

2 Ej. No. 59



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"Variación de la Nitrato y Nitrito Reductasa
y el Contenido de Alcaloides por Influencia
en los Cambios de Fuente de Nitrogeno en
Catharanthus Roseus"**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A
MARIA EUGENIA LOPEZ BAEZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Abreviaturas	5
Introducción	7
Antecedentes	11
Materiales y Métodos	33
Resultados y Discusión	50
Conclusiones	70
Bibliografía	71

ABREVIATURAS.

ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
ATC	Acido(s) tricarbóxico(s)
ADN	Acido dextribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de bismuto pentahidratado
CO	Monóxico de carbono
CO_2	Dióxico de carbono
DL ₅₀	Dosis letal del 50% de la población
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
g	Gramos
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
HCl	Acido clorhídrico
HNO_3	Acido nítrico
HgI_2	Yoduro de mercurio
KBH_4	Boro hidruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
KI	Yoduro de potasio
KNO_3	Nitrato de potasio

Mo	Molibdeno
mM	Milimolar
M	Molar
μ g	Microgramos
μ M	Micromolar
μ moles	Micromoles
ml	Mililitros
min	Minutos
NR	Nitrato reductasa
NiR	Nitrito reductasa
NaNO_3	Nitrato de sodio
NADH	Nicotín-adenín-dinucleótido reducido
NAD^+	Nicotín-adenín-dinucleótido oxidado
NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido-fosforilado reducido
NADP^+	Nicotín-adenín-dinucleótido-fosforilado oxidado
NaOH	Hidróxido de sodio
NH_4Cl	Cloruro de amonio
NNEDA	n-Naftiletilen diamino
ProOH	Propanol
r.p.	Recién preparada
SDS	Dodecíl sulfonato de sodio
TS	Triptofano sintetasa
TCA	Tricloro acético
VLB	Vincalécoblastina
VC	Vincristina
ZnSO_4	Sulfato de zinc

INTRODUCCION

El cáncer ocupa el tercer lugar en la lista de causas de muerte en el hombre, después de las enfermedades del corazón y de las alteraciones circulatorias. Sin embargo, el cáncer no es una enfermedad de nuestra época: ha existido en todos los tiempos y afecta tanto al hombre como animales y vegetales. A pesar de considerarse la -- más terrible enfermedad es curable en sus comienzos. Hoy en día se cuentan con tres armas principales para luchar contra ella: la cirugía, la radioterapia y los medicamentos citostáticos.

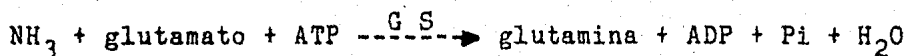
Entre estos últimos, cabe mencionar a 4 alcaloides de gran uso: - vincristina, vinblastina, vinleurosina y vincosidina. Alcaloides - extraídos de la planta Catharanthus roseus conocida vulgarmente como vinca rosa. Esta planta produce más de 120 alcaloides con diversas actividades farmacológicas. Podría considerarse a C. roseus un recurso importante de obtención de agentes citostáticos, ya que se encuentra en forma silvestre en todo el trópico y costas de México. El único inconveniente es que los produce en pequeñísimas cantidades.

En la biosíntesis de estos alcaloides indólicos, participa, en forma primaria o principal, el triptofano, quien aporta el anillo indólico. En la biosíntesis del triptofano, los carbonos provienen de fosfoenol piruvato y de la eritrosa fosfato, los cuales a su vez se originan del catabolismo de las hexosas.

Como se indica en la figura A, la secuencia biosintética completa implica muchos pasos y varios intermediarios siendo los más importantes el ácido siquímico y el ácido corísmico. También ocurren - dos donaciones en esta secuencia.

Una de las transaminaciones es a partir de glutamina y la otra a - partir de serina como donadores de nitrógeno. La glutamina provie-

ne mediante la siguiente reacción catalizada por la glutamina sintetasa, dependiente de ATP:



El amino de la serina, a su vez, proviene del glutamato (8,37,73, 74). La reacción anterior es particularmente importante en el metabolismo de nitrógeno. El nitrógeno inorgánico es tomado principalmente por las plantas en forma de nitrato.

La transformación de nitrógeno inorgánico a material orgánico se puede resumir en la siguiente secuencia de reacciones:

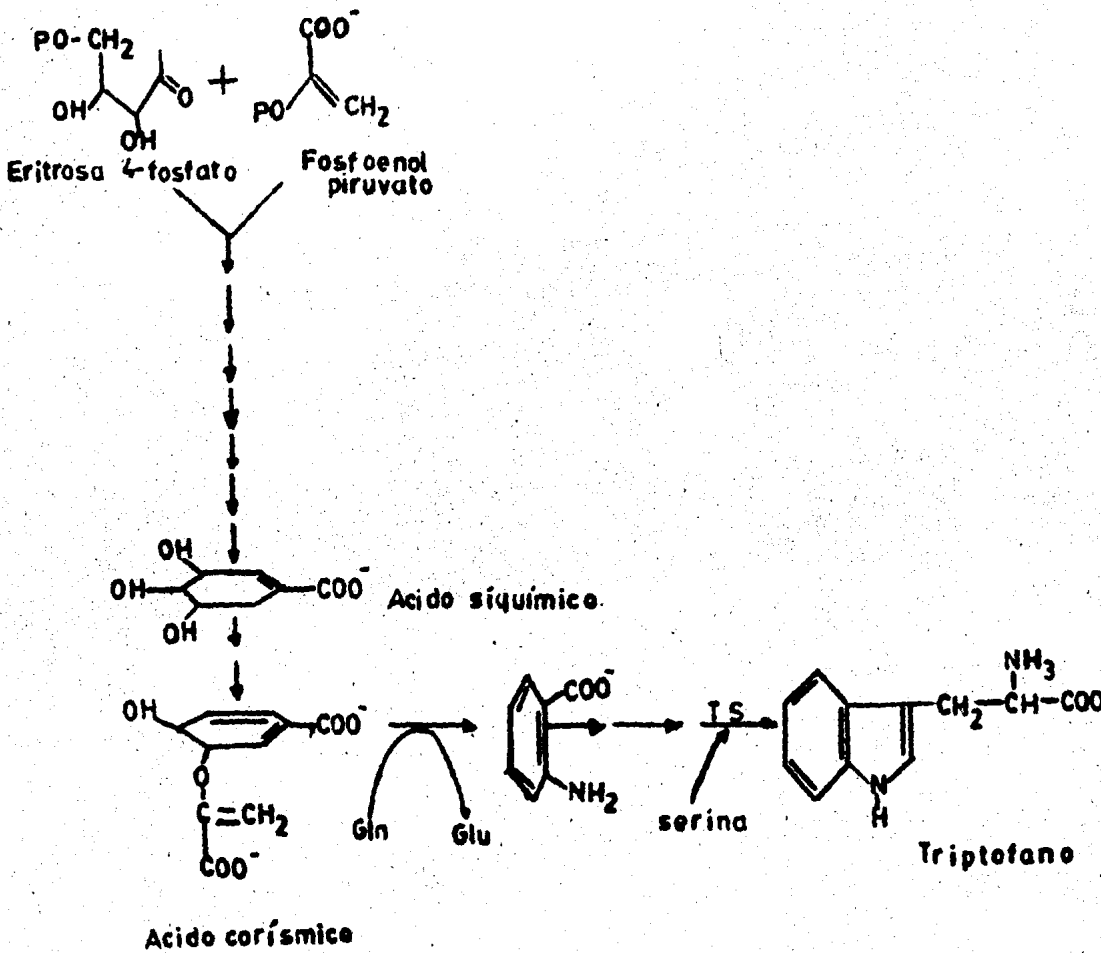
- a) reducción del nitrato vía nitrito a amonio
- b) asimilación de amonio a glutamato
- c) transaminación de glutamato a aminoácidos primarios
- d) la síntesis de otros aminoácidos.

La primera parte del proceso: la reducción del nitrato a amonio - involucra la participación secuencial de dos enzimas: la nitrato y la nitrito reductasa.

Con base a lo anterior se podría pensar, que existe una relación entre el metabolismo nitrogenado y la producción de alcaloides indólicos (ver figura 1). Siendo los objetivos particulares de este trabajo:

- a) Estudiar el comportamiento de la nitrato y nitrito reductasa - frente a diferentes fuentes de nitrógeno (NO_3^- , NH_4^+ y una mezcla de ambos), tanto en plantas como en explantes.
- b) Estudiar la relación entre la producción de alcaloides y las - diversas fuentes nitrogenadas en plantas de Catharanthus roseus.

FIGURA "A"

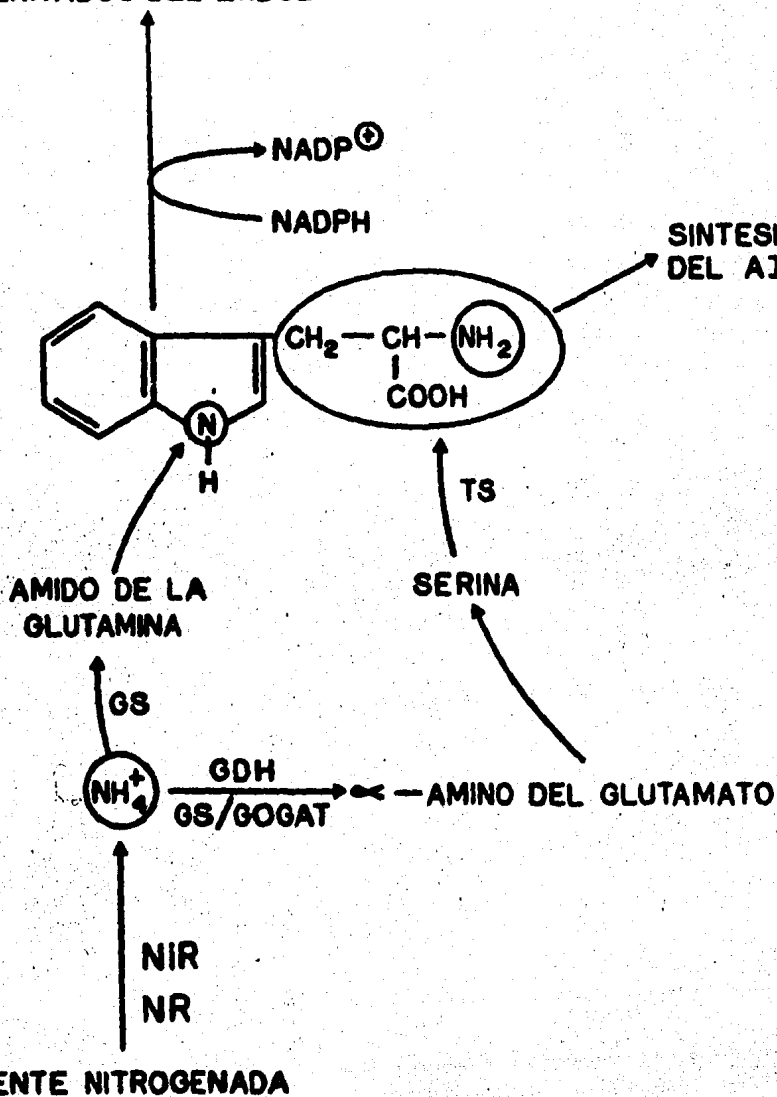


MODELO DEL PROYECTO DE CATHARANTUS ROSEOUS L.

SINTESIS DE ALCALOIDES
DERIVADOS DEL INDOL

SINTESIS DE
PROTEINAS

SINTESIS
DEL AIA



I. ANTECEDENTES

I.1 GENERALIDADES.

Catharanthus roseus (sin. *Vinca rosea*) es un arbusto pequeño y erguido, de 30 a 60 cm de altura, perenne, común en todas las regiones tropicales pero se cultiva en todo el mundo. Es apreciado tanto por sus flores como por sus brillantes hojas verdes. Estas son ovales, de 2 a 5 cm de longitud, con un nervio central blanco. Nacen en pares opuestos sobre tallos delgados y se producen una o más flores por el tallo desde la mitad de la primavera al principio del otoño. Cada flor tiene un tubo de 2.5 cm de longitud que termina en un plano formado por cinco pétalos de unos 4 cm de diámetro. Las flores son rosa, malva, blancas con un ojo central carmín. Existen en la naturaleza 4 especies: *albus* (blanco), *roseus* (rosa), *acellatus* y *villasus* (mezcla del blanco y rojo).

Anteriormente se aceptaban los siguientes sinónimos para el género *vinca*: *Pervinca*, *Lochnera* y *Catharanthus*. Sin embargo, se ha demostrado que el género *Vinca* y *Lochnera* difieren en 34 características morfológicas. En la actualidad la filiación aceptada es la de Pichon (85):

Familia: Apocynaceae
 sub-familia: Plumerioideae
 tribu : Alstonieae
 sub-tribu : Catharanthinae
 genus : *Catharanthus* G. Don.
 Sección 1 : *Lochnera* Pich.
 C. lanceus
 C. longifolius
 C. roseus
 C. trichophyllus

Desde el siglo pasado se emplea como agente hipoglucemiante oral (76). Recientemente se reportó que algunos de sus alcaloides tienen actividad antibiótica contra V. cholera y St. pyogenes var. aureus; mientras otros son hipotensores (10).

Además en otros estudios se les encontró efecto sedante, hipnótico y analgésico (9,75), analéptico, emético, etc. (67). Pero principalmente se considera como una fuente valiosa de agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer.

Vincalencoblastina (VLB), leurosina, leurosidina y vincristina (VC) son efectivos en ciertas neoplasias. Con excepción de la leurosidina, todos ellos prolongan la vida de los animales cancerosos aún cuando se encuentran cercanos a los estados terminales del cáncer (28). Los agentes más efectivos son VLB y VC.

Estos alcaloides inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos, la síntesis de las proteínas y la de los lípidos. El efecto en la síntesis proteica está relacionada, probablemente, con su capacidad de unirse a los ribosomas y sus sub-unidades, originando la precipitación de complejos en los ribosomas de las células afectadas. El mecanismo de acción no está todavía muy claro, parece ser que detienen la mitosis en la metafase. La detención mitótica es reversible.

La VLB tiene dos efectos: 1) efecto mitodepresivo: disminuye el número de células en la profase y 2) efecto mitoclásico deteniendo las células que ya han entrado en la profase y metafase (57). La VLB y la VC sólo son activas en la fase S, especialmente sobre tumores con proliferación celular acelerada como en las leucemias agudas.

Toxicidad: Los efectos tóxicos de estos alcaloides son reversibles en periodos variables posteriores a la suspensión del trata-

miento. La frecuencia e intensidad dependen de la dosis administrada. Los efectos secundarios generales son: anemia, náusea, vómito, diarrea, alopecia e insuficiencia renal entre otros.

La DL_{50} para VLB y leurocristina en ratón es de 17 y 2 mg/Kg respectivamente. Dosis elevadas causan leucopenia en ratas y perros.

I.2 Biosíntesis.

Las figuras 1.2, 1.3 y 1.4 nos muestran la ruta biosintética de los alcaloides derivados del indol en C. roseus. Como se observa, el nitrógeno se deriva de la triptamina y el resto de la molécula de la secologanina, una glucosa, y el grupo metilo de la metionina. A continuación se analizan brevemente a las enzimas que se sabe están involucradas en dicho proceso.

A) Geraniol-nerol hidroxilasa: hidroxila al geraniol o al nerol y da sus 10-hidroxiderivados. Es una oxigenasa del grupo citocromo P_{450} (64,86). La electroforesis en geles de acrilamida muestran dos bandas de polipéptidos con peso molecular de 63,000 y 78,000. En donde la banda de 63,000 pudiera ser la degradación proteolítica de la 78,000. Esta enzima transfiere electrones al ferricianuro y al 2,6-diclorofenolindolfenol al igual que el citocromo C. No es inhibida ni por actinomicina D, ni por dicumarol pero si por retroalimentación, $NADP^+$ y por p-cloromercuribenzoato. Es altamente específica para la hidroxilación de los metilos C-10 del geraniol y del nerol y su acción es dependiente de NADH; no hidroliza a los pirofosfatos. Esta enzima se localiza en las vacuolas.

C) Acido logánico metiltransferasa: esta enzima convierte al ácido logánico y secologánico en sus correspondientes metil ésteres.

D) Triptofano descarboxilasa: cataliza la formación de triptamina a partir de triptofano. Esta enzima se regula por retroalimenta-

BIOSINTESIS DE ESTRICTOSIDINA

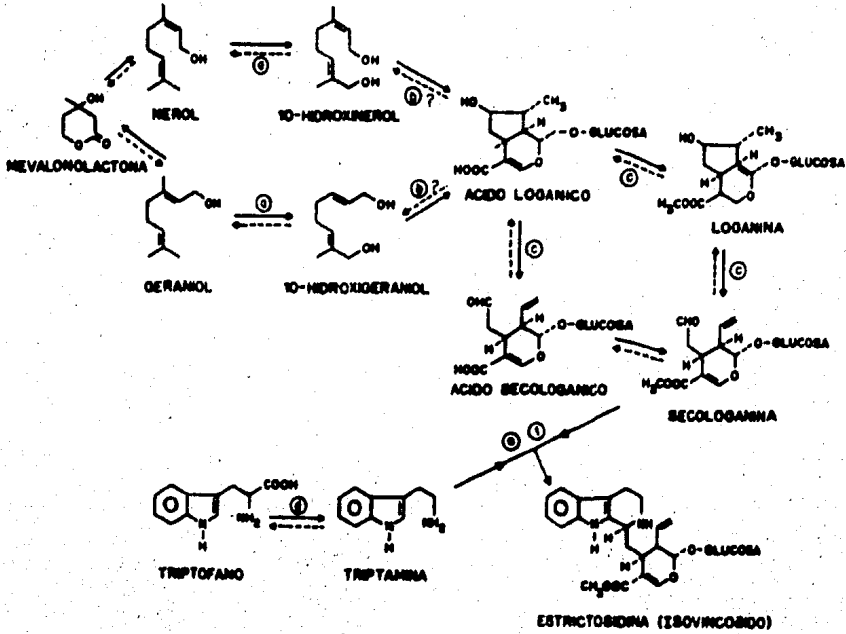


FIGURA I.2

Biosíntesis de estrictosidina

- a) oxigenasa
- b) ?
- c) metil transferasa
- d) Tryptofano descarboxilasa
- e) Complejo ajmalicina sintetasa
- f) Estrictosidina sintetasa

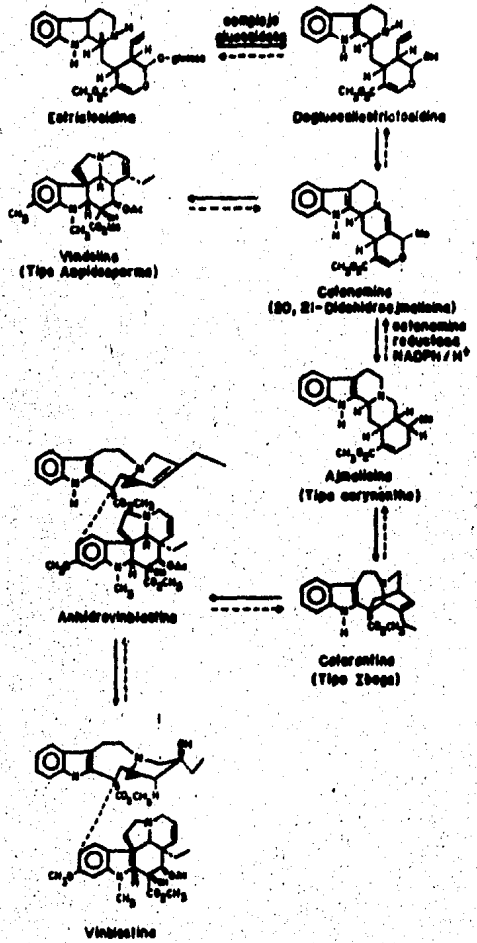


Figura 1.3 Biosíntesis de Vinblastina

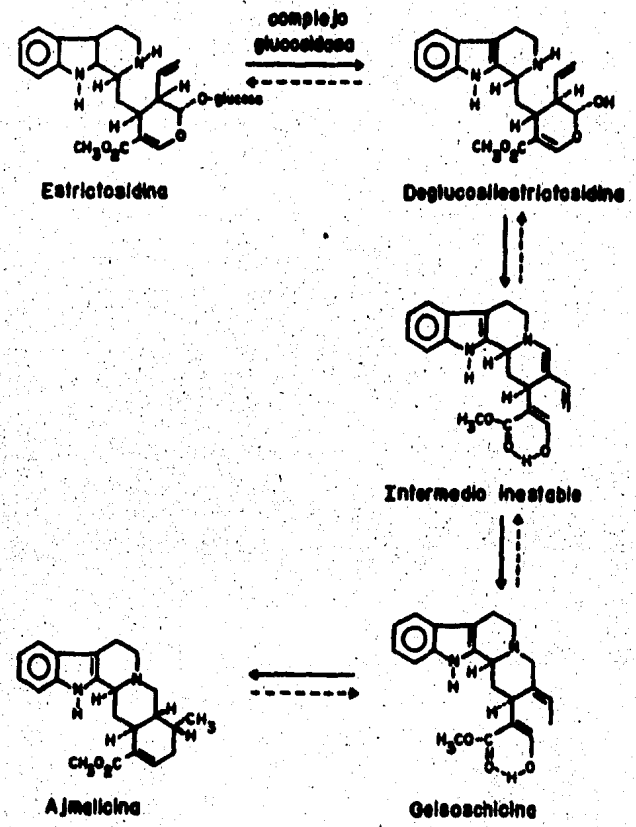


Figura 1.4 Biosíntesis de Ajmalicina

ción. Se ha comprobado (65) que el triptofano estimula la producción de ajmalicina y serpentina en cultivos en suspensión, al igual que la triptamina.

F) Estrictosidina sintetasa: realiza la condensación estereoespecífica de la triptamina y la secologanina. Parece ser que forma parte de un complejo enzimático, complejo ajmalicina sintetasa - (86), el cual también incluye a la β -glucosidasa y a una reductasa dependiente de piridín nucleótidos (E). Algunas de sus propiedades son: (64) actividad específica=5.85 nKat/mg, peso molecular por filtración en gel= 38,000; punto isoeléctrico= 4.6; pH óptimo= 5.0-7.5. No tiene efectos inhibitorios de los productos finales como catarantina, vindolina (feedback o retroalimentación) ni la afecta los inhibidores de los grupos sulfhidrilos.

Es necesario para su estabilidad mercaptoetanol o ditiotritol. Esta enzima es inhibida por Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , en concentraciones del orden de 0.1 M y por gluconolactona 0.02 M.

G) β -Glucosidasa: hidroliza al glucósido alcaloidal para dar una aglicona inestable que se transforma en el dialdehído con una configuración C-3 altamente reactiva (70). Pertenece al complejo enzimático antes mencionado pero no se ha podido separar (86).

Este dialdehído sufre posteriores transformaciones para dar catenamina (20,21 dehidroajmalicina) quién es el precursor de los tipos iboga, aspidoesperma y corinante (figura 1.3).

La conversión de catenamina a los alcaloides requiere de una enzima, la catenamina reductasa y de NADH ó NADPH (más efectivo), de tal manera que si no está disponible el NADPH la catenamina no se metaboliza sino sólo se acumula (71).

Para interceptar el precursor de catenamina, en una preparación enzimática de C. roseus de una suspensión celular se incluyó KBH para reducir el dialdehído posterior

se activan con KBH_4). Después de incubar la muestra se localizaron dos componentes, 2 estereoisómeros: la sitsiskina con orientación alfa y beta (cambio en el C-16) (70), los cuales son derivados del 4,21 aldehído dehidrocorinante.

Las investigaciones hechas por I. J. Scott (66) muestran la intervención de la geissoschizina (figura 1.4) en la biosíntesis de la ajmalicina y de la tetrahydroalstonina. La baja incorporación de geissoschizina en ajmalicina y su poca abundancia en las plantas pudiera reflejar su papel como intermediario (se une a la enzima tal vez) rápidamente convertida en otro alcaloide.

Y a partir de la ajmalicina se producen los demás alcaloides (tipo iboga) a través de la vía de la estimadina y de la tabersonina

I.3 Metabolismo nitrogenado:

El nitrógeno inorgánico es tomado principalmente por las plantas en forma de nitrato.

La transformación de nitrógeno inorgánico a material orgánico se puede resumir en la siguiente secuencia de reacciones:

- a) reducción del nitrato vía nitrito a amonio
- b) asimilación de amonio a glutamato
- c) transaminación de glutamato a aminoácidos primarios
- d) la síntesis de otros aminoácidos.

En todos los casos, en las plantas superiores se consume energía en la reducción, síntesis y transporte del nitrógeno de la raíz a los demás tejidos de la planta.

La primera parte del proceso: la reducción del nitrato a amonio - involucra la participación secuencial de dos enzimas: la nitrato y la nitrito reductasa. En la figura 1.5 se resume dicho proceso.

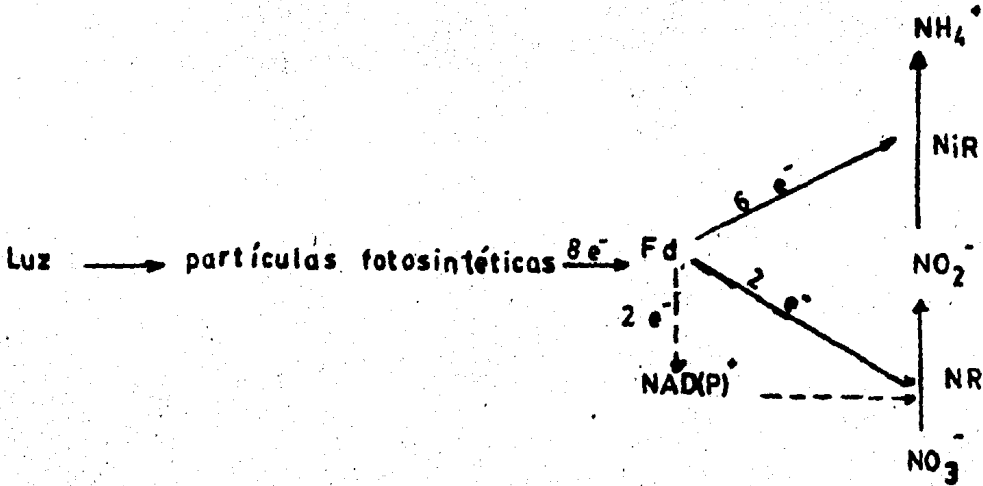
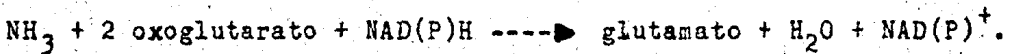


FIGURA 1.5

Las fuentes fisiológicas de electrones son los piridín nucleótidos reducidos y la ferredoxina reducida, de acuerdo a la fuente y el tipo de enzima. No se requiere ATP para la reducción de nitratos y nitritos. En algas azules-verdes, la reducción del nitrato está íntimamente unida con la fotosíntesis y está además acoplada con la fotólisis del agua (63).

En algas verdes eucarióticas y plantas superiores, la reducción es también un proceso fotosintético en donde el poder de reducción se genera en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis.

El amonio se asimila vía la glutamato deshidrogenasa (GDS) :



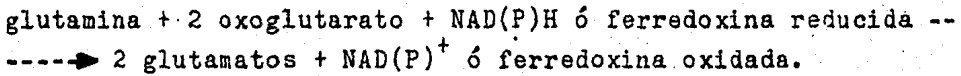
Esta enzima es abundante en casi cualquier tipo de planta. Hay evidencia que sugieren que no participa en la asimilación del amonio pero quizás esté involucrada en el catabolismo de los aminoácidos en las semillas en germinación (19) aunque todavía no está claro su papel.

Datos obtenidos de diversos investigadores con una variedad en técnicas de análisis confirman que bajo condiciones normales de crecimiento el amonio es asimilado por una reacción de dos pasos en el cual actúan dos enzimas (39, 48):

1) Glutamino sintetasa (GS):



2) Glutamato sintasa (GOGAT):



La glutamino sintetasa (GS) está localizada tanto en el citoplasma como en los cloroplastos, mientras que la GOGAT sólo está en los cloroplastos.

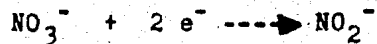
Cuando el amonio es asimilado en los cloroplastos, la energía proviene del ATP y de la ferredoxina reducida generada en las reacciones lumínicas. En este caso la asimilación del amonio y la reducción del nitrito es mediada por la luz. En raíces y semillas maduras la GOGAT puede utilizar ATP ó ferredoxina (41,42,54). El grupo amino del glutamato se transfiere para formar aspartato y alanina del oxalacetato y del piruvato respectivamente. Las reacciones son catalizadas por las aminotransferasas. Los dos principales 2 oxoácidos son sintetizados en la mitocondria en el ciclo de Krebs pero la mayoría se sintetizan en el cloroplasto durante la fotosíntesis.

I.4 Nitrato y Nitrito Reductasa:

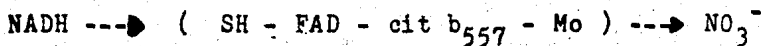
La nitrato reductasa, en eucariotes, es un complejo enzimático de alto peso molecular (200-300,000 Daltons) que contiene un nucleó tido piridínico (flavín, FAD), un grupo hemo (cit b₅₅₇) ambos u nidos no covalentemente con Mo (25). En organismos procariotes fotosintéticos como las cianobacterias, la enzima es una proteína pequeña (74,000 Daltons) que contiene solo molibdeno (Mo).

En los organismos eucariotes y algas se encuentra en el citoplas ma de células de raíz, tallo y hojas, muy cerca a la membrana ex terna de los cloroplastos o de los plástidos. En los procariotes fotosintéticos se encuentra cerca de los tilacoides (19,21,22,47, 55).

En las plantas superiores, la nitrato reductasa es la primera en zima en el complejo enzimático de la asimilación del nitrógeno, y actúa sobre el nitrato NO₃⁻ (5+) reduciéndolo a NO₂⁻ (3+), de a--- cuerdo a la siguiente ecuación química:



Los electrones van desde el donador hasta el nitrato a través de la cadena de transporte de electrones de la enzima en la siguien te secuencia:

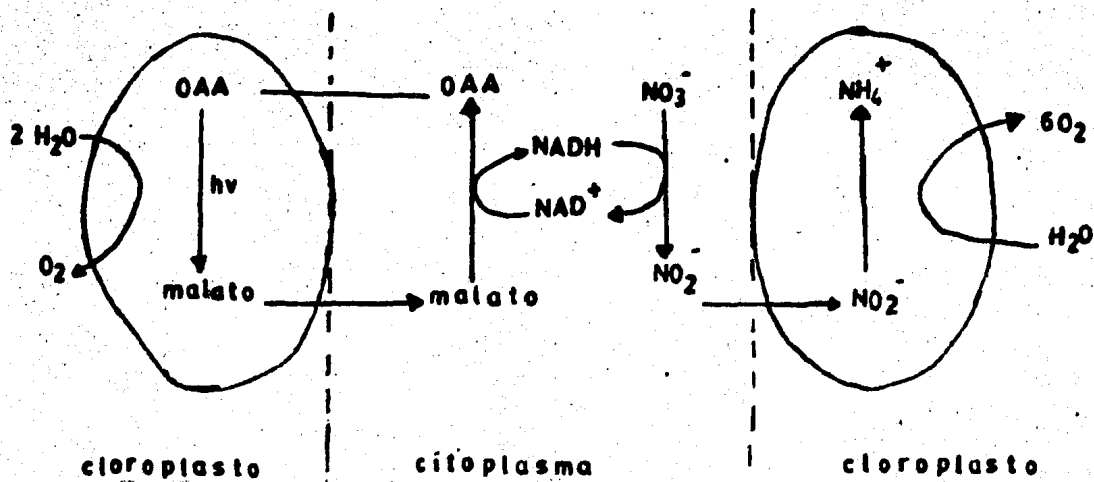


en donde los SH son los grupos sulfhidrilos entre el NADH y el si tio en donde el citocromo se alimenta en la secuencia (32,87). La reducción no requiere ATP. En las raíces se lleva a cabo la ma yor cantidad de la reducción, entre el 50-80% (47,62). Generalmente los donadores de electrones son los piridín nucleóti dos (19,21,22,32,36,87).

La fuente principal de NADH es el ciclo del ácido cítrico y muy poco es por la vía glucolítica (69). La oxidación del NADH, en condiciones luznicas, es inhibida por altas concentraciones de ATP.

Se ha demostrado (22,13,69) que el malato puede actuar como una fuente de NADH vía malato deshidrogenasa citoplásmica. La deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico funciona en la luz para suministrar el esqueleto de carbono en la síntesis de los aminoácidos (el malato incrementa también la cantidad de aminoácidos exportados). Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de ATP, existe una modificación en este ciclo que permite su funcionamiento para producir NH_3 generando piruvato y oxalacetato a expensas de malato y citrato con ayuda de la malato deshidrogenasa (figura 1.6). En los experimentos de Kent (69) se demostró que la ruta de las triosasfosfatos antes considerada como una fuente significativa de esqueletos de carbono en el ciclo del ácido cítrico, no lo es en realidad.

FIGURA 1.6



Factores inductivos de la actividad de la enzima:

a) NO_3^- : La entrada de nitrato al sitio de inducción está considerada como el primer factor regulante de los niveles de la enzima. La concentración de nitrato aumenta con el desarrollo para declinar con la edad en la hoja, así ocurre con la actividad (3,20,78, 82).

La reducción del nitrato se lleva a cabo en el citoplasma y está relacionado con la fotosíntesis (luz) (63), con los adyuvantes (tensoactivos y alcoholes) (3); se estimula con ácidos orgánicos, fosfoenol-piruvato (60), con malato (22) y se regula por la competencia entre el oxígeno y el nitrato por el NADH.

En 1972 Tomas, Yoder y Filner (16) en sus estudios en células de tabaco, determinaron 2 pozas de nitrato en las células: una de almacenamiento y una metabólica. Una grande e inaccesible a la enzima (almacenamiento) y la otra accesible al sistema de reducción - que convierte al nitrato en nitrito. Las pozas se encuentran separadas pero hay interrelación entre ellas. Ferrari (35) concluyó que la poza de almacenamiento está localizada en vacuolas celulares. La poza metabólica se encuentra en el citoplasma.

b) Luz: la luz es necesaria para la producción de piridín nucleótidos reducidos por la oxidación de intermediarios del ciclo del ácido cítrico. En plantas transferidas a baja luminosidad se produce una baja en la actividad debido a una falta de energía reductora (82). La relación temperatura-actividad e intensidad de la luz-actividad es directamente proporcional (52).

La luz afecta la toma y utilización del nitrato afectando la permeabilidad de la membrana celular y la asimilación del nitrato. En condiciones no fisiológicas como en la oscuridad existe un mecanismo regulatorio en el cual se impide la reducción inmediata,

de tal forma que la acumulación de cantidades tóxicas de nitrato sólo puede ser reducida por reacciones fotosintéticas. Esta regulación funciona a través de una respiración mitocondrial, el cual opera en la oscuridad, es decir, se inhibe en la luz al incrementarse la carga de adenilato en el citoplasma producido por la fotosíntesis.

Cuando se incuban semillas enteras u hojas enteras de 10 días en una atmósfera libre de oxígeno y en la oscuridad se reducen cantidades sustanciales de nitratos. Sólo se reduce nitrato en presencia de oxígeno cuando se tratan con monóxido de carbono (CO), un inhibidor de la transferencia de electrones en el paso de la citocromo oxidasa. Este efecto es reversible con la luz (disocia el complejo citocromo-CO).

La inhibición del transporte electrónico del oxígeno por amital también estimula la acumulación de nitrito. Los resultados de Sawhney (63) muestran que la inhibición de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria por condiciones anaeróbicas o por inhibidores causa la reducción de nitrato en la oscuridad. La activación de la reducción y su inmediata cesación cuando no hay luz se explica así: la luz incrementa la proporción ATP/ADP en el citoplasma, el cual es transportado a la mitocondria a través de un translocador de adenilato, el cual inhibe la respiración mitocondrial. La energía derivada de la fosforilación en los cloroplastos es transferida al citoplasma. La infiltración de ATP o fructuosa 1-6 difosfato (intermediario glucolítico) aumenta la acumulación de nitrito aún en presencia de oxígeno. El aumento con la fructuosa también es por la producción de NADH por gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa durante la glucólisis.

La luz induce a la enzima pero no necesariamente por encontrarse en tejidos no fotosintéticos como en la raíz y ser inducible en la oscuridad en la presencia de inhibidores de la respiración mi

condrial (21):

La luz tiene un efecto dañino cuando las plantas de *Cucumis* están expuestas a bajas temperaturas. El daño es causado por fotooxidación en el cual se afecta los componentes de la membrana de los -cloroplastos e induce daño en la envoltura de ellos. La luz afecta la inducción de la enzima a bajas temperaturas de varias maneras: 1. daño en el potencial redox del citoplasma, ocasiona un daño en el componente FAD de la enzima (estimula la fotoreacción - de la enzima) 2. inhibe la síntesis de NADH, ATP y carbohidratos inhibe la glucólisis y la respiración (ésta es necesaria para inducir la enzima) 3. destrucción de la membrana del cloroplasto - (2).

c) pH: de acuerdo a Herber y Purczeld (61) la reducción de nitrato está asociada con un incremento del pH en el citoplasma debido a la penetración de nitrito (HNO_2) al cloroplasto para su posterior reducción a amonio. En forma análoga pasa en raíz (Hewett, 26).

Como cada molécula de NO_2^- consume 1 H^+ , el pH se va alcalinizando y la reducción del nitrito se incrementa. Así que el incremento de pH (21,38) o cualquier proceso relacionado a este incremento, como la síntesis de malato u otros aniones orgánicos, tienen un efecto inductivo en la enzima.

d) Otros inductores: los tensoactivos y alcoholes como el propanol inducen la actividad ya que incrementan tanto la entrada de nitrato a la célula como la salida del nitrito al medio. También facilitan el transporte del nitrato de la poza de almacenamiento a los tejidos (3,29,35). En hojas son más efectivos los tensoactivos, mientras en raíz tienen un efecto inhibitorio (35).

El nivel de la actividad de la enzima en plantas superiores es afectada por diversos reguladores de crecimiento como citocininas

y GA_3 . Se ha visto que hormonas como GA_3 (ácido giberélico), benziladenina y ABA (ácido absicico) son estimuladores (1).

La enzima también se induce con molibdeno, quien puede actuar junto con el nitrato como un coinductor o bien actúa sólo como grupo protéctico en la enzima.

El calcio es necesario en el transporte del nitrito del citoplasma hacia el cloroplasto. A su falta se acumula nitrito hasta que la enzima se inhibe por retroalimentación. De esta manera produce un efecto indirecto en la enzima (15,55).

Factores inhibitorios en la actividad de la enzima:

La enzima se inhibe con tungsteno (60,87) mediante dos mecanismos: 1. evitando la inserción de molibdeno en el complejo 2. el tungsteno se incorpora al complejo en lugar de molibdeno. Se inhibe con algunos aminoácidos, con KCN, CO_2 y agentes quelatantes (3,35,60,78,87). Los ácidos dicarboxílicos aumentan la proporción $NAD^+/NADH$ inhibiendo a la enzima (22).

Estabilidad:

La nitrato reductasa es una enzima inestable y se deteriora rápidamente después de la extracción debido a degradación proteolítica (32,38,81). La estabilidad es función de la edad, temperatura de crecimiento, especie, condiciones y métodos de extracción. La actividad in vitro es representación del nivel potencial de la enzima (52). La enzima es más estable cuando se extrae de plantas jóvenes crecidas a $16^\circ C$, con buffer Tris (trishidroximetilaminometano) pues da mayor estabilidad por el efecto de la sal, a concentraciones de 0.25 M o más; el pH óptimo de extracción es de 8.2--8.5. La enzima requiere grupos sulfhidrilos (se unen al piridín nucleótido) y agentes reductores que eviten su oxidación.

El ditioreitol (DTT) es más efectivo a concentraciones mayores de 10^{-6} M y el EDTA a concentraciones de 0.3-0.5 mM (4,21,81).

El término análisis in vivo se refiere aquellos análisis con tejidos cortados intactos. El método depende básicamente de la generación de NADH (factor limitante) dentro del tejido de la hoja durante la incubación anaeróbica y la prevención de su oxidación - por el transporte de electrones mitocondrial.

Los resultados de estas mediciones se ven afectadas por las condiciones de análisis así como de la composición del medio. El medio generalmente consta de KNO_3 exógeno en concentraciones de 0.1-0.02M, buffer de fosfatos (aumenta la actividad y da mayor estabilidad ya que facilita la reducción del molibdeno formando complejos con él, 21) en concentraciones de 0.1 M, pH óptimo de 7.5 (el pH básico facilita la salida del nitrito al medio de análisis) algún tensoactivo (sólo en caso de hojas) y de algún alcohol en bajas cantidades (ProOH al 1%) (3,29,35,52,69). Si se quiere se puede agregar glucosa 50 mM (aumenta la actividad) pero no es necesario.

Variación de la actividad de la nitrato reductasa frente a diferentes fuentes de nitrógeno:

Se ha observado una relación entre el aumento de la actividad de la enzima y los valores de nitrógeno en el suelo (59). El proceso de nitrificación en suelos bien aireados hacen al nitrato disponible a las plantas pero las raíces pueden estar expuestas tanto a nitratos como a amonio.

1. Nitratos: todos los cambios en la actividad en las hojas son paralelos al contenido de nitrato y de la concentración de nitrato en el suelo y se considera a esta última más importante que la

del tejido para mantener la actividad (82).

Tanto en diversas plantas como en cultivos de célula in vitro, la enzima es inducida en presencia de nitrato (17,19,21,23,24,47,88, 90,92), y se lleva a cabo una síntesis de novo en la enzima (6,7) El mecanismo del incremento no se sabe pero existen dos posibilidades: a) durante el incremento en la velocidad, la degradación - baja y permite la acumulación de la enzima en la célula b) la - más probable, el incremento en la velocidad de síntesis de enzima durante la inducción.

2. Amonio: la respuesta a amonio difiere grandemente según la especie y el tejido considerado. El amonio puede tener efecto inhibitorios (inhibe la toma de nitrato y la inducción de la enzima en raíz, 47,40,50,78) como por ejemplo en Lemnaea, cebada y cereza; en otros no tiene efecto y en otras induce la actividad.

Cuando el amonio es la única fuente de nitrógeno en células en - suspensión de tabaco, éste inhibe el crecimiento de las células - pero si se le añade succinato, malato, fumarato, citrato o 2 oxo- glutarato las células crecen. Aparentemente la concentración de a monio extracelular no es la causa primaria en la inhibición. A su vez los ATC tienen como función la de suministrar esqueletos de - carbono para la síntesis de los aminoácidos (7). Recientemente se ha sugerido que puede ser un cambio en la relación $NAD^+/NADH$, pro vocados por los ATC, el responsable de la asimilación. En células de soya se ha observado que la adición de amonio más glutamina al medio, estimula la actividad de la nitrato reductasa (5).

Anteriormente se ha reportado que el amonio aumenta la actividad de la nitrato reductasa en hojas de maíz pero no en raíz o tallos El incremento en hojas es in vivo, no observado si estaba presente cicloheximida (45) y aparentemente involucra dos mecanismos: a) síntesis de novo b) indirectamente en la síntesis de proteí- nas.

Viajajraghanen et al (84) sugirieron que el amonio incrementa la síntesis por el incremento de la reducción nítrica y la disponibilidad de NADH. Una de las reacciones iniciales en la síntesis de nucleótidos piridínicos es la aminación del 5 fosforribosil-1-pirofosfato por la glutamina, un intermediario (12) del producto de asimilación del amonio.

Por lo tanto al añadir amonio puede incrementarse la poza general de nucleótidos. También puede incrementarse el nivel de NADH indirectamente por estimulación del metabolismo respiratorio, estimulando la fosfofructocinasa y la piruvatocinasa (30,31,49,79,80). En células de Chlorella la formación de la nitrato reductasa ocurre en dos pasos a) los aminoácidos forman una proteína inactiva b) la proteína inactiva por medio de nitrato o amonio forma una molécula de enzima activa.

Al igual que en Chlorella, en maíz el amonio puede inducir la -- síntesis de una apoenzima inactiva y el nitrato endógeno puede activarla para dar la molécula activa. Aparentemente la apoenzima es dependiente de molibdeno e inhibida con tungsteno.

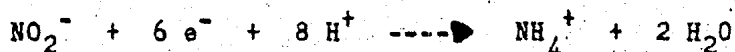
Según Platt (58) el amonio puede inducir la síntesis de la enzima y libera al nitrato de la poza de almacenamiento. El nitrato activa directamente o a través de alguna molécula a la apoenzima. Así, el amonio puede incrementar in vivo la actividad mediante 1 o más caminos a) puede incrementar la síntesis de la apoenzima inactiva de la nitrato reductasa la cual es convertida en enzima activa por el nitrato endógeno b) incrementa la síntesis del - NADH c) moviliza al nitrato endógeno de la poza de almacenam--- miento y consecuentemente causa la activación de la enzima inactiva.

3. Nitrato + amonio: al igual que la fuente de nitratos la combinación de nitrato y amonio induce la actividad de la nitrato reductasa.

Cuando se adiciona amonio (0.91 mM) junto con nitrato (24mM) en el medio como fuente de nitrógeno, la actividad de la enzima se incrementa dos veces y puesto que no hay una influencia estimuladora en el incremento de la síntesis de la enzima (51).

Nitrito reductasa:

El nitrito, producido por la reducción enzimática del nitrato, es posteriormente reducido antes de su incorporación en el esqueleto de los aminoácidos. La enzima responsable es la nitrito reductasa que ha sido purificada de plantas superiores por muchos investigadores. Es la segunda enzima que actúa en la vía de la reducción de los nitratos y utiliza como sustrato al nitrito (N^{3+}) y produce amonio (N^{3-}) de acuerdo la siguiente ecuación que no requiere ATP:



El nitrito es directamente reducido a amonio sin liberar intermediarios.

La enzima se localiza en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos o en los plástidos.

Los donadores de electrones in vitro pueden ser el metil viológeno, la ferredoxina reducida y el ditionito y se inactiva con NADH ó FAD (19,43,83). También puede catalizar la reducción de hidroxilamina a amonio usando metil viológeno o ferredoxina como donadores de los electrones (83).

Esta enzima está compuesta de un solo polipéptido que contiene un centro Fe_4S_4 y un grupo protéstico sirohemo (tetrahidroporfirina de fierro) similar al que se encuentra en la sulfitorreductasa.

Esta estructura fue elucidada de los estudios realizados por Scott (34), Vega y Kamin (44) y Lancaster (44,83) quienes trabajaron

principalmente con nitrito reductasa purificada de espinaca, pepino, *Chlorella* y *Neurospora*.

Es una enzima con un peso molecular de alrededor de los 61,000 D. Posee 5 átomos de Fe (4 para el centro y 1 átomo para el hemo) y dos grupos S_2 por cada molécula de enzima.

Es estable a -20°C en glicerol al 50% por varios meses. A 4°C en buffer de fosfatos 0.1 M y pH 7.7 por una semana. La vida media en el mismo buffer a 25°C es de solo 30-35 horas. El pH óptimo es de 7-8.0.

Es inhibida con KCN (tipo competitivo), con CO puede formar un complejo que puede evitarse con nitrito, hidroxilamina y sulfito. También la inhibe el pCMB (paracloromercuribenzoato) formando un mercáptido. Otros inhibidores son el mersasil y el ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).

El centro Fe_4S_4 reacciona rápidamente con reductores y es sensible a la presencia de ligandos hemo. El nitrito juega un papel importante en el mecanismo catalítico de la reducción del nitrato. El grupo hemo y el centro se reducen a la misma velocidad.

El mecanismo de catálisis supone una interacción entre el grupo hemo y los sustratos o inhibidores. Forma complejos con compuestos de nitrógeno de más de un estado de oxidación. Con nitritos y en presencia de ditionito la enzima forma un complejo NO-sirohemo. Se requieren de 3 electrones para reducir 1 molécula de enzima (2 del centro y 1 del grupo protéctico sirohemo). La enzima suministra 6 electrones a una molécula de nitrito en pasos rápidos de 1 electrón cada uno.

El fierro del centro es responsable para la transmisión de electrones y se cree que está localizado muy adentro de la enzima.

El flujo de electrones desde la ferredoxina se transmite al hierro mediante el átomo de azufre (fig. 1.7)

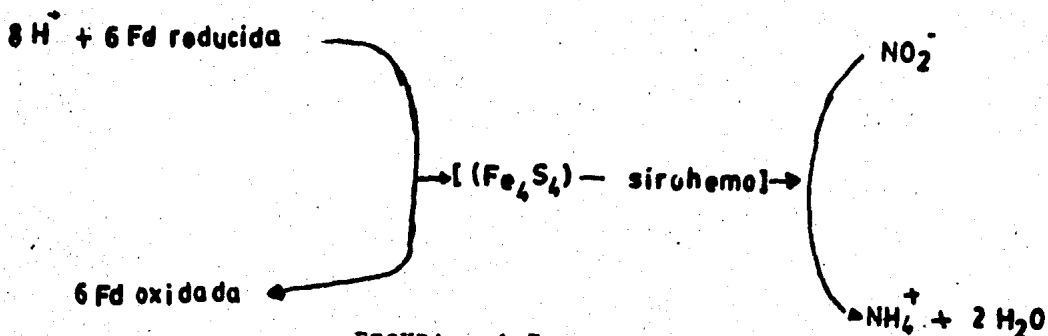


FIGURA 1.7

Variación de la nitrito reductasa frente a diversas fuentes de nitrógeno:

La nitrito reductasa al igual que la nitrato reductasa son inducidas al mismo tiempo por el nitrato, llevándose a cabo una síntesis de novo de la enzima (11). El incremento de la nitrito reductasa en suelos con nitrato provee un mecanismo que evita la acumulación de cantidades tóxicas de nitrito, por otra parte hace al nitrato disponible a la nitrato reductasa (78).

El tungsteno inhibe a la nitrato reductasa pero no a la nitrito reductasa, en tanto la toma de nitrato no se vea afectada, lo -- que sugiere que es el nitrato quien directamente incrementa la actividad de la enzima y no es el nitrito producido en su reducción (11).

En células de tabaco cultivadas in vitro se ha encontrado que la actividad baja cuando sufren un stress de nitrógeno y al mismo tiempo el sistema de toma de nitratos no se desarrolla normalmente (11).

Cuando se cultivan in vitro células de Ipomea y soya con amonio

como única fuente de nitrógeno, ambas enzimas son reprimidas (NR y NiR).

Cuando su fuente es una mezcla de nitrato y amonio se observa que primero toman el amonio y después al nitrato, transcurrido cierto tiempo comienzan a asimilar al nitrato rápidamente sin importar la presencia del amonio (58,91).

II. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIAL

II.1a. Material Biológico

Se sembraron semillas de Vinca de la compañía Lone Star Seed Co., en condiciones de invernadero. Para todos los experimentos se utilizaron hojas de vinca del mismo tamaño y edad fisiológica.

II.2a. Material de vidrio:

Todo el material de vidrio utilizado se lavó con detergente, se enjuagó con agua destilada dos veces. Se secó en estufa (70°C).

III.3a. Equipo

Potenciómetro Beckman 3550

Placas de calentamiento y agitación

Centrífuga Beckman JA-21

Espectrofotómetro Carl Zeiss M4 Q III

Polytron, PCU-2

Cámaras de crecimiento a 32°C y 25°C New Brunswick Scientific.

Licuada Osterizer

Balanza analítica Mettler

Balanza granatoria Sartorius

Baño María de temperatura constante (55°C) J. M. Ortiz

Agitador Vortex-Genie

Jeringas tipo raquia del no. 20

Espectrofotómetro Unicam SP 1805 Programme Controller.

II.4a. Reactivos

Los reactivos empleados fueron todos de grado reactivo de las casas: Técnica Química, J. T. Baker, Merck, Sigma, Pharmacia y Whatman.

B. METODO EXPERIMENTAL. Primera Parte.

II.5b. Determinación del metabolismo nitrogenado

II.5.1b. Preparación del material biológico

Se tomaron hojas (4.6 g) del mismo tamaño y a la misma hora (las 9 a. m.). Se lavaron las hojas con agua corriente y después dos veces con agua destilada. Se secaron entre toallas de papel y se cortaron en cuadrados de aproximadamente 5 cm y se colocaron en las diferentes fuentes nitrogenadas los tiempos requeridos, con agitación moderada, luz continua y a 25°C.

II.5.2b. Preparación de las fuentes nitrogenadas

Se utilizaron cuatro fuentes (ver cuadro)

Fuente	Concentración
Agua destilada	
KNO_3	20 mM
NH_4Cl	2 mM
$\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$	20 mM + 2 mM

Los tiempos de incubación fueron: 0, 2, 4 y 8 horas.

II.5.3b. Preparación del extracto enzimático:

Se siguió el procedimiento mencionado a continuación:

- 1) El tejido se secó y se congeló a -70°C por 3 horas o más.
- 2) El tejido congelado se molió en un mortero hasta convertirlo en un polvo fino, el cual se dejó descongelar.
- 3) Una vez descongelado el tejido pulverizado se le adicionó el buffer de extracción (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.2 + EDTA 10 mM) en una relación 1:6 (p/v) y 5% (p/p) de polivinilpirrolidona
- 4) La mezcla se homogenizó por dos minutos en licuadora.
- 5) El extracto obtenido en el paso anterior se pasó por 4 capas de gasa.
- 6) El filtrado se centrifugó a 13,000 g durante 30 min en el rotor JA-20 de la centrífuga JA-21.
- 7) El líquido sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) fue el utilizado para las determinaciones enzimáticas.

II.5.4b. Determinación de la actividad de la nitrato reductasa in vivo

Reactivos:

Medio de incubación muestras: KNO_3 0.1 M + ProOH 1% + buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.5

Medio de incubación blancos: buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.5 + ProOH 1%

Sulfanilamida al 1% en HCl 3 N que contenga 10% de TCA
NNEDA 0.02%

La actividad se determinó por el método modificado de Guerrero (19). Se midió la aparición de nitritos en el medio.

Procedimiento: después de exponer las hojas (explantes) a la fuente y el tiempo deseado, se secaron entre toallas de papel y se siguió el proceso indicado abajo:

Kitasatos	peso del tejido (g)	Medio de incubación
1) problema	0.3	10 ml medio c/ KNO_3
2) blanco	0.3	10 ml medio s/ KNO_3
3) problema	0.5	10 ml medio c/ KNO_3
4) blanco	0.5	10 ml medio s/ KNO_3
5) bco. reactivos	0.0	10 ml medio c/ KNO_3

Se cubrieron los kitasatos con papel aluminio para impedir la entrada de la luz. Se hizo vacío por 5 minutos. Se incubaron a 30°C con agitación moderada.

Se tomaron alícuotas (1 ml) con una jeringa, previamente ajustada al tapón, a los 20 y 30 min de incubación. A la alícuota se le adicionaron 0.5 ml de sulfanilamida, se agitó y se le agregaron 0.5 ml de NNEDA. Se agitaron y se esperó 20 min antes de leer a 540 nm.

II.5.5b. Determinación de la actividad de la nitrato reductasa in vitro:

Se determina la actividad midiendo la aparición de nitritos. Se empleó el método modificado de Guerrero (19).

Reactivos:

Medio de incubación: buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5

KNO_3 0.02 M

NADH 3 mM (r.p.)

ZnSO_4 al 25%

EDTA 0.5 M

NaOH 1 N

Sulfanilamida al 1% en HCl 3 N que contenga 10% de TCA

NNEDA 0.02%

Metasulfato de fenazina 10 μM (r.p.)

Procedimiento: después de exponer las hojas al tiempo y fuente deseada se hace el extracto enzimático (II.5.3b.) para posteriormente desarrollar el siguiente cuadro.

Tubos	extracto ml	buffer ml	KNO ₃ ml	NADH ml	EDTA ml
1) problema	0.3	1.18	0.1	0.1	0.02
2) blanco	0.3	1.28	---	0.1	0.02
3) problema	0.5	0.98	0.1	0.1	0.02
4) blanco	0.5	1.08	---	0.1	0.02
5) bco. react. ---		1.48	0.1	0.1	0.02

Agitando después de cada adición. Se inicia la reacción agregando el NADH a la mezcla. Se incuban los tubos a 30°C con agitación moderada.

Parar la reacción a los 20 y 30 min después, agregando 0.1 ml de metasulfato de fenazina 10 M (r.p.). Espere 5 min y adicione 0.1 ml de ZnSO₄ al 25% y 0.1 ml de NaOH 1 N. Agite. Centrifuge a 3,000 g por 15 min. Tome 1 ml del sobrenadante y agregue 0.5 ml de sulfanilamida y 0.5 ml de NNEDA.

Agite y espere 20 min a que se desarrolle color. Lea a 540 nm.

II.5.6b. Curva patrón para la nitrato reductasa in vivo e in vitro

Sustituir la muestra de hojas o extracto por concentraciones de 2-10 μ mol de NaNO₂. Agregue el resto de reactivos y siga el mismo procedimiento respectivo. Figuras 2.1 y 2.2

II.5.7b. Determinación de la actividad de la nitrito reductasa in vitro:

Se determinó por el método modificado de Guerrero (19). Se mide la desaparición de nitritos.

Reactivos:

Medio de incubación: buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5

NaNO_2 0.0375 M

Metil viológeno: pesar 0.018 g y disolver en 5 ml de agua destilada (r.p.)

Solución de ditionito y bicarbonato: pesar de ambas 250 mg y disolverlas juntas en 10 ml de agua destilada (r. p.)

EDTA 0.5 M

Procedimiento: del extracto anterior se toman alícuotas y se desarrolla el proceso:

Tubos	extracto ml	buffer ml	NaNO_2 ml	MV ml	Dit ml	EDTA ml
1) problema	0.3	1.28	0.1	0.1	0.2	0.02
2) blanco	0.3	1.38	---	0.1	0.2	0.02
3) problema	0.5	1.08	0.1	0.1	0.2	0.02
4) blanco	0.5	1.18	----	0.1	0.2	0.02
5) bco. react.	---	1.68	---	0.1	0.2	0.02

Incubar a 30°C y con agitación moderada. Parar la reacción después de los 20 y 30 min agitando el tubo con un vortex hasta que el color azul desaparezca.

Tomar una alícuota de 0.01 ml y llevarla a 1 ml con agua destilada. Agregue 0.5 ml de sulfanilamida y 0.5 ml de NNEDA. Espere 20 min y lea a 540 nm.

Elabore curva patrón con NaNO_2 en concentraciones desde 0.75 mM a

a 3.75 mM. No adicione el NaNO_2 0.0375 (0.1 ml), agregue los demás reactivos y siga el mismo procedimiento. (No se olvide tomar alícuota de 0.01 ml y dilúyala a 1 ml). Figura 2.3

II.5.8b. Determinación de proteínas por el método de Peterson - (57).

Cada muestra se realizó por duplicado,

Procedimiento:

```

    extracto (0.1 ml)
      +
    0.9 ml de agua destilada
      ↓
    agitar
      +
    0.1 ml de DOC al 0.15%
      ↓
    agite y deje reposar por 10 min a temperatura ambiente
      +
    0.1 ml de TCA al 70%, frío
      ↓
    agite
      ↓
    centrifuge a 3,000 g por 15 min
      /
     /
    /
   /
  /
 /
↓
descarte sobrenadante
  /
 /
/
↓
pastilla + 1.0 ml de agua destilada
  ↓
 agite
  +
 1.0 ml de react. "A" (r.p.): mezcla de volúmenes iguales de agua destilada, SDS al 10% y CTC (  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% + Tartrato de potasio al 0.2% +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 % ).
  ↓
 agite. Deje reposar 10 min a temperatura
  
```

tura ambiente.

+

0.5 ml de reactivo "B": react. de Folin-Cicolteu 1:6

↓
espere 30 min a que se desarrolle el color y lea a 750 nm.

Elabore curva patrón con albumina en concentraciones de 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Vea figura 2.8

II.5.9b. Determinación de nitritos:

Se empleó el método de Nicholas (53).

Proceso: extracto (0.1 ml) + 0.9 ml de agua destilada. Agitar. - Adicionar 0.5 ml de sulfanilamida al 1% y 0.5 ml de NNEDA al 0.02%. Agite y espere 20 min. Lea a 540 nm. Elabore curva patrón con NaNO_2 en concentraciones de 2-10 $\mu\text{g/ml}$. Figura 2.6

II.5.10b. Determinación de aminoácidos totales por el método de ninhidrina (68).

Reactivo "A": buffer de citratos 0.2 M, pH 5.0. Agregar por cada 50 ml de buffer 0.08 g de SnCl_2 .

Reactivo "B": tomar 10 ml de reactivo A y agregarle 0.4 g de ninhidrina previamente disuelta en 10 ml de metilcelosolvo (etilen-glicol-monometil éter).

Método: extracto (0.05 ml) + 0.95 ml de agua destilada + 1.0 ml de reactivo B. Agitar y calentar en baño María a ebullición por 20 min. Deje enfriar y agregue 2.5 ml de propanol al 50%. Agite de nuevo y espere 15 min para leer a 570 nm.

Curva patrón con glutámico o glicina en concentraciones de 1-50 $\mu\text{g/ml}$. Figura 2.4

II.5.11b. Determinación de amonio por el método de Nessler (72).

Muestra (0.1 ml) + 4.9 ml de agua destilada + 0.5 ml del reactivo 1:10. Agite. Lea a 400 nm después de 15 min.

Reactivo: disolver 10 g de HgI_2 + 7 g de KI en 10 ml de agua destilada. Agregue 16 g de NaOH previamente disuelta en 70 ml de agua destilada. Mezcle y afore a 100 ml al abrigo de la luz. Dejar reposar durante dos días y decante.

Curva patrón con NH_4Cl de 5-50 $\mu\text{g/ml}$. Figura 2.5

II.5.12b. Determinación de nitratos por el método de Nicholas (53).

Extracto (0.02 ml) + 1.48 ml de agua destilada + 0.1 ml de ácido sulfámico al 10%. Agitar. Dejar reposar por dos min. Vuelva a agitar y agregue 0.4 ml de ácido perclórico al 20%. Agite y lea a 210 nm.

Elabore curva patrón con KNO_3 de 10-200 nM. Figura 2.7

C. METODO EXPERIMENTAL. Segunda Parte.

II.6.c. Determinación de alcaloides.

II.6.1c. Preparación del material biológico:

Se dividieron en 4 lotes plantas de *Catharanthus roseus* de 5 meses. Las plantas crecieron en condiciones de invernadero. Cada lote se regó durante un mes con una fuente. Al inicio y al término del experimento se determinó la nitrato reductasa (método in vivo e in vitro), la nitrito reductasa in vitro, las pozas de amonio, aminoácidos, nitratos, nitritos, y la determinación de alcaloides en hojas. Todo lo anterior se realizó en hojas y en raíz excepto la determinación de alcaloides.

Las fuentes nitrogenadas empleadas eran las mismas que se utilizaron en la primera parte: H_2O , KNO_3 20 mM, NH_4Cl 2 mM, y una mezcla de KNO_3 20 mM + NH_4Cl 2 mM.

II.6.2c. Determinación de las actividades de las enzimas:

Se procedió igual que en la primera parte:

- nitrato reductasa in vivo (II.5.4b.)
- nitrato reductasa in vitro (II.5.5b.)
- nitrito reductasa in vitro (II.5.7b.)

II.6.3c. Determinación de las pozas:

- Determ. de proteínas (II.5.8b.)
- Determ. de nitritos (II.5.9b.)
- Determ. aminoácidos (II.5.10b.)
- Determ. amonio (II.5.11b.)
- Determ. de nitratos (II.5.12b.)

II.6.4c. Extracción de alcaloides totales según el método de -- Kutney (33).

Se desarrolló el proceso indicado en la figura 2.9

La muestra de toma fue de 8.0 g para todas las fuentes (c/u).

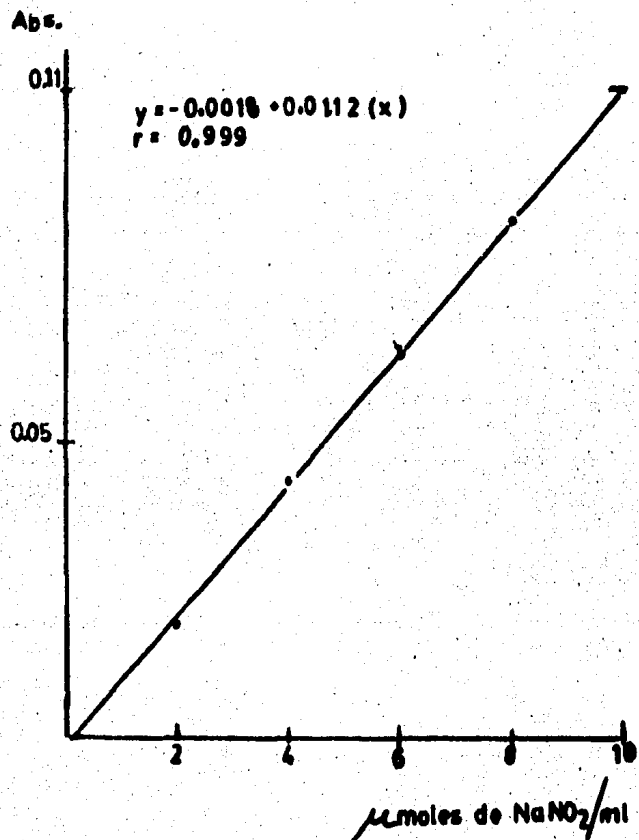
II.6.5c. Cualificación de alcaloides totales.

Se empleó un reactivo general de alcaloides. El reactivo de Dragendorff (14), que consiste en una mezcla de $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ disuelta en HNO_3 y KI. Produce un precipitado anaranjado-marrón -

en contacto con el alcaloide.

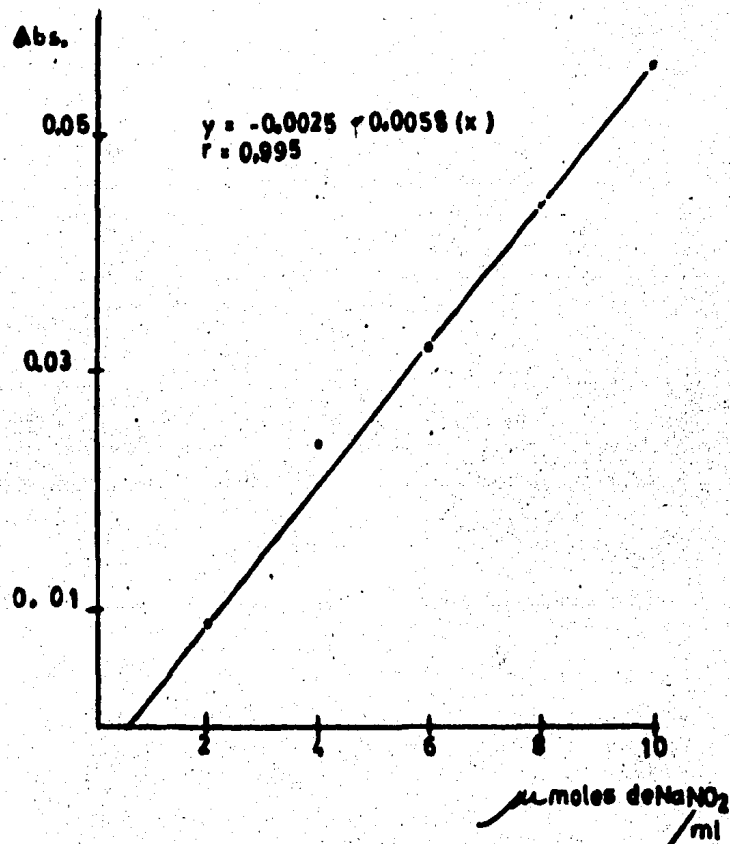
Agregue una gota del reactivo y una gota de la muestra, que previamente se ha disuelto en metanol.

FIGURA 2.1



Curva patrón de la nitrato reductasa
in vivo

FIGURA 2.2



Curva patrón de la nitrato reductasa
in vitro

Absorbancia

FIGURA 2.3

0.5

0.3

0.1

3.75

7.5

11.25

15

18.75

$\mu\text{moles de NaNO}_2$
/ml

Curva patrón de la nitrato reductasa in vitro

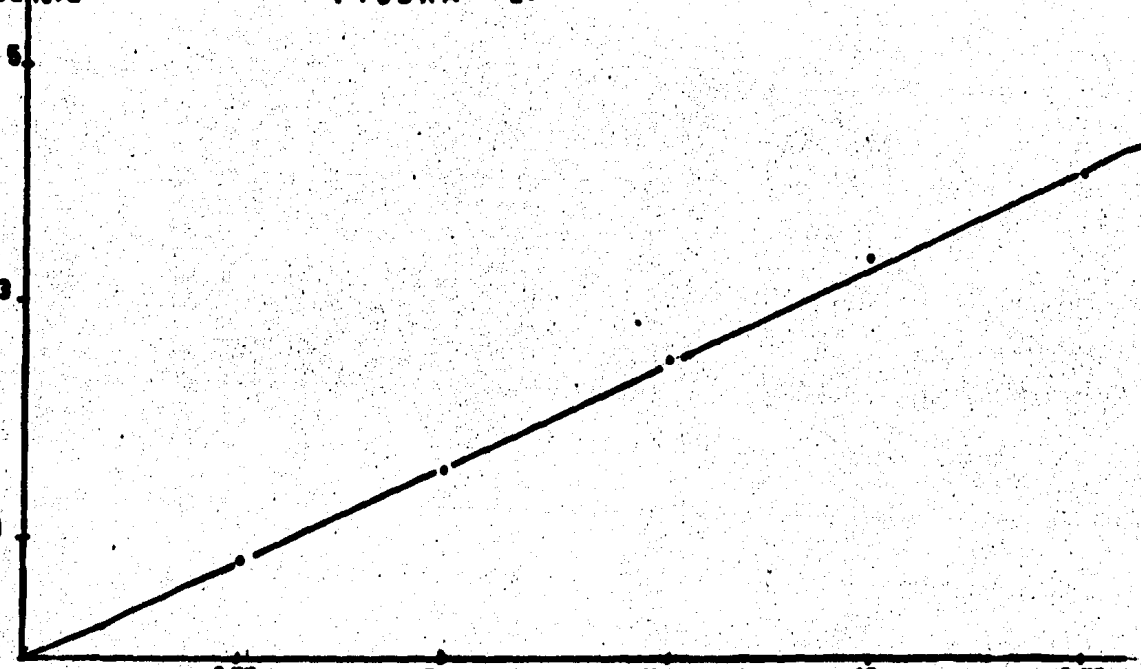
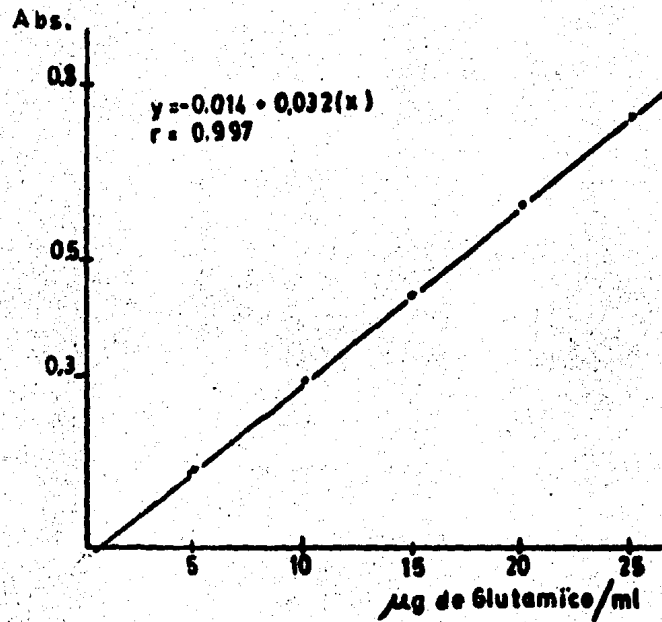
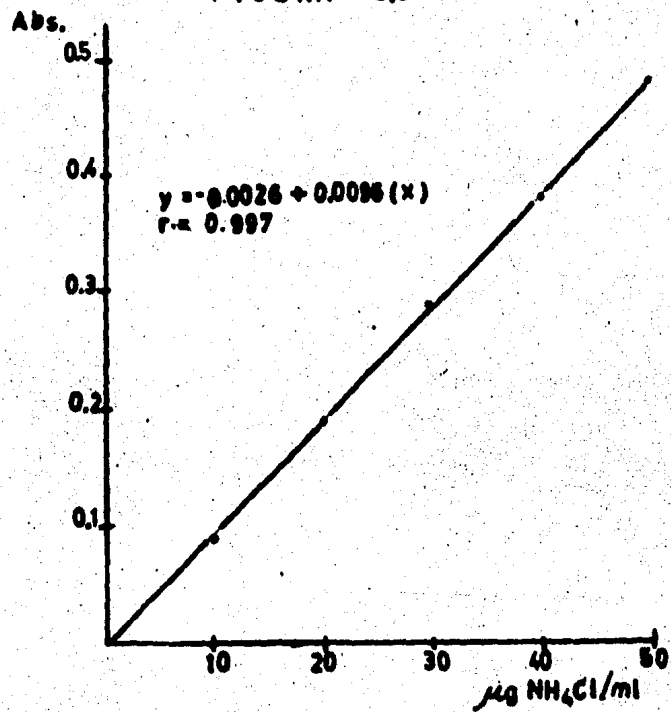


FIGURA 2.4



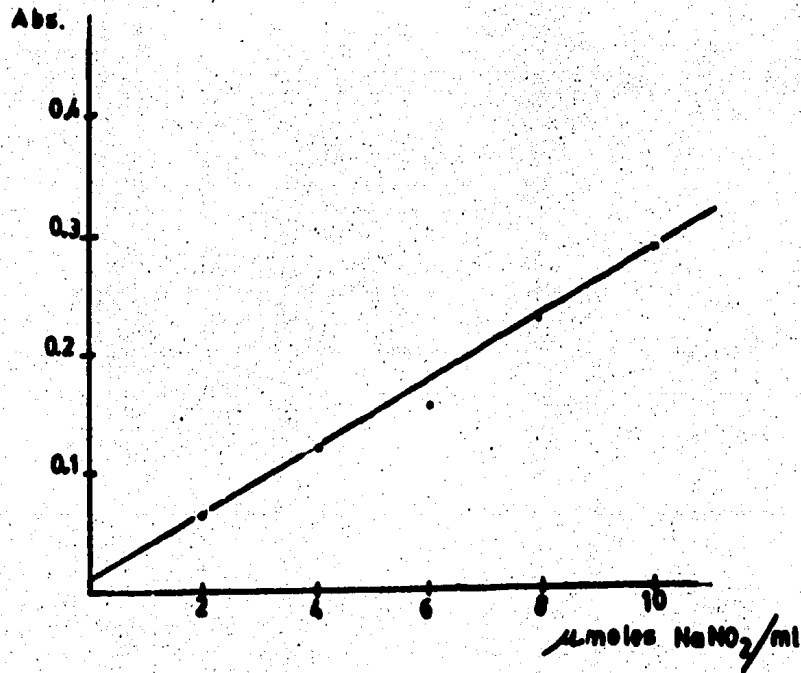
Curva patrón de aminoácidos totales

FIGURA 2.5



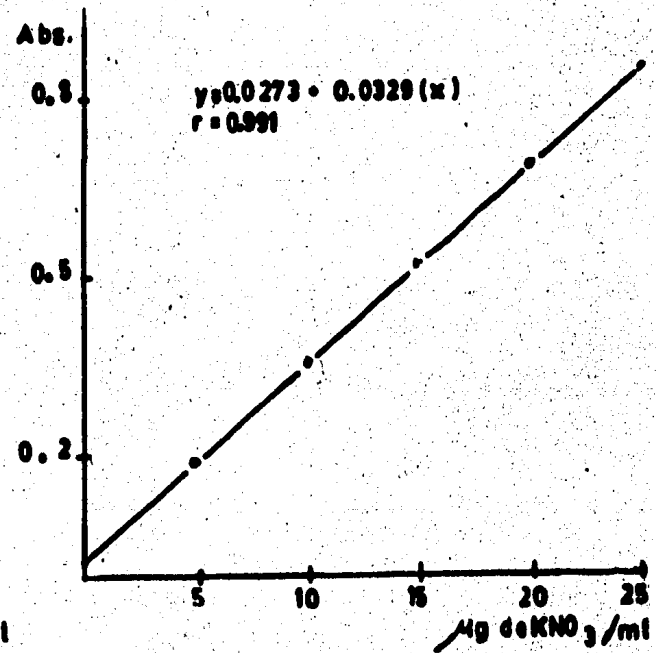
Curva patrón de amonio

FIGURA 2.6



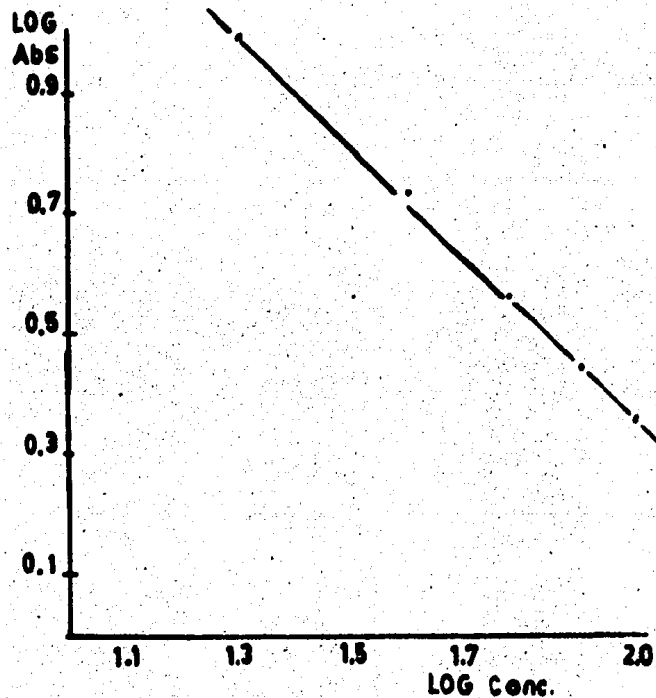
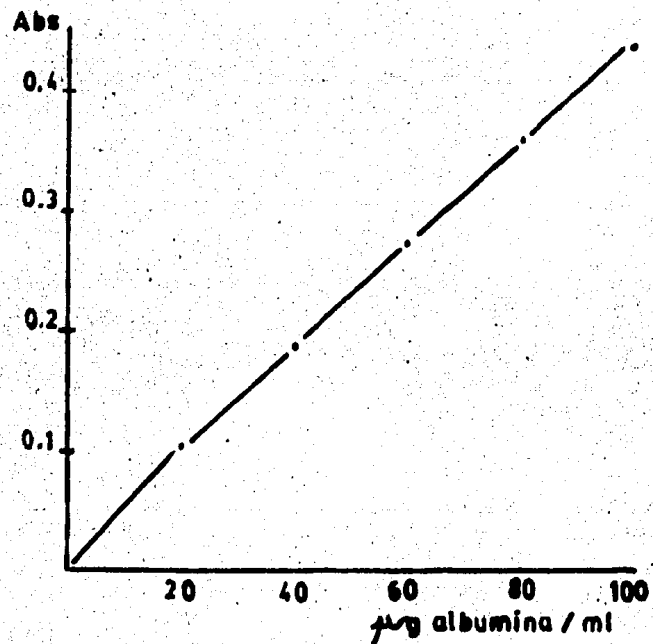
Curva patrón de nitritos

FIGURA 2.7



Curva patrón de nitratos

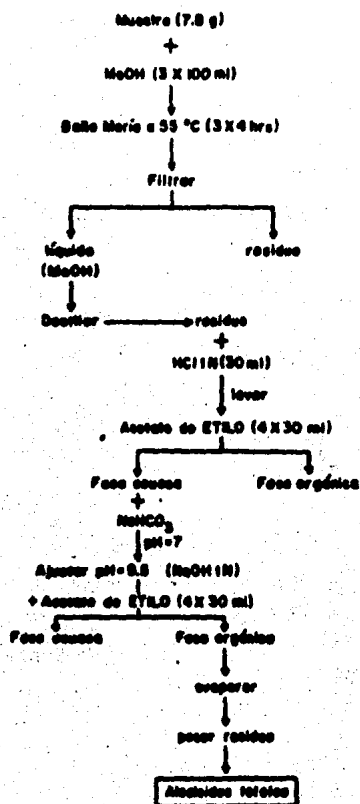
FIGURA 2.8



$\mu\text{g prote\u00ednas} = (14180) A_m^{750}]^{1.172}$

Curva patr\u00f3n de prote\u00ednas

EXTRACCION DE ALCALOIDES



Kutney, P. J. and Lewis, S. L. (1980) *Phytochem.* **19**: 2589-2595.

Figura 2.9 Extracción de alcaloides.

III. RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1 Metabolismo nitrogenado: Se sometieron explantes de hojas de *Catharanthus roseus* a diferentes fuentes de nitrógeno y a diversos tiempos. Se midió la nitrato reductasa in vivo e in vitro la nitrito reductasa in vitro y las pozas de amonio, nitritos, -nitratos, proteínas y aminoácidos (vease materiales y métodos).

III.1.1 Nitrato reductasa:

a) Medición in vivo: Como se observa en la figura 3.1 y tabla 3.1 la actividad de la enzima se ve incrementada en todas las fuentes nitrogenadas excepto en agua durante las primeras dos horas, luego decae (2-4 horas) para aumentar nuevamente (4-8 horas).

La fuente de mayor inducción es la de KNO_3 20 mM (ver tabla 3.1) El comportamiento de la enzima frente a la mezcla de nitrato y amonio es muy similar a la de la fuente única de amonio (en realidad es un poco mayor), lo que se explica porque el amonio inhibe la toma del nitrato exógeno (47,40,50,78).

Como se acaba de mencionar en las primeras horas hay un aumento que luego declina. Esto puede deberse a la presencia de proteasas que degradan a la enzima como en explantes de *Bouvardia* (Murrillo, comunicación personal), pero que también producen la lisis de los compartimientos o pozas de almacenamiento del nitrato haciendo de esta forma posible, la utilización del nitrato antes inaccesible. Esto explicaría el incremento posterior de la actividad enzimática.

Desgraciadamente no se puede incluir algún inhibidor de proteasas o del envejecimiento como las citocininas para impedir la degradación, ya que estas sustancias (citocininas) estimulan por

si mismas la actividad de la NR (1).

b) Medición de la nitrato reductasa in vitro: La figura y tabla 3.2 nos muestra que en las primeras horas (0-4 horas) hay un incremento en la actividad de la NR para posteriormente decrecer. En las primeras horas se observa un incremento que puede deberse a una síntesis de novo como se ha observado en cebada, trigo, tabaco, etc. (6,7).

El periodo de 4-8 horas indica una inactivación o una degradación de la enzima, en tanto que la poza de aminoácidos (figura y tabla 3.4) se incrementa significativamente.

Otra vez la fuente de mayor inducción es la de nitratos. La fuente de amonio y la de la mezcla tienen el mismo comportamiento. Es razonable pensar que la fuente de nitratos sea la de mayor aumento, ya que se incrementan los nitratos disponibles no sólo por la ruptura de la poza de almacenamiento durante la extracción sino también proveniente de la fuente externa como puede apreciarse en la figura 3.3 y tabla 3.7.

c) Nitrito reductasa in vitro:

El comportamiento de esta enzima frente a las fuentes nitrogenadas (figura 3.5 y tabla 3.3) es de un aumento máximo hasta las dos horas y de una disminución a continuación.

La fuente de nitratos estimula la actividad dentro de las primeras horas de acuerdo a lo reportado (3,20,78,82). De 2 a 4 horas baja aunque sigue siendo mayor al del tiempo cero, pues ya sólo utiliza el nitrito producido con anterioridad por la nitrato reductasa, la poza de nitrito (figura 3.6 y tabla 3.6) decrece a partir de las dos horas; además se inicia la degradación de la enzima. El aumento frente a la fuente de amonio quizá se debe a algún efecto indirecto como lo explica Platt (58) para la nitrato reductasa de maíz. Tal vez moviliza al nitrato endógeno de la poza de almacenamiento y consecuentemente causa la activación de la

NR y ésta a su vez estimula a la NiR. El incremento fue menor de todas las demás fuentes.

La fuente de $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$ incrementan más la actividad de la NiR que la fuente de amonio sola pero siempre es menor que la fuente de nitrato, debido posiblemente a que la poza de nitritos es muy alta (fig. y tabla 3.6). Esta inducción puede ser que, a pesar de que amonio inhiba la toma de nitrato (40,37,78), la planta asimila el suficiente nitrato como para que se active la NR (fig. - 3.2). Además debe considerarse el efecto inductivo del amonio explicado anteriormente. La poza de amonio (fig. 3.7 y tabla 3.5) indica que rápidamente el amonio se incorpora en aminoácidos pero a partir de las 4 horas quizá la GS sufra una degradación que permita el incremento de la poza de amonio.

III.2 Estudio de la relación metabolismo nitrogenado-producción de alcaloides:

Plantas de 5 meses de *C. roseus* se sometieron a diferentes fuentes nitrogenadas (H_2O , KNO_3 20 mM, NH_4Cl 2 mM y una mezcla de KNO_3 20 mM + NH_4Cl 2 mM) durante un mes. Se determinaron las actividades enzimáticas de la nitrato reductasa in vivo e in vitro, la nitrito reductasa in vitro, y las pozas de amonio, aminoácidos, nitratos, nitritos y proteínas. Todo lo anterior fue hecho tanto en raíz como en hojas. Además se cuantificó alcaloides totales de hojas de *C. roseus* después del experimento.

III.2.1 Aspecto físico de las plantas expuestas:

La apariencia física era la siguiente: las de mayor tamaño fueron las regadas con la fuente de nitrato 20 mM (35-40 cm) seguida de la mezcla (25-30 cm); en la fuente de amonio crecieron mucho menos (20-25 cm) y ya presentaban clorosis en algunas hojas; y por último la fuente de agua que casi no hubo crecimiento (15-20 cm) además de presentar gran cantidad de plantas con clorosis.

III.2.2. Medición de la nitrato reductasa in vivo:

En las figuras 3.8 y 3.9 se observa que la actividad de la NR in vivo en raíz es mucho mayor que en las de las hojas. Lo que sugiere que la mayor parte de la reducción del nitrato se lleva a cabo en las raíces.

Al mismo tiempo se puede observar en la tabla 3.8 que tanto en la fuente de agua como en la de nitrato no se detectó actividad mientras que en las plantas regadas con las fuentes de amonio y con la de la mezcla fue muy baja. Por otro lado en raíz las fuentes nitrogenadas disminuyeron drásticamente la actividad de la NR medida in vivo.

Ahora bien, las pozas de aminoácidos y nitratos en las plantas crecidas en nitrato y en la mezcla son muy elevadas (figuras 3.10 y 3.12 respectivamente) y es posible que éste sea el factor que mantiene muy baja la actividad de la NR medida in vivo ya que la puede inhibir in situ.

III.2.3 Medición de la nitrato reductasa in vitro:

La actividad de la NR en hojas medida in vitro es mucho mayor que su actividad medida in vivo, lo que sugiere que existe una inhibición in situ de la enzima.

Por otro lado la actividad de la NR medida in vitro (figura 3.14 y 3.15) es mayor en hoja que en raíz cuando las plantas han sido crecidas en amonio o en la mezcla, pero menor si la fuente de nitrógeno ha sido nitrato, en esta última fuente a pesar de que la poza de nitratos es muy elevada. Lo que sugiere que el nitrato se encuentra almacenado y no disponible a la enzima.

En raíz, la poza de nitratos es más baja (figura 3.13) que en el control (agua), lo que aunado a las actividades de NR determinadas sugiere que el nitrato es rápidamente convertido en amonio (figura 3.19), el cual es transformado en aminoácidos, los cuales son transportados a las hojas, en donde se acumulan (figura 3.10).

III.2.4 Medición de la nitrito reductasa in vitro:

La actividad de la NiR es mayor en raíz que en hoja tanto en las fuentes de nitratos como en la de amonio, no así en la mezcla - (figura 3.16 y 3.17). Este hecho es similar al determinado en maíz. Lo que sugiere que no es la NiR el paso limitante en la asimilación del nitrato.

La gran actividad de esta enzima en raíz apoya fuertemente el hecho de que el nitrato es asimilado en raíz. Por otro lado la disminución de las actividades de la NR como la de NiR en las plantas crecidas con la mezcla de fuentes nitrogenadas puede explicarse por el hecho de que amonio inhibe la toma de nitrato (fig. 3.13) (40,47,50,78).

III.2.5. Cuantificación de alcaloides totales:

La fuente de nitrato produjo un incremento del 46% en el contenido total de alcaloides, en tanto que las plantas crecidas con la mezcla mostraron una reducción de aproximadamente el 40%.

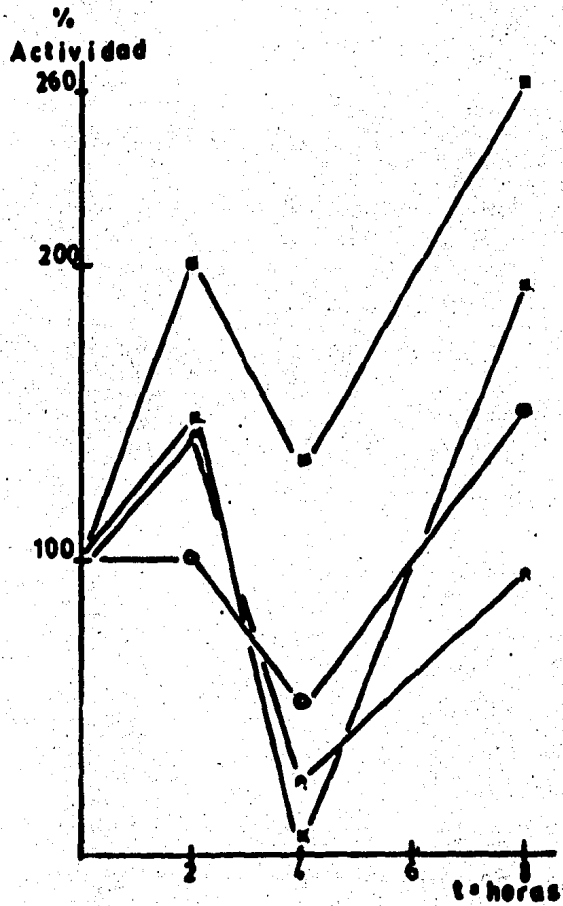
Una posible explicación al respecto podría ser la calidad del tipo de aminoácidos producidos por cada una de las fuentes nitrogenadas. P. ej. es posible que la fuente de nitrato incremente la poza de glutamina, el cual puede utilizarse para la síntesis de precursores de los alcaloides indólicos, en tanto que en las plantas crecidas en la mezcla de las dos fuentes solamente reciben amonio, el cual podría acumularse principalmente como glutamato, el cual no sirve como precursor para la biosíntesis de los alcaloides.

Podemos establecer finalmente en relación con lo anterior que las plantas toman el nitrógeno inorgánico en forma de nitratos (principalmente) y éste se transforma rápidamente en aminoácidos por la nitrito y nitrito reductasa en raíz, mientras que en las hojas el nitrato se almacena.

En experimentos recién hechos (18) en las mismas condiciones (- plantas de *C. roseus* expuestas durante un mes a estas fuentes ni trogenadas) la vía de asimilación del nitrógeno es la GS/GOGAT - también en la raíz de la planta y se transporta como glutamina a las hojas.

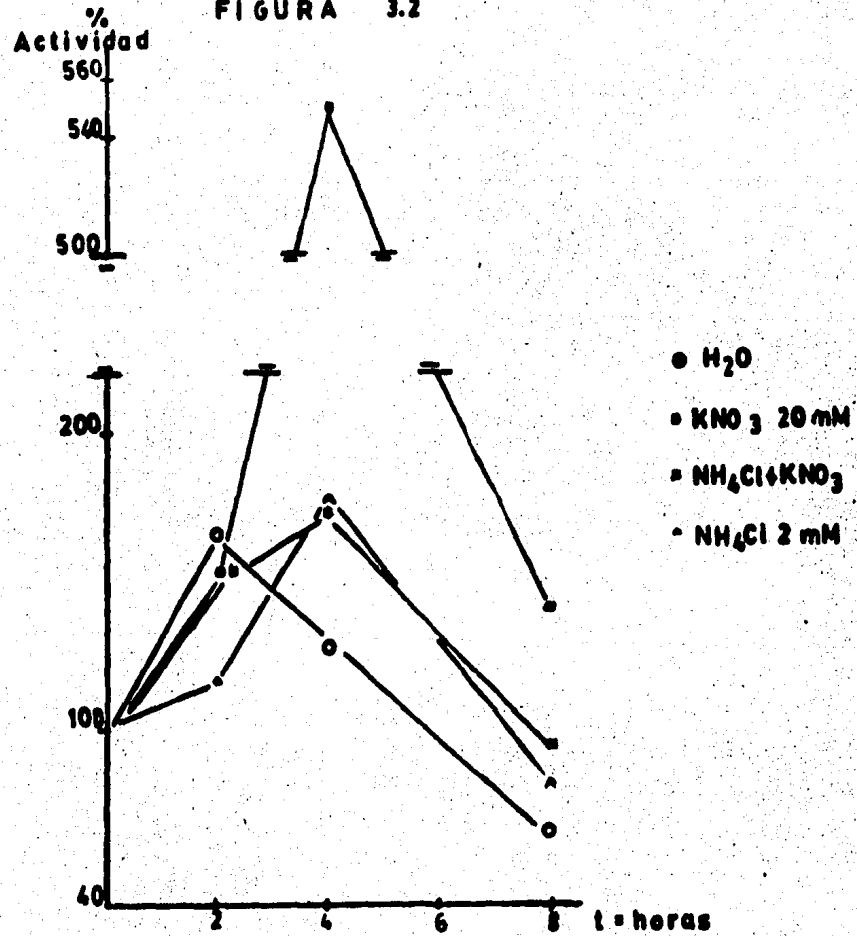
Todos estos resultados nos inducen a seguir con una serie de ex- perimentos con otras fuentes nitrogenadas y con otras concentra- ciones; además será necesario estudiar todas las enzimas que in- tervienen en la biosíntesis de estos alcaloides como por ejemplo la triptofano sintetasa, quien puede estar jugando un papel im- portante en la biosíntesis.

FIGURA 3.1



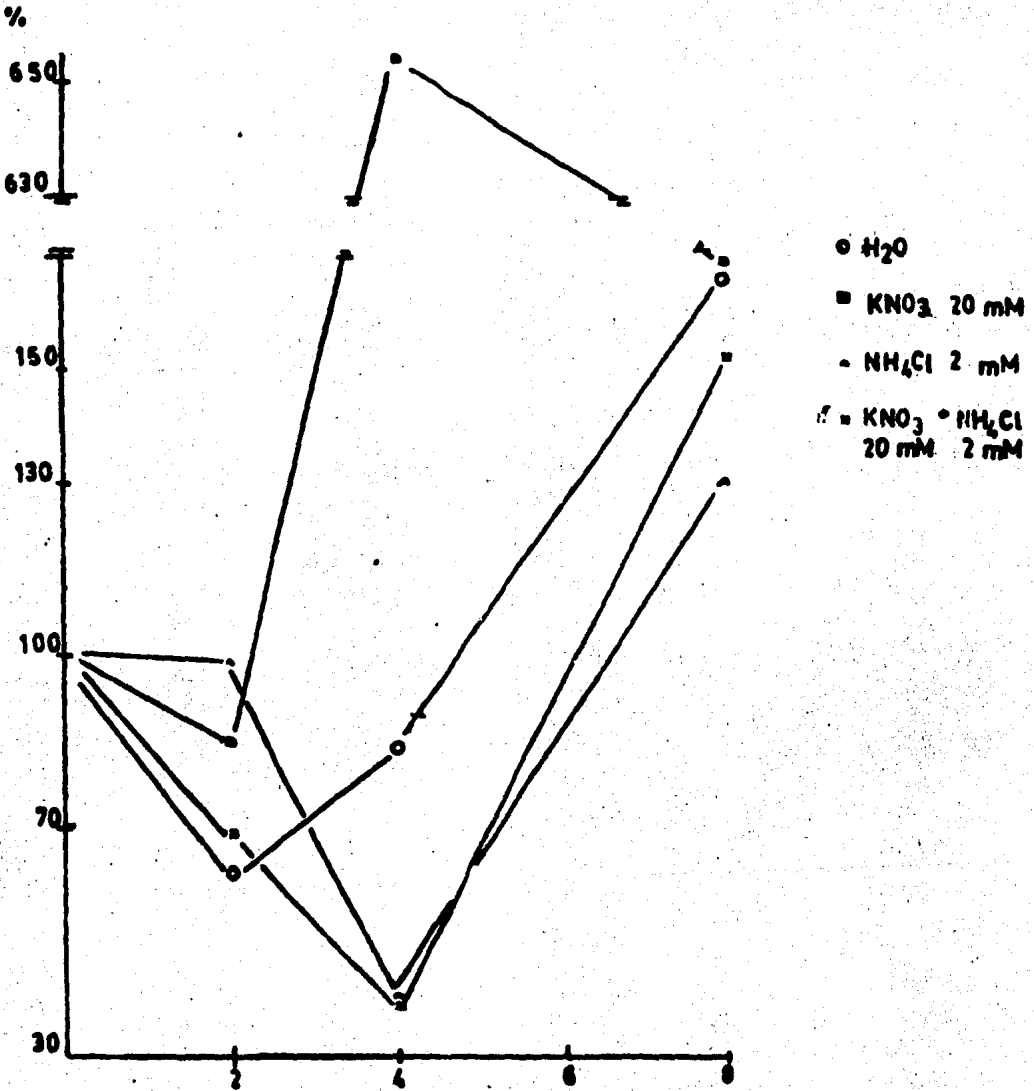
Medición de la nitrato reductasa in vivo a diferentes tiempos y en diversas fuentes nitrogenadas

FIGURA 3.2

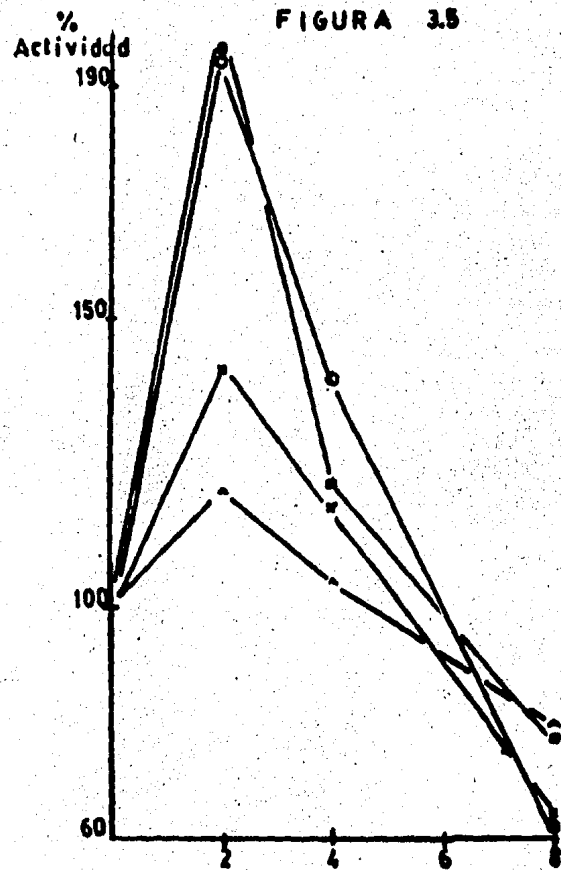


Medición de la nitrato reductasa in vitro a diferentes tiempos y en diversas fuentes nitrogenadas

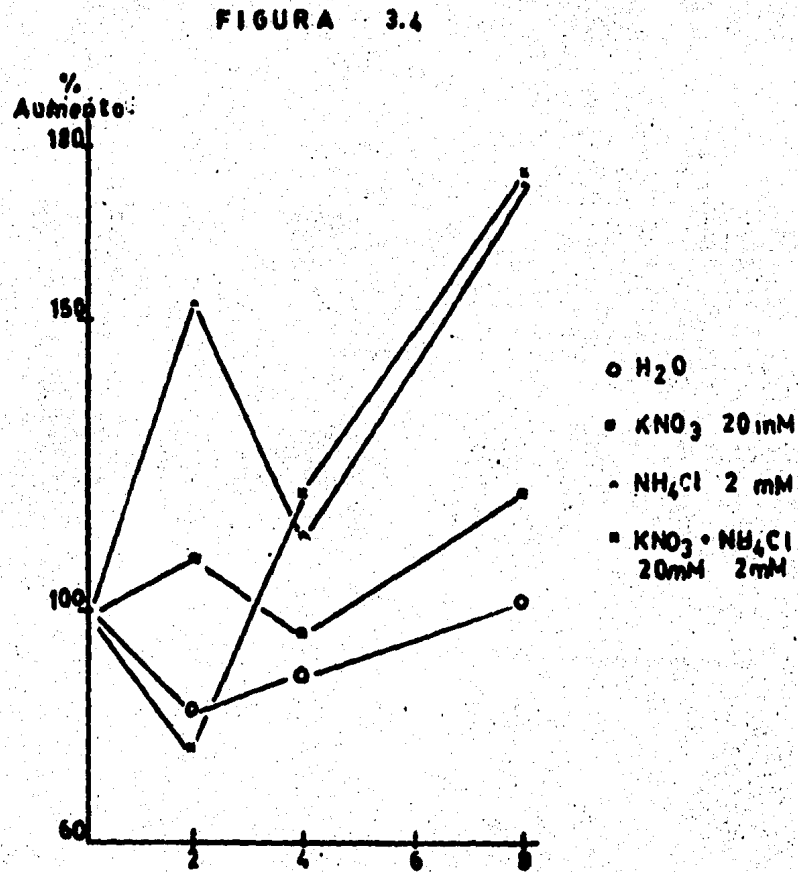
FIGURA 3.3



Medición de la poza de nitratos.

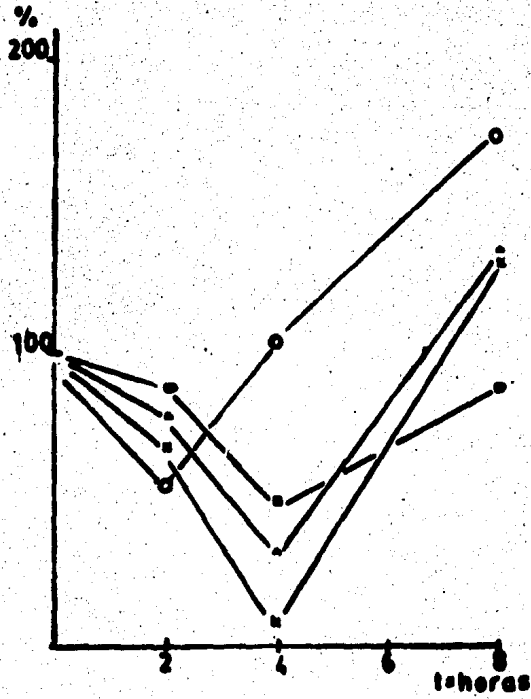


Medición de la nitrito reductasa *in vitro* a diferentes tiempos y en diversas fuentes nitrogenadas.



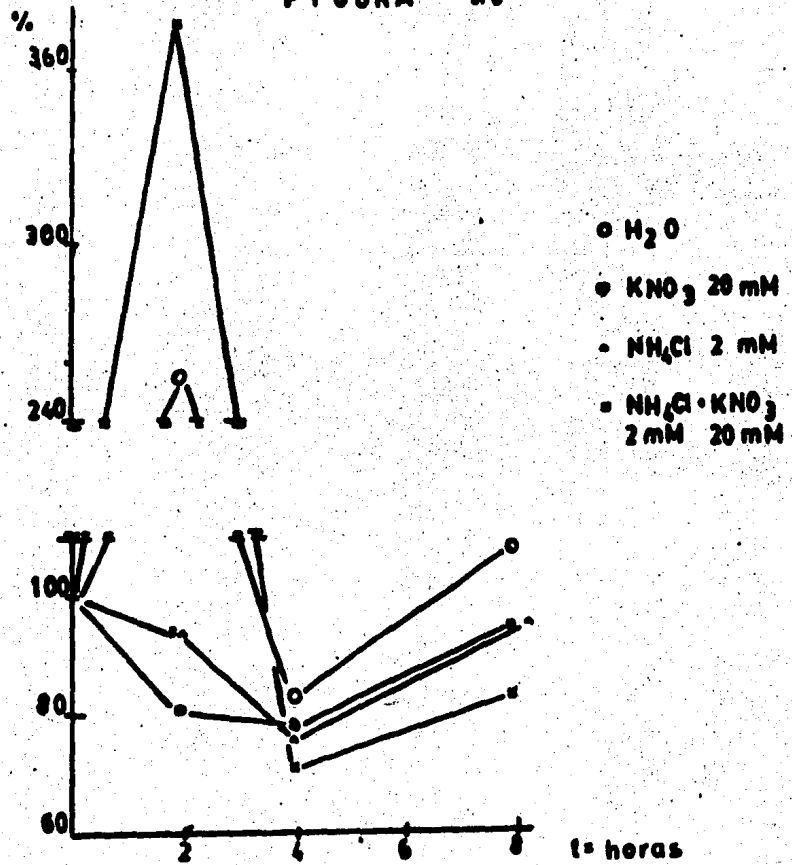
Medición de la poza de aminoácidos totales.

FIGURA 3.7



Medicion de la poza de arsenio

FIGURA 16



Medicion de la poza de nitritos

TABLA 3.1

Fuente	% Act T=2h	% Act T=4h	% Act T=8h
H ₂ O	100.75	49.81	151.49
KNO ₃ 20 mM	202.32	133.25	271.80
NH ₄ Cl 2 mM	144.01	23.8	95.44
KNO ₃ • NH ₄ Cl 20 mM 2 mM	148.03	6.20	192.97

% de las Actividades de la nitrato reductasa in vivo
 Actividad = $\mu\text{moles de NaNO}_2$ producidos / mg proteína / minuto

TABLA 3.2

Fuente	% Act T=2h	% Act T=4h	% Act T=8h
H ₂ O	166.77	129.64	65.97
KNO ₃ 20 mM	153.39	550.09	142.12
NH ₄ Cl 2 mM	116.92	179.49	80.81
NH ₄ Cl • KNO ₃ 2 mM 20 mM	154.77	175	94.03

% de las Actividades de la nitrato reductasa in vitro
 Actividad = $\mu\text{moles de NaNO}_2$ producidos / mg proteína / minuto

TABLA 3.3

Fuente	% Act T=2h	% Act T=4h	% Act T=8h
H ₂ O	195.28	139.09	61.89
KNO ₃ 20 mM	196.31	121.41	76.82
NH ₄ Cl 2 mM	119.54	104.43	79.81
KNO ₃ • NH ₄ Cl 20 mM 2 mM	140.68	117.25	63.14

% de las Actividades de la nitrito reductasa in vitro
 Actividad = $\mu\text{moles de NaNO}_2$ desaparecidos / mg proteína / minuto

T A B L A 3.4

Fuente	% Act T=2 h	% Act T=4 h	% Act. T=8 h
H ₂ O	82.91	88.98	101.57
KNO ₃ 20 mM	108.54	96.04	120.38
NH ₄ Cl 2 mM	153.42	113.03	173.68
KNO ₃ + NH ₄ Cl 20 mM 2 mM	75.64	119.9	175.23

poza de aminoácidos totales

T A B L A 3.5

Fuente	% Act T=2h	% Act T=4h	% Act T=8h
H ₂ O	54.09	103.69	173.58
KNO ₃ 20 mM	87.81	47.5	88.3
NH ₄ Cl 2 mM	77.5	31.75	135.96
NH ₄ Cl + KNO ₃ 2 mM 20 mM	68.32	8.32	135.96

poza de amonio

T A B L A 3.6

Fuente	% Act T=2 h	% Act T=4 h	% Act T=8 h
H ₂ O	256.25	83.26	116.89
KNO ₃ 20 mM	81.25	77.78	96.27
NH ₄ Cl 2 mM	93.75	76.	95.27
NH ₄ Cl + KNO ₃ 2 mM 20 mM	375.6	70.66	84.12

poza de nitritos

T A B L A 3.7

Fuente	% Act T=2 h	% Act T=4 h	% Act T=8 h
H ₂ O	61.98	83.58	166.19
KNO ₃ 20 mM	84.79	653.6	168.84
NH ₄ Cl 2 mM	98.99	41.14	130.45
NH ₄ Cl + KNO ₃ 2 mM 20 mM	68.57	39.74	151.63

poza de nitratos

TABLA 3.8

Fuente	Actividad específica (μ moles de NO_2 producidos/mg proteína/min)
H_2O	n. d. (no detectable)
KNO_3 20 mM	n. d.
NH_4Cl 2 mM	0.0545
$\text{KNO}_3 \cdot \text{NH}_4\text{Cl}$ 20 mM 2 mM	0.01305

HOJA

TABLA 3.9

Fuente	Actividad específica (μ moles de NO_2 producidos/mg proteína/min)
H_2O	0.450
KNO_3 20 mM	0.2019
NH_4Cl 2 mM	0.1162
$\text{KNO}_3 \cdot \text{NH}_4\text{Cl}$ 20 mM 2 mM	0.2169

RAIZ

Medición de la nitrato reductasa in vivo después de un mes de exposición a diferentes fuentes nitrogenadas.

FIGURA 3.10

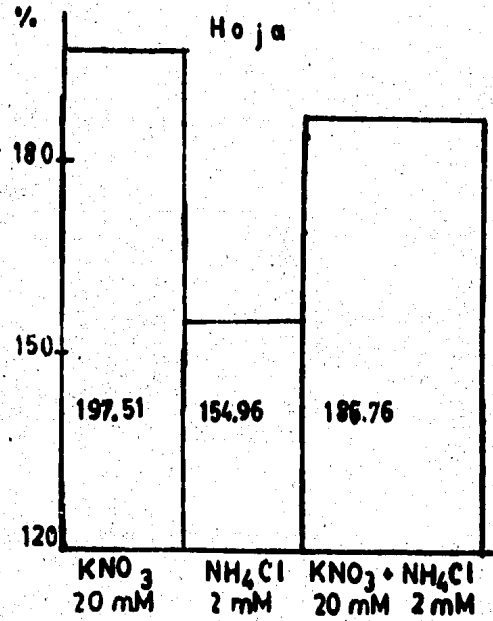
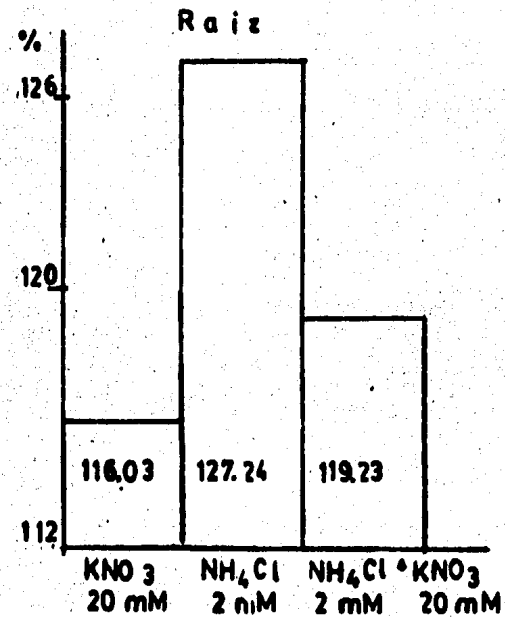


FIGURA 3.11



Medición de la pozu de aminoácidos totales

FIGURA 3.12.

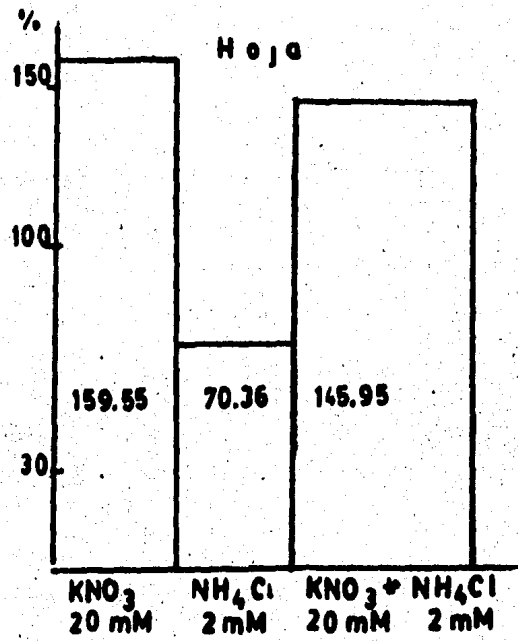
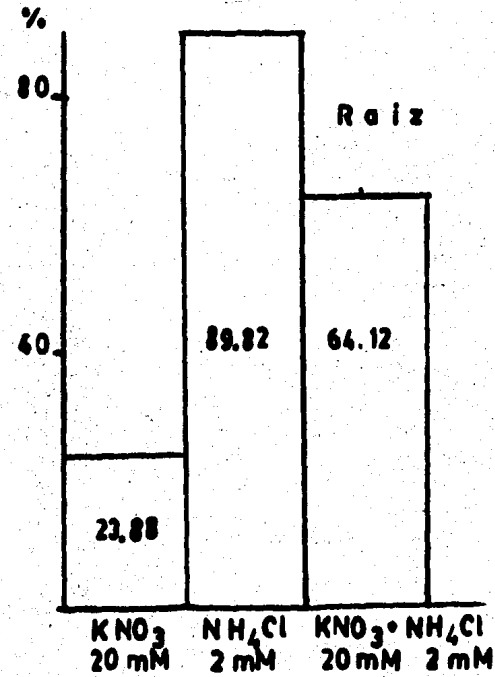


FIGURA 3.13.



Medición de la poza de nitratos.

FIGURA 3.14

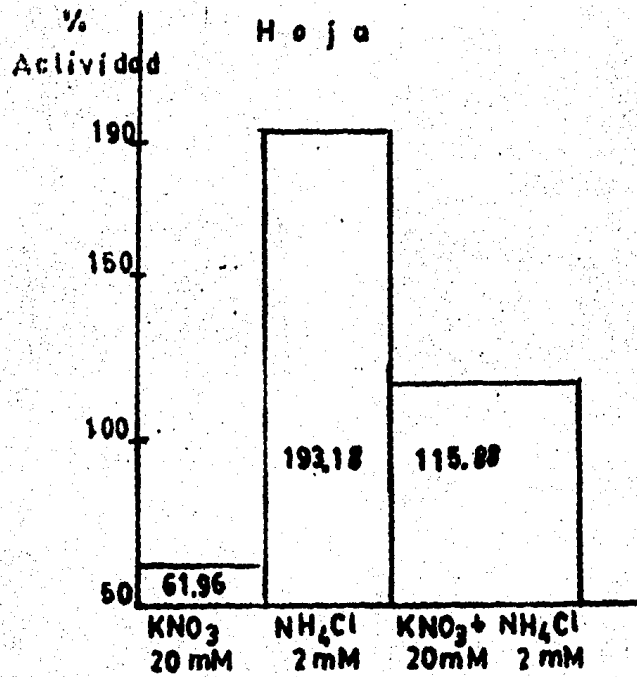
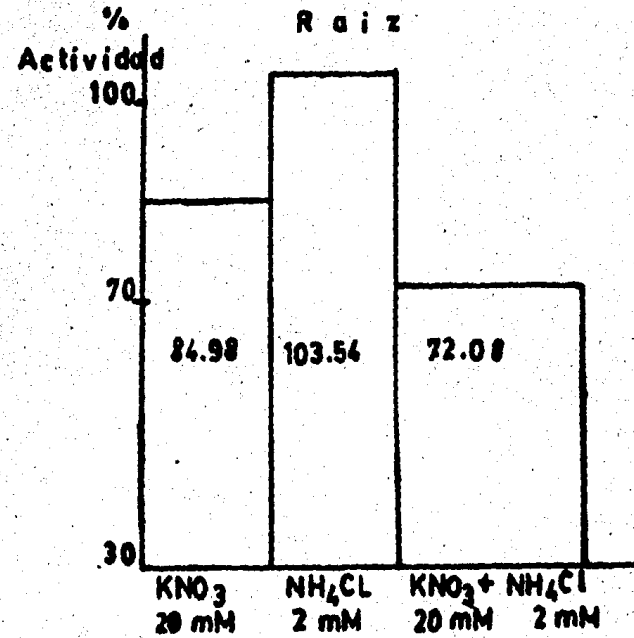


FIGURA 3.15



Medición de la nitrato reductasa in vitro despues de un mes de exposicion a diferentes fuentes nitrogenadas.

FIGURA 3.16

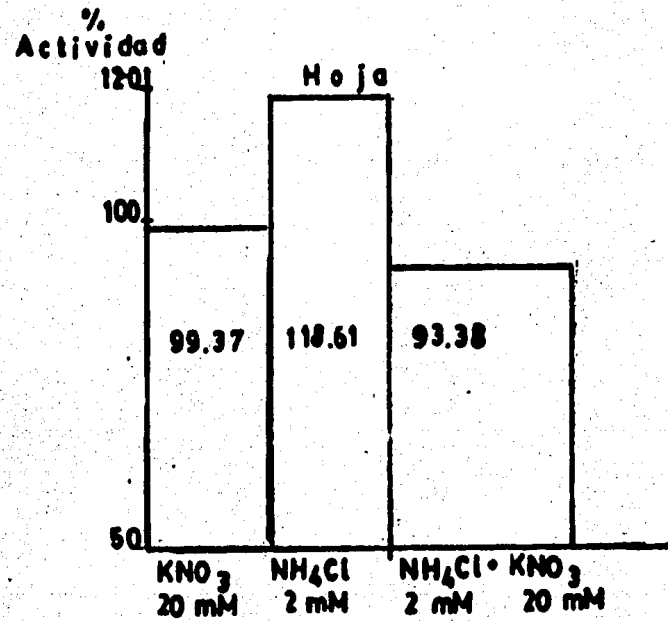
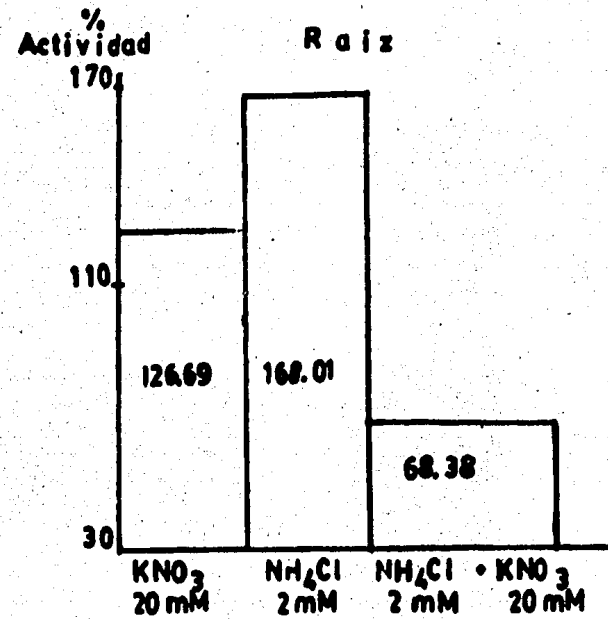


FIGURA 3.17



Medición de la nitrito reductasa *in vitro* después de un mes de exposición a diferentes fuentes nitrogenadas.

FIGURA 3.18

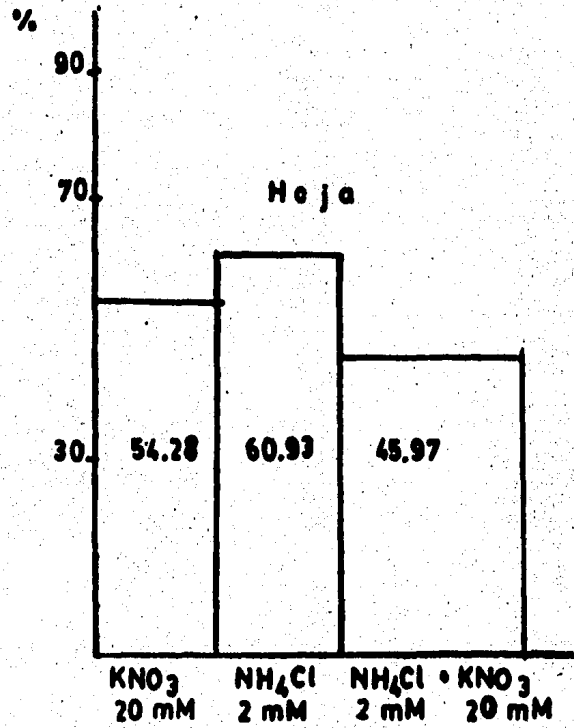
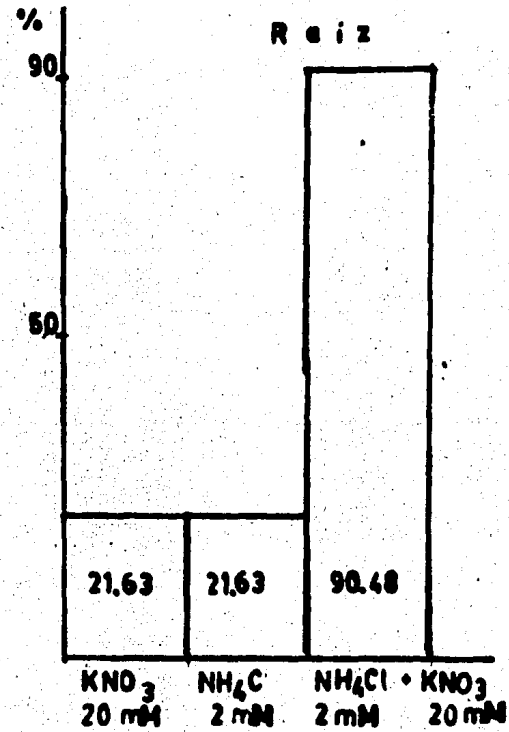


FIGURA 3.19



Medición de la poza de amonio

FIGURA 3.20

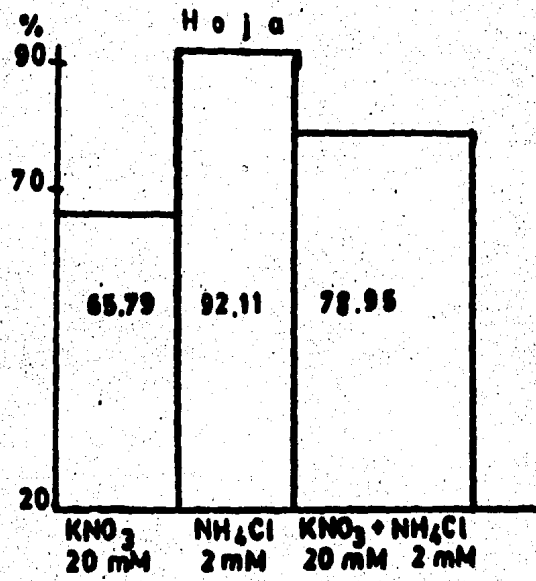
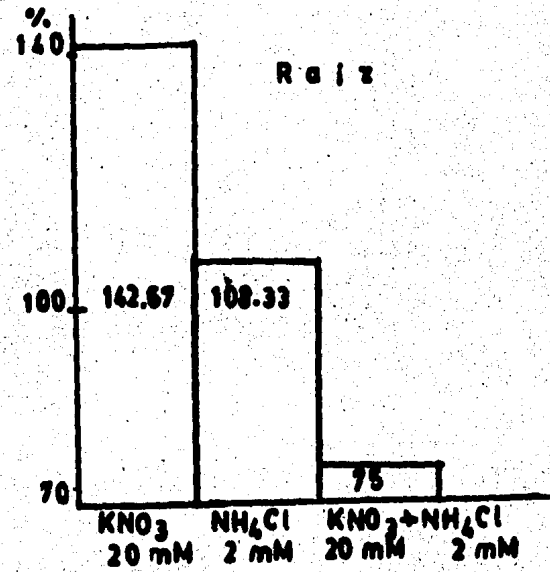
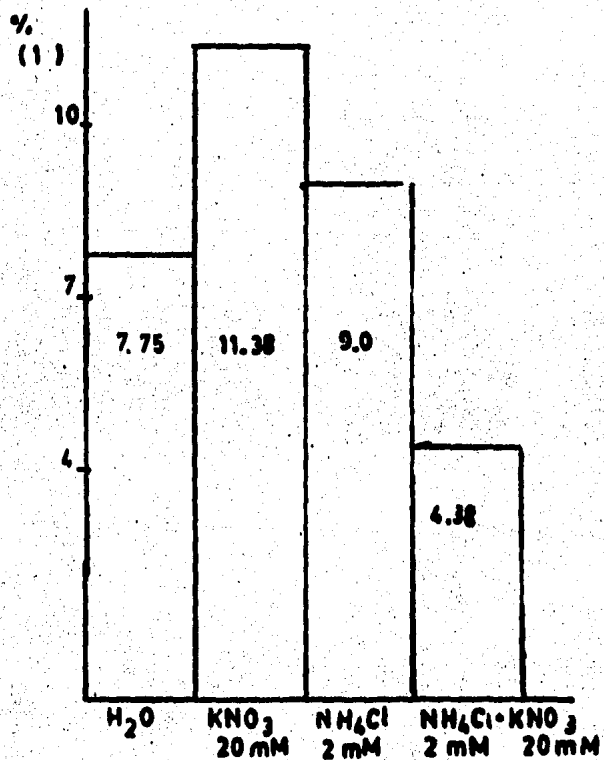


FIGURA 3.21



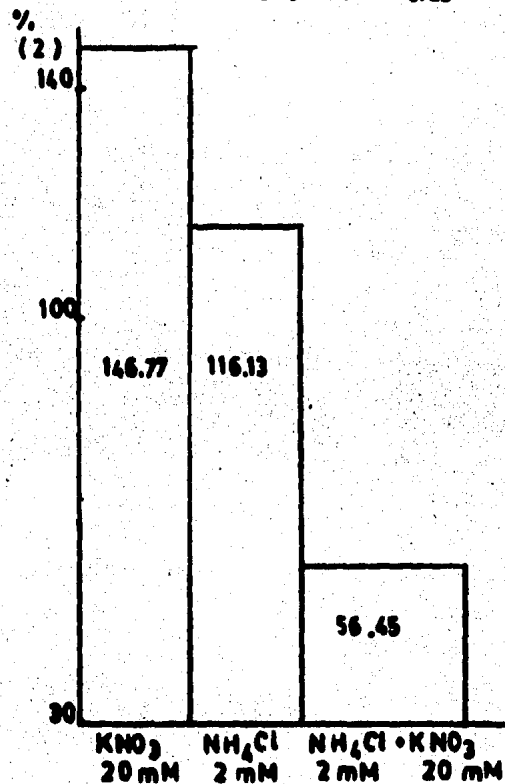
Medición de la poza de nitritos

FIGURA 3.22



$$\% (1) = \frac{\text{peso residuo muestra}}{\text{peso inicial muestra}} = 100$$

FIGURA 3.23



$$\% (2) = \frac{\text{peso residuo muestra}}{\text{peso residuo H}_2\text{O}} = 100$$

Determinación de alcaloides totales de plantas de *Crassus*, después de un mes de exposición a diferentes fuentes nitrogenadas.

CONCLUSIONES.

1) La nitrato reductasa, medida tanto in vivo como in vitro se estimula con nitrato como fuente de nitrógeno. También estimula el amonio pero en menor grado. El comportamiento de la enzima frente a la mezcla de las dos fuentes es muy similar a la fuente única de amonio, debido a que él evita la asimilación del nitrato exógeno (40,37,78).

2) La mayor parte de la reducción nítrica se lleva a cabo en las raíces.

3) La nítrito reductasa no se ve muy afectada por las diferentes fuentes. Lo que sugiere que no es el factor limitante en la toma de nitrato exógeno. Todas las fuentes la estimulan principalmente la fuente de nitrato, en explantes de hojas de C. roseus. Al igual que en la NR, la fuente de la mezcla produce un comportamiento semejante al de la fuente única de amonio.

4) Si existe una relación entre la fuente de nitrógeno y la producción de alcaloides. La fuente de mayor inducción es la de nitrato. Parece ser que cada fuente produce diferentes tipos de aminoácidos que pueden o no participar en la biosíntesis de alcaloides indólicos. Solo faltaría analizar que alcaloides produjo para observar si son los que nos interesa (VLB y VC).

BIBLIOGRAFIA

1. A.H. Abad-Faroqi and S.D. Maheshware; Does cAMP stimulate nitrate reductasa level in fenugreek cotyledons?. *Biochem. Physiol Pflanzen.* 171: 231-234, (1977).
2. Bakker Nick and Philip R. Van Hasselt; Photooxidative inhibition of nitrate reductase during chilling. *Physiol. Plant* 54: 414-418 (1982).
3. D. Barry Scott and Carlos A. Neyra; Glutamine synthetase - and nitrate assimilation in sorghum leaves. *Can. J. Bot.* 57: 754-758, (1979).
4. Bayley, J., J. King and O. L. Gamborg; The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta*, 105: 15-24, (1972).
5. Bayley, J., J. King and O. L. Gamborg; The ability of amino compounds and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells growth in suspension cultures. *Planta* 105: 25-32, (1972).
6. Beherend, J. and R. Mateles; Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of aminoacids on growth *Plant. Physiol.* 56: 584-589, (1975).
7. Beherend, J. and R. Mateles; Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on amonia. *Plant Physiol.* 58: 510-512, (1976).

8. Bohinsky, Bioquímica, Fondo Educativo Interamericano, USA, 1978.
9. Chadorkar, A. J. Shivast; Univ 4 (8), 129-132, (1971).
10. Chopra, I.C., Jamwal, K. S., Chopra, C. L., Nair, C. P. N., and Pillary, P. P., Indian J. Med. Research 47, 39, (1959).
11. Chroboczk, H. and P. Filner; Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. Biochem. Biophysic. Acta. 252 69-82, (1971).
12. Cohen G., Biosynthesis of purine nucleotides and deoxy nucleotides and its regulation. In: the regulation of cell metabolism. Holt Rinehart and Winston Inc., N. Y. 1968, pp - 179-185.
13. Celia E. Deamme-Drummond and David T. Clarkson; Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed in vivo in Barley roots. Plant Physiol. 64: 660-662, (1979).
14. Dr. Xorge Alejandro Domínguez; Métodos de investigación fitoquímica. Edit. Limusa S.A., 1ra. Edic., México 1973, cap. 15, pp. 211-229.
15. Epstein E. Mineral metabolism. In: Plant Biochemistry, J. - Bonner and J. E. Warner, Edit. Academic Press; N. Y. 1965, pp. 438-466.
16. Ferrari, T., C. Yoder and P. Filner; Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: Evidence for two nitrate pools. Plant Physiol. 51: 423-431, (1973).

17. Filner P.; Regulation of the nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 118: 299-310, (1966).
18. Gomez Noriega Irene; Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el metabolismo nitrogenado y el contenido de alcaloides de *Catharanthus roseus*. Tesis 1984.
19. Guerrero, M., Assimilatory nitrate reduction; Section 8; Fixation and assimilation of nitrogen from the atmosphere and combined sources. In: *Techniques in Bioproducity and Photosynthesis*; 1980, pp 118-141.
20. Hageman R. H.; Integration of nitrogen assimilation in relation to yield. In: E. J. Hewitt, C. V., Cutting, Eds. *Nitrogen assimilation of plants*, Proc. 6th. Long Ashton Symposium, Academic Press, N. Y. 1979, pp 591-611.
21. R. H. Hageman and D. P. Hucklesby; Nitrate reductase from higher plants. *Methods in enzymology* 23, (45), (1971).
22. Hausse M. C., and John W. Anderson; Light dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C₄-dicarboxylic acids. *Phytochem.* 19: 1925-1930, (1980).
23. Heimer, Y. M., Nitrite-induced development of the nitrate uptake system in plant cells. *Plant Science Letters.* 4:137-139, (1975).
24. Heimer, Y. M. and P. Filner; Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultures tobacco cells. II. Properties of variant cell line. *Biochem. Biophys. Acta.* 215: 152 (1970).

25. Heimer, Y. M. and P. Filner; Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochem. Biophys. Acta.* 230: 362-372, - (1971).
26. Hewitt, E. J.; Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Annu Rev. Plant Physiol*, 26: 73-100, (1975).
27. Jackson W. A.; Nitrate acquisition and assimilation by higher plants processes in the root system. In: D. R. Nielsen J. G. MacDonald, Eds. Nitrogen in the environment, Vol 2; Academic Press, N. Y. 1978, pp 45-88.
28. Jara Silvia Reyes; Vinca rosea, su posible interés farmacéutico, Revisión Bibliográfica 1970-1979; Tesis 1981.
29. Jaworski Ernest G., Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43, 6: 1274-1279, (1971).
30. Kanazawa T., Kirk, M. R., and Bassham J. A.; Regulatory effects of amonia on carbon metabolism in Chlorella pyrenoidosa during photosynthesis and respiration. *Biochem. Biophys. Acta.* 256: 656-659, (1972).
31. Kanazawa T., Kirk, M.R., and Bassham J.A.: Regulatory effects of ammonium on carbon metabolism in photosynthesizing Chlorella pyrenoidosa. *Biochrn. Biophys. Acta.* 205: 401-408, (1970).
32. Nancy Klien Amy and H. Garret; Immune electrophoretic determination in Neurospora crassa. *Analytical Biochem* 95: 97-107, (1979).

33. Kutney James P., Lewis Sh. Chai; W. G. W. Kurz; F. Constabel; et al; Alkaloid production in C. roseus cell cultures. Isolation and characterization of alkaloid from one cell line. Phytochem. 19: 2589-2596, (1980).
34. Lancaster, Vega, Kamin, et al; Identification of the iron-sulfur center of spinach ferredoxin-nitrite reductase as a tetranuclear center and preliminary EPR studies of mechanism Journal of Biol. Chem. 254,4: 1268-1271, (1979).
35. Lea, P., M. Reportes and M. Guerrero; Fixation and assimilation of nitrogen from the atmosphere and combined sources. Desierto y Ciencia, p. 40, (1982).
36. Lawrence M. John and Hedwing E. Herrick; Media for in vivo nitrate reductase assay of plant tissues. Plant Sciences - Letters, 24: 17-26, (1982).
37. Lehninger, Biochemistry, Worth Publishers Inc., 2 Edition, U.S.A. 1979.
38. Lewis O. A. N., E. F. Watson, E. J. Hewitt; Determination of nitrate reductase activity in barley. Leaves and roots. Ann. of Botany 49, 1: 31-38, (1982).
39. Loyola V. M., Sanches E., y Murillo G. E.; El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Naturaleza 2: 112-116, (1981)
40. MacKnow C.T., W. A. Jackson; R. J. Volk; Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. Plant Physiol. 69: 353-359, (1982).
41. Matb T., Takashashi E., and Ida J.; Glutamate synthase in developing pea cotyledons: occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes. Plant Cell Physiol. 20: 1455-1459, (1979).

42. Match, T., and Takashashi E.; Changes in the activities of ferredoxin and NADH glutamate synthase during seedling development of peas. *Planta* 154: 289-294, (1982).
43. Mazakazu Hirose and Goro Tamura; Purification of ferredoxin-dependent nitrite reductase from spinach leaves. *Agric. Biol. Chem.* 43, 3: 659-661, (1979).
44. Mazakazu Hirose-Sogo and Goro Tamura; Some properties of ferredoxin-nitrite reductase from *Spinacia oleracea*. *Agric. Biol. Chem.* 45, 7: 1615-1620, (1981).
45. Mehta and Srivastava H. S.; Comparative stability of ammonium and nitrate induced nitrate reductase activity in maize leaves. *Phytochem.* 19: 2527-2530, (1980).
46. Mehta Pratima and H. S. Srivastava; Increase in *in vivo* nitrate reductase activity in maize leaves in the presence of ammonium. *Biochem. Physiol., Pflanzen* 177: 237-243, (1982).
47. Mengel K., Paul Robin and Louis Salsac; Nitrate reductase activity in shoots and roots of maize seedlings as affected by the form of nitrogen nutrition and the pH of the nutrient solution. *Plant Physiol.* 71: 618-622, (1983).
48. Mifflin, B. J., and Lea, P. J.; The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem* 15: 873-885, (1976).
49. Miller, R. F., and Evans, J. H.; The influx of salts on pyruvate kinase from tissues of higher plants. *Plant Physiol.* 32 346-354, (1957).
50. Minotti, P. L., D. C. Williams, W.A. Jackson; Nitrate uptake by wheat as influenced by ammonium and other cations. *Crop. Sci.* 9: 9-14, (1969).

51. Mohanty, B. and J. Fletcher; Amonium influence on the growth and nitrate reductase activity of Paul's scarlet rose suspension cultures. *Plant Physiol.* 58: 152-155, (1976)
52. Joseph C. Nicholas, James E. Harper, Richard H. Hageman; - Nitrate reductase activity in soybeans. I. Effects of light and temperature. *Plant Physiol.* 53: 731-735, (1976).
53. Nicholas D. J., and Mason A. C.; Determination of nitrate and nitrite. *Methods of enzymology* 23: 491-503, (1971).
54. Oaks, A., Jones K., and Mesra S.; A comparision of glutamate synthase obtained from maize endosperms and roots. *Plant Physiol.* 63: 793-795, (1979).
55. Paulsen Gary M. and James E. Harper; Evidence for a role of calcium in nitrate assimilation in wheat seedlings. *Plant Physiol.* 43: 775-780, (1968).
56. Gary L. Peterson; A simplification of the protein assay method of Lowry et al, which is more generally aplicable. *Analytical Biochem.* 83: 346-356, (1977).
57. Peterson C. Currier. *Physiol. Plant* 22: 1238-1250, (1969)
58. Platt, S. G., Plant Z., and Bassham J. A.; Ammonia regulation of carbon metabolism in photosynthesizing disc. *Plant Physiol.* 60: 739-742, (1977).
59. Pokhreyal, T. C., M. S. Sachder, Hh. Grower, R. P. Arova - and Y. P. Abrol.; Nitrate assimilation in leaf blades of wheat of different age. *Physiol. Plant* 48: 477-481, (1980)

60. C. S. Ramarao, Srinivassan, M. S., Naick; Origin of reductant for reduction of nitrate and nitrite in rice and wheat leaves in vivo; *New Phytol.* 87: 517-525, (1981).
61. Robin P.; Etudes de quelques conditions de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de maiz. *Physiol. Vég.* 17: 45-54, (1979).
62. Ruffy T. W. Jr., W. A. Jackson, C. T. Raper Jr.; Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium - and by flux of nitrate through the roots. *Plant Physiol.* 68: 605-609, (1981).
63. K. Sawhney, M. S. Nack, D. J. D. Nicholas; Regulation of nitrate reduction by light, ATP and mitochondrial respiration in wheat leaves. *Nature* 272: 647-648, (1978).
64. Scott A. Jan., Hajime Mizuki, H. Nordlöv Siv-levng Lee; Purification and properties of strictosidine synthetase (an enzyme condensing triptamina and secologanine) from *C. roseus* cultured cells. *Biochem.* 18, 17: 3760-3763, (1979).
65. Scott A. Jan., Hajime Mizukami, Siv-levng Lee; Characterization of a 5-methyltryptophan resistent strain of *C. roseus* - cultured cells. *Phytochem.* 18: 795-798, (1979).
66. Scott I., et al; Indole alkaloid biosynthesis in *C. roseus* involvement of geissoschizine and 19 epiajmalicine. *Tetrahedron Letters* 8: 691-694, (1979).
67. Shimoyama, Kimura and K. Saishen *Igaku* 28, 236: 1024-1040, (1973).
68. Snell and Snell; Colorimetric methods of analysis; D. Van Nostrand Co. Inc., vol. 4, 3 Edit., 1956.

69. Sriniv Asan, S. Prakash and M. S. Naick; Reevaluation of in vivo assay of nitrate reductase activity in wheat leaves. Plant Science Letters 25: 9-14, (1982).
70. J. Stockit, M. H. Zenk, M. Rueffer and G. A. Hoyer; Indirect indentificatification of 4,21-dehydrocorynanthiene aldehyde as an intermediate in the biosynthesis of ajmalicine and related alkaloids, Planta Medica 33: 188-192, (1978).
71. Stockigt, M. H. Zenk, H. P. Husson and Kan-Fan; Cathenamine a central intermediate in the cell free. Biosynthesis of ajmalicine and related indole alkaloids. J. C. S. Chem. Common 164-166, (1977).
72. C. A. Strewoli, P. R. Averell Ed. Analytical chemistry of -nitrogen and its compounds, Part I., Wiley Interscience, N. Y. 28: 55, (1970).
73. Stryer, Biochemistry, Freeman Inc., 2 Edit., U.S.A., (1981)
74. P. K. Stumpf and E. E. Conn; The biochemistry of plants, - Vol. 5, Academic Press, U. S. A., 1980.
75. Sultanov, M. Aktual; Probl. K. Farmakol, Frame Uses, Nauch Knof, 154-168, (1971).
76. Svoboda, G. H.; Lloydia 24: 173, (1961).
77. Svoboda, G. H., Johnson, Gorman and Neuss; Current status - of research on the alkaloid of Vinca rosea, Linn (C. roseus G. Don.). J. of Pharmaceutical Science 51, 8: 707-729, 1962
78. Emelia E. Timpo and Carlos A. Neyra.; Expression of nitrate and nitrite reductase activities under varios form of nitrogen nutrition in Phaseola vulgaris Plant Physiol 72:71-75, (1983).

79. Tomlinson, J. D., and Turner, J. F.; Pyruvate kinase of higher plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 329: 128-139, (1973).
80. Tsai, M. Y., Gonzalez, F, and Kemp, R. G.; Physiological significance of phosphofructo kinase isozymes. In: *Isozymes. II Physiological function* (C. L. Market, ed) Academic Press, N. Y., 819-835, (1975).
81. Tsung Min Kuo, Robert Warner, Andres Klien Hofs; *In vitro* - stability of nitrate reductase from barley leaves. *Phytochem* 21, 3: 531-533, (1982).
82. M. Udayakumar, R. Devendra, V. Sreemivasa Reddy and K. S. - Krishna Sastry; Nitrate availability under low irradiance - and its effect on nitrate reductase activity. *New Phytol.* - 88: 289-297, (1981).
83. Vega José, Cardenas y Lozada; Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods in enzymology* vol 69. cap. 23, 255-270, 1982.
84. Vijajraghavan, S. J., Sopory, S. K., and Gaha-Mukherjee S; Ammonium stimulation of nitrate reductase induction in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Z. Pflanzen Physiol.* 93: 395-402, (1979).
85. Waizel Bucay Jorge; Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de 3 especies de plantas con propiedades anticancerígenos. Tesis 1979.
86. Waller George R. and Otis C. Dermer. Cap. 12; Enzymology of alkaloid metabolism in plants and microorganism, In: *The biochemistry of plants*, Vol. 7, P. K. Stumpf and E. E. Conn, Academic Press, 370-381, 1980.

87. Wray L. John and Philip Filner; Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochem. J.*, 119: 715-725, (1970).
88. Young, M.; Studies on the growth in culture of plant cells. *J. Exp. Bot.* 24, 83: 1172-1185, (1973)
89. Zenk H., et al; Enzyme synthesis of corynanthe type alkaloids in cell cultures of *C. roseus*. Quantification by radioimmunoassay. *Phytochem.* 17: 227-231, (1978).
90. Zielke, H., and P. Filner; Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultures tobacco cells. *J. Bio. Chem.* 246, 6: 1772-1779, (1971).
91. Zink, M. V.; Regulation of nitrate reductase by various nitrogen sources in cultured *Laurea sp.* *Can. J. Bot.* 60, 4: 386-396, (1982).
92. Zink, M., and I. Veliky; Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductase in cultured *Laurea sp* cells. *Can. J. Bot.* 55: 1557-1568, (1977).