relativa de aminoácidos libres es similar a tabaco bright, pero la cantidad total es sustancialmente menor.

Un examen de aminoácidos libres y ligados de varias especies de Nicotiana e híbridos, Weybrew y Matzinger (1969), demostró significantes diferencias entre las especies para todos los constituyentes.

Hidroxiprolina y homocisteína estaban presentes en considerable cantidad en Nicotiana tabacum, pero solamente detectable en otras especies, mientras que lo inverso sucedía para cistina y  $\alpha$ -alanina. Comparada con otras especies, N. tabacum es más baja en lisina, histidina, amonio, arginina, ácido aspártico, STAG (mezcla de serina, treonina, asparraguina y glutamina), glicina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y ácido  $\alpha$ -aminobutírico; pero más alta en taurina, metionina-S-óxido, prolina, ácido  $\alpha$ -amino-adípico, tirosina y galactosamina. En los híbridos de la  $F_1$ , el grado de concentración para la mayoría de los aminoácidos libres es más bajo que en los padres, con unas pocas excepciones.

Noguchi, Yamamoto y Tamaki (1961), como se ha indicado en el apartado 1-4, estudiaron los compuestos nitrogenados del jugo de tabaco e informaron que amidas y aminoácidos básicos componen una gran parte del N amino y amido. Entre los aminoácidos y amidas del jugo de tabaco, glutamina se encuentra en mayor cantidad, seguida por asparraguina y después por lisina, leucina y serina.

Se conocen muchos factores que afectan a los niveles y composición de aminoácidos libres y ligados en tabaco. La hora del día, estado de crecimiento y desarrollo,

infección patológica o desorden fisiológico, estado nutricional y edad fisiológica se ha demostrado que juegan papeles importantes en el contenido de aminoácidos y proteínas. Por ejemplo, el nitrógeno proteico usualmente decrece durante la noche (De Bonis, 1951). También, los aminoácidos libres experimentan variación diurna.

Noguchi y Tamaki (1962) informaron que en hojas de tabaco verde, ácido aminobutírico, ácido glutámico, prolina, serina, alanina, glicina y treonina alcanzaban sus máximos contenidos de cerca de 2 ppm. Serina, glicina y arginina incrementaban rápidamente durante el día, mientras que el ácido aspártico tenía su máximo contenido en la noche.

El contenido de ácido  $\gamma$ -aminobutírico varía irregularmente con el tiempo, pero predomina siempre sobre los otros aminoácidos.

Mizusaki, Noguchi y Tamaki (1964) observaron que la biosíntesis de prolina, formada de glutamina, era muy activa durante el día, pero muy lenta en la noche. Las características físicas, reflejan en parte la composición de la hoja. En el caso del tabaco bright de buena calidad, la consistencia del cuerpo de la hoja parece afectar la cantidad de aminoácidos libres. Esta influencia, es muy pronunciada en el tabaco burley (de quemar).

El desorden fisiológico es sabido que afecta al contenido de aminoácidos y proteínas de tabaco. En breve, cualquier perturbación desvía la planta del desarrollo normal, y resulta generalmente en un mayor nivel de aminoácidos, excepto probablemente aquella causada por deficiencia de nitrógeno (Tso y Burk, 1962; Tso y colab 1962;

Tso y McMurtrey, 1960).

Steinberg, Bowling y McMurtrey (1950) encontraron un agudo incremento en aminoácidos libres en plantas deficientes en Ca, Mg, K y P.

La clorosis que resulta de deficiencias minerales, exceptuando posiblemente la de Mg y N, son atribuidas primariamente a la acción tóxica directa de una excesiva acumulación de metabolitos.

Yoshida (1962) examinó plantas de tabaco a intervalos sucesivos de 0, 1, 3 y 5 días después de que el N fuese eliminado de la solución de cultivo y 1 día después de la adición de N a las plantas que eran deficientes en N durante 5 días. Con una deficiencia en la absorción de N, decrecían ácido aspártico, serina, prolina, ácido glutámico, glicina, alanina y ornitina; incrementaban isoleucina, leucina, lisina, histidina, triptófano y arginina; manifestaban poco cambio treonina, valina, metionina, fenilalanina y l-metilhistidina. Acido glutámico decrecía significativamente. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico incrementaba hasta 3 días después de la deficiencia de N, pero decrecía a los 5 días.

Cuando se adicionaba N a la planta que era deficiente durante 5 días, la mayoría de los cambios causados por la deficiencia de N desaparecían. El autor indicaba que ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina y alanina estaban relacionados con la asimilación; y que ácido aminobutírico, isoleucina, leucina, lisina, histidina, triptófano y arginina estaban relacionados con el catabolismo de N.

En un estudio de campo de tabaco burley, tabaco de hojas delgadas, Bortner y Hamilton (1966) encontraron que limitando cualquiera de los nutrientes N, P ó K se reducía grandemente el contenido de aminoácidos, especialmente ácido glutámico, prolina, arginina y lisina.

El incremento de N aumentaba proporcionalmente a la concentración de aminoácidos totales, particularmente treonina, asparraguina, ácido glutámico, prolina y arginina.

Un estudio efectuado en Japón (Noguchi y colab, 1967) mostraba que las proporciones de prolina y serina, y contenido total de aminoácidos, en las hojas era considerablemente mayor en los casos de cultivos con nitrógeno-amonio que en cultivos de nitrógeno-nitrato, mientras que sucede al revés para ácido y -aminobutírico, alanina y glicina.

También el contenido de carbonato del suelo ejercía un influjo positivo sobre el contenido de aminoácidos de las plantas.

Generalmente, los aminoácidos totales incrementan durante el crecimiento de la planta. Vallee y colab (1968) encontraron en N. xanthi nic. un progresivo aumento de prolina libre durante el crecimiento. Una prolongada exposición (72 horas) a 32 °C causa una considerable caída en el contenido de prolina.

Cuando las plantas se aproximan a la madurez, ocurría una relativa disminución en el contenido de N total, principalmente como resultado de la desaminación (Bonazzi, 1952). Noguchi, Yamamoto y Tamaki (1964) observaron simi-

lares descendos, especialmente en serina, glicina y ácido glutámico.

Se efectuaron varios experimentos examinando los niveles de aminoácidos y amidas libres en plantas separadas, hojas separadas, partes de hojas y cultivos de tejidos o células. Empleando tabaco Vamorr 48 (N. tabacum L.) y  $C^{14}O_2$ , Weinstein y Porter (1962) encontraron que aminoácidos y amidas libres incrementaban más en partes separadas que en plantas intactas. Asparraguina incrementaba más que glutamina.

En un estudio sobre cambios en la composición de aminoácidos de proteína de hoja en varios estado del crecimiento de tabaco hacia la madurez, Kawashima y Tamaki (1967) encontraron que la variación en la composición de proteínas de fracciones subcelulares era más pequeña que aquella de proteína total. Proteína sobrenadante mostraba mayor contenido de aminoácidos básico, ácido glutámico, valina y tirosina, y más bajo contenido de serina, prolina, glicina, leucina y fenilalanina, comparado con proteína del cloroplasto. Un área importante de estudio en el tabaco, lo constituye el relacionado con la fracción "proteína I" o carboxidismutasa, enzima presente en todas partes donde hay clorofila; según Kawashima y Wildman (1970), es una proteína de elevado peso molecular, que presenta propiedades físicas y químicas, inmunológicas y enzimáticas, muy similares en las diversas especies en que se ha analizado. En su composición figuran, fenilalanina, ácido aspártico, serina, treonina, ácido glutámico, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, lisina, histidina y arginina. Sin embargo, la

cantidad y composición de carboxidismutasa cambia durante el crecimiento y desarrollo de la planta de tabaco. Si nos referimos a la hoja, la cantidad de esta proteína empieza a aumentar en la hoja incipiente y alcanza su máximo valor cuando la hoja deja de alargarse; la relación entre la fracción proteína I y las proteínas solubles totales de la hoja, durante este período, se desplaza de 1 : 10 a 1 : 1. A medida que la hoja envejece, la cantidad de este enzima desciende hasta volver a la relación 1 : 10 con las proteínas solubles totales, momento en que la hoja muestra los primeros síntomas de clorosis (Dorner y colab, 1957).

### 1.5.1 Control de la biosíntesis de aminoácidos.

De los caminos biosintéticos se deduce que en la síntesis de un número de aminoácidos puede intervenir un determinado precursor. Por ejemplo, el glutamato funciona como precursor para la biosíntesis de prolina y arginina; pero estos aminoácidos se acumulan en diferentes proporciones, lo que sugiere que el paso de glutamato a prolina o arginina está regulado y no es un fenómeno al azar.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la síntesis de diferentes productos de un precursor común. En el caso prolina y arginina se ha sugerido, aunque no hay evidencia experimental disponible en plantas superiores, que la relativa contribución de glutamato a uno u otro aminoácido, depende del grado de acetilación de glutamato; se ha postulado que glutamato sustituido pudiera servir como sustrato preferente para la biosíntesis de arginina, mientras que el ácido libre sería utilizado para la síntesis de prolina.

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos derivados de aspartato es también compleja, y están por conocer los factores que determinan la derivación relativa de aspartato a treonina, metionina, isoleucina y lisina. En el caso del control de lisina, se ha sugerido que la regulación sería ejercida al nivel de aspartil quinasa. De ser así, el control de este enzima por lisina regularía también la conversión de aspartato en treonina, metionina e isoleucina.

Durante la biosíntesis de alanina, valina y leucina, hay competición potencial por el carbono derivado de piruvato; de nuevo quedan por resolver los factores que controlan la derivación del carbono de piruvato en cualquiera de estos aminoácidos. Se ha demostrado, sin embargo, que en algunos casos la corriente de carbono a un aminoácido particular, es una función de la concentración de aquel aminoácido. Oaks (1965) ha efectuado con éxito experimentos de nutrición, para demostrar que aminoácidos exógenos suministrados previenen la entrada de glucosa o acetato en aminoácidos específicos.

Este tipo de regulación de retronutrición en el que el producto final previene la entrada de metabolitos, es decir, carbono, en una secuencia metabólica particular puede ser atribuida a dos causas: inhibición por el producto final ó represión por el producto final. En el caso de inhibición por el producto final, el producto final de un camino metabólico particular inhibe la actividad de enzimas implicados en las reacciones iniciales de aquel camino.

En la represión por el producto final, un producto final particular causa una determinación de la síntesis de enzimas requeridos para las reacciones iniciales de una secuencia metabólica.

En plantas superiores, la evidencia hasta ahora, aunque limitada, indica que la inhibición por el producto final es el principal mecanismo de regular el metabolismo aminoácido.

Enzimas implicados en la biosíntesis en plantas, que han mostrado estar sujetas a la inhibición por el pro-

ducto final:

<u>Enzima</u>	<u>Inhibidor</u>
	Isoleucina
Ac. acetohidroxi sintetasa -----	Leucina
	Valina
Homoserina deshidrogenasa -----	Treonina
Treonina desaminasa -----	Isoleucina
Isopropil malato sintetasa -----	Leucina
Antranilato sintetasa -----	Triptófano
Aspartato quinasa -----	Lisina
	Treonina

Los experimentos de Fletcher y Beevers (1971) indican que este tipo de retroalimentación y regulación por el producto final, es un aspecto normal del metabolismo y no un artefacto, que es inducido por aminoácidos exógenos. En estos estudios, la aplicación del inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida, inhibía la síntesis proteica y entonces se restringía marcadamente la incorporación de precursores en los aminoácidos arginina, lisina, isoleucina, valina y prolina. El cese rápido de síntesis de estos aminoácidos era interpretado como debido a una acumulación transitoria de los aminoácidos, cuando su incorporación en proteína era evitada. Los aminoácidos acumulados por el proceso de inhibición por el producto final prevenía la entrada de carbono marcado en secuencias metabólicas que conducen a su síntesis.

Los aminoácidos solubles libres se originan como

consecuencia de biosíntesis o como resultado de la hidrólisis de proteínas; una parada de la síntesis de proteínas podría resultar (igualmente) en una acumulación de aminoácidos solubles. Sin embargo, la observación de que la composición de aminoácidos de la fracción soluble difiere de aquella de las proteínas, indica que los aminoácidos solubles no son necesariamente precursores de la síntesis proteica, ni productos directos de la degradación proteica. Actualmente se piensa en la existencia de pools de aminoácidos, algunos de ellos son metabólicamente activos y contribuyen directamente a la síntesis proteica, mientras que otros están localizados en pools de acumulación (Bidwell y colab, 1964). Así la composición de los aminoácidos solubles no tiene porque guardar relación con los aminoácidos presentes en las proteínas. Adicionalmente, la composición de aminoácidos de la fracción soluble, puede fluctuar sin alterar notablemente la composición de aminoácidos de las proteínas.

### 1.5.2 Control de la biosíntesis de proteínas.

Actualmente, se tiene una información detallada sobre los pasos específicos de la biosíntesis de proteína, y en ellos se evidencian varios lugares donde podría controlarse este proceso. Brevemente resumido, estos incluyen: modificación del ARN-t y enzimas formadores de aminoacil-ARN-t, especificidad de factores que determinan el enlace del ARN-m a los ribosomas y quizá factores que controlan la disponibilidad del ARN-m para el sistema traslacional del ribosoma. Un área que ha sido intensamente examinada se refiere al hallazgo de  $N^6(\Delta^2\text{-isopentenil})$ adenina, en una posición adyacente al extremo 3' del anticodón de un número de ARN-t (Hall, 1970). Este compuesto es de particular interés para los fisiólogos vegetales debido a su muy potente actividad citoquinina, en el ensayo de cultivo de callo de tabaco. A nivel bioquímico, la modificación estructural del grupo  $\Delta^2\text{-isopentenil}$  de ARN-t, por mutación o por tratamiento químico reduce fuertemente la capacidad del ARN-t para unirse a los ribosomas. Tales resultados sugieren que el grupo  $\Delta^2\text{-isopentenil}$  podría de algún modo afectar a la traslación, y como tal proporcionar un sitio funcional para la actividad citoquinina. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que las citoquininas radiactivas no son significativamente incorporadas en ARN-t. Por otra parte, cultivos de callo de tabaco dependientes de citoquinina exógena para el crecimiento sintetizaban citoquininas en ARN-t independientemente de que fuesen suministradas con citoquininas exó-

genas (Kende, 1971). Así, aunque la presencia de citoquinina en ARN-t es un fenómeno intrigante, su significación en relación con la promoción de crecimiento parece dudosa.

## 1.6 Lugar de formación de nicotina y alcaloides afines.

El lugar de formación de un alcaloide varía de especie a especie y de compuesto a compuesto, dentro de especies que producen más de un alcaloide, como sucede a las especies del género Nicotiana.

Los alcaloides de Nicotiana se sintetizan predominantemente en las partes más jóvenes de las raíces. Por ello, pueden estar asociados con el metabolismo de las células meristemáticas y en activo crecimiento de la raíz. Experimentos de nutrición tenían sólo éxito cuando las plantas utilizadas por los mismos tenían raicillas en rápido crecimiento. El estímulo de la actividad meristemática de la raíz induce la formación de nicotina, mientras que la detención de su crecimiento paralizaría la síntesis del alcaloide (Mothes y colab, 1957).

Los ensayos de injerto efectuados entre especies de Nicotiana, y entre éstas y otros géneros afines, particularmente Solanum lycopersicum, así como el cultivo de raíces aisladas en medio esteril, indujeron a varios investigadores a establecer que:

- a) la nicotina se forma en la raíz de Nicotiana, desplazándose a las hojas y otros órganos aéreos por el xilema;
- b) la nornicotina se forma sólo en la hoja por demetilación de la nicotina;
- c) la anabasina se forma en la raíz y en el tallo independientemente, y
- d) la nicotina y anabasina se forman por síntesis total y la nornicotina se-

cundariamente de la nicotina (Dawson, 1945; Mothes, 1955).

Mediante varios tipos de experimentos, fundamentados en el ensayo con hojas aisladas, el injerto de embriones de tabaco sobre patrón de tomate, la incubación de fragmentos de hojas y tallos con sulfato amónico y nitrato potásico, etc., han comprobado varios investigadores la síntesis de pequeñas cantidades de nicotina y alcaloides afines en tejidos y órganos ajenos a la raíz. (Cromwell, 1943; Mashkovtsev y Sirotenko, 1951; Bose y colab, 1956). Como causa de estos hallazgos contradictorios se sugirieron algunas explicaciones, entre ellas se indican la naturaleza de las especies o variedades de plantas ensayadas, el estado vegetativo en que se encuentran, y también los métodos utilizados para su reconocimiento y análisis.

Se ha encontrado que la hoja de tabaco cultivada en presencia de arginina, ornitina, prolina, triptófano y ácido antranílico sintetiza también nicotina y alcaloides afines. En injertos de tallo de tabaco sobre raíz de tomate, suministrando  $N^{15}O_3K$  a la solución nutriente en la que crecía, no se detectaba alcaloides en la raíz, pero se detectaba  $N^{15}$  en nicotina y nornicotina. Estos resultados indican que la nicotina y la nornicotina pueden formarse en el tallo de la planta de ensayo sin necesidad de raíz de tabaco. En un injerto inverso al anterior, tallos de tomate sobre raíz de tabaco, tanto el tallo como la raíz tenían nicotina y nornicotina, pero la proporción de  $N^{15}$  en nornicotina era mucho mayor, particularmente en la raíz. Los resultados indican que la nornicotina puede formarse en la raíz y no siempre a partir de nicotina. Incluso, según este hallazgo, la nornicotina podría ser precursor de la nicotina (Tso y Jeffrey, 1957). Después de breve expo-

sición de plantas de Nicotiana a  $C^{14}O_2$  se demostró evidencia de síntesis de nicotina independientemente en parte aérea y raíz (Alworth y colab, 1964). Sin embargo, la síntesis de nicotina en las partes aéreas parece ser pequeña y la mayor parte de la evidencia, disponible en la actualidad, es convincente, en el sentido de que la nicotina se forma predominantemente en la raíz.

Mediante el método de análisis de "jugo de sangría" (bleeding sap), Mothes y Engelbrecht (1956) han confirmado el hallazgo de Dawson (1941), que en Nicotiana los alcaloides formados en la raíz son transportados rápidamente a los tallos y hojas. El movimiento ascendente se observaba en el xilema y el descendente en el floema. Utilizando métodos microtécnicos, Chojecki (1949) estableció que nicotina se distribuía por toda la planta de tabaco. Encontró que la epidermis de la hoja era el tejido más rico, mientras que el cilindro axial de la raíz era el más pobre en alcaloide.

Es de destacar, que en cultivo de callo obtenido de raíz u hoja de Nicotiana tabacum L., var. "Virginia" se producía síntesis de nicotina (Speake y colab, 1964). Igualmente, en callo de tallo de Nicotiana tabacum var. "Wisconsin 38", en cultivo, se produce una pequeña cantidad de nicotina (Tabata y colab, 1971), y cantidades normales en plantas intactas regeneradas de tejidos de callo (Tabata y colab, 1968). De todo ello se deduce, que las células de cualquier tejido de tabaco poseen capacidad genética para la biosíntesis de nicotina, dependiendo su expresión cualitativa de factores peculiares de la organización de la planta. Es notable que los factores reguladores del crecimiento, asociados con el desarrollo de la ye-

ma, regulen la formación de nicotina (Tabata y colab, 1971).

Podríamos concluir que la nicotina se sintetiza predominantemente en la raíz y desplaza, con la corriente de transpiración, por el tejido de xilema a la parte aérea de la planta. El alcaloide es tomado mediante participación activa del protoplasma por las células de la epidermis de la hoja, así como en otros tejidos semejantes o parenquimatosos del tallo y el mesófilo esponjoso de las hojas. El alcaloide puede ser convertido en otro alcaloide, así como en sustancias no alcaloídicas en la parte aérea de la planta. Es interesante destacar que la nicotina puede ser degradada en las plantas que la producen y en otras especies. La nicotina puede ser degradada en Lycopersicum esculentum, Atropa belladonna y Cyphomandra batatea, y también por la parásita de la raíz de tabaco Orobache crenata. La Nicotiana alata pobre en alcaloide, degradaba la mitad de la nicotina introducida en 20 horas mientras que Nicotiana rustica no degradaba nicotina en 40 días (Neuman y Tschoepe, 1966).

Puesto que el lugar primario para la síntesis de nicotina se produce en los tejidos de la raíz, el desarrollo de este órgano y las condiciones que lo regulan tienen particular importancia para la síntesis de nicotina y su nivel en la planta. En consecuencia, la profundidad del suelo es un aspecto importante para el desarrollo de la raíz, y por consiguiente, para la síntesis de nicotina (Wolf y Bates, 1964).

### 1.7 Biosíntesis de nicotina y regulación de sus pasos metabólicos.

Para la formación de nicotina, la planta puede servirse de distintos precursores, con las consiguientes modificaciones de algunos pasos en los caminos de síntesis por ella seguidos.

El metabolismo de los aminoácidos está íntimamente relacionado con la biogénesis de los alcaloides. Los aminoácidos ornitina, ácido glutámico y prolina, actúan como precursores del anillo de pirrolidina de la nicotina; pero precursores de estos aminoácidos y compuestos derivados de ellos, intermediarios en la biosíntesis de nicotina, pueden intervenir también como precursores del alcaloide.

Experimentos verificados con aminoácidos marcados con  $C^{14}$ , aplicados a brotes de plantas de tabaco, han permitido revelar que se incorporan a nicotina en el siguiente orden: ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, prolina, leucina, valina, serina, fenilalanina, alanina, histidina, lisina y treonina. Es como si la biosíntesis de nicotina estuviese vinculada al metabolismo nitrogenado global de la planta de tabaco (Lovkova y Il'in, 1963). Es decir, la especificidad de la planta de Nicotiana sería estricta respecto al alcaloide formado, pero no lo sería en el mismo grado respecto con los precursores internos o dados de origen externo.

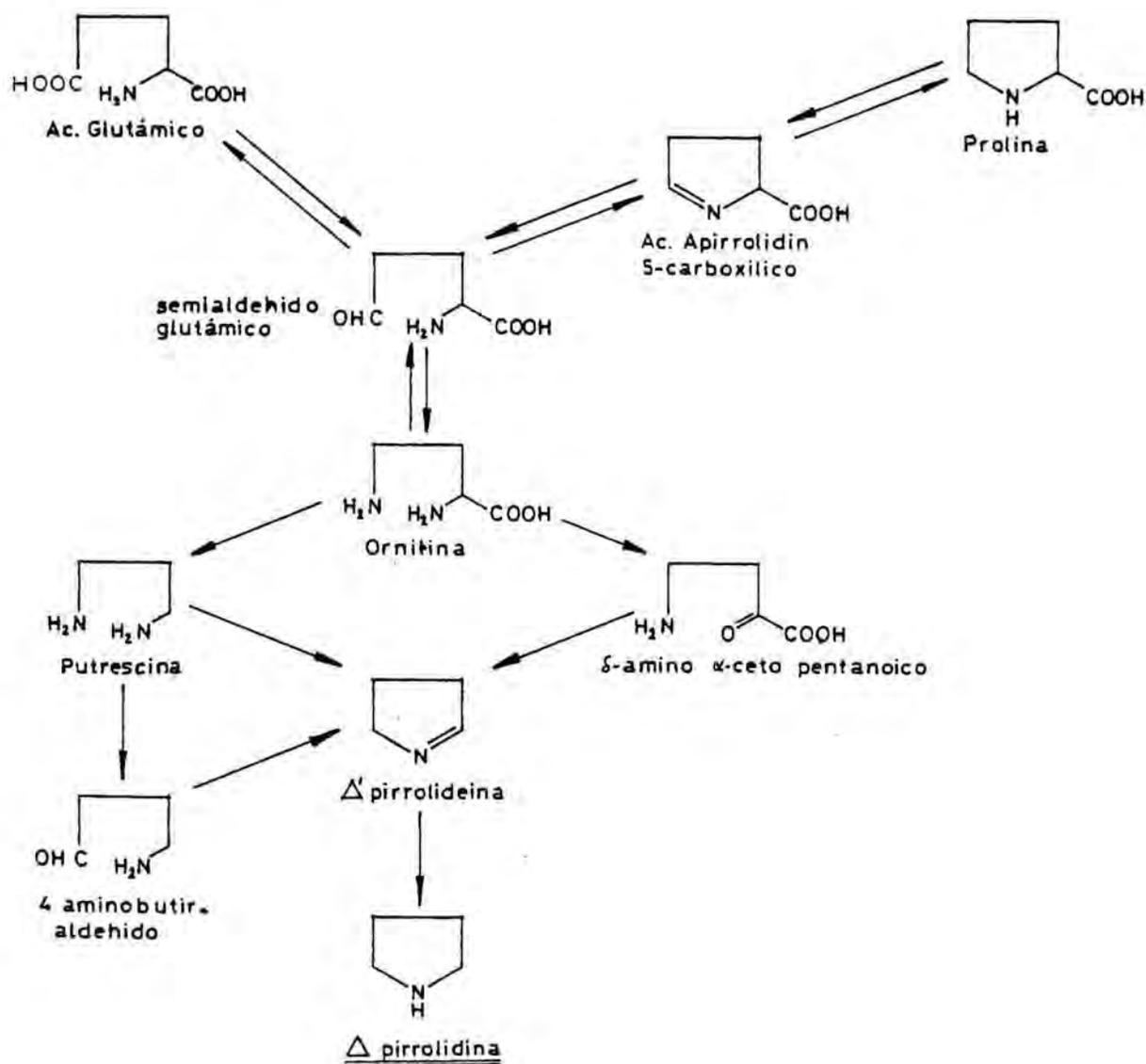
En definitiva, se considera que el control primario de las reacciones de la biosíntesis de nicotina y de alcaloides afines se halla vinculado al genotipo de la

planta; ésta tiene que poseer los genes portadores del mensaje para la síntesis de los enzimas, que ocasionan en el metabolismo nitrogenado, las reacciones secundarias que conducen a la síntesis de tales alcaloides (Heß, 1968). Las plantas alcaloídicas producen siempre el mismo alcaloide principal y alcaloides afines, en una concentración y proporciones relativamente determinadas. Como se indicó anteriormente, en Nicotiana rustica predomina la nicotina, en Nicotiana glauca la anabasina. En razas de Nicotiana tabacum pobres en nicotina se acumula nornicotina, lo que podría ser indicador de una fuerte desmetilación de nicotina procedente de la raíz.

Ornitina es un aminoácido metabólicamente muy activo. Este aminoácido puede ser precursor de sistemas anillados de N. De ornitina, se produce por descarboxilación la correspondiente amina biógena putrescina, o bien, se separa oxidativamente un grupo amino. Aunque primeramente se supuso que sucedía el primer camino, se sabe hoy que ambos caminos son utilizados, y que a veces es preferido el segundo (Heß, 1975). En ambos casos se forma pirrolideína como precursor inmediato de la pirrolidina (Fig.1, pag.46). Debido a la interrelación metabólica entre ornitina y ácido glutámico, se ha verificado experimentos con este último aminoácido. La aplicación de glutamato- $2C^{14}$  a plantas de tabaco en activo crecimiento, ha permitido encontrar nicotina radiactiva en el anillo de pirrolidina de este alcaloide, (Lamberts y Byerrum, 1958a, 1958b; Leete, 1958). El ácido glutámico puede producir semialdehído glutámico que se cicla a ácido  $\Delta$ -pirrolidín-5-carboxílico, y éste se transforma en  $\Delta$ -pirrolideína. También se ha probado la incorporación de prolina- $2C^{14}$  en el anillo de pirrolidina de la nicotina,

(Lamberts y Byerrum, 1958). En experiencias realizadas por Klein y Linser en 1933, se demostró que plantas de tabaco puestas en disoluciones al 1% de prolina, ácido glutámico y ornitina, aumentaban considerablemente el contenido de nicotina, y los modernos métodos de marcado parecen confirmarlos como precursores del nillo de pirrolidina del alcaloide considerado.

Figura 1



En la formación de nicotina, cuyo anillo de pirrolidina está metilado, es probable que tal metilación se produzca en la ornitina o putrescina, con lo que el precursor

de pirrolidina está ya metilado.  $\alpha$ -N-metil-ornitina es un precursor eficiente del anillo de pirrolidina, probablemente sin pérdida del grupo N-metilo (Schroeter y Neuman, 1966), para formar N-metil-pirrolidina. N-metil-putrescina, cuando suministrada a raíces de tabaco, es incorporada al anillo de N-metil-pirrolidina de nicotina (Schütte, 1966). Experimentos con compuestos marcados han revelado que el anillo de N-metil-pirrolidina de nicotina era formado de ornitina, a través de N-metil- $\Delta'$ -pirrolideina como intermedio. Esto viene apoyado por la presencia en raíces de tabaco de: a) N-metil-putrescina transferasa, un enzima que cataliza la formación de N-metil-putrescina a partir de putrescina y S-adenosil-metionina (Mizusaki y colab, 1971), y b) la purificación parcial de N-metil-putrescina oxidasa, un enzima que cataliza la desaminación oxidativa del grupo amino primario de N-metil-putrescina, para producir N-metil-aminobutiraldehído. Este último compuesto se cierra espontáneamente formándose sal de N-metil- $\Delta'$ -pirrolideina.

Estudios de marcado, han demostrado que ornitina, putrescina y N-metil- $\Delta'$ -pirrolideina, dadas a raíces de tabaco, son precursores activos de nicotina (Mizusaki y colab, 1968; Leete, 1967).

En plantas de tabaco se ha identificado  $\gamma$ -metil-aminobutiraldehído, y comprobado que si se da este compuesto a raíces de tabaco, se comporta como un precursor eficaz de nicotina. La presencia de  $\gamma$ -metil-aminobutiraldehído como intermediario en la biosíntesis de nicotina, indicaría que el grupo metilo se introduce antes de la condensación de los anillos de piridina y pirrolidina (Mizusaki y colab, 1968).

Como donadores del grupo metilo de la nicotina se indican varias sustancias, entre ellas: metionina; carbono de formato, en menor grado que metionina ( Brown y Byerrum, 1952); los carbonos  $\alpha$  de glicina y  $\beta$  de serina, previa transformación en formaldehído o formaldehído activo (Byerrum y colab, 1955 a; Byerrum y colab, 1955 b). Experimentos realizados con metionina doblemente marcada en el grupo metilo con  $C^{14}$  y deuterio, dada a plantas de tabaco intactas, permitieron apreciar que era transferida íntegramente para formar nicotina (Dewey y colab, 1954).

Como se indicó, la nicotina consta además del anillo de pirrolidina, de otro de piridina. Si se admite que el anillo de piridina que procede del ácido nicotínico, (Tso y Jeffrey, 1956; Dawson y colab, 1956; Dawson y colab, 1960 a ) el problema está en averiguar como se forma el ácido.

En animales y hongos se admite que el precursor, el ácido quinolínico, procede de un anillo de indol; mientras que en plantas superiores y bacterias, sería producido por la asociación de glicina y ácido aspártico. Probablemente el gliceraldehído-3-fosfato se condensa con el grupo amino del ácido aspártico (Mann y Byerrum, 1974), para formar la base de Schiff, y de ella se produciría ácido quinolínico; este compuesto así producido entraría en el ciclo piridín nucleótido (fig. 2 , pag. 49 ), en el que el ácido quinolínico es descarboxilado y convertido en ácido nicotínico. En plantas de Nicotiana tabacum L. intactas, se ha comprobado que el ácido quinolínico es un precursor bastante eficaz de nicotina (Yang y colab, 1965). También se ha probado que los ácidos 2,3,7,8- $C^{14}$ -quinolínico, 2,3,7- $C^{14}$ -nicotínico y 2,3,7- $C^{14}$ -nicotinamida-ade-

nin-dinucleótido son incorporados con muy similar eficiencia, por Nicotiana rustica (Frost y colab, 1967).

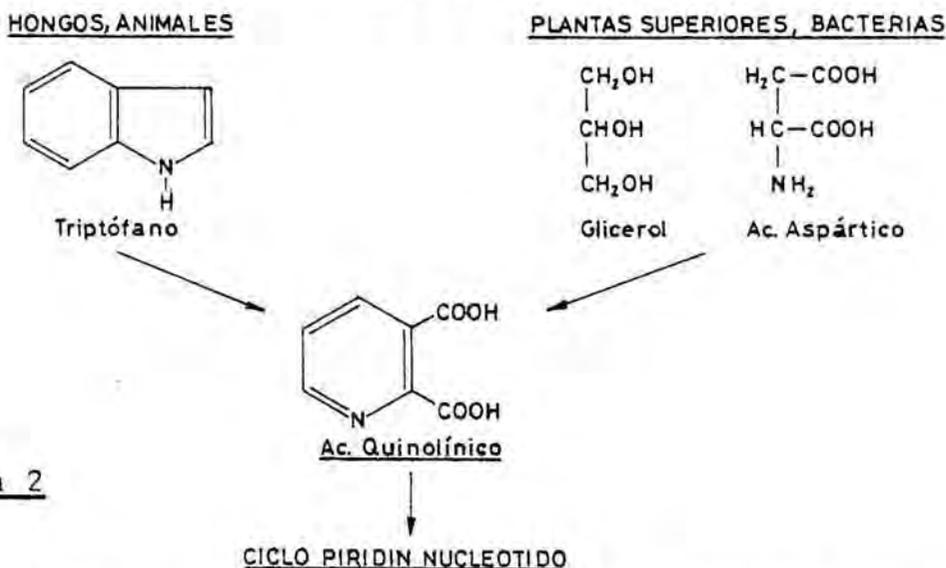


Figura 2

Mothes, Gross, Schütte y Mothes (1961), probaron la síntesis de ácido nicotínico en Mycobacterium tuberculosis a partir de ácido 1,4-C<sup>14</sup>-N<sup>15</sup>-aspártico; Ortega y Brown (1960) en Escherichia coli a partir de glicerol y ácido succínico. De lo expuesto, puede tomarse como bastante cierto, que en la construcción del anillo de piridina participan como intermediarios compuestos del ciclo del ácido cítrico o estrechamente relacionados con él (Richards 1965). En plantas de Nicotiana rustica a las que se había proporcionado 2-C<sup>14</sup>-glutamato, se ha probado la incorporación de C<sup>14</sup> en el anillo de piridina de nicotina (Lamberts y Byerrum, 1958 b), así como 2-C<sup>14</sup>-acetato, 1-C<sup>14</sup>-piruvato y 3-C<sup>14</sup>-piruvato (Griffith y Byerrum, 1959).

Una vez formados los anillos de piridina y pirrolidina, se reúnen para formar el alcaloide. Si se dan a plantas de Nicotiana tabacum cantidades subletales de ácido-5-fluornicotínico, se formará 5-fluornicotina (Leete y colab, 1971). Por ello, se piensa que el anillo de pirrolidina se une al de piridina por el carbono 3, es de-

cir, por el mismo carbono que el carboxilo (Yang y colab, 1965; Scott y Glynn, 1967). Según Chandler y Gholson, (1972), en las raíces hay un sistema enzimático que no se halla presente en hojas y tallos, implicado en la biosíntesis de nicotina y que cataliza el desprendimiento de  $C^{14}O_2$  correspondiente al carboxilo. En especies de Nicotiana, el ácido nicotínico ó el 1,6-dihidronicotínico, se condensa con un compuesto de pirrolidina, probablemente el catión ó la sal de N-metil- $\Delta$ -pirrolideína (fig 3), en el carbono 3, con eliminación de dióxido de carbono, para formar nicotina (Dawson y colab, 1960 b; Leete, 1967; Kisaki y colab, 1968).

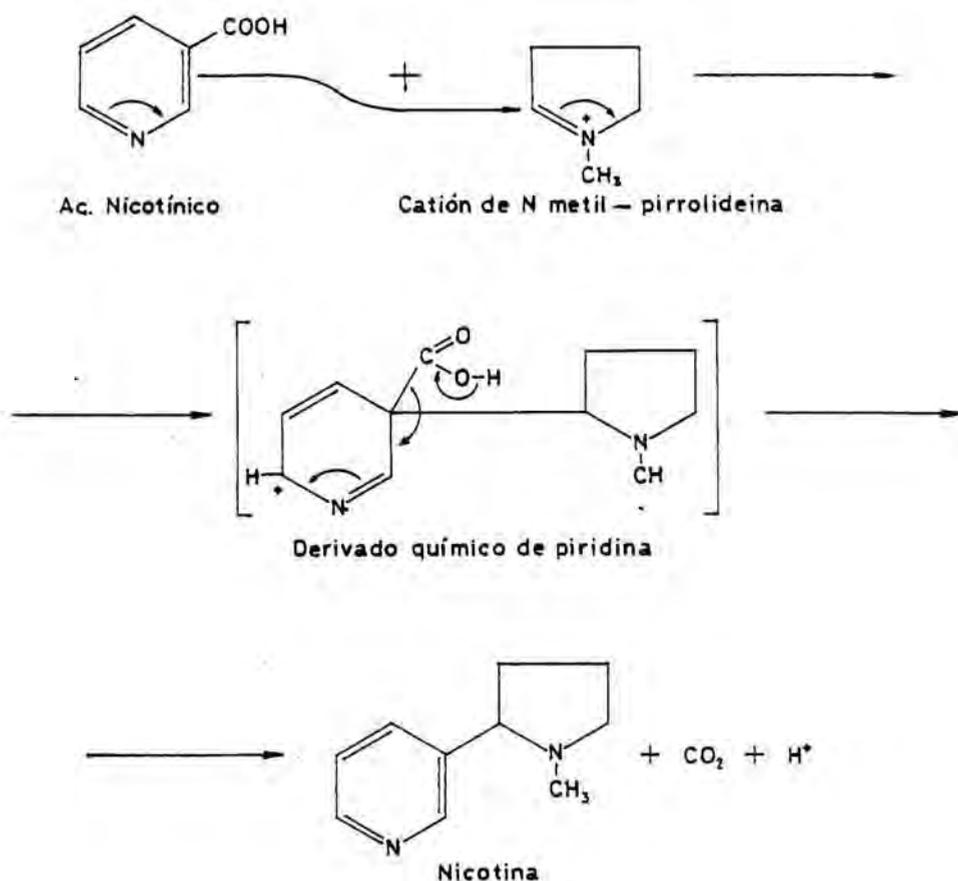


Figura 3

### 1.7.1 Regulación de los pasos metabólicos.

La presencia de un alcaloide en una planta, según Mothes (1965), significa que la planta tiene la capacidad para biosintetizar y catabolizar el alcaloide. Significa también, que el alcaloide no es tóxico para la planta y que la proporción de su catabolismo es lo suficientemente lenta, o la de biosíntesis suficientemente rápida, para permitir a los alcaloides acumularse.

Los alcaloides de piridina, por ejemplo, nicotina, anabasina y ricinina, tienen un especial relación con las reacciones metabólicas primarias que se dan en especies de Nicotiana y en Ricinus communis. Parece que el mecanismo de control para la regulación del ciclo piridín dinucleótido implica también la regulación del camino que conduce a los alcaloides de piridina.

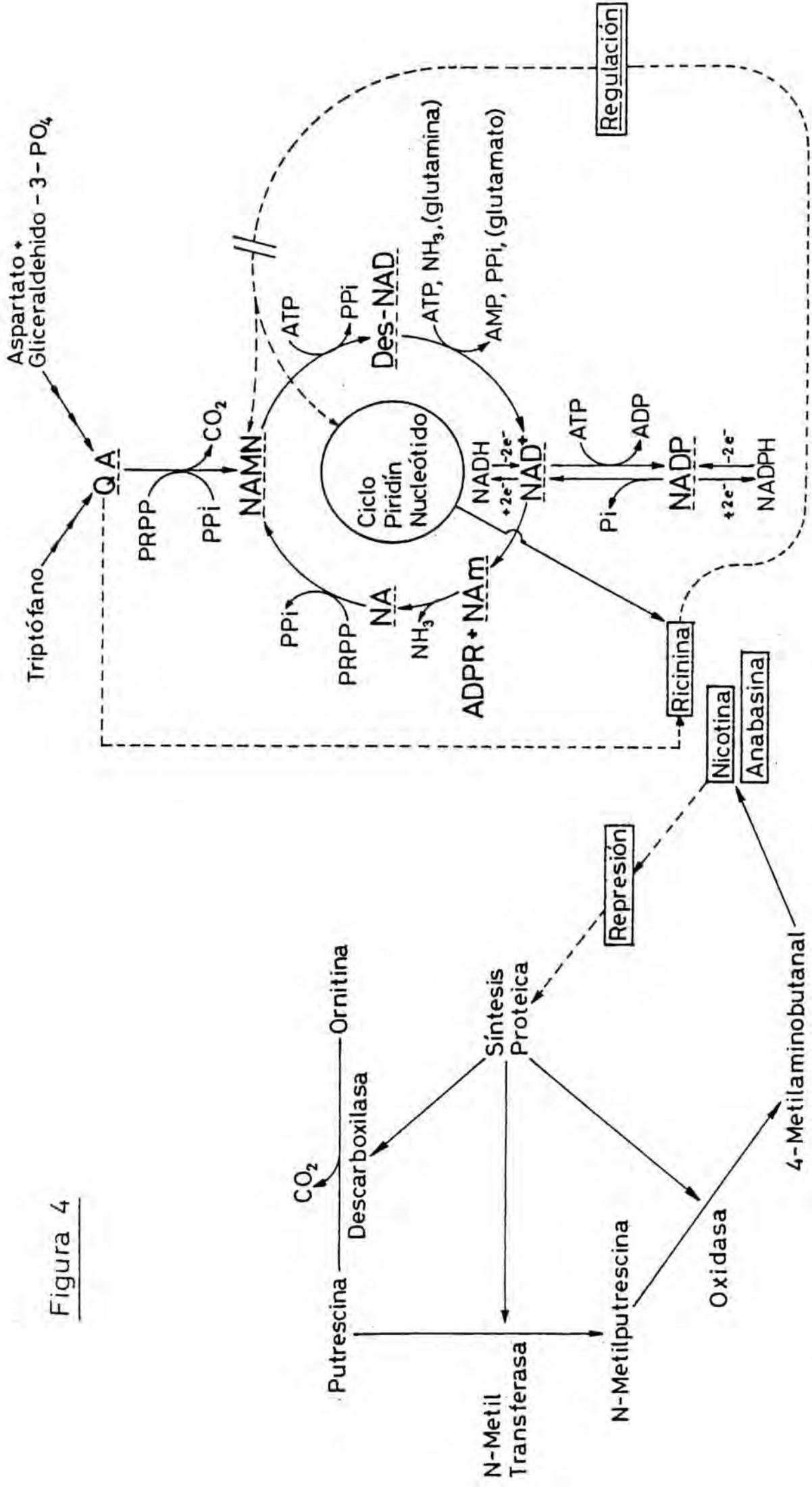
Una vez que el ácido quinolínico se ha formado, la biosíntesis de NAD y de ácido nicotínico procede por el mismo camino en casi todos los organismos, por el ciclo piridín-nucleótido (ciclo P.N.) (Waller y colab, 1966). El primer paso en la conversión de ácido quinolínico es la reacción catalizada por el ácido fosforribosil transferasa, para dar ácido nicotínico mononucleótido, que reacciona con ATP en presencia de fosforribosiladenil transferasa para dar desamidonicotinamido adenina dinucleótido (desNAD). Se forma NAD, por amidación de desNAD, en presencia de amoníaco o glutamina, ATP y NAD sintetasa (Spencer y Preiss, 1967). NAD y NADP son interconvertibles en la célula por la acción de NAD quinasa y NADP fos-

fatasa. La síntesis de NAD de ácido nicotínico fué observada primero por Preiss y Handler en 1958 en eritrocitos y se denomina, por ello, camino de Preiss-Handler. NAD puede excindirse para formar nicotinamida y ADPR por NAD glico hidrolasa (Kaplan, 1961). La reutilización de nicotinamida se inicia por su hidrólisis en ácido nicotínico, por nicotinamidasa, un enzima encontrado en plantas, hígado de mamíferos, bacterias y levaduras. El ciclo se completa por la síntesis de NAMN de ácido nicotínico y PRPP por ácido nicotínico fosforribosil transferasa (Gholson y Kori, 1964). (Fig 4 )

La pérdida de la mitad nicotinil del ciclo puede ocurrir de cualquier compuesto; sin embargo, la evidencia sugiere que tal pérdida ocurre como ácido nicotínico ó nicotinamida, que puede liberarse como compuesto libre o como derivado, según las especies implicadas. En plantas, está extendida la metilación de ácido nicotínico para dar trigonelina, y la trigonelina puede ser reutilizada para proporcionar ácido nicotínico libre para la biosíntesis de NAD. Un hallazgo de Lee y Waller (1972 ), demuestra la acumulación de grandes cantidades de N-metilnicotinamida de  $6-C^{14}$ -NAD y  $6-C^{14}$ -ácido nicotínico en *Tripterygium wilfordii*; ello hace necesario reexaminar el ampliamente aceptado punto de vista, según el cual el ácido N-metilnicotínico es la forma más común de acumulación de la vitamina en las plantas.

La secuencia de reacción que conduce a la condensación de un compuesto  $C_3$  y uno  $C_4$  para formar ácido quinolínico (AQ), NAMN, des-NAD y NAD, constituye el camino "de novo" de biosíntesis de NAD. La biosíntesis de rici-

Figura 4



REGULACION PROPUESTA PARA LAS MITADES DE PIRIDINA Y N-METIL PIRROLIDINA DE NICOTINA Y ALCALOIDES AFINES (Waller y Nowacki, 1978).

nina, nicotina y otros derivados de ácido nicotínico producidos por las plantas, representan ramas que parten de un punto desconocido en el ciclo.

Evidencia para el papel obligatorio del ciclo piridín nucleótido en la biosíntesis de alcaloides de piridina lo han proporcionado Mann y Byerrum (1974). Utilizando plántulas etioladas de Ricinus comunis, estos autores encontraron un incremento de 12 veces en el contenido de ricinina sobre un período de cuatro días y un incremento de 6 veces en la actividad de ácido quinolínico fosforribosil transferasa, que precedía en 1 día el establecimiento de la biosíntesis de ricinina. El enzima cataliza la formación de ácido nicotínico mononucleótido de ácido quinolínico y fosforribosil pirofosfato, y parece estar en un punto en el que la regulación puede efectuarse en el ciclo piridín nucleótido; por ejemplo, en un homogeneizado del alga Astosia longa, el ácido nicotínico inhibía la actividad del enzima (Kahn y Blum, 1968). Sin embargo, para la biosíntesis de ricinina el punto de regulación no parece estar en la conversión de ácido quinolínico en ácido nicotínico mononucleótido, puesto que Mann y Byerrum (1974) no encontraron acción inhibidora por ricinina de ácido quinolínico fosforribosil transferasa en endospermo de ricino etiolado purificado cerca de 500 veces.

En la actualidad, la evidencia indica que la formación de la mitad piridina de los alcaloides de tabaco, nicotina y anabasina, es paralela a la biosíntesis de ricinina. Se ha demostrado que el ácido nicotínico puede servir como precursor de nicotina (Dawson y colab, 1960 b) y anabasina (Solt y colab, 1960). Para nicotina, (Yang y

colab, 1965; Frost y colab, 1967), cada uno de los compuestos presentes en el ciclo P.N. se incorporaba con una eficiencia similar a aquella de ácido quinolínico y ácido nicotínico. Chandler y Gholson (1972) encontraron un desprendimiento de  $\text{CO}_2$ , dependiente de  $\text{O}_2$ , de  $\text{C}^{14}$  ácido nicotínico en raíces de tabaco, que no ocurría en las hojas o el tallo. Mann y Byerrum (1974) descubrieron elevados niveles de ácido quinolínolínico fosforribosil transferasa en raíces de Nicotiana rustica que sintetizan nicotina. Si, como ahora parece, la biosíntesis de ricinina está regulada a nivel de formación de precursor, Floss y colab, (1974) piensan que la formación de nicotina y anabasina, puede estar regulada de modo similar debido a su estrecho parecido con la biosíntesis de la mitad piridina de los compuestos del ciclo P.N. (fig. 4 ).

Los tres enzimas que catalizan las tres primeras reacciones que conducen de ornitina a nicotina fueron aislados de Nicotiana tabacum por Mizusaki y colab (1968, 1971, 1972, 1973). Al decapitar plantas de 4 semanas de edad, las actividades de los tres enzimas incrementaban de dos a diez veces, alcanzando su máxima actividad 24 horas después de la decapitación, y entonces decrecía de nuevo durante el período siguiente de 1-2 días. La nicotina que se acumulaba en las raíces seguía un curso similar. Los tres enzimas, cuyas actividades fueron medidas eran: ornitina descarboxilasa, putrescina N-metil transferasa y N-metil putrescina oxidasa. Se efectuaron experimentos "in vitro" con nicotina como inhibidor y los resultados fueron negativos. Por otra parte, ácido indolacético (AIA, 2,5 - 5,0  $\mu\text{m}$ ) aumentaba significativamente las actividades enzimáticas en raíces de plantas decapitadas, mientras

que mayores concentraciones de AIA prevenían el aumento de las actividades enzimáticas promovidas por la decapitación. La nicotina inhibía en todos los casos el aumento de las actividades enzimáticas en las raíces de las plantas decapitadas. Así, parece que la regulación de la síntesis de ornitina  $\rightarrow$  nicotina (fig 4), resulta en los tres enzimas que están bajo control de un sistema regulador común en el que auxina y nicotina son componentes importantes. Un incremento de la concentración enzimática en las raíces de 0,02 - 0,5 mm es suficientemente alta para reprimir la formación de los tres enzimas, al menos en un 50%. Esto sería un ejemplo de una regulación de retronutrición de la biosíntesis de alcaloides.

### 1.8 Influencia ambiental y nutritiva sobre la producción de alcaloides.

Aunque el nivel de biosíntesis de los alcaloides está regido, lógicamente, por genes, se producen notables fluctuaciones en las concentraciones y cantidades de los mismos en las plantas, debido a influencias ambientales (Mika, 1962). Las condiciones ambientales afectan al crecimiento general de la planta así como a la formación de alcaloides.

Debido a que la mayoría de los alcaloides se forman en tejidos jóvenes, en activo crecimiento, factores que afectan al crecimiento de estos tejidos como: la luz; la provisión de N, K, P y otros compuestos minerales; la temperatura; la humedad del suelo y la altitud, afectaran a la producción de alcaloides.

Dado que la producción de alcaloides implica varios caminos metabólicos diferentes, un factor ambiental puede alterar la biosíntesis o degradación de alcaloides de varios orígenes, este mismo factor puede incrementar la producción de alcaloide en una especie y disminuirla en otra.

### 1.8.1 Influencia de la luz, el agua y las condiciones climáticas generales.

Debido a que la fijación de  $\text{CO}_2$  y el crecimiento dependen directamente de la luz, son de esperar notables diferencias en la producción de metabolitos secundarios en plantas crecidas bajo condiciones variantes de luz.

Es evidente, que la luz no puede ser esencial como factor directo, para el control de aquellos alcaloides que se forman exclusivamente en la raíz. Sin embargo, el papel de la luz como factor indirecto tiene que ser considerado.

Schmid (1948), encontró que semillas de Nicotiana tabacum en germinación producían nicotina en la luz, lo mismo que en la oscuridad, pero en cantidades muy bajas. La cantidad de nicotina producida en la oscuridad alcanzaba el máximo nivel de producción alcaloídica el 5º día después de la germinación, y entonces declinaba rápidamente. Sin embargo, las plantas crecidas en la luz alcanzaban siempre un menor nivel de nicotina y además no mostraban descenso en la producción alcaloídica. La explicación para el mayor nivel de nicotina en plantas etioladas, comparadas con las crecidas en la luz, podría ser la biosíntesis de nicotina procedente de un intermediario ya presente en las semillas. Las semillas germinantes en la oscuridad respiran y consumen reservas entre las que se encuentran proteínas de acumulación, que consecuentemente liberan ciertos aminoácidos. El ácido glutámico, un intermediario en la biosíntesis de nicotina, no puede ser uti-

lizado para la síntesis de proteína y por ello es destinado a la producción de alcaloide. Por otro lado una planta que crece en la luz está abastecida con nuevo carbono de fotosíntesis y nitrógeno del suelo, así que, en estas condiciones, los aminoácidos son utilizados mayoritariamente para la síntesis de proteína; además parte de la nicotina puede degradarse para proporcionar N y C para la biosíntesis de aminoácidos.

Plantas de tabaco crecidas en fotoperíodos, largo o corto (Tso y colab, 1970), seguido de 5 minutos diarios de irradiación roja o infrarroja, presentaban variaciones en su contenido alcaloídico. Las plantas que recibían fotoperíodos de 16 horas, tenían una concentración significativamente mayor de alcaloides totales que aquellas que recibían fotoperíodos de 8 horas. Y el contenido alcaloídico total mayor se encontraba en las plantas que recibían luz roja, más bien que infrarroja cada día.

Las plantas crecidas bajo diferentes condiciones lumínicas, normalmente no son comparables; no sólo son diferentes los estados de desarrollo, sino también los tamaños. Muchas especies de Nicotiana son plantas fuertemente sensibles al fotoperíodo, y cuando son cultivadas bajo condiciones de día largo proceden rápidamente al estado de floración, un estado en que normalmente termina la síntesis alcaloídica.

En general, en especies de Nicotiana fotoperiodicamente sensibles, cuando son expuestas a un ritmo día-noche inhibitorio de la floración, es estimulado el crecimiento de la raíz y la formación de nicotina. Plantas de Nicotiana sylvestris -de día largo-, cultivadas en día corto

pueden perdurar años en roseta, mostrando además en el borde un cociente nicotina/nornicotina más alto que las plantas florecientes. Mothes y colab (1957), a quienes se deben estas observaciones, sugieren que siendo la desmetilación una función propia del envejecimiento de la planta, Nicotiana sylvestris en día corto desarrolla hojas jóvenes, y su espectro alcaloídico tendría que corresponder, por consiguiente, a una planta joven.

Estrechamente relacionados con experimentos sobre la intensidad lumínica están aquellos con plantas crecidas en diferentes latitudes geográficas; las plantas crecidas en el sur eran más ricas en alcaloides que las crecidas en el norte.

También influye la humedad del suelo, los suelos nórdicos nunca se desecan a extremos como los del sur. Kuzmenko y Tikhvinska (1935) encontraron que plantas de tabaco crecidas en un campo con 90% de saturación de la capacidad de agua del suelo producían solo trazas de alcaloides, mientras que el porcentaje más alto de alcaloides se encontraba en aquellas plantas crecidas bajo un nivel de saturación inferior de agua (30%).

Weeks (1970) y Weeks y colab (1969, 1974) efectuaron experimentos con plántulas de Nicotiana tabacum germinadas a diferentes temperaturas. Un incremento de temperatura de 21° a 27° C durante el período de germinación, ocasionaba la protrusión de la radícula después de 76 horas, 24 horas antes que a 21° C. La rápida germinación aumentaba la proporción de alcaloides, a la vez que en las condiciones indicadas se daba la más rápida proporción de descomposición de alcaloide. Las cantidades de nicotina, nornicoti-

na y anabasina medidas a las 48 horas, eran más bajas a 27° que a 21° C. Sin embargo, a las 144 horas la fracción alcaloídica total de plantas de semillas germinadas a 27°C era doble que el de plantas iniciadas a 21°C. Esta fracción total estaba compuesta de 90% de nicotina, 6% de nornicotina, 4% de anabasina y trazas de anatabina.

A 32° C la protrusión de la radícula ocurría a las 48 horas, y a las 72 horas se observaba una acumulación de nicotina y nornicotina. Sin embargo, la proporción de acumulación de alcaloide en las plántulas, en el primer período de 24 horas que sigue a la protrusión de la radícula, era más bajo a 32° C que a cualquier otra temperatura, excepto 16° C. La fracción alcaloídica total a 144 horas estaba compuesta de 93% de nicotina, 3,5% de nornicotina, 3,5% de anabasina y trazas de anatabina.

El contenido de nicotina era más alto a 27° C, y cantidades decrecientes se observaron a 21°, 32° y 16° C. Así la temperatura más favorable para la síntesis alcaloídica, durante las primeras 144 horas de germinación, era a 27° C.

### 1.8.2 Influencia de los nutrientes minerales.

Una de las áreas más fundamentales pero menos comprendidas de la fisiología y bioquímica vegetal, es la relación entre las cantidades de los elementos nutrientes esenciales y los cambios metabólicos que ocurren en la planta. Una deficiencia en cualquier elemento y también un exceso, afecta al sistema metabólico normal y perturba el balance de los constituyentes químicos. Todo ello está asociado con el desarrollo de un síntoma típico, usualmente reconocible. Es lógico que el estado nutritivo mineral de la planta ejerza una influencia positiva o negativa sobre los niveles alcaloídicos en las plantas que producen estas sustancias.

Dado que los alcaloides son compuestos nitrogenados, es de esperar que la disponibilidad de N juegue un importante papel en la biosíntesis y acumulación de alcaloides en las plantas. Todas las plantas no reaccionan al abonado nitrogenado con un incremento en la biosíntesis alcaloídica (Nowacki y colab, 1975, 1976). En el caso concreto de Nicotiana es posible aumentar de 2 a 10 veces el contenido alcaloídico tratando las plantas con altos niveles de nitrógeno. Sin embargo, experimentos realizados por Mothes (1928) con plantas de Nicotiana, crecidas bajo niveles diferentes de nitrógeno revelaron que la producción de alcaloide por planta incrementaba rápidamente por adición del primer nivel de N (porcentaje de N: 1-1,4), pero que las cantidades adicionales de N disminuían la cantidad total de alcaloides. Esto era lógico para un alcaloide como nicotina, cuyos precursores tienen una relación C:N mayor y decrece marcadamente en el estado final

de la formación del alcaloide, de 11:3 a 10:2. Experimentos efectuados por Nowacki y colab (1976) confirmaron estas consideraciones.

Parece ser que los nitratos inducen mayores niveles de nicotina que las sales amónicas (Paech, 1950). Así ha sido apreciado también en el estado de plántula (Serrano, 1948 b). Otros investigadores han indicado al nitrógeno amónico como más favorable para la acumulación de alcaloides en varios órganos de la planta (Avundzhyan, 1963). Según Nowacki y colab (1976), de manera general, el amonio, como fuente nitrogenada, causa una mayor concentración que el nitrato; mientras que las plantas suministradas con ambas formas ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ), tenían una concentración intermedia.

En plantas nutridas con  $\text{N}^{15}\text{O}_3\text{K}$ , la incorporación de  $\text{N}^{15}$  en alcaloides es selectiva (Tso, 1961). En Nicotiana rustica, la incorporación más alta se da en nicotina, y en Nicotiana glauca en anabasina. En Nicotiana glutinosa es necesario que el tratamiento se prolongue durante todo el período de crecimiento para que el  $\text{N}^{15}$  se detecte en nornicotina, mientras que en nicotina puede detectarse en un tiempo relativamente corto. Este último hecho, puede ser de importancia para comprender las relaciones nicotina-nornicotina, en el sentido de una desmetilación de nicotina para formar nornicotina.

El segundo elemento nutriente importante es el K; pero dado que en nuestro trabajo se estudia la sustitución parcial de este elemento en la nutrición de Nicotiana rustica, por los otros elementos alcalinos, consideramos conveniente tratar a uno (K) y otros (Li, Na, Rb y Cs)

en un apartado especial (1.9.1).

El efecto del fósforo es menos espectacular que el del K sobre el nivel de alcaloide, particularmente de aquellos que derivan de aminoácidos. El fósforo influye de modo directo sobre la formación de nicotina y alcaloides afines. Probablemente, intensifica los procesos intermediarios que preceden a la síntesis de alcaloides (Nebot, 1959).

Los efectos de los micronutrientes semejan a aquellos de los macronutrientes, aunque no siempre son parecidos. Miromenko (1965) encontró que micronutrientes como B, Mo, Mn y Cu, causaban una caída en el nivel alcaloídico en las semillas de tres especies de altramuza. Tso y colab (1973) ensayaron 54 elementos respecto a sus efectos sobre la producción de nicotina en plantas de Nicotiana tabacum crecidas en solución de cultivo. Algunos elementos como Be, Cu, Pb, Pt y Sm, incrementaban ostensiblemente el rendimiento de nicotina (más del 25%). Mientras que otros elementos ejercían efectos menos pronunciados (Ni, Rb, Ag, Tl, Sn, U, V), y Zn disminuía el rendimiento de nicotina.

También el efecto del pH del suelo tiene que ser considerado junto con el de los nutrientes. Mc Nair (1942) encontró una clara relación entre el pH del suelo y el porcentaje de alcaloides en plantas ricas en ellos; dicho porcentaje incrementaba con la basicidad del suelo. Menos del 4% de las especies investigadas eran ricas en alcaloides en suelos fuertemente ácidos, mientras que en suelos básicos más de 15% acumulaban alcaloides por encima del nivel normal. El hallazgo de Mc Nair, probablemente

te no puede ser explicado como simple adaptación al pH del suelo, sino quizá causado por otras condiciones ambientales. Es frecuente que los suelos fuertemente básicos se encuentren en áreas áridas, donde la acumulación de plantas ricas en alcaloides, es probablemente un resultado de la presión ambiental (causada por la predación y el crecimiento lento de las plantas que producen alcaloides en estos suelos).

## 1.9 Efecto de los elementos alcalinos en la fisiología de la planta.

Para comprender el sentido de nuestro trabajo, referente a la sustitución, en la nutrición de la planta, (Nicotiana rustica), del elemento K, imprescindible en gran cantidad, por Li, Na, Rb ó Cs, de los que a lo más la planta tendrá unas necesidades catalíticas o ultracatalíticas, es necesario hacer algunas consideraciones sobre la nutrición mineral de las plantas.

Los elementos químicos del suelo son absorbidos por la planta, tanto si son necesarios para la planta como si no lo son. Si el análisis de los elementos minerales es suficientemente sensible, aparecen fácilmente 60 elementos del centenar que compone la corteza terrestre, como constituyentes de la planta. Así, la capacidad de elección de la planta para los elementos minerales es solo relativa. Sin embargo, la planta toma gran cantidad de determinados elementos, sin excluir totalmente otros.

Para considerar el elemento realmente esencial para la planta es necesario, según el criterio de Arnon y Stout (1939) que se cumplan los siguientes principios:

- La omisión del elemento en cuestión tiene que ocasionar un crecimiento anormal, la imposibilidad de completar el ciclo vital o la muerte prematura de la planta.
- El elemento tiene que ser específico y no reemplazable por otro. Por ejemplo, el Na puede reemplazar en algunas funciones al K, pero no en todas, luego el K es esencial y el Na beneficioso.

- El elemento tien que ejercer su efecto directo sobre el crecimiento o metabolismo, y no por algún efecto indirecto, tal como por antagonismo con otro elemento presente a nivel tóxico.

En la tabla que se representa seguidamente relacionan los elementos que se conocen como esenciales para la vida de las plantas superiores, en números relativos respecto a Mo.

<u>Concentración en materia seca</u>			
Elementos	Atomos/g $10^{-6}$	ppm g/g	Número relativo de átomos con respecto al Mo
<u>Macronutrientes</u>			
Hidrógeno	60.000	60.000	60.000.000
Carbono	35.000	450.000	35.000.000
Oxígeno	30.000	450.000	30.000.000
Nitrógeno	1.000	15.000	1.000.000
Potasio	250	10.000	250.000
Calcio	125	5.000	125.000
Magnesio	80	2.000	80.000
Fósforo	60	2.000	60.000
Azufre	30	1.000	30.000
<u>Micronutrientes</u>			
Cloro	3,0	100	3.000
Boro	2,0	20	2.000
Hierro	2,0	100	2.000
Magnesio	1,0	50	1.000
Cinc	0,3	20	300
Cobre	0,1	6	100
Molibdeno	0,001	0,1	1

Como puede observarse hay una interrupción entre Cl y S respecto a las cantidades consideradas como esenciales, respectivamente 100 y 1.000 ppm. Todos los elementos presentes a concentraciones de 1.000 ppm o superiores se denominan macronutrientes; éstos, con la excepción del K, tienen un papel, o en la estructura de la planta o como componente de metabolitos vegetales. En cuanto a los elementos presentes a concentraciones de 100 ppm o inferiores, micronutrientes, ya su limitada necesidad refleja su función en reacciones de óxido reducción, y como activadores enzimáticos y cofactores.

### 1.9.1 Potasio

El K, principal constituyente en las cenizas vegetales, es un elemento absolutamente esencial para la nutrición de la planta. A diferencia del nitrógeno y del fósforo, el K no forma parte estructural de ninguna molécula dentro de las células. Sin embargo, existen informes que indican que el K podría combinarse con algún compuesto orgánico. Olsen (1948), informó que durante el verano, aproximadamente el 30% del K permanecía insoluble en hojas de melocotón, y que antes de la caída de la hoja todo el K se solubilizaba. Según él, el K estaría ligado a proteína y se liberaría cuando al producirse la hidrólisis proteica en la hoja. También se ha informado de la existencia de K ligado en Chlorella (Scott, 1944). Es de destacar que se necesitan importantes cantidades de este elemento para un crecimiento apropiado (Cooper y colab, 1965).

El K es fijado con facilidad por el suelo. Incluso los fertilizantes de K solubles en agua son retenidos por el suelo, de forma que no son arrastrados por el lavado, salvo que se trate de suelos muy ligeros en áreas de lluvia intensa. Si hay K disponible, las plantas toman más del que necesitan, y la mayor parte en las primeras semanas del crecimiento activo. En la planta se encuentra el K en formas salinas solubles, disueltas en los jugos celulares de tejidos meristemáticos y fisiológicamente activos. El K es indispensable para las divisiones celulares, y en el cultivo de tejidos debe ser añadido a una concentración tanto más elevada cuanto más activa es la proliferación de tejidos.

En estado vivo, las plantas evitan su pérdida por lixiviación y lavado, desplazándose de los tejidos senescentes a los jóvenes, evitándose así, en parte, su pérdida con la caída de las hojas bajas.

El K actúa exclusivamente como ión libre y, debido a su gran movilidad, pasa fácilmente a través de las membranas. Su gran movilidad es también motivo de que pase a través de las membranas más fácilmente que el Na y una de las causas de que sea preferido al Ca. Neutraliza los ácidos orgánicos y es regulador del balance iónico en el protoplasma y en el jugo celular. En el interior de las células debe existir un cierto equilibrio entre los cationes y los aniones, es decir, entre las cargas (+) y las cargas (-), dicho de otra manera, existe una relación entre los niveles globales de cationes (necesariamente minerales) y de aniones (minerales y orgánicos).

El poder de imbibición de los coloides depende de los iones presentes. El K facilita la imbibición de los coloides (el citoplasma y las proteínas en general son coloides ionógenos anfóteros). Y por ello, contribuye al mantenimiento de las estructuras celulares; disminuye la transpiración de las plantas y tiende a impedir su marchitamiento en caso de deficiencia de agua. A este respecto, existe un antagonismo entre los iones de K y Ca. Es de destacar, que el enriquecimiento del medio en K disminuye la absorción de Ca y viceversa. El grado de hidratación de los iones dependerá no solamente de su carga sino también de la dimensión del núcleo. Al aumentar el radio del ión con el peso atómico, decrece proporcionalmente su capa de hidratación. Si se ordenan los iones

según su grado de hidratación, se constituyen las series liotropas de Hofmeister.

Series catiónicas     $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{Sn} > \text{Ba}$   
 Series aniónicas     $\text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$

Dos iones se comportan como competitivos, cuando uno disminuye la penetración del otro y reciprocamente, de tal forma que parece existir una competición entre los dos por la entrada a la célula. Efectivamente, según la teoría de los transportadores, en el transporte activo de iones se considera que existe una competición de los iones por el mismo transportador. Se da antagonismo competitivo entre K y Rb, sin embargo no existe antagonismo de este tipo entre estos metales y el Na. El Li utilizaría un tercer transportador. Es de destacar, que una ATP-asa de la membrana plasmática de las células de la raíz de avena, hidroliza específicamente el ATP. Este enzima es estimulado por cationes monovalentes, en el mismo orden de afinidad que el mostrado por la entrada de estos iones en la raíz intacta, es decir:  $\text{K} > \text{Rb} > \text{Na} > \text{Cs} > \text{Li}$  (Hodges, 1976). Utilizando vesículas de membrana, procedentes de tejido de raíz de Avena, Hodges estudió también el flujo pasivo de ión; las permeabilidades relativas decrecían de nuevo de K a Li. Las vesículas no mostraban específicamente transporte dependiente de ATP, y se piensa que son necesarios ulteriores trabajos para dilucidar si la ATP-asa estimulada por K de las membranas celulares de raíz en efecto transporta K. Generalmente, la actividad ATP-asa se incrementa por K y Na, juntos o individualmente, y la hidrólisis de ATP podría intervenir en la transferencia de iones a través de las membranas biológicas. Esto viene

apoyado por el hecho de la existencia de concentraciones relativamente altas de este enzima en las fracciones de membrana de la planta (Lai y Thompson, 1971).

Se ha sugerido que concentraciones relativamente altas de K y otros cationes monovalentes pueden ser requeridos para cambios conformacionales de enzimas inducidas por catión, puesto que estos cationes no forman quelatos (complejos altamente estables) (Evans y Sorger, 1966). Así, una alta concentración de cationes monovalentes sería requerida para el mantenimiento de estos cationes con grupos cargados en las superficies de proteína. Por ello, el K parece ser el único catión monovalente en la naturaleza, disponible en cantidad suficiente y con propiedades químicas apropiadas para satisfacer las necesidades de la mayoría de las enzimas activadas por catión, según Evans y Sorger (1966). Estos investigadores indican que el K y otros cationes monovalentes funcionan como cofactores para aproximadamente 46 de las enzimas conocidas de animales, plantas superiores y microorganismos.

Por lo expuesto, parece seguro, que el K actúa como coenzima esencial o activador de muchos enzimas. Tales enzimas no pueden actuar como catalizadores efectivos en las reacciones metabólicas en que falta el K. Este elemento es necesario para la acción de la fructo quinasa, piruvato quinasa, acético tioquinasa, succinil-CoA sintetasa y transacetilasa, entre otras. En frutos de tomate, el K también juega un papel importante en la activación de los enzimas malato deshidrogenasa y glutamato-oxalacetato transaminasa mitocondrial. (Besford y Hobson, 1975). También el metabolismo del ácido fólico requiere K, aunque

Rb y  $\text{NH}_4$  son igualmente efectivos (Hiatt, 1965).

Succinil-CoA sintetasa aislada de tabaco, mostraba una necesidad de K del orden de 0,06 M para su máxima actividad (Bush, 1969).

Extractos de raíz de guisante deficientes en K mostraban considerablemente menos actividad piruvato quinasa que plantas suficientes (Evans, 1963).  $\text{NH}_4^+$  o Na podían sustituir solo parcialmente al K. La necesidad de K para la activación del enzima, se ha demostrado en varias especies vegetales, y según Gauch (1972), el elemento no actúa iónicamente sino ligado bastante fuertemente a la molécula enzimática, haciéndole alcanzar una estructura particular que le permite actuar catalíticamente y ocasionar una degradación normal de los carbohidratos. Es interesante la relación hallada entre la piruvato quinasa y el K en plantas de trigo, por Sugiyama y colab (1968): cuando las plantas se hacían deficientes en K, la actividad piruvato quinasa aumentaba, y cuando a las plantas se les suministraba suficiente K, la actividad devenía normal. Propusieron que el K podría actuar como regulador de la enzima por medio de la represión de la síntesis de piruvato quinasa. Además, la activación de piruvato quinasa por K puede ser utilizada para el microensayo cuantitativo del ión K en muestras biológicas, con alta sensibilidad.

El K aumenta la actividad asimiladora de las hojas. Así, aumenta la absorción de  $\text{CO}_2$  por unidad de superficie, lo que representa un mejor aprovechamiento de la radiación. Las hojas deficientes de K dejan de funcionar normalmente antes que si están suficientemente provistas.

Un aumento de K reduce el contenido de azúcares re-

ductores, evitando la condensación de hexosas; probablemente esto está en conexión con los procesos de fosforilización. Facilita la migración (translocación) de carbohidratos desde los órganos de síntesis a aquellos donde se acumula en forma de almidón u otros azúcares, para constituir reservas de carbohidratos en la planta; así aumenta la relación raíz/hoja (Salisbury y Ross, 1969). Según Hartt (1969), la deficiencia de K disminuía la translocación de fotosintetizados marcados desde las hojas a otras partes de plantas de caña de azúcar. La translocación es inhibida en hojas sin síntomas visibles de deficiencia de K, o cuando se produce algún descenso en la proporción de fotosíntesis. Realmente, el descenso de translocación de azúcares es considerado como el efecto primario de deficiencia de K.

Nitsos y Evans (1969) mostraron que la sintetasa de maíz tierno tenía una absoluta necesidad de K, produciéndose una activación óptima con  $ClK$  0,05 M. Durante la deficiencia de K, la falta de síntesis de almidón podía ser el resultado de un reducido suministro de energía (aún cuando puedan acumularse azúcares), puesto que el K es necesario para la glucólisis, la fosforilización oxidativa, la fotofosforilización y la síntesis de adenina (Evans y Sorger, 1966). Consecuentemente, la escasez de K, en presencia de grandes cantidades de N, da como resultado la acumulación de N mineral no utilizado. Además, se ha podido observar que el tiempo requerido para la inducción de nitrato reductasa en Neurospora crassa era más largo en ausencia de K (3 horas), que cuando el K era suficiente (1 hora). También la formación de nitrato reductasa en raíces de plántulas requiere K (Oji y Izawa, 1969).

La síntesis proteica es un proceso que requiere altas cantidades de K, independientemente de su vinculación al suministro de energía. Se ha probado que el K es indispensable para la formación de los enlaces peptídicos y de la proteogénesis en general (se le encuentra igualmente en los ribosomas). Esto explica probablemente el hecho, conocido de hace tiempo, de que las plantas deficientes en K son usualmente bajas en contenido proteico, pero altas en el de aminoácidos libres de naturaleza proteica. El K se requiere para catalizar la incorporación de aminoácidos en proteínas, en extractos de plantas superiores. Es necesaria la adición de este elemento para la síntesis de polifenilalanina en un sistema libre de células (homogeneizado), que contiene ácido poliuridílico y ribosomas de E. coli (Lubin y Ennis, 1963). La activación de tirosina y de guanosina trifosfatasa ribosomal, en levadura, requiere K, y por ello se supone que se requiere también este elemento para la activación de los enzimas correspondientes en las plantas superiores. (Conway y Lipmann, 1964). Ya se ha indicado el papel del K en las reacciones de fosforilización y en la biosíntesis de purina; además, es necesario para la actividad de la aspartato quinasa, y por ello una deficiencia de este catión podría resultar en un bloqueo de la síntesis de cistina, homoserina, treonina, isoleucina y valina (Paulus y Gray, 1964). Puesto que se necesita K para la síntesis de carbamil-fosfato, es lógico que una deficiencia del mismo pudiera limitar o evitar la biosíntesis de arginina, citrulina y pirimidinas, en los organismos donde la carbamil-fosfato sintetasa es operativa (Marshall y Metzzenberg, 1961). También el K es necesario para la síntesis de S-adenosil-metionina, y así

podría intervenir en el metabolismo de la transferencia de metilo (Ramasastrí y Blakely, 1962). Por último, hay una serie de enzimas involucrados en la síntesis de vitaminas, cofactores y coenzimas, que requieren catión monovalente ( $K$  o  $NH_4^+$ ), que podrían afectar la síntesis de proteínas indirectamente. Así, el  $K$  sería necesario para una serie de reacciones importantes en la biosíntesis de aminoácidos y proteínas. También un exceso de  $K$  y una débil provisión de  $N$  ejerce un efecto depresivo sobre las proteínas.

Hoy sabemos que el  $K$  es el principal catión implicado en la regulación del turgor durante la apertura y cierre estomático en la luz. Esta incrementa la toma de  $K$  en las plantas superiores (Rains, 1968). Fujino, (1967), observó una interacción entre ATP, ATPasa y  $K$  en la apertura estomática y propuso que la energía en forma de ATP podría ser utilizada para la acumulación de iones osmóticamente activos, tales como el  $K$ , y de esta forma se regularía el flujo de agua. Aproximadamente al mismo tiempo, Fischer (1968) comprobó el efecto del  $K$  en la apertura de los estomas en Vicia faba, y determinó que la concentración requerida de este elemento para la máxima apertura de los estomas era de 10 mM en aire libre de  $CO_2$ . El  $K$  juega también un importante papel como catión osmorregulador en el crecimiento de la fibra de algodón (Dhindsa y colab, 1975). La implicación del flujo rítmico de  $K$  en el pulvinio, durante el movimiento rítmico de la hoja controlado por fitocromo, ha sido demostrado en Samanea saman (Satter y colab, 1974). Sin embargo, parece que no todo el sistema oscilatorio dependiente del turgor muestra flujos concomitantes de  $K$ , puesto que el  $K$  no parti-

cipa en el ritmo del metabolismo ácido de las crasuláceas (Lüttge y colab, 1975).

Hay evidencia de que el K ejerce una función importante en el crecimiento en extensión; donde la elongación de segmentos de coleoptilo de avena ha sido inducida por AIA se ha detectado un cambio K/H (Haschke y Lüttge, 1975). En el crecimiento de las células de la hoja parece estar específicamente implicado en la síntesis de clorofila, aunque no se ha demostrado en tabaco, como se indica más adelante. Además el K puede influir también, indirectamente, sobre el crecimiento, por ejemplo, por medio de un efecto sobre los niveles de sustancias endógenas parecidas a giberilina, o afectando la resistencia estomatal (Koch y Estes, 1975). La interacción entre el K y los procesos de crecimiento en las plantas es por ello extremadamente compleja, y todavía pobremente comprendida.

El K, igual que el N y el P, se redistribuyen, o desplazan de los órganos maduros a los más jóvenes, y los síntomas de deficiencia se observan primero en las hojas bajas, más viejas. En las dicotiledóneas primero se ponen cloróticas a rodales, y pronto se desarrollan lesiones necróticas oscuras. El limbo de la hoja tiende a curvarse hacia atrás o hacia la superficie superior paralelamente al nervio medio. Los márgenes "quemados" se curvan frecuentemente hacia adelante. A causa de la reducción del crecimiento son cortos los entrenudos, y en la planta disminuye la producción de semillas y frutos, y se desarrolla poco el sistema radicular. En deficiencia severa, son seriamente afectados los ápices vegetativos. Clorosis y necrosis son síntomas en general asociados con

muchas deficiencias, y por ello es difícil asociar estos fenómenos con un proceso metabólico en particular. Con todo, es de interés que se requiere K para la actividad de  $\gamma$ -aminolevulínico deshidratasa, en extractos de Rhodospseudomonas spheroides, y consecuentemente el catión sería necesario para la síntesis de porfirinas, y con ello de bacterioclorofila en la célula bacteriana (Burnham y Lascelles, 1963). La conversión del ácido  $\gamma$ -aminolevulínico (AAL) en porfobilinógeno es el paso catalizado por AAL-deshidrogenasa y representa un punto clave de la síntesis de pirrol en la bacteria. Se ha observado que el enzima era inhibido por hemina y protoporfirina y activado por Li, Rb, K ó Na. También Mg ó Mn la activaban a baja concentración (Nandi y colab, 1968). Por el contrario, AAL deshidratasa parcialmente purificada, de tabaco, no era inhibida por hemina, protoporfirina IX ó citocromo C. El Mg era esencial para su actividad, y el Mn en ausencia de Mg la estimulaba a bajas concentraciones.

La disminución de K en la planta alcaloídica, normalmente se traduce en un incremento del porcentaje de alcaloides de la misma. Smith (1965) encontró que en hojas de cebada deficientes en K, era mayor el nivel del enzima que cataliza el paso de N-carbamil-putrescina a putrescina. Plantas libres de alcaloides, como Trifolium, Hordeum y Melianthus, respondían a la deficiencia de K acumulando aminos como putrescina y agmatina (Suzuki y Mc Lead, 1970; Sinclair, 1967; Koch y Mangel, 1972). Sin embargo, según Tso (1972), parec ser que el K no afecta el contenido de nicotina en la planta de tabaco.

En estudios de nutrición con plantas de tabaco

para fumar, crecidas en cultivo de arena, la sustitución del K por el Na en la solución nutritiva demostró: que en deficiencia de K, el Na le podía sustituir parcialmente en la nutrición; que el K reducía la absorción de Na por la planta y que los dos elementos ejercían un efecto sinérgico en la reducción de la absorción de Ca, Mg y P por la planta (McEvoy, 1955). Sin embargo, Hutcheson y colab (1959), con plantas crecidas en condiciones de invernadero demostraron la esenciabilidad del K para el desarrollo normal de la planta, y encontraron que el Na tenía muy poco efecto sobre el crecimiento de la planta, cuando se añadía a la solución nutritiva con o sin K. Estos investigadores concluyeron que el K no puede ser reemplazado por el Na en las plantas de tabaco para fumar.

### 1.9.2 Litio

Este elemento no es esencial para la nutrición vegetal y está muy repartido por la corteza terrestre, aunque en pequeñas cantidades. Los datos obtenidos en la bibliografía demuestran que muchas plantas lo absorben, ocasionándoles efectos tóxicos o estimulantes, según la cantidad que han tomado; generalmente las plantas lo contienen en concentraciones de 1 ppm o más bajas (Bradford, 1966). Ya Focke (1878), observó la presencia de Li en los tejidos vegetales, y Robinson (1917) lo determinó en cantidades de 1 ppm en 48 especies vegetales. Posteriormente, Bertrand (1948) examinó la existencia de Li en un considerable número de plantas, y dedujo que las monocotiledóneas lo contienen en cantidades de 0,85 ppm, y las dicotiledóneas en 1,3 ppm. En el tabaco solo se han encontrado pequeñas cantidades de Li, 0,013-1,2 ppm (Yamagata, 1950). Parece ser que las especies de Nicotiana en estado de floración contienen una concentración relativamente alta de Li (Heffer y Sons, 1934).

No se ha probado, en ningún caso, que el Li sea un elemento esencial para el crecimiento vegetal, pero existen datos sobre los efectos beneficiosos para el crecimiento de la planta naturalmente en dosis muy bajas. Nakamura (1905) observó que pequeñas cantidades de Li estimulaban el crecimiento del trigo y de la cebada. Brenchley (1932) llegó a la misma conclusión procediendo con soluciones muy diluidas de cloruro de Li, y comprobó que estimulaba el crecimiento de la cebada. Hance (1933), trabajando con caña de azúcar, observó el efecto estimulante producido por pequeñas cantidades de sales de Li.

Puccini (1954) adicionó diferentes sales de Li a cultivos de claveles, y comprobó un mejor crecimiento vegetativo y otras respuestas favorables, excepto en el caso de que el Li se hallara en estado básico.

Finalmente, experiencias con tabaco Kentucky, al que se daban cantidades y proporciones variantes de K y Li, parecían indicar que el tabaco se fortalecía con la adición de pequeñas porciones de sales de Li (Ravenna y Maugini, 1912). El Li contenido en la ceniza de las plantas de tabaco, crecidas en cultivo enriquecido de este elemento, era de 2 a 3 veces mayor que en las plantas control. Las plantas de tabaco toleran considerables cantidades de Li. Los trabajos realizados por Ekdakova (1962), para observar el efecto del Li en la fisiología de la planta de tabaco, le llevaron a la conclusión de que la fotosíntesis era más intensa en las plantas prueba, con Li. También el desprendimiento de  $\text{CO}_2$  indicaba que el Li estimulaba la respiración. Otro efecto de este elemento era el incremento de la robustez de la planta aún en condiciones adversas de sequedad y calor.

Sin embargo, existen también en la bibliografía numerosos datos sobre el efecto tóxico del Li. Ravenna y Zamonini (1909) observaron sus efectos tóxicos sobre el cultivo de avena y judía. El Li, de manera general, retrasa la germinación; también se ha observado la producción de un moteado en las hojas por adición de sales de Li al medio de cultivo. La sal de Li que parece ser más tóxica es el  $\text{NO}_3\text{Li}$ . Scharrer (1954) llegó a la conclusión de que el Li es el más tóxico de los elementos alcalinos, y Edwards (1941) observó que el primer efecto se produce en

las células meristemáticas de la raíz. El Li ejerce una acción inhibidora sobre ciertos enzimas activados por el K, así Hiatt y Evans (1960) comprobaron este efecto sobre acético tioquinasa aislada de hojas de espinaca, después de haber sido estimulada por K.

Es decir, que el efecto del Li depende de la dosis aplicada y de la planta sobre la que actúa. Los ensayos efectuados parecen demostrar que ninguna sal de Li es tóxica, si las cantidades no exceden a 30 ppm, y que por el contrario estimula el crecimiento si se encuentra en una proporción inferior a las 20 ppm. A esta concentración parece ser que el Li puede paliar una ligera deficiencia de K. En el caso particular de las Solanaceas, se ha encontrado (Ravenna y Zamonini, 1909) que el Li no causaba efectos perjudiciales.

### 1.9.3 Sodio

Se sabe que ciertos elementos pueden ejercer un efecto beneficioso sobre las plantas, sin ser esenciales para ellas. El caso del Na para la remolacha azucarera, es bien conocido; incluso bajo condiciones de excelente abonado potásico, el Na es necesario para un crecimiento óptimo, no pudiendo ser reemplazado enteramente por el K. De manera general, el Na no se considera elemento esencial pero produce efectos beneficiosos sobre algunas cosechas. Este elemento confiere a las plantas resistencia a las enfermedades y evita el marchitamiento por el calor. Las plantas lo requieren para un crecimiento óptimo; en su ausencia las hojas pueden tomar un color verde negruzco, sin brillo, y son más delgadas y, en consecuencia, menos resistentes a la sequía. Incluso pueden presentarse lesiones marginales, semejantes a las provocadas por falta de K.

Además, en el caso de Na se encuentran otros diferentes efectos de acuerdo con su necesidad, según se indica a continuación.

Es esencial para Atriplex vesicaria, una planta forrajera de las regiones áridas de Australia, y Halogeton glomeratus, una halófita americana (Williams, 1960), así como para las algas en general. Halogeton glomeratus daba la máxima respuesta de crecimiento, cuando la concentración de ClNa en la solución de cultivo era 0,1 N. De acuerdo con Allen y Arnon (1955) son requeridas 5 ppm en el medio, para un crecimiento óptimo del alga Anabaena cylindrica. El K, Li, Rb o Cs no podían sustituir favorablemente al Na.

Otras especies responden al Na, cuando el K no se encuentra en su óptimo (trigo, avena, cebada, algodón, tomate). Por último, numerosas especies son indiferentes al Na, a cualquier concentración de K.

Cuando Atriplex se pasa de un medio deficiente en Na a otro suficiente, se podía observar un incremento en la respiración, medible por el consumo de  $O_2$ , antes de que la planta recupere su normal crecimiento (Brownell y Jackman, 1966). Este efecto era específico para el Na, y en deficiencia de este elemento el  $CO_2$  desprendido procedía de procesos fermentativos. Estos hechos, se interpretaron como que la glicólisis era específicamente afectada por la deficiencia de Na en la planta, e indican la necesidad de Na para este proceso.

En el alga Anabaena cylindrica, el primer síntoma visible de la deficiencia de Na es el desarrollo de clorosis. Esta clorosis es debida a una toxicidad por nitrito, resultante de la acumulación de nitrato cuando el Na es deficiente en el sistema. En ausencia de Na, la actividad de la nitrato reductasa incrementa, lo que da como resultado la acumulación de  $NO_3^-$ . A su vez, la asimilación de nitrógeno se reduce en células deficientes en Na. La interpretación general de estos datos, es que el Na influye en la síntesis de proteínas y que por este camino ejerce un control sobre el metabolismo nitrogenado (Brownell y Nicholas, 1967).

Es de destacar, que muchas plantas con el camino fotosintético  $C_4$  requieren Na como elemento nutritivo esencial. Sin embargo, plantas del mismo género que se caracterizan como plantas  $C_3$  no parecen tener una especial

necesidad de este elemento (Brownell y Crossland, 1972). El Na es aparentemente necesario para la fijación de  $\text{CO}_2$  por el ciclo de Hatch - Slack ( $\text{C}_4$ ). Aeluropus litoralis, una halófito, fija el  $\text{CO}_2$  mediante el ciclo Calvin-Benson ( $\text{C}_3$ ) en ausencia de Na, mientras que la adición de Na al medio le condiciona el paso del camino fotosintético  $\text{C}_3$  al  $\text{C}_4$  (Schomer-Ilan y Waisel, 1973). Se ha demostrado también que el Na afecta el balance entre los enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa ( $\text{C}_4$ ) y ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa ( $\text{C}_3$ ) en Zea mays, una planta no halófito.

Ciertas especies vegetales muestran necesidad de Na para la expresión del camino CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas). Según Winter (1973), plantas pertenecientes a la familia de las Aizoaceas producían el sistema CAM, solo cuando disponían de Na en el medio de cultivo. Cuando a éste se adicionaba  $\text{ClNa}$ , la toma de  $\text{CO}_2$  incrementaba en la oscuridad y el contenido de malato incrementaba en las hojas.

Es necesario subrayar, que si bien los umbrales de toxicidad y de carencia se hallan generalmente muy próximos para los micronutrientes, no sucede así para el Na, que aunque micronutriente no presenta, en sentido estricto, umbral de toxicidad. Por el contrario, generalmente se encuentra en la planta a concentraciones muy superiores a aquellas requeridas.

Atriplex vesicaria, solo necesita 2,3 ppm, mientras que el contenido de Na en el tabaco para fumar oscila entre concentraciones de 240 a 330 ppm (Bacot, 1960), y en el tabaco japonés el contenido en Na es de 14.700 ppm (Yamagata, 1950). En la mayoría de las especies, el Na se

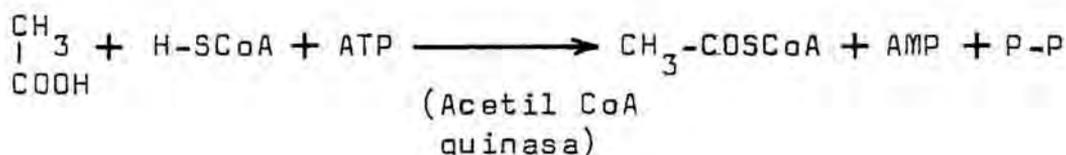
acumula en la raíz, los tallos solo poseen bajas concentraciones y en las hojas aún más bajas. Wallace (1966), obtuvo evidencia de que el Na se acumulaba en las vacuolas de las células de la raíz, y que el flujo normal del ión desde el suelo a las hojas se produce a través de las vacuolas de las células de este órgano. Después de un período de absorción de 4 horas, aproximadamente el 95% del Na absorbido por la planta de judía era retenido por las raíces secundarias; a su vez, el Na translocado hacia los ápices era retenido en su mayor parte por el tallo. También observó, que cuando el ión se aplicaba directamente a las hojas de estas plantas se depositaba en las vacuolas del tejido foliar y difícilmente era translocado a la raíz.

El Na como el K contribuye al balance anión/catión. Es decir, ayuda a mantener el equilibrio iónico, en relación con el mantenimiento de un buen estado de hidratación del citoplasma, condición necesaria para que conserve su estructura. También contribuye a la neutralización de los ácidos orgánicos. El papel del K en la apertura estomática puede ser reemplazado por el Na, aunque solo a altas concentraciones iónicas (Humble y Hsiao, 1969).

En una revisión bibliográfica, Lunt (1966) indicó que para varias especies de plantas el Na puede ser requerido por ciertos enzimas, puede activar sistemas enzimáticos, ser requerido para la fotosíntesis (Synechococcus cedorum), o incrementar la asimilación de  $\text{CO}_2$ . Para Gauch (1972), el papel del Na es todavía oscuro, puesto que, igualmente que las funciones del K, no son del todo bien conocidas.

Está claro que el Na es conservador del K, y que

puede reemplazar parcialmente al mismo. Se ha logrado comprender, al menos para ciertos elementos, como a veces puede ser sustituido uno por otro, en su totalidad, o como sucede más frecuentemente, en parte, lo que puede razonarse a partir de ciertas reacciones enzimáticas. Tal es el caso K - Na, que podemos relacionarlo con dos reacciones enzimáticas esenciales:



Además de Mg (o de Mn), les es indispensable el K. En la primera reacción, el Na (e incluso el Rb) puede reemplazar enteramente al K, pero esta sustitución no es posible para la segunda reacción enzimática. Si se tienen en cuenta estas dos reacciones, se puede explicar el papel beneficioso, aunque no esencial, del Na; sin embargo, cuando la ocasión se presenta, el Na puede ser tan funcional como el K. Pero aun así, a lo más puede retrasar la evolución de la carencia de K.

Un gran número de reacciones enzimáticas son catalizadas por enzimas que necesitan ser activadas por cationes monovalentes. Los enzimas que son activados por el K lo son también usualmente por el Rb, pero poco por el Na y nada por el Li. A su vez, las pocas enzimas activadas

por el Na lo son también por el Li y muy poco por el Rb o K. Según Melchior (1954), el hecho de que ciertos enzimas puedan ser activados por K y no por Na podría estar relacionado con la capacidad de ambos elementos para formar complejos coordinados con ADP y ATP. Modelos de estos complejos (K-ATP y Na-ATP) revelaban que el Na estaba completamente envuelto por la molécula de ATP, y que, en contraste, el K permanecía en la superficie de la misma. Esta distinta situación permitiría a los complejos K-ATP activar a los enzimas pertinentes.

Woolley (1957) realizó estudios precisos para determinar la esenciabilidad del Na, en Lycopersicum esculentum. Utilizó sales minerales y agua altamente purificados y tomó precauciones para eliminar el Na del medio restante. En estas condiciones, no pudo demostrar la esenciabilidad del Na para la planta de tomate. Sin embargo, demostró que la adición de 1 mmol de ClNa por litro de solución nutritiva aumentaba el peso seco de la planta en un 12%. La adición de Li, K ó Rb a la solución nutritiva completa utilizada, sin Na, no producía, por parte de estos elementos, respuestas de crecimiento apreciables.

En plantas de tomate y espinaca crecidas en cultivos hidropónicos se ha estudiado la sustitución parcial o total del Na por el K. La sustitución parcial producía una disminución del peso fresco de la espinaca, y solo la total producía este efecto en la planta de tomate. La sustitución completa de Na por K, implicaba un aumento de la asimilación de  $\text{CO}_2$  en el tomate. En ambas plantas, la respiración aumentaba con la adición de Na sobre aquella con solo K.

Mediante estudios de nutrición con plantas de tabaco en deficiencia de K, se comprobó que el Na podía reemplazarlo de modo favorable. En estas condiciones, la supresión de Na del medio de cultivo causaba un descenso del 30% en el crecimiento de las plántulas, lo que indicaba la acción beneficiosa del Na para esta planta (Mc Evoy, 1955).  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , a la concentración de 150 ppm, producía un ligero estímulo en el crecimiento de la planta de tabaco (Gupta, 1962, 1963).  $\text{ClNa}$ , a la concentración de 200 ppm, era ligeramente tóxico para la planta; mientras que a la dosis de 300 ppm mataba el 50% de las plantas después de tres días de tratamiento.

En una experiencia con plantas de tabaco crecidas en el suelo y sobre arena de río, se compararon los efectos del  $\text{NO}_3\text{Na}$  y  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$  en la nutrición. Los resultados indicaron que las plantas eran influidas favorablemente por la sal de sodio y que la necesidad de K descendía (Popper y colab, 1960).

#### 1.9.4 Rubidio

Los datos existentes en la bibliografía sobre el rubidio son escasos, pero se tiene la certeza de que la presencia de Rb en las plantas es también general. Bertrant, (1943) analizó los tejidos de 150 especies vegetales y en todas ellas encontró cierta cantidad de rubidio. En la planta de tabaco (Yamagata, 1950; Kennaway y Lindsey, 1958), aparecen trazas en un promedio de 30 ppm.

La posibilidad de una sustitución parcial de K por los otros iones alcalinos, en muchas funciones fisiológicas de la planta, puede ser debida a su doble papel en la misma: la activación de determinados enzimas, y la participación en la regulación osmótica. Es conocido, que el papel específico de un ión depende de sus características químicas, tales como la energía de hidratación y el radio iónico. De entre los metales alcalinos, el Rb es el que tiene propiedades químicas más semejantes al K; por ello, podría esperarse que reemplazará parcialmente al K, como elemento mineral esencial en los procesos biológicos. Sobre este punto, existen resultados contradictorios. Alter (1933), llegó a la conclusión de que el Rb y el Cs eran incapaces de sustituir al K. Según Richards (1941), bajos niveles de K hacen cesar el crecimiento cuando la planta tiene una o dos hojas, y si persiste la deficiencia la planta muere; la adición de Rb mejoraba el crecimiento, pero si el nivel de este elemento era excesivo se traducía en anormalidades características en las hojas. El efecto tóxico de un exceso de Rb en la solución nutritiva utilizada en el cultivo de Hordeum vulgare, fué comprobado por

Richards (1944); sin embargo cuando la avena crecía en deficiencia de K, la adición de una concentración adecuada de Rb mejoraba notablemente su crecimiento. La adición de Li, Na ó Cs no producía este efecto. También se ha estudiado los efectos del Rb sobre el crecimiento de la planta de tabaco (Skogley y Mc Cants, 1963); los resultados indicaban que el Rb se acumulaba en las raíces y que de alguna manera el mayor tamaño de la planta estaba relacionado con esta acumulación. Epstein (1956) observó que los iones K ó Cs inhibían la toma de Rb, pero que los de Na ó Li ejercían poco efecto sobre este proceso.

El rubidio es tan efectivo como el potasio en la apertura de los estomas en la luz (Humble y Hsiao, 1970). En la luz, las concentraciones requeridas para la máxima apertura de los estomas son 100 veces superiores para Na, Li ó Cs que para Rb ó K. En la oscuridad, todos estos iones son igualmente efectivos aunque a altas concentraciones. La luz parece activar el transporte específico de K y Rb, lo cual incrementa el flujo osmótico de agua al interior de las células de guarda del estoma.

Noack (1942) investigó los efectos de la deficiencia de K sobre la fotosíntesis y comprobó que podían paliarse aplicando Rb. Pirson (1939) observó que la adición de Rb a la solución de cultivo deficiente en K, donde crecían Chlorellas, implicaba un notable incremento en el ritmo de asimilación de  $CO_2$  por estas algas. Sugirió que el Rb podría sustituir al K como un catión necesario en la fotosíntesis. También observó que la adición de K ó Rb a la solución, volvía normal el ritmo respiratorio de Chlorella asociado con la deficiencia de K.

Si se consideran las funciones bioquímicas del K en la planta, con respecto al Rb, podríamos destacar:

Acético tioquinasa de hojas de espinaca, requiere K para su máxima actividad enzimática (Hiatt y Evans, 1960). El Rb era igualmente efectivo en promover su actividad; sin embargo el Na y el Li inhibían el sistema enzimático.

La síntesis de  $\gamma$ -glutamilcisteína requiere K, y es altamente específica para este catión (Webster, 1956). El Rb no podía reemplazar al K, sino que reducía la actividad del enzima.

En el metabolismo del ácido fólico, se ha comprobado que requiere K, aunque no específicamente. El sistema necesita de catión monovalente, y el Rb era igualmente efectivo (Hiatt, 1965).

Succinil-CoA sintetasa, aislado de hojas de tabaco, requiere una concentración 0,06 M de K para su máxima actividad; se ha demostrado que el Rb podía reemplazar parcialmente al K en la actividad del enzima, con mayor efectividad que el Na (Bush, 1969).

El tiempo necesario para la inducción de nitrato reductasa en Neurospora crassa es más largo en ausencia de K; son necesarias tres horas en estas condiciones y sólo una cuando el K es suficiente. Otra vez, el Rb podía reemplazarlo parcialmente, cuando Na y Li no tenían efecto alguno (Nitsos y Evans, 1966).

Finalmente, en la activación de almidón sintetasa aislado de maíz, el Rb es un 80% tan efectivo como el K (Nitsos y Evans, 1969).

### 1.9.5 Cesio

Se han realizado estudios sobre la toma de Cs-137, isótopo pesado, por varias especies vegetales, y se ha observado que todas ellas tenían potencialmente una gran capacidad para la acumulación de Cs-137, debido a su similitud con el K. En Paxillus involutus y especies de Boletus, una alta toma de Cs estaba asociada con una fuerte toma de K por los hongos (Grütter, 1964). La adición de K al suelo o a la solución nutritiva, ya rica en K, no reducía la absorción de Cs por plantas de cebada. Sin embargo, cuando la concentración de K era baja, se incrementaba la toma de K y descendía la de Cs (Ferron, 1964).

Levi (1970) investigó la penetración, retención y transporte de los cationes alcalinos aplicados a las hojas. Observó que la penetración no era selectiva, y parecía ser pasiva para todos ellos. El Cs era el elemento más retenido en el área tratada, y una vez en el interior de la planta, era transportado tan lentamente como el K y distribuido de manera similar a K y Rb.

En plantas de tabaco Burley, cultivadas en Italia, Traetta-Morca (1913) encontró Cs. Yamagata (1950) en plantas de tabaco japonés determinó 0,003 - 0,025 ppm en la hoja joven y 0,022 ppm en la hoja adulta. En un estudio de la toma y translocación de Cs por las plantas (Rediska, y Selders, 1953) observaron que no había redistribución significativa de Cs desde las hojas viejas a otras partes de la planta; sin embargo, sí que pudieron demostrar translocación desde las hojas jóvenes cuando existían gradientes de concentración en las mismas. La concentración de

de Cs en las partes aéreas de la planta era casi proporcional a la concentración de Cs añadida a la solución nutritiva. La absorción de Cs tendía a aumentar cuando el pH del medio nutritivo disminuía.

Los datos existentes en la bibliografía sobre el Cs son escasos. De manera general, el K no puede ser reemplazado en la nutrición mineral de la planta, por los otros elementos alcalinos; éstos solo pueden demorar la evolución de la carencia. Pero además, estos elementos, a excepción del Na, son muy tóxicos a la dosis de algunos mmoles. Sin embargo, el Cs es casi tan efectivo como el K en la activación del almidón sintetasa, que tiene un requerimiento absoluto de K. Nitsos y Evans (1969) observaron que, en la activación del almidón sintetasa aislado de maíz dulce, el Cs era efectivo en un 80% respecto al K. El Cs puede inducir también la apertura estomática (Humble y Hsiao, 1970), y así ejercer actividad osmótica en la planta. La concentración requerida de este elemento para la apertura de los estomas en la luz es de 100 veces superior a la de K; mientras que en la oscuridad, los dos iones alcalinos son igualmente efectivos.

## 2 . PARTE EXPERIMENTAL

Para realizar este trabajo, hemos seguido los pasos que se indican a continuación:

### 2.1 Obtención del cultivo de Nicotiana rustica

Hemos trabajado con Nicotiana rustica L. por ser una planta cuyo ciclo vegetativo y exigencias de cultivo conocemos bien por trabajos anteriores realizados en la Cátedra.

Se seleccionaron semillas de Nicotiana rustica de la cosecha del año anterior, y se lavaron con agua destilada para evitar la presencia de sustancias inhibitoras que podrían impedir su germinación.

Para investigar la acción de cualquier elemento se debe recurrir al cultivo en solución nutritiva. En nuestro caso se utilizó el cultivo en arena silíceo pura; esta se sometió a un tratamiento con ácido clorhídrico, hasta eliminar totalmente los carbonatos; después se lavó con abundante agua corriente para eliminar las sales solubles y finalmente con agua destilada hasta que ésta no dió reacción con solución de nitrato de plata. Obtuvimos de esta forma una arena que únicamente ejercía un efecto mecánico de soporte de la raíz.

Las semillas, una vez lavadas, se sembraron en arena, contenida en recipientes de polietileno transparente. Estos recipientes poseían un dispositivo de desagüe en su

parte inferior, lo que facilitó la labor de renovar semanalmente la solución nutritiva y el lavado de la arena con agua destilada. La indicada operación es necesaria para eliminar los iones concentrados como consecuencia de una posible absorción selectiva y la concentración de  $H^+$  que acidifica el medio.

De esta manera se podía mantener la solución nutritiva a la concentración iónica y pH adecuados. El pH fué mantenido a lo largo de toda la experiencia entre 6 y 6,5, es decir dentro de los límites fisiológicos apropiados para nuestro cultivo.

Los recipientes se dividieron en cinco lotes, y hasta que las semillas germinaron el sustrato inerte se humedeció con agua destilada. En cuanto aparecieron las primeras hojas verdes de las plántulas, se procedió al total drenaje del agua contenida en los recipientes y se inició el riego con solución nutritiva.

- El lote I se destinó a las plantas control, que se regaron, a lo largo de toda la experiencia, con solución nutritiva completa, según la fórmula de Ben Zioni y colab (1971), (solución nutritiva apropiada para plantas de Nicotiana).

- Los lotes II, III, IV se regaron con la misma solución nutritiva, en la que se le había sustituido la mitad de su contenido en iones K por iones Na, Li ó Rb, respectivamente.

- El lote V se regó con la misma solución nutritiva, pero en este caso a partir de la segunda semana, tan solo se sustituyó la cuarta parte de los iones K por iones

Cs, ya que dada la toxicidad del Cs no era posible la misma sustitución de un medio realizada en los otros tres lotes.

Solución nutritiva según Ben Zioni y colab:

$(NO_3)_2Ca$ ... 2,5	mM/1	EDTA-Fe ... 5	ml
$NO_3K$ ..... 2,5	mM/1	$BO_3H_2$ ..... 0,025	mM/1
$SO_4Mg$ ..... 1,0	mM/1	$Cl_2Mn$ ..... 0,008	mM/1
$PO_4H_2K$ .... 0,5	mM/1	$Cl_2Zn$ ..... 0,0005	mM/1
$MoO_4H_2$ ..... 0,0006	mM/1	$Cl_2Cu$ ..... 0,0002	mM/1

La experiencia se realizó en cámara acondicionada a 25° C de temperatura, 60% de humedad y una iluminación de 6000 lux durante 14 horas diarias, procedente de plafones con 12 tubos fluorescentes de 20 W, situados a 80 cm de la superficie de los recipientes.

## 2.2 Toma de muestras y preparación para su análisis.

A los 28 días, después de la siembra, se procedió a tomar la primera muestra. A partir de este momento, se tomaron muestras semanales, hasta una semana después de la aparición de los primordios de inflorescencia en las plantas control, momento en que se dió por terminada la experiencia. Se tomaron siete muestras durante el período del ciclo vegetativo estudiado.

Así, las plantas tomadas en las muestras eran representativas de todos los ensayos. Se contó el número de

hojas por planta y se midió la longitud del tallo, el número y las medidas de las hojas y la longitud de la raíz. Se cortó la planta por la base del tallo, se separaron las hojas y se pesaron por separado del tallo. Se extrajo la raíz y, después de limpiada, se midió y pesó. De esta forma obtuvimos el peso fresco de las hojas, tallo y raíz de las plantas. Sin pérdida de tiempo se estabilizaron los referidos órganos, por separado, sumergiéndoles cinco minutos en alcohol hirviente de 70%. Se guardaron las muestras en cámara frigorífica durante 24 horas. Pasado dicho tiempo se homogeneizaron en un homogeneizador "Ivan Sorvall, Omni Mixer". El recipiente que contenía el producto a homogeneizar se sumergió en un baño de metanol a  $-15^{\circ}$  C de un refrigerador de contacto de la firma "Colone", para evitar alteraciones metabólicas del material. El homogeneizado se llevó a un volumen conocido con etanol del 70% y se conservó en cámara fría hasta el momento de su análisis.

Para la determinación de los pesos secos y para los análisis de proteína, aminoácidos y nicotina, se procedió con volúmenes conocidos de homogeneizado, susceptible de ser referido a una planta y a porcentaje de peso seco de planta.

### 2.3 Determinación del peso seco

Los pesos secos se obtuvieron de un volumen de homogeneizado, que se pesó contenido en pesafiltros. La desecación se efectuó en estufa a  $60^{\circ}$ C, durante 24 horas. Se repite la operación hasta peso constante.

## 2.4 Determinación colorimétrica de las proteínas por el método de Lowry.

Las proteínas producen con los reactivos alcalino-cúprico y de Folin-Ciocalteu, un compuesto de color azul. La coloración sigue la ley de Lambert-Beer, es decir, que el coeficiente de extinción y la concentración, al menos dentro de ciertos límites son proporcionales. Para utilizar este método hay que obtener previamente una curva patrón. En nuestro trabajo se ha operado con un espectrofotómetro "Zeiss PMQ".

Reactivos para la extracción de proteínas:

- Acido tricloroacético-acetona: 5 g de ácido tricloroacético se disuelven en una mezcla de 47,5 ml de agua y 47,5 ml de acetona.

Reactivos para el método de Lowry:

- Reactivo A:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en NaOH 0,1 N.
- Reactivo B:  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 5% en tartrato sódico al 1%.
- Reactivo C: Solución alcalina de cobre. Mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml del B.
- Reactivo D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua destilada.

Extracción de proteínas.

Por su exactitud y precisión, hemos elegido el método de Ingle y colab (1967), Pillet (1967) y Belhanafi y Collet (1970).

Se procede con un volumen conocido de homogeneizado. Este, junto con un volumen triple de ácido tricloroacético-acetona, se deja 24 horas en frigorífico a 0° C. Pasado este tiempo se efectúa una centrifugación a 6000 rpm durante 20 - 25 min. Se elimina el sobrenadante, se lava el residuo con igual volumen de TCA-acetona, y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. El TCA-acetona, además de precipitar las proteínas por acción del ácido tricloroacético, tiene la ventaja de solubilizar los pigmentos liposolubles y sustancias lipídicas en general, lo que evita posteriores extracciones con alcohol-eter. (Daniel, J.W. and Balwin, 1964).

Las proteínas del sedimento obtenido en la segunda centrifugación, después de eliminar el sobrenadante, se solubiliza con 2 ml de NaOH 0,1 N, se deja durante 24 horas a temperatura ambiente y se valoran por el método de Lowry (Lowry y colab, 1951).

#### Procedimiento.

En un tubo de ensayo se ponen 0,4 ml de la solución problema de proteínas (este volumen debe contener de 5 a 100  $\mu$ g de proteína), y se adicionan 2 ml del reactivo C; se mezcla bien y se deja durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionan 0,2 ml de reactivo D y se mezcla con rapidez. Después de transcurridos 30 minutos se lee la densidad óptica en un espectrofotómetro a 500 nm. Para concentraciones de proteína comprendidas entre 5 y 25  $\mu$ g por ml, es aconsejable efectuar las lecturas a 750 nm.

La lectura obtenida permite en la curva conocer los

$\mu$  g de proteína por 0,4 ml.

#### Obtención de la curva patrón.

Las concentraciones de proteína de las soluciones analizadas se dedujeron a partir de una curva patrón obtenida con albúmina de huevo desecada y pulverizada, de la firma Merck. La figura ( 5 ) muestra la curva patrón obtenida en el método de Lowry para concentraciones de proteína comprendidas entre 100 y 10000  $\mu$  g por ml. Puesto que soluciones correspondientes a las primeras muestras presentaban un bajo contenido proteico, se procedió a la obtención de otra curva patrón, en la que las concentraciones de proteína estaban comprendidas entre 10 y 100  $\mu$  g por ml (Fig 6 ). Cada vez que se procede con reactivos nuevos es necesario realizar una nueva curva patrón.

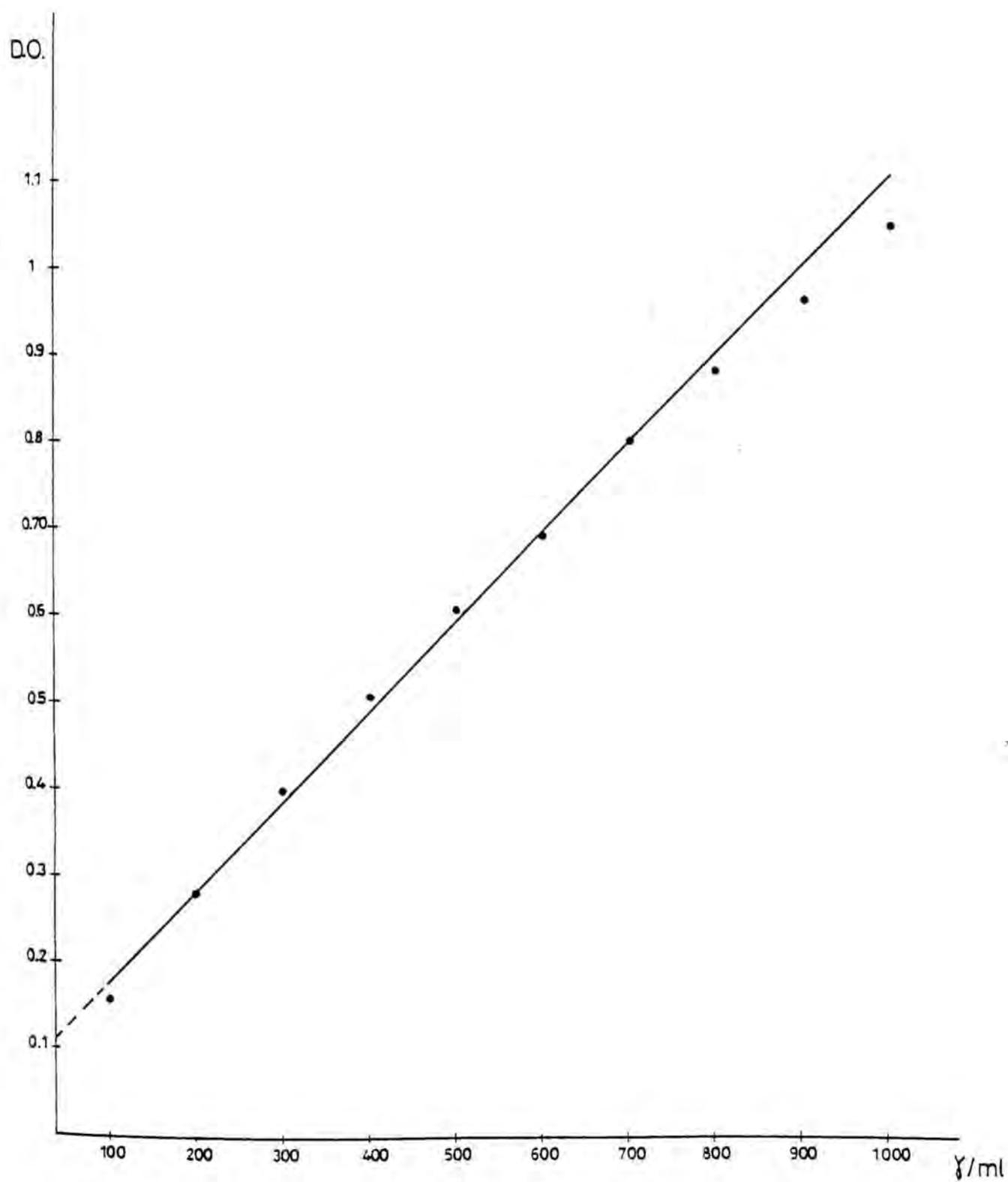
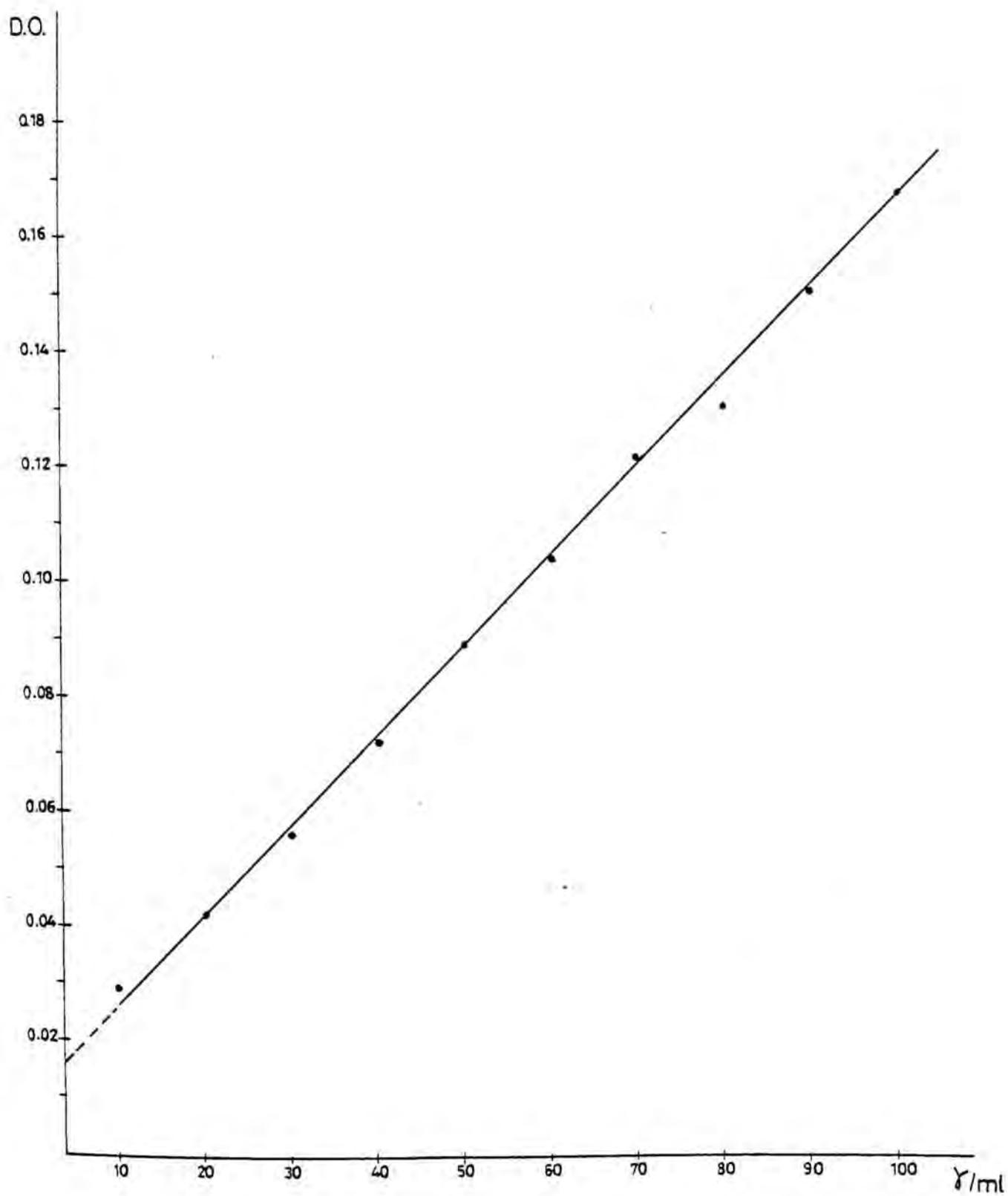
Figura 5CURVA-PATRON PROTEINAS

Figura 6CURVA-PATRON PROTEINAS

## 2.5 Análisis de los aminoácidos proteícos, libres e integrados en proteína, por cambio iónico.

En la constitución de los aminoácidos, puede haber un segundo grupo amino o carboxilo, o bien figurar un anillo aromático o un átomo de azufre. Cada uno de estos componentes hace que el aminoácido responda de modo diferente frente a la resina de cambio iónico, respecto a su absorción y disociación. Lo mismo sucede con los isómeros que tienen el mismo número de carbonos. La aplicación adecuada de la cromatografía de cambio iónico permite la separación de los indicados compuestos. Stein, H. y Moore, H, en 1951 establecieron este procedimiento como método analítico. Para la exposición de esta técnica nos hemos basado en: "Introduction Manual for the Model 034-0004 Liquid Chromatograph" Perkin - Elmer (1968), en el que figura una bibliografía de catorce destacados artículos científicos, y en nuestra propia experiencia.

El cromatógrafo líquido "Hitachi Perkin-Elmer" mod. 034 utilizado por nosotros, posee las unidades funcionales fundamentales independientes: los sistemas de bombeo de líquido eluyente, elución, control de temperatura de las columnas y baño de reacción, detección y registro; éstas se pueden combinar de forma idónea, según se indica en el cuadro de las condiciones analíticas (pag. 108 ). El sistema de detección consiste en un espectrofotómetro de flujo continuo, que permite reconocer simultáneamente la absorbancia por la reacción de los aminoácidos (contenidos en la solución eluida) y el reactivo de ninhidrina en tres longitudes de onda diferentes. Para nuestros análisis de amino ácidos son apropiadas las de 440, 570 y 640 nm.

La máxima absorción para los aminoácidos analizados se da a la longitud de onda de 570 nm, excepto para prolina que se da en la de 440 nm.

#### Reactivos.

- Acido clorhídrico 6 N. Se prepara por dilución de ClH del 37%.
- Patrón de aminoácidos Takara-Kosan.
- Reactivo de ninhidrina:
  - . Características y preparación del tampón de acetato para el reactivo de ninhidrina:
 

Normalidad del acetato sódico	....	4
pH	.....	5,51 0,03
Agua destilada	.....	600 ml
Acetato sódico	.....	328 g
  - . Calentar (50°C) hasta disolución; enfriar:
 

Acido acético glacial	.....	100 ml
Llevar a volumen final a	.....	1000 ml

 Ajustar el pH con ácido acético glacial.
  - . Para la preparación del reactivo de ninhidrina:
 

Concentración de ninhidrina	.....	2%
Volumen final	.....	3000 ml
Metilcelosolve	.....	2250 ml
Tampón acetato	.....	750 ml
Ninhidrina	.....	60 g

 Paso de nitrógeno.
  - . La solución se puede utilizar a las 24 horas de preparada.
- Solución regeneradora.- Utilizada para la regeneración de la columna para los aminoácidos ácidos y neutros. Su composición esta indicada en el

cuadro correspondiente.

#### Tampones:

- Tampón de cotrato sódico de pH 2,2. Se utiliza como diluyente simple.
- Tampones de citrato sódico de pH 3,25 y 4,25, utilizados como eluyentes de aminoácidos ácidos y neutros
- Tampón de citrato sódico de pH 5,28, utilizada como eluyente de aminoácidos básicos.

#### Procedimiento.

Un volumen conocido de homogeneizado se centrifuga 20 minutos a 17000 rpm en una ultracentrífuga "Ivan Sorvall" modelo SS-4. Se separa el sobrenadante y se lava el residuo con alcohol. Se vuelve a centrifugar 10 minutos a las mismas prm. Se reúnen los sobrenadantes. Se efectúa una hidrólisis ácida con el sedimento. Para ello se pone éste en un frasco según diseño propio, con ClH 6N, en la proporción proteína/ácido clorhídrico 1/500, y 1 g de  $Cl_2Sn$ , como agente reductor, y por último se pasa corriente de  $N_2$ , de forma que éste desaloje enteramente el aire del espacio libre del frasco. Se efectúa el cierre hermético del frasco y se deja en una estufa a 100°C durante 24 horas. El hidrolizado se evapora a sequedad en un rotavapor Büchi y se disuelve con tampón de citrato sódico de pH 2,2, cuya composición y preparación se describen en el cuadro correspondiente. La solución se filtra, quedando en condiciones de utilizarla directamente o de guardarla en frigorífico hasta el momento de pasarla por la columna.

Cuadro de la composición de los tampones de citrato y de la solución regeneradora.

pH	3,25 0,01	4,25 0,01	5,28 0,02		2,2 0,1
Concentración Na (N)	0,20	0,20	0,35	0,2	0,2
Citrato sódico $2H_2O$ (g)	197	197	343		19,7
Ac. clorhídrico con. (ml)	132	84	75		16,5
Fenol (g)	10	10	10		1
Tiodiglicol (ml)	50	50			20
Alcohol etílico (ml)	800				
Alcohol bencílico (ml)			50		
Hidróxido sódico (g)				40	
BRIJ - 35 (g)	40	40	40	20	4
Volumen total (l)	10	10	10	5	1
Usos	Elu- yente A y N	Elu- yente A y N	Elu- yente B	Rege- nera- ción Colum- na	Elu- yente

Cuadro - resumen de las condiciones para el método analítico de dos horas de duración.

Muestra de análisis	Columna 500 x 9 mm Aminoácidos ácidos y neutros. 14 componentes	Columna 100 x 9 mm Aminoácidos básicos 4 componentes
Resina cambiadora de iones	Resina esférica nº 2612	Resina esférica nº 2611
Tiempo de análisis	Una hora y cuarenta minutos	Treinta minutos
Velocidad de paso del tampón	120 ml por hora	120 ml por hora
Velocidad de paso de ninhidrina	60 ml por hora	60 ml por hora
Tiempo de reacción	54 segundos a 105°C	54 segundos a 105°C
Temperatura columna	55°C 0,5°C	55°C 0,5°C
Tampón	pH 3,25; pH 4,25	pH 5,28
Presión bomba tampón	15 - 25 Kg/cm <sup>2</sup>	4 - 10 Kg/cm <sup>2</sup>
Presión bomba ninhidrina	1,5 - 4 Kg/cm <sup>2</sup>	1 - 3 Kg/cm <sup>2</sup>
Tiempo cambio tampón en el programador	35 10 min.	-
Regeneración	1. Tampón regenerador 30 min a 2,5 Kg/cm <sup>2</sup> 2. Tampón pH 3,25 durante 1 hora	-

Los sobrenadantes se reúnen, y son despigmentados por reiterados lavados con eter de petróleo, utilizando para ello una ampolla de separación. El eter de petróleo se lava con agua acidulada para recuperar posibles aminoácidos que hubieran quedado en él. El residuo hidroalcohólico, que contiene los aminoácidos libres, se evapora a sequedad en una estufa de vacío "Heraeus", y seguidamente se disuelve en tampón de citrato sódico de pH 2,2, quedando en condiciones de inyectarlo en las columnas, para su análisis.

Reconocimiento y determinación cuantitativa de los aminoácidos en el cromatograma.

La absorbancia de la solución problema es medida por el fotómetro y registrada en el papel, en el que los aminoácidos componentes están representados por picos de diferentes dimensiones. Así, los aminoácidos serán reconocidos por las posiciones de sus picos, y determinados cuantitativamente por la medida de sus áreas, por comparación con los picos producidos por los aminoácidos de una solución patrón.

Para la medida del área hemos seguido el método H.W (altura, anchura). El método es sencillo y dará resultados estimables, siempre que el pico tenga la distribución de una curva de Gauss y forma simétrica. Es necesario efectuar las siguientes lecturas:

H<sub>b</sub> - Línea de base

H<sub>o</sub> - Altura determinada por el punto más alto en el pico del cromatograma.

H - Altura neta. Calculada de la fórmula:

$$H = H_o - H_b$$

W - Anchura. Trazar una línea recta fina a través del pico, a la altura equivalente a  $1/2 H - H_b$ . La longitud de esta línea representa la anchura (W) del pico; su determinación puede efectuarse por conteo de los puntos que determinan el pico más alto, por encima de la línea fina.

Una vez determinada el área correspondiente a cada pico, debemos determinar el valor en  $\mu$  moles de cada área, para ello hay que relacionar el área de cada aminoácido problema con el área desarrollada por el mismo aminoácido en el cromatograma patrón.

Si ChW es el área correspondiente al aminoácido del patrón, la fórmula para el cálculo de los moles de aminoácido en la muestra problema será la siguiente:

$$\text{moles} = \frac{H \cdot W}{ChW} \cdot a$$

a- Concentración en moles del aminoácido presente en el volumen del patrón utilizado.

El cromatograma patrón debe obtenerse cada vez que se prepara reactivo de ninhidrina o tampón eluyente.

## 2.6 Determinación colorimétrica de la nicotina

Para la determinación de este alcaloide hemos escogido el método colorimétrico de Werle y Becker (1942), que se basa en la coloración amarilla que se produce cuando reacciona la nicotina y en general las sustancias con núcleos piridínicos con el bromuro de cianógeno, en presencia de aminas aromáticas (anilina). La coloración sigue la ley de Lambert-Beer, es decir, que dentro de ciertos límites, la concentración y el coeficiente de extinción son proporcionales. La máxima coloración se produce, en este caso, cuando concurren las siguientes condiciones: pH de la solución de anilina, 6,1; concentración de la solución de bromuro de cianógeno del 10% y lectura entre los siete y catorce minutos, ya que al ser el compuesto formado de poca estabilidad, la coloración, una vez que ha alcanzado el máximo de intensidad, va decreciendo hasta extinguirse.

Para operar con este método hay que obtener previamente una curva patrón, procediendo con soluciones de nicotina de concentración conocida. Cada vez que se usen reactivos nuevos es necesario hacer una nueva curva patrón. Para las lecturas hemos utilizado un espectrofotómetro.

### Reactivos.

- Solución de  $\text{ClH}$  0,05 N
- Solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 5%, saturada de  $\text{ClNa}$
- Solución de anilina al 1% en tampón fosfato a pH 6,1

- Solución de bromuro de cianógeno al 10%. Debe guardarse en nevera, en estas condiciones se conserva hasta dos meses.

#### Procedimiento.

Un volumen conocido de homogeneizado se lleva a sequedad. El residuo se pone en un matraz para destilación en corriente de vapor, junto con 15 ml de la solución de carbonato sódico saturada de cloruro sódico; con ello logramos que la destilación de la nicotina se produzca a 180° C arrastrada por el vapor de agua. Se coloca el matraz en el aparato de destilación y se introduce a la vez en un baño de parafina regulado a 180° C. El destilado se recoge en una probeta que contiene 2 ml de solución de anilina al 1% en tampón fosfato a pH 6,1. Se destila hasta llegar a un total de 9 ml, es decir, se habrán recogido 7 ml de destilado en los que se ha comprobado (Schmid-Serrano, 1948) que está contenida toda la nicotina, que puede haber en las cantidades de homogeneizado de muestra con las que se trabaja. A los 9 ml de la probeta se añade 1 ml de solución de BrCN al 10% y se procede a la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica a 460 nm. A partir de los 7 y 14 minutos siguientes a la adición de BrCN, se obtiene la lectura más alta. Este valor se traslada a la curva patrón para leer en ella el equivalente a la concentración correspondiente de nicotina.

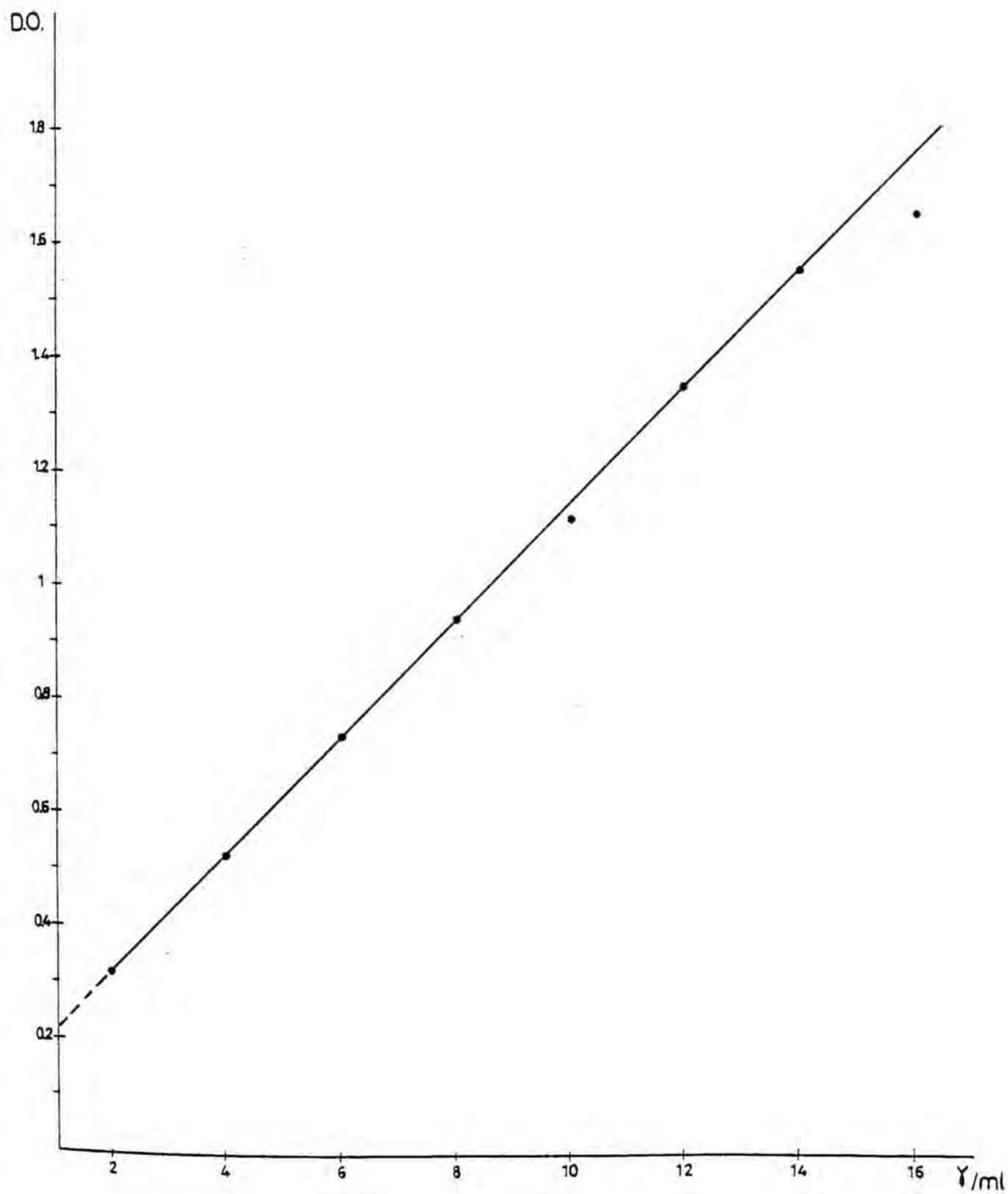
#### Obtención de la curva patrón.

Para el trazado de esta curva patrón partimos de nicotina pura de la firma Merck, pero debemos considerar

que aún la nicotina conservada herméticamente cerrada y a baja temperatura, se oxida facilmente y adquiere con ello una coloración parda que de producirse, interferiría con la reacción coloreada. Para asegurar la pureza del producto se procede a sucesivos destilados a  $240^{\circ}$  C, hasta que la nicotina resultante sea incolora. o a lo más de color ambar muy pálido y de aspecto nacarado, características del alcaloide puro. Esto se consigue normalmente después de la cuarta o quinta destilación. Como comprobación, se toman 0,2 g de nicotina de la 4ª destilación, se disuelven en 1 ml de ClH 0,05 N, y 10 ml de esta solución se diluyen hasta 1000 ml con ClH de la misma normalidad. De la nueva solución así obtenida se lee al espectrofotómetro su absorción a 259 nm . Esta operación se repite con la nicotina obtenida en la 5ª destilación, y si las dos lecturas coinciden, se considera la nicotina pura. En nuestra experiencia las dos absorciones coincidieron exactamente en 0,657.

Con la nicotina pura, se prepara una solución que contenga 1000  $\mu$ g del alcaloide por ml de ClH 0,05 N. A partir de ésta, preparamos varias soluciones cuyas concentraciones estén comprendidas entre los 20 y los 150  $\mu$ g/ml, (estas diluciones deben prepararse con agua destilada). En probetas graduadas de 10 ml que contienen 2 ml de la solución de anilina al 1% en tampón fosfato a pH 6,1, se añade 1 ml de la solución de bromuro de cianógeno al 10%. Finalmente se obtienen soluciones de concentraciones comprendidas entre 2 y 15  $\mu$ g/ml, valores entre los cuales se sabe que la reacción coloreada que se produce cumple la ley de Lambert-Beer. Las lecturas al espectrofotómetro se realizan a la longitud de onda de 460 nm. La figura 7 muestra la curva patrón obtenida.

Figura 7

CURVA-PATRON NICOTINA

### 3. RESULTADOS Y SU INTERPRETACION

#### 3.1 Consideraciones previas.

Para la interpretación de los resultados experimentales obtenidos en nuestro trabajo, sólo se han estimado como valorables aquellos que se han presentado de modo ostensible y/o constante, dada la variabilidad del material biológico ensayado, y los errores que se pueden cometer durante las operaciones de toma y preparación de las muestras, dado el reducido número de plantas muestreadas debido a su magnitud.

Las muestras se tomaron semanalmente, de plantas correspondientes al período vegetativo, comprendido desde los 28 días de la siembra hasta una semana después de la aparición de los primordios de inflorescencia en las plantas del ensayo control (con K como único elemento alcalino). Estas plantas siguieron su crecimiento normal, correspondiendo la aparición de los primordios florales con la toma de la sexta muestra. Las plantas crecidas en el medio de cultivo en el que la mitad de los iones K fué sustituida por los iones Li o Na, se desarrollaron con aparente normalidad e iniciaron los primordios florales seis días después que las plantas control. Las plantas crecidas en el medio en el que la mitad del K fué sustituido por Rb, experimentaron un notable retraso en su crecimiento, y desarrollaron malformaciones características en las hojas. Finalmente, las plantas del cultivo con Cs presentaron síntomas de grave toxicidad desde el principio, por lo que a los ocho días de iniciarse la germinación se redujo la concentración de iones Cs de un medio a un cuarto, y la cantidad de K aumentó proporcionalmente para que la concen-

tración iónica final fuera igual en todas las soluciones. Aún así, las plantas tratadas con Cs crecieron muy pobremente durante la experiencia, y presentaron necrosaciones en las hojas.

Después de dar por terminada la toma de muestras, se continuó observando el cultivo, con el fin de averiguar si las plantas crecidas en los medios con Rb o Cs, tenían capacidad para florecer y fructificar. Dos meses después de iniciada la formación de los primordios florales en las plantas control, apenas se apreciaban signos de floración en las plantas tratadas con Rb, que eran practicamente enanas y malformadas; su fructificación fué muy deficiente, pero llegaron a producir semillas maduras. Las plantas tratadas con Cs, donde la posible deficiencia de K debiera manifestarse mucho menos, dado que sólo había sido sustituido en una cuarta parte, no solo crecieron menos que las tratadas con Rb sino que no llegaron a florecer y presentaron necrosaciones en las hojas; por ello hay que admitir un efecto tóxico del Cs.

### 3.2 Valores indicadores del crecimiento de las plantas.

Como hemos indicado (pag. 77 ), el K ejerce una función importante en el crecimiento en extensión, ya que el efecto estimulante del AIA, va acompañado de un cambio K/H. El K puede influir también indirectamente sobre el crecimiento, por medio de un efecto sobre los niveles de sustancias endógenas parecidas a la giberelina, o afectando a la resistencia estomatal. Además es conocido el efecto del K sobre el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas, y en definitiva sobre el metabolismo general de la planta.

Al estudiar los efectos de la sustitución parcial del K por Li, Na, Rb o Cs, observados en nuestro trabajo, hay que considerar que pueden deberse a una deficiencia de K, a la cantidad presente de los elementos sustituyentes, o a ambas causas a la vez.

#### 3.2.1 Número de hojas y sus medidas.

(tabla 1 )

Las hojas, debido a su capacidad para la fotosíntesis y para una enorme diversidad de actividades fisiológicas, influyen de forma decisiva sobre los restantes órganos de la planta, al proporcionarles sustancias nutritivas derivadas de tales funciones, y factores de crecimiento. Además, en las hojas se acumula principalmente la

nicotina procedente de la raíz, de modo especial en la epidermis y mesófilo esponjoso de estos órganos, aspecto fisiológico que nos interesa especialmente.

Según se puede apreciar, todos los elementos monovalentes ensayados ajenos al K, en la proporción dada, han reducido la longitud y anchura de las hojas, consecuentemente el área de las hojas de las plantas tratadas con Li, Na, Rb o Cs es más reducida que en las plantas control. Pero, a pesar de la enorme reducción ocasionada en el crecimiento por los tratamientos con Rb y Cs respecto a los ensayos con Li y Na y particularmente respecto al control, el número de hojas es bastante parecido en todos los ensayos.

Los valores globales (suma de los valores parciales de todas las muestras) expresados en la tabla ( 1 ) indican que la relación existente entre las medidas longitud y anchura de las hojas en los distintos ensayos es la siguiente:

$$K > Li \geq Na \gg Rb \gg Cs$$

### 3.2.2 Crecimiento del tallo en longitud.

(tabla 2 ; gráfica 1 )

El tallo está compuesto fundamentalmente de tejidos para el sostén de la planta y la circulación de sustancias, pero además posee abundante tejido vivo, y por ello desarrolla actividades metabólicas importantes.

En todos los ensayos, los tallos crecen, de modo más o menos acusado, durante el período del ciclo vegeta-

tivo estudiado. En las plantas del ensayo control, el crecimiento del tallo en longitud siguió un ritmo ascendente desde la primera hasta la séptima muestra, particularmente en las dos últimas. Este mismo comportamiento se aprecia en los tallos de las plantas de los ensayos con Li o Na, pero sus alturas, excepto en las dos primeras muestras, son menores que las de las plantas control. Los tallos de las plantas tratadas con Rb, siguieron también un curso de crecimiento continuamente ascendente, aunque menos acusado que en los ensayos precedentes, y a su vez superiores que los de las plantas tratadas con Cs. En el ensayo con Cs, el tallo apenas creció a partir de la cuarta muestra, y siempre fué mucho menor que en las plantas de los demás ensayos.

Si se consideran los valores globales (tabla 2 ), de los ensayos con Li, Na, Rb y Cs, respecto al valor global del ensayo control, la relación que se obtiene es la siguiente:

$$K > Na \geq Li > Rb \gg Cs$$

La diferencia entre los ensayos con Na y Li es mínima. En definitiva, los elementos alcalinos ensayados, ajenos al K, han reducido el crecimiento en longitud del tallo, acusadamente en presencia del Rb, y muy acusadamente en la de Cs. Se puede reconocer que el Li y el Na ejercieron un efecto más parecido y Rb y Cs menos parecido al del K.

La longitud de la parte aérea en su conjunto está lógicamente modificada por la disposición de las hojas. Pero, en general, se observa el mismo curso indicado para el crecimiento del tallo.

### 3.2.3 Crecimiento de las raíces en longitud.

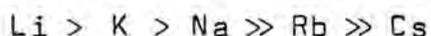
(tabla 3 ; gráfica 2)

Las plantas absorben por la raíz, el agua y las sustancias minerales, y además desarrolla importantes funciones metabólicas, así que su estudio bajo la influencia de los elementos alcalinos ensayados es fundamental para nuestro trabajo. De sumo interés para nosotros es también que la nicotina se sintetiza predominantemente en las partes más jóvenes de las raíces, así que su crecimiento y las condiciones que lo regulan son de particular importancia para la síntesis del alcaloide y su nivel en la planta entera.

También las raíces, en todos los ensayos, crecen de un modo más o menos acusado durante el período del ciclo de crecimiento estudiado. Las raíces de las plantas control siguen un curso de crecimiento ascendente, desde la primera a la séptima muestra, y parecidamente sucede en las plantas tratadas con Li, Na, Rb o Cs.

A partir de la cuarta muestra, es decir, aproximadamente en la segunda mitad del período que comprende la experiencia, las raíces de las plantas tratadas con Li son más largas que las raíces de las plantas control. Esto no puede interpretarse como debido a la menor proporción de K sino a la presencia de Li, que ha favorecido el crecimiento de las raíces. Por el contrario, la sustitución parcial de K por los demás elementos ensayados no ha estimulado, sino reducido, el crecimiento de las raíces, ya que su longitud es inferior en todas las muestras a las de las plantas control.

Si se consideran los valores globales de todos los ensayos (tabla 3 ) la relación que se puede establecer es la siguiente:



Es evidente que la sustitución parcial de K por Li, ha estimulado el crecimiento en longitud de la raíz, por proliferación o extensión celular. En este órgano, y fundamentalmente en las partes más jóvenes, se produce síntesis de sustancias de crecimiento, y pudiera ser que el Li absorbido por la raíz, afecte de alguna manera los niveles de fitohormonas en esta parte de la planta.

Tabla - 1

Número de hojas y sus medidas, expresadas en centímetros (cm).

M	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	N = 3,9 L = 1,67 A = 0,80	N = 4,6 L = 1,71 A = 0,79	N = 5,0 L = 1,78 A = 0,81	N = 5,1 L = 1,43 A = 0,75	N = 3,8 L = 0,20 A = 0,09
2ª	N = 5,1 L = 2,83 A = 1,20	N = 5,3 L = 2,82 A = 1,20	N = 5,0 L = 2,92 A = 1,20	N = 5,4 L = 2,06 A = 1,10	N = 4,3 L = 0,58 A = 0,30
3ª	N = 5,3 L = 3,67 A = 2,10	N = 5,3 L = 3,31 A = 1,80	N = 5,1 L = 4,68 A = 2,40	N = 5,7 L = 2,07 A = 1,87	N = 5,5 L = 0,60 A = 0,30
4ª	N = 5,8 L = 4,12 A = 2,60	N = 5,3 L = 3,87 A = 2,10	N = 5,7 L = 4,79 A = 2,81	N = 6,1 L = 2,11 A = 1,90	N = 5,6 L = 0,62 A = 0,30
5ª	N = 5,8 L = 5,56 A = 2,92	N = 7,0 L = 5,18 A = 2,99	N = 7,0 L = 5,95 A = 3,02	N = 6,3 L = 2,64 A = 1,93	N = 5,8 L = 0,70 A = 0,31
6ª	N = 7,0 L = 6,70 A = 4,96	N = 7,5 L = 6,92 A = 4,99	N = 7,5 L = 7,75 A = 5,10	N = 6,8 L = 5,54 A = 2,94	N = 6,0 L = 0,71 A = 0,31
7ª	N = 7,7 L = 8,42 A = 6,60	N = 7,5 L = 8,50 A = 6,89	N = 7,5 L = 9,50 A = 6,98	N = 7,0 L = 6,09 A = 3,27	N = 6,6 L = 0,81 A = 0,34
V.G.	N = 40,6 L = 32,97 A = 21,18	N = 42,5 L = 32,31 A = 20,76	N = 42,8 L = 37,14 A = 22,32	N = 42,4 L = 21,94 A = 13,76	N = 37,6 L = 4,22 A = 1,95

N - Nº de hojas, valor medio; L - Largo; A - Ancho; M - Muestras  
V.G. - Valor global; K - Control, solo con K.

Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de iones K por iones Li, Na  
y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de iones K por iones Cs

Tabla 2

Crecimiento en longitud del tallo de una planta, expresado en cm.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	3.50	3.60	2.86	2.85	0.62
2ª	4.14	4.64	3.93	3.27	0.76
3ª	4.40	5.05	5.11	3.40	1.04
4ª	4.72	5.81	5.86	4.72	1.30
5ª	6.54	6.94	8.92	5.38	1.32
6ª	14.87	14.87	17.37	8.45	1.33
7ª	22.25	20.66	23.70	11.21	1.33
V. G.	60.42	61.57	67.75	39.28	7.70

V. G. - Valor global

K - Control, con solo K

Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li, Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs.

Gráfica 1 - Crecimiento en longitud de los tallos, expresado en centímetros.

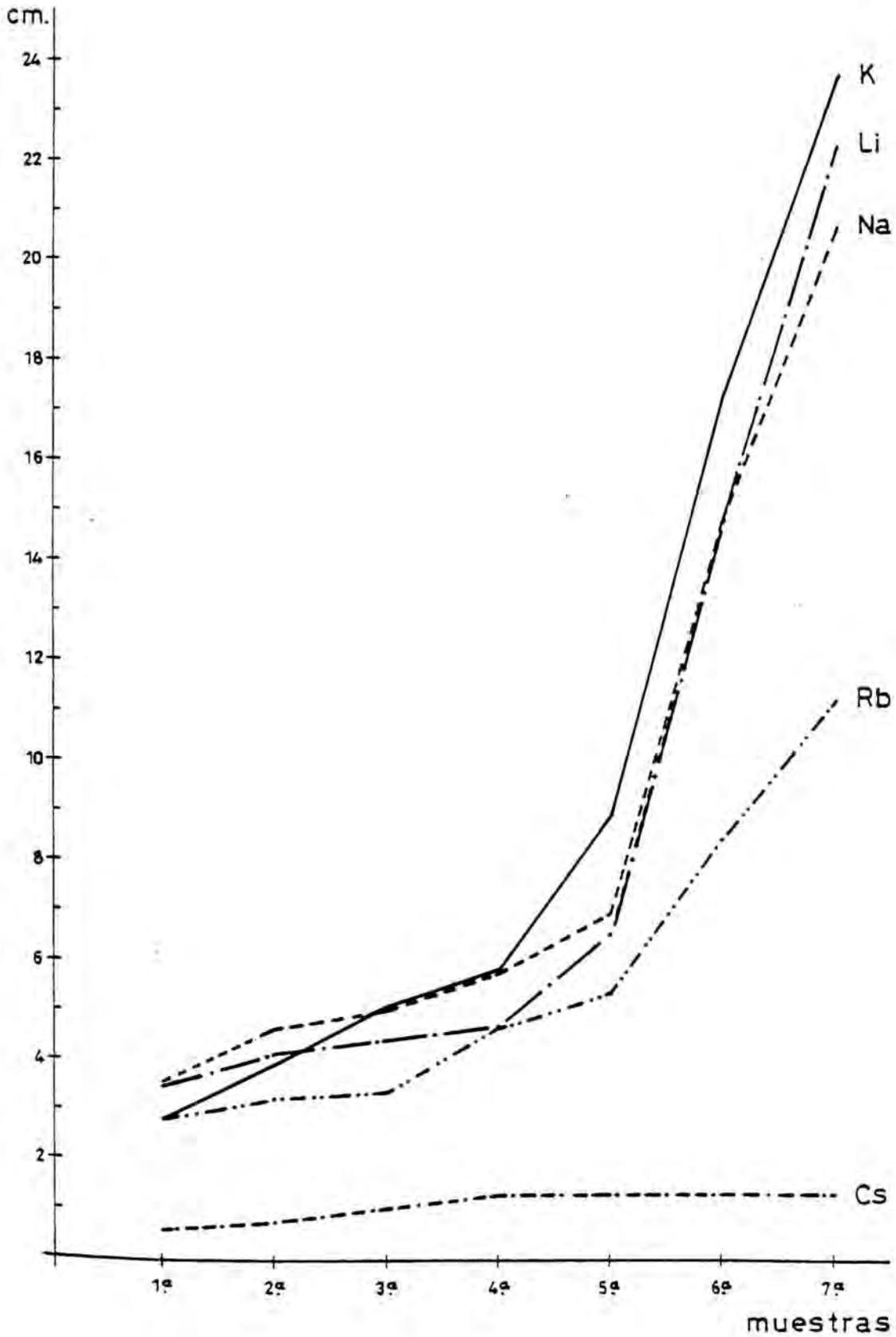


Tabla 3

Crecimiento en longitud de la raíz de una planta, expresado en cm.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	3.56	3.57	3.67	3.35	1.32
2ª	5.23	4.10	4.80	3.47	1.36
3ª	6.21	4.74	6.36	3.58	2.36
4ª	7.19	6.22	6.49	4.01	2.62
5ª	8.35	7.44	7.06	5.31	2.65
6ª	12.25	8.80	10.51	5.34	2.73
7ª	13.05	9.41	11.50	6.01	2.90
V. G.	55.84	44.28	50.39	31.07	15.94

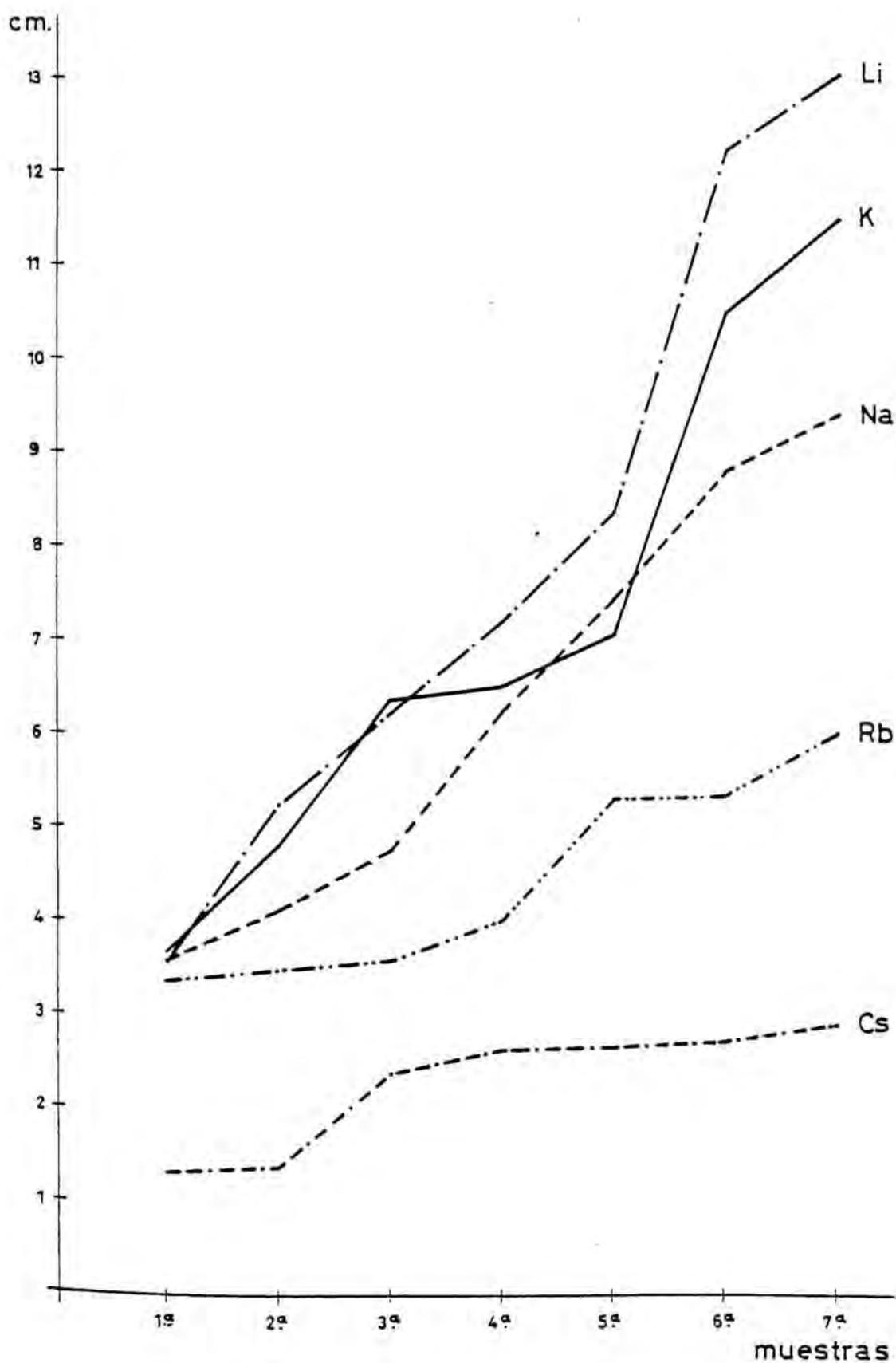
V. G. - Valor global

K - Control, con solo K

Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li, Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de iones K por iones Cs

Gráfica 2 - Crecimiento en longitud de las raíces, expresado en centímetros.



### 3.3 Peso de hoja, tallo y raíz.

Una de las principales funciones del K en la planta es mantener el equilibrio iónico del protoplasma, y consecuentemente su equilibrio hídrico. El K es el único elemento alcalino monovalente que tiene las propiedades fisico-químicas adecuadas que le permiten hidratar y descargar las proteínas del modo más favorable para su actividad en el medio celular. La sustitución parcial del K , Na , Rb o Cs , efectuada en nuestro trabajo, puede afectar a los equilibrios anteriormente indicados, ya que la capacidad de los iones sustituyentes para hidratar y descargar las proteínas es diferente que para el K . Los radios iónicos del Li y Na son menores y los del Rb y Cs mayores que el del K , por lo que los primeros hidratan más y descargan menos y los segundos hidratan menos y descargan más que el K .

#### 3.3.1 Peso fresco y peso seco de las hojas.

(tablas 4, 5, 6; gráficas 3, 4, 5)

El peso fresco de las hojas (tabla 4) aumenta en todos los ensayos, de manera más o menos acusada, a lo largo del período de crecimiento estudiado. El peso fresco de las hojas de las plantas control es, en general, más alto que en las hojas de los ensayos con Li, Na, Rb o Cs; le siguen las de los ensayos con Li y Na y muy distanciadas las correspondientes a los ensayos con Rb y Cs.

Los pesos secos de las hojas, siguen el mismo curso que los frescos a lo largo de la experiencia (tabla 5) Así, la sustitución parcial del K por los otros elementos alcalinos han reducido el crecimiento, referido a peso seco y a peso fresco, de las hojas.

La relación de los pesos fresco y seco de las hojas en los distintos ensayos es la siguiente:

Peso fresco:      K > Li > Na >> Rb >> Cs  
 Peso seco         K > Li > Na >> Rb >> Cs

Por ello, se puede deducir que los elementos más hidratantes y menos descargantes (Li y Na) ejercen un efecto más parecido al del K, y diferente los menos hidratantes y más descargantes (Rb y Cs).

El porcentaje de peso seco referido a peso fresco de hoja se ajusta a la predicción teórica en el ensayo con Cs pero no en los otros ensayos, según se deduce de la relación entre los valores.

Valor teórico:    Cs > Rb > K > Na > Li  
 Valor hallado:    Cs > Li > K > Na = Rb

### 3.3.2 Peso fresco y peso seco del tallo. (tablas 4,5,6 ; gráficas 3,4,5)

A lo largo del período de crecimiento estudiado, los pesos frescos de los tallos de las plantas control y de las tratadas con Li, Na, Rb y Cs, siguen lógicamente un curso ascendente.

Los pesos secos siguen también un curso ascendente,

aunque muy poco acusado en el ensayo con Cs. Los pesos frescos y secos globales de los diferentes ensayos se encuentran en la relación siguiente:

Peso fresco:       K > Li > Na >> Rb >> Cs

Peso seco:         K > Li > Na >> Rb >> Cs

Es evidente que en los tallos la sustitución parcial del K por los otros elementos alcalinos ha reducido también el crecimiento (menor peso) de este órgano.

Si se comparan los valores de porcentaje de peso seco referido al peso fresco de tallo se observa la siguiente relación:

$$\text{Rb} > \text{K} > \text{Cs} > \text{Li} > \text{Na}$$

Esta relación tampoco se ajusta a la predicción teórica.

### 3.3.3 Peso fresco y peso seco de las raíces.

(tablas 4,5,6; gráficas 3,4,5)

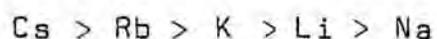
Los pesos frescos de las raíces, al igual que para hojas y tallos, siguen un curso ascendente en todos los ensayos, durante el período de duración de la experiencia. Las raíces de las plantas tratadas con Li, Na, Rb o Cs, tienen un peso fresco inferior que el de las plantas control en todas sus muestras.

La relación entre los pesos frescos y secos de la raíz en los diferentes ensayos es la siguiente:

Peso fresco:       K > Li > Na >> Rb >> Cs

Peso seco:         K > Li > Na >> Rb >> Cs

Finalmente, los porcentajes de peso fresco referidos a peso fresco de raíz (tabla 6 ), es la siguiente:



Excepto la situación del Li o del Na, la relación corresponde a la teórica.

Peso fresco expresado en gramos (g).

M	Organos	E N S A Y O S				
		Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	Hojas	0,1433	0,1869	0,2333	0,1038	0,0103
	Tallos	0,0343	0,0437	0,0486	0,0348	0,0008
	Raices	0,0136	0,0158	0,0155	0,0057	0,0004
	Planta	0,3688	0,2464	0,2974	0,1443	0,0115
2ª	Hojas	0,7236	0,4357	0,6445	0,2369	0,0202
	Tallos	0,1578	0,0891	0,1354	0,0698	0,0029
	Raices	0,0893	0,0526	0,0656	0,0065	0,0010
	Planta	0,3904	0,3286	0,4343	0,1801	0,0142
3ª	Hojas	1,4112	1,3232	2,1266	0,3231	0,0305
	Tallos	0,2960	0,2795	0,5159	0,0736	0,0060
	Raices	0,1202	0,1692	0,3222	0,0080	0,0043
	Planta	1,8274	1,7719	2,9647	0,4047	0,0408
4ª	Hojas	1,9206	1,8174	2,8301	0,3379	0,0411
	Tallos	0,5136	0,4250	0,7375	0,0774	0,0084
	Raices	0,2273	0,4100	0,5125	0,0199	0,0048
	Planta	2,6642	2,6524	4,0801	0,4352	0,0543
5ª	Hojas	4,3550	3,0819	4,1721	0,6883	0,0411
	Tallos	0,7825	0,9435	1,2625	0,1424	0,0098
	Raices	0,4836	0,9436	0,7504	0,0578	0,0052
	Planta	5,6211	4,9690	6,1850	0,8885	0,0561
6ª	Hojas	11,2927	7,2693	10,2213	1,7527	0,0422
	Tallos	3,0040	2,2338	3,8678	0,3984	0,0098
	Raices	3,0486	2,0515	4,5606	0,2217	0,0056
	Planta	17,3453	11,5546	18,6497	5,3728	0,0576
7ª	Hojas	17,7950	17,5126	20,4195	3,7401	0,0431
	Tallos	6,5724	7,1070	6,9822	0,8939	0,0140
	Raices	6,1118	4,3360	4,8434	0,3253	0,0075
	Planta	30,4792	28,9556	32,2451	4,9593	0,0646
V.G.	Hojas	37,6459	31,6270	40,6474	7,1828	0,2285
	Tallos	11,3633	11,1216	13,5499	1,6903	0,0517
	Raices	10,0944	7,9787	11,0702	0,6449	0,0288
	Planta	59,1036	50,7273	65,2675	9,5180	0,3090

M - Muestras; V.G. - Valor global; K - Control, solo con K  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li, Na  
 y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de iones K por iones Cs.

Peso seco expresado en gramos (g).

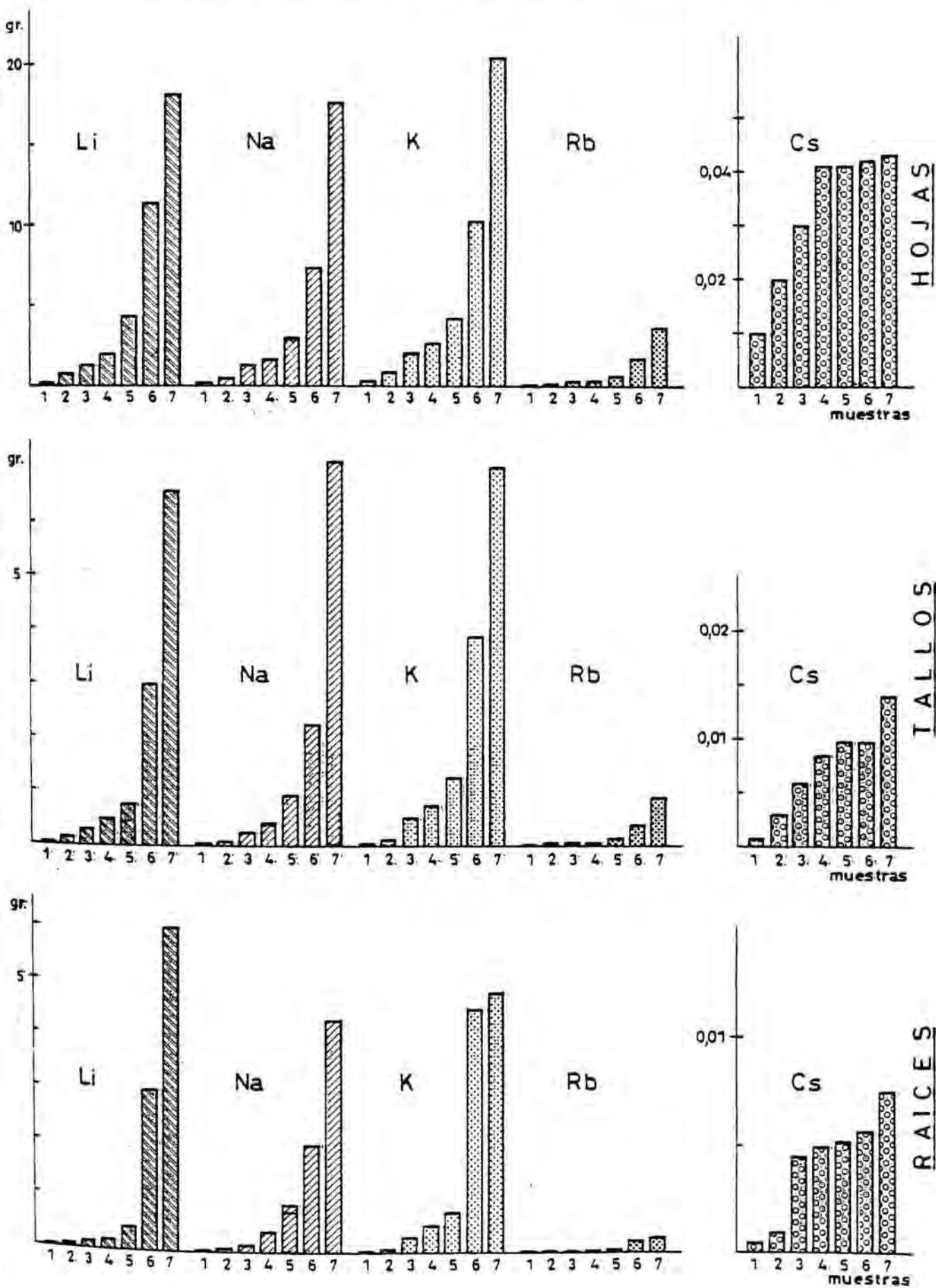
M	Organos	E N S A Y O S				
		Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	Hojas	0,0071	0,0096	0,0101	0,0075	0,0011
	Tallos	0,0015	0,0013	0,0019	0,0015	0,0001
	Raices	0,0010	0,0014	0,0014	0,0006	0,0002
	Planta	0,0096	0,0123	0,0096	0,0096	0,0014
2ª	Hojas	0,0371	0,0235	0,0333	0,0106	0,0019
	Tallos	0,0064	0,0049	0,0067	0,0013	0,0002
	Raices	0,0049	0,0036	0,0051	0,0007	0,0002
	Planta	0,0484	0,0320	0,0451	0,0144	0,0023
3ª	Hojas	0,0568	0,0531	0,1000	0,0124	0,0021
	Tallos	0,0125	0,0088	0,0156	0,0037	0,0004
	Raices	0,0077	0,0093	0,0168	0,0009	0,0002
	Planta	0,0770	0,0712	0,1324	0,0164	0,0027
4ª	Hojas	0,0937	0,0931	0,1472	0,0160	0,0028
	Tallos	0,0254	0,0216	0,0458	0,0046	0,0004
	Raices	0,0126	0,0237	0,0293	0,0012	0,0003
	Planta	0,1317	0,1384	0,2223	0,0218	0,0035
5ª	Hojas	0,2386	0,1900	0,2159	0,0260	0,0030
	Tallos	0,0632	0,0490	0,0727	0,0071	0,0004
	Raices	0,0451	0,0338	0,0405	0,0028	0,0003
	Planta	0,3469	0,2845	0,3291	0,0359	0,0037
6ª	Hojas	0,7243	0,4428	0,7240	0,0888	0,0033
	Tallos	0,1425	0,1237	0,2600	0,0250	0,0005
	Raices	0,1500	0,0857	0,1950	0,0125	0,0003
	Planta	1,0168	0,6522	1,1790	0,1273	0,0041
7ª	Hojas	1,1400	0,6800	1,1550	0,1766	0,0050
	Tallos	0,2843	0,2216	0,3687	0,0533	0,0008
	Raices	0,2675	0,1542	0,2562	0,0250	0,0006
	Planta	1,6918	1,0558	1,7799	0,2549	0,0064
V.G.	Hojas	2,2976	1,4921	2,3855	0,3379	0,0192
	Tallos	0,5358	0,4309	0,7714	0,0977	0,0028
	Raices	0,4888	0,3234	0,5443	0,0437	0,0021
	Planta	3,3220	2,2464	3,7012	0,4793	0,0241

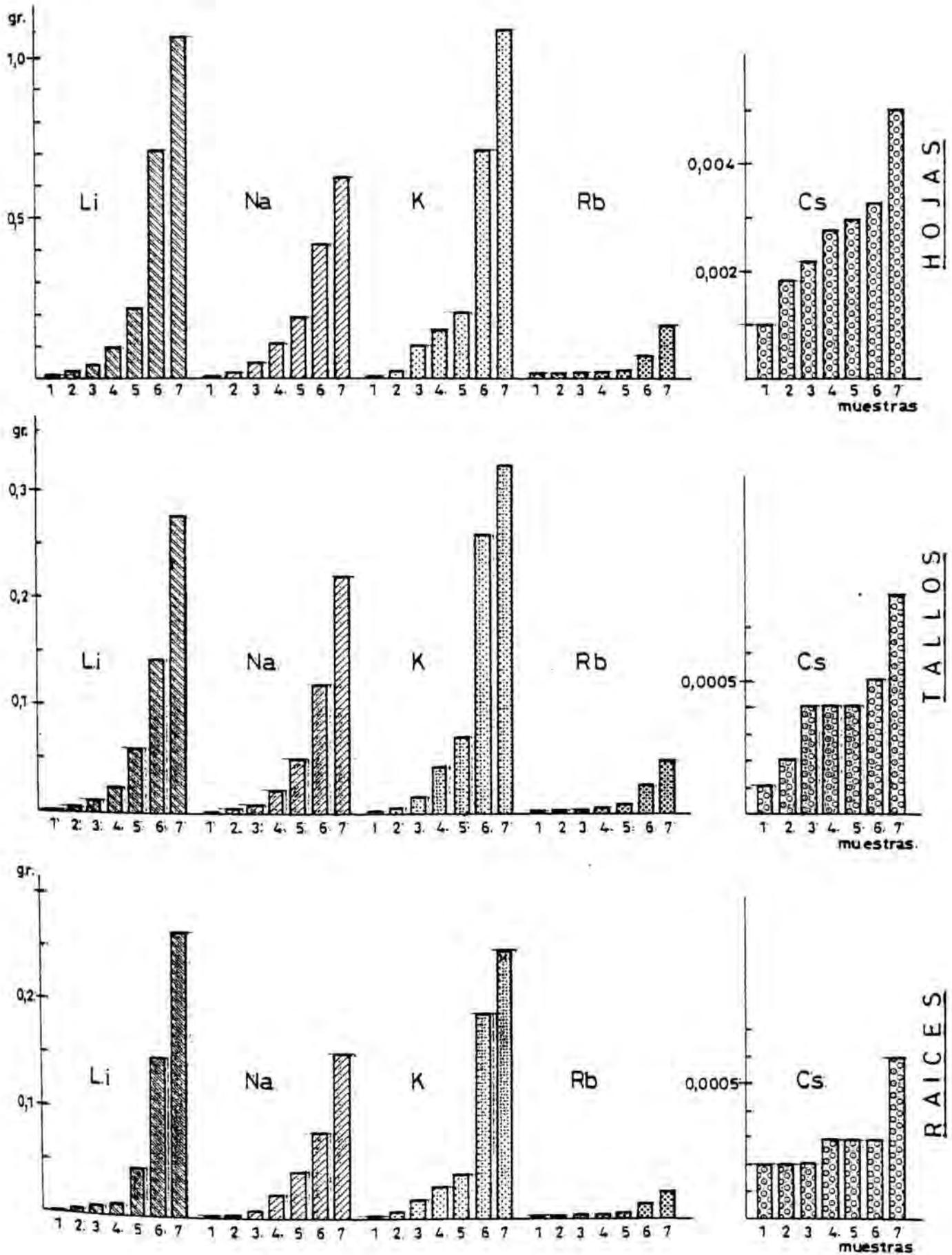
M - Muestras; V.G. - Valor global; K - Control, con solo K  
 Li, Na, Rb - Ensayos en los que se ha sustituido la mitad de los iones  
 K por iones Li, Na y Rb respectivamente.  
 Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de iones K por iones Cs.

Porcentaje de peso seco referido a peso fresco.

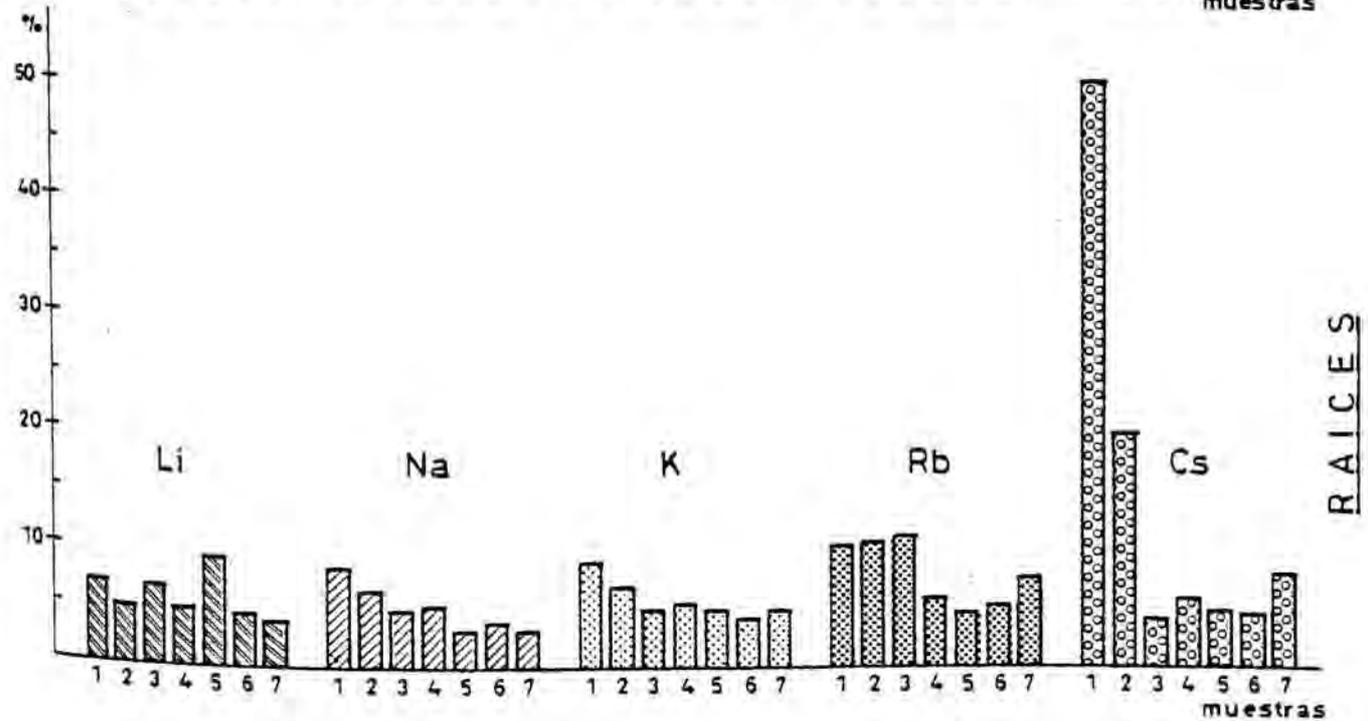
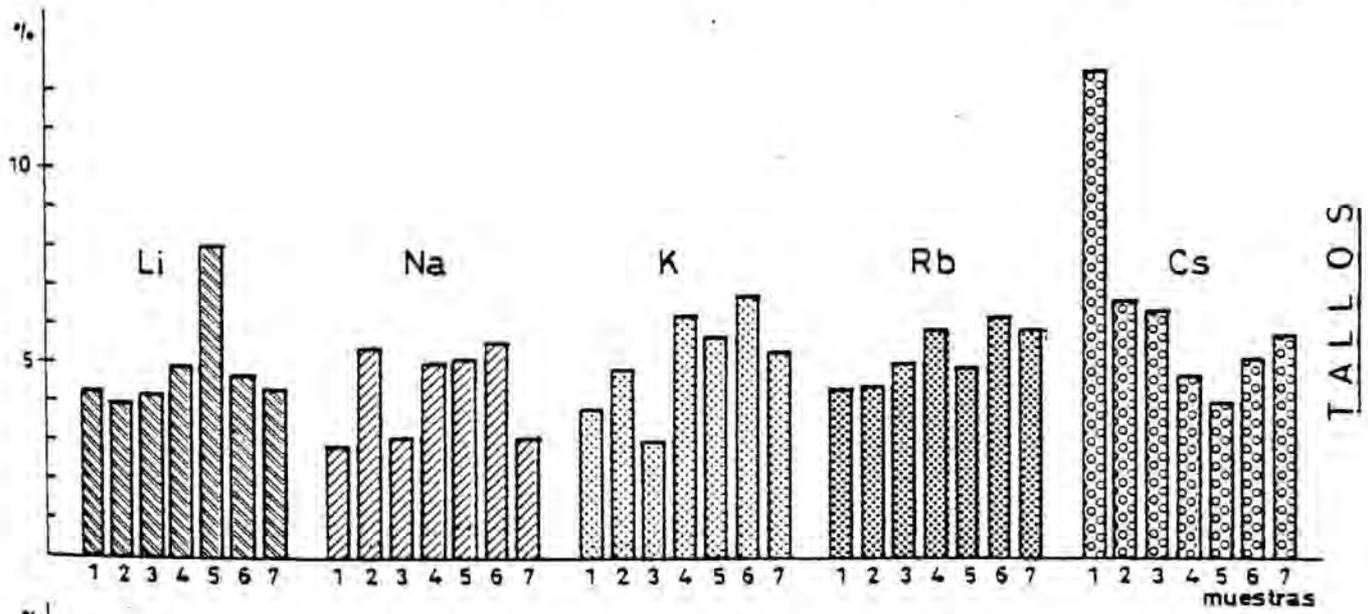
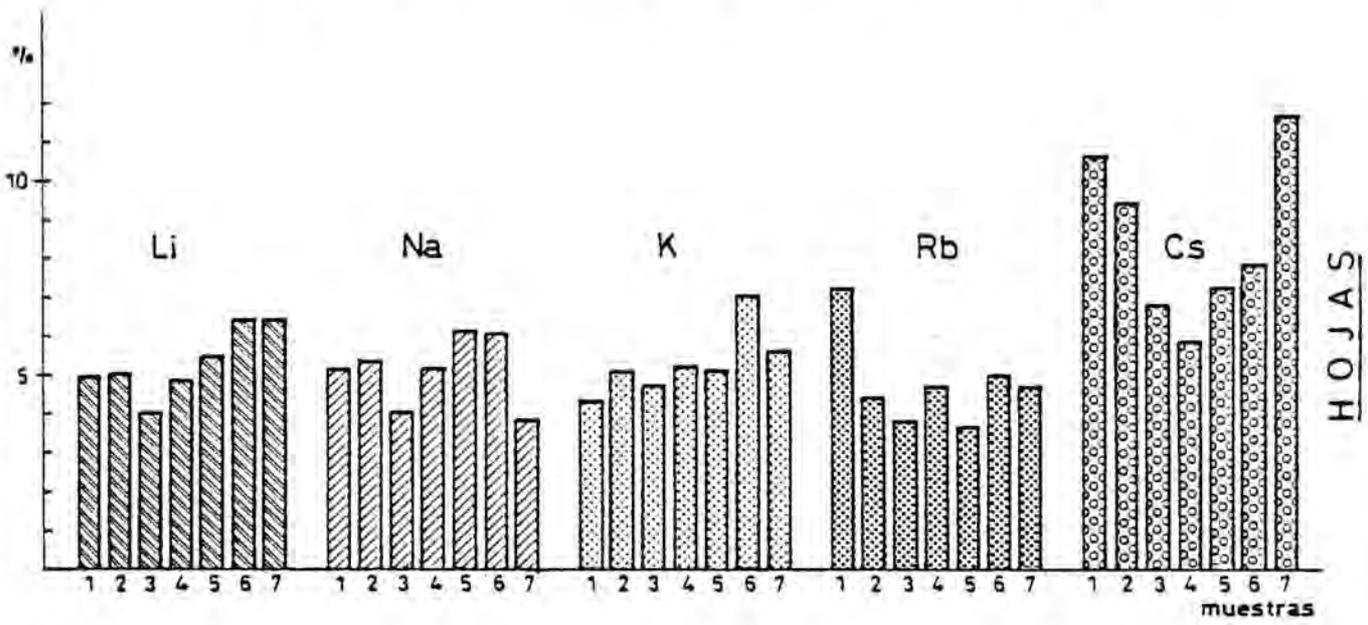
M	Organos	E N S A Y O S				
		Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	Hojas	4,9546	5,1364	4,3291	7,2254	10,6796
	Tallos	4,3731	2,9748	3,9094	4,3103	12,5000
	Raices	7,3529	8,8607	9,0322	10,5263	50,0000
	Planta	16,6806	16,9719	17,2707	22,0620	73,1796
2ª	Hojas	5,1271	5,3936	5,1667	4,4744	9,4059
	Tallos	4,0557	5,4994	4,9483	4,4412	6,8965
	Raices	5,4871	6,8441	7,7743	10,7692	20,0000
	Planta	14,6699	17,7371	17,8893	19,6848	36,3024
3ª	Hojas	4,0294	4,0129	4,7023	3,8378	6,8852
	Tallos	4,2229	3,1484	3,0238	5,0271	6,6666
	Raices	6,4059	5,4964	5,2141	11,2500	4,6511
	Planta	14,6537	12,6577	12,9402	20,1149	18,2029
4ª	Hojas	4,8786	5,1227	5,2012	4,7351	5,8126
	Tallos	4,9196	5,0823	6,2101	5,9431	4,7619
	Raices	5,5433	5,7804	5,7170	6,0301	6,2500
	Planta	15,3415	15,9854	17,1283	16,7083	17,8245
5ª	Hojas	5,4787	6,1650	5,1748	3,7774	7,2992
	Tallos	8,0766	5,1934	5,7584	4,9859	4,0816
	Raices	9,3258	3,5820	5,3971	4,8442	5,7692
	Planta	22,8811	14,9404	16,3303	13,6075	17,1500
6ª	Hojas	6,4113	6,0913	7,0832	5,0664	7,8199
	Tallos	4,7436	5,5376	6,7221	6,2751	5,1020
	Raices	4,9202	4,1774	4,2757	5,6382	5,3571
	Planta	16,0751	15,8063	18,0810	16,9797	18,2790
7ª	Hojas	6,4062	3,8829	6,6563	4,7217	11,6009
	Tallos	4,3256	3,1180	5,2805	5,9626	5,7142
	Raices	4,3767	3,5562	5,2896	7,5862	8,0000
	Planta	15,1085	10,5571	16,2264	18,3685	23,3151
P.M.	Hojas	6,1031	4,7178	5,8687	4,7042	8,4026
	Tallos	4,7151	3,8744	5,6930	5,7800	5,4158
	Raices	4,8422	4,0532	4,9168	6,7762	7,2916
	Planta	15,6604	12,6454	16,4785	17,2604	21,1100

M - Muestras ; P.M. - Porcentaje medio ; K - Control, sólo K  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K, por iones Li, Na  
 y Rb respectivamente.  
 Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs.





Gráfica 5 - Porcentaje de peso seco referido a peso fresco.



### 3.4 Proteínas.

La síntesis proteica es un proceso que requiere por sí mismo altas cantidades de K, independientemente de la vinculación de éste último con las relaciones energéticas de la planta, según hemos indicado antes (pag 75 ) Por ello, es lógico que las proteínas sean muy sensibles a las variaciones de K. En los tejidos vegetales, una deficiencia severa de K tiene como consecuencia la disminución de la síntesis proteica y la acumulación de aminoácidos proteicos en estado libre (Webster, 1956), mientras que una ligera deficiencia aumenta el contenido de proteína (Hsiao y colab, 1970). En nuestro trabajo, a la deficiencia de K, se suma la presencia, en cada ensayo, de uno de los otros elementos monovalentes alcalinos, que pueden influir también, sobre los niveles de proteína en los distintos órganos de la planta (véase la Introducción).

#### Proteínas en hojas

(tablas 7, 8 ; gráficas 6,7,12)

La proteína aumenta en las hojas de todos los ensayos durante el período de duración de la experiencia. Los valores de proteína referidos a las hojas de una planta control y a las hojas de las plantas tratadas con Li, Na o Rb, experimentan, de la primera a la cuarta muestra, un progresivo pero suave aumento, y a partir de este momento un acusado aumento hasta el final de la experiencia, especialmente en las hojas de las plantas control y

en aquellas de las tratadas con Li o Na. Por el contrario, en las plantas tratadas con Cs los niveles de proteína en las hojas, siguen a partir de la cuarta muestra un ligero descenso poco significativo, y después incrementan en la última.

Los valores de proteína referidos a las hojas de una planta control son, en todas las muestras, parecidos a las de las plantas tratadas con Li, y éstos a su vez bastante superiores a los de las plantas que recibieron Na; los valores más bajos corresponden a las hojas de las plantas tratadas con Rb o Cs, particularmente las últimas. Los valores globales (corresponden a la suma de los valores parciales de todas las muestras) se presentan en la siguiente relación:

$$\text{control} \geq \text{Li} > \text{Na} \gg \text{Rb} \gg \text{Cs}$$

En las hojas de plantas en que la mitad del K había sido sustituido por Li, el área era más reducida y su peso seco también algo inferior. Se puede suponer que en las condiciones experimentales de nuestro trabajo, la presencia de Li ha estimulado ligeramente la síntesis de proteína en las hojas, o quizá ha quedado inalterada y solo se han producido pequeños efectos de crecimiento. Se recuerda que en las plantas con Li se ha retrasado la floración aproximadamente una semana, lo que lógicamente tiene que haber influido algo sobre las relaciones de crecimiento y proteínas. En todo caso, el Li ha influido poco sobre los valores absolutos de proteína. Como veremos seguidamente, las relaciones crecimiento : proteína, bajo el efecto del Li y/o la deficiencia de K se aprecian mejor en los porcentajes.

Los valores de proteína expresados en porcentaje de peso seco de hoja, indican en los ensayos control y en los que recibieron Li o Na un curso inicial descendente. Este hecho es normal, puesto que durante el ciclo vegetativo de la planta, se acumulan distintas estructuras inertes que ocasionan aumento del peso seco, y como consecuencia la disminución del porcentaje de materia viva. Aunque con algunas irregularidades, el curso es parecido en los ensayos con solo K y los ensayos con Li, Na y Rb, mientras que en el ensayo con Cs el curso es en gran parte inverso, o más bien irregular, sobre todo en las muestras terminales. En todo caso, el porcentaje de proteína en un tejido no depende solo de su biosíntesis sino también de la de otras estructuras inertes, por lo que el curso de los valores expresados en porcentaje de proteína no tiene porque ser rigurosamente regular.

En el caso del ensayo con Cs, en el que las plantas han quedado extremadamente raquíticas, y el valor absoluto de proteína es sumamente bajo, el porcentaje es parecido al de las plantas control, lo que indica que la reducción del crecimiento ha ocasionado una disminución equivalente de la biosíntesis de proteína.

La relación entre los porcentajes medios de proteína es la siguiente:

$$\text{Na} > \text{Li} \geq \text{control} \geq \text{Cs} > \text{Rb}$$

parece confirmar que en las hojas de las plantas tratadas con Li se ha producido un moderado estímulo de la síntesis proteica. En las plantas del experimento con Na las hojas han crecido menos que su capacidad para biosintetizar proteína, lo que se ha traducido en un porcentaje de

proteína más alto que en el experimento control. El Na sustituyendo parcialmente al K no ha ejercido ningún efecto aparentemente tóxico sino solo una reducción o retardo del crecimiento, con formación de menos estructuras inertes, lo que se ha traducido en un porcentaje de proteína más alto.

Los valores más notables son el alto porcentaje de proteína en el ensayo con Na y el bajo porcentaje en el ensayo con Rb, explicable el primero a causa de su menor peso, mientras que para el segundo hay que pensar en un efecto inhibitor específico del Rb. El Cs ha reducido fuertemente el crecimiento y de modo parecido la síntesis de proteína, por lo que los porcentajes en el experimento con Cs y en el experimento control, son parecidos.

Proteínas en el tallo.

(tablas 9, 10 ; gráficas 8, 9, 12)

Igual que sucede en las hojas, los valores de proteína referidos al tallo de una planta, aumentan a lo largo del período del ciclo vegetativo estudiado, en todos los ensayos . Si consideramos los valores absolutos globales de los ensayos con Li, Na, Rb o Cs, respecto al del ensayo control, la relación que se obtiene es la siguiente:

$$\text{control} > \text{Na} > \text{Li} \gg \text{Rb} \gg \text{Cs}$$

Así, los valores de proteína referidos al tallo de una planta control, son, en conjunto, mucho mayores que en los tallos de las plantas tratadas con Li, Na, Rb o Cs, y este hecho se refleja claramente en los valores globales.

En el tallo, el valor absoluto de proteína en el ensayo control, es notablemente mayor que en los ensayos con Na y Li, mientras que en las hojas los tres valores son más parecidos.

Los valores de proteína expresados en porcentaje de peso seco de tallo, correspondientes a las plantas tratadas con Li o Na y a las plantas control, siguen un curso descendente a lo largo de la experiencia, debido a la formación de estructuras inertes necesarias para el desarrollo estructural de las plantas. Por el contrario, el curso de los indicados valores en los tallos de las plantas tratadas con Rb o Cs es oscilante, con cierta tendencia ascendente. Una explicación para este hecho es el retraso en el crecimiento que experimentan las plantas expuestas a estos tratamientos.

La relación entre los porcentajes medios es la siguiente:

$$\text{Rb} > \text{Na} \geq \text{control} > \text{Li} \gg \text{Cs}$$

Los valores absolutos de los tallos de las plantas control, son los mayores, y después siguen los de los ensayos correspondientes a Na y Li, que a su vez son mayores que los que recibieron Rb y Cs, con las diferencias que se pueden apreciar en la tabla. Los valores son sumamente bajos en el ensayo con Cs. Los valores expresados en porcentaje de peso seco se prestan a diferente interpretación; los más altos en el experimento con Na respecto al experimento control pueden deberse a su menor crecimiento, mientras que en el ensayo con Li, que también ha crecido menos, el porcentaje es más bajo, lo que indica un claro efecto negativo del Li, es decir, lo contra-

rio de lo que sucedía en las hojas. En el par Rb y Cs hay que matizar dos efectos: uno el del Rb, que ha ocasionado una reducción del crecimiento mayor que de la biosíntesis proteica, lo que se ha traducido en un porcentaje de proteína relativamente alto, y otro el del Cs en el que a pesar del menor crecimiento todavía es menor el porcentaje, lo que indica un claro efecto negativo de este elemento sobre la síntesis proteica. La situación de los tejidos en la planta puede haber contribuido a estas diferencias.

#### Proteínas en la raíz

(tablas 11, 12; gráficas 10, 11, 12)

Los valores de proteína en las raíces de una planta, siguen un curso ascendente en todos los ensayos, durante el período de crecimiento estudiado. En general, los valores referidos a las raíces de una planta control, son mayores que en las raíces de las plantas correspondientes a los otros ensayos. Este hecho se refleja de una manera especial en los valores globales, que se pueden ordenar como sigue:

control > Li > Na >> Rb >> Cs

Estos resultados son simplemente un reflejo del efecto producido sobre el crecimiento (peso seco) de los elementos Li, Na, Rb o Cs, ya que la relación indicada, es análoga a la obtenida para los valores globales de peso fresco y seco correspondientes (pag 129)

Los valores de proteína expresados en porcentaje de peso seco de raíz, muestran fluctuaciones, pero, en defi-

nitiva, su curso es descendente respecto a los de la primera muestra, como consecuencia del crecimiento de estos órganos y del desarrollo de estructuras inertes. Como en las hojas, se produce una disminución seguida de aumento en las muestras más próximas al desarrollo del brote floral. Los porcentajes medios para los ensayos con Li, Na, Rb o Cs, en relación a los mismos valores para el ensayo control se observa la siguiente relación:

$$\text{Na} \geq \text{Cs} > \text{control} \geq \text{Li} = \text{Rb}$$

El mayor porcentaje medio de proteína en las raíces crecidas en los medios con Na o Cs respecto a las crecidas en el medio control, se podría explicar por el menor crecimiento (peso seco) que experimentan aquellas raíces. Pero mientras el Cs ha ejercido un efecto nocivo, el Na solo ha ocasionado una reducción del crecimiento, respecto al experimento control. En ambos casos, la reducción del crecimiento ha sido mayor que la biosíntesis proteica, lo que se ha traducido en un mayor porcentaje de proteína. En las raíces de las plantas tratadas con Li o Rb, se demuestra la necesidad de una concentración adecuada de K para una proteosíntesis normal, que aquellos elementos no han podido suplir.

Aún teniendo en cuenta los efectos de crecimiento, la falta y/o la presencia, en las cantidades dadas, de Li Rb o Cs ha influido de modo negativo sobre los niveles de proteína en la raíz. Los valores del ensayo con Na no indican efecto negativo directo, sino un efecto de crecimiento.

En resumen, se han apreciado diferencias en la capacidad para la síntesis de proteína en los órganos de la

planta, en relación con el crecimiento, según el efecto de los elementos ensayados. Aunque los valores absolutos de proteína se ajusta relativamente a los del crecimiento, en los porcentajes se aprecian diferencias debidas sobre todo a las diferencias en el crecimiento respecto al experimento control.

#### Consideraciones finales

Los valores absolutos (referidos a órgano) de proteína en hojas y raíces se presentan en la misma relación, que a su vez es la misma que para los pesos seco. En los tallos difiere algo, ya que los valores de los experimentos con Li y Na cambian de situación, aunque la diferencia entre ambos valores es muy pequeña. Más destacable es la gran diferencia entre el experimento control y el experimento con Na.

En los valores expresados en porcentaje de peso seco de órgano participan no solo la proteína biosintetizada sino también la formación de otros componentes de la materia viva y de reserva y de las estructuras inertes producidas, lo que puede modificar la proporción de proteína, y como consecuencia su porcentaje, en los órganos de la planta.

Así hay que distinguir entre la capacidad total de la planta (o de sus órganos) para producir proteína; pero a la proporción (porcentaje) de proteína en los órganos de la planta contribuye además la formación de otros componentes de la materia viva y de estructuras inertes. El crecimiento resultante de la acción de los elementos ensayados, influirá lógicamente sobre el valor de los por-

centajes de proteína.

Tabla - 7

PROTEINAS. Referidas a las hojas de una planta, expresadas en mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	1.349	1.997	1.631	0.665	0.177
2ª	4.475	2.908	4.825	0.939	0.268
3ª	9.143	7.011	16.927	1.035	0.404
4ª	19.253	13.982	23.492	1.743	0.486
5ª	38.629	31.422	32.711	3.771	0.309
6ª	85.837	56.156	85.215	7.130	0.443
7ª	183.756	127.840	183.206	22.774	0.685
V.G.	342.442	241.316	348.007	38.047	2.772

Tabla - 8

PROTEINAS. Referidas a las hojas de una planta, expresadas en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	19.000	20.802	16.148	8.733	16.118
2ª	12.061	12.374	14.489	8.858	14.105
3ª	9.143	13.203	16.297	8.346	19.238
4ª	13.079	15.018	15.959	10.893	17.357
5ª	16.189	16.538	15.151	14.504	10.300
6ª	11.851	12.682	11.770	8.030	13.424
7ª	16.119	18.800	15.862	12.896	13.700
P.M.	14.904	16.173	14.588	11.260	14.437

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 9

PROTEINAS. Referidas a los tallos de una planta, expresadas en mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.086	0.133	0.104	0.040	ind.
2ª	0.247	0.211	0.279	0.064	0.002
3ª	0.188	0.402	0.762	0.080	0.004
4ª	0.684	0.825	1.385	0.109	0.007
5ª	1.606	1.811	1.650	0.131	0.002
6ª	1.918	3.402	6.783	0.770	0.007
7ª	6.033	5.509	10.788	1.944	0.008
V.G.	10.762	12.293	21.751	3.138	0.031

Tabla - 10

PROTEINAS. Referidas a los tallos de una planta, expresadas en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	5.733	10.230	5.473	2.666	0.400
2ª	3.859	4.306	4.164	4.923	1.050
3ª	1.504	4.568	4.884	2.162	1.050
4ª	2.693	3.819	3.024	2.369	1.900
5ª	2.541	3.696	2.270	1.845	0.375
6ª	1.346	2.750	2.609	3.080	1.400
7ª	2.122	2.486	2.926	3.647	1.000
P.M.	2.008	2.852	2.819	3.211	1.100

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 11

PROTEINAS. Referidas a las raices de una planta, expresadas en mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.187	0.269	0.260	0.069	0.042
2ª	0.571	0.214	0.441	0.070	0.030
3ª	0.592	0.393	1.063	0.087	0.021
4ª	0.631	1.190	1.216	0.103	0.022
5ª	2.997	4.403	4.176	0.205	0.022
6ª	6.975	7.392	10.214	0.993	0.029
7ª	29.919	23.709	31.513	2.206	0.072
V.G.	41.872	37.570	48.863	3.733	0.238

Tabla - 12

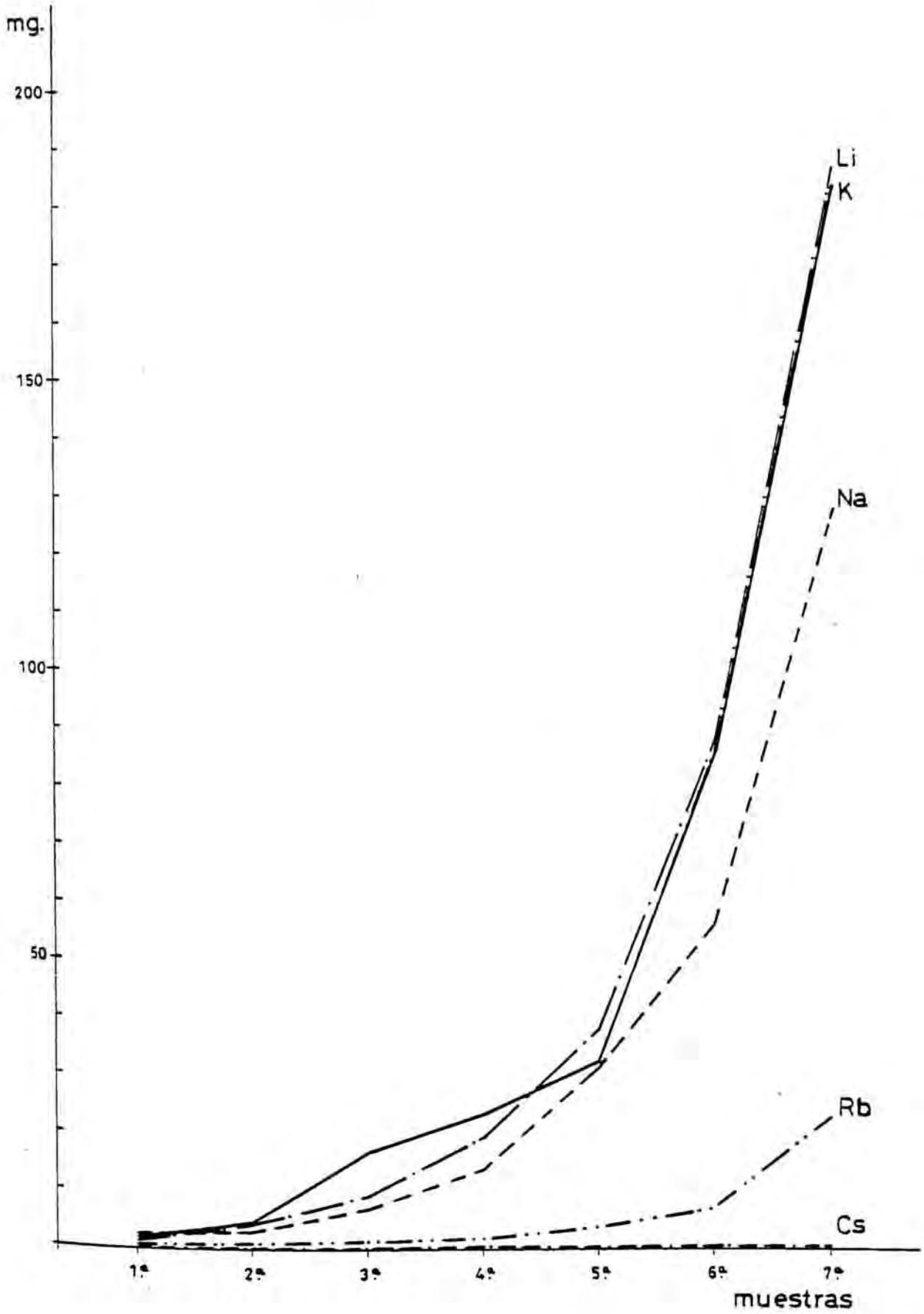
PROTEINAS. Referidas a las raices de una planta, expresadas en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	18.700	19.214	18.571	11.500	21.000
2ª	11.653	5.944	8.647	10.000	15.000
3ª	7.688	4.225	6.327	9.666	10.500
4ª	5.007	5.021	4.150	8.583	7.333
5ª	6.645	13.026	10.317	7.321	7.333
6ª	4.650	8.625	5.237	7.944	9.666
7ª	11.184	15.375	12.300	8.824	12.000
P.M.	8.566	11.617	8.980	8.542	11.333

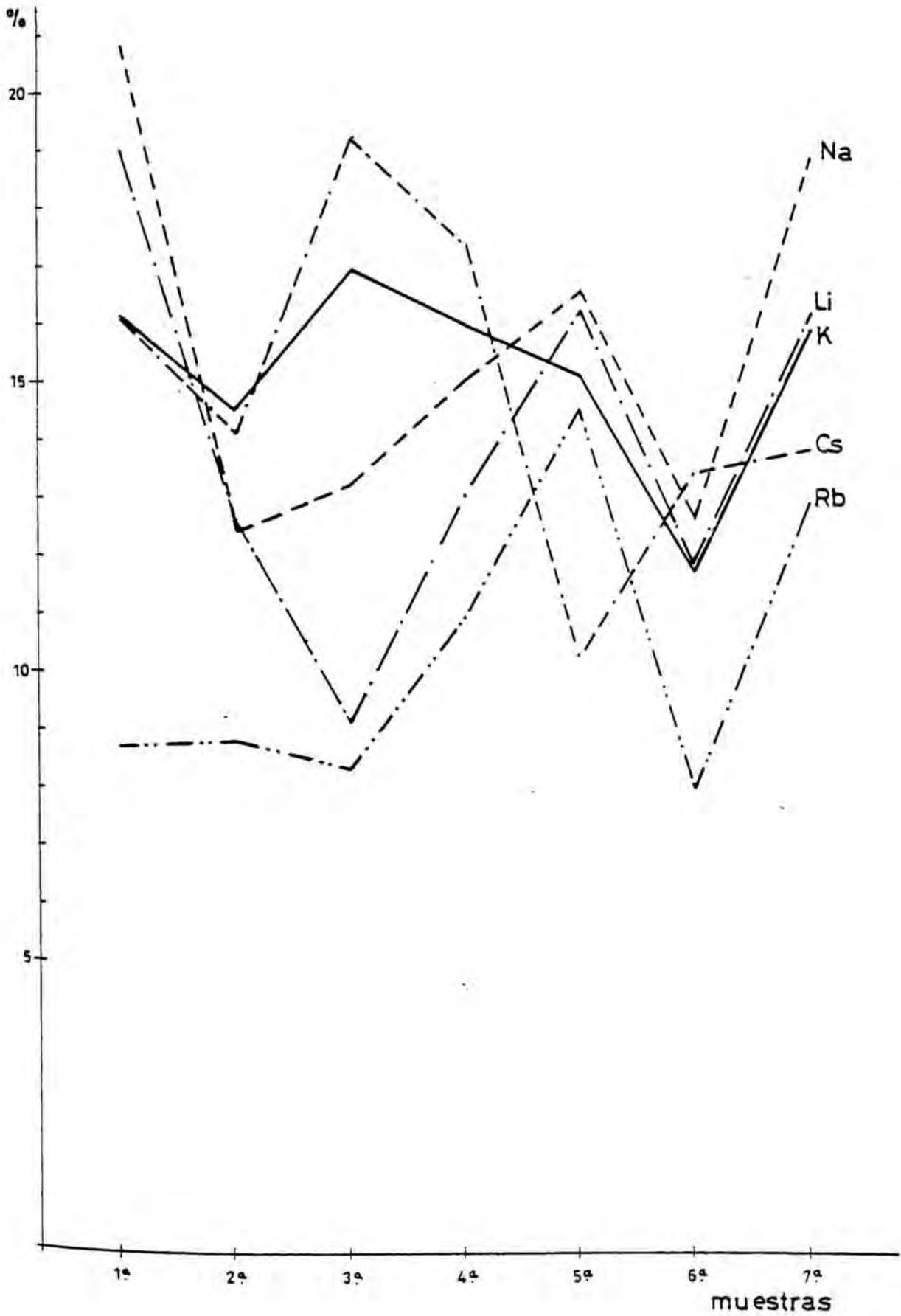
V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

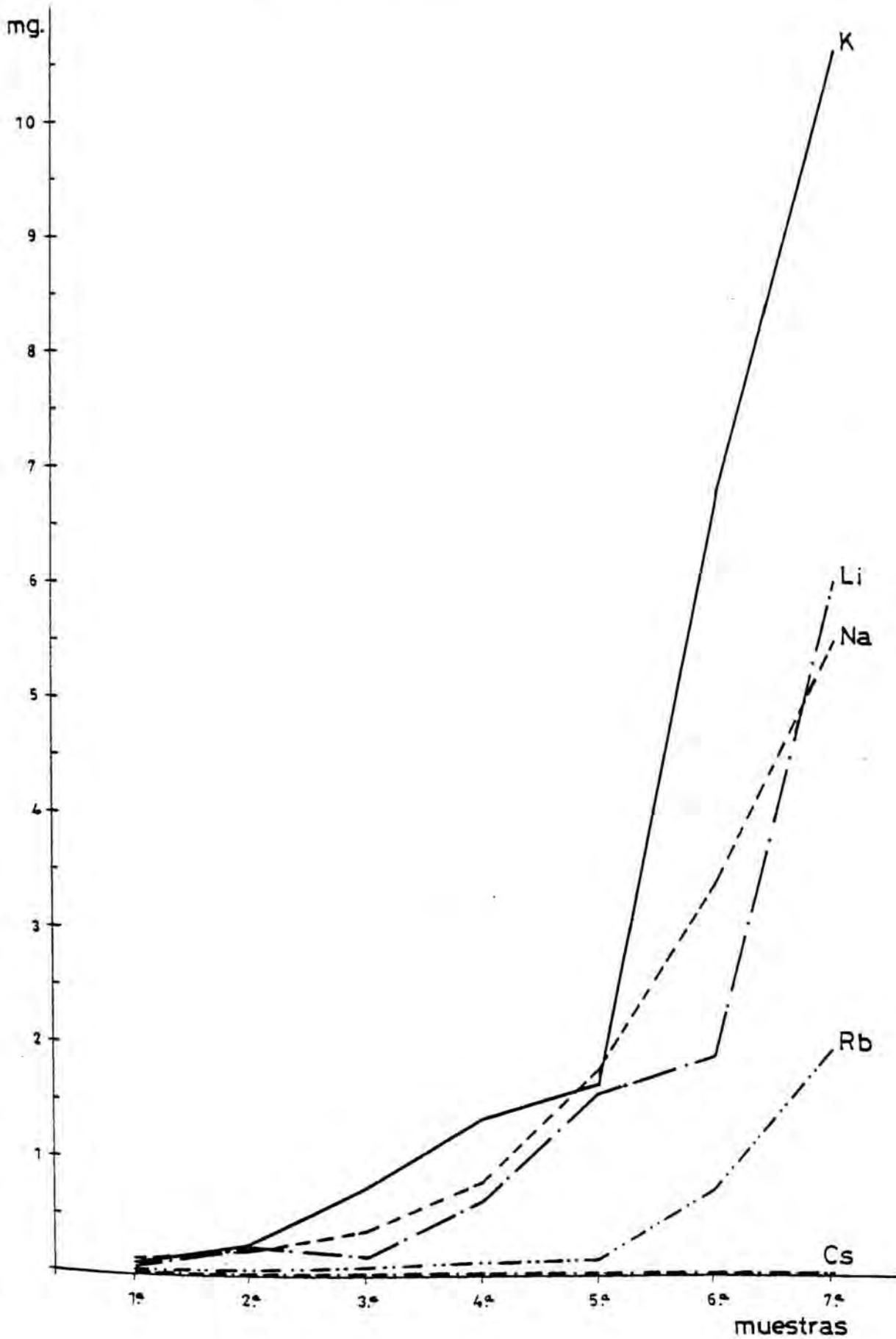
Gráfica 6 - Proteínas referidas a las hojas de una planta, expresadas en miligramos.



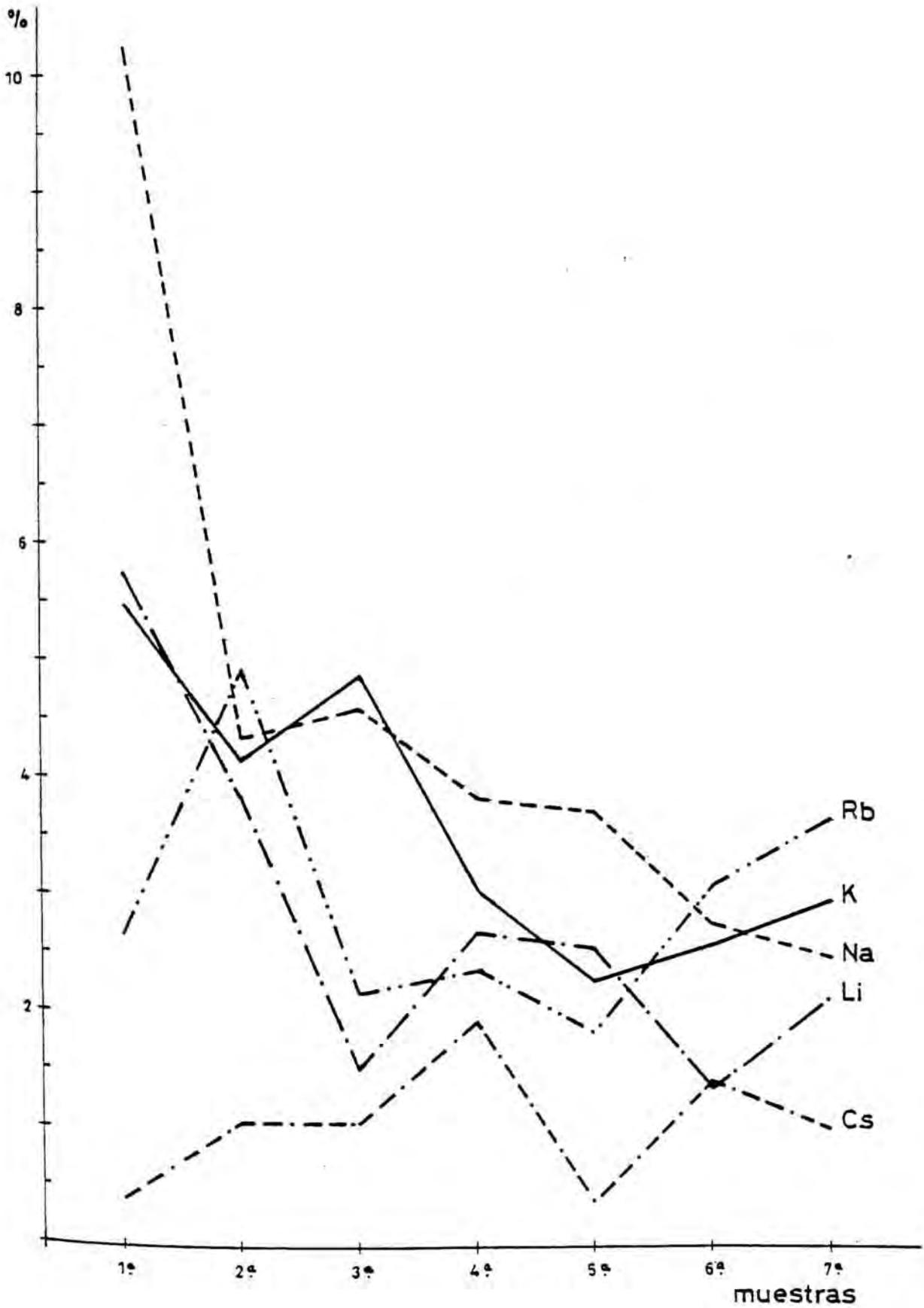
Gráfica 7 - Proteínas en hojas expresadas en porcentaje de peso seco.



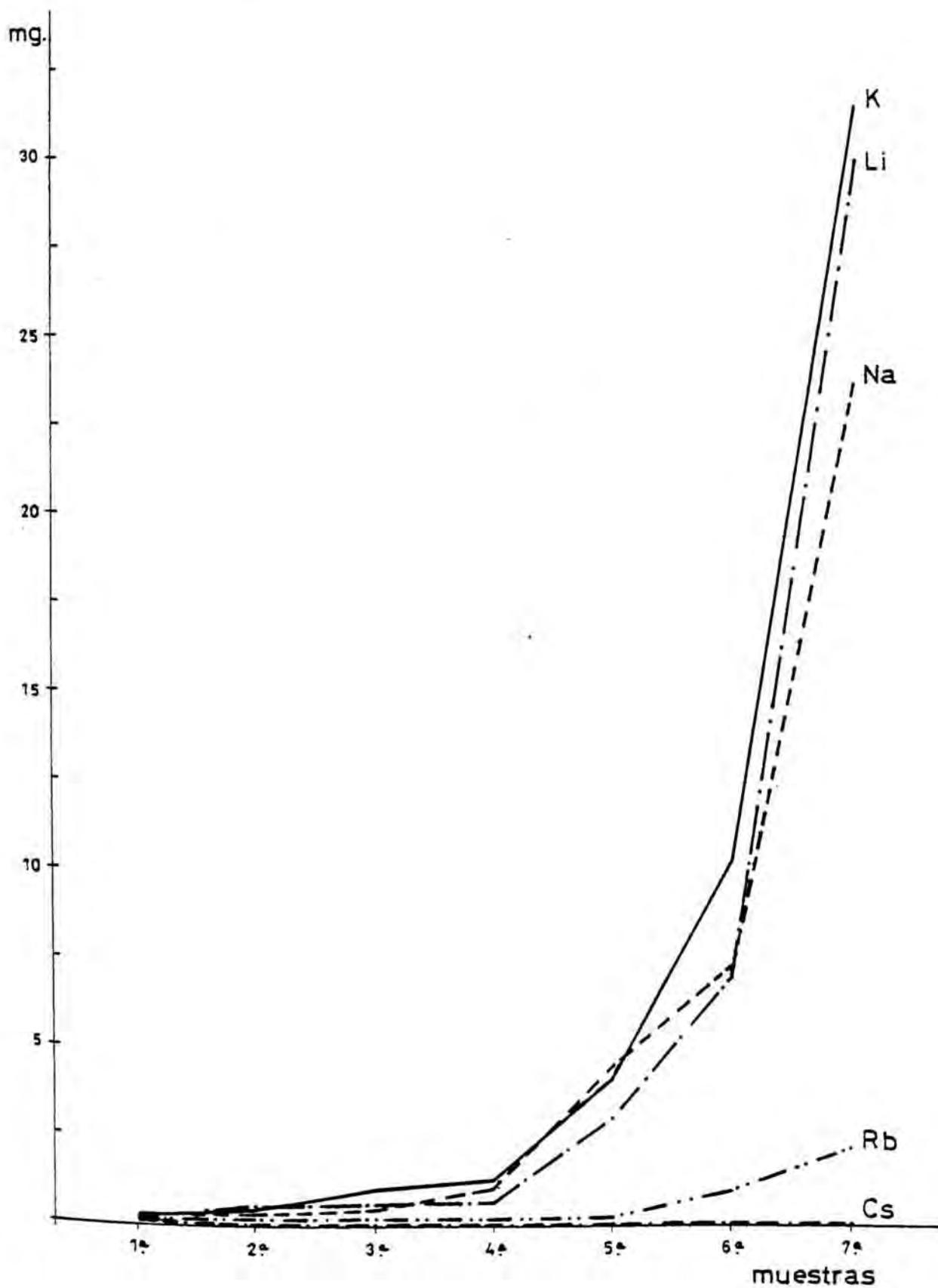
Gráfica 8 - Proteínas referidas a los tallos de una planta expresadas en miligramos.



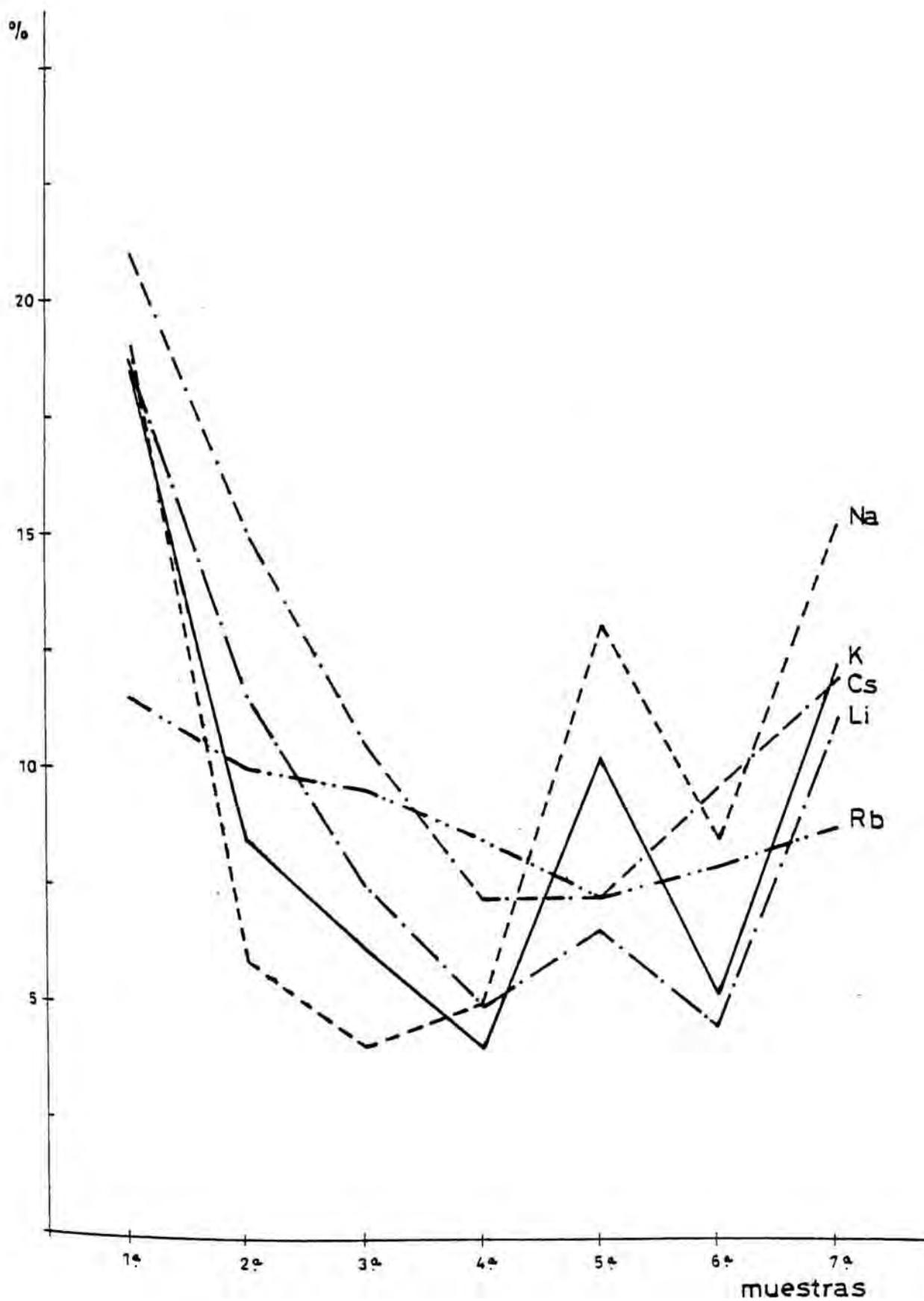
Gráfica 9 - Proteínas en tallos expresadas en porcentaje de peso seco.



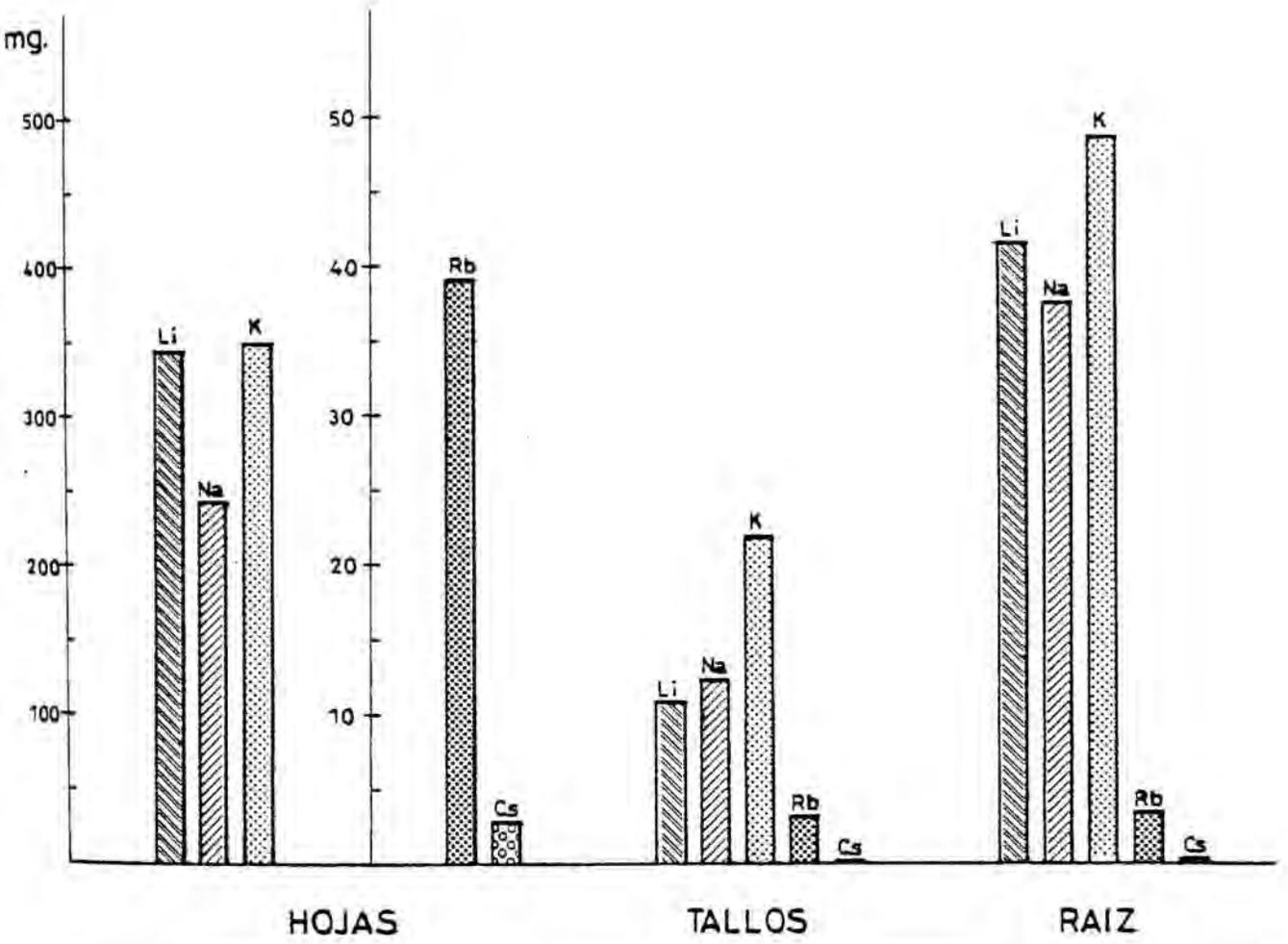
Gráfica 10 - Proteínas referidas a las raíces de una planta expresadas en miligramos.



Gráfica 11 - Proteínas en raíces expresadas en porcentaje de peso seco.



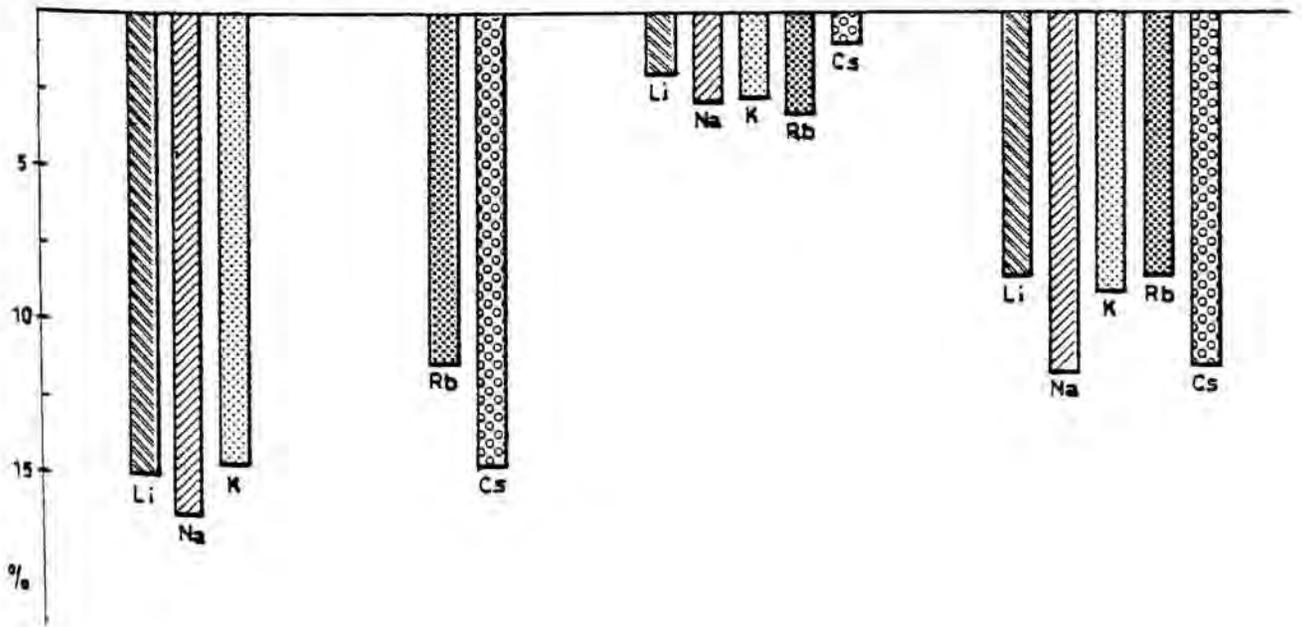
Valores globales expresados en miligramos.



HOJAS

TALLOS

RAIZ



Porcentaje medio referido a peso seco.

### 3.5 Aminoácidos

Los resultados referentes a la proporción de aminoácidos proteicos en estado libre e integrados en proteína, obtenidos en nuestro trabajo, dependen fundamentalmente de las condiciones nutritivas de los distintos ensayos, y son producidas por un efecto directo a causa de las modificaciones que producen sobre el crecimiento de las plantas.

Como se indicó antes (pag 37 ), la observación de que la composición de aminoácidos de la fracción soluble difiere de aquella de las proteínas, indica que tales aminoácidos solubles no son necesariamente precursores de la síntesis proteica, ni productos directos de la degradación proteica. Así, la composición de aminoácidos de la fracción soluble, puede fluctuar sin alterar notablemente la composición de aminoácidos de las proteínas ni reflejar una complementariedad. Sin embargo, la detención de la síntesis proteica podría o tendría que resultar en una acumulación de aminoácidos en estado libre y viceversa.

Para la interpretación de los resultados obtenidos sobre aminoácidos hemos creído conveniente, dados la diversidad de valores a interpretar y los inevitables errores cometidos, tomar las siguientes previsiones:

- Agrupamiento en "familias" según su origen metabólico, sin perjuicio de otras posibles formas de agrupamiento, por ejemplo según sus funciones químicas.
- Prestar atención a los valores globales absolutos (su-

ma de los valores parciales de todas las muestras) y además de a los valores parciales, a veces afectados de errores de muestreo y manipulación.

- De los órganos analizados, el más fiable es la hoja, debido a su facilidad de muestreo. El tallo, debido a su dureza, y la raíz a causa de la dificultad que entraña su extracción completa e indemne, dan valores más inseguros.

---

### 3.5.1 Aminoácidos en hojas, tallo y raíz

- Serina, Glicina y Cistina en estado proteico -

Hojas

(Tablas 13 - 18; gráfica 13)

En el experimento control y en los experimentos con Li, Na, Rb o Cs, los tres aminoácidos en estado proteico, referidos a las hojas de una planta, siguen un curso ascendente, más acusado en las plantas control. Los tres aminoácidos en las plantas del experimento con Cs, y además cis en el ensayo con Rb, presentan irregularidades, a las que puede contribuir el pobre y anómalo crecimiento de las plantas expuestas a estos elementos. El valor absoluto, referido a las hojas de una planta, de estos aminoácidos, es mayor en el experimento control, aunque sumamente parecido al del experimento con Li para los aminoácidos gli y cis. Por el contrario, el Li ha ocasionado una disminución de ser proteica. La relación entre los valores absolutos en las hojas es la misma que la observada entre los pesos secos de la hoja en los distintos experimentos:

$K \text{ (control)} \geq Li > Na \gg Rb \gg Cs.$

En los valores expresados en porcentaje de peso seco se produce la siguiente relación:

Serina : Cs > K (control) > Na > Li > Rb

Glicina : Cs > Li = K (control) > Rb > Na

Cistina : Cs > K (control) = Li > Na > Rb

El valor más alto corresponde siempre al experimento con Cs. Este hecho indica que el efecto inhibido<sup>r</sup> o tóxico del Cs sobre el crecimiento es más acusado que el ejercido sobre la biosíntesis e integración en proteína de los aminoácidos ser, gli y cis. Dicho de otro modo: la biosíntesis y/o integración de los aminoácidos en proteína ha sido algo menos inhibida que el crecimiento. En el experimento con Rb, que también ha sido fuertemente limitante del crecimiento, aunque no tanto como el Cs, este menor crecimiento no se ha traducido en un mayor porcentaje de los indicados aminoácidos, como sería de esperar, respecto al experimento control. Así, el efecto de este último elemento sobre la formación o integración de dichos aminoácidos en proteína ha sido mayor que la reducción del crecimiento, pero este efecto no ha sido igual para los tres aminoácidos. Una consecuencia es que en el experimento con Rb las estructuras inertes, de tipo carbohidratos, han contribuido al peso seco de la hoja en mayor medida que las proteínas. En el experimento con Li, el porcentaje de ser es más bajo y los de gli y cis iguales, y en el experimento con Na, los porcentajes de los tres aminoácidos son menores que en el experimento control. Así, el experimento control se puede considerar el más favorable respecto a la biosíntesis e integración en proteína de ser, gli y cis.

Tallos

(Tablas 19 - 24; gráfica 14)

En los tallos solo se puede evaluar ser y gli, ya

que la presencia de cis es esporádica y en una cantidad que escapa a la sensibilidad del método utilizado. Los valores absolutos (referidos a los tallos de una planta) son siempre notablemente más altos en el experimento control que en los demás. La relación entre los valores de estos aminoácidos es la siguiente: control > Na > Li > Rb ≫ Cs. Por consiguiente, los valores en el experimento con Na son mayores que en el experimento con Li, en contra de lo que sería de esperar.

Los porcentajes más altos corresponden al experimento con Cs, por las razones indicadas para la hojas. En el experimento con Rb, el valor de ser es más bajo y el de gli parecido al control; en definitiva comparables a los observados para las hojas. En el experimento con Li, la única diferencia con las hojas es el porcentaje algo más alto de gli, respecto al experimento control. En el experimento con Na los valores son parecidos (ser) o mayores (gli y cis) que en el control. Si se exceptúan los valores del experimento con Cs, mayores debido a un efecto de crecimiento, los porcentajes de ser, gli y cis en el tallo son poco significativos.

### Raíz

(Tablas 25 - 30; gráfica 15)

En la raíz, los valores absolutos (referidos a la raíz de una planta) siguen un curso ascendente, igual que en las hojas y el tallo. Los valores más altos de ser, gli y cis corresponden aproximadamente al experimento con Li. Así, el orden de mayor a menor de los valores se puede situar aproximadamente como sigue: Li ≥ K (control) > Na ≫ Rb ≫ Ca. El rasgo más notable es el valor parecido (ser) o más alto (gli y cis) en el experimento con Li que en el control. El experimento con Li es el más pare-

cido al control.

Los porcentajes más bajos de ser, qli y cis corresponden al ensayo con Cs, a diferencia de lo que sucedía en las hojas y en el tallo. Los demás porcentajes de ser y qli no difieren demasiado entre sí, si se considera la naturaleza de los experimentos. Sólo se aprecian diferencias en los valores de cis.

En los valores expresados en porcentaje de peso seco se producen muy diferentes relaciones:

Serina : Na > Li > K (control) > Rb > Cs  
 Glicina: Li > Rb > K (control) > Na > Cs  
 Cistina: Na > Li > Rb = K(control) > Cs

En el experimento con Cs, los porcentajes de los aminoácidos ser, qli y cis son, según se ha indicado, más bajos que en los demás experimentos, lo que indica que el Cs ha reducido de modo más acusado todavía que el crecimiento la formación y/o la integración en proteínas de estos aminoácidos en la raíz. En la raíz, se ha producido un efecto contrario que en las hojas y el tallo, es decir, una reducción todavía mayor de la incorporación en proteína de estos aminoácidos que del crecimiento de las plantas. Hay que considerar que la planta ha tomado el Cs, como los demás elementos por la raíz y que su primera y más acusada acción la ha ejercido en este órgano. Los otros elementos, mucho menos tóxicos que el Cs, hacen que las plantas que los han recibido, aunque hayan crecido menos (ensayos con Na y Rb) que las del experimento control, tengan porcentajes de los aminoácidos más parecidos a los de estos últimos.

Así "se han comportado como reductores de crecimien-

to de la raíz que como tóxicos o inhibidores de la síntesis proteica! Otro rasgo es la posición media y constante de los valores en el experimento control.

.....

A. Valores absolutos (referidos a los órganos de la planta).

a) En los órganos aéreos (hojas y tallo), los valores absolutos más altos corresponden al experimento control, seguidos sucesivamente de aquellos de los experimentos con Li y Na en las hojas y de los experimentos con Na y Li en el tallo, y los más bajos a los experimentos con Cs y Rb en las hojas y con Cs en el tallo. El experimento control es el que ha permitido un mayor crecimiento (peso seco) y un mayor valor absoluto de los aminoácidos ser, gli y cis.

b) En la raíz, las relaciones cambian algo, compartiendo el experimento control (ser) y el experimento con Li (gli y cis) los valores más altos; los valores más bajos corresponden a los experimentos con Cs. En los experimentos realizados, el Li es el elemento que ha permitido un crecimiento de las plantas más parecido al experimento control.

Entre los tres órganos se han producido algunas diferencias poco significativas en los valores absolutos de ser, gli y cis, según los tratamientos efectuados.

B. Valores expresados en porcentaje de peso seco de órgano.

En los órganos aéreos (hojas y tallos) los porcentajes más altos corresponden al experimento con Cs, segui-

dos de los del experimento control, y los más bajos a los del experimento con Rb. Por el contrario, en la raíz, los porcentajes más altos son compartidos por experimentos con Li y Na y los más bajos son siempre los del experimento con Cs, ocupando los del experimento control una situación intermedia, que a juzgar por el crecimiento de las plantas, es la más favorable. El Cs y el Rb han restringido muy acusadamente el crecimiento de las plantas, en particular el primero, pero respecto al metabolismo aminoácido-proteico de ser, gli y cis su comportamiento ha sido diferente en las hojas y en la raíz. En las hojas, el Cs ha inhibido más el crecimiento que el metabolismo aminoácido-proteico y en la raíz al contrario.

---

- Serina, Glicina y Cistina en estado libre -  
(Tablas 31 - 48; gráficas 16 - 18)

Los valores de ser libre en hojas, tallos y raíz son los más altos seguidos de los de gli y cis libres. La relación entre los valores absolutos de los distintos experimentos es la misma que para los aminoácidos en estado proteico, con algunos cambios de situación entre los valores de los experimentos con Li y Na.

Dado que en el cálculo de los valores en porcentaje intervienen los pesos, se establecen diferentes relaciones nada comparables con las observadas para los aminoácidos en estado proteico.

SERINA. Proteica. Referida a las hojas de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0290	0.0376	0.0384	0.0204	0.0083
2ª	0.2595	0.1319	0.1947	0.0380	0.0141
3ª	0.2460	0.3198	0.5555	0.0440	0.0222
4ª	0.5701	0.4665	0.7588	0.0720	0.0267
5ª	0.9278	0.7173	1.4481	0.0741	0.0150
6ª	1.6050	1.1612	2.4426	0.3333	0.0162
7ª	3.8137	2.3183	6.5468	0.3912	0.0372
V.G.	7.4511	5.1526	11.9849	0.9730	0.1397

Tabla - 14

SERINA. Proteica. En hojas, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.4084	0.3916	0.3800	0.2720	0.7545
2ª	0.6995	0.5614	0.5846	0.3583	0.7421
3ª	0.4330	0.6023	0.5555	0.3548	1.0571
4ª	0.6084	0.5010	0.5154	0.4500	0.9535
5ª	0.3888	0.3775	0.6707	0.2848	0.5000
6ª	0.2215	0.2622	0.3372	0.3753	0.4908
7ª	0.3345	0.3409	0.5668	0.2212	0.7440
P.M.	0.3243	0.3453	0.5024	0.2879	0.7276

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

GLICINA. Proteica. Referida a las hojas de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0528	0.0477	0.0677	0.0417	0.0100
2ª	0.2499	0.1680	0.2927	0.0544	0.0207
3ª	0.2670	0.3998	0.7160	0.0287	0.0256
4ª	0.6458	0.5962	1.1188	0.1025	0.0329
5ª	1.7594	0.9527	1.6863	0.1498	0.0240
6ª	5.5466	1.4091	3.2150	0.5310	0.0281
7ª	7.0460	4.3548	8.8691	1.1562	0.0544
V.G.	15.5675	7.9283	15.9656	2.0643	0.1957

Tabla - 16

GLICINA. Proteica. En hojas, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.7443	0.4968	0.6701	0.5559	0.9090
2ª	0.6737	0.7149	0.8789	0.5132	1.0894
3ª	0.4700	0.7528	0.7160	0.4628	1.2190
4ª	0.6892	0.6403	0.7600	0.6405	1.1750
5ª	0.7373	0.5014	0.7810	0.5763	0.7998
6ª	0.7658	0.3182	0.4440	0.5980	0.8544
7ª	0.6180	0.6404	0.7678	0.6546	1.0872
P.M.	0.6775	0.5313	0.6693	0.6109	1.0193

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

CISTINA. Proteica. Referida a las hojas de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0081	0.0088	0.0154	—	—
2ª	0.0378	0.0176	0.0600	ind.	—
3ª	0.0455	0.0317	0.1059	0.0044	0.0022
4ª	0.1027	0.0507	0.1496	0.0055	0.0034
5ª	0.3201	0.1490	0.1902	0.0033	0.0005
6ª	0.8646	0.3011	0.7408	ind.	0.0117
7ª	1.0827	0.5800	1.2908	ind.	0.0525
V.G.	2.4615	1.1389	2.5527	0.0243	0.0703

Tabla - 18

CISTINA. Proteica. En hojas, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.1141	0.0917	0.1524	—	—
2ª	0.1019	0.0748	0.1801	ind.	—
3ª	0.0801	0.0597	0.1059	0.0354	0.1047
4ª	0.1096	0.0544	0.1016	0.0346	0.1214
5ª	0.1341	0.0784	0.0880	0.0127	0.0166
6ª	0.1193	0.0679	0.1020	ind.	0.3545
7ª	0.0949	0.0853	0.1117	ind.	1.0500
P.M.	0.1071	0.0763	0.1070	0.0072	0.3661

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

SERINA. Proteica. Referida a los tallos de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0023	0.0022	0.0038	0.0018	0.0004
2ª	0.0078	0.0054	0.0096	0.0030	0.0004
3ª	0.0148	0.0084	0.0200	0.0017	0.0006
4ª	0.0277	0.0354	0.0550	0.0025	0.0013
5ª	0.0604	0.0791	0.0867	0.0071	0.0013
6ª	0.1248	0.2259	0.4668	0.0328	0.0015
7ª	0.3798	0.3047	0.5883	0.0428	0.0009
V.G.	0.6212	0.6611	1.2302	0.0917	0.0064

Tabla - 20

SERINA. Proteica. En tallos, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.1533	0.1692	0.2000	0.1200	0.4500
2ª	0.1226	0.1101	0.1432	0.0967	0.2250
3ª	0.1184	0.0954	0.1332	0.0562	0.1500
4ª	0.1092	0.1092	0.1201	0.0542	0.3200
5ª	0.0954	0.1614	0.1192	0.1000	0.3200
6ª	0.0900	0.1826	0.1795	0.1312	0.3100
7ª	0.1334	0.1375	0.1595	0.0803	0.1125
P.M.	0.1159	0.1534	0.1595	0.0938	0.2286

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

GLICINA. Proteica. Referida a los tallos de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0059	0.0025	0.0038	0.0031	0.0005
2ª	0.0280	0.0078	0.0083	0.0060	0.0007
3ª	0.0420	0.0118	0.0162	0.0048	0.0008
4ª	0.0565	0.0298	0.0462	0.0089	0.0014
5ª	0.0847	0.1040	0.0081	0.0156	0.0017
6ª	0.1694	0.3406	0.4604	0.0480	0.0025
7ª	0.3081	0.4293	0.7810	0.0990	0.0014
V.G.	0.6949	0.9328	1.4040	0.1854	0.0090

Tabla - 22

GLICINA. Proteica. En tallos, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.3933	0.1968	0.1978	0.2066	0.5000
2ª	0.4375	0.1590	0.1238	0.1935	0.3500
3ª	0.3360	0.1340	0.1038	0.1544	0.2000
4ª	0.2224	0.1381	0.1009	0.1934	0.3500
5ª	0.1340	0.2122	0.1212	0.2197	0.4250
6ª	0.1189	0.2753	0.1770	0.1920	0.5100
7ª	0.1083	0.1937	0.2118	0.1856	0.1750
P.M.	0.1298	0.2165	0.1820	0.1897	0.3214

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

CISTINA. Proteica. Referida a los tallos de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	—	ind.	—	ind.	ind.
2ª	—	ind.	—	—	—
3ª	—	ind.	—	—	—
4ª	—	ind.	ind.	—	—
5ª	ind.	ind.	ind.	—	—
6ª	ind.	—	ind.	ind.	—
7ª	0.0290	0.0301	0.0406	ind.	ind.
V.G.	0.0290	0.0301	0.0406	ind.	ind.

Tabla - 24

CISTINA. Proteica. En tallos, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	—	ind.	—	ind.	ind.
2ª	—	ind.	—	—	—
3ª	—	ind.	—	—	—
4ª	—	ind.	ind.	—	—
5ª	ind.	ind.	ind.	—	—
6ª	ind.	—	ind.	ind.	—
7ª	0.0102	0.0135	0.0110	ind.	ind.
P.M.	0.0054	0.0069	0.0052	ind.	ind.

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 25

SERINA. Proteica. Referida a las raices de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0070	0.0091	0.0096	0.0039	0.0007
2ª	0.0232	0.0174	0.0253	0.0035	0.0002
3ª	0.0362	0.0272	0.0827	0.0045	0.0004
4ª	0.0825	0.0879	0.1297	0.0088	0.0012
5ª	0.2918	0.1732	0.2664	0.0150	0.0012
6ª	0.9309	0.4623	0.7722	0.0794	0.0018
7ª	1.4106	1.1976	1.6192	0.1153	0.0019
V.G.	2.7823	1.9747	2.9051	0.2304	0.0074

Tabla - 26

SERINA. Proteica. En raices, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.7020	0.6500	0.6857	0.6500	0.3500
2ª	0.4736	0.4832	0.4960	0.5000	0.1000
3ª	0.4699	0.2924	0.4922	0.5000	0.2000
4ª	0.6552	0.3708	0.4428	0.7333	0.4000
5ª	0.6469	0.3805	0.6577	0.5356	0.4000
6ª	0.6205	0.5394	0.3960	0.6352	0.6000
7ª	0.5273	0.7760	0.6320	0.4612	0.3166
P.M.	0.5692	0.6106	0.5337	0.5272	0.3523

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

GLICINA. Proteica. Referida a las raices de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0079	0.0089	0.0110	0.0041	0.0008
2ª	0.0255	0.0148	0.0248	0.0049	0.0008
3ª	0.0384	0.0265	0.0967	0.0045	0.0006
4ª	0.0870	0.0666	0.1696	0.0075	0.0010
5ª	0.3385	0.1435	0.3145	0.0135	0.0010
6ª	1.1015	0.4453	0.8798	0.0727	0.0011
7ª	1.6651	0.6654	1.5885	0.1665	0.0015
V.G.	3.2639	1.3710	3.0849	0.2737	0.0068

Tabla - 28

GLICINA. Proteica. En raices, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.7900	0.6357	0.7857	0.6833	0.4000
2ª	0.5240	0.4125	0.4862	0.7000	0.4000
3ª	0.4986	0.3177	0.5755	0.4998	0.3000
4ª	0.6901	0.2810	0.4765	0.6250	0.3333
5ª	0.7505	0.3153	0.7765	0.4821	0.3333
6ª	0.7343	0.5195	0.4510	0.5816	0.3666
7ª	0.6224	0.4315	0.6200	0.6660	0.2500
P.M.	0.6677	0.4339	0.5667	0.6263	0.3238

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

CISTINA. Proteica. Referida a las raices de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0018	0.0013	0.0006	—	—
2ª	0.0072	0.0023	0.0012	0.0002	ind.
3ª	0.0067	0.0068	0.0075	0.0003	ind.
4ª	0.0100	0.0195	0.0133	0.0008	ind.
5ª	0.0223	0.0216	0.0262	0.0009	ind.
6ª	0.1088	0.0743	0.0748	0.0072	0.0002
7ª	0.2640	0.1678	0.0982	0.0112	0.0007
V.G.	0.4208	0.2936	0.2218	0.0206	0.0009

Tabla - 30

CISTINA. Proteica. En raices, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.1800	0.0899	0.0428	—	—
2ª	0.1469	0.0639	0.0235	0.0285	ind.
3ª	0.0870	0.0728	0.0454	0.0333	ind.
4ª	0.0793	0.0822	0.0323	0.0666	ind.
5ª	0.0494	0.0474	0.0578	0.0321	ind.
6ª	0.0725	0.0867	0.0383	0.0580	0.0666
7ª	0.0987	0.1088	0.0379	0.0448	0.1166
P.M.	0.0861	0.0908	0.0454	0.0471	0.0428

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.  
 Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 31

SERINA. Libre. Referida a las hojas de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0013	0.0014	0.0018	0.0055	0.0015
2ª	0.0054	0.0039	0.0119	0.0088	0.0015
3ª	0.0102	0.0094	0.0246	0.0119	0.0030
4ª	0.0181	0.0170	0.0218	0.0095	0.0035
5ª	0.0249	0.0290	0.0384	0.0108	0.0049
6ª	0.0757	0.1194	0.1900	0.0588	0.0049
7ª	0.1537	0.2659	0.1795	0.0826	0.0042
V.G.	0.2893	0.4460	0.4460	0.1879	0.0235

Tabla - 32

SERINA. Libre. En hojas, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0190	0.0145	0.0178	0.0733	0.1363
2ª	0.0145	0.0165	0.0357	0.0830	0.0789
3ª	0.0180	0.0177	0.0246	0.0959	0.1428
4ª	0.0193	0.0182	0.0148	0.0593	0.1250
5ª	0.0103	0.0152	0.0177	0.0455	0.1633
6ª	0.0104	0.0270	0.0262	0.0662	0.1484
7ª	0.0134	0.0391	0.0155	0.0467	0.0840
P.M.	0.0126	0.0300	0.0196	0.0556	0.1223

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 33

GLICINA. Libre. Referida a las hojas de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0002	0.0012	0.0015	0.0009	ind.
2ª	0.0005	0.0035	0.0042	0.0012	ind.
3ª	0.0052	0.0040	0.0127	0.0009	0.0002
4ª	0.0043	0.0070	0.0233	0.0020	0.0001
5ª	0.0044	0.0090	0.0284	0.0030	0.0003
6ª	0.0345	0.0274	0.0374	0.0070	0.0002
7ª	0.0557	0.0748	0.0333	0.0148	0.0002
V.G.	0.1048	0.1269	0.1408	0.0298	0.0010

Tabla - 34

GLICINA. Libre. En hojas, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0028	0.0124	0.0148	0.0120	ind.
2ª	0.0013	0.0150	0.0126	0.0118	ind.
3ª	0.0091	0.0075	0.0127	0.0072	0.0095
4ª	0.0045	0.0075	0.0158	0.0125	0.0035
5ª	0.0018	0.0045	0.0131	0.0115	0.0100
6ª	0.0047	0.0061	0.0051	0.0078	0.0060
7ª	0.0048	0.0110	0.0028	0.0083	0.0040
P.M.	0.0045	0.0085	0.0059	0.0088	0.0052

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 35

CISTINA. Libre. Referida a las hojas de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	ind.	ind.	ind.	ind.	ind.
2ª	ind.	—	0.0006	0.0006	ind.
3ª	ind.	ind.	ind.	0.0016	ind.
4ª	0.0027	ind.	0.0032	0.0010	0.0003
5ª	ind.	0.0024	ind.	ind.	ind.
6ª	0.0228	ind.	ind.	ind.	0.0008
7ª	ind.	ind.	0.0158	0.0032	0.0012
V.G.	0.0255	0.0024	0.0196	0.0064	0.0023

Tabla - 36

CISTINA. Libre. En hojas, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	ind.	ind.	ind.	ind.	ind.
2ª	ind.	—	0.0018	0.0056	ind.
3ª	ind.	ind.	ind.	0.0129	ind.
4ª	0.0028	ind.	0.0021	0.0062	0.0107
5ª	ind.	0.0012	ind.	ind.	ind.
6ª	0.0031	ind.	ind.	ind.	0.0242
7ª	ind.	ind.	0.0013	0.0018	0.0240
P.M.	0.0011	0.0001	0.0008	0.0019	0.0119

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 37

SERINA. Libre. Referida a los tallos de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0004	ind.	0.0008	ind.	—
2ª	0.0021	ind.	0.0025	ind.	—
3ª	0.0086	ind.	0.0062	ind.	ind.
4ª	0.0111	0.0076	0.0114	0.0016	ind.
5ª	0.0340	0.0057	0.0094	0.0012	0.0006
6ª	0.0148	0.0127	0.0211	0.0063	0.0014
7ª	0.0221	0.0365	0.0383	0.0065	0.0005
V.G.	0.0934	0.0625	0.0897	0.0156	0.0025

Tabla - 38

SERINA. Libre. En tallos, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0266	ind.	0.0421	ind.	—
2ª	0.0328	ind.	0.0373	ind.	—
3ª	0.0688	ind.	0.0397	ind.	ind.
4ª	0.0437	0.0354	0.0248	0.0347	ind.
5ª	0.0537	0.0115	0.0129	0.0169	0.1500
6ª	0.0103	0.0102	0.0081	0.0252	0.2800
7ª	0.0077	0.0123	0.0103	0.0121	0.0625
P.M.	0.0174	0.0145	0.0116	0.0159	0.0892

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

GLICINA. Libre. Referida a los tallos de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0001	ind.	0.0003	ind.	—
2ª	0.0007	ind.	0.0007	—	—
3ª	0.0009	ind.	0.0032	—	—
4ª	0.0018	0.0018	0.0045	0.0002	ind.
5ª	0.0018	0.0011	0.0029	0.0005	ind.
6ª	0.0016	0.0020	0.0054	0.0088	ind.
7ª	0.0062	0.0097	0.0148	0.0010	ind.
V.G.	0.0131	0.0146	0.0318	0.0025	ind.

Tabla - 40

GLICINA. Libre. En tallos, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0066	ind.	0.0157	ind.	—
2ª	0.0109	ind.	0.0104	—	—
3ª	0.0072	ind.	0.0205	—	—
4ª	0.0071	0.0083	0.0098	0.0043	ind.
5ª	0.0028	0.0022	0.0039	0.0070	ind.
6ª	0.0011	0.0016	0.0020	0.0032	ind.
7ª	0.0021	0.0043	0.0040	0.0018	ind.
P.M.	0.0024	0.0033	0.0041	0.0025	ind.

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 41

CISTINA. Libre. Referida a los tallos de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	ind.	—	0.0001	0.0001	—
2ª	—	—	0.0005	—	—
3ª	0.0034	—	0.0019	—	—
4ª	0.0074	ind.	ind.	—	—
5ª	ind.	ind.	ind.	0.0011	ind.
6ª	—	—	ind.	—	0.0004
7ª	—	ind.	ind.	—	—
V.G.	0.0108	ind.	0.0025	0.0012	0.0004

Tabla - 42

CISTINA. Libre. En tallos, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	ind.	—	0.0052	0.0066	—
2ª	—	—	0.0074	—	—
3ª	0.0272	—	0.0121	—	—
4ª	0.0291	ind.	ind.	—	—
5ª	ind.	ind.	ind.	0.0154	ind.
6ª	—	—	ind.	—	0.0800
7ª	—	ind.	ind.	—	—
P.M.	0.0020	ind.	0.0003	0.0012	0.0142

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

SERINA. Libre. Referida a las raices de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0004	0.0005	0.0004	0.0003	ind.
2ª	0.0013	0.0015	0.0014	ind.	—
3ª	0.0051	0.0039	0.0027	0.0003	—
4ª	0.0036	0.0044	0.0046	0.0004	ind.
5ª	0.0108	0.0126	0.0078	0.0009	0.0009
6ª	0.0772	0.0300	0.0842	0.0020	0.0001
7ª	0.0589	0.0134	0.0723	0.0059	0.0002
V.G.	0.1573	0.0663	0.1734	0.0098	0.0012

Tabla - 44

SERINA. Libre. En raices, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0400	0.0357	0.0285	0.0500	ind.
2ª	0.0265	0.0417	0.0274	ind.	—
3ª	0.0662	0.0419	0.0160	0.0333	—
4ª	0.0285	0.0184	0.0153	0.0333	ind.
5ª	0.0239	0.0276	0.0192	0.0321	0.3000
6ª	0.0514	0.0350	0.0431	0.0160	0.0333
7ª	0.0220	0.0087	0.0282	0.0236	0.0333
P.M.	0.0321	0.0290	0.0318	0.0224	0.0571

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

GLICINA. Libre. Referida a las raices de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0001	0.0002	0.0002	0.0001	ind.
2ª	0.0004	0.0005	0.0007	ind.	—
3ª	0.0024	0.0013	0.0020	ind.	—
4ª	0.0013	0.0027	0.0030	0.0001	ind.
5ª	0.0038	0.0059	0.0039	0.0003	0.0004
6ª	0.0308	0.0104	0.0200	0.0005	ind.
7ª	0.0493	0.0111	0.0349	0.0023	ind.
V.G.	0.0881	0.0321	0.0647	0.0034	0.0004

Tabla - 46

GLICINA. Libre. En raices, expresada en porcentaje de peso seco.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	0.0100	0.0142	0.0142	0.0166	ind.
2ª	0.0081	0.0139	0.0137	ind.	—
3ª	0.0311	0.0139	0.0119	ind.	—
4ª	0.0103	0.0114	0.0102	0.0083	ind.
5ª	0.0084	0.0129	0.0096	0.0107	0.1000
6ª	0.0205	0.0122	0.0102	0.0040	ind.
7ª	0.0184	0.0072	0.0136	0.0092	ind.
P.M.	0.0180	0.0208	0.0119	0.0077	0.0190

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

Tabla - 47

CISTINA. Libre. Referida a las raices de una planta, mg.

Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	ind.	—	—	ind.	—
2ª	—	—	—	—	—
3ª	—	—	—	—	—
4ª	—	—	—	—	—
5ª	ind.	0.0004	—	ind.	ind.
6ª	ind.	ind.	ind.	ind.	ind.
7ª	ind.	ind.	ind.	ind.	ind.
V.G.	ind.	0.0004	ind.	ind.	ind.

Tabla - 48

CISTINA. Libre. En raices, expresada en porcentaje de peso seco.

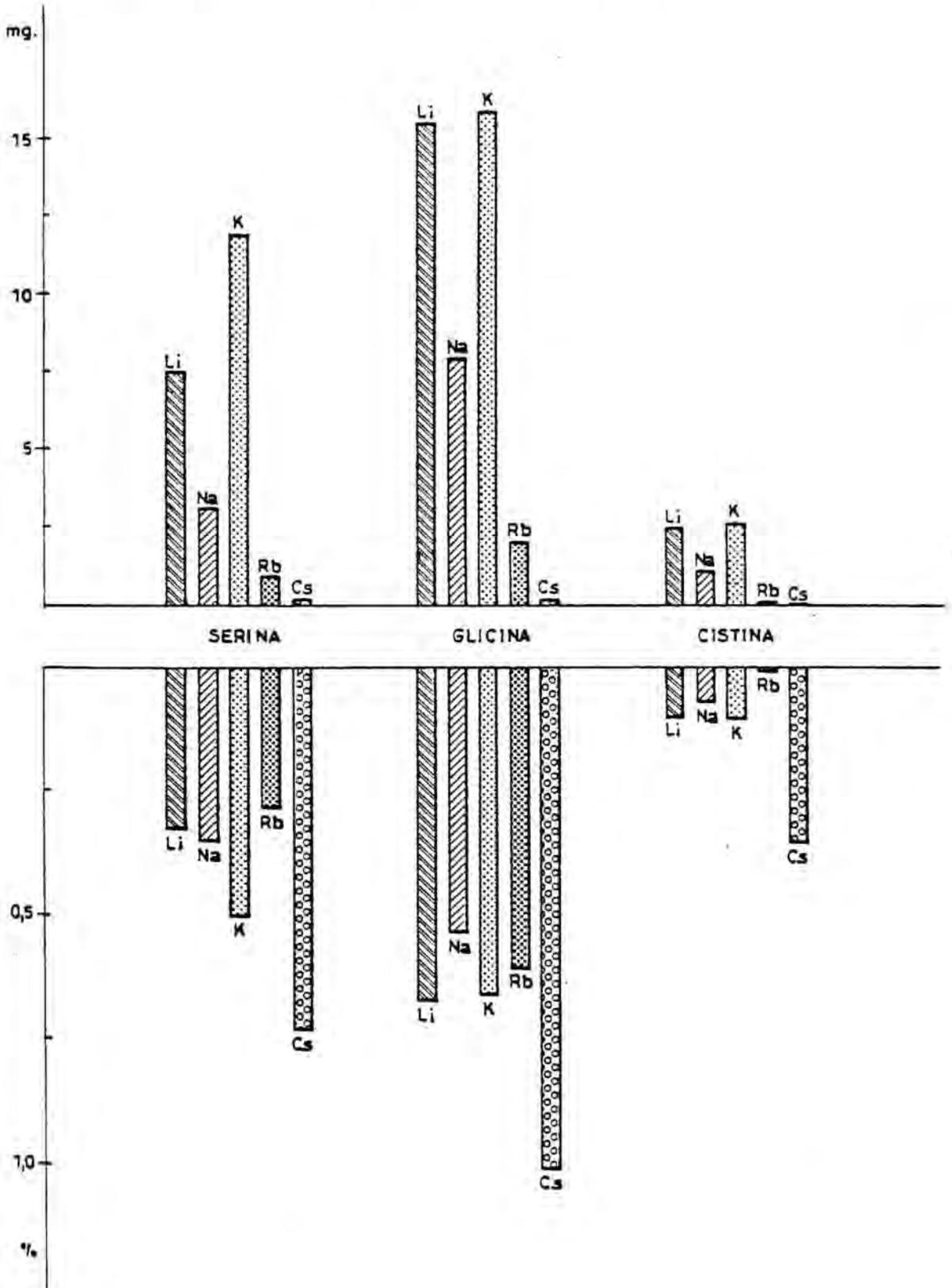
Muestras	E N S A Y O S				
	Li	Na	K	Rb	Cs
1ª	ind.	—	—	ind.	—
2ª	—	—	—	—	—
3ª	—	—	—	—	—
4ª	—	—	—	—	—
5ª	ind.	0.0008	—	ind.	ind.
6ª	ind.	ind.	ind.	ind.	ind.
7ª	ind.	ind.	ind.	ind.	ind.
P.M.	ind.	0.0001	ind.	ind.	ind.

V.G. - Valor global. P.M. - Porcentaje medio. K - Control, solo K.  
 Li, Na, Rb - Se ha sustituido la mitad de los iones K por iones Li,  
 Na y Rb respectivamente.

Cs - Se ha sustituido la cuarta parte de los iones K por iones Cs

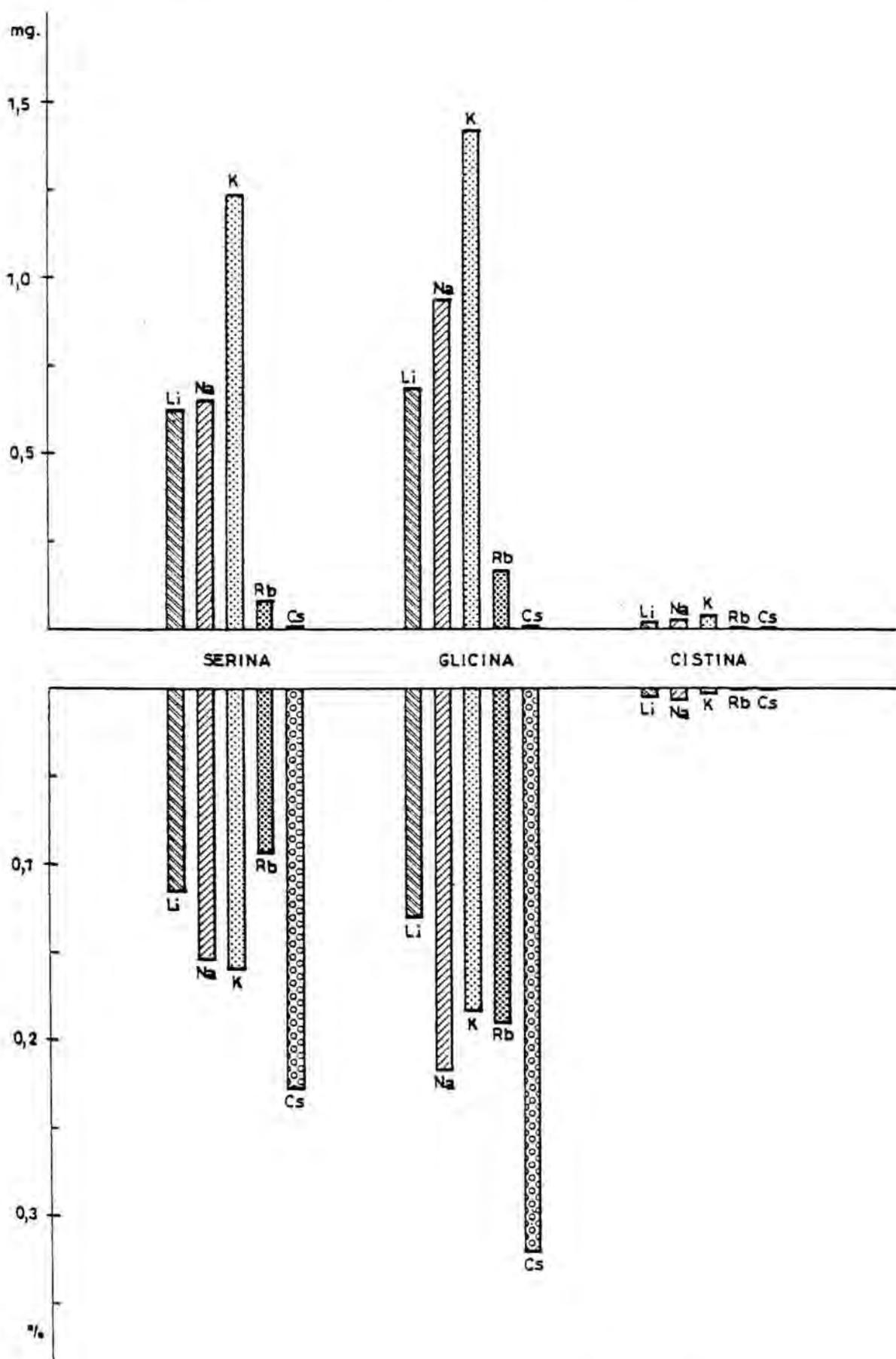
Gráfica 13 Aminoácidos en estado proteico ( Ser, Glic, Cis )

Valores globales expresados en mg/hojas de una planta



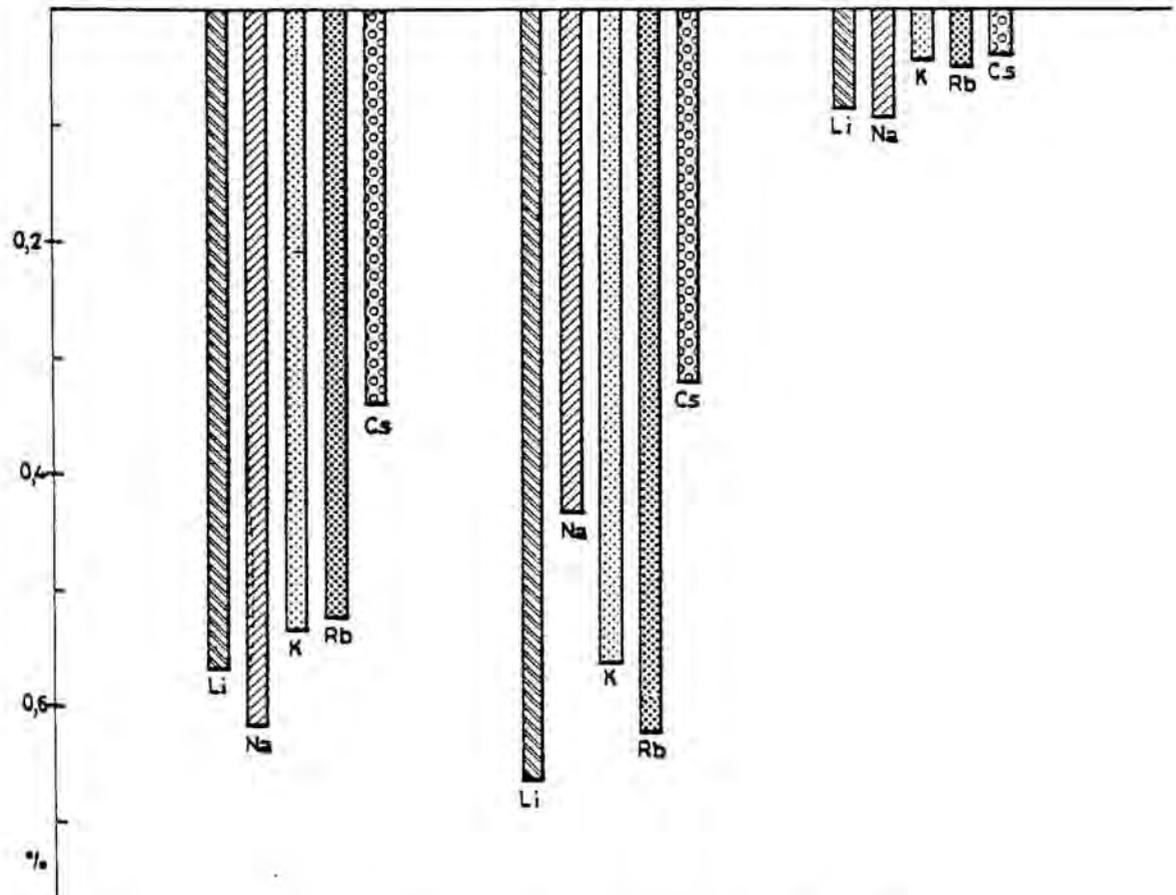
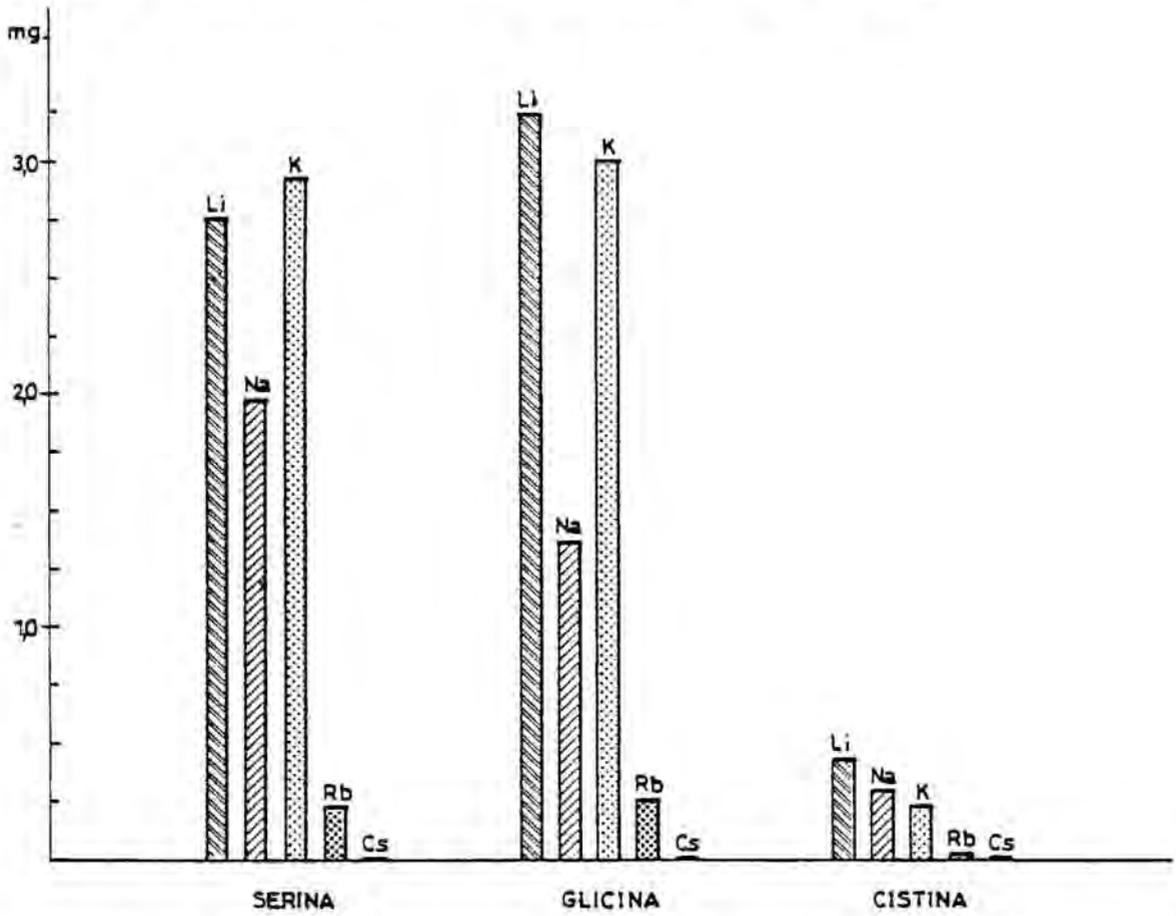
Porcentajes medios referidos a peso seco de hoja

Valores globales expresados en mg/tallo de una planta



Porcentajes medios referidos a peso seco de tallo

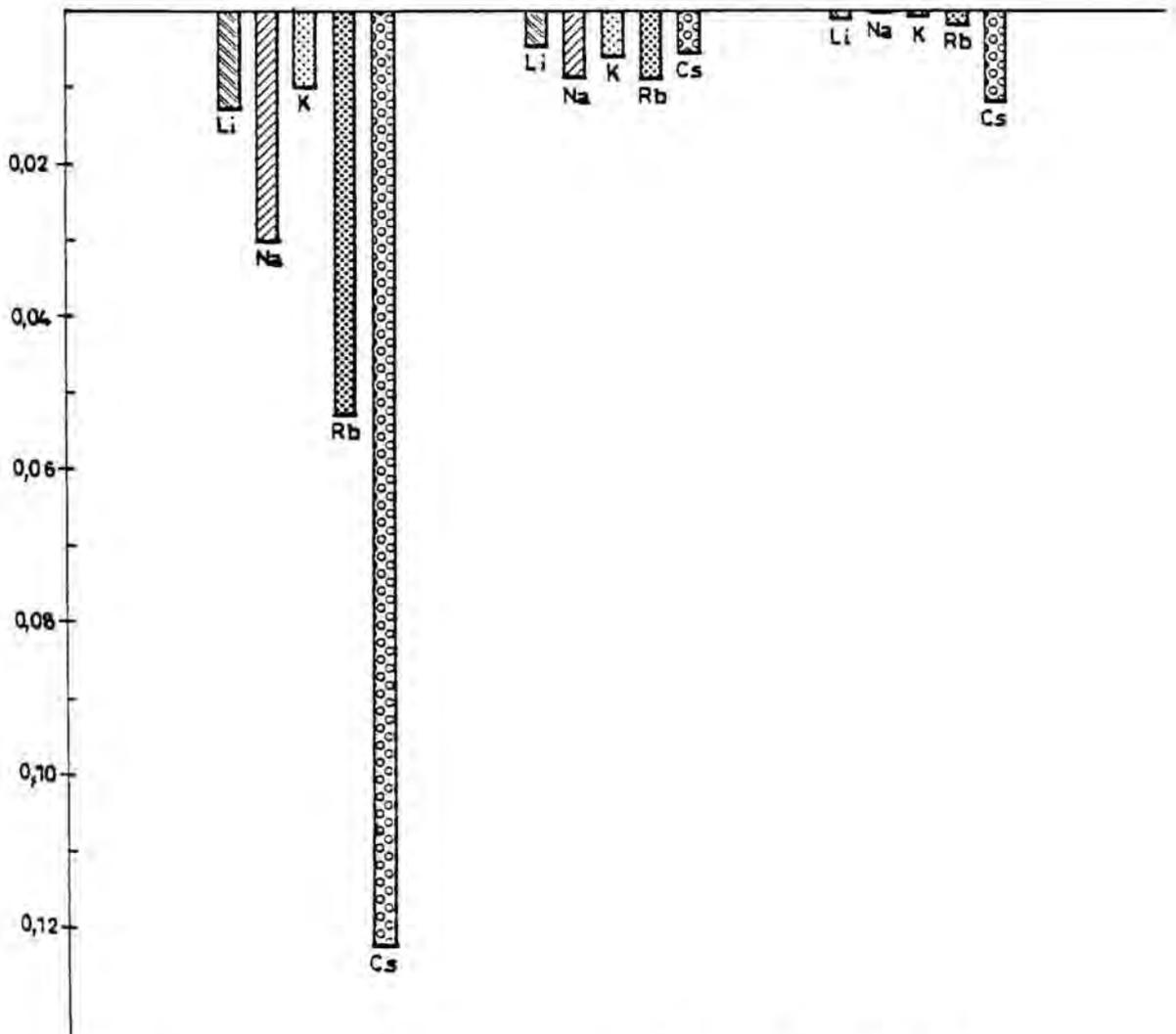
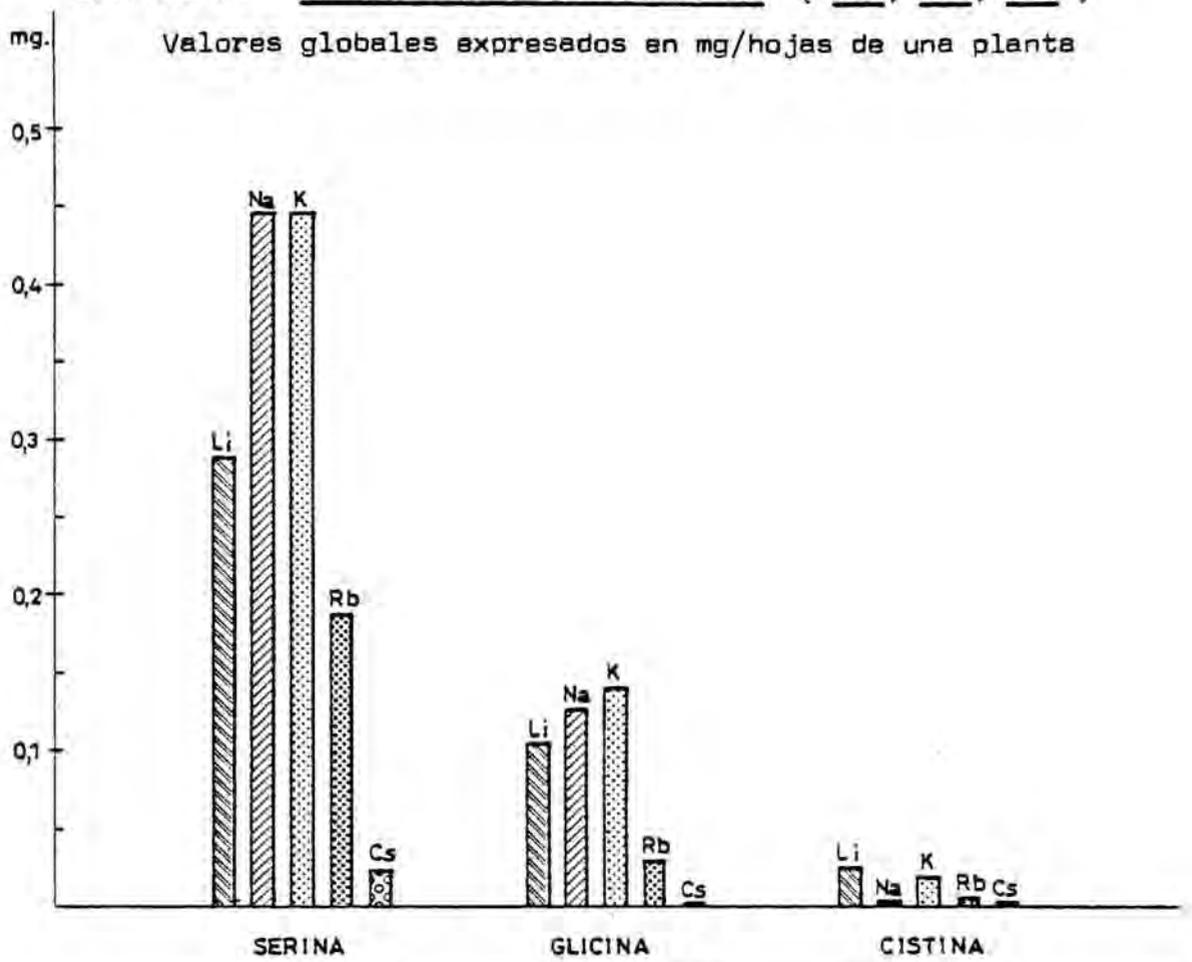
Valores globales expresados en mg/raíz de una planta



Porcentajes medios referidos a peso seco de raíz

Gráfica 16 Aminoácidos en estado libre ( Ser, Glic, Cis )

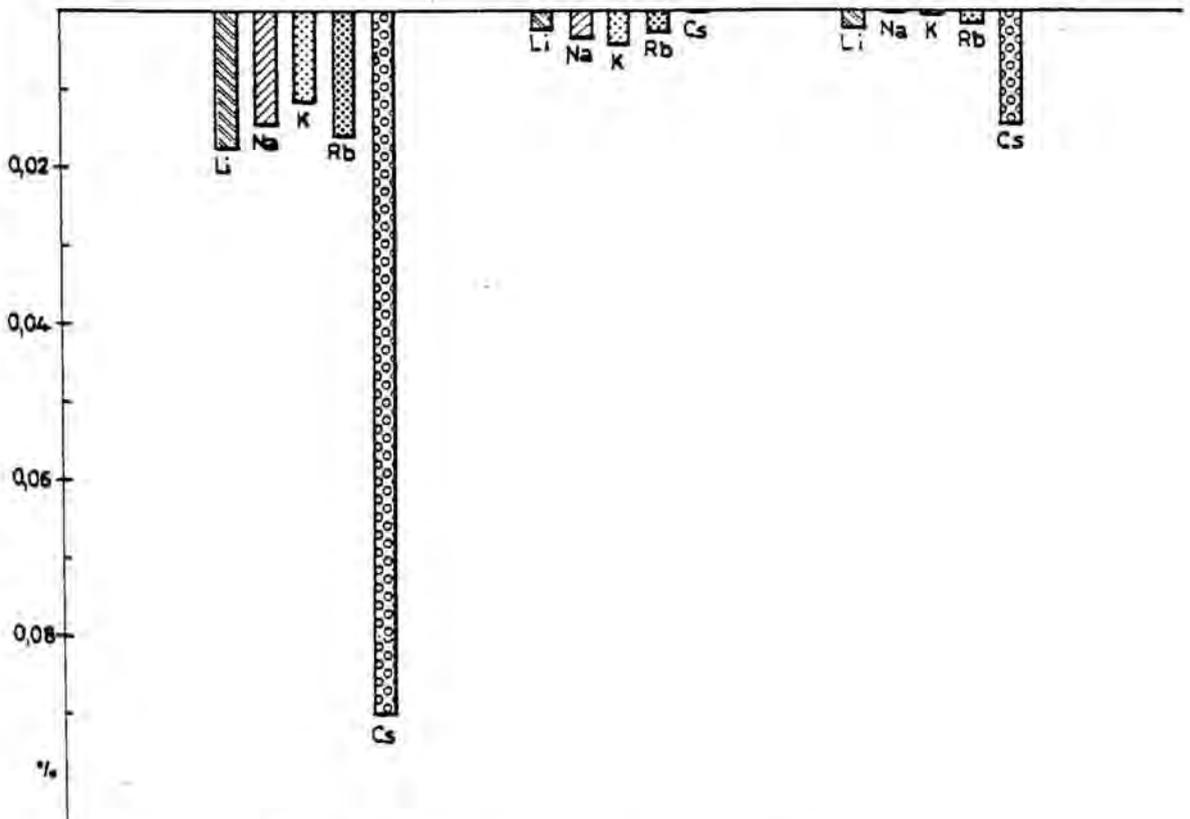
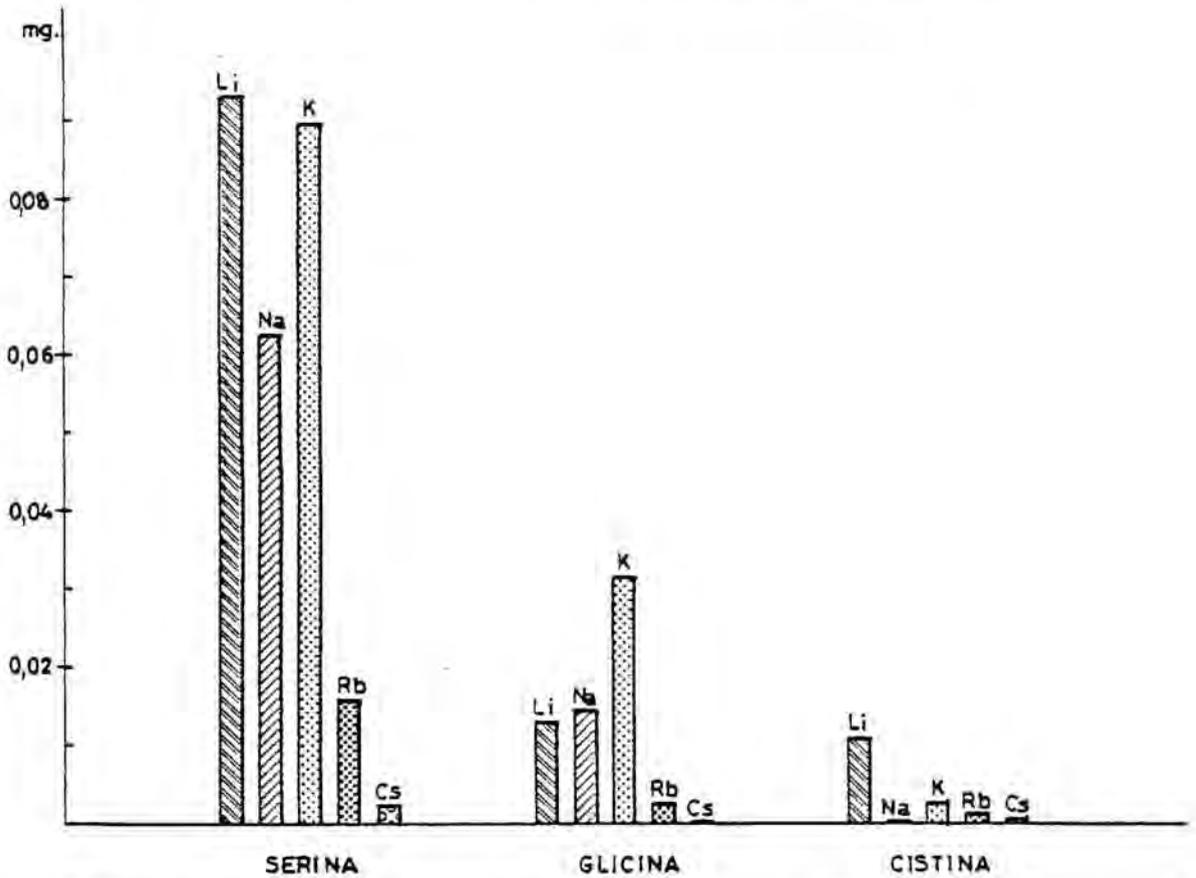
Valores globales expresados en mg/hojas de una planta



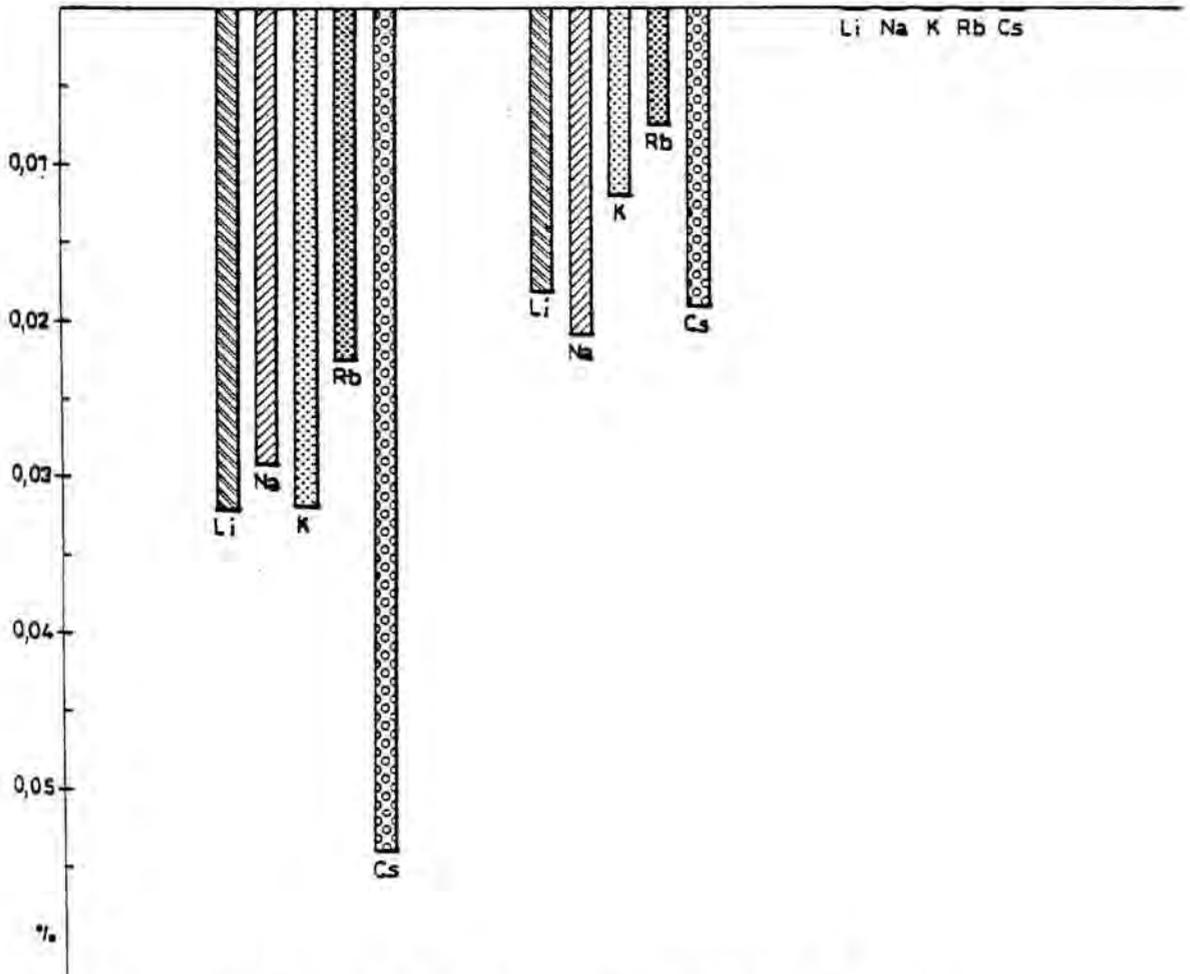
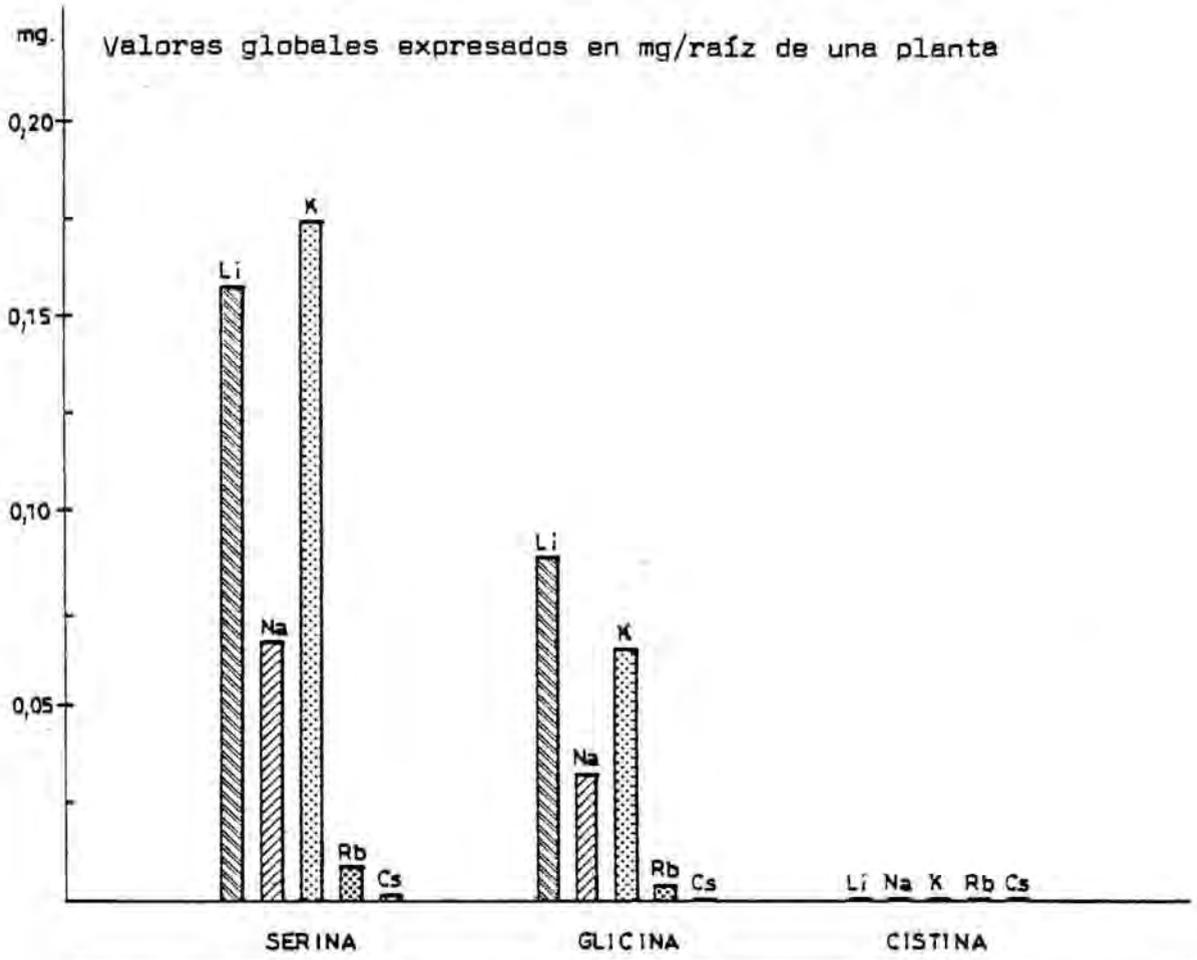
Porcentajes medios referidos a peso seco de hoja

Gráfica 17 Aminoácidos en estado libre ( Ser, Gli, Cis )

Valores globales expresados en mg/tallo de una planta



Porcentajes medios referidos a peso seco de tallo



Porcentajes medios referidos a peso seco de raíz

- Fenilalanina y Tirosina en estado proteico -

Hojas

(Tablas 49-52; gráfica 19)

Los valores de fen y tir referidos a las hojas de una planta (valores absolutos) siguen un curso ascendente durante el período del ciclo vegetativo estudiado. Los valores absolutos de fen son, en todos los experimentos, notablemente más altos que los de tir. La relación de los valores absolutos de fen y tir entre los distintos experimentos es como sigue:  $K$  (control)  $>$   $Li$   $>$   $Na$   $>$   $Rb$   $>$   $Cs$ .

Es de destacar el valor notablemente más alto de fen y tir en el experimento control que en el experimento con  $Li$ , a pesar de que la diferencia entre los pesos no es muy acusada (solo 3.6 % mayor en el experimento control que en el experimento con  $Li$ ). Así, el experimento control es el más favorable para la síntesis y/o integración en proteína de fen y tir.

En los experimentos con  $Na$ ,  $Rb$  y  $Cs$ , los valores siguen el mismo orden, que el correspondiente a los pesos secos de las hojas.

Los porcentajes son también más altos para fen que para tir, pero la relación entre los distintos experimentos varia, manifestandose como sigue:

Fenilalanina :  $K = Cs > Rb > Li > Na$

Tirosina :  $Cs > K > Li \geq Rb > Na$

Estas relaciones revelan que el experimento control, con solo  $K$ , debido a su significación metabólica, y

el Cs, debido al reducido peso de las hojas, ocupan los primeros puestos. La situación es parecida para K y Cs, pero los motivos distintos. En definitiva el experimento control se destaca como el más favorable. Los valores de los experimentos con Li y Rb ocupan situaciones intermedias, aunque fen es más alto en el experimento con Rb. Las hojas del experimento con Na, a pesar de haber crecido menos que las de los experimentos control y con Li, contiene menos porcentaje de fen y tir, lo que indica un efecto desfavorable del Na sobre la biosíntesis e integración en proteína de estos aminoácidos.

#### Tallo

(Tablas 53-56; gráfica 20)

En el tallo, los valores absolutos (referidos al tallo de una planta) de fen y tir siguen, al igual que en las hojas, un curso ascendente durante el período del ciclo vegetativo de las plantas estudiado, y los valores, en todos los experimentos, son más altos para fen que para tir

Los valores de fen y tir en los distintos experimentos, siguen el curso: K(control) > Na > La > Rb > Cs. El valor más alto corresponde al experimento control y los más bajos a los experimentos con Rb y Cs; en los experimentos con Li y Na, estos aminoácidos cambian de orden respecto a las hojas. El experimento control es el más favorable, seguido del experimento con Na.

Los valores de fen y tir, referidos a porcentaje de peso seco de tallo, se manifiestan en el orden:

Fenilalanina : Cs > K (control) = Na = Rb > Li

Tirosina : Cs > K (control) > Na > Li > Rb

es decir, parecido para ambos. El porcentaje más alto en el experimento con Cs habría que atribuirlo al reducido crecimiento (peso seco) de las plantas y se ha traducido en un efecto todavía más severo sobre el crecimiento que sobre los aminoácidos fen y tir. En definitiva, exceptuado el caso particular del Cs, el experimento control es el más favorable, sobre todo si se considera el crecimiento, y el curso con pequeñas modificaciones es como el indicado para los valores absolutos.

#### Raíz

(Tablas 57-60; gráfica 21)

Los valores de fen y tir referidos a la raíz de una planta (valor absoluto) siguen, como en la hoja y el tallo, un curso ascendente. Los valores de fen son, también en todos los experimentos, más altos que los de tir. Si se refieren los valores de fen y tir a los diferentes experimentos, la relación es: Li > K(control) > Na > Rb > Cs. El Li ha ocasionado la biosíntesis y/o integración en proteína más importante de fen y tir.

Los restantes valores, en función de los experimentos, siguen un orden lógico, si se consideran los pesos alcanzados por las raíces.

Los valores de fen y tir, expresados en porcentaje de peso seco de raíz, son lógicamente más altos para fen que para tir, como para los valores absolutos. En la relación entre los distintos experimentos:

Fenilalanina:  $Li > Rb > K \text{ (control)} > Na > Cs$

Tirosina :  $Li > Rb > Na > K \text{ (control)} > Cs$

Los valores de los experimentos con Li y Cs conservan su situación respecto a los valores absolutos, pero en las posiciones intermedias los valores de los experimentos control y con Na y Rb cambian de situación; por ejemplo, Rb se revela como un elemento que ha reducido más el crecimiento que a los aminoácidos fen y tir, al contrario de lo sucedido en el experimento con Cs. Es notable el hecho de que el Li haya ocasionado un estímulo de fen y tir en la raíz, lo mismo si se considera su valor absoluto que su porcentaje.

.....

A. Valores absolutos (referidos a los órganos de la planta).

a) Fen se halla, en todos los órganos, en mayor proporción que tir.

b) La relación entre los valores absolutos en los distintos experimentos sería la misma en todos los órganos de no ser por el cambio de posición de los valores del experimento con Li: la segunda posición para la hoja, la tercera para el tallo, ésta no muy distante de la segunda, y la primera para la raíz. En definitiva, los dos primeros puestos son compartidos practicamente por los valores de los experimentos control y con Li. Las plantas del experimento con Li son las más parecidas en su crecimiento (peso seco) a las del experimento control, y por lo menos los efectos de uno y otro sobre el crecimiento son muy diferentes.

8. Valores expresados en porcentaje de peso seco de órgano.

a) La relación entre los valores expresados en porcentaje de peso seco varía según los órganos. En los órganos aéreos (hojas y tallo), los valores de los experimentos control y con Cs ocupan los lugares preferentes. Este hecho es lógico, aunque por distintas causas, según se ha indicado ya para otros aminoácidos. Los valores más bajos en las hojas corresponden al experimento con Na; este hecho es relativamente sorprendente ya que las plantas de este experimento han crecido bastante menos que las del experimento control y además el Na no es particularmente lesivo para la vida del vegetal, es decir, dos hechos favorables para un mayor porcentaje. En el tallo, los últimos puestos lo comparten los experimentos con Li y Rb; en el experimento con Rb, las plantas han crecido poco, pero el efecto sobre la biosíntesis e integración en proteína de estos aminoácidos, es todavía más negativo que sobre el crecimiento.

b) En la raíz el efecto ha sido muy diferente, respecto a los experimentos con Li, cuyos valores son los más altos en la relación, seguidos de aquellos de Rb, y del experimento con Cs, cuyos valores ocupan el último lugar. Así, Li y Rb han determinado el mayor porcentaje de fen y tir y Cs el menor en la raíz, respecto al experimento control. En el caso del Li puede haberse producido un estímulo de la biosíntesis y/o la integración de los aminoácidos en proteína; en el experimento con Rb los valores pueden deberse a un fenómeno de crecimiento. En el experimento con Cs se ha producido una verdadera inhibición

de la síntesis y/o integración en proteína de estos aminoácidos.

---

- Fenilalanina y Tirosina en estado libre -  
(Tablas 61-72; gráficas 22-24)

La presencia de fen y tir en estado libre se presenta de modo irregular, y sin posibilidad de deducir consecuencias, sin embargo, la relación de los valores absolutos entre los distintos experimentos es comparable con la indicada para estos aminoácidos en estado proteico.

Los porcentajes más altos en la hoja corresponden al experimento con Rb y en la raíz al experimento con Li. Solo los valores de la raíz son comparables con los indicados para estos aminoácidos en estado proteico.