

Las relaciones C/N y PS/N durante el crecimiento y la senescencia de hojas de *Phaseolus vulgaris* L.

Pereyra de Altamira, S.M. y Trippi V.S.

RESUMEN

El contenido de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono) cambia durante el crecimiento y senescencia foliar. La alteración de las proporciones de los elementos fundamentales como nitrógeno y carbono, no han recibido mucha atención. Se propone como hipótesis que los cambios de las relaciones carbono/nitrógeno (C/N) y peso seco/nitrógeno (PS/N) pueden ser un indicador ontogénico del estado fisiológico del tejido foliar.

Se trabajó con hojas primarias de *Phaseolus vulgaris* L. var Balín de Albenga y se realizaron dos experiencias: 1) Crecimiento y senescencia foliar. 2) Supresión de correlaciones (apicectomía y defoliación). El análisis de los resultados permite concluir que las relaciones C/N y PS/N pueden servir como índices del estado fisiológico de las hojas durante el crecimiento y la senescencia. Ello debido a que: i) Ambas relaciones (C/N y PS/N) aumentan constantemente durante la ontogenia de la hoja. ii) Los tratamientos que retardan en diferente magnitud la senescencia foliar, provocan disminuciones (apicectomía) o estabilización (defoliación) de las relaciones C/N y PS/N.

Palabras clave: *Phaseolus* sp. - senescencia - relación carbono/nitrógeno.

ABSTRACT

The macromolecules content (protein, nucleic acid and carbohydrates) change during leaf growth and senescence. However no data are presently available concerning the changes of fundamental elements like Nitrogen and Carbon, and their relations. A hypothesis that variation in C/N and WR/N ratios may be used as ontogenic index of leaf physiology stage is propose.

Leaf first pair of *Phaseolus vulgaris* L. var Balín de Albenga was used and two experiments were carried out: 1) Leaf growth and senescence. 2) Correlation supression (apex excision and defoliation). The results indicated that C/N and WR/N ratios are a posible index of leaf physiological stage, during growth and senescence. These findings are supported by: i) Both relations (C/N and WR/N) show an steady increase during leaf ontogenie. ii) Senescence delaying tretments promote a declination (apex excision) or stabilitation (defoliation) of C/N and WR/N ratios.

S.M. Pereyra de Altamira, Fisiología Vegetal, Dpto. Biología Aplicada, Fac. Cs. Agropecuarias, UNC, CC 509 - Córdoba, Argentina; V.S. Trippi, Fisiología Vegetal, Fac. Cs. Ex., Fis. y Nat. UNC.

INTRODUCCION

La evolución ontogénica de la hoja implica cambios morfológicos y fisiológicos que están íntimamente asociados con la calidad y contenido de macromoléculas (Trippi, 1980). La etapa de crecimiento se caracteriza por una activa síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y clorofilas, las cuales disminuyen cuando el crecimiento se detiene y la hoja comienza a envejecer (Makrides and Goldthwaite, 1981). La síntesis de ARN y proteínas evolucionan en forma conjunta (Makrides and Goldthwaite, 1981) y parecen regular el flujo de nitrógeno (N), ya que al cesar tal actividad, disminuye su incorporación e incluso comienza a movilizarse fuera de la hoja (Mae and Ohira, 1981, 1982).

La fijación fotosintética de carbono (C) aumenta durante el crecimiento foliar y luego comienza a disminuir (Sestak, 1963). Sin embargo, la incorporación del C a azúcares comienza muy temprano en el curso de la ontogenia foliar y continúa aún cuando la síntesis de proteínas ha disminuido, durante la senescencia de las hojas (Kocher and Leonard, 1971).

Estos hechos inducen a postular que el balance entre las fracciones de C y N varía durante la ontogenia de la hoja. Al respecto se ha mencionado un aumento de la relación PS/N durante el crecimiento y la senescencia de pétalos de clavel (Kenis *et al.*, 1985). Asimismo se ha determinado un aumento de la relación C/N durante el crecimiento de gramíneas (Gounot and Yu, 1980). Sin embargo, la alteración de tales relaciones no ha recibido mucha atención respecto a la ontogenia de la hoja. En base a estas consideraciones se propone la hipótesis que las relaciones C/N y PS/N podrían ser un índice ontogénico del estado fisiológico de la hoja. De confirmarse esta hipótesis, tratamientos que determinen cambios en la evolución ontogénica de la hoja deberían reflejarse en los cocientes C/N y PS/N. Al respecto, es conocido que la eliminación de centros en activo crecimiento determina un retardo en la senescencia de las hojas, inhibiendo la movilización de nutrientes (Thomas and Stoddart, 1980). La apicectomía y la defoliación provocan incrementos en el contenido de ARN, proteínas y clorofilas (Phillips *et al.*, 1969; Krul, 1974) e incluso aumentos en la incorporación de N (Carr and Pate, 1967). En base al análisis precedente, el objetivo del presente trabajo es estudiar la variación de las relaciones C/N y PS/N respecto a los cambios fisiológicos durante el crecimiento y la senescencia de las hojas de *Phaseolus vulgaris* L.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal: Se utilizaron plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var Balin de Albenga crecidas en macetas con tierra y vermiculita (1:1) y en condiciones de

invernáculo. temperatura $20 \pm 2^\circ$, humedad $50 \pm 2\%$ y régimen fotoperiódico de 12 hs de luz (2 000 lux).

Cada muestra estuvo constituida por el primer par de hojas verdaderas de una misma planta.

Se llevaron a cabo dos experiencias.

Estudios de crecimiento y senescencia en hojas: Para ello se cosecharon hojas a los 7, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30 y 40 días desde la siembra. Las determinaciones, que más adelante se detallan, se realizaron inmediatamente después de la escisión de las hojas.

Supresión de correlaciones: Las mismas se realizaron mediante tratamientos de apicectomía y defoliación. Para ello se utilizaron plantas de 25 días de edad. La apicectomía consistió en el corte del ápice caulinar, y la defoliación en la separación de todas las hojas ubicadas por encima del primer par. Con el propósito de eliminar los centros con actividad meristemática, se efectuaron desyemados permanentes.

Las muestras se tomaron al inicio de los tratamientos y a los 3 y 7 días posteriores.

En ambas experiencias se realizaron las siguientes determinaciones:

a Crecimiento de las hojas: Se midió la superficie de las hojas después del corte, en una Medidora de Area Foliar (LICOR-3100). Posteriormente se cuantificó el PS, después de 48 hs de secado a 90°C .

b Contenido de Clorofilas, ARN, Nitrógeno y Carbono: el contenido de clorofilas se evaluó en un extracto alcohólico, según la técnica de Wintermans and De Mots (1955).

El ARN se determinó de acuerdo a lo descrito por Fiesk and Munro (1962).

El contenido de N se analizó en material seco finamente molido e incinerado con ácido sulfúrico concentrado según Capó *et al.* (1955).

Las determinaciones de C se efectuaron en el material seco y molido con un Analizador Automático (CS44 LECO 726-300). Las mismas se realizaron en el Centro de Investigaciones Metalúrgicas (CIM) CONICET-UNCba.

c Relaciones C/N y PS/N: Se obtuvieron luego de realizar un cociente entre el contenido de C y/o PS y el contenido de N.

Cada experiencia se realizó por lo menos 3 veces y las determinaciones se realizaron por triplicado. El análisis estadístico consistió en pruebas de significancia según el test de T de Student.

RESULTADOS

Crecimiento y Senescencia de las hojas

La fase de crecimiento dura aproximadamente 20 días (Fig. 1A), durante los cuales el PS aumenta más

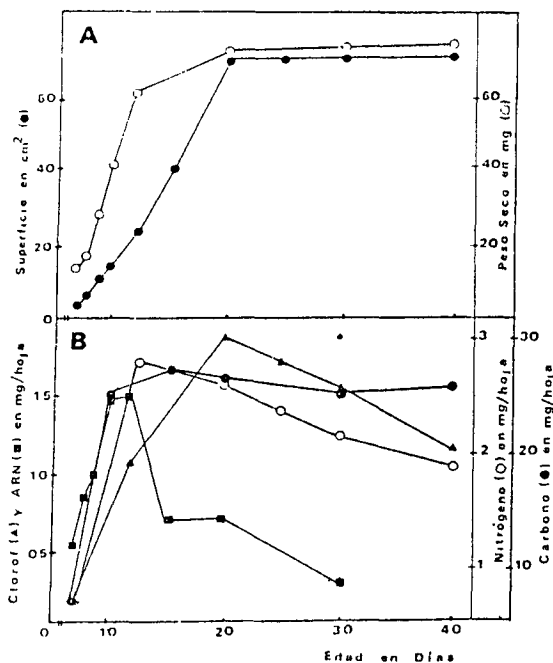


Figura 1: A. Evolución del Peso Seco y la Superficie, B. Cambios en el contenido de clorofilas, ARN, nitrógeno y carbono, en el primer par de hojas de *Phaseolus vulgaris* L., en función de la edad de las plantas.

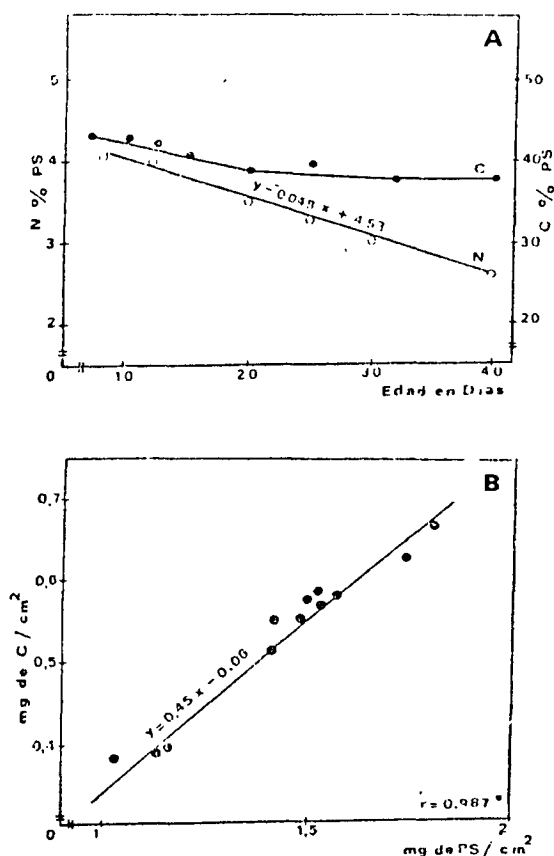


Figura 2: A. Evolución del contenido de C y N en base al PS en el primer par de hojas de *Phaseolus vulgaris* L., en función de la edad de las plantas. B. Correlación entre el PS y el contenido de C, en hojas primarias de *Phaseolus vulgaris* L.

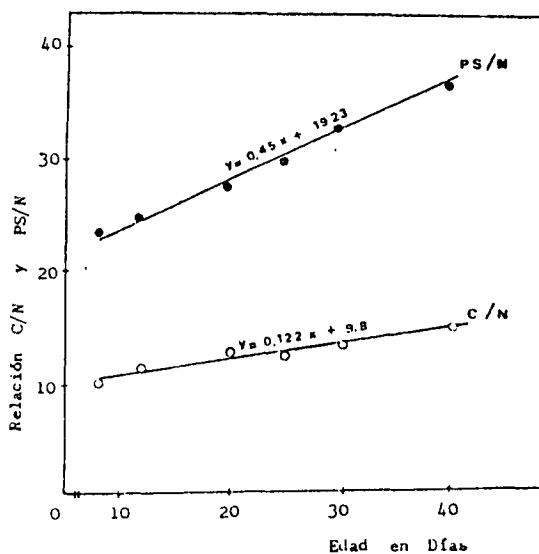


Figura 3: Cambios en las relaciones C/N y PS/N en hojas primarias de *Phaseolus vulgaris* L., en función de la edad de las plantas

rápidamente que la superficie. Sin embargo, ambas variables alcanzan el máximo valor al mismo tiempo, ya que a partir de los 20 días no se observan cambios significativos en la superficie y PS.

El contenido de clorofilas aumenta durante todo el período de crecimiento y a partir de los 20 días comienza a disminuir (Fig. 1B), mientras que el contenido de ARN se incrementa hasta los 12 días y luego disminuye marcadamente.

Tanto el N como el C, expresadas como total por hoja, aumenta durante el primer período de crecimiento (12-15 días) y a partir de allí el N comienza a disminuir, en tanto que el C se mantiene constante (Fig. 1B). El contenido de N en base al peso seco disminuye constantemente desde las primeras etapas del crecimiento (Fig. 2A). Esta disminución constante y lineal está definida por una función $y = -0,048x + 4,53$, donde "y" es el porcentaje de N en el PS y "x" es el tiempo. El contenido de C en el peso seco, también

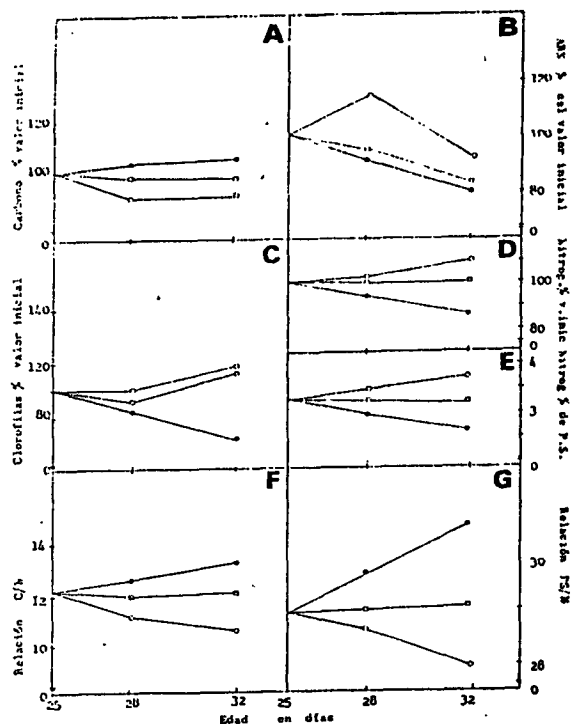


Figura 4: Cambios en el contenido de carbono (A), ARN (B), clorofilas (C), nitrógeno en porcentaje del valor inicial (D), y en base al PS (E) y relaciones C/N (F) y PS/N (G), en hojas primarias de *Phaseolus vulgaris* L. con tratamientos de apicectomía (O) y defoliación (■), en función del tiempo. Los tratamientos se realizaron a los 25 días de edad de las plantas. Testigos (•).

presenta una ligera disminución durante el período de crecimiento (Fig. 2A). Sin embargo, tanto el carbono como el peso seco muestran una alta correlación ($r = 0,987$) (Fig. 2B).

Las relaciones C/N y PS/N muestran un incremento constante y lineal en función de la edad de las hojas (Fig. 3) a pesar de que la relación PS/N muestra una pendiente mayor que la relación C/N.

Supresión de correlaciones

La apicectomía provoca disminuciones leves del contenido de C y aumento en el contenido de ARN, N y clorofilas (Fig. 4A, B, C, D y E), mientras que las relaciones C/N y PS/N disminuyen (Fig. 4 F y G).

La defoliación no tiene efecto sobre el contenido de C y de ARN (Fig. 4A y B), aunque provoca la estabilización del contenido de N, aumenta la concentración de clorofilas (Fig. 4C, D y E) y mantiene las relaciones

C/N y PS/N (Fig. 4 F y G).

DISCUSION

El crecimiento de la hoja se detiene a los 20 días, aunque a partir de los 12 días comienza la hidrólisis de ARN conjuntamente con la disminución del contenido de N. Estas observaciones coinciden con lo señalado por Makrides y Goldthwaite (1981) para hojas de poroto en crecimiento y sugieren que la división celular no superaría los 12 días, a partir de los cuales comenzaría la expansión foliar. Por otra parte, la evolución conjunta de ARN y N indicaría que la síntesis de proteínas declina a partir de esta primera etapa, indicando también la existencia de una estrecha relación entre la síntesis de proteínas y la incorporación de N (Mae and Ohira, 1982). Sin embargo y a pesar de ello, el contenido de clorofilas y la acumulación de materia seca, prosiguen aumentando durante la expansión foliar (Fig. 1B). Estos resultados sugieren que la fijación fotosintética de C continúa, aún cuando el contenido de N y ARN está disminuyendo. No obstante, finalizada la expansión de la hoja comienza la caída del contenido de clorofilas, aunque el contenido de C y PS no presentan cambios significativos (Fig. 1B). Ello concuerda con observaciones realizadas en hojas de poroto (Makrides and Goldthwaite, 1981) y arvejas (Smillie and Krotov, 1961) en las que se señala que el contenido de clorofilas alcanza el máximo al finalizar la expansión foliar. La disminución en el contenido de clorofilas conjuntamente con la continua pérdida de N, sugiere que finalizada dicha expansión, comienza la senescencia foliar. De lo antes expuesto surge que los compuestos ricos en C, tienden a acumularse en la hoja, en tanto que los compuestos nitrogenados se movilizan con facilidad (Mae and Ohira, 1981; Hocking and Steer, 1983). Ello se evidencia también por la constante disminución de N en relación al PS (Fig. 2A), lo que sugeriría que la síntesis de compuestos ricos en C se ve favorecida desde el inicio del crecimiento foliar, tal como lo señalara Kocher and Leonard (1971). Las relaciones C/N y PS/N aumentan constantemente durante el crecimiento y la senescencia de la hoja (Fig. 3). Resultados semejantes fueron encontrados en gramíneas durante el crecimiento por Gounot and Yu (1980) y el crecimiento y senescencia de pétalos de clavel por Kenis *et al.* (1985). De ello se deduce que las relaciones C/N y PS/N pueden considerarse un reflejo de los cambios fisiológicos de la hoja durante su crecimiento y senescencia. El hecho que ambas relaciones evolucionen en forma conjunta, resulta de la alta correlación existente entre contenido de C y PS (Fig. 2B). Sin embargo, la relación PS/N muestra una pendiente mayor, indicando que otro componente del PS (distinto del C) se va acumulando con el tiempo.

La senescencia foliar se ve retardada en diferente magnitud por los tratamientos de apicectomía y defoliación. El corte del ápice provoca incrementos en el contenido de ARN, clorofilas, N y modifica débilmente el contenido de C (Fig. 4A, B, C, D y E). Ello concuerda con las observaciones realizadas por otros autores (Noguchi *et al.*, 1964; Carr and Pate, 1967; Das, 1968), e indicaría que el ápice ejerce un efecto regulador del metabolismo de las hojas cuyo crecimiento ha finalizado. Por otra parte, la defoliación provoca incrementos en el contenido de clorofilas y parece impedir la movilización de N (Fig. 4 C, D y E), pero no tiene efectos sobre el contenido de C y ARN (Fig. 4 A y B). Efectos semejantes sobre el contenido de N fueron informados por Carr and Pate (1967) para plantas *Avena* y *Xanthium*. Estos resultados estarían indicando que las hojas en crecimiento ejercen un efecto atractivo sobre los nutrientes (Thomas and Stoddart, 1980), pero mucho más débil que el ápice. Por último, las relaciones C/N y PS/N disminuyen por efecto de la apicectomía y se mantienen estables como consecuencia de la defoliación (Fig. 4F y G). Por lo expuesto, parece evidente que el contenido relativo de N es lo que determina el aumento o disminución de tales relaciones. Las variaciones de las relaciones CN y PS/N son un reflejo de la magnitud de los tratamientos (apicectomía y defoliación) sobre las variables de senescencia.

Las evidencias experimentales expuestas permitirían confirmar la hipótesis acerca de la utilidad de las relaciones C/N y PS/N como indicadores del estado fisiológico del tejido foliar durante el crecimiento y la senescencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen al Dr. Juan A. Argüello por sus valiosas sugerencias y la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

Capo, B.G., G. Samueles, P. Landrau, S. Alers and A. Riera, 1955. The method of foliar diagnosis as applied to sugar cane. Agric. Exp. Sta., Univ. of Puerto Rico, Bull. 123.

- Carr, D.J. and J.S. Pate, 1967. Aging of whole plant. *Sim Soc Exp. Biol.* XXI. 559-599. Cambridge at the University Press.
- Das, T.M., 1968. Physiological change with leaf senescence. Kinins on cell ageing and senescence. *Proc. Internat. Symp. Plant Growth Substances*. Ed. S.M. Sircar. Dep. Botany Calcutta University pp 91-102.
- Flesk, A. and H.N. Munro, 1962. The precision of ultraviolet absorption in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochem. Biophys. Acta*, 55: 571-583.
- Gounot, M. and O. Yu, 1980. Recherches sur l'évaluation de la productivité primaire épigée des graminées prairales. *Oecol. Pl.*, 15: 81-102.
- Hocking, P. and B.T. Steer, 1983. Distribution of nitrogen during growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Ann. Bot.*, 51: 787-789.
- Kenis, J.D., S.T. Silvente and V.S. Trippi, 1985. Nitrogen metabolism and senescence-associated changes during growth of carnation flowers (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 65: 455-459.
- Kocher, H. and O.A. Leonard, 1971. Translocation and metabolic conversion of C¹⁴-labeled assimilates in detached and attached leaves of *Phaseolus vulgaris* L. in different phases of leaves expansion. *Plant. Physiol.*, 47: 212-216.
- Krul, W.R., 1974. Nucleic acid and protein metabolism of senescing and regeneration soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 54: 36-40.
- Mae, T. and K. Ohira, 1981. The remobilization of nitrogen related leaf growth and senescence in rice plant (*Oriza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, 22: 1067-1074.
- Mae, T. and K. Ohira, 1982. Relations between leaf age and nitrogen incorporation in the leaf of rice plant (*Oriza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, 23: 1019-1024.
- Makrides, S.C. and J.G. Goldthwaite, 1981. Biochemical changes during bean leaves growth, maturity and senescence. Content of RNA, polyribosomes, ribosomal RNA, protein and chlorophyll. *J. Exp. Bot.*, 32: 725-735.
- Noguchi, L., K. Yamamoto and E. Tamaki, 1964. Studies on nitrogen metabolism in tobacco plant. A.V. Changes of the free amino acid composition of tobacco leaves with age. *Tobacco Sci.*, 8:8-12. *Fron Tobacco*, 158: 28-32.
- Phillips, D.R., R.F. Horton and R.A. Fletcher, 1969. Ribonuclease and chlorophyllase activities in senescing leaves. *Physiol. Plant.*, 22: 1050-1054.
- Sestak, Z., 1963. Changes in the chlorophyll content as related to photosynthetic activity and age of leaf. *Photochem. and Photobiol.*, 2: 101-110.
- Smillie, R.M. and G. Krotov, 1961. Changes in dry weight, protein, nucleic acid and chlorophyll content of growing pea leaves. *Can. J. Botany*, 39: 891-900.
- Thomas, H. and J. Stoddart, 1980. Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 83-111.
- Trippi, V.S., 1980. Ontogenia y senilidad en plantas. Univ. Nac. de Córdoba, Dirección de publicaciones. Córdoba, Rep. Argentina. pp 547.
- Wintermans, J.F.G. and A. De Mols, 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta*, 109: 448-453.