

INCORPORACION DE FOSFORO EN COMPUESTOS

DE TEJIDO DE REPOLLO ¹

POR E. M. SIVORI, M. C. ESPONDA Y C. P. RUMI ²

El presente trabajo se realizó costado por CEFAR ³ y por contrato con la Comisión Nacional de Energía Atómica de la República Argentina. Se agradece al Licenciado Juan Carlos Masotta el eficaz asesoramiento prestado en las determinaciones de la radioactividad.

La aplicación de sustancias radioactivas en las plantas ha permitido determinar la pérdida de algunos elementos por lixiviación foliar, como sucede con el potasio y el nitrógeno. Este hecho reviste sumo interés en agricultura, especialmente en las regiones lluviosas como así también con el nuevo sistema de riego por aspersión.

Entre los elementos estudiados se encuentra el P, si bien con resultados inciertos (Tuckey, Wittwer, Teubner y Long, 1956). Estos autores encuentran que cuando la absorción se produce por vía normal, a través de las raíces, hasta las 48 horas de haber sido aplicado no se produce ninguna pérdida. Por otra parte se manifiesta lixiviación foliar cuando la absorción se realiza directamente por el tallo cortado y sumergido en la solución.

La importancia de este elemento en la nutrición mineral de los vegetales indujo a profundizar el conocimiento de los procesos mencionados. Para una evaluación más exacta del P lixiviado, como tam-

¹ Trabajo recibido para su publicación el 30 de diciembre de 1959.

² Ingeniero agrónomo, profesor titular de Fisiología vegetal, ingeniera agrónoma, Jefe de Laboratorio y estudiante respectivamente.

³ Comisión Especial de Física Atómica y Radioisótopos de la Universidad Nacional de La Plata.

bién para determinar el distinto comportamiento que se manifiesta cuando es absorbido en las dos formas descriptas, se consideró conveniente hacer un estudio previo de la distribución e incorporación en los diversos compuestos de la planta.

ANTECEDENTES

De acuerdo a Kamen y Spiegelman (1948) el fósforo penetra contra un gradiente de 100 a 1 sin una apreciable reversibilidad y sin establecerse un equilibrio entre la solución celular y la extracelular. El valor máximo de la absorción se establece cuando el fosfato llega a una concentración 0,002 M que se interpreta como una saturación del sistema de transporte en el cual interviene un proceso de esterificación (Rothstein, 1956).

El PO_4H_2^- y el PO_4H^- , se absorben por "sitios" distintos, siendo el proceso inhibido competitivamente por OH^- (Hagen y Hopkins, 1955). Hopkins (1956), determina que la inhibición requiere oxígeno. De acuerdo a Loewenberg y Tolbert (1958), el movimiento no está relacionado directamente con la magnitud del "depósito" (esterificantes); encuentran que el agregado de colina no aumenta la absorción y además disminuye la ascensión. Por otra parte, según Wright y Barton (1955), la acumulación de fósforo en las hojas depende del traslado de agua. Con una nutrición normal el compuesto orgánico predomina en las raíces mientras que el mineral predomina en las hojas (Bagaev, 1954, citado por Pirson, 1955).

El fósforo asciende principalmente por el leño y desciende por el liber, pero a través de este tejido puede moverse en direcciones opuestas (Chen, 1951). El descenso se produce a una velocidad de 21 cm por hora en algodón y puede difundirse en forma transversal al leño para ascender nuevamente, estableciéndose una "circulación" dentro de la planta (Biddulph y Markle, 1944). Se ha demostrado que esta circulación se mantiene por lo menos durante un período de 96 horas (Biddulph, Biddulph, Cory y Koontz, 1958).

La velocidad de ascensión es muy variable, habiéndose registrado un ascenso de 64 cm por hora en trigo (Frazier, Schaff, Hein y Mac Farland, 1956) y de 272 cm en tomate (Arnon, Stout y Sipos, 1940).

METODOS EMPLEADOS

Plantas de repollo (*Brassica oleracea*) provenientes de almácigo se trasplantaron a recipientes de material plástico recubiertos con una capa de pintura de aluminio. Como medio de sostén se utilizó grava fina. Las plantas se regaron diariamente con solución nutritiva hasta que alcanzaron una altura aproximada de 20 cm y las hojas una superficie de 85-165 cm², sin haber llegado a formar "cabeza".

El día 18 de julio se lavaron los recipientes, gravas y raíces con agua corriente al comienzo y luego con agua destilada, quedando en estas condiciones hasta el día siguiente que se aplicó la solución radioactiva. Esta solución contenía:

NO ₃ Na.....	0,589 gr/l
SO ₄ Mg.7H ₂ O.....	0,490 »
PO ₄ H ₂ K.....	0,250 »
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,250 »
ClNa.....	0,125 »

Se eliminaron las sales de Ca e Fe para evitar toda posible precipitación del P. Se consideró que la ausencia de estos elementos en la solución nutritiva, como la de los menores, de ninguna manera podrá tener influencia durante el breve lapso que dura el ensayo.

El P₃₂ se agregó hasta impartir una actividad de 333 microcurie /l, siendo despreciable su contenido en peso. Se trabajó con 6 plantas que se dividieron en dos grupos, al primero se le suministró la solución activa en forma normal, agregando 450 ml por recipiente con 150 microcurie en cada uno. Las plantas correspondientes al segundo grupo se cortaron en la parte inferior de los tallos, sumergiéndolas de inmediato en la solución con el radioisótopo.

Con el objeto de establecer el momento adecuado para extraer las muestras, se determinó en forma periódica la actividad de las hojas, deslizándolas sobre la ventana de un tubo Geiger conectado a un escalímetro. Se midieron en total 10 hojas de cada planta y los resultados (Tabla I), se expresan en "cuentas" por minuto, donde se han restado 70 cuentas que corresponden, 35 al fondo natural y 35 a la influencia directa de la solución del recipiente.

TABLA I

Radioactividad de las hojas por la afluencia de P_{32}

Tiempo transcurrido entre la aplicación de P_{32} y su determinación	Absorción directa ¹ c/m	Absorción radical ² c/m
0 ^h 48'	442	—
3 13	2066	153
4 58	3400	330
6 28	3078	—
6 53	—	475
7 58	3690	—
8 43	—	629
9 3	3807	—
9 38	—	788
24 1	6271	—
24 8	—	934
47 53	—	2613

Como puede observarse, a los 48 minutos ya se registró una actividad importante en las plantas con absorción directa, mientras aún no se había manifestado en las hojas de aquellas plantas con absorción normal, a través de las raíces. En este caso recién a las 3 horas y 13 minutos se registraron 153 c/m.

A las 24 horas las plantas que habían absorbido la solución por vía directa presentaban cierto marchitamiento, razón por la cual no se extrajeron más muestras. Aproximadamente a las 48 horas las plantas con absorción radical manifestaron una actividad aún muy inferior a aquella de las hojas de absorción directa a las 24 horas.

Para la obtención de las muestras se practicaron numerosos cortes circulares con un sacabocado de 7 mm de diámetro, distribuidos en forma homogénea en la lámina de la hoja, procurando no incluir las nervaduras mayores. Para cada tratamiento correspondieron 33 hojas y cada muestra pesaba 2 gr, habiendo extraído en total 4 muestras por tratamiento. De cada una se determinó el contenido de P y la actividad correspondiente a los ácidos nucleicos totales, lípidos, compuestos orgánicos insolubles, orgánicos solubles e inorgánicos. De la actividad se calculó el P incorporado.

Para la separación de los compuestos mencionados se utilizó el

¹ Directa: Absorción directa por tallos cortados y sumergidos en la solución.

² Radical: Absorción normal por las raíces.

método de Juni et al. modificado por Klein (1952). Luego de separadas, las muestras fueron mineralizadas con ácido sulfúrico y ácido nítrico, neutralizándose a continuación con amonio. El contenido de P se evaluó colorimétricamente con molibdato de amonio y ácido 1-amino 2-naftol 4-sulfónico como reductor, en un electrofotómetro Fisher. La actividad del P incorporado se determinó luego de la mineralización, en 10 ml de la solución sulfúrica, calculando los valores correspondientes a la solución total. Con este objeto las cuarenta muestras de las soluciones en ácido sulfúrico se colocaron en cajas de Petri de 4,7 cm de diámetro que se acomodaron debajo del Geiger, a 1 cm de la ventana, sobre un soporte fijo para evitar errores de geometría. Con una solución patrón preparada en forma similar se estableció la relación entre contenido y actividad y se trazaron curvas para determinar si la absorción del fósforo y otras sales tenían influencia, la cual resultó sin importancia. Las "cuentas" se registraron con un escalímetro durante 10 minutos, lapso que dió valores constantes.

Los resultados se exponen en la Tabla II, donde los valores del contenido de fósforo se expresan en mg/g de peso seco, promediando las cuatro determinaciones de cada tratamiento. El P incorporado se expresa en porcentaje del contenido del compuesto correspondiente y de la fracción inorgánica.

DISCUSION

De acuerdo a los datos obtenidos sobre la llegada del fósforo a las hojas, la velocidad de ascensión es superior a los 25 cm por hora cuando la solución penetra directamente por los vasos. Cuando la absorción se produce a través de las vías normales, lo cual implica procesos de difusión más complicados y esterificación, la ascensión ha sido mucho más lenta, llegando aproximadamente a 6 cm por hora. Estos valores se calculan cuando la actividad de la hoja fue relativamente alta (442 y 153 c/m respectivamente), pero es evidente que la primer llegada del fósforo debió haberse producido con anterioridad. No obstante, de ninguna manera puede compararse a la velocidad de traslado obtenida por Frazier et al. (1956) en trigo. Esta diferencia puede atribuirse a la especie con que hemos trabajado, a la altura de las plantas y a las condiciones registradas

TABLA II

Contenido e incorporación de fósforo en compuestos de tejido de hoja de repollo

Absorción	Tiempo transcurrido entre la aplicación de P ₂ y extracción de la muestra	A. nucleicos		Lípidos		Org. insoluble		Org. soluble		Inorgánico	
		Contenido mgr/gr promedio	P Incorp. %	Contenido mgr/gr promedio	P Incorp. %	Contenido mgr/gr promedio	P incorp. %	Contenido mgr/gr promedio	P incorp. %	Contenido mgr/gr promedio	P incorp. %
Radical ¹	3 ^h 33'		—		—		—		0,18		0,14
	7 48		—		—		—		0,50		0,21
	25 13	0,147	—	0,026	—	0,234	—	1,213	0,84	0,511	0,93
	48 18		—		—		—		2,28		1,61
Directa ²	1 18		—		—		—		1,05		0,37
	4 13		—		—		—		2,71		1,79
	7 13	0,108	—	0,024	—	0,224	0,39	1,206	4,12	0,571	3,19
	24 43		—		—		0,68		5,54		4,39

¹ Radical : Absorción normal por las raíces.

² Directa : Absorción directa por tallos cortados y sumergidos en la solución.

durante el ensayo, ya que las plantas fueron mantenidas en un anteinvernáculo de luz muy difusa, alta humedad relativa y temperatura baja.

Hasta las 24 y 48 horas de absorción directa y radical respectivamente, la incorporación de fósforo sólo pudo registrarse en la forma de compuestos orgánicos insolubles, orgánicos solubles e inorgánico. No se ha combinado aún constituyendo ácidos nucleicos ni lípidos o bien lo ha hecho en cantidades comparativamente reducidas, inferiores a 1,7 gammas en las muestras extraídas.

En el tiempo que duró el ensayo (48 h) el fósforo orgánico insoluble no manifestó una actividad medible cuando la absorción fue radical. Con absorción directa recién pudo registrarse después de 7 horas, correspondiendo a un contenido que sólo alcanza al 0.39 % del fósforo total de este compuesto.

Casi todo el fósforo absorbido se ha combinado constituyendo sustancias orgánicas solubles o bien ha quedado en forma inorgánica. Los valores de la absorción directa han sido superiores, en tal forma que a las 48 horas los de absorción radical sólo alcanzan aproximadamente a una fracción de aquéllos, registrados a las 24 horas.

En general el contenido de fósforo incorporado como orgánico soluble, es superior al inorgánico y esta diferencia se acentúa cuando la absorción es directa. No se manifestaron mayores diferencias entre los contenidos promedios de ambas formas de absorción, excepto en el ácido nucleico y en el inorgánico. En esta última forma la absorción directa elevó su contenido aproximadamente en un 10 %. Tal diferencia, considerada en forma global, no puede explicar los resultados dispares mencionados entre la absorción por el tallo y la raíz.

Calculando la concentración total en fosfato por litro de la solución de fósforo inorgánico de la hoja, se obtienen valores (0,253 gr/l) similares a la concentración de la solución nutritiva utilizada (0,250 gr/l). Es posible que con la absorción directa, el fósforo inorgánico afluya arrastrado por la corriente transpiratoria y se acumule en los haces leñosos de las nervaduras, foliares, estableciéndose así una concentración desigual a través de la lámina de la hoja. Este comportamiento estaría facilitado si el "reservorio" esterificante foliar fuera inferior al de las raíces (Bagaer, 1954). La vaina parenquimática, que envuelve los haces conductores de las

hojas, suele llegar hasta la epidermis estableciendo una comunicación directa con el exterior que inclusive podría actuar en la transpiración cuando es delgada, dejando poco lugar entre los vasos leñosos y el tejido epidérmico (Esau, 1953; Wylie, 1943; Armacost, 1944). La cutícula, cuando embebida en agua, se hace más permeable, permitiendo el paso de sales en ambos sentidos (van Overbeek, 1956). En consecuencia el fósforo acumulado en los vasos podría pasar directamente a las células epidérmicas cercanas, a través del parénquima que las rodea, y de las regiones epidérmicas de alta concentración sería lixiviado por el agua de lluvia.

Cuando el fósforo penetra normalmente por el sistema radical la absorción es más lenta ya que se produce a través de procesos metabólicos, llegando a las nervaduras foliares en forma regular, lo cual permite su distribución homogénea por el limbo, antes que tenga tiempo de concentrarse en los vasos y parénquima que los rodea.

Resumen. - El objeto del presente trabajo fue determinar la incorporación de fósforo, absorbido en los ácidos nucleicos, lípidos, compuestos orgánicos solubles e insolubles y en la fracción inorgánica, utilizando P_{32} .

La solución fue suministrada a las raíces o directamente al tallo cortado de plantas de repollo.

Se evaluó colorimétricamente el contenido de P de los compuestos mencionados y de la fracción inorgánica. El porcentaje incorporado se determinó por la actividad específica de cada fracción.

Tanto el P absorbido por las raíces como por el tallo no se incorporó o sólo lo hizo en cantidades que no fue posible medir, a los ácidos nucleicos y lípidos, hasta las 24 h 43' y 48 h 18' respectivamente. Estos lapsos representan los tiempos máximos ensayados con absorción directa y radical en el mismo orden.

Sólo se produjo incorporación medible en el P orgánico insoluble cuando la absorción fue directa, con valores que llegaron al 0,39 % y 0,68 % a las 7 h 23' y 24 h 43' respectivamente.

La incorporación en forma de P orgánico soluble y como inorgánico aumentó a medida que el tiempo de absorción transcurría y en general fue mayor en las plantas a las cuales se les suministró en forma directa por el tallo.

Summary. - The purpose of this work was to determine the incorporation of uptaken phosphorus into nucleic acids, lipids, soluble and insoluble organic compounds and the inorganic fraction, with the utilization of P_{32} . The P solution was supplied to the root and directly to the stem of cabbage plants by immersing the basal end of it, previously cut off.

The P content of the several mentioned groups of compounds and the inorganic amount was colorimetrically determined. The incorporated percentage was measured by the specific activity of every fraction.

The P absorbed either by the root or the stem was not incorporated, or it was in such a small amount that it was not possible to determine it, to the nucleic acids and to the lipids, until 24 h 43' after supplying it, when it was uptaken by the stem and 48 h 18', when it was uptaken by the roots. Both times were the longest that have been respectively tested.

There was incorporation as insoluble organic compounds only when the absorption was direct, up to 0.39 % and 0.68 % after 7 h 23' and 24 h 43' respectively.

The incorporation into soluble organic compounds and the accumulation as inorganic P increased with the elapsing of absorption time. In general, the uptake was bigger when the supply was direct than when it was by the roots.

BIBLIOGRAFIA

- ARMACOST, R. R. *The structure and function of the border parenchyma and veins-rib* of certain dicotyledon leaves.* — Proceedings of the Iowa Academy of Science 51 : 157-169. 1944.
- ARNON, D. I. *Phosphorus metabolism and photosynthesis.* — Ann. Rev. Plant Phys. 7 : 325-359. 1957.
- ARNON, D. I., P. R. STOUT AND F. SIVOS. *Radioactive phosphorus as an indicator of phosphorus absorption of tomato fruits at various stages of development.* — Amer. Jour. Bot. 27 : 791-798. 1940.
- BIDDULPH, O. *Absorption and movement of radiophosphorus in bean seedlings.* — Plant Phys. 15 : 131-136. 1940.
- BIDDULPH, O., S. BIDDULPH, R. CORY AND H. KOONTZ. *Circulations patterns for phosphorus, sulfur and calcium in the bean plant.* — Plant Phys. 33 : 293-299. 1958.
- BIDDULPH, O. AND J. MARKLE. *Translocation of radiophosphorus in the phloem of cotton plant.* — Amer. Jour. Bot. 31 : 65-70. 1944.
- BIDDULPH, S. *Visual indications of S^{35} and P^{32} translocation in the phloem.* — Amer. Jour. Bot. 43 : 143-148. 1956.
- BIDDULPH, S., O. BIDDULPH AND R. CORY. *Visual indications of upward movement of foliar applied P^{32} and C^{14} in the phloem of the bean stem.* — Amer. Jour. Bot. 8 : 648-652. 1958.
- BUTLER, G. W. *Ion uptake by young wheat plant. II. The « apparent free space » of wheat roots.* — Plant Phys. 6 : 617-653. 1953.
- CHEN, S. L. *Simultaneous movement of P^{32} and C^{14} in opposite directions in phloem tissue.* — Amer. Jour. Bot. 38 : 203-210. 1951.
- ESAU, K. *Plant anatomy.* John Wiley and Sons, Inc. New York Chapman and Hall, Ltd. London. 735 pp., 1953.
- FISKE, C. H. AND Y. SUBBAROW. *The colorimetric determination of phosphorus.* — Jour. Biol. Chem. 66 : 375-400. 1925.
- FRAZIER, T. C., J. F. SCHAFF, R. E. HEIN AND R. H. MAC FARLAND. *Translocation and distribution of radioactive phosphorus in wheat.* — Bot. Gaz. 118 : 112-127. 1956.
- FREERBAIRN, H. T. AND F. REMMERT LEMAR. *Oxidative phosphorylation by subcellular particles from cabbage.* — Plant Phys. 32 : 374-376. 1957.

- FRIEZ, G. AND A. W. NAYLOR. *Phosphorylation coupled with the oxidation of succinate by mitochondria from cauliflower and mung beans*. — *Plant Phys.* 30: Supplement September 5-8: XXXI. 1955.
- GORDON, S. A. AND K. SURREY. *Red, far-red interaction in oxidative phosphorylation*. — *Plant Phys.* 33; Supplement August 24-28: XXIV. 1958.
- HAGEN, C. E. *Phosphate absorption by plant roots*. — *A conference on radioactive isotopes in agriculture* 303-307. U. S. Atomic Energy Commission. Technical Information Service 7512. 1956.
- HAGEN, C. E. AND H. T. HOPKINS. *Ionic species in orthophosphate absorption by barley roots*. — *Plant Phys.* 30: 193-199. 1955.
- HOPKINS, H. T. *Absorption of ionic species of orthophosphate by barley roots; effects of 2,4-dinitrophenol and oxygen tension*. — *Plant Phys.* 31: 155-161. 1956.
- KAMEN, M. D. AND S. SPIEGELMAN. *Cold spring harbor*. Symp. on Quant. Biol. 13: 151. 1948.
- KLEIN, R. M. *Nitrogen and phosphorus fractions, respiration, and structure of normal and crown gall tissues of tomato*. — *Plant Phys.* 27: 335-354. 1952.
- KRAL, A. R. *Phosphate uptake by digitonin extracts of spinach chloroplasts*. — *Plant Phys.* 33; Supplement August 24-28: XXX. 1958.
- LIEBERMAN, M. AND J. B. BIALES. *Oxidative phosphorylation by sweet potato mitochondria*. — *Plant Phys.* 30; Supplement September 5-8: XXX. 1955.
- LOEWENBERG, J. R. AND N. E. TOLBERT. *Effects of some organic compounds on phosphorus movement in plants*. — *Plant Phys.* 33; Supplement August 24-28: XX. 1958.
- LUNDEGARDH, H. *Mechanism of absorption, transport, accumulation and secretion of ions*. — *Ann. Rev. Plant Phys.* 6: 1-24. 1955.
- OLIVER, W. F. *Absorption and translocation of phosphorus by foliage*. — *Scient. Agr.* 32: 427-432. 1952.
- OVERSTREET, R. AND L. JACOBSON. *Mechanisms of ion absorption by roots*. — *Ann. Rev. Plant Phys.* 3: 189-206. 1952.
- PIKSON, A. *Functional aspects of mineral nutrition of green plants*. — *Ann. Rev. Plant Phys.* 6: 71-114. 1955.
- POSS JR., W. A., M. F. STANSBURY AND C. L. HOFFPAUER. *An analytical system for determining phosphorus compounds in plant materials*. — *Jour. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 36: 492-504. 1953.
- ROHSTEIN, A. *Some biochemical functions of the cell surface as deduced by isotope studies*. — *Peaceful uses of Atomic Energy*. United Nations, 12: 409-413. 1956.
- SCHMIDT, G. *Phosphorus metabolism*. I: 443-475. Mc Elroy, W. D. Glass, B.: Eds. John Hopkins Press, Baltimore, Md., 762 pp., 1952.
- STOUT, R. R. AND D. R. HOAGLAND. *Upward and lateral movement of salt in certain plants as indicated by radioactive isotopes of potassium, sodium, and phosphorus absorbed by roots*. — *Amer. Jour. Bot.* 26: 320-324. 1939.
- STREHLER, B. L. *Phosphorus metabolism*. 2-492. Glass, B. and Mc Elroy, W. D.: Eds. John Hopkins Press, Baltimore, Md., 930 pp., 1952.
- SWITZER CLAYTON, M., F. G. SMITH AND W. E. LOOMIS. *Factors affecting oxidation and phosphorylation of soybean mitochondria*. — *Plant Phys.* 30; Supplement September 5-8: XXXI. 1955.

- TSAO, T. AND W. G. WHALEY. *Uptake and accumulation of phosphorus 32 by normal and gall tissues.* — Bull. Torrey Bot. Club 77 : 382-384. 1950.
- TUCKEY, H. B., S. H. WITWER, F. G. TEUBNER AND W. G. LONG. *Utilization of radioactive isotopes in resolving the effectiveness of foliar absorption of plant nutrients.* — Proceedings of the International Conference on the Peaceful uses of Atomic Energy. 12. 1956.
- WHATLEY, F. R., M. B. ALLEN AND D. I. ARNON. *Photosynthetic phosphorylation by broken chloroplasts.* — Plant Phys. 30 Supplement September 5-8 : XXIV. 1955.
- WILLIAMS, R. F. *Redistribution of mineral elements during development.* — Ann. Rev. Plant Phys. 6 : 25-42. 1955.
- WRIGHT KENNETH, E. AND L. BARTON NANCY. *Transpiration and the absorption and distribution of radioactive phosphorus in plant.* — Plant Phys. 30 : 368-388. 1955.
- WYLIE, R. B. *The role of the epidermis in foliar organization and its relations to the minor venation.* — Amer. Jour. Bot. 30 : 273-280. 1943.
- *Conduction in dicotyledon leaves.* — Proceedings of the Iowa Academy of Science 53 : 195-201. 1946.