



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS DE PROFESIONAL
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

03062
2ej.
10
RECEIVED
MAY 10 1968

CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE FIJACION
DE NITROGENO

**EL CATABOLISMO DE UREIDOS COMO REGU-
LADOR DE LA FOTORRESPIRACION EN
PLANTAS NODULADAS DE *Phaseolus vulgaris***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

QUE PRESENTA:

HELENA PORTA DUCOING

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

1968.



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 está 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

INTRODUCCION

1. Los ureidos.....	1
1.1. Sintesis de ureidos en nódulos.....	2
1.2. Catabolismo de ureidos.....	5
1.3. Papel de los ureidos en la economía de carbono del nódulo.....	9
2. La fotorrespiración.....	11
2.1. Importancia de la fotorrespiración.....	13
2.2. Reacciones metabólicas de la fotorrespiración.....	14
2.3. Ensayos usados para medir fotorrespiración.....	19
3. Objetivo de este trabajo.....	22
4. Role of ureides catabolism on photorespiration rates in <u>Phaseolus vulgaris</u> L.....	23
5. Discusión.....	37

BIBLIOGRAFIA

Los ureidos son compuestos nitrogenados sintetizados por los nodulos de las leguminosas tropicales con el objeto de transportar nitrógeno hasta el resto de la planta. Su principal característica es que le ahorran carbono a la planta durante el transporte de nitrógeno.

Los resultados de este trabajo están encaminados a conocer si los ureidos, principalmente su catabolismo, permiten a la planta "ahorrar" más carbono a través de disminuir fotorrespiración.

La tesis consta de una descripción teórica, una copia del material enviado para su publicación en la revista Plant Physiology, en el cual se incluyen las secciones de Materiales y Métodos, Resultados y parte de la Discusión, la misma que se amplía en la sección correspondiente.

EL CATABOLISMO DE UREIDOS COMO REGULADOR DE LA
FOTORESPIRACION EN PLANTAS NODULADAS DE Phaseolus vulgaris

1. LOS UREIDOS

Los ureidos son compuestos orgánicos nitrogenados que contienen uno o más grupos ureido ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-}$). En los sistemas biológicos los más importantes son los ureidos del ácido glioxílico: alantoína y ácido alantoico. Ambos son constituyentes comunes de las plantas y se han descrito en 21 familias de plantas superiores: Aceraceae, Boraginaceae, Hippocastanaceae y Plantanaceae (Atkins, 1982).

La alantoína y el ácido alantoico, se encuentran en las semillas, en las plántulas y en el xilema de varias especies de leguminosas, ejem.: Albicia lephant, Arachis hypogea, Cajanus cajan, Glycine max, Phaseolus vulgaris, Vigna angularis, en donde son los compuestos nitrogenados más abundantes. Otras leguminosas como Lathyrus cicera, Lupinus albus, Pisum sativum, Trifolium repens, y Vicia faba, sintetizan principalmente o totalmente las amidas asparagina y glutamina como transportadores de nitrógeno (Atkins 1982).

Elevadas concentraciones de ureidos en xilema están asociadas generalmente a una nodulación efectiva y una tasa alta de fijación de nitrógeno (Atkins, 1982).

En plantas no noduladas de Phaseolus el porcentaje de

contribucion de ureidos al nitrógeno total del xilema, varia entre 13 y 12%, dependiendo de la fuente de nitrógeno orgánico con que se alimenta a la planta, esto es, menor contenido si es nitrato, mayor si es amonio. En plantas noduladas de soya, el 56% del nitrógeno total de xilema, son ureidos. Sin embargo, en presencia de 20 mM de KNO_3 , el contenido de ureidos disminuye hasta el 6% (Thomas y Schrader, 1981).



Fig. 1. Estructura molecular de los ureidos.

1.1. SINTESIS DE UREIDOS EN NODULOS

En los nodulos de soya y de frijol, la síntesis de ureidos se lleva a cabo a través de una síntesis de 9- α de purinas y su subsecuente oxidación a alantoina y ácido alantoico (Reynolds et al., 1982).

Las enzimas involucradas en este proceso, pueden ser catalogadas en cuatro grupos:

1. Las enzimas que asimilan amonio: Glutamina sintetasa (GS), 2-oxoglutarato amino transferasa (GOGAT) y Aspartato amino

transferasa (AAT).

2. Fosforibosil amino transferasa (PRAT), que es la primera enzima de la biosíntesis de purinas (fig. 2).

3. Enzimas involucradas en el abastecimiento de glicina y de C-1 a la síntesis de purinas: ácido fosfoglicérico deshidrogenasa (PGADH), Serina hidroximetilasa (SHM) y Metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa (MeFH₂DH) (fig. 2).

4. Enzimas de la oxidación de purinas: Xantino deshidrogenasa y uricosa (fig. 3).

La PRAT, utiliza la glutamina producida en el ciclo GS/GOGAT y dirige el flujo de amonio hacia la síntesis de purinas. Esta enzima se incrementa notablemente en las primeras fases de la nodulación y se cree que podría actuar como una enzima reguladora.

El primer grupo de enzimas es responsable de la asimilación inicial de amonio, incorporándolo en glutamina y aspartato. En tuya la actividad específica de estas enzimas, se incrementa conforme avanza el proceso de nodulación (Reynolds *et al.*, 1982).

El tercer grupo de enzimas, también está relacionado con la síntesis de purinas. No son inducidas como la PRAT, pues existen niveles de actividad enzimática previos.

Las enzimas del cuarto grupo, son las últimas de la vía pero son las más fuertemente inducidas de las enzimas involucradas en la síntesis de las purinas.

La concentración de ácido alantoico en la fracción vegetal del nódulo y en el xilema, se incrementa una vez establecida la

actividad de las enzimas de la síntesis de purinas.

Una vez que los ureidos son sintetizados por el nódulo, pasan al xilema para ser distribuidos al resto de la planta, en donde serán usados para la síntesis de proteínas (Atkins, 1982).

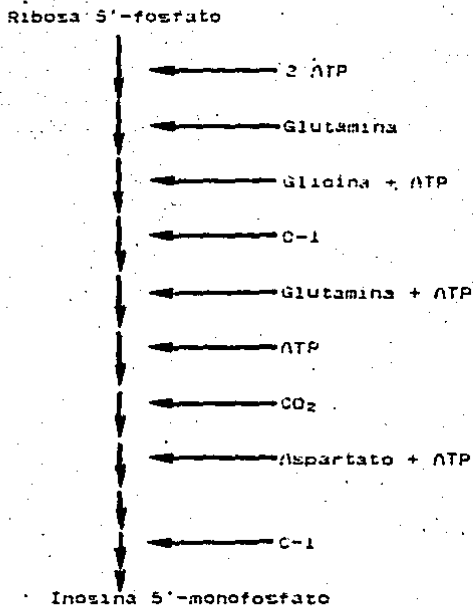


Fig. 2 Biosíntesis de Inosina 5'-monofosfato. (Tomada de Lea y Mifflin, 1980).

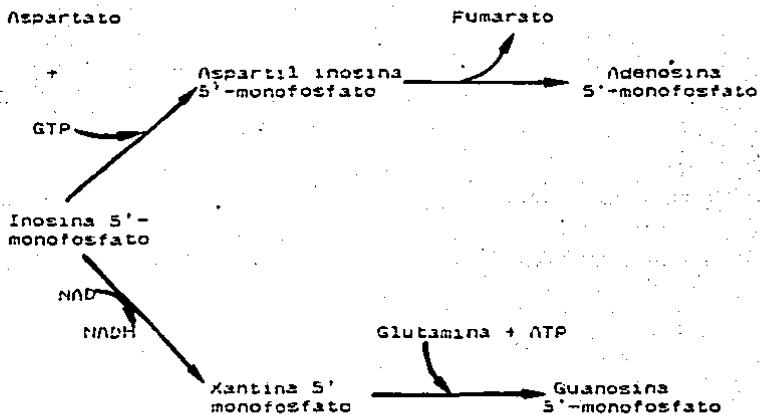


Figura 3. Conversión de inosina 5'-monofosfato a derivados de adenosina y guanosina. (Tomada de Lea y Mifflin, 1980).

1.2. CATABOLISMO DE UREIDOS

La alantoinasa (fig. 5, reacción 1), es la enzima que cataliza la hidrólisis de alantoina a alantoato. Se localiza abundantemente en nódulos, tallos, hojas y frutos de soya. Se ha reportado, que esta enzima es específica para D-alantoina, mostrando solamente un 10% de su eficiencia al degradar L-alantoina.

Para los siguientes pasos de la degradación de ureidos, se han descrito dos vías. La primera involucra la hidrólisis del

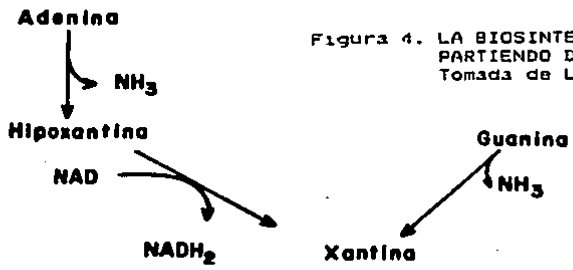
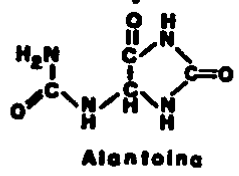
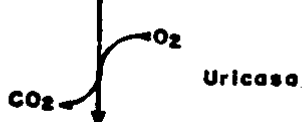
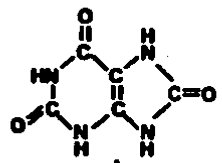
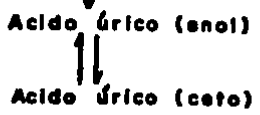
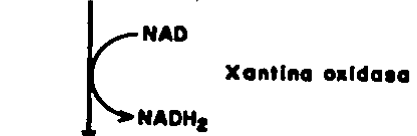
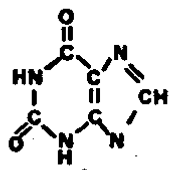


Figura 4. LA BIOSINTESIS DE ALANTOINA PARTIENDO DE PURINAS. Tomada de Lea y Miflin, 1980.



alantoato a 2 NH_3 , CO_2 y ureido glicolato por la enzima Alantoato amido hidrolasa (ALAH) (fig. 5, reacción 2). Como intermediario

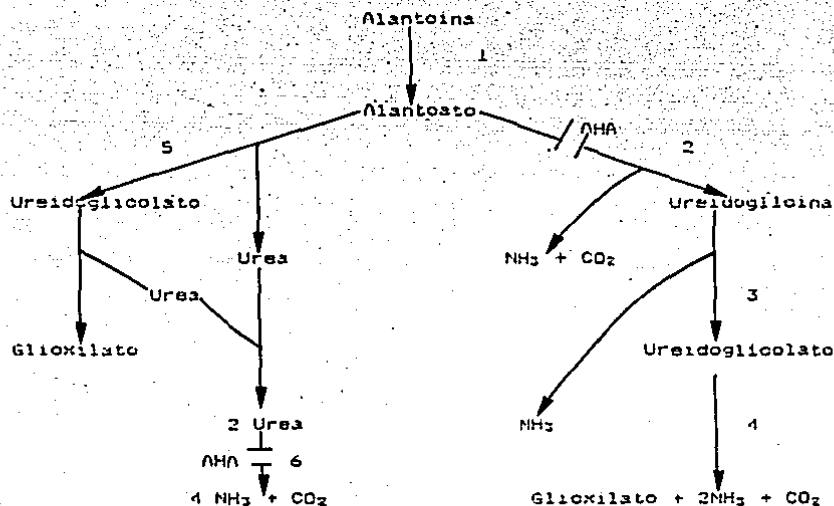


Fig. 5. Posibles vías catabólicas de la asimilación de alantoína.

1) Alantoínasa, 2) Alantoato amidohidrolasa, 3) Ureidoglicina amidohidrolasa, 4) Ureidoglicolato amidohidrolasa, 5) Alantoicasa y 6) Ureasa. Las flechas interrumpidas indican los sitios de inhibición con Acetohidroxamato (AHA). Tomada de Shelp e Ireland, 1987 y Winkler *et al.*, 1987.

de esta vía se ha propuesto a la ureido glicina.

La segunda posible vía para la hidrólisis del alantoato es encabezada por la Alantoato amidino hidrolasa o alantoicasa (fig. 5, reacción 5), sus productos son urea y ureido glicolato. Esta

enzima ha sido detectada en soya (Thomas y Schrader, 1981). La subsecuente degradación de uraído glicina o en su defecto, uraído glicolato, se muestran en la figura 5.

Hasta la fecha no se ha comprobado, conclusivamente, cual es la vía predominante para la degradación de ureidos, puesto que se han reportado resultados de experimentos que apoyan tanto a una como a la otra vía, los cuales se describen a continuación.

Atkins y colaboradores (1982), han demostrado que la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ de tejidos de *Vigna* sp. alimentados con $[2^{14}\text{C}]$ alantoína, involucra la hidrólisis de enlaces uraído-carbonilo de la alantoína. En este mismo reporte, se indica que niveles muy bajos de $[^{14}\text{C}]$ urea fueron detectados. En este caso, no se discrimina la acción ni de ALAH ni de alantoicasa.

Sheip e Ireland (1985), reportan que usando el inhibidor y quelante de ureasa, acetohidroxamato (AHA), se inhibe la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ de $[2^{14}\text{C}]$ alantoína en discos de hojas de soya, además de encontrar urea acumulada. Ellos concluyen que el metabolismo de alantoína libera dos moléculas de urea vía Alantoato amido hidrolasa y Uraído glicolasa.

Polsoco et al. (1982), reportan que cultivos de células de soya en suspensión, depletados de níquel y por lo tanto sin actividad de ureasa, pueden crecer con alantoína y no con urea. Esto sugiere que la alantoína puede ser degradada sin acción de la ureasa. Usando fenilfosfodiamidato, el más potente inhibidor de ureasa, en semillas de soya en desarrollo, Winkler et al. (1987), observaron que la liberación de amonio y de dióxido de

carbono provenientes de alantoína no se afecta. Adicionalmente, los niveles de urea detectados representan menos del 8% del CO_2 producido en presencia de dicho inhibidor. La presencia de urea, se explica, dicen, debido a una degradación no enzimática de ureido glicolato y/o ureido glicina. De esta manera, este grupo elimina la acción de alantoicasa como la primera enzima de la ruta catabólica de ureidos, favoreciendo la degradación de alantoato directamente a NH_3 y CO_2 sin la producción de urea.

Kleczkowski et al. (1987), encontró que ANH no solo es inhibidor de ureasa, sino que también inhibe fuertemente a la ALAN. Así pues, cualquiera que sea la vía de degradación de ureidos, la aparición de NH_3 y CO_2 puede inhibirse usando ANH.

No se conoce la localización intracelular de esta vía catabólica, pero ya que la asimilación del amonio liberado del rompimiento de las amidas transportadas a la hojas, ocurre en los cloroplastos por la vía GS/GOGAT, la vía de degradación de ureidos podría también suceder en los cloroplastos (Atkins, 1982).

La utilización de ureidos implica una pérdida de energía considerable, puesto que las diez moléculas de amonio que resultan de su degradación provienen de la glicina y del aspartato usados en la síntesis de purinas. Además, cada uno de los dos CO_2 liberados, vienen de un C-1 activado mediante el uso de energía fotosintética (Lea y Mifflin, 1982).

1.3. PAPEL DE LOS UREIDOS EN LA ECONOMÍA DE CARBONO DEL

MODULO.

Las amidas glutamina y asparagina son los compuestos transportadores de nitrógeno más ampliamente encontrados en el xilema de un gran número de plantas. Se ha sugerido que una de las razones por las que predominan estos compuestos es su baja proporción de carbono a nitrógeno (C:N 2:1), lo que implica una economía de carbono en su translocación de la raíz a la parte aérea de la planta. Las plantas que transportan nitrógeno en forma de ureidos economizan aún más carbono ya que la proporción C:N es de 1:1. Se ha demostrado que las plantas que transportan ureidos son más eficientes en cuanto al uso de carbono se refiere. Sin embargo esta eficiencia no solo se debe al uso de ureidos sino a una mejor conservación del carbono, ya que presentan una gran actividad de Fosfoenol piruvato carboxilasa y un desprendimiento menor de hidrógeno en comparación a las leguminosas que transportan amidas. Si se expresa el costo energético requerido para la síntesis de amidas resultan 15.5 ATP/molécula de nitrógeno, mientras que la síntesis de ureidos utiliza 8.5 ATP/ molécula de nitrógeno. El transporte de ureidos también requiere menos energía, que el transporte de amidas (Atkins, 1982 y Thomas y Schrader, 1981).

2. LA FOTORRESPIRACION.

La fotorrespiración es la toma de oxígeno y la formación de dióxido de carbono dependientes de la luz. La fotorrespiración no es un fenómeno fotoquímico. Se le llama fotorrespiración porque ocurre en la luz. (Tolbert, 1980).

El intercambio gaseoso y la pérdida de energía de la fotorrespiración ocurren simultáneamente a la fotosíntesis, de tal manera que la fotosíntesis neta es la diferencia entre la proporción total de CO_2 fijada menos la proporción de CO_2 resultante de la fotorrespiración, menos la respiración mitocondrial (Tolbert, 1980).

La fotorrespiración involucra a los cloroplastos, a los peroxisomas, a las mitocondrias y al citoplasma, mientras que la fotosíntesis solo se efectúa en los cloroplastos.

La magnitud de la fotorrespiración medida como un intercambio gaseoso, varía entre plantas diferentes desde valores bajos en plantas C_4 hasta valores altos de entre 25 y 50 % del

1.
Los cloroplastos de las plantas C_4 se encuentran distribuidos en dos tipos celulares diferentes y tienen funciones metabólicas diferentes. Uno de ellos, las células de la vaina, se encuentra generalmente arregladas en dos capas concéntricas alrededor del haz vascular. En estas células se localiza el Ciclo de Calvin. El otro tipo celular son las células del mesófilo y se encuentran rodeando a las células de la vaina. Aquí ocurre la asimilación primaria de CO_2 con fosfoenol piruvato como aceptor de CO_2 y como principales productos aspartato y malato, esqueletos de cuatro carbonos. Estos productos son transportados a las células de la vaina, son descarboxilados y el CO_2 es descubierto y es finalmente fijado a través del Ciclo de Calvin. De esta manera, las plantas C_4 poseen un mecanismo por medio del cual se provee más eficientemente de carbono al Ciclo de Calvin (Salisbury y

valor de la fotosíntesis en plantas C_3 ? (Tolbert, 1980).

El flujo de carbono e indirectamente el de nitrógeno que circula a través de la vía C_3 es determinado por las propiedades cinéticas de la enzima Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) que puede usar tanto CO_2 como O_2 como sustrato (fig.1), desviando el carbono hacia el Ciclo de Calvin o hacia la vía de fotorrespiración. La proporción de carbono encaminado hacia cada una de las vías depende de la relación de O_2 a CO_2 presente en el interior de los espacios intercelulares de la hoja. Si la planta crece rodeada de una concentración elevada de CO_2 ($>0.2\%$),³ el flujo de carbono hacia fotorrespiración se reduce. Alta temperatura incrementa la solubilidad de O_2 y de CO_2

Ross, 1978; Bonner y Vanner, 1976).

2.

En las plantas C_3 , los cloroplastos de las células de la vaina y los de las del mesófilo, no están especializados. El CO_2 se fija a través del Ciclo de Calvin y el primer producto tiene un esqueleto de tres carbonos: el ácido 3-fosfoglicérico. Las plantas C_3 tienen una gran cantidad de RUBISCO para poder utilizar al máximo el CO_2 disponible (Salisbury y Ross, 1978; Bonner y Vanner, 1976).

3. La concentración de CO_2 normal del aire es de 0.033%.

favoreciéndose la reacción oxigenasa. Un valor alto de pH disminuye la concentración de CO₂ libre y favorece la reacción oxigenasa. Así pues, alta temperatura y alto pH incrementan la fotorrespiración (Tolbert 1980).

Cuando se inhibe la fotorrespiración cualquiera que sea el método empleado, la planta no puede vivir porque el Ciclo de Calvin se depleta de carbono y consecuentemente disminuye la fotosíntesis (Martín *et al.*, 1983).

La fotorrespiración es totalmente dependiente de fotosíntesis debido al abastecimiento de carbono, consiguientemente depende la intensidad luminosa. Alta intensidad luminosa aumenta el poder de asimilación fotosintético, disminuyendo el CO₂ disponible y aumentando la fotorrespiración (Tolbert, 1980).

2.1. IMPORTANCIA DE LA FOTORRESPIRACION.

Un gran número de factores regulan la actividad fotosintética, sin embargo cuando varios de estos como el agua, la temperatura, los nutrientes y la luz son óptimos, la fotosíntesis aún está limitada por la baja concentración de CO₂ y alto contenido de O₂ del aire (21%). Si se incrementa el contenido de CO₂ o se disminuye el de O₂ del aire, puede incrementarse la cantidad de CO₂ fijado por la fotosíntesis (Tolbert, 1980).

En el campo, al mediodía, la cantidad de irradiación que reciben las hojas de la parte superior de la planta puede ser

superior a la necesaria para fijar CO_2 . Al ser limitante el contenido de CO_2 en el interior de la hoja, el aparato fotosintético es protegido por la fotorrespiración de una intensidad luminosa alta y de un contenido alto de oxígeno. Ya que durante la fotorrespiración se consume energía fotosintética, su principal función parece ser proteger al aparato fotosintético. También, es un mecanismo que protege de una intoxicación con oxígeno (Tolbert, 1980).

2.2. REACCIONES METABOLICAS DE LA FOTORRESPIRACION.

Como resultado de la oxigenación de ribulosa- P_2 se producen una molécula de fosfogliceraldehido y una de 2-fosfoglicolato (fig. 6 reacción 1). El aislamiento de una mutante de Arabidopsis carente de la enzima P-glicolato fosfatasa (reacción 2), aseguró que fosfoglicolato es el precursor del glioxilato y del CO_2 resultante de la fotorrespiración (Somerville y Ogren, 1982). El fosfoglicolato es hidrolizado por dicha fosfatasa cloroplástica específica y el glicolato es transportado al citoplasma. El glicolato llega a peroxisomas en donde es irreversiblemente metabolizado por glicolato oxidasa (reacción 3), resultando glioxilato y H_2O_2 que forma un complejo con catalasa (reacción 4) y otra molécula de H_2O_2 para dar dos moléculas de agua y una de oxígeno..

El glioxilato se convierte a glicina principalmente a través de serina glioxilato aminotransferasa (reacción 5), que facilita un flujo acoplado de carbono de ida en forma de

glioxilato a glicina y de regreso, de serina a hidroxipiruvato y después a glicerato. Existe una mutante de Arabidopsis carente de esta enzima, la cual se muere en condiciones atmosféricas normales (Somerville y Ogren, 1982).

Dado que la formación de una serina requiere de dos glioxilatos, la glutamato glioxilato aminotransferasa (reacción 6), es necesaria en peroxisomas. El glutamato sirve como el grupo amino receptor y donador del amonio formado en la conversión de dos glicinas a una serina en la mitocondria. De tal forma que hay dos donadores para dos reacciones de transferencia de amonio para formar dos moléculas de glicina.

La glicina oxidasa (reacción 7), de la mitocondria descarboxila la glicina formando CO_2 , NH_3 y C-1[THF], (metal tetrahidro folato). La oxidación de la glicina está ligada a la reducción de NAD. En mitocondrias aisladas, el NADH formado puede ser usado para la síntesis de ATP. También de esta enzima hay una mutante en Arabidopsis probando su necesidad para descarboxilar a la glicina de la fotorrespiración.

La reducción de C-1[THF], requiere de NADH, así pues se compensa la energía entre la descarboxilación de glicina y la formación del C-1[THFA].

El amonio que se libera de la descarboxilación oxidativa de glicina, excede entre 8 y 10 veces a la cantidad de NH_3 resultante de la reducción primaria de NO_3 (Miflin y Lea, 1982). Como el amonio es desacoplante del transporte de electrones en el cloroplasto, debe ser inmediatamente refijado en glutamato y

glutamina. Con el aislamiento de mutantes deficientes en GOGAT (2-oxoglutarato amino transferasa), dependiente de ferredoxina (*Arabidopsis* y *Hordeum*) (Somerville y Ogren 1982; Kendall *et al.*, 1986) y de una mutante deficiente en la isoenzima cloroplástica Glutamina sintetasa (GS), (reacción 10), en *Hordeum* (Wallsgrove *et al.* 1987), se demostró que el amonio liberado de la descarboxilación de glicina es res asimilado en cloroplasto por el ciclo GS/GOGAT (reacciones 8 y 9). El funcionamiento de este ciclo requiere de la energía proveniente de fotosíntesis.

La serina formada durante fotorrespiración se convierte a hidroxipiruvato mediante la serina glioxilato aminotransferasa (reacción 5) usando el glioxilato de fotorrespiración. Este paso enzimático es irreversible.

La conversión reversible de OH-piruvato a glicerato es catalizada por la glicerato deshidrogenasa ligada a NAD (reacción 10). Durante fotorrespiración la enzima funciona como una NADH-hidroxipiruvato reductasa (reacción 11), que requiere de una fuente de NADH y se cree que para ese propósito, el peroxisoma contiene una NAD-malato deshidrogenasa (reacción 11). Se ha propuesto que el malato entra al peroxisoma y es oxidado a oxalacetato para la reducción de NAD y el NADH sirve para la reducción de hidroxipiruvato. Este ir y venir de hidrógeno resulta en una pérdida de energía. La regeneración de malato podría suceder en cloroplasto o citoplasma, catalizada por NAD(P)-malato deshidrogenasa (reacción 12).

La reducción de hidroxipiruvato a glicerato y la

fosforilación de glicerato con ATP, es la mitad de la energía perdida durante la hidrólisis de P-glicolato y su posterior oxidación a glicolato, por eso se requieren dos moléculas de P-glicolato por la formación de serina y la síntesis de P-glicerato. La pérdida de energía en esta parte de la vía no puede ser medida como pérdida de CO_2 sin embargo si se debe considerar en el balance energético total de la fotorrespiración.

Para entrar al Ciclo de Calvin, el glicerato debe ser fosforilado a glicerato 3-P, probablemente por una cinasa (reacción 14) que no ha podido ser identificada. El 3-Pglicerato puede ser usado para regenerar ribulosa- P_2 . Para éste proceso se requiere más energía proveniente de fotosíntesis, la cual puede ser otra vez desperdiciada si esta ribulosa- P_2 entra a fotorrespiración. Así pues, la fotosíntesis es parte esencial de la fotorrespiración que a su vez consume el exceso de energía que no es usado para la fijación de carbono.

Una vía alterna para la síntesis de serina sucede a través de P-glicerato y puede funcionar en la luz y en la oscuridad. Es una vía anaeróbica reversible, en donde la mayor parte de la energía se conserva como NADH y no hay pérdida de CO_2 . Si comúnmente se usara esta vía la planta presentaría un crecimiento neto mayor, lo cual se comprueba cuando las plantas crecen en atmósferas con bajo O_2 . La presencia de esta vía demuestra que la fotorrespiración no es esencial para la síntesis de glicina, serina y C-1[THF], pero no funciona simultáneamente a la fotosíntesis.

En resumen, hay seis reacciones irreversibles involucradas en el metabolismo del glicolato formado por la RUBISCO: P-glicolato fosfatasa, glicolato oxidasa, catalasa, dos glioxilato aminotransferasas y glicina oxidasa. Se pierde energía en las cuatro primeras reacciones.

En cuanto a intercambio de O_2 se requiere, una mol de O_2 en la oxidación de ribulosa y otra media mol durante la oxidación de glicolato. No se sabe cuanto más oxígeno se toma para la oxidación de glicina en la mitocondria. Pero si el NADH formado durante la oxidación de glicina formara ATP se usaría media mol más de oxígeno. Por cada dos glicinas que se convierten a serina se requieren tres y media moles más de O_2 .

Durante la conversión de serina a P-glicerato y luego a ribulosa- P_2 se consumen equivalentes de reducción, lo que ocasiona desprendimiento de O_2 sin toma de CO_2 .

La mayor pérdida de CO_2 durante la fotorrespiración, proviene de la oxidación de glicina.

Parte del CO_2 desprendido durante fotorrespiración puede ser refijado fotosintéticamente. Así pues tanto el oxígeno como el dióxido de carbono son reciclados dentro de las células de la hoja durante fotorrespiración.

El NADH producido durante la oxidación de la glicina podría ser usado indirectamente para refijar NH_3 , lo más seguro es que se consuma poder fotosintético. Durante fotorrespiración no hay conservación de la energía como ATP o NADH.

2.3. ENSAYOS USADOS PARA MEDIR FOTORRESPIRACION.

i. La aparición explosiva de CO_2 (post-illumination CO_2 outburst), dependiente de la intensidad luminosa. Este ensayo tiene varias desventajas: 1) la intensidad de CO_2 desprendido decrece con el tiempo; 2) si se incrementa la resistencia a la difusión de gases a través de los estomas durante medición, se subestimara el valor de la fotorrespiración y 3) es un ensayo poco sensible (Zelitch, 1979).

ii. Inhibición neta de la asimilación de CO_2 por oxígeno. El desprendimiento fotorrespiratorio de CO_2 depende de la concentración de oxígeno. Así pues una caída de la fotosíntesis neta por un incremento en la concentración de O_2 está directamente relacionada a la fotorrespiración. La fotosíntesis neta a altas concentraciones de O_2 en plantas C_3 muestra una disminución. En contraste, las plantas C_4 no muestran cambio. Este ensayo subestima los valores de fotorrespiración (Zelitch, 1979).

iii. Aparición de CO_2 y $^{14}\text{CO}_2$ en aire libre de CO_2 . Cuando se expone una hoja a la luz y a un flujo rápido de aire libre de CO_2 , el CO_2 que se libera es una medida de la fotorrespiración. Esta depende de la resistencia que presentan los cloroplastos y estomas a la difusión de CO_2 . Este método subestima los valores reales de fotorrespiración aún con los estomas abiertos totalmente. De cualquier forma es el método más ampliamente usado. La fotorrespiración de plantas C_3 medida de esta manera

es un 50% de la fotosíntesis neta. Una modificación al ensayo es incubar discos de hojas con $^{14}\text{CO}_2$ en un sistema cerrado, se permite que se reciclen los productos marcados con ^{14}C y luego se mide el $^{14}\text{CO}_2$ liberado en un flujo de aire libre de CO_2 . Este método permite medir más eficientemente los valores de fotorrespiración (Zelitch, 1979).

iv. Consumo de $^{14}\text{CO}_2$ y $^{12}\text{CO}_2$ medido en tiempos muy cortos. Si bajo condiciones de fotosíntesis en estado estacionario se supe a una hoja con $^{14}\text{CO}_2$, la toma inicial representa la fotosíntesis total y será mayor que la toma previa de $^{12}\text{CO}_2$ que representa a la fotosíntesis neta. La diferencia entre estos dos valores sería igual al dióxido de carbono que resulta de la fotorrespiración. Se debe medir en tiempos de 20 segundos. Es un método muy complicado en su manipulación y puede ocasionar varios errores (Zelitch, 1979).

v. Medición simultánea de la actividad de carboxilasa y oxigenasa de la RUBISCO: determinación de la relación v_c/v_o . Con este ensayo, se mide la relación entre la velocidad de carboxilación contra la velocidad de oxigenación de la enzima, la que será indicativa de los valores de fotorrespiración. Se utiliza un electrodo de oxígeno para medir el consumo de oxígeno. Simultáneamente en el vaso del electrodo hay $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ para la reacción carboxilasa, la cual está acoplada a anhidrasa carbónica que libera el $^{14}\text{CO}_2$. La actividad de carboxilasa se mide con el número de cuentas presentes en el residuo no volátil de la reacción (Boyle y Keys, 1957).

vi. Inhibición de GS con metionina sulfoximina (MS). Por cada molécula de CO_2 liberada durante fotorrespiración se libera una molécula de amonio, mismo que es asimilado por la GS cloroplástica. La acumulación de este amonio cuando la enzima está inhibida específicamente con MS representa una medida relativa del valor de fotorrespiración. Si bien el amonio que se acumula no proviene únicamente de fotorrespiración, si su mayor parte ya que excede entre ocho y diez veces al NH_3 proveniente de la asimilación primaria de nitrato. Usando una concentración no mayor de 2.5 mM de MS se evita el efecto negativo que este inhibidor tiene sobre fotosíntesis. Este ensayo dará un valor sobrestimado pero las diferencias medibles entre una planta C_3 es de 3 y 4 veces mayor que en una C_4 .

2. OBJETIVO DE ESTE TRABAJO.

En las plantas noduladas de frijol, se conjunta la síntesis de ureidos en nodulos, su transporte a través del xilema y su degradación en el tejido verde, coincidiendo, probablemente en este punto con la fotorespiración (fig. 6).

Como se mencionó anteriormente, el nivel de fotorespiración disminuye cuando se eleva la concentración de CO_2 . También se mencionó que del catabolismo de ureidos se desprende CO_2 .

Basado en las afirmaciones anteriores, en este trabajo se compara el nivel de fotorespiración que presentan plantas de frijol noduladas contra plantas de frijol no noduladas, con el objeto de determinar si el CO_2 desprendido de la degradación de ureidos disminuye el nivel de fotorespiración.

ROLE OF UREIDES CATABOLISM ON PHOTORESPIRATION RATES IN Phaseolus
vulgaris L.¹

Manuscript received date:

Manuscript revised date:

Authors:

Helena Porta and Miguel Lara

Departamento de Biología Molecular de Plantas

Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM

Apartado postal 565-A, Cuernavaca, Mor., México.

ABSTRACT

Nodulated and nonnodulated plants of Phaseolus vulgaris were used to study the role of ureide catabolism on photorespiration rates. The ureide content in the xylem and in the first trifoliate leaves was around 90-fold higher in the nodulated than in the nonnodulated plants.

The ammonium content when glutamine synthetase (GS) was inhibited with methionine sulfoximine (MSO) was referred as the relative rates of photorespiration. The ammonium pools were also measured when ureide catabolism was inhibited with acetohydroxamate (AHA). The ammonium concentration found in the control leaves was 50% lower in the nodulated than in the nonnodulated plants.

When MSO was used ammonium content increased around 100% in both kinds of leaves.

AHA promotes an increase of 275% in ammonium levels in the leaves of nodulated plants and almost had no effect on the leaves of nonnodulated plants, suggesting that the inhibition of ureide catabolism promotes an increase of the photorespiration rates. These results support the hypothesis that ureide catabolism contribute to maintain low levels of photorespiration in nodulated Phaseolus vulgaris plants.

INTRODUCTION

In Phaseolus vulgaris as in other tropical legumes, ureides, allantoate and allantoin are the main nitrogen compounds transported from the nodule to the shoot during the symbiosis with Rhizobium phaseoli. Lower levels of ureides occur when similar plants are provided with nitrate or ammonium, in this condition the amides glutamine and asparagine are the main nitrogen compounds transported (1). In legumes, two pathways have been described concerning ureide catabolism (Fig. 1). In both cases the end products are glyoxalate, ammonium and CO_2 (10, 15). Some data suggest this metabolic pathway is light dependent and could be located in the chloroplast (1). On the other hand, it is well known that photorespiration is a consequence of the bifunctionality of ribulose-biphosphate carboxylase/oxygenase activity and can be diminished when the CO_2/O_2 ratio is increased (12). During photorespiration, CO_2 and NH_3 are produced in mitochondria, and the rate of ammonia recycling is 8-10 fold higher than the rate of nitrate assimilation into aminoacids (9). This ammonia is reassimilated in the chloroplast by GS (11). When this enzyme is inhibited by MSO, NH_3 accumulation can be used as a measure of the relative rates of photorespiration (7). We report here evidence which indicates that ureide catabolism can regulate photorespiration in Phaseolus vulgaris plants.

MATERIALS AND METHODS.

Plant material. Nodulated and nonnodulated plants of common bean *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa were grown hydroponically in a greenhouse under conditions previously described (5).

Nodulated plants were previously inoculated with Rhizobium phaseoli strain CIAT 899 (4). Pots were watered every other day with nitrogen-free nutrient solution (3). The nonnodulated plants were treated similarly, except that nutrient solution contained 5 mM KNO_3 .

Xylem sap collection. After 25 days from sowing, plants were decapped with a razor blade just below the cotyledonary node and xylem sap were collected in plastic tubing. Sap collection was done in 10 to 15 plants between 10:00 and 11:00 AM during 20 min. The pooled sap was frozen and stored for later analysis.

Enzyme inhibition. After sap extraction, petioles of first trifoliate leaves from those plants used for sap collection were cut under water and placed during one hour in 5 ml flasks containing 2.5 mM MSO, 50 mM AHA or both. Water was used to control leaves. Leaves were transferred to a growth chamber (26°C, and 5200 luxes). After one hour petioles were washed with distilled water and immediately frozen at -20°C for later determination of enzymatic activities and ammonium pool content pool.

Determination of enzymes activities. Frozen leaves were crushed in a mortar and pestle in the presence of solid CO_2 . Two volumes of leaves extraction buffer (5) were added and then mixture twice

with a Politron during 30 seconds. The homogenate was filtered through 4 layers of muslin and centrifuged at 20000 g for 45 min. The supernatant were dialysed against the same buffer. GS activity was determined by the synthetase assay as described by Ferguson and Sims (4). Units of GS activity represent μmol of γ -glutamyl hydroxamate formed per minute at 30°C. Urease activity was measured with a coupled spectrophotometric assay using GDH, according to Kerr *et al.* (5). The allantoate-degrading activity was measured as described by Winkler *et al.* (16). Protein determination was made according to Bradford (2), with a BSA standard. Ureides were measured, directly from xylem sap and also from 75% (v/v) ethanolic leaves extraction as described by Trijbels and Vogels (11). Ammonium pool was measured using a GDH enzymatic assay as described by White (14).

RESULTS AND DISCUSSION

Our results show that the ureide content found in xylem sap and in the first trifoliolate leaves extracts was approximately 90 and 100-fold greater in nodulated than in nonnodulated plants (Table I). Thus, when Phaseolus vulgaris grows in symbiosis, the synthesis of ureides must be activated and the concentration of ureides in the xylem sap increases significantly. In contrast, when nonnodulated bean plants are supplied with nitrate, the concentration of ureides in the xylem sap is not elevated. As mentioned earlier ureide catabolism results in the production

of CO_2 . Considering that the ratio CO_2/O_2 regulates photorespiration, we decided to compare photorespiration rates in nodulated and nonnodulated plants, since there is a considerably difference in the ureide content of these two systems.

Table II shows the effect of MSO on GS and AHA on uricase and allantoin-degrading activity. GS activity was inhibited between 95-100% with 2.5 mM of MSO after one hour. Allantoin-degrading activity was inhibited between 80-100% and no urease activity was detected after one hour using 50 mM of AHA.

In the absence of inhibitors, the NH_3 concentration found in the leaves of nodulated plants was 50% the amount found in the leaves of nonnodulated plants. When GS was inhibited the NH_3 concentration increased a 100% in both kind of systems (table III). Lower amount of NH_3 found in nodulated plants suggests lower photorespiration rates compared to nonnodulated plants. When AHA was applied, the ammonium concentration in the leaves of the nodulated plants was increased 275% as compared with its control leaves. In contrast AHA almost did not affect the ammonium levels in the leaves of the nonnodulated plants. This results could be explained if it is considered that when AHA is present the CO_2/O_2 ratio diminishes because ureide degradation is blocked, and consequently a rise in photorespiration rate is noticed as an increase in the NH_3 content. Moreover, in the nonnodulated leaves, the CO_2/O_2 ratio must not be affected when AHA is present, because leaves contain low levels of ureides. When both inhibitors were used simultaneously, the NH_3

accumulated by the nodulated and the nonnodulated leaves was 196.37% and 45.75% respectively. This result also indicates that when ureide degradation is blocked photorespiration increases. Accordingly, nodulated plants which have been treated with MSO and AHA show ammonium levels which are similar to those found in nonnodulated plants, that is 95.55+-17.60 and 95.25+-13.90 respectively. These values are smaller than expected, but we do not have a clear explanation for it.

These results clearly suggest that the CO₂ released from ureide catabolism, could reduce photorespiration rates in leaves of nodulated plants. This phenomenon can be regarded as a mechanism which could improve CO₂ assimilation during symbiosis, since in this condition ureide biosynthesis increases. However, to confirm our results, evaluation of photosynthesis and photorespiration by other methods, needs to be done in plants which transport ureides or amidas.

Acknowledgments- We are grateful to M.S. Alicia Gonzalez, M.S. Jaime Padilla, M.S. Guadalupe Espin and Dr. Federico Sanchez for critical reading of the manuscript.

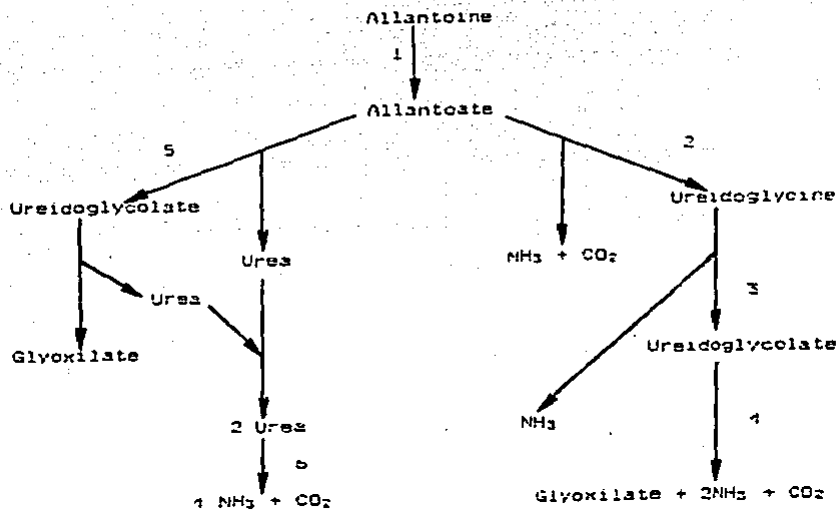


Fig. 1. Possible catabolic pathways of allantoin assimilation.
1) Allantoinase, 2) Allantoate amidohydrolase, 3) Ureidoglycine
amidohydrolase, 4) Ureidoglycolate amidohydrolase, 5) Allantoicase
and 6) Urease. Interrupted arrows indicates sites of acetohydroxamate
inhibition. Taken from Refs. 10 and 15.

Table I. Ureaides content of xylem sap and first trifoliolate leaves extract of nodulated and nonnodulated 25-days-old bean plants.

Ureaides	Fraction			
	Xylem sap		First trifoliolate leaves	
	mol ml ⁻¹		nmol mg ⁻¹ fr. wt.	
	nod	nonnod	nod	nonnod
Allantoins	1710.72	15.71	554.00	4.54
Allantoate	5417.28	62.84	942.20	10.38
Total	7128.00	78.55	1496.20	14.92

Table II. Inhibitory effect of 2.5 mM MSO and 50 mM AHA on GS, urease and allantoinase-degrading activities from excised first trifoliolate leaves of nodulated and nonnodulated 25-days-old bean plants.

ENZYME	Treatment	nodulated	nonnodulated
GS		Units mg p ⁻¹	
	Control	0.088	0.112
	2.5 mM MSO	n. d. ^b	0.005 (95.35) ^a
UREASE		µm NH ₃ mg p ⁻¹ min ⁻¹	
	Control	0.799	0.914
	50 mM AHA	n. d. ^b	n. d. ^b
ALLANTOATE-DEGRADING ACTIVITY		µm glyoxylate mg p ⁻¹ h ⁻¹	
	Control	0.113	0.043
	50 mM AHA	0.020	n. d. ^b
		(82.30) ^a	

a. Percentage of inhibition relative to controls

b. Non detected

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Table III. Effect of MSO and AHA on ammonium accumulation in the first trifoliolate leaves of nodulated and nonnodulated 25-days-old bean plants.

Values in parenthesis represents percent accumulation of ammonium relative to the control. Data represent the mean of 8-9 leaves made by triplicate \pm sd.

	Nodulated	Nonnodulated
	$\mu\text{mol NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ fr. wt.}$	
CONTROL	32.2 \pm 7.6	65.4 \pm 12.0
2.5mM MSO	72.6 \pm 22.0 (134.5)	130.1 \pm 14.2 (99.1)
50mM AHA	121.1 \pm 20.0 (275.8)	76.8 \pm 18.0 (17.5)
AHA and MSO	95.6 \pm 17.6 (196.4)	95.3 \pm 13.9 (45.8)

LITERATURE CITED

1. Atkins CA 1982 Ureide metabolism and the significance of ureides in legumes. In NS Subba Rao, ed, *Advances in Agricultural Microbiology*. Oxford & IBH, New Delhi, pp 53-88
2. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
3. Broughton WJ, MJ Dilworth 1971 Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125:1075-1080
4. Ferguson AR, AP Sims 1974 The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* 80:159-171.
5. Kerr PS, DG Blevins, BJ Rapp, DD Randall 1983 Soybean leaf urease: comparison with seed urease. *Physiol Plant* 57:339-345
6. Lara M, H Porta, J Padilla, J Folch, F Sanchez 1984 Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol* 76:1019-1023
7. Martin F, MJ Winspear, JD Mac Farland, A Oaks 1983 Effect of methionine sulfoximine on the accumulation of ammonia in C₃ and C₄ leaves. The relationship between NH₃ accumulation and photorespiration activity. *Plant Physiol* 71:177-181
8. Martinez E, MA Pardo, R Palacios, MA Cevallos 1985 Reiteration of nitrogen fixation genes sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. *J Gen Microbiol*. 131:1779-1786
9. Mifflin BJ, PJ Lea 1982 Ammonia assimilation and aminoacid

- metabolism. In Boulter D and B Parthier, eds, Encyclopedia of Plant Physiology Vol 14 A Spring Verlag, Berlin pp 3-64
10. Shelp JB, RJ Ireland 1985 Ureide metabolism an leaves of nitrogen fixing soybean plants. Plant Physiol. 77:779-783
11. Trijbel F, GD Vogels 1966 Degradation of allantoin by Pseudomonas acidovorans. Biochem Biophys Acta 112:292-301
12. Tolbert NE 1980 Photorespiration in Stumpf PK and EE Conn, eds, The Biochemistry of Plants, Vol 2 Academic Press, NY, pp 487-523
13. Wallsgrave RM, JC Turner, NP Hall, AC Kendall SWJ Bright (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase- biochemical and genetic analysis. Plant Physiol 83: 155-158
14. White C 1970 The determination of NH_3 with the use of glutamic dehydrogenase. Methods Enzymol 17:955
15. Winkler RG, DG Blevens, JC Polacco, DD Randall 1987 Ureide catabolism of soybeans. II Pathway of catabolism in intact leaf tissue. Plant Physiol 83:585-591
16. Winkler RG, JC Polacco, DG Blevins, DD Randall 1985 Enzymic degradation of allantoin in developing soybeans. Plant Physiol 79:787-793

3. DISCUSION

La elección de primer trifolio de plantas noduladas de 26 días de edad como modelo para estudiar la relación entre el catabolismo de ureidos y la fotorespiración, se hizo con base en las siguientes consideraciones:

1) Se analizó la concentración de ureidos presente en las hojas primarias, el primer trifolio y el segundo trifolio encontrando que la concentración de ureidos en las hojas embrionarias no presenta prácticamente variación entre plantas noduladas y no noduladas. El primer trifolio de plantas noduladas presenta la máxima concentración de ureidos, la cual es aproximadamente diez veces mayor a la hallada en el primer trifolio de plantas no noduladas. El segundo trifolio de plantas noduladas muestra la mitad de la concentración hallada en el primer trifolio, la cual es también aproximadamente diez veces mayor que la concentración encontrada en plantas no noduladas.

2) Ha sido descrito en leguminosas sintetizadoras de ureidos que la mayor degradación de ureidos se lleva a cabo en hojas maduras (Atkins et al., 1982).

3) La fijación de nitrógeno en frijol en raíces completas y noduladas, alcanza su nivel máximo en la tercera semana después de inoculadas las plantas (Padilla et al., 1987)

4) En soya y en frijol, los niveles máximos de ureidos exportados desde el nódulo es alcanzado a los 20 días (Atkins, et al., 1982).

Así pues, el primer trifolio de plantas de 24 días es el más adecuado para estudiar el efecto que el catabolismo de los ureidos pueda tener sobre la fotorrespiración.

Por otro lado, Hinkler y colaboradores (1987), son los primeros en indicar que la urea no se encuentra involucrada en el catabolismo primario de alantoína en plantas de soya, y que la acumulación de urea reportada por otros grupos, es de origen no enzimático o que alternativamente existe otra vía catabólica de alantoato en plantas. Cualquiera que sea la vía funcional de degradación de ureidos en frijol, la producción de CO_2 resultante es bloqueada con el uso de ANA ya que inhibe tanto a la alantoato amidohidrolasa como a la ureasa.

Se debe considerar que como resultado de esta misma inhibición, también se detiene la aparición de amonio, de tal manera que la fotorrespiración medida como la acumulación de amonio podría verse afectada. Sin embargo los resultados muestran que en presencia de los inhibidores, la cantidad de amonio acumulada fue mayor que la de los controles. Estos datos demuestran que la cantidad de amonio resultante de la degradación primaria de ureidos es menor que el amonio liberado durante la fotorrespiración.

En cuanto a lo que al método usado para medir fotorrespiración se refiere, si bien, no es el más adecuado, existen datos que apoyan su uso. Martín y colaboradores (1983), reportan que la acumulación de amonio cuando se inhibe la GS con MS es dependiente de luz y por lo tanto su origen es la

fotorrespiración. Además mediante el empleo de inhibidores de fotorrespiración, e.g. AOA, INH Y ALFA-HPMS⁴, simultaneamente con MS se observa la dependencia entre la acumulación de amonio y el funcionamiento de fotorrespiración, esto quiere decir que la cantidad de amonio acumulada disminuye en presencia de dichos inhibidores.

La degradación de ureidos en frijol no parece conceder ventajas a las plantas que los transportan en cuanto a fotorrespirar menos, ya que aparentemente no existen diferencias entre el punto de compensación⁶ de una leguminosa que transporta ureidos y una que transporta amidas (Krenzer et al., 1975).

4. AOA: amino-oxiacetato, inhibe a la glutamato glioxilato aminotransferasa. INH: hidrazida isonicotínica, inhibe a la glicina oxidasa. alfa-HPMS: ácido 2-piridil hidroximetano sulfónico, inhibe a la fosfoglicolato fosfatasa (Martin et al., 1983)

5. Punto de compensación de CO₂. Cuando una planta C₃ es colocada en una cámara cerrada e iluminada, el CO₂ disminuye hasta una concentración estable en donde la fotosíntesis neta es cero, a esta concentración de CO₂ se le llama el punto de compensación de CO₂. El punto de compensación no es un fenómeno estático sino dinámico en donde la fotosíntesis es igual a la fotorrespiración (Cauvin, 1979).

Puesto que una mayor actividad fotorrespiratoria depende de una alta intensidad luminosa (Tolbert, 1980), es de esperarse que la proporción de fotorrespiración sea mayor en leguminosas tropicales que en leguminosas templadas.

En vista de que un gran número de leguminosas tropicales transportan uridos, la degradación de los mismos puede verse como una estrategia para mantener niveles de fotorrespiración similares a los que presentan las leguminosas tropicales.

BIBLIOGRAFIA

Atkins CA 1982. Ureide metabolism and the significance of ureides in legumes. In NS Subba Rao, ed. Advances in Agricultural Microbiology. Oxford & IBH, New Delhi, pp 53-88.

Atkins CA, JS Pate, A Ritchie, MS Peoples 1982. Metabolism and translocation of allantoin in ureide-producing legumes. Plant Physiol 70:471-482.

Bovis FA, NJ Keys 1987. The state of activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in wheat leaves. Photosynthesis research 11:97-108.

Curvin DT (1979). Photorespiration. Comparison between C₃ and C₄. In Gibbs & Litzko eds. Encyclopedia of plant physiology Vol 6. Springer-Verlag Berlin pp 373.

Hatch MD 1976. Photosynthesis: the path of carbon. In Bonner J & Vanner JE eds. Plant Biochemistry. Academic Press, NY pp 799-815

Klesczkowski LA, KM Lukarewski, RG Winkler, DG Slevins, DD Randall 1987. Acetohydroxamate inhibition of leaf allantoinase, amidohydrolase and NADPH-glyoxylate reductase. Plant Physiol 84-46

Krenzer GE, DL Moss, RM Crockett 1975. Carbon dioxide compensation points of flowering plants. Plant Physiol 54:174-205.

Lea PJ, SJ Miflin 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In Stumpf PK & EE Conn, eds. The Biochemistry of Plants, vol 5 Academic press, NY pp 594-601.

Martin F, MJ Winespear, P MacFarlane, A Guke 1983. Effect of methionine sulfoximine on the accumulation of ammonia in C₃ and C₄ leaves. Plant Physiol 71:177-181.

Miflin SJ, PJ Lea 1977. Amino acid metabolism. Annu Rev Plant Physiol 28:299-329.

Padilla JE, F Campos, V Conde, M. Lara, F Sánchez 1987. Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*L.

Polacco JC, AL Thomas, PJ Slessoe 1982. A soybean urease-null produces urease in cell culture. Plant Physiol 69:1233-1240.

Reynolds PHS, MJ Soland, DG Slevins, KR Schubert, DD Randall

1982. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. *Plant Physiol* 69:1334-1338.

Salisbury FB, Ross CW 1975. Carbon dioxide fixation and carbohydrates synthesis. In Plant Physiol. Wadsworth PCI California pp 135-134.

Shelp JB, RJ Ireland 1985. Ureide metabolism in leaves of nitrogen fixing soybean plants. *Plant Physiol* 77:779-783.

Somerville CR, WL Ogran 1982. Genetic modification of photorespiration *TIBS* 7:171-174.

Thomas RJ, LE Schrader 1981. Ureide metabolism in higher plants. *Phytochem* 20:361-371.

Tolbert NE 1980. Photorespiration. In Stumpf PJ & EE Conn eds. The Biochemistry of Plants Vol 2 Academic Press, NY pp 487-523.

Wallsgrave RM, JC Turner, MP Hall, AC Kendall SWJ Bright 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol* 83:155-159.

Winkler RG, DG Blevins, JC Polacco, DD Randall 1987. Ureide catabolism of soybean. *Plant Physiol* 83:585-591

Zelitch I 1979. Photorespiration: studies with whole tissues. In Gibbs M & Lattke eds. Encyclopedia of plant physiology Vol 6 Springer-Verlag Berlin pp 353-358.