

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Facultad de Ciencias Exactas



**"Estudio comparativo de los compuestos proteicos  
en plantas de TROPAEOLUM MAJUS normales  
y enanizadas por luz"**

N<sup>o</sup>  
515



Jorge Ricardo Alaniz

1970

A mi esposa

A mis padres

Deseo expresar el más profundo agradecimiento a mi Director de Tesis Profesor Enrique Sivori, por haberme sugerido el tema y orientado en su realización. Agradezco también a la Ing. Agr. Clara Rumi, cuya esmerada tarea de selección y mantenimiento del clon de Tropaeolum majus, me permitió contar con el material vegetal adecuado.

Finalmente, deseo dejar constancia de mi reconocimiento a aquellas personas que de una forma u otra colaboraron en la realización de este trabajo y en especial al Dr. Juan H. Hunziker con quien, por carecer del equipo adecuado, efectué la densitometría de las bandas protéicas obtenidas por electroforesis.

## INTRODUCCION

El presente trabajo tiene por objeto profundizar el conocimiento de las diferencias existentes entre plantas de Tropaeolum majus enanizadas por la incidencia de luz solar directa y plantas normales desarrolladas bajo luz indirecta. Este fenómeno tan evidente en Tropaeolum majus es común en gran número de plantas superiores, por ello consideramos que el presente aporte puede ayudar a explicar el efecto general de disminución del crecimiento provocado por la luz.

Ya se conocía, desde fines del siglo pasado, que los vegetales dependen de la luz, para efectuar la síntesis de compuestos orgánicos que ellos producen y para sus procesos de desarrollo. En lo que se refiere a éstos últimos, los estudios que en un comienzo fueron descriptivos, en la primera parte de éste siglo pasaron a un nivel experimental, intensificándose posteriormente en una forma tal que en nuestros días han llegado a constituir un capítulo importante dentro de la Fisiología Vegetal, el que corresponde a los procesos fotomorfogénicos. Por otra parte, el efecto de la luz sobre los vegetales es mucho más acentuado que en los animales. Se podría generalizar diciendo que las plantas superiores están expuestas, inequívocamente, a las variaciones del medio, el que controla en gran medida, los procesos ya mencionados.

Se comprenderá perfectamente que los fenómenos comentados, se consideran por lo menos parcialmente, en forma independiente de aquellos producidos como consecuencia de la fotosíntesis clorofiliana.

Se sabía, por ejemplo, que si las condiciones de iluminación eran adecuadas, los vegetales lograban un buen tamaño y desarrollo vigoroso, pero en cambio si las mismas eran deficientes se observaba un crecimiento débil con tallos alargados, aún cuando se cumplieran las condiciones óptimas de requerimiento de agua, nutrientes inorgánicos y temperatura. La ex-

perencia posteriormente recogida, señaló resultados realmente interesantes cuando los vegetales se expusieron a distintas intensidades lumínicas logradas con equipos adecuados.

El efecto de la luz en los vegetales, se puede estudiar teniendo en cuenta tres variables: intensidad, calidad y duración (1).

Intensidad. Ya que la fotosíntesis aumenta con la intensidad de la luz, el crecimiento y el vigor de las plantas es generalmente proporcional a ella, dentro de ciertos límites. Shirley (2), haciendo crecer un grupo de plantas a diferentes intensidades de luz, comprobó que con baja intensidad el peso seco logrado de las mismas, era en cada caso, directamente proporcional a su valor; a intensidades muy altas, el aumento del peso seco era relativamente menor. Además observó que la intensidad afectaba ciertas características cualitativas del vegetal, así por ejemplo, la relación raíz-tallo, vigor del mismo, espesor de las hojas y desarrollo del tejido vascular.

También Popp (3), en coincidencia con otros autores, señaló que el alargamiento del tallo en los vegetales varía en forma inversa con la intensidad de la luz; en cambio el espesor en forma directa con la misma. Observaciones realizadas en los tallos de algunas herbáceas expuestas a la luz, mostraron formas en "zig-zag", mientras que en la oscuridad crecían rectas.

Es indudable que el efecto morfogenético más importante y más estudiado es el de la "ahilación". Los primeros trabajos indicaron que el "ahilado" significaba un considerable aumento de la longitud de las células de los tejidos en la oscuridad. Cabe señalar, como aclaración, que en procesos de éste tipo un aumento de la longitud puede ser consecuencia también de la proliferación celular.

El efecto de la luz puede ser diferente, según la parte de la planta que se considere. Así por lo que se expone más arriba se observa que el mismo se produce esencialmente en los

tallos, no así en las raíces, flores ni frutos:

Penfound (4) observó que los tallos de Heliopsis y Polygonum, que crecen pleno sol poseen una mayor cantidad de xylema y células con paredes más gruesas en el tejido mecánico, que aquellas mantenidas en invernáculo.

Talbert y Holch (5) ensayando con 37 especies, comprobaron que aquellas que se colocaban a sol directo, en comparación con otras de la misma especie en invernáculo, tenían las hojas más reducidas, lóbulos más profundos con nervaduras y bordes aserrados más pronunciados, superficies pilosas y pecíolos más cortos.

El mecanismo del efecto lumínico aquí comentado, es parcialmente conocido; se considera que se halla vinculado a las auxinas en su forma activa. Es bien conocido que la sensibilidad de los tejidos a las mismas, aumenta con la oscuridad. Numerosos autores han llegado a la conclusión de que la intensidad lumínica provoca entre otros efectos, la inhibición del agrandamiento celular y por lo tanto de los tejidos (6).

Calidad. Este tipo de estudios implica resolver varias dificultades técnicas entre ellas la obtención de longitudes de onda precisas, puras, con suficiente superficie en intensidad que permita el tratamiento simultáneo de numerosas plantas. De cualquier modo se han logrado resultados concretos.

Se ha aclarado perfectamente, que las mayores longitudes de onda sobre todo en la zona del rojo, afectan solo en pequeña proporción el alargamiento celular, mientras que los rayos azules poseen una acción francamente inhibitoria (7). Ya Mohr (8) trabajando con helechos, logró numerosos datos que demostraron lo anteriormente señalado:

Lo mismo ocurrió en los vegetales superiores. Así Vinice (9) estudió el efecto de la luz sobre distintas especies y observó que al aumentar la longitud de onda, la inhibición en el alargamiento del tallo, la longitud de los internudos y el desarrollo de las hojas, era menor. Es indudable, como ya lo

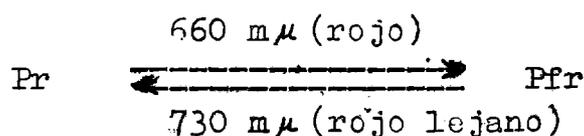
había sugerido Stolwik (10) que la relación entre la longitud de onda y la producción de las auxinas, jugaba un rol importante en la mayoría de éstos fenómenos.

Se ha comprobado en los últimos años que las radiaciones superiores 700 m $\mu$  (radiaciones rojo lejano) posee una efectiva influencia sobre la fotomorfogénesis y no producen efecto importante sobre la fotosíntesis (11). Para completar el cuadro de los procesos fotomorfogénicos, en lo referente a calidad, no podemos dejar de referirnos al fitocromo y las radiaciones de la zona roja (660 m $\mu$ ) y rojo lejano (730 m $\mu$ ).

El fitocromo es un sistema de pigmentos fotoreactivos que se encuentran en los vegetales. Según se ha podido comprobar es una cromoproteína soluble, presente en el citoplasma, que por técnicas adecuadas se ha podido aislar y mantener en solución. Su conocimiento analítico y su valoración pudo lograrse merced a la espectrofotometría diferencial (12).

Los estudios realizados en base a esa técnica, demostraron que el fitocromo, desde el punto de vista fisicoquímico, funciona como un sistema reversible. Así, se ha podido comprobar que en vegetales mantenidos en la oscuridad, se presenta bajo una forma cuyo espectro de absorción posee un pico máximo de 660 m $\mu$ , en la bibliografía se lo representa como: Pr (fitocromo rojo). También se observó que si la forma Pr se expone a la luz roja, se convierte en otra forma: Pfr (fitocromo rojo lejano), cuyo espectro de absorción presenta un pico máximo de 730 m $\mu$ . Finalmente y como consecuencia de la reversibilidad del sistema, la irradiación de ésta última forma con rojo lejano, revierte a la forma: Pr.

Lo dicho anteriormente se representa con el siguiente esquema:



Además se pudo comprobar que Pfr en la oscuridad, se

transforma espontáneamente y lentamente en Pr. Como resultado de algunas investigaciones, se sugirió la posibilidad de que fitocromo rojo lejano, funcione como una enzima de gran actividad en algún mecanismo aún desconocido del metabolismo celular, provocando respuestas morfogénicas (11). Todos estos procesos se desarrollan durante exposiciones a luz de poca intensidad, por eso se los conoce como reacciones de baja energía.

Algunos autores han sugerido la posible presencia en los vegetales de otros sistemas fotoreactivos relacionados con la fotomorfogénesis. Estos sistemas, a diferencia del fitocromo, actuarían como consecuencia de irradiaciones de alta energía (HER) durante un período relativamente largo de exposición. Los espectros de acción de los mismos, muestran picos en la zona azul y rojo extremo. Así Siegelman y Hendrick (13) (14) y Mohr (15), hablan de la posible existencia de un compuesto formado por una flavoproteína y cobre (butiril-coenzima A-dehidrogenasa) que absorbería ese tipo de irradiación. Según ellos, la activación de una enzima, sería la causa del efecto morfogénico de las irradiaciones de alta energía (HER).

Por otro lado, posteriormente el mismo Hendricks y Borthwick (16), interpretaron de una manera distinta el problema; en la opinión de ellos, la reacción fotoquímica dentro de esos sistemas es sensibilizada de alguna manera por el sistema fitocromo.

Ambas teorías, en la actualidad, están lejos de dar una correcta solución al problema, especialmente teniendo en cuenta que muy recientemente Siegelman postula una posible destrucción de Pfr por causas aún sin determinar (17).

Finalmente, cuando se habla de duración de la luz, es necesario discriminar entre la influencia de una luz que actúa en forma continua un período de tiempo dado, y aquella cuyo tiempo total de acción es el mismo, pero con intervalos intercalados de oscuridad. La influencia del primer tratamiento, sobre el desarrollo, es generalmente distinto del segundo.

Además, los estudios realizados han permitido comprobar que la acción de la luz está vinculada con el período de oscuridad; así como ejemplo podemos decir que un breve período de luz intensa, suministrado en el medio del lapso de oscuridad, puede inhibir totalmente el efecto morfogenético de ésta última (18).

Se ha observado que las tres variables ya señaladas con respecto a la luz, al estudiar los vegetales, no son perfectamente separables, es más, es muy probable que cualquiera de ellas puede modificar el efecto de la otra.

Concluiremos diciendo que el cúmulo de observaciones realizadas, algunas veces contradictorias, han llevado en el momento actual, al concepto de que la fotobiología de los vegetales, sin ninguna duda, está estrechamente conectada con la fisiología del desarrollo. Así se ha observado que no solamente la cantidad, sino también la calidad de la respuesta de un órgano de una planta (por ejemplo, internodio), ante un mismo programa de irradiación, puede depender de la edad de la misma en el momento del ensayo. También se ha podido comprobar que las interacciones y correlaciones entre los diferentes órganos de una misma planta en crecimiento pueden influir en la respuesta de un órgano particular.

\* - - - -

## Metabolismo del Nitrógeno

### Revisión bibliográfica.

Realizamos una exposición general de las investigaciones y conclusiones más importantes en el campo del metabolismo del nitrógeno en los vegetales.

Si se realiza un estudio de los distintos compuestos nitrogenados que se encuentran en los vegetales, como también del rol que desempeñan, y se compara con los mismos en los animales, se puede afirmar sin lugar a duda que existe una marcada diferencia. Así, se aprecia que en los vegetales existe una gran variedad de reacciones metabólicas, y sobre todo, un verdadero proceso de reaprovechamiento de los distintos compuestos nitrogenados.

Como bien comentaron Steward y Bidwell (19), los vegetales, partiendo por un lado del nitrato ó del amoníaco, y por otro lado del carbono fijado por medio de la fotosíntesis, realizan lo que los autores llaman la síntesis "primaria" de la proteína. Por el contrario, los animales dependen de esa formación de proteínas que consumen en forma pasiva, y que después del proceso metabólico son eliminadas como restos nitrogenados volátiles ó de excreción.

Es evidente que ese proceso general de "reciclo" y "reuso" del nitrógeno, ya señalado más arriba en los vegetales, exige un mecanismo apropiado de almacenamiento, recuperación y traslado del mismo hacia el torrente metabólico principal.

Por lo demás, se hace necesaria la presencia de compuestos ricos en nitrógeno, acondicionados de tal manera, que permitan cumplir con esa demanda en cualquier punto del vegetal, y mantener una reserva "activa" del mismo. Entre éstas sustancias ricas en nitrógeno, numerosos autores e investigadores señalaron como más importante, las amidas asparagínica y glutamínica; como así también la arginina.

Ya Pfeffer y Schulze, cada uno por su lado, bosquejaron la idea de que el amoníaco y las amidas cumplían un importantísimo rol tanto en la síntesis metabólica de las proteínas como en su desdoblamiento, e inclusive, ya sugerían que esas fuentes ricas en nitrógeno, junto con los ácidos orgánicos y los esqueletos de carbono que provenían de los azúcares, servirían de punto de partida para una posterior realización del metabolismo protéico.

Además, Prianishnikov, en sus ya clásicas investigaciones, comprobó que cuando se agregaban hidratos de carbono a plántulas que crecían en la oscuridad, se producía una acumulación de asparagina en las mismas. Viets, Whitehead y Moxon (20), con sus ensayos confirmaron también, que en esos casos se producía acumulación de amidas. De acuerdo a esos resultados, se aceptó entre otras cosas, que la aparición de amidas significaba la eliminación de amoníaco que se producía por alguna causa en el proceso metabólico. Es evidente, que la eliminación del mismo, se lograba por la combinación con los ácidos aspártico y glutámico.

Kretovich (21) por su lado va aún más lejos, diciendo que no solo la biosíntesis de los aminoácidos y amidas está vinculada con el tenor de los hidratos de carbono que posee el vegetal, sino también, que en cierto modo se halla afectada ó influenciada por la luz. Últimamente, Lähdesmäki (22) coincide en señalar que las dos amidas-asparagina y glutamina, son, en la mayoría de los vegetales, las fuentes más importantes de reserva de nitrógeno soluble.

Todo esto va señalando que en los vegetales existe un proceso de síntesis que es fundamental, y que es aquel que se efectúa para combinar el nitrógeno y los compuestos del carbono entre sí. Las ideas modernas, han venido señalando que para resolver ese problema se requiere un efectivo conocimiento sobre el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, más concretamente sobre los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs).

La confirmación de esos conceptos fueron dados en distintas circunstancias por Chibnall (23) y por Vickery (24), quienes coincidieron en señalar que los cetoácidos, que junto con los ácidos orgánicos forman parte del ciclo de Krebs, serían la "puerta de entrada" del nitrógeno en las combinaciones orgánicas, sirviendo de eslabón entre los hidratos de carbono y las proteínas. Ya anteriormente Knoop y Oesterlin (25) habían postulado que la formación de los aminoácidos se lograba partir de los cetoácidos y el amoníaco, hecho que se había comprobado en los animales. Es evidente que para ese momento, esas conclusiones significaron un gran paso adelante, pero como todavía no se tenía conocimiento de los sistemas enzimáticos que intervienen en las amidaciones reductivas, la teoría de Knoop quedó reducida a una hipótesis de trabajo.

No se puede dejar de comentar las importantes experiencias de Quastel y Wolf (26) (27), realizadas con restos celulares de Escherichia coli, que les permitió sintetizar en forma reversible el ácido L-aspártico, a partir del fumarato y del cloruro de amonio. Pero es indudable que los trabajos de Virtanen y Tartanen (28), significaron el trascendente hecho de haber logrado sintetizar por primera vez un aminoácido, el ácido aspártico, por medio de un sistema enzimático extraído de células vegetales. Ellos, por ese ensayo señalaron la presencia de la enzima "aspartasa", factor fundamental en la síntesis realizada.

Finalmente, Virtanen (29) indicó que la "aspartasa", que como ya se ha observado es la enzima específica para la formación del ácido aspártico partir del ácido oxalacético, existe en numerosos microorganismos y algunos vegetales superiores. La determinación de las propiedades y estructura de la misma ya había sido dilucidado por Ellfolk (30), quién la purificó y caracterizó, llegando a la conclusión de que es una metaloenzima.

También es necesario recordar que ya Fuller y Adler

(31) habían realizado el importante descubrimiento de que la enzima glutámico deshidrogenasa era específica para la combinación del ácido alfa-ceto glutámico con el amoníaco, para dar ácido glutámico. Esta enzima fué perfectamente estudiada en numerosos vegetales.

Paralelamente con estas investigaciones, en distintos trabajos, otros investigadores fueron aclarando las vías de síntesis ya señaladas. Así, por ejemplo, Wang y colab. (32), en sus ensayos confirmaron la presencia del acetato y del piruvato, como intermediarios en el camino que lleva a la formación del ácido aspártico, en el caso del acetato a través del ciclo de Krebs, y del piruvato por medio de un aporte extra realizado por la enzima málica ó por la reacción de Wood y Werkman.

Es indudable que habiéndose reconocido el camino metabólico para la obtención de los ácidos aspárticos y glutámico, era obvio que la adición de un grupo amino a los mismos significaba la obtención de las amidas correspondientes, ya señaladas como fundamentales en el cuadro metabólico de los compuestos nitrogenados solubles. Webster y Varnor (33) trabajando con lupino y con trigo germinado, confirmaron la síntesis de la asparragina a partir del aspartato y del amoníaco. En el caso del trigo germinado, se comprobó que el adenosintrifosfato (ATP) y el ión magnesio, son factores esenciales de síntesis. Además ellos mismos, trabajando con el extracto, observaron que se lograba la formación de aspartilhidroxamato, a partir del aspartato, hidroxilamina, ATP e ión magnesio. Estos resultados indicarían que la asparragina, se formaría en los vegetales, por un camino similar al que sigue la formación de la glutamina, que como se sabe se estudió exhaustivamente en los animales.

La síntesis de ésta última es la siguiente:

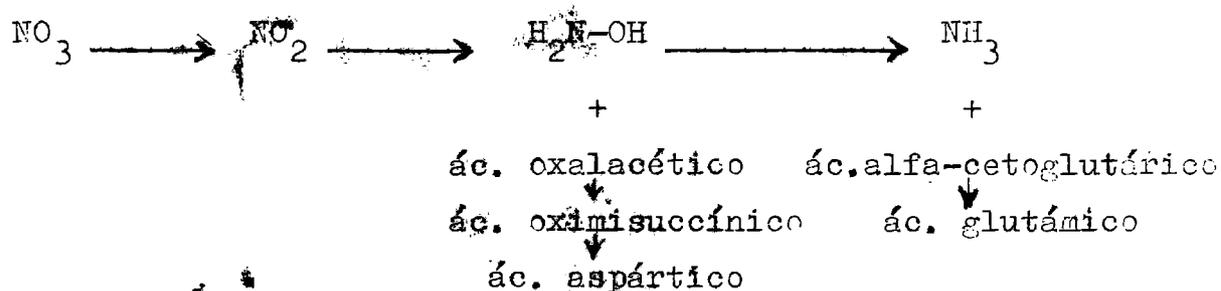


La misma se ha demostrado perfectamente en los vegetales (34) (35). Además, Bidwell (36) trabajando con hojas

de trigo, comprobó en sus experimentos lo señalado anteriormente, ó sea que tanto aspartato, glutamato, como así también la asparragina y la glutamina, se lograban de acuerdo a los caminos ya señalados.

Una confirmación del esquema hasta aquí expuesto, es lo publicado por Steward y Durzan (37), a raíz de un trabajo que se había realizado en forma paralela en Wisconsin (U.S.A.) y en Finlandia, con el mismo material y con resultados distintos. Para explicarlo, ellos sugirieron dos vías metabólicas alternativas, en donde las condiciones nutricionales y ambientales determinarían, cuál funcionaría, a los efectos de permitir la entrada del nitrógeno. Concretamente, una se efectuaría a través de un cetoácido de cuatro carbonos, que en última instancia produciría ácido aspártico, y la otra a través de un cetoácido de cinco carbonos, que finalmente daría ácido glutámico.

Esquema:



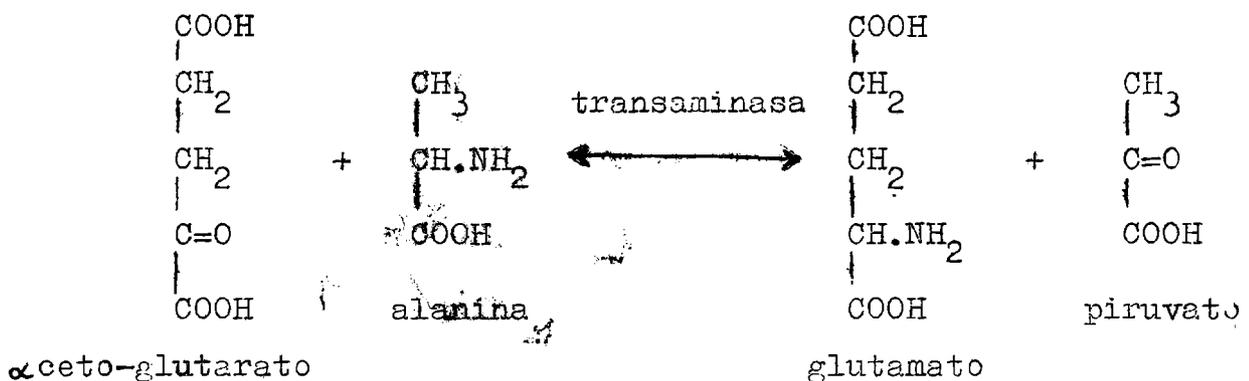
Complementaron la explicación diciendo que de los ácidos formados, finalmente, derivarían los correspondientes amidas, y de allí, por transaminación toda una serie de aminoácidos.

Trataremos brevemente un punto que interesó a los investigadores, el mismo consiste en la forma que el nitrógeno se incorpora a los cetoácidos. Como ya se ha demostrado, los ácidos glioxílico, pirúvico, oxalacético y alfa-cetoglutámico, reaccionan fácilmente con la hidroxilamina produciendo la oxima correspondiente y de allí por reducción aminoácidos. Los mismos son respectivamente glicocola, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico. Siempre se pensó que ese podría ser el camino,

natural y, como ya vimos, Steward así lo planteó en el esquema anteriormente presentado. Concretamente, en la formación del ácido glutámico, se comprobó en los vegetales la existencia del ácido alfa imino glutárico, posteriormente reducido por la enzima glutámico deshidrogenasa para dar el aminoácido ya indicado.

No debemos dejar de tener en cuenta los procesos de transaminación, que por otro lado han sido perfectamente estudiados en tejidos animales (38). Son procesos reversibles que permiten la posibilidad de la existencia de otros caminos metabólicos y que, concretamente coloca a los aminoácidos en una posición tal que ellos a su vez podrían generar otros aminoácidos primarios.

Ejemplo:



Precisamente Albaun y Cohen (39), observaron en plantas de avena, rápidas transaminaciones entre el ácido oxalacético y el ácido glutámico. También Leonard y Burris (40) estudiaron la actividad de distintas transaminasas en varios vegetales y, Meister y colab. (41), comprobaron éstos procesos en distintas transaminaciones que partían de la glutamina y la asparragina, y dirigida hacia un cierto grupo de cetoácidos. Wilson y colab. (42), controlaron esos procesos con  $C^{14}$  también en los vegetales, aportando datos de interés.

Finalmente merecen destacarse estudios efectuados en el coliflor: se determinó el mecanismo y la cinética de las transaminaciones sobre el sistema glutámico-oxalacético transaminasa (43).

Esta revisión bibliográfica efectuada nos permite creer

que cualquier aminoácido ó cetoácido puede tener varios orígenes, pues, aparte de los procesos de transaminación, pueden ser obtenidos por otros caminos: a través de condensaciones carboxílicas, oxidaciones etc. Un ejemplo aclaratorio puede ser el ácido oxalacético y el ácido alfa-cetoglutarico. Los mismos pueden obtenerse en forma directa a partir del ciclo de Krebs, ó en forma indirecta por transaminación del ácido aspártico y del ácido glutámico (29).

Por último, no podemos dejar de comentar algo que señalan los autores: la presencia en los vegetales de una cantidad mayor de cetoácidos que los que forman parte del ciclo de Krebs. Los ensayos de fijación de los cetoácidos presentes en los tejidos, con una solución alcohólica ácida de 2,4 fenilhidrazona, purificados posteriormente como sal de sodio e hidrogenados a los efectos de transformarlos en el aminoácido correspondiente, así lo demostraron (44) (45).

Para finalizar esta reseña hemos considerado conveniente en primer término, tratar brevemente la participación de los aminoácidos en la formación de las proteínas pues como ya se ha demostrado, la formación de las mismas requiere la presencia simultánea de los veinte aminoácidos llamados fundamentales y la omisión de cualquiera de ellos e inclusive de cualquiera de las amidas (glutamina, asparragina), actuando como factor limitante, frenan su formación (46); y en segundo término, recordar que los ribosomas, componentes de la célula vegetal, sintetizan las proteínas ensamblando en forma ordenada los distintos aminoácidos, operación que se efectúa de acuerdo a una guía ó modelo proporcionada por la información que transporta el RNA mensajero (código genético) (47). El origen de esa información se halla en el DNA de los cromosomas del núcleo, que como ya es sabido, imprime copias de si mismo en forma de RNA (48).

### Objetivos concretos

Observaciones realizadas en el laboratorio del Instituto de Fisiología Vegetal, comprobaron que las plantas de Tropaeolum majus sometidas a la luz solar directa, presentaban ciertas características que las distinguían de aquellas mantenidas a la luz solar indirecta (49) (50) (51). Entre las más importantes podemos señalar, un color verde amarillento, mayor contenido en antocianinas y un menor desarrollo que se manifestaba en el acortamiento de los tallos, pecíolos y en la reducción de las láminas foliares. Figura 1,b:



Figura 1-a: Tropaeolum majus normal. b: enanzada

Como ya se ha señalado en la introducción de nuestra Tesis, la disminución del crecimiento de las plantas por efecto de la luz directa, es un proceso que se presenta en forma muy general y que precisamente en la especie ya nombrada, posee características tan agudas que la presentan como una planta experimental ideal para estudiar ese tipo de problema. Además

distintas determinaciones realizadas por los autores arriba mencionados, fueron reuniendo una serie de informaciones: así por ejemplo, las plantas afectadas por la luz solar directa (que llamaremos enanizadas), presentaban una menor actividad de la enzima indolacético oxidasa, una respiración muy reducida y un cociente respiratorio menor. Cabe señalar, que en el caso de la reducción respiratoria se alcanzaban valores de hasta más de un 50 %, con respecto a las plantas mantenidas a la luz solar indirecta (ó plantas normales). (Sivori y Rumi, 1968- no publicado).

Lo cierto es, que se fueron desarrollando una serie de interrogantes que era necesario aclarar. Precisamente el dato respiratorio, sugirió la necesidad de averiguar el contenido de los diversos compuestos que forman el ciclo de Krebs. Realizadas las determinaciones correspondientes se obtuvo como dato fundamental que se produce una acumulación de ácido cítrico en plantas enanizadas, además de presentar diferencias en otros ácidos orgánicos. El resultado anteriormente logrado hizo pensar en la conveniencia de medir la actividad de la enzima aconitasa, que como sabemos actúa en el metabolismo del ácido cítrico en el ciclo de Krebs. Ensayos que hemos efectuado en el laboratorio dieron datos que sugirieron que al menos en parte, esa acumulación podría deberse a una menor actividad enzimática de la enzima mencionada. (Sivori y Alaniz, a publicar).

Como se puede apreciar todos éstos resultados fueron conformando un esquema de trabajo, cuyo paso siguiente nos señalaba, dada la vinculación que existe entre los ácidos del ciclo de Krebs y los aminoácidos a través de los cetoácidos, la conveniencia de estudiar el cuadro de los aminoácidos libres en las plantas enanizadas.

Los primeros ensayos cromatográficos realizados con tal fin indicaron un hecho importante: la disminución del contenido de la asparragina en las plantas enanizadas de Tropaeolum majus con respecto a las plantas normales. Como dato ilustrativo, es necesario agregar que ya Schulze había establecido

que ciertas especies presentan una notable acumulación de la asparragina, así él citaba a *Papaver somniferum* (Papaveraceae), *Pinus sylvestris* (Coniferae) y *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) (52).

Dado el valor fundamental que se les reconoce a las amidas en general y, en nuestro caso particular a la asparragina, se sugirió la conveniencia de analizar con atención su incidencia en el cuadro metabólico general, particularmente en el protéico. Para ello se completó el siguiente esquema de trabajo, al cual nos ajustaremos en nuestra labor:

- 1) Acidos aminados libres.
- 2) Acidos aminados provenientes del hidrolizado de proteínas solubles en agua.
- 3) Proteínas totales (bruta).  
" solubles en agua.
- 4) Separación electroforética de proteínas solubles en agua.

- - - - -

Acidos aminados libres1) Bibliografía

Se determinaron los aminoácidos libres del extracto vegetal, por medio de la cromatografía en papel, bidimensional ascendente, de acuerdo al método empleado por Ramirez de Gugliermone y Gómez (53) para líquidos biológicos en general. Se utilizó dos tipos de solventes, el primero en solución acuosa amoniacal (alcalino) y propanol normal, y el segundo, en un medio acuoso fórmico (ácido) con propanol normal y metiletilcetona.

Para revelar el cromatograma desarrollado, se siguieron los pasos del procedimiento de Cook y Luscombe (54), modificado por los autores arriba indicados que consiste en el tratamiento con una solución de ninhidrina en etanol 95 % más ácido láctico. Ubicadas las manchas, fueron eluidas con una solución de etanol y sulfato de cadmio (55). La elección de la sal de cadmio, significó obtener una absorbancia máxima con un pico muy estrecho de 510-515  $m\mu$ , en los complejos formados con todos los aminoácidos, salvo la fenilalanina que es de 500  $m\mu$ . La gran estabilidad y sensibilidad de ésta reacción de coloración, significó un considerable aporte para estimar pequeñas cantidades de aminoácidos presentes.

Los valores hallados en el laboratorio de los distintos aminoácidos se expresaron en base a curvas patrónes trazadas con aminoácidos conocidos. Para ello se efectuaron siembras de alícuotas de los mismos que contenían desde 10  $\mu g$  hasta 40  $\mu g$ . Se leyó la absorbancia lograda y se trazó las curvas correspondientes; la respuesta fué lineal.

El ensayo se efectuó sembrando una alícuota del extracto soluble de ambas plantas, sobre el papel cromatográfico elegido y realizando la técnica bidimensional ascendente y posterior revelado de las manchas. La determinación cualitativa de los aminoácidos buscados, se logró comparándolos con "mapas" de aminoácidos conocidos efectuados en las mismas

condiciones. En cuanto a la determinación cuantitativa, se efectuó eluyendo esas manchas con soluciones adecuadas y midiendo la intensidad de color desarrollado con un espectrofotómetro; las curvas patrones previamente trazadas, permitieron expresar los resultados en  $\mu\text{g}$  de aminoácidos solubles.

## 2) Técnica experimental.

### Material vegetal utilizado

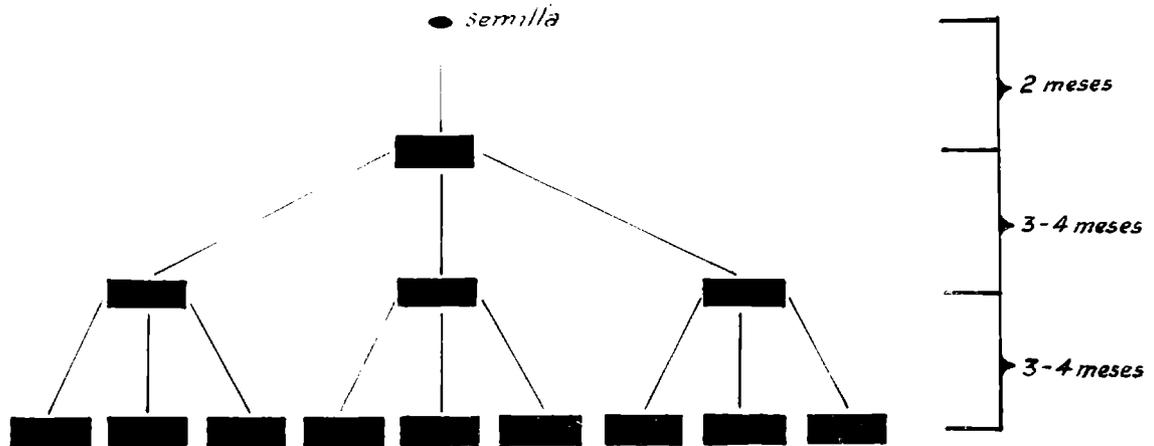
El material vegetal utilizado en todos éstos ensayos, y en los siguientes, proviene de un mismo clon logrado y mantenido en el laboratorio del Instituto de Fisiología Vegetal (Fac. de Agronomía).

Al decir clon, se está expresando la existencia de un conjunto de individuos (plantas en éste caso), que poseen un origen común y cuya descendencia se ha efectuado vegetativamente, lo que ha permitido conservar la uniformidad genética. Para obtenerlo, de una serie de plantas de una misma especie logradas, por semilla, se eligió un individuo que presentaba una serie de caracteres de interés, de ese individuo se obtuvieron estacas con las que se efectuó el enraizamiento. Brevemente señalaremos los pasos que se efectuaron para lograrlo: se cortaron tres o cuatro brotes de 10-15 cm. de largo, que incluían 4, ó 5 nudos y en las que solamente se conservaron las hojas de crecimiento; se sumergió en agua (1 día), se los plantó en terrina con vermiculita (2 ó 3 días) para finalmente llevarlo a invernáculo (luz) en donde se los dejó hasta que se efectuó un buen enraizamiento. Logrado el mismo, cada estaca se trasplantó a maceta y luego se lo dejó en condiciones de vidriera (conservando en ésta etapa y en todas las anteriores las condiciones óptimas de humedad) hasta que adquirió un tamaño apropiado: ramificaciones, crecimiento del tallo, etc., para así nuevamente obtener una serie de estacas y reiniciar el proceso.

Un esquema aclarará lo expresado, indicándose también

el tiempo que transcurre entre una etapa y la otra.

ESQUEMA DE FORMACION DE UN CLON



■ ETAPA EN RAIZAMIENTO Y POSTERIOR EXTRACCION DE ESTACAS

Figura 2

Esta metodología se continúa hasta lograr el número de plantas que se desea. El conjunto así logrado es el clon. El mismo procedimiento se lleva a cabo para su mantenimiento. Obtención de plantas enanas:

Para obtener las plantas que denominamos enanas, se tomó un número conveniente de individuos pertenecientes al clon, que se encuentran en macetas, y se los colocó a la luz solar directa durante un período continuo de un mes o un mes y medio, adquiriendo en esas condiciones los caracteres propios de esas plantas: entrenudos cortos, pecíolos cortos, pigmentación antociánica más intensa en los tallos y la lámina foliar más chica con un color verde amarillento.

Plantas normales:

Las plantas así llamadas, como bien dice su denominación, presentan los caracteres de las plantas desarrolladas normalmente, para ello se mantuvieron en sombrá-culo.

La técnica experimental se efectuó en varias etapas:

a) toma de muestra, b) preparación de la muestra para el análisis, c) determinación de peso seco, d) extracción, e) separación cromatográfica y f) revelado y valoración.

a) toma de muestra.

En forma paralela, se tomaron de plantas enanas y normales, ápices con dos ó tres hojas en formación que incluye: lámina, pecíolo, meristema apical y parte de tallo. Se pesó aproximadamente unos 75 g. El material se transportó hasta el laboratorio, en recipientes cerrados y con un ambiente de humedad adecuado, manteniéndose en esas condiciones hasta el momento de realizar los ensayos.

b) preparación de la muestra para el análisis.

El material se colocó sobre una placa de vidrio y se cortó en trozos muy pequeños, efectuándose el tratamiento que corresponde para así lograr un material representativo y homogéneo. Se separaron 68 g para la extracción y con el resto se efectuó peso seco.

c) determinación de peso seco.

Se determinó a 100 °C hasta peso constante, los resultados fueron:

Para Tropaeolum majus normal: 7,7 % peso seco.

" " " enanizada: 11,7 % peso seco.

d) extracción.

Se efectuó utilizando un medio hidroalcohólico, según lo indicaron Thompson y Steward (56). El material cuyo peso se conoce, 68 g para ambos tipos de vegetales, se desintegró en un mortero con arena de cuarzo y pilón.

El orden de extracciones fué el siguiente:

1ra. extracción,	se usó	75 ml	de alcohol	96°	, en frío.
2da.	"	,	"	"	80 ml " " 80°, " "
3ra.	"	,	"	"	65 ml " " 80°, " "
4ta.	"	,	"	"	55 ml " " 80°, " "
5ta.	"	,	"	"	50 ml " " 80°, baño maría 10-15'.

Después de cada extracción se centrifugó a aproximadamente 4.000g y se reservaron los extractos solubles. Siguiendo este esquema, se aseguró la total extracción de los aminoácidos. Se reunió el total de extractos y se efectuó la concentración en el vacío, por medio de un "rotavapor" marca Büchl. Esta operación permitió la eliminación total del alcohol y parte del agua a temperaturas menores de 35 °C, lo que aseguró la no destrucción de aminoácidos, como por ejemplo, la glutamina (37). Finalmente los concentrados acuosos de cada extracto total, fueron llevados a un volumen de 60 ml.

e) separación cromatográfica.

Se utilizaron aminoácidos "patrones", adquiridos en el comercio. Los solventes usados, fueron todos pro-análisis (Merck, B.D.H. etc.); no obstante, el propanol normal utilizado se destiló y, la metil-etil-cetona se rectificó en una columna de 40 cm de altura.

Los ensayos se realizaron en dos cubas de vidrio, especiales para cromatografía ascendente, una de ellas de 30 cm de altura y 25 cm de diámetro y, la segunda de 65 x 30 cm, ambas con sus paredes totalmente tapizadas con papel de filtro, embebido en el solvente que se usó para efectuar la corrida, detalle técnico que aseguró homogeneidad ambiental dentro de las cubas. Como papel cromatográfico se usó Whatman N° 3MM, en bandas de 30 x 40 cm; el material extraído se sembró a una distancia de 2,5 cm del borde inferior derecho y se dobló sobre si mismo formando un cilindro, mantenido en posición con un gancho especial de vidrio. Luego se sumergió en la mezcla solvente que cubre el fondo de la cuba, y se dejó correr hasta 1 cm del borde superior. Haciendo girar el papel en ángulo recto, se repitió la misma operación en la otra cuba y con la segunda mezcla de solventes.

Solvente I: propanol normal: hidróxido de amonio 3 %. (4:1 v/v).

Solvente II: propanol normal: metiletilecetona: ácido fórmico 25 % (5:3:2 v/v).

La corrida con el solvente I se efectuó en un tiempo aproximado de 10 hs. Se retiró el papel de la cuba y se dejó en un ambiente ventilado que permitió eliminar por evaporación restos del solvente (aprox. 2 hs.). Se repitió el ensayo y luego se efectuó la corrida con el solvente II, en la segunda cuba, que se prolongó durante 10 hs. La última eliminación del solvente, se prolongó un tiempo no menor a 12 hs., detalle técnico que aseguró posibles interferencias de restos de éste último en el proceso de revelado.

f) revelado y valoración.

El cromatograma se sumergió en una solución que contenía 1 g de ninhidrina en 100 ml de alcohol etílico 95 % y ácido láctico al 1 %. Luego la hoja de papel embebida se dejó secar bajo campana, a temperatura ambiente, durante 30 min. y, posteriormente se colocó en estufa a  $105 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 4 min. Las manchas logradas, se compararon con "mapas" de aminoácidos conocidos. Según la ubicación de las mismas, se determinó a que aminoácido corresponde.

A continuación fué recortada la zona cubierta por la mancha, y el trozo de papel se sumergió en un eluyente constituido por 7,8 ml de etanol al 90 % y 0,2 ml de sulfato de cadmio al 1%. Al mismo tiempo se preparó un "blanco" utilizando para ello una zona del cromatograma lo más próximo posible a la mancha y de área similar.

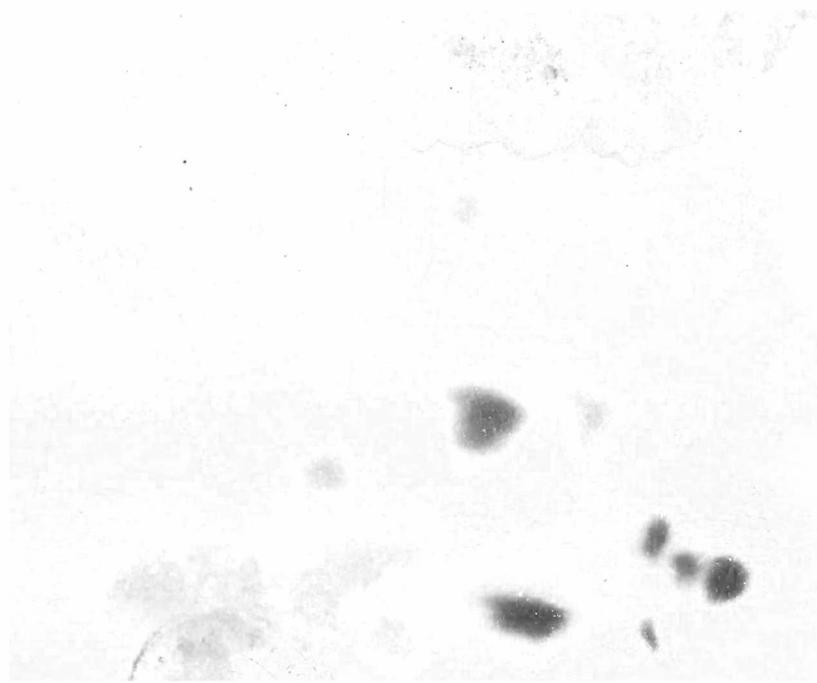
Después de una hora de contacto, los colores desarrollados fueron valorados con un espectrofotómetro Bausch y Lomb "Spectronic 20". Los datos así obtenidos fueron llevados a las curvas patrones trazadas, como ya se indicó, con muestras conocidas. Habiendo determinado los microgramos sembrados, el volumen de siembra, volumen total de extracto, gramos de peso fresco, y peso seco de la planta, se obtuvo el valor final de cada aminoácido expresado en mg/g peso seco. En base a éstos datos se creyó conveniente calcular el porcentaje relativo de cada aminoácido, a los efectos de conocer su incidencia particular en el cuadro total, en cada

tipo de planta.

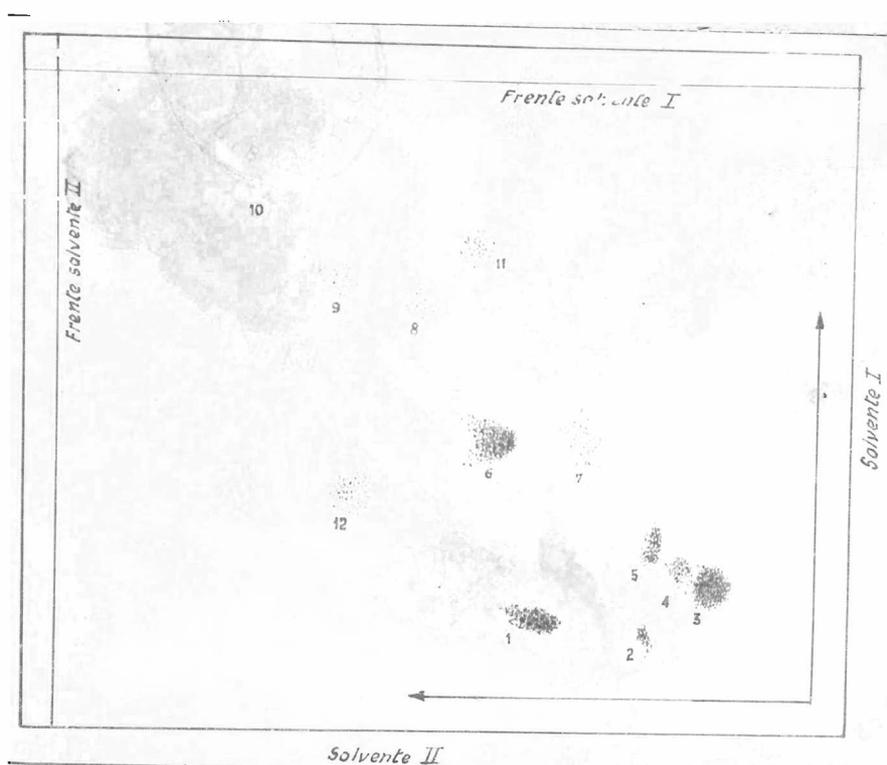
Por último debemos recordar que el volumen de extracto a sembrar se halla condicionado a la necesidad de obtener un revelado de manchas perfectamente definidas. Los ensayos efectuados determinaron que las siembras de 15 y 30 microl. eran las más adecuadas.

### 3) Resultados.

a)

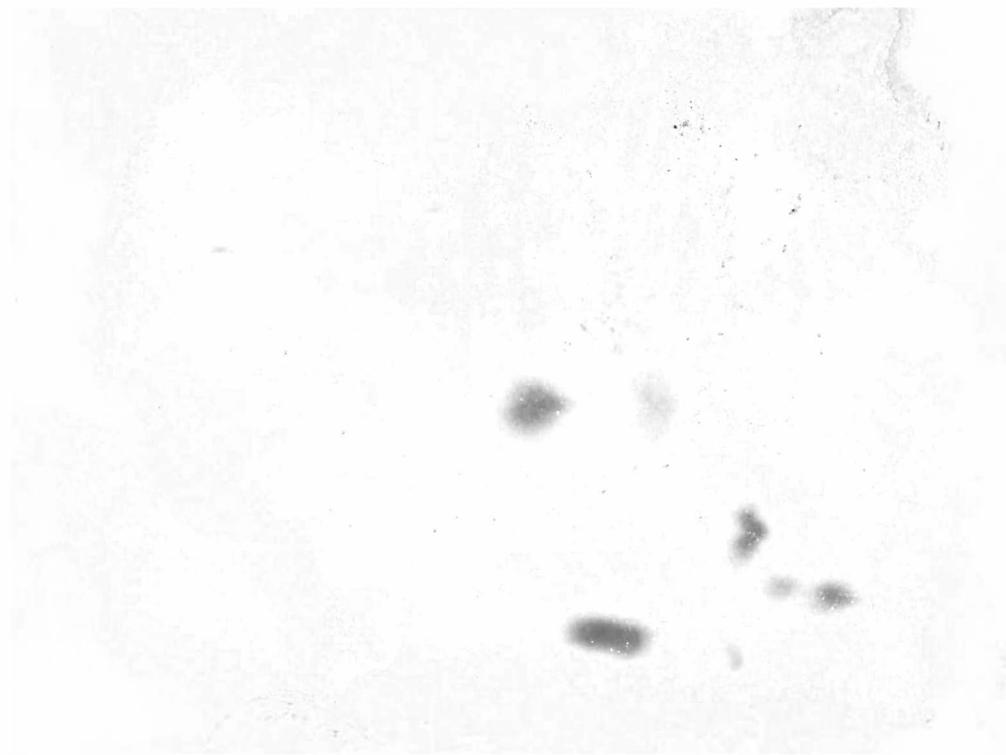


b)

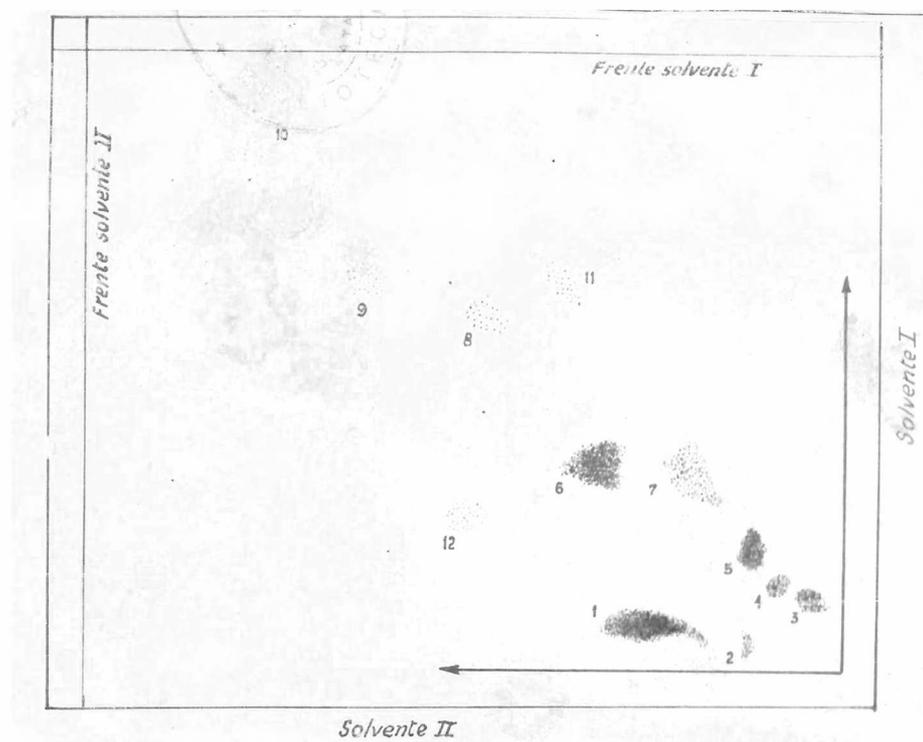


1- ác. glutámico 2 - ác. aspártico 3 - asparragina 4 - glutam.ina  
5 - glicocola-serina 6 - alanina 7 - treonina 8 metionina 9 valina  
10 - leucina 11 - etanolamina 12- $\gamma$ amino butírico.

a)



b)



1- ác. glutámico 2 - ác. aspártico 3 - asparracina 4 - glutamina  
 5 - glicocola-serina 6 - alanina 7 - treonina 8 - metionina 9 - valina  
 10 - leucina 11 - etanolamina 12- $\gamma$  amino butírico.

Figura 4- T. majus enana, a: cromatograma, b: dibujo aclaratorio.

CUADRO COMPARATIVO DE ACIDOS AMINADOS

	<u>T. majus normal</u>		<u>T. majus "enanizada"</u>	
	<u>mg./g.p.seco</u>	<u>%</u>	<u>mg./g.p.seco</u>	<u>%</u>
1) <u>ác. glutámico</u>		10,71	3,18	15,56
2) <u>ác. aspártico</u>	<u>1,30</u>	<u>3,65</u>	<u>0,55</u>	<u>2,69</u>
3) <u>asparagina</u>	<u>13,78</u>	<u>38,65</u>	<u>3,82</u>	<u>18,69</u>
4) <u>glutamina</u>	0,51	1,43	0,34	1,66
5) <u>glicocola-serina</u>	0,63	1,77	0,70	3,42
6) <u>alanina</u>	14,29	40,07	10,60	51,86
7) <u>treonina</u>	0,49	1,37	0,68	3,33
8) <u>metionina</u>	0,65	1,82	0,43	2,10
9) <u>valina</u>	<u>0,19</u>	<u>0,53</u>	<u>0,14</u>	<u>0,69</u>
<i>suma.</i>	35,66	100,00	20,44	100,00

4) Discusión.

Según se deduce del cuadro anterior, la suma total de los aminoácidos libres determinados en plantas enanas, comparando con aquella de las plantas normales, disminuye aproximadamente en un 43%. Esa diferencia se halla representada, principalmente, por la asparagina y en pequeña proporción por el ácido aspártico. Así, si observamos los valores de la amida en plantas normales vemos que es de 13,8 mg/g p, seco y en cambio en plantas enanas de 3,8; lo que arroja una disminución de 72% en éstas últimas. Con respecto al ácido aspártico son respectivamente de 1,30 y de 0,55 mg/g p. seco.

Además observando los porcentos relativos de aminoácidos en cada planta, se concluye que la familia ác. aspártico-asparagina en plantas enanas, disminuye sensiblemente en sus valores con respecto al resto de los aminoácidos. El porcentaje de asparagina en plantas normales es de 38,7 en cambio en plantas enanas 18,7. Puede observarse por otra parte que el contenido de alanina aumenta en forma porcentual del 40 a casi el 52%.



Acidos aminados provenientes del hidrolizado de proteínas solubles en agua.

1) Bibliografía.

En nuestros ensayos se utilizó la técnica de extracción desarrollada por Bennett y Naylor (57) que consideramos la más adecuada para nuestros fines. La misma consistió en una doble extracción con molienda, del material vegetal en un mortero y pilón, en presencia de agua fría, centrifugación y reunión de los sobrenadantes, para finalmente precipitar las proteínas con ácido tricloroacético al 20%. Las proteínas así separadas se purificaron y se decoloraron quedando en condiciones de ser hidrolizadas.

La hidrólisis se efectuó con HCl 6N, en vacío y a una temperatura de 110 °C, según Moore y Stein (58), técnica que ya es común para éste tipo de operaciones.

2) Técnica experimental.

a) toma de muestra.

El material a utilizar, se recogió con las precauciones ya señaladas en la determinación de los aminoácidos libres.

Se trabajó en paralelo con plantas de Tropaeolum majus normal y enanizada. De cada una se tomó 10 g, de los cuales se reservó una parte para la determinación de los aminoácidos proteícos y el resto para el respectivo peso seco.

b) determinación de peso seco.

Arrojó los siguientes resultados:

T. majus normal: 12%

T. majus enanizada: 15%

c) extracción de las proteínas solubles en agua.

7 g del material vegetal (lámina, pecíolo, meristema apical y parte de tallo), se cortaron en pequeños trozos y se molieron utilizando un mortero y pilón, con arena lavada y agua destilada fría (volumen 30 ml). El homogeneizado fué centrifugado a 27.000g en una supercentrífuga marca "Sorvall" rotor SS-34, durante 10 min. La fracción sobrenadante se re-

servó y el insoluble se volvió a extraer nuevamente con agua destilada fría, se utilizó un volumen de 20 ml. Luego de centrifugar en las condiciones ya señaladas, el sobrenadante se reunió con el anterior dando un volumen final de 50 ml.

A 5 ml. del extracto anterior se le agregó igual volumen de ácido tricloroacético al 20%. Se dejó en digestión durante 10 min. Se centrifugó a 27.000g. (en el mismo tiempo) y se desechó el líquido sobrenadante. El insoluble de la operación anterior, se trato con 5 ml de ácido tricloroacético al 10%, se agitó, se dejó en reposo durante 10 min., centrifugando nuevamente en las condiciones ya indicadas.

El sobrenadante se descartó y el insoluble se decoloró de la siguiente manera: se incubó con 2 ml de una mezcla de etanol, éter y cloroformo (2:2:1 v/v/v), durante  $\frac{1}{2}$  hora a 37°C. La operación se repitió dos veces, centrifugando en cada caso y desechando el sobrenadante. El insoluble que quedó perfectamente decolorado, se secó para reducirlo a polvo de la siguiente manera: en un tubo se lo sumergió en un baño de agua que se hallaba a una temperatura de 40-50°C durante 15 min. A continuación se lo dejó en un desecador conectado a una línea de vacío durante el tiempo necesario (aprox. 1 hora). El polvo obtenido en cada caso se pesó.

Para T. majus normal: 9,7 mg.

Para T. majus enanizada: 6,8 mg.

d) hidrólisis ácida de la proteína.

Se tomaron cuatro tubos de paredes gruesas, con un cierto estrangulamiento cerca de la boca. Previamente se los lavó con una mezcla sulfocrómica, agua destilada y finalmente HCl 1N, dejándolos secar en estufa a 100°C. Los ensayos se efectuaron por duplicado en cada tipo de planta.

Para T. majus enanizada

tubo N° 1: 3,4 mg.

tubo N° 2: 3,4 "

Para T. majus normal

tubo N° 3: 4,6 mg.

tubo N° 4: 5,1 "

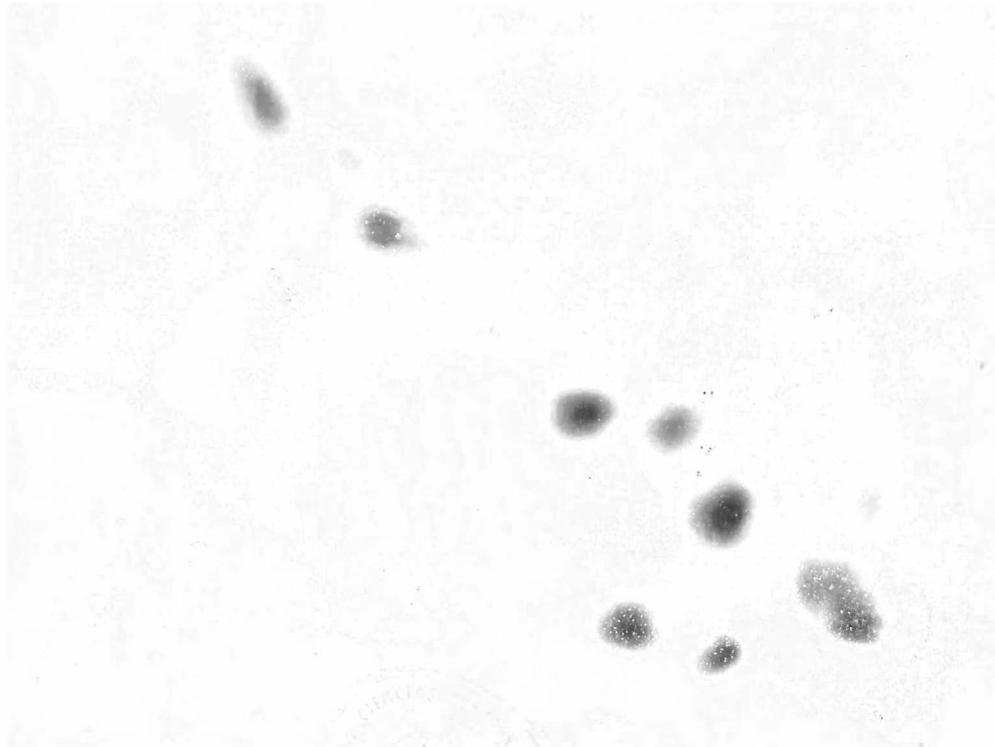
A cada tubo se agregó 1 ml de ácido clorhídrico 6N y se lo soldó, trabajando con soplete oxiacetilénico, a una línea de alto vacío de vidrio, conectado a una bomba difusora. Al mismo tiempo, se sumergió por su extremo en un recipiente con aire líquido. Cuando el líquido se congeló, se realizó el vacío. La intensidad del mismo se controló con un detector de alto vacío. A un valor adecuado se cerró la ampolla, trabajando siempre con soplete.

La hidrólisis de las proteínas se efectuó sumergiendo las ampollas en un baño de tolueno a ebullición, en un equipo con refrigerante de reflujo, lo que permitió mantener una temperatura de 110°C durante todo el proceso.

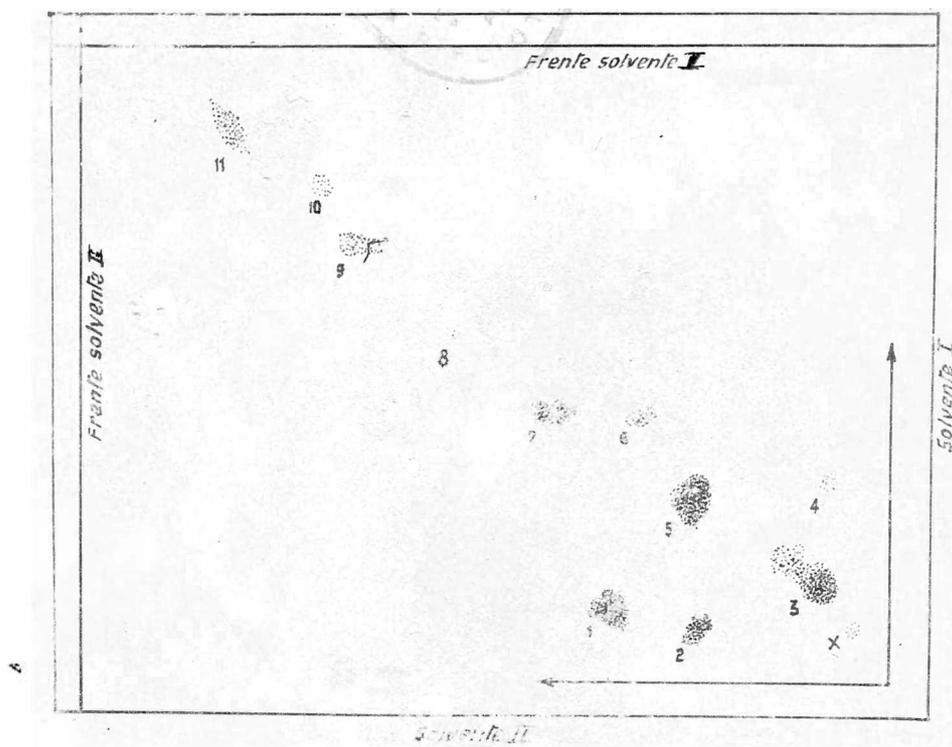
La operación se prolongó durante 20 hs. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se abrió la ampolla con una lima. El material hidrolizado se transfirió cuantitativamente a un tubo especial que se conectó a un rotavapor, marca Büchl, que trabajó en vacío y a una temperatura inferior a 30°C. Con ésta operación se eliminó totalmente el ácido clorhídrico. El residuo obtenido se disolvió en 1 ml de agua, para ambos tipos de plantas, efectuándose a continuación los ensayos cromatográficos. La técnica utilizada fué similar a la del ensayo de determinación de los aminoácidos libres, por lo tanto, no es necesario insistir en los detalles de la misma.

### 3) Resultados.

a)



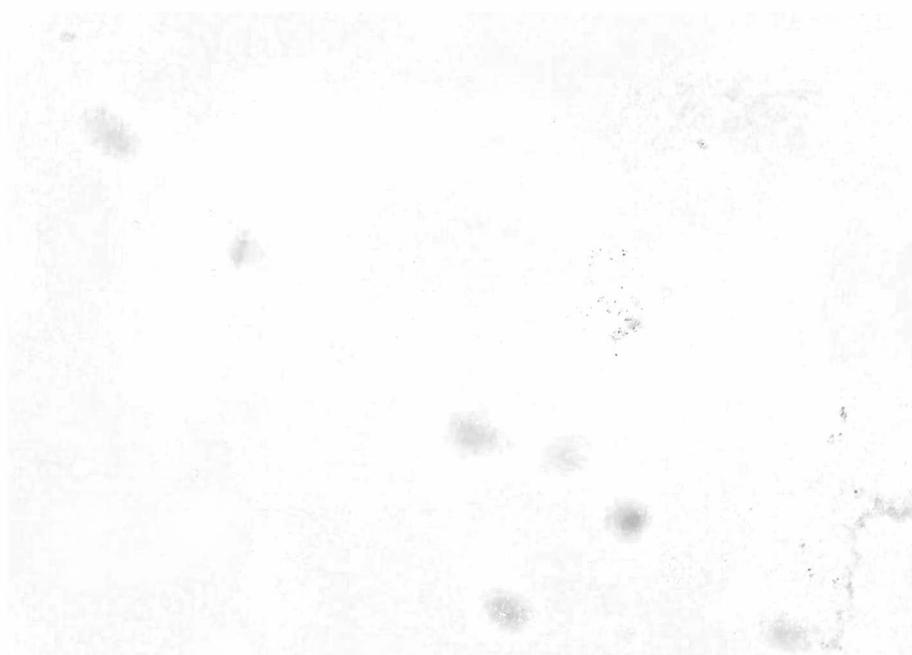
b)



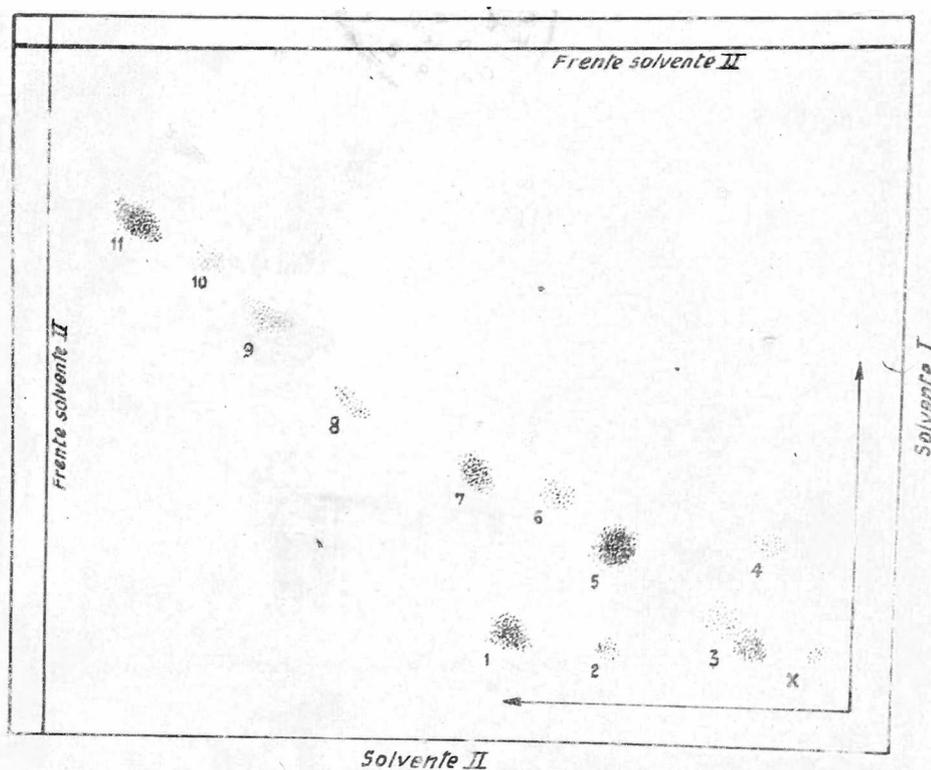
1) ác. glutámico 2) ác. aspártico 3) lisina-arginina 4) histidina  
 5) glicocola-serina 6) treonina 7) alanina 8) tirosina 9) valina  
 10) fenil alanina 11) leucina x = prod. degrad. cistefna.

Figura 5- a: cromatograma, b: dibujo aclaratorio. I. mejus normal

a)



b)



1) ác. glutámico 2) ác. aspártico 3) lisina-arginina 4) lisina  
 5) glicocola-serina 6) treonina 7) alanina 8) tirosina 9) valina  
 10) fenil alanina 11) leucina x = prod. degrad. cisteína.

Figura 6- T. majus enana, a: cromatograma, b: dibujo aclaratorio.

CUADRO COMPARATIVO DE ACIDOS AMINADOS

	<u>T. majus normal</u>		<u>T. majus "enanizada"</u>	
	<u>mg./g.p.seco</u>	<u>%</u>	<u>mg./g.p.seco</u>	<u>%</u>
1) <i>ácido glutámico</i>	16,4	16,6	5,5	12,6
2) <i>ácido aspártico</i>	7,6	7,7	3,2	7,3
3) <i>lisina arginina</i>	13,8	14,0	3,3	7,
4) <i>histidina</i>	—	—	—	—
5) <i>glicocola serina</i>	6,5	6,6	3,3	7,6
6) <i>treonina</i>	2,8	2,8	1,4	3,2
7) <i>alanina</i>	39,0	39,3	20,0	45,9
8) <i>tirosina</i>	2,1	2,1	1,3	3,0
9) <i>valina</i>	4,1	4,2	1,8	4,1
10) <i>fenilalanina</i>	<u>6,6</u>	<u>6,7</u>	<u>3,8</u>	<u>8,7</u>
<i>suma</i>	98,9	100,0	43,6	100,0

4) Discusion.

Los resultados indican ciertas diferencias entre el contenido porcentual de los ácidos aminados de las proteínas solubles, provenientes de las plantas normales y de las plantas enanizadas.

Dentro de las variaciones generales, algunas son de importancia evidentemente significativas. La primera es el menor contenido del conjunto lisina-arginina en plantas enanas, que baja del 14% al 7,6%. La otra variación evidente se encuentra en el contenido de alanina, que es de 39,3% en planta normal y llega a 45,9% en la planta enana. En éste caso se manifiesta un aumento, que puede ser de importancia dada las cifras relativamente altas de los valores absolutos. Como ya se mencionó éste aumento también ocurre en los ácidos aminados libres.

Posiblemente tengan valor las diferencias en ácido glutámico (16,6 y 12,6) y fenilalanina (6,7 y 8,7). Es prudente no tomar en cuenta las diferencias restantes, dado su bajo valor expresado en por ciento como sus menores valores absolutos.

Proteínas totales (bruta) y proteínas solubles en agua.

1) Bibliografía.

En nuestros ensayos se utilizó el micrométodo de Kjeldahl (59) (60). El equipo de destilación empleado (61) se observa en la figura 7

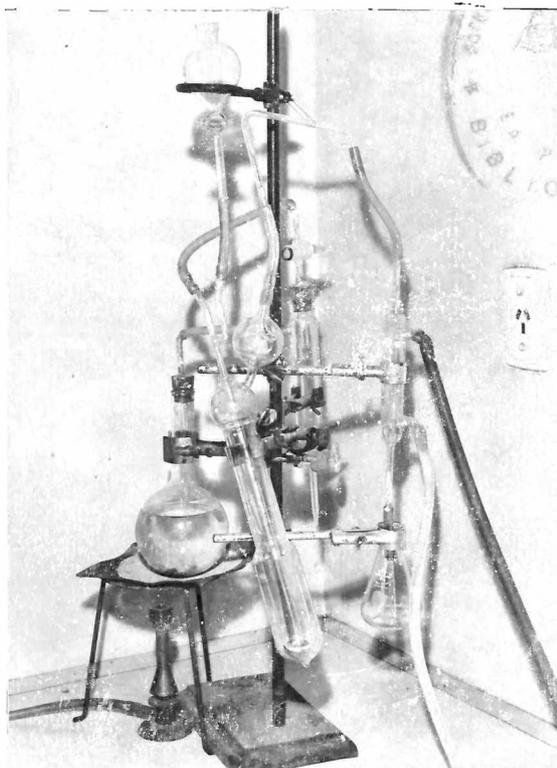


Figura 7

2) Técnica experimental

Reactivos.

Mezcla catalizadora:

sulfato de potasio anhidro = 93 g  
 sulfato de cobre anhidro = 6,3 g  
 selenio = 0,7 g

Solución de hidróxido de sodio al 40%:

hidróxido de sodio = 40 g  
 agua = 100 ml

Indicador Shiro Tashiro:

azul de metileno = 0,060 g  
 rojo de metilo = 0,125 g  
 agua = 100 ml

### Toma y preparación de la muestra

El material vegetal de ambos tipos de plantas se extrajo en forma paralela. El mismo consistió en ápices con dos ó tres hojas en formación: láminas, pecíolos, meristema apical y parte de tallo. De cada muestra se obtuvo un peso de 20 g. efectuándose el transporte del material al laboratorio, en las condiciones ya señaladas en ensayos anteriores.

A partir de las mismas se realizaron las determinaciones de proteínas brutas y proteínas solubles. En ambos casos se cortó el material en pequeños trozos y se homogeneizó cuidadosamente obteniendo una muestra representativa. De ese conjunto se extrajeron en forma sucesiva, las muestras para los distintos análisis.

### Determinación de proteínas totales.

Aproximadamente 5g del material anterior de ambos tipos de plantas, se trataron en alto vacío en una estufa especial a 80°C durante 24 hs. Luego el material se trasladó a un desecador con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , en donde se mantuvo hasta que se extrajo la muestra para efectuar el análisis (aproximadamente  $\frac{1}{2}$  hora).

Las pesadas se efectuaron con una balanza Metler, con exactitud de 0,1 mg. Al material pesado se le agregó 1 g de la mezcla catalizadora y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (pro-análisis), todo dentro de un balón especial de vidrio de 300 ml de capacidad, que se calentó con calefactores eléctricos graduables. La operación se inició a temperatura moderada y por debajo del punto de ebullición del ácido sulfúrico. Esta precaución evita una iniciación violenta de la ebullición, con proyecciones del material sobre las paredes del balón, que incidiría en la exactitud de los resultados.

Una vez finalizado el desprendimiento de burbujas se aumentó el calentamiento, hasta que se observó la aparición de humos blancos. La operación se continuó hasta que el líquido se presentó límpido, verdoso y sin puntos negros. El

tiempo de ataque fué de dos horas.

Se dejó enfriar la solución y se trasvasó cuantitativamente a una ampolla de decantación y de allí a la cámara de desprendimiento. Posteriormente se agregó una cantidad adecuada de hidróxido de sodio al 40%, que se dejó entrar suavemente, evitando así un desprendimiento turbulento del amoníaco. El punto final de la operación se logró por la presencia de un anillo púrpura, que indicó la existencia de un ligero exceso de hidróxido de sodio. El amoníaco desprendido se recibió en un volumen conocido de ácido sulfúrico 0,0095N (20 ml), efectuándose las valoraciones respectivas. En todos los casos se realizó en forma paralela un ensayo en "blanco".

### 3) Resultados.

Las determinaciones se realizaron por triplicado, tanto para muestras de plantas normales como para las de enanas. Las titulaciones de los ácidos correspondientes a los triplicados de plantas normales fueron de 9,6 , 9,9 y 9,9 ml. De acuerdo a éstos valores y según el peso del material previamente secado a 80°C se obtuvieron: 3,9 , 3,8 y 3,7% de nitrógeno. Estas cifras son muy similares, lo que indican la exactitud del método empleado, resultando un promedio de 3,8% de nitrógeno y 23,8% de proteínas totales ó brutas, empleando el factor 6,25.

Los valores de titulación para las plantas enanizadas fueron de 12,6 , 12,6 y 12,6 con un promedio de 2,3% de nitrógeno y 14,4% de proteínas.

### Determinación de proteínas solubles.

Del material fresco se pesaron dos muestras de 6 g de plantas de T. majus normales y enanizadas. Esas muestras de acuerdo al método ya citado se trataron, en cada caso, con 20 ml de agua destilada y enfriada en un mortero y se trituraron convenientemente, con el agregado de arena de cuarzo lavada. continuación se centrifugaron a 27.000g. Se reservó el sobrenadante y se extrajeron nuevamente en las

condiciones anteriores. El volumen final de ambas extracciones reunidas se llevó a 41 ml en ambos tipos de plantas.

De los extractos totales se tomó 5 ml a los que se les agregó 5 ml de ácido tricloroacético al 20%. Se dejaron en reposo durante 10 min. y se centrifugaron a 27.000g durante el mismo tiempo. Con el residuo se repitieron las operaciones pero ésta vez tratando con ácido tricloroacético al 10%. Después de eliminar el sobrenadante, previa centrifugación, el precipitado de proteínas se decoloró con la técnica ya señalada en el capítulo referido a determinaciones de los aminoácidos en el hidrolizado de proteínas solubles. Con el residuo decolorado y desecado se efectuó la determinación de proteínas, en ambos tipos de plantas, por el método de Kjeldahl ya descripto.

#### Peso seco.

Del mismo material, se tomó una parte para efectuar peso seco, obteniéndose:

para T. majus normal = 11

" T. majus enanizada = 17 %

#### Resultados:

Las determinaciones de nitrógeno se realizaron por duplicado, obteniéndose 1,17% de nitrógeno y 7,30% de proteínas solubles, referido peso seco en plantas normales y, 0,57% de nitrógeno y 3,56% de proteínas solubles también referido a peso seco en plantas enanizadas.

Los resultados logrados se exponen en el siguiente cuadro:

	Prot. totales % peso seco	Prot. solubles % peso seco	Prot. insolubles % peso seco	Prot. solubles % Prot. totales	Prot. insolubles % Prot. totales	Ac. aminados libres % g. peso seco
E.	14,4	3,6	10,8	25,0	75,0	20,44 mg.
N.	23,8	7,3	16,5	30,7	69,3	35,66 mg.
<i>% en planta enanizada referida a planta normal</i>						
	60,5	49,3	65,4			57,0

E. enana  
N. normal

### Discusión.

Los resultados señalan diferencias de significación. Por ejemplo, las proteínas totales en las plantas enanas se encuentran en un 60,5% del valor que corresponde a las plantas normales; las proteínas solubles en agua llegan a ser solo un 49,3% quedando finalmente el valor de las proteínas insolubles en agua que es de 65%. Ello indica alteraciones en el proceso de formación de las mismas. Los antecedentes bibliográficos ya expuestos por nosotros y los valores hallados para la asparragina, sensiblemente menores indicarían a ésta como un factor limitante en la formación de las proteínas.

Además, es interesante hacer notar que las proteínas solubles con relación a las totales, son aproximadamente un 5% menor en plantas enanizadas con respecto a las plantas normales (25,0% contra 30,0%), y las proteínas insolubles también referidas a las totales un 6% más (75 contra 69) en plantas enanizadas con respecto a las normales.

Finalmente, como dato complementario en éste caso, se observa que las diferencias en los ácidos aminados libres son evidentemente importantes e inferiores en las plantas enanizadas. Así, en éstas alcanzan a 20 mg/g peso seco, mientras que en las normales, éste valor se eleva a 36 mg. Lo que arroja una disminución para las enanizadas de 57,0%.

Separación electroforética de las proteínas solubles en agua.

1) Bibliografía

Aunque la electroforesis se mostró siempre como la técnica más eficaz para estudiar la distribución de las proteínas en un material biológico, su utilización en los vegetales fué poco satisfactoria. Sin embargo, la incorporación reciente de los geles de acrilamida como soporte del sistema, la electroforesis en disco (62), permitió obtener resultados concretos. (63) (64). En consecuencia se seguirá este procedimiento.

2) Técnica experimental.

Se partió de 15 g de ambos tipos de plantas. El material recogido, se molió cuidadosamente en un mortero enfriado y en presencia de arena de cuarzo. Posteriormente se centrifugó a 27.000g, durante 10 min., reservándose el sobrenadante de ambos tipos de plantas, con el que se efectuó un dializado, en presencia de agua a 0°C, durante 16 hs. Finalizada esa operación se colocó la membrana con el material en una corriente de aire, para concentrar el extractivo, determinándose a continuación la concentración de las proteínas solubles, por medio del método de Lowry (65).

El dato así logrado, permitió averiguar que volumen de extracto se debe agregar para realizar una siembra de 300-400 microg. de proteínas en el gel, que se considera óptima.

Preparación del gel y electroforesis

Soluciones "stock". Se prepararon de la siguiente manera:

a) ácido clorhídrico 1N	48 ml
Tris (hidroximetilamino metano) (Tris).	36,6 g
N,N,N',N',-Tetrametiletilediamino (Temed)	0,23 ml
agua destilada.	100 ml
b) ácido clorhídrico 1N	48 ml
Tris (hidroximetilamino metano) (Tris).	5,98 g
N,N,N',N',-Tetrametiletilediamino (Temed).	0,46 ml
agua destilada.	100 ml

c) acrilamida.	28 g
N,N',-metilenebisacrilamida (Bis).	0,735 g
agua destilada.	100 ml
d) acrilamida.	10 g
N,N',-metilenebisacrilamida (Bis).	2,5 g
agua destilada.	100 ml
e) riboflavina.	4 mg
agua destilada.	100 ml
f) sacarosa.	40 g
agua destilada.	100 ml

Las soluciones "stock" fueron envasadas en frasco color caramelo y guardadas en frío durante varios meses, sin que se alteren.

#### Soluciones de trabajo.

Se prepararon de la siguiente manera:

Para el gel inferior, también llamado de poro fino:

1 parte de a.  
 2 " " c.  
 1 " " agua destilada.           pH: 8,8-9

más un volumen equivalente de persulfato de amonio (0,14 g)

La solución ó mezcla se preparó en el momento, evitando una aereación prolongada; las soluciones de origen previamente se habían llevado a temperatura ambiente.

Para el gel superior ó de poro grueso:

1 parte de b.  
 2 " " d.           más 4 partes de f.  
 1 " " e.                           pH: 6,6-6,8.

#### Polimerización del gel.

Una serie de ocho tubos de vidrio, de diámetro y altura similares, fueron fijados en forma vertical en los orificios de goma de un soporte de madera, que posteriormente se mantuvo fijo durante la operación. A continuación, la solución del gel de poro fino, fué transferido con pipeta dentro de cada tubo, hasta una altura de 45 mm evitando en todo momento la formación de burbujas. Luego se cubrió con una co-

luna de agua de 7 mm, agregándose ésta última cuidadosamente con la ayuda de un gotero. En ésta etapa delicada, se evitó en todo momento la alteración de la interfase, que redundaría en la resolución del ensayo. Luego se iluminó con una lámpara fluorescente, durante un tiempo de 40 min., lo que provocó el proceso de polimerización.

Transcurrido ese tiempo se eliminó el agua y se lavó la superficie del polímero, con unas gotas de la solución del gel de poro grueso. Luego se agregó de la misma solución, hasta una altura de 7-8 mm, cubriéndose posteriormente con agua destilada hasta 5 mm. La exposición a la luz fluorescente se realizó en ésta operación durante 15 min. Se eliminó el agua de los tubos, se agregó la muestra con micropipeta, cubriéndose nuevamente con una solución de poro grueso. La exposición a la luz fluorescente fué ésta vez de 20 min. Con los geles así preparados se armó el equipo para efectuar la electroforesis.

#### La electroforesis.

El equipo fué construido en el Laboratorio con dos platos de polietileno colocados uno encima del otro, que contienen el buffer y poseen en su centro un electrodo de platino, colocado verticalmente, que conecta a los polos de una fuente de poder.

En el plato ubicado en la parte superior, se perforaron en su borde externo una serie de orificios a los cuales se ajustaron perfectamente, por medio de un cierre de goma, los tubos de vidrio que contienen el gel con la muestra. En esas condiciones, la posición de los tubos quedó en forma vertical y sumergidos por sus extremos en el "buffer" contenido en el plato inferior.

Terminado el proceso de polimerización ya sellado, se retiraron los tubos del soporte con cuidado para evitar la succión de los geles, y se los ubicó en la posición correspondiente en el armado del equipo. Las burbujas de aire fijadas en la base de los tubos fueron eliminadas y el es-

pacio resultante se lo llenó con el "buffer" tris-glicina (0,1M, pH:8,3).

### Operación.

En esas condiciones, por medio de los electrodos de platino, se conectó a los polos de una fuente de alto poder. La terminal negativa de la misma, al electrodo del recipiente del plato superior. La corriente se reguló de manera de tener hasta 4 ma por tubo, dando así la adecuada densidad de corriente, y la electroforesis se prolongó hasta que el colorante del frente se desplazó 2,5-3 cm dentro de la capa de poro fino.

Teñido y decoloración: Finalizada la electroforesis y habiendo separado el tubo con el gel del soporte del plato superior, se desprendió el gel por medio de una aguja hipodérmica. La misma se desplazó en la zona correspondiente entre el gel y la pared del vidrio, rotando y con la ayuda de abundante agua. Esta operación se realizó evitando en lo posible que la punta de la aguja alterara la superficie del gel. Después de separado el mismo, se tiñó sumergiendo en una solución de Amido Schwarz al 0,7 % (p/v), en ácido acético al 7 % (v/v), durante un tiempo de  $\frac{1}{2}$  hora. Transcurrido ese tiempo se los retiró y se los colocó en ácido acético al 10 % durante varias horas, para eliminar el exceso de colorante y fijar las proteínas. La operación de decoloración del gel se completó por medio de una electrólisis en presencia de una solución de ácido acético al 10 %. Los restos del colorante, en presencia del campo eléctrico, se desplazaron hacia el ánodo.

### 3) Resultados.

Se realizaron varias determinaciones previas con el objeto de ajustar las cantidades de muestras adecuada para cada tratamiento. De acuerdo a los datos obtenidos se sembró:

para planta normal:	40 microl.	=	368 microg.
"	" enanizada:	35 "	= 406 "

Además, se efectuó densitometría en cada caso.

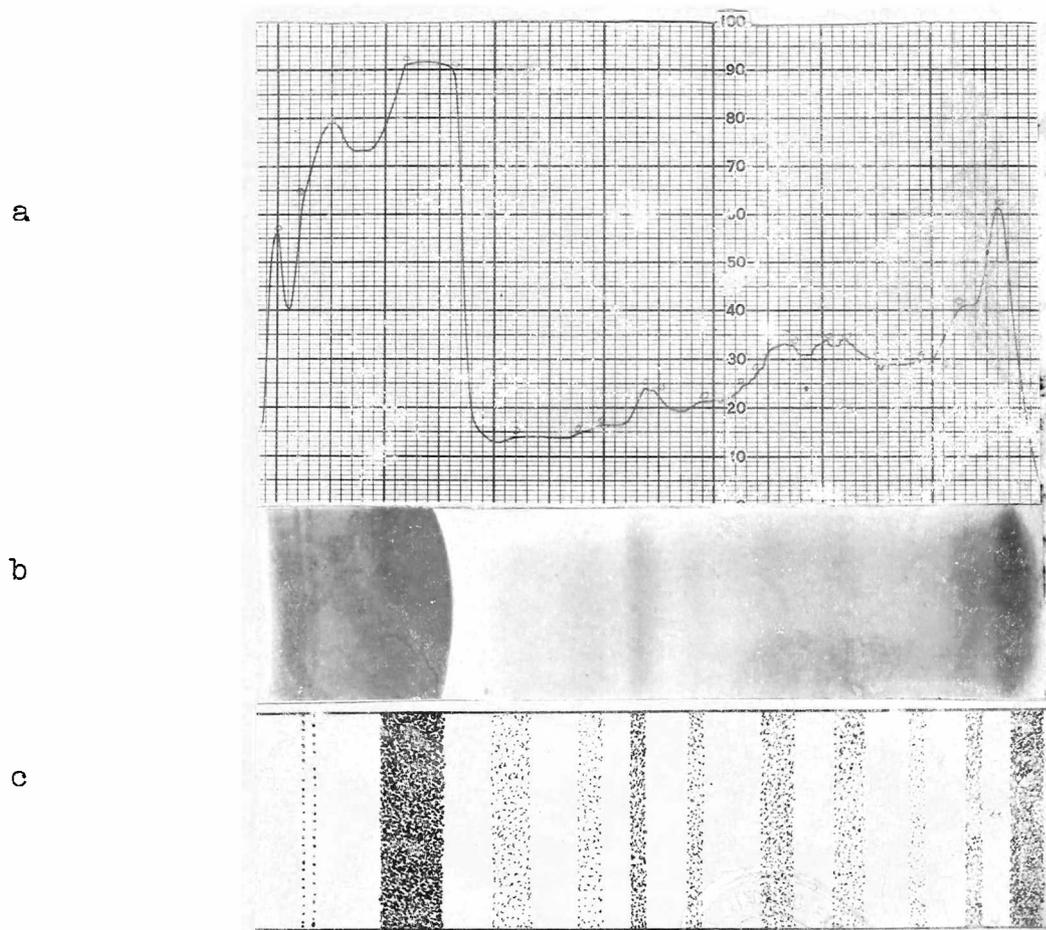


Figura 8- T. majus normal, a: densitograma, b: fotografía del gel, c: dibujo aclaratorio

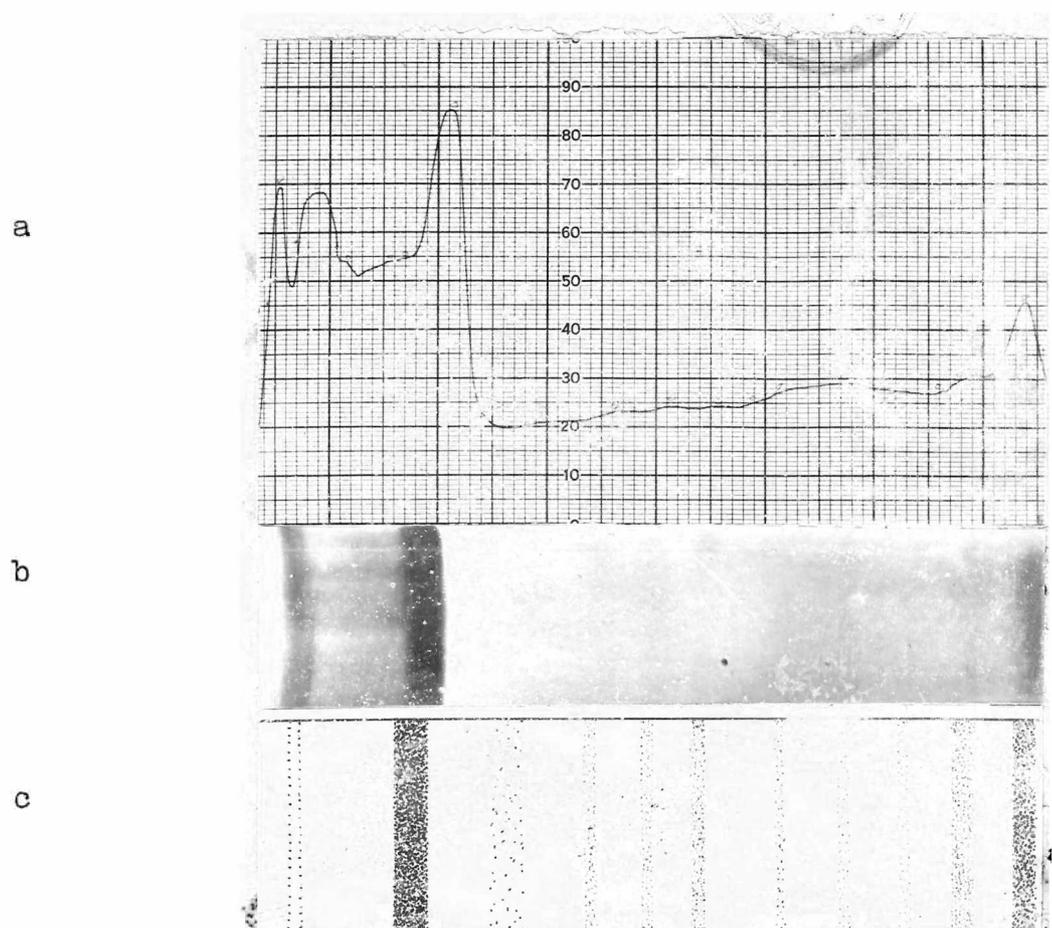


Figura 9- T. majus enana, a: densitograma, b: fotografía del gel, c: dibujo aclaratorio.

#### 4) Discusión.

Como puede observarse, las bandas electroforéticas de las proteínas de las plantas normales es notablemente más nítida que aquella de las enanizadas, las cuales son comparativamente mucho más difusas. Ya que se han probado numerosas concentraciones, sin lograrse en los extractos de enanizadas la nitidez de las normales, es evidente que dicha difusión no se trata de una condición cuantitativa sino de una característica cualitativa que puede tener más de una interpretación. Una de éstas sería la presencia de uno ó varios compuestos que interfieren en su desplazamiento. También podría tratarse de las mismas estructuras protéicas, cuya configuración presentan ciertas diferencias.

En lo que respecta a la apreciación visual del número de bandas, las proteínas de plantas normales pueden identificarse en 12 discos; las proteínas de plantas enanizadas se resuelven en igual número, con mucha dificultad. No obstante, la densitometría revela diferencias fundamentales no solo en la intensidad de las bandas, sino también en el número. Así, por ejemplo, la banda situada a 25 mm (tomada desde el lado izquierdo de la fotografía del gráfico) correspondiente a las proteínas de las plantas enanizadas, se resolvería en dos bandas unidas en el gráfico de las normales. También aquella correspondiente a 7 mm es inferior a la de 2 mm, en plantas enanizadas, mientras que en las normales es muy superior. De igual manera pueden realizarse otras comparaciones que indican diferencias cualitativas y cuantitativas en el complejo proteínico.

### Discusión general

El problema del enanismo provocado por la luz es sumamente amplio, incluyendo aspectos hormonales, enzimáticos, del metabolismo de hidratos de carbono, de ácidos orgánicos, del nitrógeno, además de los morfogénicos y ecológicos. Es evidente que ninguno de ellos en particular puede aclarar en forma aislada todo el proceso; no obstante el conocimiento de las diferencias de los distintos compuestos **nitrogenados** entre plantas enanizadas y normales es un aporte importante que puede contribuir a una explicación básica del fenómeno.

Limitaciones experimentales en los trabajos que se realizan en el Instituto de Fisiología Vegetal hacen difícil determinar las diferencias de peso seco total entre plantas enanizadas y normales de manera que es imposible, bajo estas condiciones, obtener diferencias absolutas cuantitativas, tanto en lo que se refiere a cualquier tipo de compuestos en general como a los nitrogenados en particular. De cualquier manera, es evidente que dichas diferencias absolutas son mayores que las diferencias porcentuales sobre la base de peso seco en que se expresan los valores consignados en éste trabajo. Las cifras quedan así reducidas a diferencias relativas entre los compuestos nitrogenados y el total, expresado como materia seca. A partir de ésta base se han obtenido diferencias en las proteínas totales (bruta), en las solubles, en los ácidos aminados que constituyen las proteínas solubles y en los ácidos aminados libres. Por otra parte se han obtenido diferencias en la intensidad de las bandas proteicas y en su número, separadas por electroforesis en gel de acrilamida.

En lo que respecta a las proteínas totales, vemos que las plantas enanas tienen un contenido inferior en un 40% con respecto a las plantas normales; una disminución también elevada, en el mismo sentido se observa en las proteínas solubles. Se plantea en consecuencia cual sería la causa inmediata de ésta disminución.

Basado en la hipótesis de Webster (46) que señala la necesidad de la presencia de los 18 aminácidos y las dos amidas para la síntesis de las proteínas y "la firme dependencia de la u-

tilización de óptimas concentraciones de cada componente en el sistema en reacción", podemos suponer que el factor limitante inmediato de los bajos valores protéicos determinados por nosotros se encuentra entre los aminoácidos libres o las amidas mencionadas.

La mayoría de aquellos ácidos aminados libres determinados, indican cierta disminución en las plantas enanizadas, pero es evidente que la diferencia correspondiente al total, inferior a un 43 %, se debe al bajo nivel de la asparragina cuyo valor disminuye en un 72 % con respecto al de las plantas normales, sobre cifras absolutas que son muy elevadas si las comparamos con el resto; podemos inferir en consecuencia que el bajo nivel de asparragina sería una de las causas limitantes inmediatas de la síntesis protéica en plantas enanizadas. Esta situación nos es incompatible con otros factores que podrían actuar como limitantes; tal es el caso de la menor síntesis de ATP que se deduce por irregularidades en el ciclo de Krebs ó también la intervención de sustancias reguladoras (inhibidoras).

La composición de los ácidos aminados de las proteínas solubles son bastante similares, excepto en el contenido porcentual de lisina-arginina y alanina; se encuentran además ciertas diferencias en el ác. glutámico y la fenilalanina, lo que hace suponer que debían encontrarse diferencias en las proteínas por ellos constituidos. Esta situación quedó demostrada por el análisis densitométrico de la separación electroforética de las proteínas.

Finalmente consideramos que las diferencias encontradas en el contenido de ácidos aminados y amidas solubles, en los aminoácidos provenientes del hidrolizado de proteínas, en las proteínas brutas y solubles en agua y la separación electroforética de éstas últimas, corresponden a características fundamentales en las diferencias bioquímicas correspondientes a los dos tipos de plantas que se suman a las diferencias morfológicas y fisiológicas descritas por otros autores.

Revisión Bibliográfica

- (1) Sinnott, E.W. Plant morphogenesis 1960. 13, 308-24.
- (2) Shirley, H.L. Amer. Jour. Bot. 1929. 16, 354-90. (Citado por Sinnott, Plant Morphogenesis).
- (3) Pepp, H.W. Bot. Gaz. 1926. 82, 306-19. (Citado por Sinnott, Plant Morphogenesis).
- (4) Penfound, W.T. Amer. Jour. Bot. 1931. 18, 558-72.
- (5) Talbert, C.M.; Holch, A.E. Ecology 1957. 38, 655-58.
- (6) Burström, H. Encycl. of Plant Pyhsiol. 1961. XIV, 285-310.
- (7) Polevaya, .S.; Butenko, R.C. Doklady Botanical Sciences 1966, Volumes 169-71, 133-34.
- (8) Mohr, H. Planta (Berl.) 47, 127. (Citado por Bürström, Encycl. Plant Physiol. 1956, Vol. XIV).
- (9) Vince, D.J. Horticult. Sci. 1956. 31, 16-24.
- (10) Stolwik, J.A.J. Mededeel. Landbouwhoogesch. Wageningen 1954. 54, 181-244. (Citado por Sinnott, Plant Morphogenesis).
- (11) Mohr, H. Ann. Rev. Plant Physiol. 1962. 13, 455-88.
- (12) Butler, .L.; Hendricks, S.B.; Siegelman, H.W. Chemistry and Biochemistry of plant pigments 1965. 7, 197-210.
- (13) Siegelman, H.W.; Hendricks, S.B. Plant Physiol. 1957. 32, 393-98.
- (14) Siegelman, H.W.; Hendricks, S.B. Plant Physiol. 1958. 33, 185-90.
- (15) Mohr, H. Planta 1957. 49, 339-405.
- (16) Hendricks, S.B.; Borthwick, H.A. Botan. Gaz. 1959. 120, 187-93.
- (17) Bonner, B. La Biología Vegetal en nuestros días: avances y problemas 1968. 11, 219-49. Herrero Hnos., Mexico.
- (18) Cathey, H.M.; Borthwick, H.A. Botan. Gaz. 1957. 119, 71-76.
- (19) Steward, F.C.; Bidwell, R.G.S. Amino Acid Pools, 1962. 25-42. Elsevier. Amsterdam.
- (20) iets, F.G.; Whitehead, E.I.; Moxon, A.L. Plant Physiol. 1947, 22, 465-76.

- (21) Kretovich, W.L. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1965. 16, 141-54.
- (22) Lähdesmäki, P. *Physiologia Plantarum* 1968. 21, 1097-103.
- (23) Chibnall, A.C. *Protein metabolism in plants* 1939 (reimpresso 1964), 86. Yale Univ.
- (24) Vickery, H.B. *Physiol. Rev.* 1945, 25, 347-76.
- (25) Knoop, F.; Oesterlin, H. *Z. Physiol. Chem.* 1925, 143, 294  
(Citado por McLee, *Nitrogen Metabolism in Plants* (1962)).
- (26) Quastel, J.H.; Woolf, B. *Biochem. J.* 1926. 20, 545.
- (27) Quastel, J.H.; Woolf, B. *Biochem. J.* 1929. 23, 472.
- (28) Virtanen, A.L.; Tartanen, J. *Biochem. Z.* 1932. 250, 193-211. (Citado por Mc Lee, *Nitrogen Metabolism in Plants* (1962)).
- (29) Virtanen, A.I. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1961. 12, 1-10.
- (30) Ellfolk, N. *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A. II*, N° 79  
(1956). (Citado por Virtanen, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1961).
- (31) Euler, H.; Adler, E.; Günter, C.; ~~Van~~ N.B.Z. *Physiol. Chem.* 1938. 254, 61.
- (32) Wang, C.H.; Thomas, R.C.; Cheldelin, .H.; Christensen, B.E. *J. Biol. Chem.* 1950. 197(2), 663-67.
- (33) Webster, G.C.; Warner, J.E. *J. Biol. Chem.* 1955. 215, 91-99
- (34) Elliot, W.H. *J. Biol. Chem.* 1953. 201, 661.
- (35) Webster, G.C. *Plant Physiol.* 1953. 28, 724-27.
- (36) Bidwell, R.G.S. *Canadian J. of Botany* 1963. 41, (12), 1623-16
- (37) Steward, F.C.; Durzan, D.J. *Plant Physiol.* 1965. IVA, 392.
- (38) Braunstein, A.E.; Kritsmann, M.G. *Enzymologia* 1937.  
2,129.
- (39) Albaum, H.G.; Cohen, P.P. *J. Biol. Chem.* 1943. 149, 19-27.
- (40) Leonard, M.J.; Burris, R.H. *J. Biol. Chem.* 1947. 170,  
701-09.
- (41) Meister, A.; Soler, H.A.; Tice, S.V.; Fraser, P.E. *J. Biol. Chem.* 1952. 197, 319-30.
- (42) Wilson, D.G.; King, K.W.; Burris, R.H. *J. Biol. Chem.*  
1954. 208, 863-74.

- (43) Davies, D.D.; Ellis, R. *Biochem. J.* 1961. 78, 623-30.
- (44) Towers, G.H.N.; Thompson, J.F.; Steward, F.C. *J. Am. Chem. Soc.* 1954. 76, 2392-96.
- (45) Steward, F.C.; Pollard, J.K. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1957. 8, 65-114.
- (46) Webster, G. C. *Arch. Biochem. Biophys.* 1957. 7, 59-70.
- (47) Watson, J.D. *Molecular Biology of the gene* 1965. 297-313.
- (48) Bonner, J. *La Biología Vegetal en nuestros días: avances y problemas.* 1968. 1, 1-12. Herrero Hnos. Mexico.
- (49) Sívori, E.M.; Espanda, E.M.; Rumi, C. *Notas del Museo.* 1963. XX, (95), 1-16 (Botánica). Fac. C. Nat. y Museo (La Plata).
- (50) Sívori, E.M.; Rumi, C. *Phyton.* 1960. 15 (2), 119-27, XII.
- (51) Sívori, E.M.; Rumi, C. *I Reunión Sudamericana de Fisiología Vegetal.* Enero 1965. Itabuna (Brasil).
- (52) Mc Kee, H.S. *Nitrogen metabolism in Plants* 1962. 262 Clarendon Press, Oxford.
- (53) Ramirez de Guglielmone, A.E.; Gomez, G. *Revista de la Asoc. Bioq. Argentina* 1965. Año XXX, Nº 159, 178-187.
- (54) Cook, E.R.; Luscombe, M.J. *Chromatog.* 1960. 3, 75-84.
- (55) Kaweran, E.; Wieland, T. *Nature* 1951. 168, 77-8.
- (56) Thompson, J.F.; Steward, F.C. *J. Exptl. Botany* 1952. 3, 170-87.
- (57) Barnett, N.M.; Naylor, A.W. *Plant Physiol.* 1966. 41, 1222-30.
- (58) Moore, S.; Stein, H. *Methods in enzymology* 1963. VI, 820-22.
- (59) Cook, E.F.; Martin, E.W. *Farmacía práctica de Remington,* 1953. pag. 1161, 10ª edición.
- (60) Marenzi, A. y colab. *Bioquímica Analítica Cuantitativa* 1947. pag. 377, Ed. "El Ateneo" Buenos Aires.
- (61) Aparato de destilación micro-Kjeldahl (Pregl-Barnas-Wagner. Catálogo LaPine. Scientific company, 1962. pag. 525.

- (62) Ornstein, L.; Davis, B.J. Disc electrophoresis. Preprint by  
Distillation Products Industries (Eastman Kodak Co.)  
Rochester, N.Y.
- (63) Chang, L.O.; Srb, A.M.; Steward, F.C. Nature 1962. 193  
756-59.
- (64) Steward, F.C.; Lyndon, R.F.; Barber, J.T. Ann. Journ.  
Bot. 1965. 52 (2), 155-64.
- (65) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall R.J.  
J. Biol. Chem. 1951. 193, 265-75.