

# Acido $\delta$ -Aminolevulínico en material vegetal verde y clorótico

por E.. MONGE, J. ABADIA, M. SANZ, L. MONTAÑES y L. HERAS  
Estación Experimental de Aula Dei. ZARAGOZA

---

Recibido el 20-X-1983

---

## A B S T R A C T

E. MONGE, A. ABADIA, M. SANZ, L. MONTAÑES and L. HERAS, 1983.  
 $\delta$  -Aminolevulinic acid in green and chlorotic plant leaves. *An. Aula Dei* 16 (3-4): 275-283.

Levels of  $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$  ALA), total chlorophyll and active iron from normal and iron chlorotic leaves of peach trees, were analyzed.

In our working conditions the obtained data on  $\delta$ -ALA do not show significant differences, between normal and chlorotic materials. Nevertheless the values of active iron and total chlorophyll, showed significant differences.

Similar analyses were made on soybean, that was grown in a greenhouse in a nutritive solution (with and without iron). Results were very similar to those in peach trees.

## I N T R O D U C C I O N

Aunque el hierro no forma parte directa de ningún precursor de la clorofila, está demostrada su implicación en el metabolismo de la misma. JACOBSON (1945) demostró que un tipo de hierro que denominó "activo", localizado enteramente en los cloroplastos, estaba relacionado estrechamente con los complejos clorofila-proteína. Por otra parte, DeKOCK et al. (1960) y EVANS (1959) hallaron una correlación positiva entre el contenido en hierro del medio nutritivo y la cantidad de

clorofila y hemo en hojas. Dentro de la ruta de biosíntesis de clorofila MARSH et al. (1963 a,b) demostraron la participación de este elemento en la formación del ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), primer intermediario identificado en la formación de clorofila y de otros compuestos tetrapirrólicos. HSU y MILLER (1965) y MACHOLD y STEPHAN (1969) indicaron su necesidad en la inhibición de la descarboxilación oxidativa del coproporfirinógeno a protoporfirina. OSTROVSKAYA (1965) y CHERNAVINA (1965) observaron que el hierro actúa en la unión del fitol a la protoclorofila.

DUGGAN y GASSMAN en 1974 trabajando con compuesto que forman complejos estables con el hierro ( $\alpha$ ,  $\beta$ , dipiridilo, o-fenantrolina, etc) comprueban que se sintetizan grandes cantidades de Mg-protoporfirina monometil ester y menores cantidades de Mg-protoporfirina, protoporfirina y protoclorofila, y proponen que el hemo o un complejo de hierro-proteína bloquea la acción de la(s) enzima(s) que gobiernan la síntesis de  $\delta$ -ALA y que los quelatos de hierro son antagónicos a esta inhibición, conduciendo a la biosíntesis de  $\delta$ -ALA y porfirinas. Asimismo, BROWN et al. (1980), sugieren que el hemo controla la síntesis de  $\delta$ -ALA al inhibir la enzima ALA sintetasa.

Los recientes trabajos de SPILLER et al. (1982) y CHERESKIN y CASTELFRANCO (1982) demuestran la necesidad del hierro en la conversión de Mg-protoporfirina IX monometil ester a protoclorofila. Por otro lado, en la formación del  $\delta$ -ALA, dentro del ciclo de KREBS, actúa la enzima aconitatohidratasa (aconitasa) catalizando la acción reversible del agua al doble enlace del ácido cisaconítico en dos direcciones unas que conduce al ácido cítrico y la otra al ácido isocítrico (GLUSKER, 1971). HSU y MILLER (1968) trabajando con esta enzima, obtenida de *Glycine max. Merr.*, observaron que el  $\text{Fe}^{++}$  es un compuesto necesario para su estabilización y activación. YU y MILLER (1982) encuentran que la actividad de la aconitasa, procedente de cebada, era igualmente incrementada al tratarla con hierro.

En el presente trabajo se estudian los niveles de  $\delta$ -ALA en material vegetal verde y afectado por la clorosis férrica.

## MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado hojas de melocotonero (*Prunus Persica* (L) Batch) y hojas de soja (*Glycine max.* L.).

La toma de muestras, en melocotonero, se realizó recogiendo de la 4ª a la 8ª hoja en brotes del año. El cultivo de soja se realizó en inver-

nadero, en recipientes de plástico que contenían solución nutritiva (MOORE, 1981), a la que se hacía burbujear aire de manera continuada. Un lote de plantas recibió esta solución exenta de hierro y otro con este elemento (2,5 ppm) incorporado en forma de Sequestrene 138-Fe (Ciba-Geigy). El cultivo se mantuvo durante varias semanas hasta que se observó visualmente la sintomatología de clorosis férrica.

La determinación de clorofila se llevó a cabo en extractos de metanol del 80%, utilizando los coeficientes de absorción específica de MACKINNEY (1941).

Las medidas de hierro se realizaron según el método descrito por ABADIA et al. (1984).

Los análisis cuantitativos de  $\delta$  -aminolevulínico se hicieron según el método de MAUZERALL y GRANICK (1956) siguiendo las modificaciones realizadas por MILLER et al. (1979). La cromatografía de  $\delta$  -ALA se realizó según técnicas descritas por estos mismos autores utilizando placas de sílica gel.

El patrón de ácido  $\delta$  -aminolevulínico se elaboró con productos de la casa Sigma Chemical Co.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1 aparecen los resultados correspondientes a dos plantaciones de melocotoneros situadas en las proximidades del laboratorio.

En ambas plantaciones existen diferencias significativas entre material verde y clorótico, respecto a los valores de clorofila total y hierro activo, parámetros que nos indican que el material era adecuado para el trabajo. Aunque los valores de  $\delta$  -ALA son prácticamente los mismos, tanto para material verde como clorótico, hay que hacer notar que las derivaciones son bastante altas, sobre todo en la plantación (1).

Los análisis cromatográficos nos proporcionaron un  $R_f = 0,47$  (acetato de metilo. alcohol isopropílico, amoniaco 25%; 45:35.20).

Asimismo, en el conjunto de ambas muestras, se volvió a corroborar la correlación encontrada por ABADIA et al. (1984) entre hierro activo y clorofila total, que en nuestro caso dio un valor de  $r = 0,94$ .

Un tercer muestreo, más amplio, se realizó en la zona del Valle del Jalón, donde se tomaron 27 muestras distintas. Hemos de indicar que, mientras en la toma de muestras anteriores, dentro de cada plantación

CUADRO 1. -- Clorofila, Fe activo y  $\delta$ -ALA en hoja de melocotonero verde y clorótico.

PLANTACION	PARAMETROS	MATERIAL VERDE	MATERIAL CLOROTICO
1 n = 15	Clorofila total nmoles/g.p.f. $\bar{x} \pm S.D.$	4.361 $\pm$ 553	2.455 $\pm$ 350
	Hierro activo $\mu\text{g/g.p.f.}$ $\bar{x} \pm S.D.$	17,3 $\pm$ 8,9	13,1 $\pm$ 1,4
	$\delta$ -ALA $\bar{x} \pm S.D.$ nmoles/g.p.f.	58,3 $\pm$ 8,9	58,3 $\pm$ 10,7
2 n = 7	Clorofila total nmoles/g.p.f. $\bar{x} \pm S.D.$	5.118 $\pm$ 445	1,136 $\pm$ 99
	Hierro activo $\mu\text{g/g.p.f.}$ $\bar{x} \pm S.D.$	16,2 $\pm$ 1,4	10,54 $\pm$ 1,0
	$\delta$ -ALA nmoles/g.p.f. $\bar{x} \pm S.D.$	63,0 $\pm$ 4,6	67,7 $\pm$ 2,2

había una sola variedad, en éste, al tomarse en varias plantaciones, se incluyen variedades distintas de melocotonero. Los resultados obtenidos (Fig. 1), en este caso, se expresan por unidad de superficie para evitar las posibles modificaciones en el peso de las muestras, entre el momento de la recogida y el inicio de los análisis (HERAS *et al.* 1971).

Como puede observarse, la mayoría de los valores de  $\delta$ -ALA se agrupan dentro de un intervalo (0,8-1) bastante estrecho y no aparecen diferencias significativas entre material verde y clorótico. Sin embargo, al quedar reflejadas ciertas desviaciones se consideró de interés determinar el coeficiente de variación de este parámetro dentro de un mismo árbol.

Para ello se eligieron tres árboles y se tomaron tres muestras, fisio-

lógicamente semejantes, de cada uno. Los resultados obtenidos quedar reflejados en el cuadro 2 y parecen indicar, que aunque el  $\delta$ -ALA tiende a ser una constante fisiológica, posee unos límites de variabilidad apreciables y por lo tanto los factores que influyen en los niveles de  $\delta$ -ALA, tendrían que manifestar su acción de forma más notable.

CUADRO 2. — Variación de  $\delta$ -ALA inter-árbol.

ARBOL	1	2	3
$\delta$ -ALA nmoles/g.p.f. $\bar{x} \pm$ S.D.	60,6 $\pm$ 1,1	58,3 $\pm$ 3,8	62,3 $\pm$ 5,6

Es un hecho corriente que en un mismo árbol existan hojas verdes y cloróticas. En el cuadro 3 se dan los valores de  $\delta$ -ALA y clorofila de hojas verdes y cloróticas procedentes de un mismo árbol.

CUADRO 3. — Valores de  $\delta$ -ALA y clorofila en árboles con hojas verdes y cloróticas.

ARBOL	HOJAS VERDES		HOJAS CLOROTICAS	
	$\delta$ -ALA nmol/g.p.f.	Clorofila nmol/g.p.f.	$\delta$ -ALA nmol/g.p.f.	Clorofila nmol/g.p.f.
1	45,22	3.489	46,5	2.194
2	38,30	2.955	37,6	1.980
3	45,20	2.860	40,3	1.150
$\bar{x} \pm$ S.D.	42,9 $\pm$ 3,98	3101 $\pm$ 339	41,4 $\pm$ 4,5	1774 $\pm$ 551

Como puede observarse tampoco se aprecian diferencias significativas en el contenido de  $\delta$ -ALA a pesar de la drástica diferencia en clorofila de las hojas analizadas.

Para contrastar si este hecho se reproducía en condiciones experi-

mentales se cultivó soja en invernadero en solución nutritiva, y se determinó Fe activo, clorofila y  $\delta$ -ALA, sobre material verde y clorótico.

Los resultados que se indican en el cuadro 4 son las medias de tres repeticiones. Las muestras se obtuvieron de hojas con la misma posición en la planta. El primer par de hojas (hojas sencillas) está referenciada como 1P y es la más cercana a la base, el resto de las hojas (trifoliadas) se les asignó la denominación 1T, 2T, 3T y 4T según su disposición ascendente respecto a la base. La muestra 4T (verde) pertenece a hojas en formación y únicamente se pudieron tomar en plantas verdes.

CUADRO 4. — Soja en cultivo hidropónico.

MUESTRA	MATERIAL VERDE		
	Fe $\mu\text{g/g.p.f.}$	Chl $\text{nmoles/g.p.f.}$	$\delta$ -ALA $\text{nmoles/g.p.f.}$
1P	20,0 $\pm$ 1,2	1555 $\pm$ 63	62,0 $\pm$ 4,3
1T	17,0 $\pm$ 1,0	1503 $\pm$ 50	56,3 $\pm$ 4,9
2T	14,0 $\pm$ 1,4	1843 $\pm$ 166	59,3 $\pm$ 2,3
3T	17,0 $\pm$ 0,4	2063 $\pm$ 161	63,3 $\pm$ 2,31
4T	12,0 $\pm$ 1,6	1623 $\pm$ 65	82,0 $\pm$ 5,3
MATERIAL CLOROTICO			
1P	11,0 $\pm$ 0,6	1593 $\pm$ 91	60,0 $\pm$ 4,4
1T	11,0 $\pm$ 0,8	1654 $\pm$ 126	62,0 $\pm$ 3,6
2T	8,0 $\pm$ 0,4	811 $\pm$ 65	69,2 $\pm$ 10,9
3T	5,0 $\pm$ 0,6	585 $\pm$ 98	58,0 $\pm$ 2,41
4T	—	—	—

Como puede observarse en el cuadro citado, nuevamente se refleja la diferencia en el contenido de hierro entre material clorótico y verde. Si tenemos en cuenta los datos de clorofila y hierro es de destacar que tanto las hojas 1P como 1T tienen la misma cantidad de clorofila aunque difieren en la cantidad de hierro y que a partir de las hojas 2T es cuando se aprecia la diferencia en pigmentación, lo que podría indicar que la presencia de hierro jugaría un papel tendente a estabilizar la clorofila, más que intervenir de manera destacada en su formación.

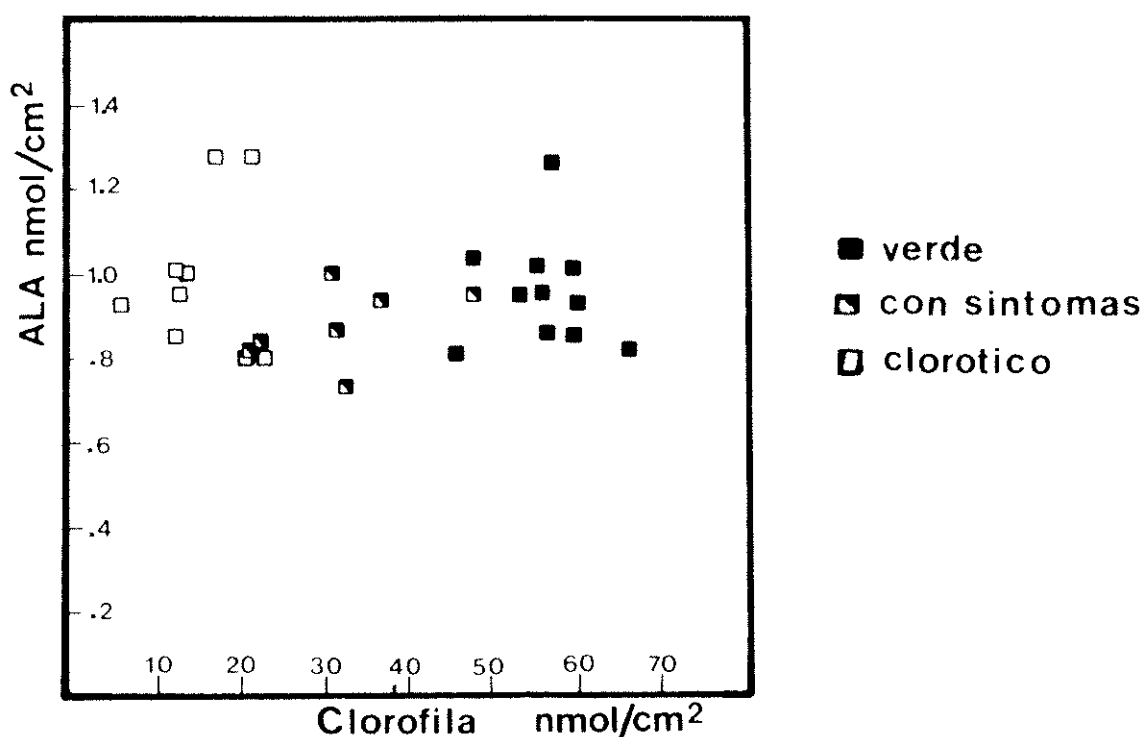


FIG. 1. — Relación clorofila total/  $\delta$ -ALA, expresados por unidades de superficie.

## RESUMEN

Se han determinado los niveles del ácido  $\delta$  - aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), clorofila total y hierro activo en hojas de melocotonero verdes y cloróticas.

Los datos obtenidos, en nuestras condiciones de trabajo, sobre  $\delta$ -ALA, no muestran diferencias significativas, entre ambos tipos de material. Sin embargo los valores obtenidos tanto para hierro activo y clorofila total, mostraron diferencias significativas entre material verde y clorótico.

Las mismas determinaciones se realizaron sobre soja cultivada en invernadero en soluciones nutritivas con y sin hierro. Los resultados obtenidos son muy similares a los encontrados en melocotonero.

## REFERENCIAS

- ABADIA, J.; MONGE, E.; MONTAÑES, L.; HERAS, L.  
 1984 Extraction of iron from plant leaves by Fe (II) chelators. *J. Plant Nutrition* 7 (1-4): In press.
- BROWN, S.; HATZIKONSTANTINOY, H.; HERRIES, S.  
 1980 The structure of prophyryns in hemes in aqueous solution. *Int. S. Biochem* 12. 701-707.
- CHERESKIN, B.M.; CASTELFRANCO, P.A.  
 1982 Effects of iron and oxigen on chlorophyll biosynthesis II. Observations on the biosynthetic pathway in isolated etio-chloroplasts. *Plant Physiol.* 69: 112-116.
- CHERNAVINA, I.A.  
 1965 About the mechanism of the role of iron in the chlorophyll biosynthesis. In: Referati nauchnich soobschenij. Moscow University. M. 142.
- DeKOCK, P.D., COMMISSIONG, K.; FARMER, V.C.; INKSON, R.H.E.  
 1960 Interrelationship of catalase, peroxidase, hematin and chlorophyll. *Plant Physiol.* 35. 599-604.
- DUGGAN, J.; GASSMAN, M.  
 1974 Induction of porphyrin synthesis in etiolated bean leaves by chelators of iron. *Plant Physiol.* 53: 206-213.
- EVANS, H.J.  
 1959 The biochemical role of iron in plant metabolism. School of Forestry Bull. 15, Duke University, Durham, North Carolina.
- GLUSTER, J.P.  
 1971 In "The Enzymes" ed: Boyer. P.D. vol. V, Academic Press, New York.
- GRIS, E.  
 1844 Nouvelles experiences sur l'action des composés ferrugineaus solubles appliqués et specialment an traitement chlorose et à la debilité des plantes. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 19: 1118.
- HERAS, L.; MONTAÑES, L.; ABADIA, A.  
 1971 Importancia del contenido de agua en la interpretación de los resultados en el fenómeno de clorosis de hierro. *An. Aula Dei* 11: 47-50.
- HSU, W.P.; MILLER, G.W.  
 1965 Chlorophyll and porphyrin synthesis in relation to iron in *Nicotiana tabacum*. *Biochem. Biophys. Acta.* 111 (2). 393-402.  
 1968 Iron in relation to aconitate hydratase activity in *Glycine max.* *Merr. Biochim. Biophys. Acta.* 151: 711-713.
- JACOBSON, L.  
 1945 Iron in the leaves and chloroplasts of some plants in relation to their chlorophyll content. *Plant Physiol.* 20 (2): 233.



MacKINNEY, G.

- 1941 Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.

MACHOLD, O.; STEPHAN, U.W.

- 1969 The function of iron in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry*, 8: 2189-2191.

MARSH, H. V.; EVANS, H.I.; MATRONE, G.

- 1963a Investigations on the role of iron in chlorophyll metabolism. I. Effect of iron deficiency on chlorophyll and heme content and on the activities of certain enzymes in leaves. *Plant Physiol.* 38 (6): 632-638.

- 1963b II. Effect of iron deficiency on chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.* 38 (6): 638-642.

MAUZERALL, D.; GRANICK, S.

- 1956 The occurrence and determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219: 435-446.

MILLER, G.W.; DENNY, A.; VOOD, J.K.; WLKIE, G.W.

- 1979 Light-induced delta-aminolevulinic acid in darkgrown barley seedlings. *Plant Cell Physiol.* 20: 131-143.

MOORE, C.T.

- 1981 Research experiences in plant physiology. A laboratory Manual. 2<sup>a</sup> Ed. Springer-Verlag, New York.

OSTROVSKAYA, L.K.

- 1965 The biochemical role of iron in plants. In: Photosynthesis and pigments as the factors of yield. Kieve, Publ. House "Naukova Dumka".

SPILLER, S.C.; CASTELFRANCO, A.M.; CASTELFRANCO, P.A.

- 1982 Effects of iron and oxigen on chlorophyll biosynthesis. I. In vivo observations on iron and oxigen-deficient plants. *Plant Physiol.* 69: 107-111.

YU, M.H.; MILLER, G.

- 1982 Formation of Delta-Aminolevulinic acid in etiolated and iron-stressed barley. *Plant Nutr.* (II): 1259-1271.