

METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS PRINCIPALES DE LA FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) USANDO EL ^{14}C

R. Valdés-Carmenate¹; N. Tejera²; A. R. Guzmán¹; M. I. Balbín¹; E. Ortega².

¹Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana, Apartado 18-19, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32700 E-mail: ramiro@main.isch.edu.cu

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

RESUMEN.

Se propone una metodología que permita evaluar la capacidad fotosintética en plantas de caña de azúcar, caracterizando los fotosintatos mediante el ^{14}C como elemento trazador. El CO_2 se suministró a una cámara de acrílico donde se introdujo la hoja de una planta que se encontraba en su hábitat. El tiempo de exposición empleado fue de 10 y 30 minutos. Para extraer los fotosintatos se empleó el método de extracción fraccional y para su evaluación se usó la técnica de centelleo líquido, realizándose pruebas de quimioluminiscencia y corrección de la eficiencia. La distribución del ^{14}C fue mayor en la fracción etanólica (90%) (aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos libres), siguiéndole la fracción alcalina (proteínas). Se detectó que para un mayor tiempo de fijación se incrementa la cantidad de compuestos nitrogenados marcados con ^{14}C con relación a los carbohidratos, reafirmando con ello la óptima utilización que hace el cultivo en el balance del metabolismo C/N. Al ocurrir la fijación biológica *in situ*, es más precisa la cuantificación en la distribución relativa, lo que unido al alto valor del ^{14}C fijado en las fracciones orgánicas (98.6% del total), permite una mayor confiabilidad en la interpretación de los resultados.

PALABRAS CLAVES: Asimilación de CO_2 , extracción de fotosintatos, balance C/N, carbono marcado.

METHODOLOGY FOR ^{14}C -PHOTOSYNTHATES STUDY IN PLANTS OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum*)

SUMMARY

A methodology to evaluate the photosynthetic capacity in sugarcane plants by the ^{14}C -photosynthates production is proposed. $^{14}\text{CO}_2$ was produced within an acrylic chamber in which the leaf was introduced. The sugarcane plants were growing under natural conditions (habitat) and were exposed to a $^{14}\text{CO}_2$ -flux during 10 and 30 minutes, respectively. Photosynthates extract was obtained using a liquid scintillation method. The quenching was eliminated. Higher concentration of ^{14}C -photosynthates was found in the ethanolic fraction (free sugars, aminoacids and organic acids), and then in the alkaline fraction (proteins). When sugarcane plants were exposed for 30 minutes to $^{14}\text{CO}_2$ atmosphere a high content of nitrogen compounds was detected. It confirms that there are optimal relations between the C/N metabolism in the sugarcane when *in situ* biological fixation of $^{14}\text{CO}_2$ was taking place. The highest value of ^{14}C -fixed in the organic fractions (98.6%) allows a great confiability in the explanation of the results.

KEY WORDS: Photosynthesis; CO_2 assimilation; rate C/N, carbon tracer.

INTRODUCCIÓN

La producción y la calidad esperada de una cosecha depende en gran medida de su eficiencia en la fotosíntesis, así como de las interconversiones posteriores de los productos fotosintéticos (Caruso, 1985).

En la realización de este estudio se parte de que el ^{14}C ocupa un lugar especial entre los trazadores radiactivos por su poca labilidad en la mayoría de los compuestos, por la posibilidad de ser introducido a las plantas en

forma de $^{14}\text{CO}_2$ para estudios de fotosíntesis y translocación y porque su medición por centelleo líquido se realiza con buena eficiencia (Eduardo y Cerri, 1988; Robinson-Beer *et al.*, 1990).

Basado en dichos aspectos, en este trabajo se propone el establecimiento de una metodología que permita evaluar en las propias condiciones de cada hábitat, la distribución del ^{14}C en los productos principales de la fotosíntesis en el cultivo de la caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó con retoños de plantas de 6 meses (cultivar Ja 60-5), sembradas en suelos del área experimental del Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nuclear, Ciudad Habana, Cuba. Las horas de fijación fluctuaron entre 9:00 y 11:30 a.m. en un día plenamente soleado, empleándose muestras foliares de la lámina 5 sometidas a la temperatura ambiente.

El ¹⁴CO₂ se suministró a la planta a través de una cámara de material acrílico, incoloro y transparente (Tejera, 1992), la cual tiene dos aberturas laterales por donde es introducida la hoja de la planta a evaluar, sellándola con plastilina para lograr su hermeticidad; y una abertura por la parte inferior donde se coloca un tubo de vidrio que presenta una curvatura y por esta última penetra el referido ¹⁴CO₂.

El dióxido de carbono marcado es producido a partir de 100 µl de disolución de hidrógeno carbonato de sodio (¹⁴C) de concentración radiactiva de 250 µCi·ml⁻¹ al reaccionar con disolución de ácido perclórico al 5%.

La fijación del material biológico se realizó a continuación de retirar las láminas empleadas, cortando la zona alimentada y sometiéndola a proceso de desecado. Se utilizaron muestras de tres plantas del cultivar estudiado, utilizándose 100 mg de masa seca, realizándose por triplicado el trabajo de procesamiento de las muestras biológicas.

Se empleó el método de extracción de fotosintatos a partir de la técnica original propuesta por Yordanov (1969).

En la Figura 1 se presenta la metodología a seguir para concretar el estudio de los productos principales de la fotosíntesis, a partir de la cual se pueden precisar los siguientes aspectos:

- La producción y fijación del ¹⁴CO₂ se realiza en las hojas de las plantas que se encontraban en sus condiciones naturales, utilizando para ello una cámara de acrílico diseñada específicamente para la lámina foliar de la caña de azúcar.
- Para la extracción y evaluación de los productos orgánicos, se utilizó el método de extracción de fotosintatos basando su cuantificación en la técnica de centelleo líquido, caracterizándose 5 fracciones fundamentales:

- I) Etanólica (aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos).
- II) Sulfosalicilica (almidón).
- III) Perclórica (ácidos nucleícos y nucleótidos).
- IV) Clorhídrica (hemicelulosa).
- V) Alcalina (proteínas).

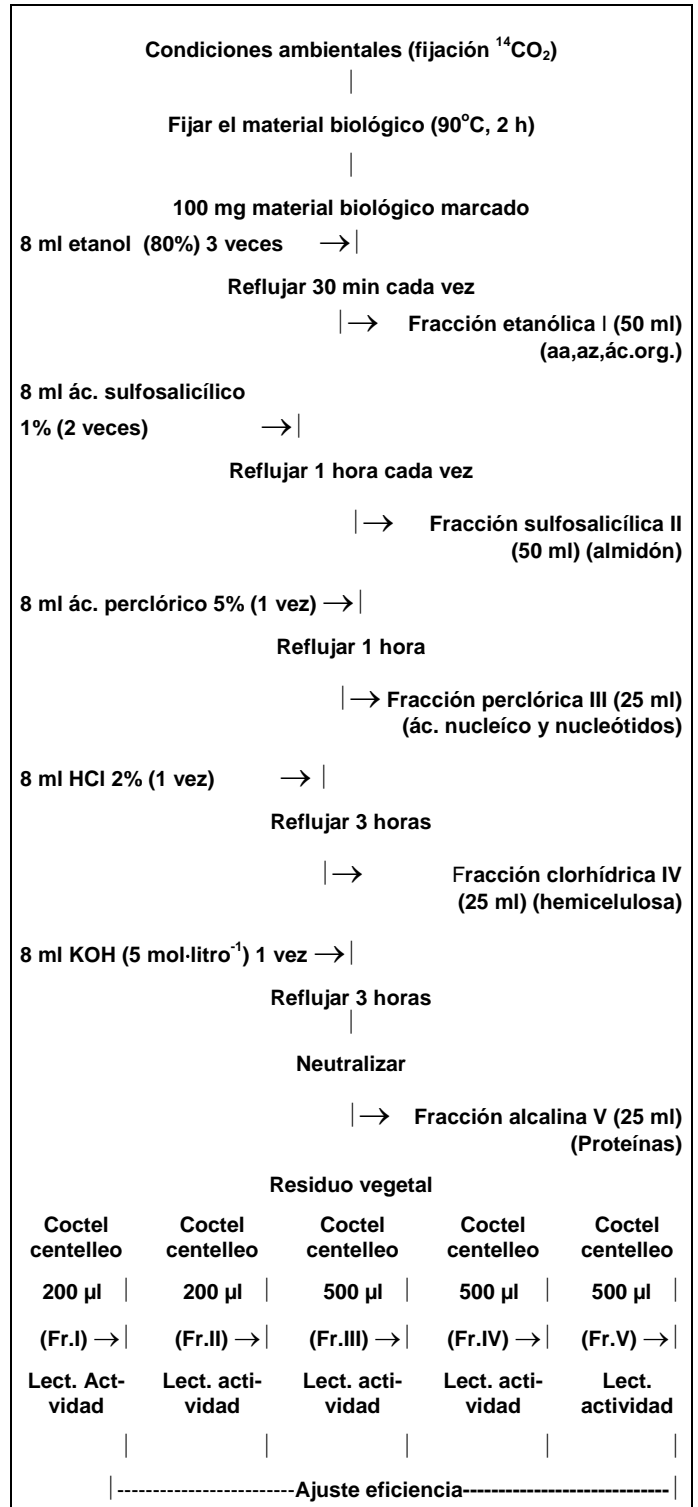


Figura 1.- Metodología para el estudio de los fotosintatos ¹⁴C en caña de azúcar

Precisándose que el 98.6% de toda la actividad fijada se detecta en dichas fracciones orgánicas.

Se realizaron pruebas de quimioluminiscencia y corrección de la eficiencia, para evaluar los efectos del “quenching”, empleándose el método de relación de ca-

nales. Para eliminar la quimioluminiscencia en la fracción V (alcalina), lo cual fue comprobado con muestras en frío, se realizó una neutralización previa a la preparación de la muestra a medir por centelleo líquido. En el caso de las restantes fracciones fueron medidas directamente en el medio centellante.

Para la medición se utilizó un equipo de centelleo líquido (TRACERLAB CM-1), empleándose 5 ml de centellante de la siguiente composición: tritón X100 (150 ml), tolueno (300 ml), PPO (2.475 g), POPOP (0.045 g).

Se realizaron pruebas de quimioluminiscencia y para ello se trabajó de forma paralela la extracción de las diferentes fracciones orgánicas del tejido vegetal, por un procedimiento en frío. La corrección de la eficiencia se efectuó por el método de relación de canales.

Finalmente se evaluó la actividad isotópica remanente en el tejido vegetal empleándose el método de digestión ácida (Cruz *et al.*, 1994).

Los resultados fueron expresados en actividad absoluta por unidad de masa seca $[A(\text{dpm})/m(\text{mg})]$ y en porcentaje relativo de cada fracción con respecto a la actividad total de todas las fracciones para cada muestra biológica. Los datos del porcentaje relativo fueron transformados según $\text{sen}^{-1}x$ y procesados estadísticamente para conocer el coeficiente de variación de cada fracción a los diferentes tiempos de exposición, para con ello poder discriminar la mayor precisión en la interpretación de la respuesta metabólica en las plantas objeto de estudio, empleando la expresión $(S_x/X_g) \cdot 100$, donde S_x representa el error típico de la media y X_g representa la media general.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica original de Yordanov (1969) hacia una evaluación potencial de los fotosintatos, ya que trabajaba con discos de hojas previamente separados de la planta. Con este trabajo experimental se propone un método que caracteriza *in situ* la formación de los mismos, lo cual permite hacer consideraciones mucho más precisas de las interrelaciones metabólicas, en un cultivo donde su producto agrícola fundamental es un compuesto orgánico de los primarios de la fotosíntesis, es decir, la sacarosa. Igualmente se perfecciona la técnica original introduciendo métodos radioquímicos de mayor precisión en la cuantificación de los productos orgánicos, lo cual unido al elevado porcentaje en la separación de dichos fotosintatos, aporta mucho más valor práctico a los resultados en la caracterización química, redundando en un mayor valor en la interpretación de los resultados.

La distribución del ^{14}C de cada una de las fracciones extraídas se presentan en el Cuadro 1, trabajándose tanto para un tiempo de fijación de 10 y 30 minutos, respectivamente. La fracción etanólica (caracterizada por aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos libres) es la que

presenta la mayor cantidad de compuestos marcados, resultados concordantes con los expresados para otros cultivos según lo señalado por Stanov *et al.* (1979) y Valdés (1985), trabajando con plantas de girasol y cafetos en condiciones controladas y de campo, respectivamente; mientras que la fracción alcalina resultó ser la segunda más favorecida en la detección de compuestos marcados con ^{14}C .

Al comparar la precisión de los resultados considerando los dos tiempos de fijación (Cuadro 2), se aprecia que a un mayor tiempo ante la fuente de $^{14}\text{CO}_2$ se alcanzan resultados más confiables en la determinación analítica, por lo cual pueden ser utilizados más convincentemente a la hora de explicar las diferentes transformaciones metabólicas; dado que la translocación de productos marcados garantiza una mayor estabilidad en la síntesis y acumulación de fotosintatos, básicamente considerando plantas con hojas fisiológicamente maduras, acorde con lo expresado por Robinson-Beers *et al.* (1990) y Valdés *et al.* (1997), trabajando con caña de azúcar.

La distribución del ^{14}C en los productos primarios (Cuadro 1) se comportó comparativamente según el tiempo de fijación empleado; aunque deben resaltarse los valores superiores relativos en el contenido de compuestos nitrogenados (proteínas, ácidos nucleicos y nucleótidos) con relación a los carbohidratos (almidón, hemicelulosa). En particular al observar la proporción proteína/almidón (4.51) para el tiempo de 30 minutos, es posible plantear que las plantas de caña de azúcar hacen una óptima utilización del balance del metabolismo del nitrógeno con referencia al metabolismo del carbono (C/N), acorde con lo expresado por Silveira (1987) y Madan *et al.* (1991) empleando métodos radioquímicos a la hora de evaluar la bioproduktividad del cultivo referido.

Considerando los aspectos anteriormente abordados, se propone que para el cultivo de la caña de azúcar, se mantenga un tiempo de fijación de 30 minutos ($^{14}\text{CO}_2$) para establecer los estudios de caracterización en el orden fisiológico-bioquímico, acorde con los elementos planteados por Hartt *et al.* (1963).

CUADRO 1. Proporción relativa en la distribución del ^{14}C en los fotosintatos en caña de azúcar (var. Ja 60-5)

Fotosintatos	Tiempo fijación (10 min)	Tiempo fijación (30 min)
Aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos	88.7 %	89.6%
Almidón.	2.7%	1.4%
Ácidos nucleicos y nucleótidos.	4.0%	1.7%
Hemicelulosa.	0.8%	1.3%
Proteínas.	3.8%	6.0%

CUADRO 2. Variabilidad de las determinaciones en las fracciones orgánicas según tiempo de fijación (datos transformados según sen^{-1}) en caña de azúcar.

Fracción orgánica	Tiempo fijación 10 minutos			Tiempo fijación 30 minutos		
	S _x	X _g	c.v. (%)	S _x	X _g	c.v. (%)
Alcohólica	0.0123	5.18	0.24	0.0135	5.19	0.26
Sulfosalicilica.	0.2734	1.65	16.57	0.1098	1.10	9.81
Perclórica	0.2403	2.04	11.78	0.1309	1.19	10.99
Clorhídrica	0.1374	0.73	18.82	0.0141	1.04	1.36
Alcalina	0.2908	1.94	14.99	0.1558	2.49	6.26

c.v. = Coeficiente de variación; S_x= Error típico; X_g= media general.

CONCLUSIONES

Se logró estabilizar una técnica que permite el estudio y caracterización de los fotosintatos en el cultivo de la caña de azúcar empleando el ¹⁴C como elemento trazador; basado en la evaluación de las plantas en las condiciones naturales. Las mediciones se realizaron por centelleo líquido, eliminando los efectos de quimioluminiscencia y para determinar la eficiencia se usó el método de relación de canales.

El ¹⁴C se localizó principalmente en la fracción etanólica (azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos libres), y en menor grado la fracción alcalina (proteínas). La proporción de fotosintatos de compuestos nitrogenados y carbohidratos (tiempo de fijación de 30 minutos), permite evaluar la utilización óptima en el balance C/N para la caña de azúcar.

LITERATURA CITADA

- CARUSO, E. 1985. Eficiencia fotosintética. ANAIS do SEBIAGRI III, Sao Paulo, Brasil, pp. 176-200.
- CRUZ, J.A.; REYES, O.; MARTÍNEZ, F. 1994. Técnica sencilla para la obtención del material vegetal marcado con Carbono-14. Resúmenes del X Seminario Científico del INCA, Cuba, p. 24.
- EDUARDO, B.DE P.; CERRI, C.C. 1988. Uso do C-14 como tracador do fluxo do carbono assimilado pelas plantas (milho, cana-de-acucar, feijao). Arq. Biol. Tecnol. 31(2): 261-271.
- HARTT, C.E.; KORTSCHAK, H.P.; FORBES, A.J.; BURR, G. 1963. Translocation of ¹⁴C in sugarcane. Plant Physiol. 3: 303-318.
- MADAN, V.K.; SRIVASTAVA, A.K.; SONI, N.; AGNIHOTRI, V.P. 1991. Sucrose accumulation in sugar cane: Photosynthetic ¹⁴CO₂ fixation, UDPG sucrose synthetase and acid invertase. Sugar Cane 4: 8-9.
- ROBINSON-BEERS, K.; SHARKEY, TH.D.; EVERT, R.F. 1990. Import of ¹⁴C-photosynthate by developing leaves of sugarcane. Acta Bot.103: 424-429.
- SILVEIRA, J.A.G. 1987. Carbono e nitrogenio: particao e productividades. ANAIS do SEBIAGRI V, Sao Paulo, Brasil, pp. 305-354.
- STANOV, V.; PANDOV, S.; KUDROV, T. 1979. Influence of the different supply with N,P,K.,Ca,Mg,S on the transport of the assimilates and on the distribution of ¹⁴C in the basic fractions of the organic compounds in sunflower. Mineral Nutr. Of Plant, Vol.1, Inst. of Plant Physiology, Sofia, Bulgaria. pp. 65-70.
- TEJERA, N. 1992. Estudio de la translocación de fotosintatos en caña de azúcar utilizando Carbono-14. Trabajo de diploma, I.S.C.T.N., La Habana, Cuba. 53 p.
- YORDANOV, Y. 1969. Técnica de laboratorio de Radioisótopos, Instituto de Fisiología Vegetal, Academia de Ciencias, Bulgaria.
- VALDÉS, R. 1985. Influencia de la nutrición nitrogenada y fosfórica sobre algunos aspectos de la fotosíntesis en el café. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas, I.S.C.A.H., La Habana, Cuba. 125 p.
- VALDÉS, R.; TEJERA, N.; GUZMÁN,A.R.; BALBÍN, M.I.; ORTEGA, E. 1997. Capacidad fotosintética en variedades de caña de azúcar. Revista Chapingo Serie Horticultura 3(1): 39-42.