

INFLUENCIA DE ALGUNAS DEFICIENCIAS MINERALES
SOBRE EL CONTENIDO DE SUSTANCIAS NITROGENADAS
SIMPLES EN HOJAS DE CAFE

Por

JOSE FARGAS ARROYO

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA
Centro Tropical de Investigación y Enseñanza para Graduados
Turrialba, Costa Rica

Enero, 1963

INFLUENCIA DE ALGUNAS DEFICIENCIAS MINERALES
SOBRE EL CONTENIDO DE SUSTANCIAS NITROGENADAS
SIMPLES EN HOJAS DE CAFE

Tesis

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado

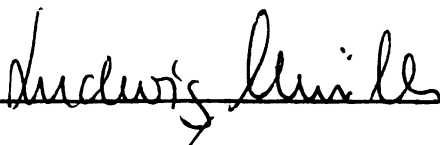
de

Magister Agriculturae

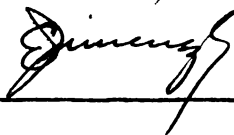
en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA:



Consejero



Comité



Comité

Enero, 1963

A mis padres

A mi esposa

A mis amigos

B I O G R A F I A

El autor nació en Riobamba, Ecuador, en el año 1931. Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, graduándose de Ingeniero Agronomo en 1959, año en que también fue elegido para desempeñar la Cátedra de Fisiología Vegetal de dicha Universidad.

Ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en mayo de 1960 para actuar como Fitofisiólogo Auxiliar y realizar estudios postgraduados, egresando del mismo en diciembre de 1962.

A G R A D E C I M I E N T O S

El autor desea expresar su agradecimiento a los miembros de su Comité Consejero, Dr. E. Echandi, Dr. E. Jiménez, Ing. E. Camacho, por su asesoramiento y especialmente a su Consejero Principal, Dr. L. Müller.

A los Drs. C. E. Fernández y H. Boroughs por sus acertadas sugerencias. Al Ing. G. Páez por su colaboración en la interpretación estadística de los resultados. Al Sr. Rodrigo Granados por su asistencia en los trabajos de laboratorio.

Al Departamento de Fitotecnia y Suelos por haberle brindado la oportunidad de trabajar como Fitofisiólogo Auxiliar y de realizar estudios postgraduados.

Al Programa de Energía Nuclear por haberle facilitado parte del equipo de laboratorio necesario.

A aquellos miembros del personal del Instituto que prestaron su gentil colaboración para llevar a cabo el presente trabajo.

T A B L A D E C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE GRAFICOS	iv
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
A. Factores que afectan el contenido de aminoácidos de las plantas	3
1. Factores nutricionales	3
2. Otros factores	9
B. Actividad fisiológica de los aminoácidos	10
C. El cultivo de plantas de café en soluciones nutritivas	11
MATERIALES Y METODOS	13
A. Preparación de las plantas, aplicación de tratamientos, diseño experimental y condiciones ambientales	13
B. Muestreo	16
C. Preparación y purificación del extracto de compuestos nitrogenados simples	18
D. Método cromatográfico	20
RESULTADOS	25
A. Estado de las plantas al momento de tomar las muestras	25
B. Aminoácidos libres y otras sustancias nitrogenadas que pudieron detectarse	26
C. Apreciación cualitativa de los resultados	26
D. Apreciación cuantitativa de los resultados	28
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	39
RESUMEN	40
SUMMARY	42
LITERATURA CITADA	44

L I S T A D E C U A D R O S

<u>Cuadro N^o</u>	<u>Página</u>
1. Composición química de las soluciones nutritivas tipo Hoagland.	14
2. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado como ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística.	27
3. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en nitrógeno a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística	29
4. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en potasio a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística	30
5. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en magnesio a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística	31
6. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en hierro a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística .	32

L I S T A D E G R A F I C O S

Gráfico N^o

1. Disposición de los aminoácidos, amidas, sustancias sin identificar y correctores de fondo en el papel de cromatografía	22
---	----

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

La determinación del contenido de minerales en las hojas de los cafetos ha adquirido últimamente una enorme importancia, por cuanto puede utilizársele como índice del estado nutricional de la planta (34, 35). El uso de soluciones nutritivas ha permitido establecer con mayor seguridad la relación entre el contenido de minerales en las hojas, las deficiencias de elementos nutritivos y los síntomas visibles (1, 3, 6, 13, 18, 27, 37).

Hay abundante literatura sobre plantas distintas al café que pone de manifiesto que las deficiencias de elementos nutritivos afectan profundamente los procesos metabólicos del nitrógeno, y una forma de comprobarlo es mediante la determinación individual de aminoácidos libres (5, 8, 14, 16, 23, 25, 45, 46, 59).

En café se ha hecho muy poca investigación sobre este tema. El autor sólo tiene conocimiento de un trabajo (56) en el cual se estudiaron las relaciones entre deficiencias y contenido de aminoácidos, valorando estos últimos en forma global (como nitrógeno alfa-amínico) y no individualmente; dicho trabajo es anterior al uso de cromatografía bidireccional en papel, la cual ha cobrado especial importancia a partir de 1947, cuando Dent, Stepka y Steward (9) lograron aplicar por primera vez con éxito este método en la investigación de los aminoácidos libres de las plantas.

En el presente trabajo se hizo un estudio, por medio de cromatografía bidireccional en papel, de las variaciones que sufren los aminoácidos libres en hojas de cafetos cultivados en soluciones

nutritivas deficientes en N, K, Mg y Fe. Los objetivos principales del trabajo fueron estudiar la influencia de las deficiencias de esos elementos sobre el metabolismo del nitrógeno en plantas de café y explorar las posibilidades de este método de análisis en la identificación de las deficiencias mencionadas.

R E V I S I O N D E L I T E R A T U R A

A. Factores que afectan el contenido de aminoácidos de las plantas.1. Factores nutricionales.

Es bien conocido que la deficiencia o ausencia de elementos nutritivos en el medio ambiente de las plantas conduce a una alteración de su composición química y de sus procesos metabólicos. El estudio detallado de las variaciones en el metabolismo del nitrógeno, debidas al régimen nutricional, ha demostrado que la síntesis y los niveles de proteínas, aminoácidos, amidas y otros compuestos nitrogenados están estrictamente relacionados con los niveles de algunos minerales.

La importancia de los aminoácidos en el metabolismo de las plantas ha dado lugar a gran número de investigaciones relacionando estos compuestos y la nutrición mineral.

Gregory y Sen (16) fueron de los primeros investigadores que notaron un efecto de la nutrición mineral sobre la concentración de aminoácidos libres y amidas. Investigaciones recientes en nutrición de las plantas han mostrado que ciertos aminoácidos pueden ser fuertemente afectados por las deficiencias nutricionales:

La deficiencia de nitrógeno, según numerosos investigadores, ocasiona una notable disminución en el contenido total de aminoácidos libres. Este efecto ha sido apreciado en plantas de cebada (16, 40), de maíz (42), de tabaco (52, 59) y de frijol (41). Aunque la tendencia general de los aminoácidos es de disminuir

ante esta deficiencia, no todos se afectan en igual forma.

En plantas de cebada (40), a los 24 días de suprimir el nitrógeno se notó que a excepción de la tirosina y la prolina, todos los aminoácidos libres habían disminuido. A los 48 días disminuyó aún más el contenido total de los aminoácidos, afectándose principalmente asparagina, glutamina, serina, prolina y los ácidos glutámico y aspártico.

En plantas de maíz (42) se observó que a las 24 horas de haberse suprimido el nitrógeno de la solución nutritiva, el contenido de aminoácidos libres había sufrido una disminución; los primeros en afectarse fueron los ácidos aspártico y glutámico, glicina, alanina y asparagina. A los tres días de la supresión del nitrógeno el contenido de aminoácidos se había reducido a la mitad.

Las fuentes de nitrógeno con que se abastece a las plantas también tienen efecto sobre el contenido de aminoácidos libres.

Se ha informado que en tomates cultivados en solución nutritiva (29) las plantas que recibieron nitrógeno nítrico tuvieron menos nitrógeno₄ amínico, nitrógeno amídico y nitrógeno soluble pero más aminoácidos dicarboxílicos que las plantas que recibieron nitrógeno amoniacal.

En plantas de trigo (63) abastecidas con nitrógeno nítrico y nitrógeno amoniacal, se notó una mayor acumulación de amoniacal que en las plantas con una sola de estas fuentes de nitrógeno. Las amidas asparagina y glutamina se encontraron en máxima cantidad en las plantas fertilizadas con nitrógeno amoniacal y a un nivel mínimo en las plantas que recibieron nitrato. En las

plantas abastecidas con amonio predominó la asparagina, mientras que en aquellas suplidas con nitrato predominó la glutamina.

En investigaciones realizadas con plantas de maíz y cáñamo nutridas con nitrógeno nítrico o nitrógeno amoniacal (24) se observó una notable diferencia en la concentración de aminoácidos libres. La aplicación de nitratos resultó en un aumento de la cantidad de valina, lisina y algunos otros.

Cuando hay deficiencia de fósforo generalmente aumenta el contenido de aminoácidos libres de las plantas. Dicho efecto se ha observado en plantas de banano (14), de tabaco (52, 59), de frijol (41), de cebada (46) y de alfalfa (15). Tal como ocurre en el caso de las demás deficiencias, no todos los aminoácidos varían en igual forma ante esta deficiencia. En estudios efectuados con plantas de cebada en solución nutritiva (40) se encontró que las plantas deficientes en fósforo, después de 48 días de la supresión de este elemento tenían la misma cantidad total de aminoácidos libres que las plantas testigos. Sin embargo, variaciones en algunos aminoácidos individuales sirvieron para caracterizar la deficiencia. Así, ésta estuvo asociada con una disminución de ácido glutámico y un aumento de glutamina. En hojas y raíces de plantas de maíz cultivadas en solución nutritiva (42) se notó que 3 días después de omitir el fósforo de la solución nutritiva no se produjo ningún cambio en el contenido de aminoácidos de las hojas, pero el de las raíces aumentó notablemente, afectando mucho a la alanina. Después de 7 días, el contenido de aminoácidos de las hojas disminuyó un poco mientras que el de las raíces se redujo tres veces. El contenido de algunos aminoácidos, como la

alanina, glicina y asparagina decayó considerablemente.

En extractos alcohólicos de plantas de alfalfa deficientes en fósforo (15) predominaron los siguientes aminoácidos y amidas: ácido glutámico, alanina, ácido aspártico, prolina, serina, glutamina y treonina.

En plantas de banano (14) la deficiencia de fósforo hizo aumentar notablemente los ácidos dicarboxílicos además de la glutamina y la asparagina.

La mayor parte de los investigadores que han estudiado la relación entre la deficiencia de potasio y el contenido de aminoácidos libres indican que el contenido de éstos aumenta cuando se produce dicha deficiencia.

Se ha demostrado que en plantas de cebada (40) la deficiencia de potasio causa un aumento en la concentración total de aminoácidos con ligera disminución de los ácidos glutámico y aspártico y por un notable aumento en la concentración de asparagina. A los 48 días de la supresión del potasio la tercera parte del nitrógeno amínico total se hallaba en la forma de asparagina. Recientes trabajos realizados con hojas y raíces de maíz (42) comprueban que una débil carencia de potasio produce un aumento notable en el contenido de aminoácidos, especialmente en las raíces. Este aumento afecta principalmente a la alanina, glicina, serina, ácido aspártico, asparagina y glutamina. Estudiando el efecto de la deficiencia de potasio en plantas de banano (14) se ha establecido que dicha deficiencia trae consigo una acumulación de aminoácidos libres; cuando la deficiencia

se hace más extrema la acumulación de glutamina es seguida por una acumulación de asparagina.

En plantas de cebada (15, 45, 46) se pudo observar que ante la deficiencia de potasio se produjo un aumento en el contenido de aminoácidos libres. Un efecto similar al observado en cebada fue también notado en plantas de tabaco (52, 59) y de frijol (41). Sin embargo, en presencia de esta deficiencia se produjo una disminución de la concentración de aminoácidos libres en los tallos de cáñamo (24). Estudiando la respuesta de las plantas de trigo a la deficiencia de potasio (45) se encontró que dicha deficiencia produce altas concentraciones de asparagina y glutamina y un bajo contenido de ácido glutámico.

Se dispone de poca literatura respecto a la influencia de la deficiencia de calcio en el metabolismo de los aminoácidos. En investigaciones realizadas con plantas de banano cultivadas en solución nutritiva (14) se encontró que el efecto de la deficiencia de calcio sobre el contenido de aminoácidos libres fue relativamente pequeña. La característica principal parece ser una acumulación de la amida glutamina en las hojas deficientes en calcio. Por otra parte, otros investigadores trabajando en plantas de tabaco (52, 59) indican que la deficiencia de calcio produjo una marcada acumulación de aminoácidos.

En la poca literatura encontrada sobre la deficiencia de magnesio se hace notar que ésta produce un aumento en el contenido de aminoácidos libres; este efecto fue notado por algunos investigadores (52, 59) trabajando con plantas de tabaco. Esta misma deficiencia en plantas de banano (14) produjo una

acumulación de los ácidos dicarboxílicos y pipercolico, desapareciendo casi completamente la lisina.

La deficiencia de azufre generalmente resulta en aumento en el contenido de aminoácidos libres. En investigaciones sobre el efecto de esta deficiencia en trébol blanco, tomate y lino (4) se notó una gran acumulación de arginina libre y una disminución del ácido glutámico. Los aminoácidos que más se acumularon fueron la asparagina en la leguminosa y la glutamina en el tomate. Los aminoácidos glicina y serina aumentaron en todas las especies estudiadas. En plantas de tabaco (59) también se ha reportado una acumulación de aminoácidos libres en condiciones de deficiencia de azufre. Es de notar sin embargo, que en trabajos realizados con alfalfa (31, 32) en solución nutritiva carente de azufre, se obtuvo un aumento de ácido aspártico y una disminución de los 16 aminoácidos restantes detectados.

En términos generales, la deficiencia de hierro produce un aumento en el contenido de aminoácidos libres. Este efecto se ha notado en estudios efectuados con diferentes familias de plantas en las cuales dicha deficiencia aumentó el contenido de casi todos los aminoácidos (7, 8, 23). Los aminoácidos afectados por el aumento varían con las diferentes plantas. En manzanas, magnolias y arándano, deficientes en hierro (22) se registró una acumulación de arginina. Por otra parte, en investigaciones realizadas en plantas de tomate deficientes en este mismo elemento (43) se observó un aumento en el contenido de amidas y en la concentración total de aminoácidos.

Estudios sobre el efecto de las deficiencias en microelementos sobre el contenido de aminoácidos (43) indicaron que la falta de cobre causó un aumento en el nivel de los aminoácidos, siendo la ausencia de fenilalanina lo que caracterizó la deficiencia.

La carencia de manganeso también causó un aumento en el contenido total de los aminoácidos libres sin que hubiera un cambio en el contenido de amidas; no obstante faltaron los aminoácidos básicos histidina y lisina. Tanto en plantas de coliflor (20) como en plantas de tomate (53) se encontró que la deficiencia de manganeso causó un aumento en el contenido de aminoácidos.

En trabajos realizados en los tallos del cáñamo (24) se ha observado que el cloro aumenta ligeramente la concentración normal de la lisina, del ácido aspártico y de la tirosina.

En plantas de tabaco la deficiencia de boro produjo un aumento en los aminoácidos libres (59).

Es interesante observar que la deficiencia de molibdeno, junto con la de nitrógeno, son las únicas que dan lugar a una notable disminución en el contenido de aminoácidos libres. En plantas de coliflor (20) por ejemplo, la deficiencia de molibdeno produce una marcada reducción en la concentración de la mayoría de los aminoácidos; el mismo efecto ha sido observado en plantas de tomate (44).

2. Otros factores.

Además de los factores nutricionales ya anotados existen otros que pueden afectar mucho el contenido de aminoácidos. Estos factores son:

a) Enfermedades. En estudios realizados en plantas de papas atacadas por virus (2) se encontró un contenido mayor de ciertos aminoácidos como triptofano y tirosina en los tubérculos de dichas plantas. En melones atacados por Antracnosis (58) el contenido de aminoácidos libres aumentó en un 70%.

b) Edad. En trabajos con plantas de cebada cultivadas en condiciones normales de nutrición, varios investigadores (4, 40, 42) encontraron que el contenido de aminoácidos libres de los órganos vegetativos decrece con la edad. En tallos de cáñamo y maíz se observó que los aminoácidos tienden a decrecer con la edad (24).

c) Horas del día. Observando las variaciones diarias de los aminoácidos libres en la savia de vid (55) se notó que éstos son más abundantes en las horas comprendidas entre las 8:00 a.m. y las 12:00 m. Sobre este mismo asunto, pero relativo a plantas de tabaco (36) se informa que la mayoría de los aminoácidos libres, excepto el ácido aspártico, alcanzaron su concentración máxima aproximadamente a las 2:00 p.m.; el ácido aspártico logró esa concentración durante la noche.

d) Luz. Después de un estudio con 14 subespecies del género Tulipa (12) se encontró que los ácidos aspártico y glutámico tienden a aumentar con la luz; sin embargo, un aumento en el sombrío de las hojas de café trajo como consecuencia una tendencia a aumentar el contenido de nitrógeno amínico (56).

B. Actividad fisiológica de los aminoácidos.

La presencia de algunos aminoácidos en cantidades apropiadas puede producir absición (48). Algunos aminoácidos en

determinadas concentraciones pueden actuar como inhibidores de la germinación (25, 33). Se sugiere también que los aminoácidos que se encuentran en forma natural en las plantas pueden actuar como inhibidores o constituir agentes causales de crecimiento anormal (47, 50).

Los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados han sido considerados como precursores de alcaloides (26, 51, 59, 60).

Algunos aminoácidos pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas y servir como fuente de nitrógeno (11, 19, 62). Al respecto es notable la diferencia en comportamiento de los aminoácidos de acuerdo con su configuración molecular (61, 66).

Ciertos aminoácidos y los productos de su dicarboxilación han sido considerados como causantes de síntomas de clorosis y toxicidad en las plantas (19, 50, 51, 61, 65).

C. El cultivo de plantas de café en soluciones nutritivas.

El cultivo de plantas de café en soluciones nutritivas se ha generalizado mucho en los últimos tiempos, principalmente en el estudio de la influencia de los elementos nutritivos en el contenido mineral de las hojas y la aparición de síntomas visibles. En estos trabajos, la edad de las plantas, las variedades, el material y volumen de los recipientes han sido muy variables. No ha ocurrido lo mismo con las soluciones nutritivas empleadas, ya que las más usadas han sido las de Hoagland y Arnon (21) con un pH comprendido entre 5.8 y 7.2.

Este tipo de soluciones, completas o deficientes, han sido utilizadas por numerosos investigadores en el estudio de síntomas

de deficiencia de varios elementos (1, 3, 6, 13, 17, 18, 27, 37).

Se ha informado (30) que cuando se cultivan plantas de café en solución nutritiva tipo Hoagland Nº 1 (carente de N amoniacal) las plantas empiezan a morirse al iniciar su período de floración, durante el 3º y 4º año; esta falla puede corregirse agregando a la solución nutritiva $\text{NO}_3\text{NH}_4 + \text{ClK}$ (0.125 g/l de sal). Se sugiere (30) que el efecto anotado puede ser debido a que la capacidad reductora de las raíces decrece mucho en ese período del desarrollo.

En estudios hechos para obtener síntomas de la deficiencia de nitrógeno amoniacal se notó que las hojas de las plantas de café (crecidas en solución Hoagland Nº 1) empezaron a mostrar síntomas de clorosis después de un mes. Los síntomas aparecieron primeramente por la nervadura central. Después de 6 meses, las hojas más viejas se mostraron cloróticas y se desprendieron prematuramente, especialmente en los días calientes.

Es de notar que todas las soluciones nutritivas de Hoagland carecen de nitrógeno amoniacal, excepto la solución completa Nº 2, la cual fue utilizada en este estudio para crecer las plantas antes de administrar los tratamientos.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

A . Preparación de las plantas, aplicación de tratamientos, diseño experimental y condiciones ambientales.

En el presente estudio se emplearon 60 plantas de café (Coffea arabica L. var. Caturra), las cuales habían crecido en suelo hasta la edad de seis meses. Al transferirlas al invernadero, se les hizo un lavado cuidadoso de las raíces, y fueron colocadas en recipientes de vidrio de un galón de capacidad que contenían solución nutritiva completa tipo Hoagland Nº 2, la cual como ya se indicó, se caracteriza por suplir el nitrógeno tanto en la forma amoniacal como en nitrato (Cuadro 1). En la preparación de la solución nutritiva se usó agua destilada.

Para impedir la formación de algas y reducir al mínimo las variaciones de temperatura en la solución nutritiva, los frascos fueron colocados primeramente dentro de bolsas negras de polietileno y luego en bolsas blancas del mismo material.

La solución nutritiva fue aireada constantemente. El pH se mantuvo entre 6 y 7 haciendo semanalmente las correcciones necesarias con ClH o NaOH, ambos al 5%. La solución se renovó cada 20 días.

Después de que las plantas habían permanecido 6 meses en la solución nutritiva Hoagland Nº 2, se procedió a la selección del material y a la aplicación de los tratamientos. Se seleccionaron 45 plantas tomando en cuenta su apariencia y uniformidad, y se aplicaron los siguientes tratamientos.

Cuadro 1. Composición química de las soluciones nutritivas tipo Hoagland

TRATAMIENTO	COMPUESTO	Partes por millón (mg/l)												
		N		P	K	Ca	Mg	S	Sequebenc Na Fe	BO ₃ H ₃ B	Cl ₂ Mn Mn	SO ₄ Zn Zn	SO ₄ Cu Cu	MoO ₄ H ₂ Mo
		N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺											
Solución completa No 2	PO ₄ H ₂ NH ₄		14	30	234	160	48	64	5	0.5	0.5	0.05	0.02	0.01
	NO ₃ K (NO ₃) ₂ Ca SO ₄ Mg	84 56												
Solución completa No 1	PO ₄ H ₂ K		30	39	195	200	48	64	5	0.5	0.5	0.05	0.02	0.01
	NO ₃ K (NO ₃) ₂ Ca SO ₄ Mg	70 140												
-N	SO ₄ K ₂				195		48	80	5	0.5	0.5	0.05	0.02	0.01
	SO ₄ Mg (PO ₄ H ₂) ₂ Ca SO ₄ Ca			30		20 80		64						
-K	(NO ₃) ₂ Ca	140				200	48	64	5	0.5	0.5	0.05	0.02	0.01
	SO ₄ Mg (PO ₄ H ₂) ₂ Ca			30		20								
-Mg	(NO ₃) ₂ Ca	112				160								
	NO ₃ K PO ₄ H ₂ K SO ₄ K ₂	84		30	234 39 117			96	5	0.5	0.5	0.05	0.02	0.01
-Fe	PO ₄ H ₂ K			30	39									
	NO ₃ K (NO ₃) ₂ Ca SO ₄ Mg	70 140			195	200	48	64		0.5	0.5	0.05	0.02	0.01

- 1) Solución nutritiva completa Hoagland N^o 1⁺ (T)
- 2) Solución nutritiva sin nitrógeno (-N)
- 3) Solución nutritiva sin potasio (-K)
- 4) Solución nutritiva sin magnesio (-Mg)
- 5) Solución nutritiva sin hierro (-Fe)

(Para la composición química de las soluciones véase Cuadro 1)

Los 5 tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar, con 3 repeticiones y parcelas de 3 plantas, lo que dió un total de 45 plantas. Cada parcela (grupo de 3 plantas con el mismo tratamiento) se consideró como una unidad experimental para los propósitos del estudio. La disposición de las plantas en las mesas del invernadero se hizo conforme se indica a continuación.

	T	T	T	T	-K	-K	-K		-N	-N	-N
-Fe	-K	-K	-K	T	-Mg	-Mg	-Mg	-Mg	T	T	T
-Fe	-N	-N	-N	T	-N	-N	-N	-Mg	-Fe	-Fe	-Fe
-Fe	-Mg	-Mg	-Mg		-Fe	-Fe	-Fe	-Mg	-K	-K	-K

Para registrar las variaciones de temperatura y humedad dentro del invernadero se usó un higrotermógrafo durante dos meses. Se registraron considerables variaciones de temperatura, la cual en días despejados se elevó con frecuencia a 32°C a las 2:00 p.m.,

+ Las plantas destinadas a ser testigos fueron cambiadas a la solución completa Hoagland N^o 1 para ponerlas en condiciones comparables a las de las plantas en soluciones deficientes en K, Mg y Fe, respecto a la ausencia de nitrógeno amoniacal. (Ver cuadro 1).

y fue menor de 18°C durante las noches frías. La humedad relativa fue de aproximadamente 60% durante las horas de mayor temperatura subiendo a 100% casi todas las noches.

Las variaciones en temperatura de la solución nutritiva contenida en los recipientes de vidrio se midieron con termómetros corrientes. Durante los días despejados la temperatura subió hasta 28°C, bajando durante la noche a la temperatura del ambiente.

El techo del invernadero en que estuvieron las plantas era de plástico incoloro, el cual actuó a manera de filtro de la luz solar. Cuando las planchas de plástico estaban recién colocadas se apreciaba cierta descomposición de la luz que pasaba a través de ellas.

B. Muestreo

De cada unidad experimental se obtuvo el material foliar necesario para preparar un extracto de compuestos nitrogenados simples. Las hojas seleccionadas para los análisis fueron las pertenecientes al segundo, tercero, cuarto y quinto par (contando desde la yema terminal); se consideró como primer par aquel que tenía hojas con más de dos pulgadas de longitud. Cada planta de la unidad experimental contribuyó con 2 hojas de cada par, tomadas de diferentes bandolas, obteniéndose 8 hojas por planta y 24 por unidad.

Las hojas se lavaron con agua destilada. Luego, de cada una se sacaron discos de 16 mm de diámetro (2 cm²), teniendo cuidado de tomar igual número de discos a cada lado de la nervadura central y de separarlos en dos grupos de acuerdo a su posición.

El número total de discos sacados por unidad experimental fue de 200; 100 de ellos, provenientes de un mismo lado de la hoja, se dedicaron al análisis cromatográfico y los otros 100 sirvieron para obtener el peso seco correspondiente.

Con este procedimiento se logró: a) que cada planta de la unidad contribuyera con igual número de hojas; b) que cada posición de las hojas en la bandola estuviera representada por igual número de hojas, y c) que el peso de los dos grupos de 100 discos provenientes de una unidad fuera casi igual (± 10 mg).

Inmediatamente después de obtenidos los discos destinados al análisis de aminoácidos, éstos fueron colocados en frascos pequeños con tapa de rosca conteniendo 25 ml de etanol al 95%, manteniéndolos en un refrigerador a 4°C hasta el momento de proceder a la obtención de los extractos de aminoácidos. Los discos destinados a proporcionar el peso seco fueron puestos en una estufa a 70°C hasta obtener peso constante.

Se tomaron muestras en los siguientes estados de deficiencia:

- a) 0 días de deficiencia. Antes de aplicar los tratamientos. (Las plantas ya habían permanecido 6 meses en solución completa Hoagland N° 2).
- b) 60 días de deficiencia. Después de 60 días de iniciados los tratamientos.
- c) 120 días de deficiencia. Después de 120 días de iniciados los tratamientos.

Todas las muestras fueron tomadas durante las horas de la mañana, con cielo despejado, unos cinco días después de haber

renovado las soluciones nutritivas.

C. Preparación y purificación del extracto de compuestos nitrogenados simples.

Para la extracción de los aminoácidos y amidas del material vegetal se procedió de la siguiente manera:

Los 100 discos de hojas (aproximadamente 1 g de peso seco) destinados al análisis cromatográfico, que habían sido mantenidos en 25 ml de etanol al 95%, se transfirieron al recipiente de una homogenizadora (43). El frasco que contenía los discos se lavó cuidadosamente con 25 ml de etanol al 80%, recogiénose este lavado (15, 22). La molienda de los discos se efectuó a unas 10.000 rpm durante 3 minutos, quedando el material finamente dividido. La mezcla así obtenida se transfirió a un vaso de precipitados de 150 ml y se dejó en refrigeración por 24 horas (43).

La parte insoluble se separó por filtración, empleando un embudo tipo Büchner con dos papeles filtro Whatman Nº 1 sobre un Kitasato previamente aforado a 150 ml y conectado a una trompa de vacío. Se lavó cuantitativamente el contenido del filtro varias veces con pequeños volúmenes de etanol al 80% hasta que el líquido filtrado fue incoloro (procurando no pasarse del aforo del Kitasato). Se llevó luego el volumen a los 150 ml.

. El líquido filtrado contenido en el Kitasato se pasó a un embudo de separación de 300 ml, agregándosele 80 ml de agua desionizada y 40 ml de cloroformo (22, 29). La mezcla se agitó bien. Una vez efectuada la separación de las dos fases, se desechó el cloroformo que arrastró consigo las clorofilas y los lípidos. Se repitió el lavado varias veces con porciones 2 ml de cloroformo

hasta que éste salió incoloro.

El líquido amarillento, libre de clorofilas, que quedaba en el embudo se pasó a un vaso de precipitados de 250 ml y su pH se llevó a 7 con soluciones de ClH o NH_4OH , 1:1. El contenido del vaso se pasó a través de una columna de resina (tipo Dowex 50 x 12 de malla 100-200) de 7 cm de largo y 1 cm de diámetro previamente llevada a la forma ácida y embebida en etanol al 80%. La velocidad del paso del líquido a través de la resina se reguló a 3 ml por minuto (38). Una vez pasado todo el líquido y antes de proceder a la elución de los aminoácidos adsorbidos a la resina, se lavó la columna con etanol al 80% hasta que el líquido saliente no dió reacción de azúcares con cloruro férrico. Se ^{coló}~~agitó~~ el lavado con agua desionizada hasta obtener reacción negativa de cloruros con nitrato de plata.

Una vez lavada la resina se procedió a la elución de los aminoácidos adsorbidos, con hidróxido de amonio 4N, hasta que se obtuvo reacción fuertemente alcalina al papel indicador (49). Esta elución se efectuó antes de cinco horas de adsorbidos los aminoácidos (38). La elución con hidróxido de amonio fue seguida de un lavado con agua desmineralizada hasta no obtener reacción de ninhidrina. Tanto el hidróxido de amonio como el siguiente lavado se recogieron en un vaso de precipitados de 100 ml. Este líquido constituyó el extracto de aminoácidos.

El extracto de aminoácidos fue llevado casi a sequedad colocando su superficie bajo un chorro de aire previamente filtrado que provenía de un compresor (49). Una vez que el extracto estuvo casi seco, su volumen se llevó a 2 ml con acetona-agua 1:1. Su pH se

llevó a 7 con soluciones de ClH o NH_4OH , 1:1. Los extractos se guardaron en una refrigeradora a -18°C (10, 64).

En esta forma los extractos quedaron listos para ser sometidos a la cromatografía.

D. Método cromatográfico.

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos libres se usó el método de cromatografía en papel, haciendo descender los solventes.

Se empleó papel Whatman Nº 1 de 22.5" x 18.25", previamente asperjado con solución tampón de fosfato monosódico 0.01, el cual se dejó secar por 24 horas.

La alícuota del extracto de aminoácidos que se puso en cada papel fue de 150 μl .

Como primer solvente, y en la dirección rápida del papel, se usó una mezcla de butanol normal, ácido acético y agua desmineralizada en la proporción de 4:1:1. Los papeles permanecieron 30 horas en la cámara de este solvente; durante ese tiempo el solvente llegó al borde inferior del papel y goteó. Se sacaron los papeles de la cámara y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente y con corriente de aire (39, 43).

Como segundo solvente, y en la dirección lenta del papel, se usó fenol saturado con agua desmineralizada, ajustando su pH a 5.5 con NaOH . Un vaso de precipitados de 100 ml conteniendo NH_4OH al 0.5% fue colocado en el fondo de la cámara, para aumentar el valor R_f de los aminoácidos básicos que obstaculizaban la lectura de la asparagina (10) Los papeles permanecieron en esta cámara hasta

que el frente del solvente llegó al borde inferior del papel.

Una vez secos los cromatogramas se les aplicó como revelador ninhidrina al 0.2% en etanol de 95%. Después de asperjada la ninhidrina, los colores se desarrollaron en una estufa con atmósfera saturada de etanol a 60°C durante 30 minutos (39, 49, 57).

Las manchas coloreadas correspondientes a los diferentes aminoácidos se delimitaron con lápiz de grafito, se cortaron y pesaron con una precisión de ± 1 mg (39, 57). Cada mancha se cortó en pedacitos pequeños y se colocó en tubos de ensayo; su color se disolvió en 5 ml de etanol al 50%. La asparagina y la prolina se disolvieron en una solución tampón de fosfatos 0.025 M ($\text{PO}_4\text{HK}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{Na}$) a pH 7 preparada con etanol al 50% (39). Esta disolución se efectuó antes de haber transcurrido dos horas desde la aparición de las manchas (28).

Las lecturas colorimétricas se efectuaron entre 16 y 24 horas (10, 39) después de haberse realizado la dilución de las manchas. La densidad óptica fue determinada con un espectofotómetro Beckman model B, usando fototubo rojo sin filtros, y células de pyrex para lecturas a través de 10 mm de espesor. Las lecturas se efectuaron a una longitud de onda de 570 μ para los aminoácidos azules, 430 para la prolina (amarilla) y 360 μ para la asparagina (café rojizo).

Para cada lectura se efectuaron las correspondientes correcciones de fondo con los valores en densidad óptica/mg obtenidos de tres secciones papel o correctores de fondo (Ver Gráfico 1).

1. La sección 0, sacada de un lugar libre de manchas, cuyo valor se diluyó en alcohol de 50% y se leyó en 570 μ para corregir

II FENOL SATURADO →

1 BUTANOL - AC. ACETICO - AGUA
(4:1:1)

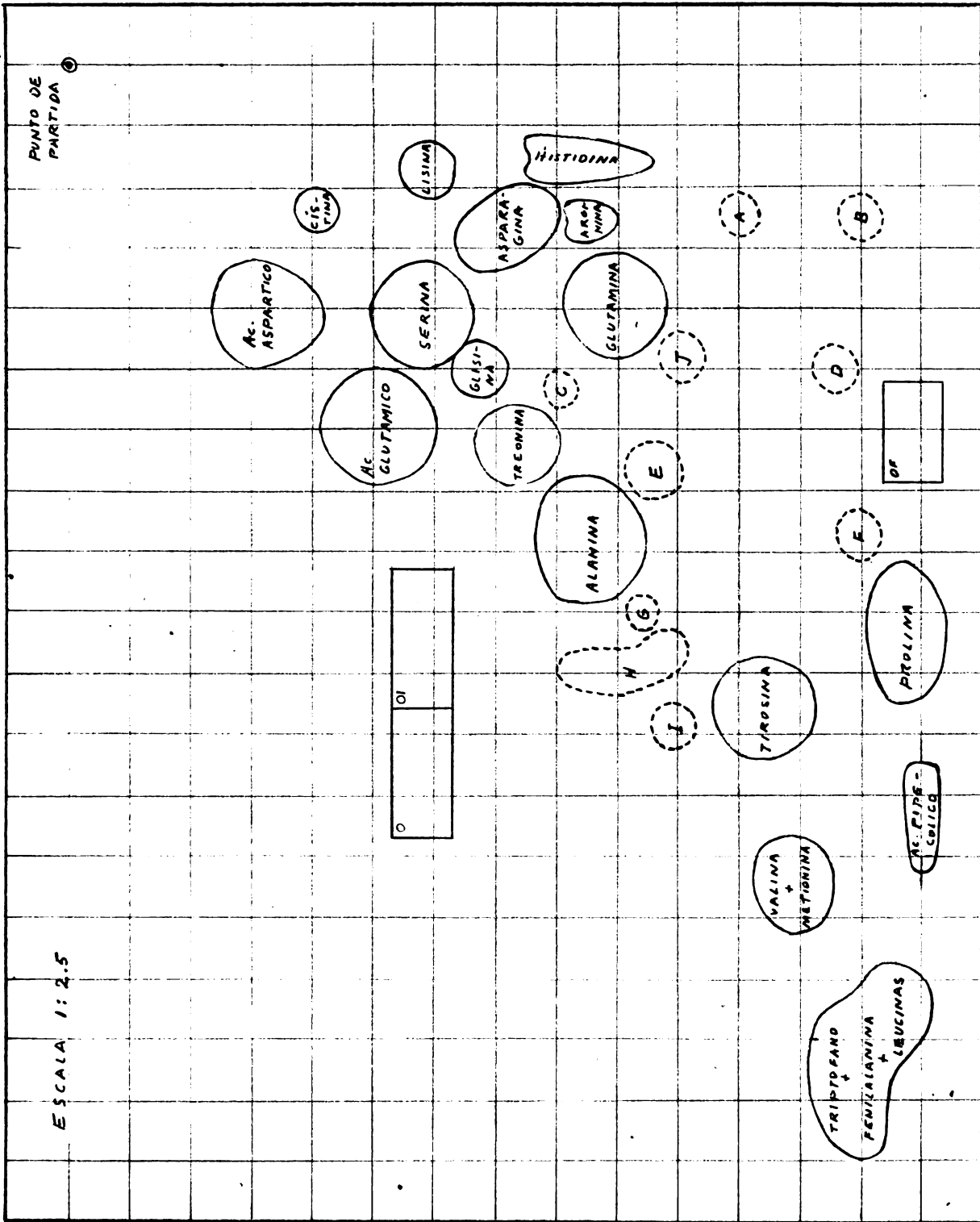
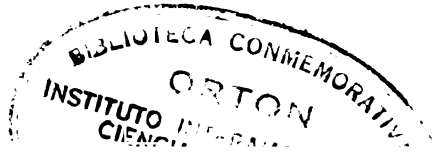


Gráfico 1. Disposición de los aminoácidos, amidas, substancias sin identificar y correctores de fondo en el papel de cromatografía. La línea cortada limita manchas sin identificar



las lecturas de los aminoácidos azules.

2. La sección O1 sacada junto a la O. Se diluyó su color con la solución tampón de fosfatos y se leyó en 360 mu; sirvió para corregir los valores de la asparagina.
3. La solución OF sacada en la zona del frente del fenol. Se extrajo su color con la solución tampón de fosfatos y se leyó en 430 mu; sirvió para corregir los valores de la prolina.

La preparación de soluciones patrones se hizo de la siguiente manera:

Los aminoácidos puros, 22 en total, fueron divididos en tres grupos: 1) básicos, 2) ácidos, 3) otros. Se prepararon cuatro soluciones patrones usando como solvente etanol al 50% acidificado con ClH 1:1; una de las soluciones contenía los aminoácidos básicos, otra los ácidos y las dos restantes los no comprendidos en esos grupos. Estas soluciones fueron preparadas de manera que su concentración fuera de 1 ug de aminoácidos por ul de solución; sin embargo, la concentración de algunos fue distinta a la indicada.

Para la obtención de las curvas de calibración se hicieron cromatogramas en triplicado conteniendo 10, 20, 40 y 60 ul de cada una de las soluciones patrones. Estos cromatogramas fueron tratados por el método cromatográfico antes descrito. Para cada aminoácido se hizo una curva de calibración relacionando densidad óptica con concentración en ug.

Las medias de las tres repeticiones fueron los valores empleados para elaborar los gráficos.

La identificación de las manchas provenientes de las hojas se hizo comparando su posición en el papel con la de los aminoácidos químicamente puros.

La valoración cuantitativa de las manchas que se pudieron aislar en forma individual se efectuó leyendo sus valores de densidad óptica en las curvas de calibración obtenidas con las soluciones patrones. Para la determinación semicuantitativa de la concentración de manchas sobrepuestas (valina + metionina y leucinas + fenilalanina + triptofano) y de las manchas de sustancias desconocidas se usó la curva de la alanina (54).

No fue posible determinar los aminoácidos básicos (arginina, histidina y lisina) debido a que al aumentar su desplazamiento por efecto de los vapores de amoníaco sus manchas se difundieron mucho.

Para interpretar estadísticamente los resultados se usó el análisis de la variancia. Para la comparación de los promedios entre las plantas testigos y las deficientes se usó la diferencia mínima significativa al nivel del 1% (DMS 0.01) deducida del cuadrado medio del error experimental.

Para tabular los resultados las manchas se clasificaron en tres grupos:

• Aminoácidos identificados que incluye aquellos aminoácidos cuyas manchas se pudieron aislar y valorar en forma individual.

Aminoácidos sobrepuestos que incluye aquellos aminoácidos cuyas manchas aparecieron sobrepuestas.

Sustancias sin identificar que incluye aquellas sustancias que reaccionaron con la ninhidrina y que no pudieron ser identificadas por no corresponder su posición con la de los aminoácidos puros usados como patrones.

R E S U L T A D O S

A. Estado de las plantas al momento de tomar las muestras.Antes de iniciarse los tratamientos (0 días de deficiencia).

Por este tiempo las plantas habían permanecido 6 meses en la solución completa Hoagland Nº 2. Su aspecto era normal, propio de las plantas bien nutridas; follaje color verde intenso, brillante y turgente. Muchas plantas florecieron y fructificaron normalmente.

A los 60 días de deficiencia. En este estado, las hojas de todas las plantas acusaron solamente una ligera clorosis, siendo más notable en las plantas deficientes en nitrógeno.

A los 120 días de deficiencia. Después de este lapso todas las plantas presentaban síntomas visibles de las deficiencias, variando su intensidad con los diferentes tratamientos.

Las plantas deficientes en nitrógeno mostraban una intensa clorosis en todo su follaje y el crecimiento se detuvo.

Los síntomas de la deficiencia de potasio fueron muy poco evidentes, notándose solo un ligero amarillamiento en los bordes de algunas hojas maduras y en algunos casos necrosis de los ápices.

Los síntomas de la deficiencia de magnesio fueron también poco evidentes, notándose la clorosis típica de esta deficiencia solamente en algunas hojas viejas.

En el caso de la deficiencia de hierro, los síntomas característicos de esta deficiencia fueron muy evidentes, mostrándose en casi todas las hojas jóvenes.

Es de importancia hacer notar que en todos los tratamientos se observó un amarillamiento uniforme que afectó principalmente a las hojas más viejas, con caída posterior de las mismas. La caída se acentuó en los días calurosos.

B. Aminoácidos libres y otras sustancias nitrogenadas que pudieron detectarse.

Antes de aplicar los tratamientos se pudo detectar, en los extractos alcohólicos de hojas de café, las siguientes sustancias nitrogenadas simples: los aminoácidos glutámico, aspártico, piperónico, lisina, histidina, arginina, cistina, serina, glicina, treonina, alanina, prolina y tirosina, así como las amidas glutamina y asparagina.

Como aminoácidos sobrepuestos se identificaron valina + metionina, y leucinas + triptofano + fenilalanina.

Se detectaron también una serie de manchas que no pudieron ser identificadas y que se designaron con letras desde la A a la J (Ver Gráfico 1).

C. Apreciación cualitativa de los resultados.

Testigos. Del estudio del Cuadro 2, en el cual se exponen los resultados analíticos obtenidos con las plantas testigos a través del período experimental, se desprende que no hubo desaparición de los aminoácidos identificables y sobrepuestos. Las manchas sin identificar C y G fueron las únicas que no se detectaron a los 60 y 120 días de aplicados los tratamientos.

Deficiencia de nitrógeno. A los 60 días se observó que desaparecieron el ácido piperónico y las manchas A, D, F e I. A los

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado como ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística.

Aminoácidos Identificables	0	60		120	
	T ^{1/}	T ^{1/}	Sig. ^{2/}	T ^{1/}	Sig. ^{2/}
Cistina	27	27		34	
Asparagina	1054	716		583	
Ac. Aspártico	605	641		458	++
Serina	540	487		422	
Glicina	85	94		34	
Glutamina	452	343		237	++
Ac. Glutámico	1212	1308		888	++
Treonina	428	314		61	
Alanina	576	514		479	
Prolina	844	950		676	
Tirosina	1156	1018		684	
Ac. Pipecólico	240	216		120	++
Totales	7223	6631		4679	++
Contenido de aminoácidos sobrepuestos y sustancias sin identificar en las hojas de las plantas testigos a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado como ug de alanina por gramo de peso seco y su equivalencia en porcentaje.					
Aminoácidos Sobrepuestos	0	60		120	
	T ^{1/}	T ^{1/}	% ^{3/}	T ^{1/}	% ^{3/}
Valina-Metionina	47	34	72	23	49
Triptofano-Fenilalanina-Leucinas	148	84	54	67	45

Sustancias sin identificar					
A	16	10	62	3	18
B	11	9	81	4	36
C	p ^{4/}	0	0	0	0
D	19	16	84	8	42
E	15	9	60	4	27
F	16	17	106	0	0
G	p ^{4/}	0	0	0	0
H	73	77	104	41	56
I	19	20	105	0	0
J	5	0	0	0	0

^{1/} Cada valor es promedio de 3 repeticiones

^{2/} Columna de significancia con respecto al testigo a los 0 días de deficiencia.

^{3/} Columna de porcentajes con respecto al testigo a los 0 días de deficiencia.

^{4/} Presente pero no detectable

120 días la mayoría de los aminoácidos restantes y las sustancias sin identificar llegaron a un nivel no detectable.

Deficiencia de potasio. En este caso (Ver Cuadro 4) a los 60 días desaparecieron las manchas B, E e I. A los 120 días ya no se detectaron el ácido pipercolico y todas las manchas sin identificar, excepto la H.

Deficiencia de magnesio. En el Cuadro 5 se aprecia que a los 60 días desaparecieron las manchas A, D, E e I, y que a los 120 solamente quedaron D y H entre las manchas desconocidas.

Deficiencia de hierro. Analizando el Cuadro 6, se deduce que a los 60 días desaparecieron las manchas A, D, E e I, pero se hizo detectable la mancha J. la cual no se presentó en el testigo a esa misma fecha. A los 120 días solamente persistieron H y J entre las manchas desconocidas.

D. Apreciación cuantitativa de los resultados

Testigos. Observando el Cuadro 2 se puede apreciar que la concentración total de los aminoácidos en estas plantas mostró una tendencia a disminuir a los 60 días, llegando a ser altamente significativa a los 120 días; la disminución, en esta última fecha, fue significativa al 1% para los ácidos aspártico, glutámico y pipercolico y para la glutamina.

Analizando los valores correspondientes a las manchas sobrepuestas y sin identificar se puede notar que hubo una disminución progresiva de las mismas, reducción que se hizo más acentuada a los 120 días.

Deficiencia de nitrógeno. En el Cuadro 3, se aprecia que ya

Cuadro 3. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en nitrógeno a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística.

Aminoácidos Identificables	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{1/}	-N ^{2/}	Sig. ^{3/}	T ^{1/}	-N ^{2/}	Sig. ^{3/}
Cistina	27	27	20		34	9	++
Asparagina	1054	716	100	++	583	0	++
Ac. Aspártico	605	641	87	++	458	24	++
Serina	540	487	286		422	39	
Glicina	85	94	62		34	0	++
Glutamina	452	343	84	++	237	0	++
Ac. Glutámico	1212	1308	491	++	888	237	++
Treonina	428	314	151		61	0	++
Alanina	576	514	408		479	57	++
Prolina	844	950	286	++	676	0	++
Tirosina	1156	1018	689		684	43	++
Ac. Pipecólico	240	216	0	++	120	0	++
Totales	1223	6631	2667	++	4679	410	++

Contenido de aminoácidos sobrepuestos y sustancias sin identificar de las plantas testigos y deficientes en nitrógeno a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug de alanina por gramo de peso seco y su equivalente en porcentaje.

Aminoácidos Sobrepuestos	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{1/}	-N ^{2/}	% ^{3/}	T ^{1/}	-N ^{2/}	% ^{3/}
Valina-Metionina	47	34	33	97	23	0	0
Triptofano-Fenilalanina-Leucinas	148	84	77	91	67	0	0

Sustancias sin identificar							
A	16	10	0	0	3	0	0
B	11	9	13	144	4	0	0
C	P ^{4/}	0	0	0	0	0	0
D	19	16	0	0	8	0	0
E	15	9	0	0	4	0	0
F	16	17	0	0	0	0	0
G	P ^{4/}	0	0	0	0	0	0
H	73	77	55	76	41	0	0
I	19	20	0	0	0	0	0
J	5	0	0	0	0	0	0

^{1/} Cada valor es promedio de 3 repeticiones

^{2/} Columna de significancia con respecto al testigo, a la misma fecha

^{3/} Columna de porcentajes con respecto al testigo, a la misma fecha

^{4/} Presente pero no detectable

Cuadro 4. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en potasio a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística.

Aminoácidos Identificables	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{2/}	-K ^{2/}	Sig. ^{2/}	T ^{2/}	-K ^{2/}	Sig. ^{2/}
Cistina	27	27	19		34	6	++
Asparagina	1054	716	1378	++	583	864	
Ac. Aspártico	605	641	779		458	403	
Serina	85	94	73		34	33	
Glutamina	452	343	722	++	237	383	
Ac. Glutámico	1212	1308	1265		888	797	
Treonina	128	314	247		61	58	
Alanina	576	514	445		479	301	
Prolina	844	950	945		676	402	
Tirosina	1156	1018	1071		684	92	++
Ac. Pipecólico	240	216	201		120	0	++
Totales	7223	6631	7467		4679	3680	
<p>Contenido de aminoácidos sobrepuestos y sustancias sin identificar de las plantas testigos y deficientes en potasio a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug de alanina por gramo de peso seco y su equivalencia en porcentaje.</p>							
Aminoácidos Sobrepuestos	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{2/}	-K ^{2/}	% ^{2/}	T ^{2/}	-K ^{2/}	% ^{2/}
Valina-Metionina	47	34	74	217	23	44	191
Triptofano-Fenilalana-Leucinas	148	84	99	117	67	81	120

Sustancias sin identificar							
A	16	10	9	90	3	0	0
B	11	9	0	0	4	0	0
C	p ^{4/}	0	0	0	0	0	0
D	19	16	6	37	8	0	0
E	15	9	0	0	4	0	0
F	16	17	16	94	0	0	0
G	p ^{4/}	0	0	0	0	0	0
H	73	77	35	45	41	18	43
I	19	20	0	0	0	0	0
J	5	0	0	0	0	0	0

^{1/} Cada valor es promedio de 3 repeticiones

^{2/} Columna de significancia con respecto al testigo, a la misma fecha

^{2/} Columna de porcentajes con respecto al testigo, a la misma fecha

^{4/} Presente pero no detectable

Cuadro 5. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en magnesio a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística.

Aminoácidos Identificables	0	60			120		
	-T ^{1/}	T ^{1/}	-Mg ^{2/}	Sig. ^{3/}	T ^{1/}	-Mg ^{2/}	Sig. ^{3/}
Cistina	27	27	23		34	44	
Asparagina	1054	716	1091		583	1215	++
Ac. Aspártico	605	641	978	++	458	627	++
Serina	540	487	609		422	754	
Glicina	85	94	102		32	50	
Glutamina	452	343	394		237	255	
Ac. Glutámico	1212	1308	1713	++	888	1100	++
Treonina	428	314	295		61	59	
Alanina	576	514	475		479	430	
Prolina	844	950	795		676	732	
Tirosina	1156	1018	1135		684	575	
Ac. Pipecólico	240	216	259	++	120	170	
Totales	7223	6631	7972		4679	6033	++

Contenido de aminoácidos sobrepuestos y sustancias sin identificar de las plantas testigos y deficientes en magnesio a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug de alanina por gramo de peso seco y su equivalencia en porcentaje.

Aminoácidos Sobrepuestos	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{1/}	-Mg ^{2/}	% ^{3/}	T ^{1/}	-Mg ^{2/}	% ^{3/}
Valina-Metionina	47	34	52	152	23	15	65
Triptofa-Fenilalana-Leucinas	148	84	97	115	67	60	89

Sustancias sin identificar							
A	16	10	0	0	3	0	0
B	11	9	9	100	4	0	0
C	P ^{4/}	0	0	0	0	0	0
D	19	16	0	0	8	13	162
E	15	9	0	0	4	0	0
F	16	17	26	152	0	0	0
G	P ^{4/}	0	0	0	0	0	0
H	73	77	36	45	41	13	31
I	19	20	0	105	0	0	0
J	5	0	P ^{4/}	0	0	0	0

^{1/} Cada valor es promedio de 3 repeticiones

^{2/} Columna de significancia con respecto al testigo, a la misma fecha

^{3/} Columna de porcentajes con respecto al testigo, a la misma fecha

^{4/} Presente pero no detectable

Cuadro 6. Contenido de aminoácidos y amidas en las hojas de las plantas testigos y deficientes en hierro a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug por gramo de peso seco y su interpretación estadística.

Aminoácidos Identificables	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{1/}	-Fe ^{1/}	Sig. ^{2/}	T ^{1/}	-Fe ^{1/}	Sig. ^{2/}
Cistina	27	27	17	++	34	23	
Asparagina	1054	716	1324	++	538	1321	++
Ac. Aspártico	605	641	399		458	406	
Serina	540	487	575		422	755	
Glicina	85	94	222		34	67	
Glutamina	452	343	170	++	237	245	
Ac. Glutámico	1212	1308	1289		888	911	
Treonina	428	314	316		61	53	
Alanina	576	514	454		479	201	++
Prolina	844	950	1130		676	566	
Tirosina	1156	1018	1171		684	443	
Ac. Pipecólico	240	216	353	++	120	119	
Totales	7223	6631	7423		4679	5114	
Contenido de aminoácidos sobrepuestos y sustancias sin identificar de las plantas testigos y deficientes en hierro, a los 0, 60 y 120 días de deficiencia, expresado en ug de alanina por gramo de peso seco y su equivalencia en porcentaje.							
Aminoácidos Sobrepuestos	0	60			120		
	T ^{1/}	T ^{1/}	-Fe ^{1/}	% ^{3/}	T ^{1/}	-Fe ^{1/}	% ^{3/}
Valina-Metionina	47	34	72	211	23	32	139
Triptofano-Fenilalanina-Leucinas	148	84	106	126	67	66	98

Sustancias sin identificar							
A	16	10	0	0	3	0	0
B	11	9	13	144	4	0	0
C	p ^{4/}	0	0	0	0	0	0
D	19	16	0	0	8	0	0
E	15	9	0	0	4	0	0
F	16	17	19	111	0	0	0
G	p ^{4/}	0	0	0	0	0	0
H	73	77	64	82	41	16	39
I	19	20	0	0	0	0	0
J	5	0	16		0	16	

^{1/} Cada valor es promedio de 3 repeticiones.

^{2/} Columna de significancia con respecto al testigo, a la misma fecha.

^{3/} Columna de porcentajes con respecto al testigo, a la misma fecha.

^{4/} Presente pero no detectable.

a los 60 días hubo una disminución altamente significativa en los valores correspondientes a algunos aminoácidos, siendo especialmente notoria la disminución de ácidos glutámico y aspártico, asparagiña, glutamina, prolina y ácido pipercolico. En general, la disminución fue también significativa al 1% a esa fecha. A los 120 días la disminución se hizo mucho más apreciable llegando a ser significativa al 1% para todos los aminoácidos identificables, excepto la serina. El total también disminuyó en forma altamente significativa.

En los valores correspondientes a las manchas sobrepuestas y sustancias sin identificar se nota que estas últimas desaparecieron en su mayor parte a los 60 días, persistiendo, sin embargo, la H y la B. A los 120 días desaparecieron completamente las manchas sobrepuestas y las sustancias no identificadas.

Deficiencia de potasio. La carencia de este elemento no hizo variar en forma significativa el contenido total de los aminoácidos (Cuadro 4). A los 60 días hubo un aumento altamente significativo de la asparagina y la glutamina. A los 120 días, la concentración de cistina, tirosina y ácido pipercolico disminuyó grandemente, al 1%, mientras que las amidas no variaron.

Las manchas sobrepuestas mostraron una tendencia a aumentar con el tiempo, mientras que las sustancias sin identificar disminuyeron, persistiendo a los 120 días únicamente la mancha H.

Deficiencia de magnesio. Esta deficiencia dió lugar a un aumento en el contenido total de aminoácidos libres. A los 60 días, el aumento de los ácidos glutámico, aspártico y pipercolico fue altamente significativo; a los 120 días lo fueron, con la misma

significancia, los ácidos aspártico y glutámico, así como la asparagina (Ver Cuadro 5).

Las manchas sobrepuestas aumentaron en concentración a los 60 días de deficiencia, pero bajaron a los 120. En esta fecha solamente persistieron las sustancias sin identificar D y H.

Deficiencia de hierro. En el Cuadro 6 se aprecia que las plantas deficientes en hierro mantuvieron el total de aminoácidos libres siempre superior al del testigo pero no en forma significativa al 1%.

A los 60 días aumentaron significativamente (al 1%) la asparagina y el ácido piperólico, bajando con la misma intensidad la glutamina. A los 120 días la concentración de asparagina era todavía alta, mientras que la de alanina sufrió un descenso altamente significativo.

En los otros grupos de manchas fue notable la desaparición progresiva de las sustancias sin identificar.

D I S C U S I O N

El análisis de los datos muestra que los elementos N, K, Mg y Fe tienen un notorio efecto sobre la acumulación, tanto de los aminoácidos libres como de las amidas, en las hojas del café.

Los principales efectos de los tratamientos pueden ser discutidos de la siguiente manera:

Testigos. La observación más importante que se hizo fue la de la disminución progresiva en el contenido de sustancias nitrogenadas simples conforme avanzó el tiempo. Esta disminución fue más notoria a los 120 días de iniciado el tratamiento, fecha en que se observó una reducción significativa de las concentraciones de los ácidos aspártico, glutámico y pipecólico. La disminución mencionada podría atribuirse a la deficiencia de nitrógeno amoniacal por las siguientes razones: 1) la solución nutritiva Hoagland N^o 1 en que colocaron las plantas carecía de esta forma de nitrógeno; 2) la clorosis afectó no sólo a los testigos sino a todas las plantas y los síntomas coincidieron con aquellos descritos para la deficiencia de nitrógeno amoniacal (37); 3) una disminución en el total de aminoácidos, semejante a la observada con estas plantas, se menciona como una de las características de esta deficiencia en otras plantas (29); 4) según observaciones hechas en plantas de café cultivadas en solución Hoagland N^o 1 parece que las raíces pueden perder la capacidad reductora de nitratos conforme avanza el tiempo (30).

Deficiencia de nitrógeno. En las plantas sometidas a esta deficiencia, la variación más importante fue una notoria disminución

de la mayoría de las sustancias analizadas. A los 60 días de deficiencia la disminución de los ácidos dicarboxílicos, amidas y otros aminoácidos ya era altamente significativa. Resultados semejantes han sido obtenidos por numerosos investigadores con otras plantas (16, 29, 40, 41, 42, 52, 59).

La disminución en el contenido total de aminoácidos puede atribuirse a que el nitrógeno es un elemento constituyente de la molécula de dichas sustancias. La disminución de amidas podría explicarse del mismo modo y además por la utilización de las reservas nitrogenadas.

Es interesante indicar que a los 60 días, fecha en que supudieron detectar la mayoría de las transformaciones, ya eran aparentes los síntomas visibles de la deficiencia. A los 120 días, la disminución en el contenido de todos los aminoácidos alcanzó un nivel tan bajo que la mayoría de las manchas desaparecieron. Esto parece estar de acuerdo con la observación hecha en el sentido de que los cafetos pierden la capacidad de reducir nitrógeno.

Deficiencia de potasio. En vista de que la glutamina sirve como reserva nitrogenada en la síntesis de aminoácidos, y habiendo notado un aumento significativo en su concentración, cabe pensar que el efecto principal de este tratamiento fue sobre la acumulación de los precursores de esas sustancias. La acumulación de asparagina podría atribuirse a una proteólisis (14). Hay que hacer notar que a los 60 días de deficiencia, fecha en que se notó la acumulación de amidas, no habían síntomas visibles de la deficiencia. A los 120 días, la cistina, la tirosina y el ácido pipecólico disminuyeron en forma significativa, a lo cual no se le

ha podido dar una explicación satisfactoria.

Deficiencia de magnesio. Examinando los resultados correspondientes a esta deficiencia, se puede apreciar que el contenido total de aminoácidos aumentó a los 60 días; a los 120 días este total siguió siendo mayor al del testigo en forma significativa al 1%. Este hecho y la acumulación de ácido aspártico y glutámico indican probablemente una reducción en los procesos de síntesis de proteína. El aumento en el contenido del ácido piperólico puede ser de importancia debido a que este aminoácido puede actuar como fuente de reserva del nitrógeno (14). Otros investigadores (14, 43) han reportado un aumento de este ácido en condiciones de deficiencia de magnesio.

Deficiencia de hierro. Ya se vio como las plantas deficientes en hierro mostraron una tendencia a aumentar su contenido total de aminoácidos libres, pero que dicho aumento no llegó a ser significativo al 1%. Un aumento notorio en la concentración total de los aminoácidos libres en plantas deficientes en hierro es mencionado como uno de los efectos de la deficiencia de este elemento (7, 8, 23); sin embargo, en nuestro caso se observó que tal incremento no fue muy marcado, lo cual se podría explicar como debido a una reducción en la síntesis de ATP que está directamente relacionada con la eficiencia de ciertos procesos metabólicos que envuelven flavoproteínas y citocromas; es sabido que estas proteínas contienen hierro.

El aumento en el contenido de asparagina, observado en las plantas con esta deficiencia ha sido también mencionado en plantas de tomate (43). La acumulación de esta amida hace pensar en

una proteólisis activa (14). La disminución de glutamina a los 60 días podría ser atribuida a la utilización exhaustiva de esta reserva de nitrógeno.

En todos los tratamientos, la variación habida en las manchas sin identificar no se considera de importancia para valorar los resultados, ya que por ser muy pequeñas, excepto la mancha H, se afectan mucho con las variaciones en intensidad de color que caracteriza la reacción de ninhidrina.

C O N C L U S I O N E S

1. Luego de haber observado la disminución progresiva de las sustancias nitrogenadas simples en plantas testigos, crecidas en solución completa pero sin nitrógeno amoniacal, se puede concluir que esta forma de nitrógeno es indispensable para el desarrollo normal de plantas de café que crezcan en condiciones semejantes a las que prevalecieron en el presente trabajo. Se recomienda, por lo tanto, que en futuros trabajos sobre nutrición mineral en los cuales se use soluciones nutritivas tipo Hoagland, se tenga en cuenta este hecho.
2. Debido a que: a) los resultados obtenidos están afectados por la carencia de nitrógeno amoniacal; b) los procesos metabólicos son muy sensibles a la influencia de los factores ambientales; c) las deficiencias producidas por elementos nutritivos no estudiados podrían dar resultados semejantes a los obtenidos con las deficiencias aquí reportadas, podemos concluir en lo siguiente: aunque se apreciaron diferencias muy marcadas en los resultados entre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos no es prudente considerar dichas diferencias como alteraciones típicas que pudieran servir para identificar las deficiencias inducidas.
3. Es recomendable identificar las sustancias desconocidas, especialmente la mancha H, cuyo tamaño fue, en algunas ocasiones, mayor al de los aminoácidos identificados.
4. Se sugiere estudiar la eficiencia del sistema reductor de nitratos en las plantas de café.

R E S U M E N

En el presente trabajo se hizo un estudio de la influencia de las deficiencias de nitrógeno, potasio, magnesio y hierro en el contenido de sustancias nitrogenadas en hojas de café. Se persiguieron con esto las siguientes finalidades: estudiar el efecto de esas deficiencias sobre la acumulación de sustancias nitrogenadas simples y determinar la posibilidad de aplicar este tipo de análisis en el diagnóstico de las deficiencias anotadas.

Las plantas utilizadas en el experimento fueron crecidas en solución nutritiva completa o deficiente en los elementos bajo estudio.

Las muestras fueron tomadas antes de producirse las deficiencias, a los 60 y a los 120 días de inducidas.

La separación de las sustancias nitrogenadas simples en forma libre se efectuó por cromatografía bidireccional en papel.

El análisis cualitativo se hizo por comparación de posiciones con sustancias puras. El análisis cuantitativo se hizo por el método colorimétrico, comparando los valores experimentales con patrones elaborados con soluciones de aminoácidos puros de concentración conocida.

Al analizar los resultados estadísticamente se apreciaron diferencias altamente significativas en las concentraciones de aminoácidos producidas por las deficiencias estudiadas. Se discutieron estas diferencias y se sacaron las siguientes conclusiones: 1) el nitrógeno amoniacal demostró ser indispensable para el crecimiento normal de la planta de café en soluciones nutritivas; 2) no se

consideró prudente utilizar los resultados obtenidos como una manera de identificar las diferentes deficiencias, debido principalmente a la interferencia producida por la falta de nitrógeno amoniacal; 3) se recomendó la identificación de ciertas manchas que no pudieron ser identificadas; 4) se sugirió el estudio del sistema reductor de nitratos en las plantas de café, con el objeto de determinar la eficiencia relativa de diferentes fuentes de nitrógeno.

S U M M A R Y

A study of the relations between nitrogen, potassium, magnesium and iron deficiencies and the free amino acid content in coffee leaves was undertaken in the present work. The main objectives of this investigation were to study the influence of the deficiencies of the above mentioned elements on the nitrogen metabolism of coffee plants, and to explore the possibilities of this method of analysis to identify these nutritional deficiencies.

The coffee plants used in this experiment were grown in complete nutrient solution, and in solutions deficient in the elements studied.

The foliar samples were taken at three different dates: before the deficiencies were induced, and 50 and 120 days thereafter.

The separation of the free amino acids was made by two-directional paper chromatography. The qualitative analysis was made by comparison of positions on the paper. The quantitative analysis was made by colorimetric methods, using pure amino acids of known concentrations as standards.

The results were subjected to statistical analyses, and highly significant differences were found in the free amino acid concentrations, induced by the deficiencies studied. These differences were discussed, arriving to the following conclusions: 1) ammoniacal nitrogen showed to be essential for the normal growth of coffee plants, cultivated in nutrient solutions; 2) It is considered advisable to take these results as means of identifying

the deficiencies, due mainly to the interferences produced by the lack of ammoniacal nitrogen; 3) it was recommended to attempt the identification of the spots of nitrogenous compounds that could not be identified; 4) it was suggested to study the reductor system of nitrates in coffee plants to determine the relative efficiency of different nitrogen sources.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. ACORSI, W. R. & HAAG, H. P. Alterações morfológicas e citológicas do cafeeiro (Coffea arabica L. var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) cultivado em solução nutritiva, decorrentes das deficiências e excesso de macronutrientes. Revista do Café Português 6:5-19. 1959.
2. BAILOVA-YANKULOVA, M. The free amino acids in the tubers of potatoes of the varieties Early Rose and Aguila infected by virus. Compt. Rend. Acad. Bulgare Sci. 14:515-518. 1961. (Original not available for examination; abstracted in Chemical Abstracts 56:6385b. 1962).
3. CARVAJAL, J. F. Estudio de las deficiencias de nitrógeno, potasio, magnesio, boro y manganeso, en plantas de café (Coffea arabica var. Typica). Revista de Biología Tropical 8:165-179. 1960.
4. COLEMAN, R. G. The effect of sulphur deficiency on the free amino acids of some plants. Australian Journal of Biological Sciences 10:50-56. 1957.
5. _____ & RICHARDS, F. J. Physiological studies in plant nutrition. XVIII. Some aspects of nitrogen metabolism in barley and other plants in relation to potassium deficiency. Annals of Botany (n.s.) 20:393-409. 1956.
6. CHAVERRI, G. & CARVAJAL, J. F. Síntomas de deficiencia de los elementos fósforo, calcio, azufre y hierro en el cafeto producidos en invernadero. Costa Rica. Servicio Técnico Interamericano de Cooperación Agrícola (STICA). Información Técnica no. 8 1959. 15 p.
7. DeKOCK, P. C. & MORRISON, R. I. The metabolism of chlorotic leaves. 1. Amino acids. Biochemical Journal 70:266-272. 1958.
8. DEMETRIADES, S. D. Chromatographic detection of free amino acids in normal and iron-deficient plants of Hibiscus esculentus L. Nature 177:95. 1956.
9. DENT, C. E., STEPKA, W & STEWARD, F. C. Detection of free amino acids of plant cells by partition chromatography. Nature 160:682-683. 1947.
10. FINE, J. M. & BARTON, L. V. Biochemical studies of dormancy and after-ripening in seeds. I. Changes in free amino acid content. Contributions from Boyce Thompson Institute 19:483-500. 1958.
11. FORNIN, A. E. & ASTAKHOVA, N. K. Nutrition of plants with methionine. Plant Physiology (Fiz. Rastenii) 6:356-359. 1959.

12. FOWDEN, L. & STEWARD, F. C. Nitrogenous compounds and nitrogen metabolism in the Liliaceae. II. The nitrogenous compounds of leaves of the genus *Tulipa*: environmental effects on the composition of *Tulipa gesneriana*. *Annals of Botany* (n.s.) 21:69-84. 1957.
13. FRANCO, C.M. & MENDES, H. C. Síntomas de deficiências minerais no cafeeiro. *Bragantia* 9:165-173. 1949.
14. FREIBERG, S. R. & STEWARD, F. C. Physiological investigations on the banana plant. III. Factors which affect the nitrogen compounds of the leaves. *Annals of Botany* (n.s.) 24:147-157. 1960.
15. GLEITER, M. E. & PARKER, H. E. The effect of phosphorus deficiency on the free amino acids of alfalfa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 71:430-436. 1957.
16. GREGORY, F. G. & SEN, P. K. Physiological studies in plant nutrition. VI. The relation of respiration rate to the carbohydrates and nitrogen metabolism of the barley leaf as determined by nitrogen and potassium deficiency. *Annals of Botany* (n.s.) 1:521-540. 1937.
17. HAAG, H. P. & MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. IV. Efeito dos excessos de macronutrientes no crescimento e na composição química do cafeeiro (*Coffea arabica* L. var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) cultivado em solução nutritiva. *Revista do Café Português* 7:5-12. 1960.
18. _____ & MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. III. Efeito das deficiências dos macronutrientes no crescimento e na composição química do cafeeiro (*Coffea arabica* L. var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) cultivado em solução nutritiva. *Revista do Café Português* 7:5-18. 1960.
19. HARRIS, G. P. Amino acids as nitrogen sources for the growth of excised roots of red clover. *New Phytologist* 58:330-344. 1959.
20. HEWITT, E. J., JONES, E. W. & WILLIAMS, A. H. Relation of molybdenum and manganese to the free amino acid content of the cauliflower. *Nature* 163:681-682. 1949.
21. HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station. Circular* 347. 1950. 32 p.
22. HOLLEY, R. W. & CAIN, J. C. Accumulation of arginine in plants afflicted with iron-deficiency type chlorosis. *Science* 121:172-173. 1955.

23. ILJIN, W. S. Metabolism of plants affected with lime-induced chlorosis (calciose). I. Nitrogen metabolism. *Plant and Soil* 3:239-256. 1951.
24. KALINKEVICH, A. F. & UDOVENKO, G. V. The question of the effect of nutrient conditions on the concentration of amino acids in plant. *Doklady Akademii Nank. S.S.S.R. (Botanical Science Section)* 126:146-149. 1959.
25. KOJIMA, H., YATAZAMA, M. & GOTO, Y. Interconversion of amino acids at an early stage of germination of plant seeds. *Science Repts. Shiga Agro. Ser. I.* 4:51-56. 1953. (Original not available for examination; abstracted in *Chemical Abstracts* 50:9527h. 1956).
26. LAMBERTS, B. L. & BYERRUM, R. U. Glutamine as a precursor for the pyrrolidine ring of nicotine. *Journal of Biological Chemistry* 233:939-943. 1959.
27. LOUÉ, A. Studies on the inorganic nutrition of the coffee tree in the Ivory Coast. I. A qualitative and quantitative study of inorganic nutrient deficiencies in Robusta coffee trees. *International Potash Institute, Berne, Centre de Recherches Agronomiques Bingerville (Ivory Coast)* 1957. pp. 7-31.
28. MANSFORD, K. & RAPER, R. The free and combined amino acids in some plant juices. *Annals of Botany. (n.s.)* 20:287-295. 1956.
29. MARGOLIS, D. The range of free amino acids and amides in tomato plants and the effects of nitrate or ammonium as nutrients. *Contributions from Boyce Thompson Institute* 20:425-436. 1960.
30. MENDES, H. C. Possível causa do insucesso de se cultivar cafeeiros adultos em soluções nutritivas do tipo Hoagland. *Bragantia* v. 15 nota no. 1. 1956.
31. MERTZ, E. T. & MATSUMOTO, H. Further studies on the amino acids and proteins of sulphur-deficient alfalfa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 63:50-63. 1956.
32. _____ SINGLETON, J. L. & GARCY, C. L. The effect of sulphur deficiency on the amino acids of alfalfa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 38:139-146. 1952.
33. MES, M. G. & MENGE, I. Potato shoot and tuber cultures in vitro. *Physiologia Plantarum* 7:637-649. 1954.
34. MULLER, L. E. Mineral nutrition: detection and control of minor elements deficiency. *Coffee & Tea Industries* 81:71-74,76-77. 1958.

35. MULLER, L. E. Algunas deficiencias minerales comunes en el cafeto (*Coffea arabica* L.). Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Boletín Técnico no. 4. 1959. 40 p.
36. NOGUCHI, M. & TAMAKI, E. Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. A. Part II. Diurnal variations in the amino acid composition of tobacco leaves. Archives of Biochemistry and Biophysics 98:197-205. 1962.
37. OCHAVILLO, E. A. Responses of coffee to deficiency of various elements in the culture medium. Philippine Agriculturist 40:315-334. 1956.
38. PLAISTED, P. H. Clearing free amino acid solutions of plant extracts for paper chromatography. Contributions from Boyce Thompson Institute 19:231-244. 1958.
39. PORTER, C. A., MARGOLIS, D. & SHARP, P. Quantitative determination of amino acids by paper chromatography. Contributions from Boyce Thompson Institute 18:465-476. 1957.
40. PLESHKOV, B. P. & FOWDEN, L. Amino acid composition of the proteins of barley leaves in relation to the mineral nutrition and age of plants. Nature 183:1445-1446. 1959.
41. _____, IVANKO, S. & ANTONOVA, G. V. The influence of nutritional conditions on the free amino acid content of bean leaves. Doklady Akad. Nank. S.S.S.R. (Botanical Sciences Section) 117:284-287. 1957. (Original not available for examination; abstracted in Biological Abstracts 33:1231. 1959).
42. _____, SHMYREVA, T. B. & IVANKO, S. The free amino acid content of leaves and roots of maize as related to nutritional conditions. Plant Physiology (Fiziologiya Rastenii) 6:674-683. 1959.
43. POSSINGHAM, J. V. The effect of mineral nutrition on the content of free amino acids and amides in tomato plants. I. A comparison of the effects of deficiencies of copper, zinc, manganese, iron and molybdenum. Australian Journal of Biological Sciences 9:539-551. 1956.
44. _____. The effect of mineral nutrition on the content of free amino acids and amides in tomato plants. II. A study of the effect of molybdenum nutrition. Australian Journal of Biological Sciences 10:40-49. 1957.
45. RICHARDS, F. J. & BARNER, E. Physiological studies in plant nutrition. XVII. A general survey of the free amino acids of barley leaves as affected by mineral nutrition with special reference to potassium supply. Annals of Botany (n.s.) 18:15-33. 1954.

46. RICHARDS, F. J. & TEMPLEMAN, W. G. Physiological studies in plant nutrition. IV. Nitrogen metabolism in relation to nutrient deficiency and age in leaves of barley. *Annals of Botany* (n.s.) 50:367-402. 1936.
47. RIJVEN, A. H. G. C. Glutamine and asparagine as nitrogen sources for the growth of plant embryos in vitro: a comparative study of 12 species. *Australian Journal of Biological Sciences* 9:511-527. 1956.
48. RUBINSTEIN, B. & LEOPOLD, A. C. Effects of amino acids on bean leaf abscission. *Plant Physiology* 37:398-401. 1962.
49. STAHL, W. H., VOELKER, W. A. & SULLIVAN, J. H. Analysis of vanilla extracts. IV. Amino acid determination. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*. (A.O.A.C.) 45:108-113. 1962.
50. STEINBERG, R. A. Frenching symptoms produced in Nicotiana tabacum and Nicotiana rustica with optical isomeres of isoleucinae and leucine and with Bacillus cereus toxin. *Plant Physiology* 27:302-308. 1952.
51. _____ & TSO, T. C. Physiology of the tobacco plant. *In Annual Review of Plant Physiology* 9:151-174. 1958.
52. _____, BOWLING, J. D. & McMURTREY, J. E., Jr. Accumulation of free amino acids as a chemical basis for morphological symptoms in tobacco manifesting frenching and mineral deficiency symptoms. *Plant Physiology* 25:279-288. 1950.
53. STEWARD, F. C. & MARGOLIS, D. The effect of manganese upon the free amino acid and amides of the tomato plant. *Contributions from Boyce Thompson Institute* 21:393-410. 1962.
54. _____ & THOMPSON, J. F. The nitrogenous constituents of plants with special reference to chromatographic methods. *In Annual Review of Plant Physiology* 1:233-264. 1950.
55. STOEV, K. D., MAMAROV, P. T. & BENCHEV, I. B. Chromatographic analysis of sugar and free amino acids in the sap of grape vine. *Plant Physiology (Fiziologia Rastenii)* 6:424-430. 1959.
56. TANADA, T. Utilization of nitrates by the coffee plant under different sunlight intensities. *Journal of Agricultural Research* 72:245-258. 1946.
57. THOMPSON, J. F., ZACHARIUS, R. M. & STEWARD, F. C. Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper. A quantitative Procedure. *Plant Physiology* 26:375-397. 1951.

58. TOUZ, A. The anthracnose of melon - Free amino acids in healthy plants and plants infected with Colletotrichum lagenarium (Pass.) Ell. and Halst. Compt. Rend. 253:2114-2116. 1961. (Original not available for examination; abstracted in Chemical Abstracts 56:9135. 1962).
59. TSO, T. C. & McMURTREY, J. E., Jr. Mineral deficiency and organic constituents in tobacco plants. II. Amino acids. Plant Physiology 35:865-870. 1960.
60. _____, McMURTREY, J. E. & SOROKIN, T. Mineral deficiency and organic constituents in tobacco plants. I. Alkaloids, sugar and organic acids. Plant Physiology 35:860-864. 1960.
61. VIRTANEN, A. I. Some aspects of amino acid synthesis in plants and related subjects. In Annual Review of Plant Physiology 12:1-10. 1961.
62. WEBSTER, G. C. Nitrogen metabolism. In Annual Review of Plant Physiology 6:43-66. 1955.
63. WEISSMAN, G. S. Influence of ammonium and nitrate on the protein and free amino acids in shoots of wheat seedlings. American Journal of Botany 46:339-346. 1959.
64. WILDING, M. D., STAHMANN, M. A. & SMITH, D. Free amino acids in alfalfa as related to cold hardiness. Plant Physiology 35:726-732. 1960.
65. WOLTZ, S. S. & JACKSON, C. R. Production of yellow strap leaf of chrysanthemum and similar disorders by amino acid treatment. Plant Physiology 36:197-201. 1961.
66. WRIGHT, D. E. Amino acid uptake by plant roots. Archives of Biochemistry and Biophysics 97:174-180. 1962.