

00563

4

24

INFLUENCIA DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA SOBRE EL METABOLISMO
NITROGENADO EN *Amaranthus hypochondriacus* L.

Facultad de Química, UNAM

Maestría en Ciencias Químicas

(Bioquímica)

Biol. Alicia Gamboa de Buen.

1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 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.

ABREVIATURAS.

ABA	Acido Abscisico
ARN	Acido Ribonucleico
CRA	Contenido Relativo de Agua
DOC	Desoxicolato de Sodio
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
GS	Glutamino Sintetasa
MPa	Megapascales
NADH	Nicotinamida Adenin Dinucleótido
PEG	Polietilenglicol
Fr	Peso fresco
P_s	Peso seco
P_t	Peso en turgencia máxima o saturación
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TCA	Acido Tricloroacético
ψ	Potencial de agua
ψ_s	Potencial de solutos o osmótico
ψ_p	Potencial de turgencia o de presión

RESUMEN.

Las plantas, al ser sometidas a pérdida de agua, presentan cambios en el metabolismo del nitrógeno. El objetivo principal de este trabajo fué establecer un sistema para determinar la secuencia de los cambios en los niveles de amonio, glutamato y aminoácidos totales y la actividad de las enzimas asimiladoras de amonio, glutamino sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) durante el proceso de pérdida de agua en *Amaranthus hypochondriacus*. Las determinaciones se hicieron en la hoja de una planta que se dejó de regar por 6 días ó en un explante del mismo tejido sometido a pérdida de agua en una solución de PEG (-0.5 MPa).

La velocidad de la pérdida de agua no alteró la respuesta bioquímica puesto que los eventos tuvieron lugar en el mismo intervalo de CRA tanto en planta completa como en explante, el cual alcanza en 10 horas los valores de CRA que la planta alcanza en 6 días. Se sugiere que el CRA, como indicador del *status* de agua, puede ser utilizado para establecer una relación entre la pérdida de agua y los eventos bioquímicos.

La concentración de amonio presentó dos incrementos; el primero se llevó a cabo en el intervalo de CRA de 85-82% y el segundo a menos de 79%. Puesto que el aumento en la actividad de GS ocurrió en el intervalo de CRA entre 80 y 73%, se sugiere que el amonio es reasimilado a través del ciclo GS/GOGAT. Los niveles de aminoácidos se incrementan desde valores de CRA de 80% por lo

que se sugiere que la segunda elevación de la concentración de amonio podría provenir de la desaminación de los aminoácidos derivados de la hidrólisis de proteínas.

En ausencia de luz no se observa un incremento notable en la actividad de GS. La acumulación de amonio y de aminoácidos se lleva a cabo en menor magnitud y a valores de CRA menores que los observados en presencia de luz.

Por otro lado, los resultados obtenidos de los explantes sometidos a agobio salino indican que el componente iónico del agobio es más tóxico que el componente osmótico, puesto que, a pesar de que los valores de CRA no disminuyeron notablemente, se encontró una ligera acumulación de amonio y un incremento en la actividad de GS en las primeras cuatro horas.

Se propone que el sistema de explante de Amaranto es un sistema adecuado para el estudio de la respuesta metabólica a la pérdida de agua así como de los sistemas de transducción de señales involucrados en esta respuesta.

ABSTRACT

The possibility that changes in Relative Water Content (RWC) during water loss could be correlated to biochemical events in short periods, was investigated.

It has been demonstrated that RWC could determine the biochemical events since these events occur within the same range of RWC in whole plants (seven days of stress) as well as in detached leaves (ten hours of stress).

Changes on nitrogen metabolism under water deficit have been thoroughly reported. These studies have been performed over long stress periods. It has been found that under short periods of stress (10 h) our system presents biochemical changes. There is an accumulation of ammonia, which is reassimilated by the glutamine synthetase. Thus, levels of glutamate decrease. Effect of darkness and NaCl on ammonium levels and on glutamine synthetase activity are also reported.

We suggest that detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* could be a good system for study metabolic responses to water deficit in short periods.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1. Relaciones de agua entre plantas y suelo	2
II.2. Relaciones de agua en las células	2
II.3. Relaciones de agua en condiciones de agobio	3
II.4. Metabolismo del Nitrógeno	5
II.5. Influencia de la pérdida de agua sobre el metabolismo nitrogenado	7
II. 6. Relación entre el Contenido Relativo de Agua (CRA) y los cambios en el metabolismo provocados por la pérdida de agua	9
II.7. Participación del calcio en la pérdida de agua	10
III. OBJETIVOS	12
IV. MATERIALES Y METODOS	13
IV.1. Material biológico	13
IV.2. Modelos experimentales	13
IV.3. Determinación del CRA	14
IV.4. Extractos	14
IV.5. Determinación de amonio	15
IV.6. Determinación de aminoácidos	15
IV.7. Determinación de glutamato	16
IV.8. Determinación de la actividad de GS	17
IV.9. Determinación de la actividad de GDH	17
IV. 10. Determinación de proteínas	17
V. RESULTADOS	19
V.1. Determinación del CRA	19
V.2. Niveles de amonio, aminoácidos libre y glutamato y actividad de GS y GDH a diferentes valores de CRA	22
V.3. Dependencia de luz de la respuesta bioquímica a pérdida de agua en explantes	29

V.4. Efecto de NaCl sobre el CRA, la concentración de amonio y la actividad de GS	35
VI. DISCUSION	44
VII. CONCLUSIONES	53
VIII.REFERENCIAS	54

I. INTRODUCCION

La mayoría de las plantas están sujetas a cambios en la disponibilidad del agua en algún momento de su desarrollo. En consecuencia, presentan adaptaciones que les permiten sobrevivir a fluctuaciones pequeñas de la humedad del medio ambiente así como a déficits extremos de agua (Kramer, 1980). La tolerancia a la pérdida de agua usualmente involucra el desarrollo de bajos potenciales osmóticos mediante la acumulación de solutos (Morgan, 1984). Entre los solutos acumulados en respuesta al agobio de agua se han reportado compuestos nitrogenados como aminas cuaternarias, principalmente glicinobetaina, y aminoácidos como la prolina (Storey and Wyn Jones, 1977; Stewart and Lee, 1974). Así mismo, los cambios en el metabolismo del nitrógeno provocados por la pérdida de agua, han sido reportados. (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1987).

Los cambios en el *status* de agua pueden ser indicados a través de cambios en el potencial de agua o de cambios en el contenido relativo de agua (CRA). El potencial de agua ha sido utilizado como una medida de agobio de agua, aunque no se ha establecido si realmente es un parámetro crítico que determine las funciones fisiológicas (Bradford y Hsiao, 1982).

En el presente trabajo se describen los cambios en los niveles de amonio, de aminoácidos libres y de glutamato, así como en las actividades de las enzimas glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa, provocados por la pérdida de agua, expresados en función del contenido relativo de agua para establecer una

secuencia de estos eventos bioquímicos a medida que la planta va perdiendo agua, utilizando como sistema a *Amaranthus hypochondriacus*.

II ANTECEDENTES

II.1. Relaciones de agua entre plantas y suelo.

El potencial de agua ψ se define como la energía libre por mol de agua y se expresa como: $\psi = \psi_{\pi} + \psi_p$ donde ψ_{π} es igual al potencial osmótico y ψ_p es el potencial de turgencia. Si consideramos que el valor del potencial hídrico del agua pura es de cero, entonces los solutos disueltos causan un potencial de agua con valores negativos. En el sistema suelo-planta-atmósfera, los potenciales de agua son usualmente negativos. En consecuencia, dado que el potencial hídrico del suelo es el menos negativo y el de la atmósfera el más negativo, el agua fluye a través de la planta (Passioura, 1982).

II.2. Relaciones de agua en las células.

En la hoja, el medio externo es el líquido que se encuentra entre los espacios intercelulares y en las paredes celulares (apoplasto). En este líquido, la concentración de solutos es muy pequeña; así, ψ_{π} no contribuye significativamente al potencial de agua del apoplasto el cual está determinado por las fuerzas mátricas ejercidas por las paredes celulares. Por lo tanto, el potencial de agua del apoplasto es igual al potencial de matriz ($\psi = \psi_m$). Dentro de la célula, se considera que el valor del potencial de agua vacuolar es equivalente tanto al del citoplasma

como al de la célula en general. En la vacuola, el potencial de agua está determinado prácticamente por el potencial osmótico.

Entonces:

$$\psi_{vac} = \psi_{\pi}$$

El potencial de agua de la vacuola suele ser más bajo que el potencial de agua del apoplasto. Por lo tanto, el agua tiende a fluir hacia la vacuola incrementando su volumen y, en consecuencia, aumentando el volumen celular. Sin embargo, el incremento en el volumen celular está limitado por la elasticidad de las paredes celulares, dando lugar a una presión de turgencia que eleva el potencial de agua (Jarvis y Tyree, 1982). El desarrollo progresivo y continuo de la presión de turgencia causado por el influjo de agua se ilustra por el diagrama de Höfler (Fig. 1). Cuando la fuerza motriz para la entrada de agua es cero, la célula ha alcanzado su volumen máximo. Entonces, $\psi_{vac} = \psi_p + \psi_{\pi} = 0$.

El contenido relativo de agua (CRA), es decir la proporción de agua que contiene una planta, se define como:

$$CRA = \frac{P_i - P_s}{P_t - P_s} \times 100$$

donde P_i es el peso inicial de la muestra, P_s corresponde al peso seco y P_t es el peso de turgencia máxima. Por lo tanto, al establecerse la correlación entre el potencial de agua y el utiliza la siguiente expresión (Fig. 2, Richter, 1978):

$$\psi = -\frac{1}{CRA} \text{ cte.}$$

II.3. Relaciones de agua en condiciones de agobio.

La disminución del valor del potencial osmótico (ψ_{π}) en respuesta a la pérdida de agua y a estrés salino es un fenómeno

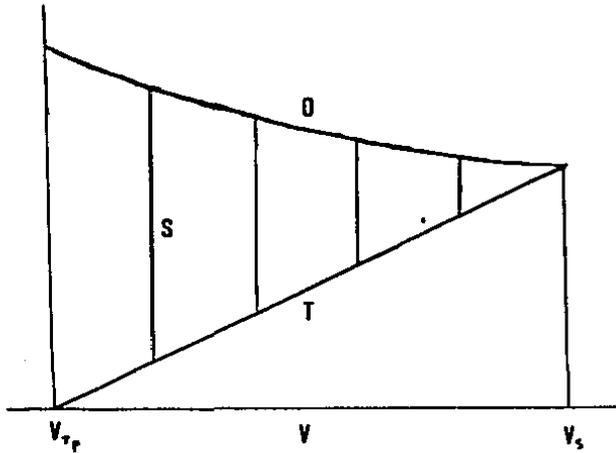


FIG. 1 DIAGRAMA DE HOFLER

V: volumen de la célula; V_s : a plasmólisis. V_{Tp} a saturación completa. O: Potencial osmótico del fluido celular. T: Presión de turgencia. S: tensión de succión

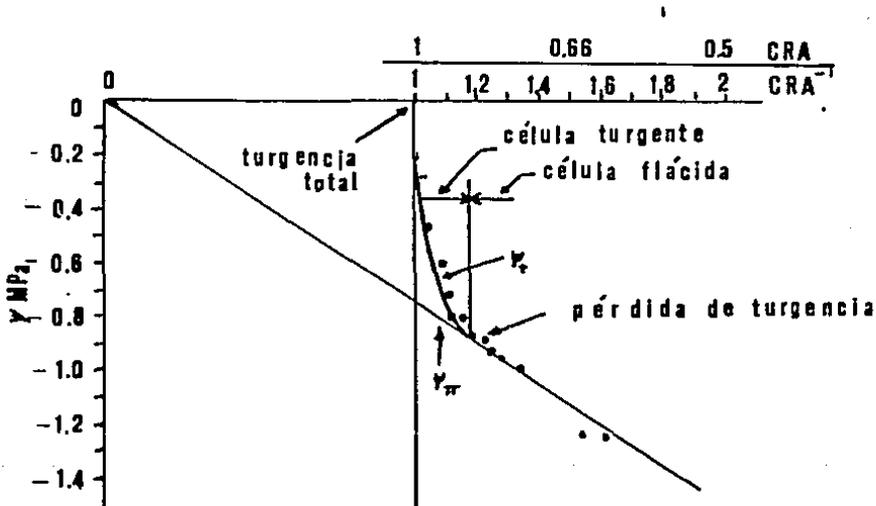


FIG. 2 DIAGRAMA DE HOFLER MODIFICADO POR RICHTER

CRA: Contenido relativo de agua

Ψ potencial de agua

Ψ_p potencial total

Ψ_π potencial osmótico

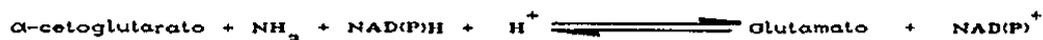
reportado (Tyree y Jarvis, 1982). Esta disminución puede ser consecuencia de una respuesta pasiva a la pérdida de agua. Sin embargo, algunas plantas presentan la capacidad de acumular algunos solutos como aminoácidos, aminas cuaternarias o carbohidratos para mantener el gradiente adecuado para la captación de agua y un potencial de turgencia positivo (Clarke y Durley, 1981).

Los solutos utilizados por las plantas sometidas a agobio salino para disminuir el potencial osmótico pueden ser tanto iones como compuestos orgánicos. La prolina y la glicina betaína se acumulan en citoplasma y los iones deben ser concentrados en la vacuola, puesto que la actividad enzimática es sensible a sodio (Wyn Jones *et al*, 1977; Polkahoff-Meyer, 1981). Así, las plantas resistentes a la salinidad tienen la capacidad de usar a los iones para evitar la pérdida de agua sin que ejerzan su efecto tóxico sobre el metabolismo (Flowers, 1977). Los compuestos orgánicos que se acumulan en el citoplasma, como la prolina y la glicinabetaína, no disminuyen la actividad enzimática e incluso pueden estabilizar sistemas enzimáticos por lo que se consideran como solutos compatibles (Borowitzka y Brown, 1974; Wyn Jones *et al*, 1977).

11.4. Metabolismo del nitrógeno (fig. 3).

El amonio producido a partir de la reducción de nitratos por medio de la nitrato reductasa o durante el proceso de fotorrespiración puede ser asimilado por dos vías alternas:

1. Aminación reductiva de un cetoácido dando lugar al aminoácido:



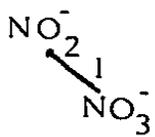
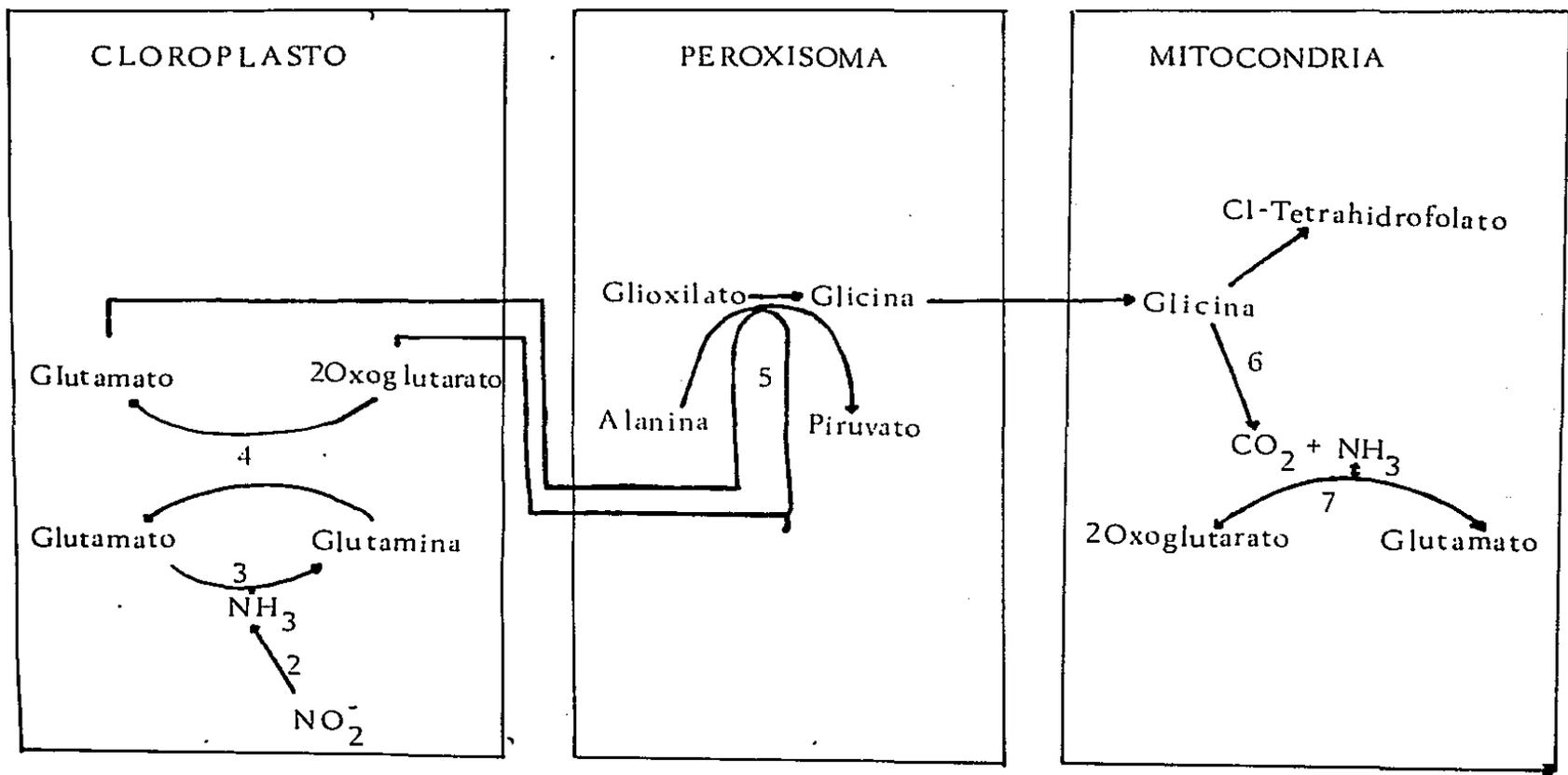
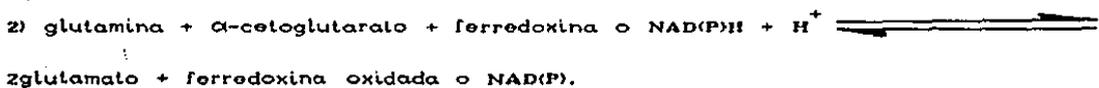
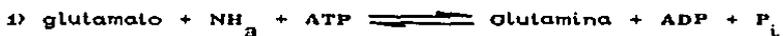


FIG. 3 ESQUEMA DEL CICLO DEL NITROGENO
 Actividades ENzimáticas: 1. Nitrato Reductasa,
 2. Nitrito Reductasa, 3. Glutamino Sintetasa,
 4. Glutamato Sintasa (GOGAT), 5. Glutamato-glioxilato
 aminotransferasa, 6. Complejo Glicina descarboxilasa
 7. Glutamato Deshidrogenasa.

H₂O. La enzima que cataliza esta reacción es la Glutamato Deshidrogenasa (GDH: E.C. 1.4.1.3.) y se encuentra ampliamente distribuida en los diferentes tejidos vegetales. En las células de hoja se encuentra tanto en mitocondria como en cloroplasto (Lea y Thurman, 1972).

2. Incorporación de amonio a la posición amida de la glutamina y su posterior transferencia a la posición α de un α -cetoácido.



La primera reacción es catalizada por la enzima glutamino sintetasa (E.C. 6.3.1.2.) que se encuentra localizada tanto en citoplasma (GSI) como en cloroplasto (GSII). La glutamato sintetasa (GOGAT), es decir, la enzima glutamino: α -cetoglutarato aminotransferasa NAD(P)H (E.C. 2.6.1.5.3.) o ferredoxina reducida (E.C. 1.4.7.1) son las enzimas que intervienen en la segunda reacción (Miflin *et al*, 1981).

II.5. Influencia de la pérdida de agua sobre el metabolismo nitrogenado.

Durante la pérdida de agua ocurren una serie de cambios metabólicos además de la disminución en el potencial de agua. Puesto que muchas plantas utilizan compuestos nitrogenados como solutos compatibles, se considera que los cambios en el metabolismo del nitrógeno son de importancia especial.

La pérdida de agua provoca una acumulación de amonio y de aminoácidos totales (Levitt, 1980) y cambios en la actividad de las enzimas asimiladoras de amonio (Miranda-Ham y Loytola-Vargas,

1987). Por lo tanto, en el presente trabajo se sugiere que el metabolismo de los aminoácidos y los mecanismos de asimilación de amonio se encuentran integralmente involucrados en la respuesta de las plantas a la pérdida de agua.

Se ha considerado que la acumulación de amonio y de aminoácidos son resultado de un desarreglo en la síntesis proteica (Levitt, 1980). La síntesis de proteínas se inhibe inmediatamente por el estrés de agua y el proceso de proteólisis puede estar aumentado (Cooke *et al.*, 1979). Por otro lado, la acumulación de amonio puede ser resultado de un incremento en el metabolismo fotorrespiratorio vía glicina para la síntesis de serina (Pulich, 1986).

Aunque la actividad de la nitrato reductasa (NR: EC 1.6.6.1.) se reduce generalmente cuando las plantas son sometidas a estrés de agua (Morilla *et al.*, 1973; Sivaramakrishnan *et al.*, 1988), se ha considerado que esta enzima podría ser responsable de la elevación del amonio.

Puesto que la velocidad de generación de amonio puede exceder a la velocidad de asimilación base, la planta debe activar sus mecanismos de reasimilación de amonio de manera rápida y eficientemente. Las enzimas que participan en la asimilación *de novo* del amonio son la glutamato deshidrogenasa y el ciclo en el que participan la glutamino sintetasa y la glutamato sintasa dependiente de NAD(P)H o de ferredoxina. Los cambios en las actividades de estas enzimas provocados por estrés de agua han sido reportados. La actividad de la GDH es mayor en *Pennisetum americanum*, *Vigna radiata* y *Phaseolus vulgaris* (Bottacin *et al.*, 1985; Kaur *et al.*, 1985; Jager y Meyer, 1977) en respuesta al

éstres de agua, mientras que para *Pisum sativum*, *Zea mays* y *Sueda maritima*, la GS presenta incrementos en su actividad (Rakova et al, 1978; Boucaud y Billard, 1981).

II.6. Relación entre el contenido relativo de agua y los cambios en el metabolismo provocados por la pérdida de agua.

La severidad del déficit de agua puede ser indicada a través del contenido relativo de agua y correlacionarla con los cambios metabólicos que se presenten.

En general, los cambios metabólicos sufridos por las plantas sometidas a pérdida de agua han sido expresados en función del potencial de agua. (Fitter y Hay, 1983)

Los cambios en el potencial de agua han sido relacionados con los cambios en la concentración de ácido abscísico (ABA) (Zabada, 1974; Wright, 1977). Se ha discutido que el parámetro crítico de las relaciones de agua que determina el incremento en los niveles de ABA es la pérdida de turgencia (Pierce and Raschke, 1978). Sin embargo, en otros eventos bioquímicos, no se ha podido establecer si el potencial de agua o uno de sus componentes pueden ser un parámetro crítico que determine las funciones fisiológicas (Bradford and Hsiao, 1982). Asimismo, la medición del potencial de agua presenta dificultades de tipo metodológico que impiden establecer una correlación entre la fisiología de la respuesta y el valor del potencial durante la pérdida de agua.

Por otro lado, el CRA ha mostrado ser una medida más adecuada para correlacionar la actividad metabólica con el grado de la pérdida de agua. En pastos C_4 , se ha determinado un valor de CRA

que corresponde al punto de muerte ($CRA = 0.25 \pm 0.01$) (Sinclair y Ludlow, 1985). La reducción en la fotosíntesis de cloroplastos sometidos a estrés está asociada a la reducción del volumen estromal. Como el cloroplasto se puede considerar como un osmómetro en los intervalos fisiológicos de deshidratación, la reducción del volumen de la célula puede reflejar la reducción del volumen del cloroplasto la reducción significativa del proceso fotosintético comienza cuando la célula ha alcanzado un valor de CRA de 0.5 (Kaiser, 1982).

II.7. Participación del calcio en la pérdida de agua.

El calcio, por medio de sus dos cargas positivas, ayuda a estabilizar las membranas estableciendo puentes entre los fosfolípidos con carga negativa que se encuentran en éstas. Por otro lado, el calcio puede incrementar el *status* hídrico de dos especies de yute sometidas a estrés de sequía (Chowdhury, S.R. y M.A. Choudhuri, 1986)

En un medio ambiente salino, cuando la concentración de calcio es baja, existe un incremento en la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ y Cl^- (Greenway, H. y Munns, 1980; Rains, D.W., 1972). Así mismo, existe evidencia directa de que el sodio desplaza al calcio asociado a la membrana (Cramer *et al*, 1985) y que afecta los niveles de calcio intracelular (Lynch y Laüchli, 1988). Se considera que el calcio exógeno puede reducir el efecto de la salinidad al incrementar la entrada de calcio y reducir la de sodio (Lynch y Laüchli, 1988). Por lo tanto, el calcio parece participar activamente en los procesos de tolerancia a salinidad.

Se considera que los cambios en el metabolismo del nitrógeno provocados por la pérdida de agua pueden ser descritos en función del contenido relativo de agua independientemente de la velocidad con que ocurra esta pérdida de agua. De esta manera será posible explicar los cambios en los niveles de amonio, aminoácidos libres, glutamato y en las actividades de las enzimas asimiladoras de amonio de una manera integrativa.

III. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fué establecer un sistema que responda bioquímicamente a pequeñas pérdidas de agua y si esta respuesta bioquímica es función del cambio en el CRA. También se pretendió determinar si los cambios en los niveles de amonio, aminoácidos libres y glutamato, y de las actividades de la Glutamino Sintetasa y de la Glutamato Deshidrogenasa se llevan a cabo en forma secuencial.

Objetivos particulares.

1. Establecer los cambios en los niveles de amonio, aminoácidos totales y glutamato en respuesta a la pérdida de agua en el sistema de explante.
2. Establecer los cambios en la actividad de la glutamino sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa en respuesta a la pérdida de agua en el sistema de explante.
3. Determinar la relación entre la respuesta bioquímica y el contenido relativo de agua.
4. Determinar si la planta completa responde de la misma manera que el sistema de explantes para establecer si la velocidad de la pérdida de agua afecta la respuesta bioquímica.
5. Estudiar el efecto de oscuridad sobre la respuesta bioquímica.
6. Estudiar si el NaCl, al provocar cambios en la disponibilidad de agua provoca una respuesta bioquímica similar a la establecida durante la pérdida de agua.

IV MATERIALES Y METODOS.

IV.1. Material Biológico

Se utilizaron plantas de *Amaranthus hypochondriacus* L. tipo mercado (INIFAP, Chapingo, México; donado por el Ing. Eduardo Espitia) de 6 a 8 semanas de edad, crecidas en tierra bajo condiciones de invernadero

IV. 2. Modelos Experimentales

Se utilizaron dos modelos experimentales: Planta completa y explantes de *Amaranthus hypochondriacus*.

Planta Completa:

El tratamiento de agobio hídrico en las plantas fué de siete días; cada día se determinó el valor de CRA en hojas maduras totalmente expandidas y se tomaron muestras de hoja para la determinación de metabolitos y de actividad de las enzimas GS y GDH. Las muestras se congelaron a -70°C .

Las plantas sometidas a agobio salino se regaron diariamente durante siete días con una solución de cloruro de sodio 300 mM; cada día se determinó el valor de CRA y se tomaron las muestras correspondientes.

Explante:

Los peciolos de hojas totalmente expandidas y turgentes se introdujeron en una solución de polietilenglicol al 8% (PEG 6,000; -0.5MPa). Se tomaron muestras cada dos horas determinándose el CRA.

Los explantes se sometieron a una solución de cloruro de sodio de 150 mM de la misma manera que en el tratamiento con PEG.

El calcio se añadió en forma de CaCl_2 (3 mM) a las soluciones de PEG o a las de NaCl.

3. Determinación del Contenido Relativo de Agua.

El contenido relativo de agua se midió de acuerdo a las condiciones establecidas para discos de hoja de *Amaranthus hypochondriacus* por del Río Portilla (1988). Los discos de hoja se cortaron con un horador de 8mm de diámetro, se pesaron 9 discos por muestra para obtener el peso fresco inicial (P_f) y se colocaron en hule espuma con orificios de 8 mm de diámetro; el sistema se saturó con agua desionizada dentro de una caja de Petri. El peso turgente (P_t) se obtuvo pesando discos que se mantuvieron durante cuatro horas dentro de la cámara. Finalmente, el peso seco (P_s) se determinó pesando los discos secados en una estufa con vacío durante 24 hrs a 80°C. El CRA se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} \times 100.$$

4. Extractos.

Extracto para la determinación de los metabolitos:

Las muestras congeladas se molieron en mortero hasta obtener un polvo, se añadieron 5 ml de agua desionizada por cada 2 gramos de tejido y se homogeneizaron en un Ultra Turrax (Janke and Kunkel, Kika Werk, RFA). El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa, se le añadió FCA para obtener una concentración final del 10%. y se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos, todo el procedimiento anterior se llevó a cabo a 4°C. Se tomó una alícuota

de 200 μ l del sobrenadante para la determinación de amonio y al resto se le hicieron 3 extracciones con éter etílico. El pH de la muestra se ajustó a 5.0 ± 0.1 tomándose una alícuota de 100 μ l para la determinación de aminoácidos libres y de 400 μ l para la determinación de glutamato.

Extractos enzimáticos:

Los extractos enzimáticos se obtuvieron de acuerdo a Miranda-Ham y Loyola-Vargas (1987).

Las muestras congeladas se molieron en mortero hasta obtener un polvo. El polvo se homogeneizó en un Ultra turrax (Janke and Kunkel, Kika Werk, RFA) por dos minutos con 2.5 volúmenes (w/v) de buffer de extracción (TRIS HCl 50mM, CaCl_2 1mM, β -Mercaptoetanol 5mM, pH 8.2) y 5 % de PVP. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se utilizó para medir las actividades enzimáticas tanto de GS como de GDH. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C.

5. Determinación de amonio.

El amonio se determinó utilizando el reactivo de Sigma (Método de Nessler). A 100 μ l de muestra se le añadió 1 ml de reactivo. La muestra se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min. y se le determinó la absorbencia a 425 nm

6. Determinación de aminoácidos.

Los aminoácidos se determinaron de acuerdo a Cocking (1954) utilizando glutamato como estándar. A 100 μ l de muestra se le añadieron 0.9 ml de agua y un ml de reactivo de ninhidrina. Las

muestras se colocaron en baño maría durante 30 min., se enfriaron en hielo y se les agregaron 2.5 ml de isopropanol al 50%. Se dejaron durante 15 min. a temperatura ambiente y se les determinó la absorbencia a 570 nm.

Reactivo de ninhidrina: Reactivo A.- buffer de citratos 0.2M pH 5.0 ± 0.1 y, por cada 50 ml de buffer, 0.8g de SnCl_2 . Disolver 0.4g de ninhidrina en 10 ml. de etilen- glicol- monometil éter y agregar 10 ml del reactivo A.

7. Determinación de Glutamato.

Los 400 μl de muestra se colocaron sobre una columna de 2cm con Dowex 1-X8. La columna se lavó con 10 ml de agua desionizada y el glutamato se eluyó con 4 ml de una solución de ácido acético 2N. El eluido se ajustó a pH 5.0 ± 0.1 y se tomó 1 ml que fue procesado como en el inciso anterior (6).

La resina se preparó de la siguiente manera: 454g de resina Dowex 1-X8 se resuspenden en 2 litros de agua desionizada. Al asentarse la resina, se decanta el líquido que contiene las partículas finas. Se repiten estos dos pasos las veces que sean necesarias. Después, la resina se enjuaga dos veces con 1 litro de etanol 75% y dos veces con 1 litro de HCl 2N y se calienta a 100°C hasta que el sobrenadante no tenga color. Una vez que la resina está a temperatura ambiente, se resuspende en 500 ml de ácido acético 2N y se calienta a $60-70^\circ\text{C}$ por 5 min. Finalmente, la resina se empaca en una columna y se pasan 3 litros de acetato de sodio 1M y un litro de ácido acético 0.1M. La resina se lava con agua destilada hasta obtener un pH neutro.

8. Determinación de la actividad de GS.

El ensayo para la actividad de transferasa de GS se llevó a cabo según Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1984).

La mezcla de reacción esta formada por : TRIS-HCl 50mM, pH 7.5; ATP 6mM, MgSO₄ 333mM; hidroxilamina 20 mM; cisteína 3.3 mM y diferentes volúmenes de extracto enzimático (0.1-0.5 ml) La reacción se comenzó al añadir 0.5 ml de glutamato 190 mM, se incubó por 30 min. a 37°C y se detuvo añadiendo 1 ml de solución de FeCl₃ (volúmenes iguales de FeCl₃ al 10% en HCl 0.2 M, TCA al 24% (w/v) y HCl al 50%). Se centrifugó y se midió la absorción del sobrenadante a 540 nm.

La actividad de GS está expresada en μ moles de γ -glutamil- γ -hidroxamato formado por minuto por mg de proteína.

9. Determinación de la actividad de GDH.

La actividad aminativa de la GDH se determinó de acuerdo a Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1984).

La mezcla de reacción está formada por: TRIS HCl 100 mM, pH 8.2; α cetoglutarato 10 mM; NH₄Cl 100 mM y diferentes volúmenes de extracto enzimático (0.05- 0.2 ml.) La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 2 min. La reacción se inició añadiendo NADH 160 μ M. La disminución en absorbencia a 340nm indica el consumo de NADH en la reacción aminativa.

La actividad de GDH se definió como nmoles de cofactor oxidado por minuto por mg de proteína.

10. Determinación de Proteínas.

Las proteínas se determinaron de acuerdo a Peterson (1977) usando

albúmina bovina como estándar.

A 1 ml de muestra conteniendo entre 10 y 100 μg de proteína se le añadieron 0.1 ml de DOC al 0.15% (10 min. a temperatura ambiente), las muestras se enfriaron durante 5 min y posteriormente se les añadieron 0.1 ml de TCA al 72% (20 minutos a 4°C). Se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se descartó y a la pastilla se le añadió un ml de reactivo A [Mezclar partes iguales de CTC (Na_2CO_3 al 10%, CuSO_4 al 0.1% y tartrato de sodio y potasio al 0.2%) SDS al 10%, NaOH 0.8 N y Agua] y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se le añadieron 0.5 ml del reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu 1:6) Se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. y se leyó a 750 nm.

V RESULTADOS.

V.1.DETERMINACION DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA.

El CRA puede ser usado como un indicador del *status* hídrico del tejido. Para algunas especies vegetales, se ha determinado que la pérdida de turgencia tiene lugar entre el 85 y 75% de CRA. Este punto ha sido determinado por medio de relaciones entre el potencial de agua y el CRA. (Clarke y Durley, 1981).

Con el objeto de establecer una comparación en la velocidad de pérdida de agua entre la planta completa y los explantes, se determinaron los cambios en CRA en función del tiempo en ambos sistemas.

Planta completa.

La planta completa pierde agua gradualmente alcanzando un valor del 60% de CRA en 6 días (Fig. 4). La pérdida de turgencia del tejido se observó en valores de CRA alrededor del 75%.

Explante.

Los valores de CRA disminuyen de manera gradual alcanzando un valor de 60% a las 10 horas cuando los explantes son sometidos a pérdida de agua con PEG (-0.5 MPa) (Fig. 5). La pérdida de turgencia de la hoja también se manifestó alrededor del 75% de CRA.

Los explantes presentaron una velocidad mayor de la pérdida de agua en relación a la planta completa. Por lo tanto, la influencia de la velocidad de la pérdida de agua sobre el

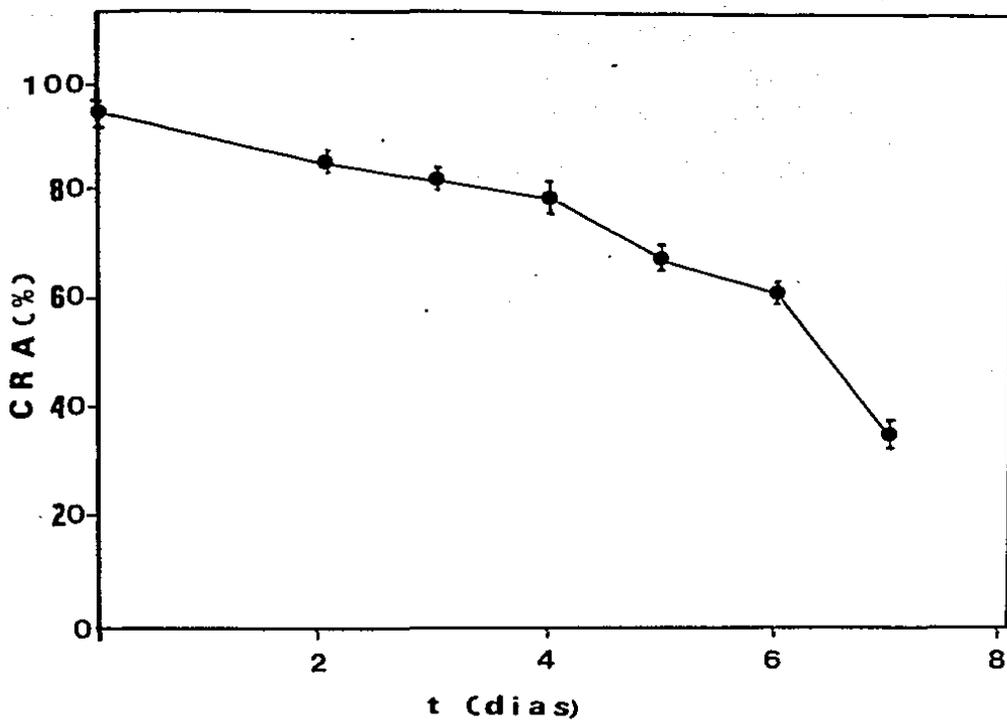


FIG. 4 Cambios en el contenido relativo de agua (CRA) de plantas sometidas a pérdida de agua durante 7 días sin riego expresados en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones y la desviación estandar.

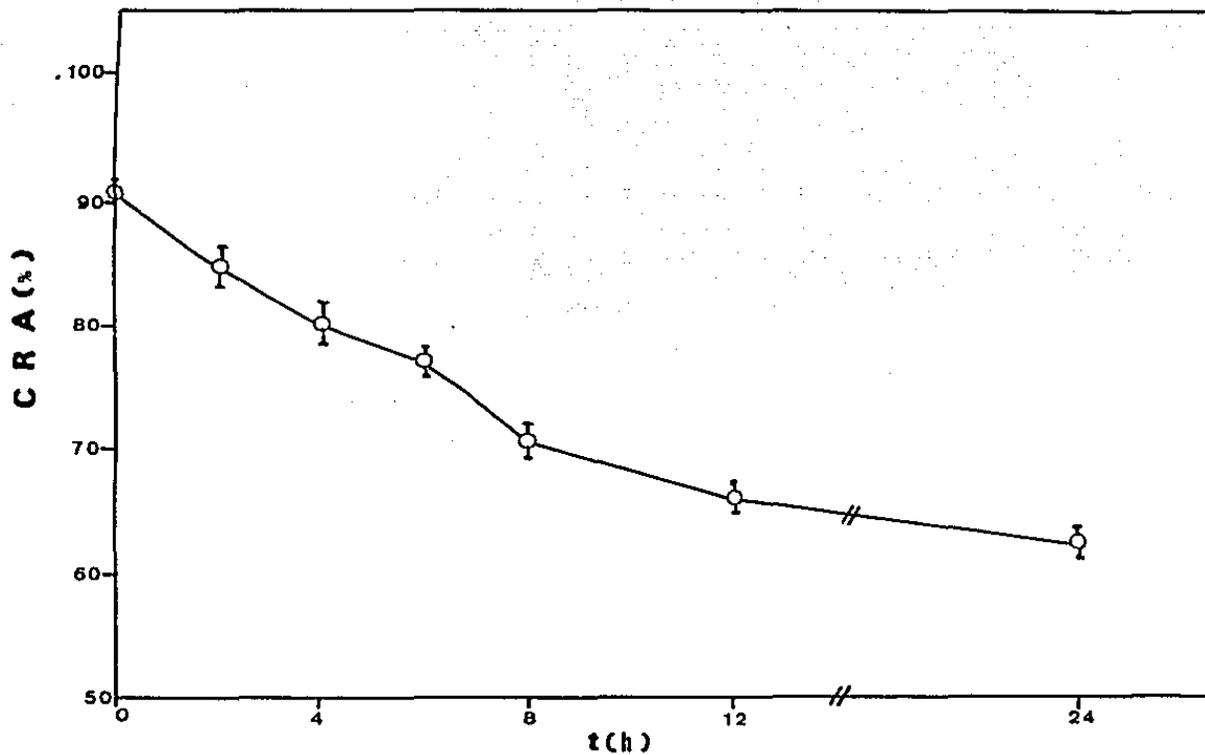


FIG. 5 Cambios en el contenido relativo de agua (CRA) de explantes sometidos a pérdida de agua con PEG (-0.5MPa) expresados en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones y la desviación estandar.

metabolismo nitrogenado, se estudió al determinar los cambios en los niveles de amonio y glutamato y en las actividades de GS en función del CRA tanto en explante como en planta completa.

V.2. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE AMONIO, AMINOACIDOS LIBRES Y GLUTAMATO Y EN LAS ACTIVIDADES DE GLUTAMINO SINTETASA Y GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN FUNCION DEL CRA.

Los cambios en los niveles de amonio provocados por la pérdida de agua pueden estar relacionados con los cambios en los niveles de aminoácidos totales y de las actividades de las enzimas asimiladoras de amonio. El CRA puede ser utilizado como un indicador del *status* de agua y de esta manera, al analizar los cambios en el metabolismo en función de este indicador, se puede establecer una secuencia en los eventos.

V.2.1 Amonio.

El amaranto acumula amonio en respuesta a la pérdida de agua (Fig. 6). Los niveles de amonio se incrementan en el intervalo entre 85-82% de CRA en el explante seguido de una disminución. En la planta completa, la disminución se observa a un valor de CRA menor que en el explante. El incremento en los niveles de amonio alrededor del 75% de CRA se observa en ambos sistemas.

Se ha considerado que la acumulación de amonio es resultado de la desaminación de los aminoácidos que se acumulan a consecuencia de una inhibición en la síntesis de proteínas provocada por el estrés (Cooke *et al*, 1979). Por lo tanto, es importante determinar los cambios en los niveles de aminoácidos

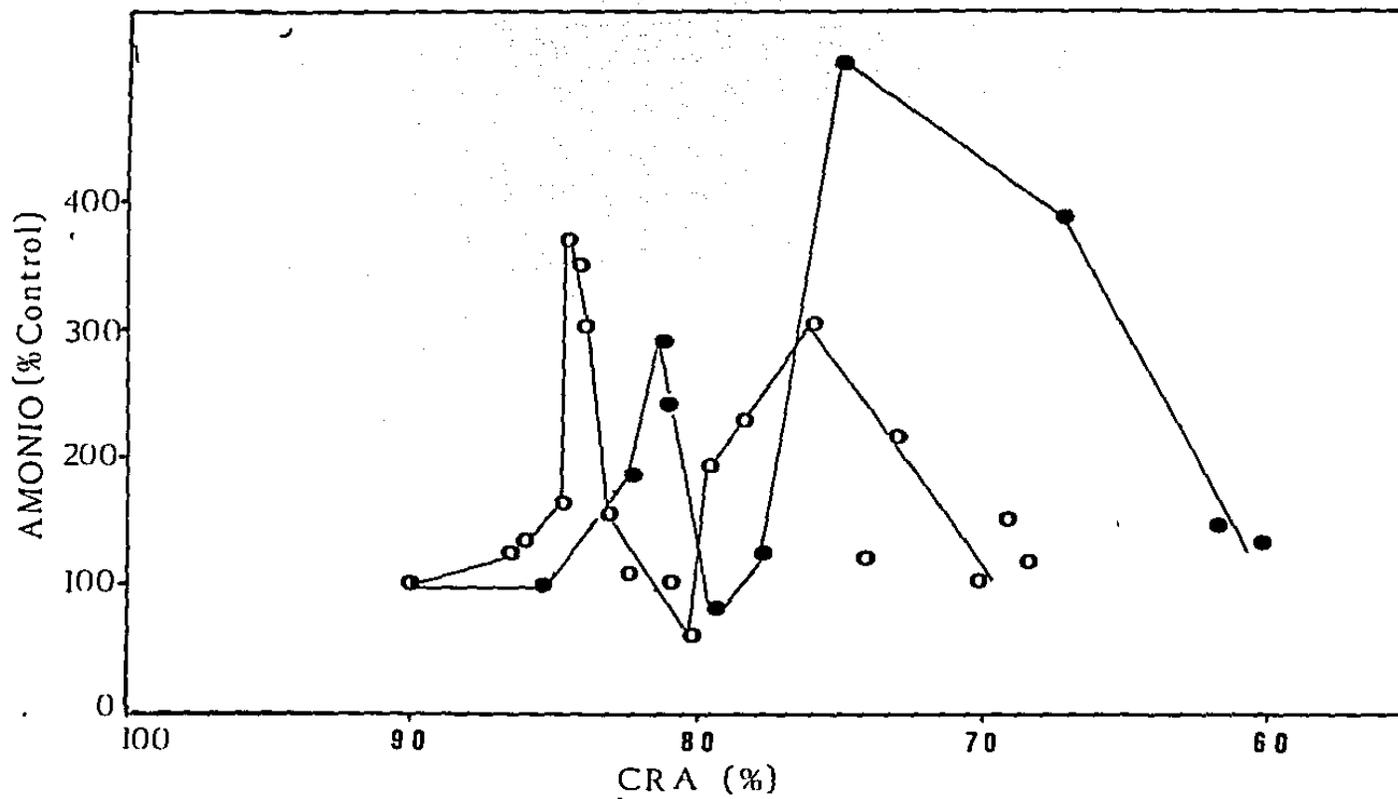


FIG. 6 Cambios en los niveles de amonio en función del contenido relativo de agua. El 100% corresponde a $50.5 \pm 4.6 \mu\text{M}$ NH_3 por gramo de peso seco.

PLANTA COMPLETA (●)

EXPLANTE (○)

totales en explantes sometidos a pérdida de agua con PEG (-0.5 MPa).

V.2.2 Aminoácidos totales.

El amaranto acumula aminoácidos en respuesta a la pérdida de agua (Fig. 7). El incremento observado fué paulatino llegándose al máximo alrededor del 70% de CRA.

El cambio en la actividad de las enzimas asimiladoras de amonio es un evento reportado en diferentes especies vegetales (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1988). Por otro lado, la disminución de los niveles de amonio en amaranto indican la posibilidad de un incremento en la actividad de los mecanismos de asimilación de amonio.

V.2.3 Glutamino Sintetasa.

La actividad de la GS presenta un incremento de 5 veces en el intervalo de valores de CRA de 80 a 73%, observándose tanto en planta completa como en explante (fig. 8). La actividad presentó valores basales cuando el tejido alcanzó valores de CRA alrededor del 70%. Se ha reportado que la actividad de GS puede variar a lo largo del día (Mifflin *et al*, 1981) En el sistema de explante, la actividad de GS no varió cuando los explantes fueron colocados en agua hasta por 10 horas (fig. 9).

V.2.4 Glutamato deshidrogenasa.

La actividad de GDH-NADH de explantes sometidos a pérdida de agua con PEG (-0.5 MPa) se muestra en la figura 10. La actividad

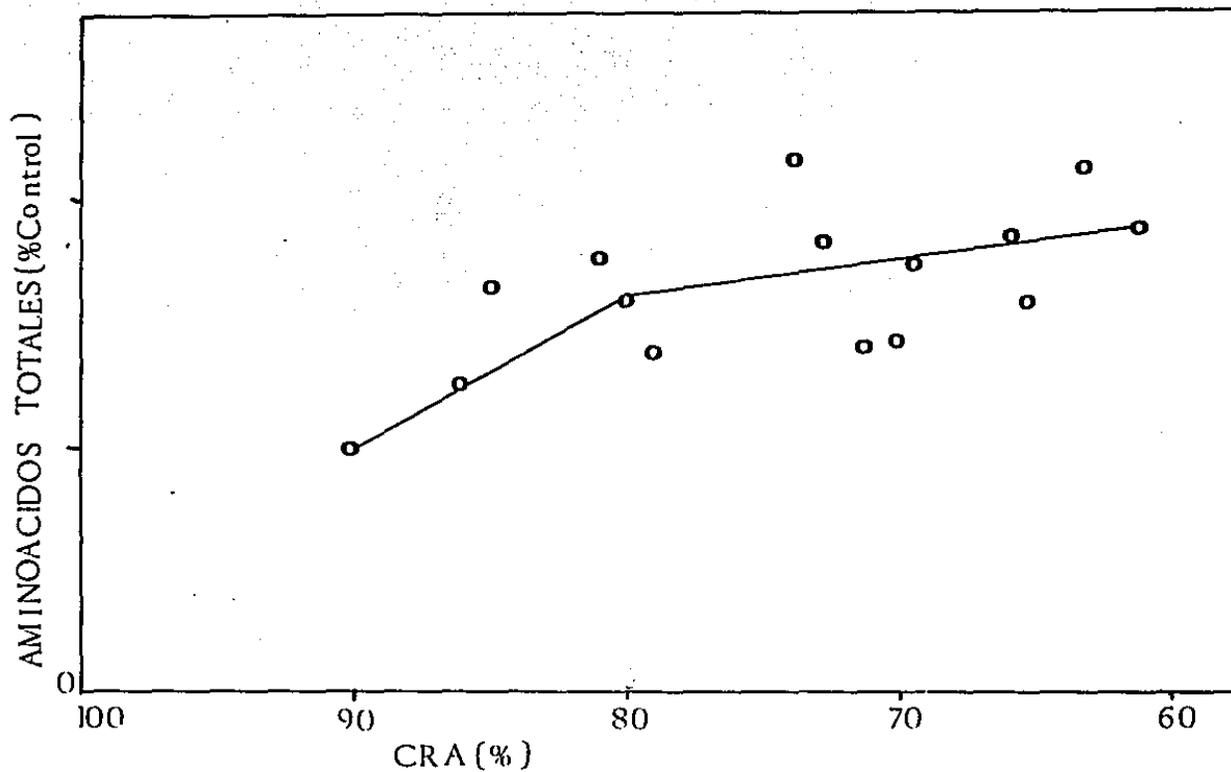


FIG. 7 Cambios en los niveles de aminoácidos totales en función del contenido relativo de agua (CRA). El 100% corresponde a 7.9 ± 1.0 mg Aa por gramo de peso seco.
EXPLANTE (O)

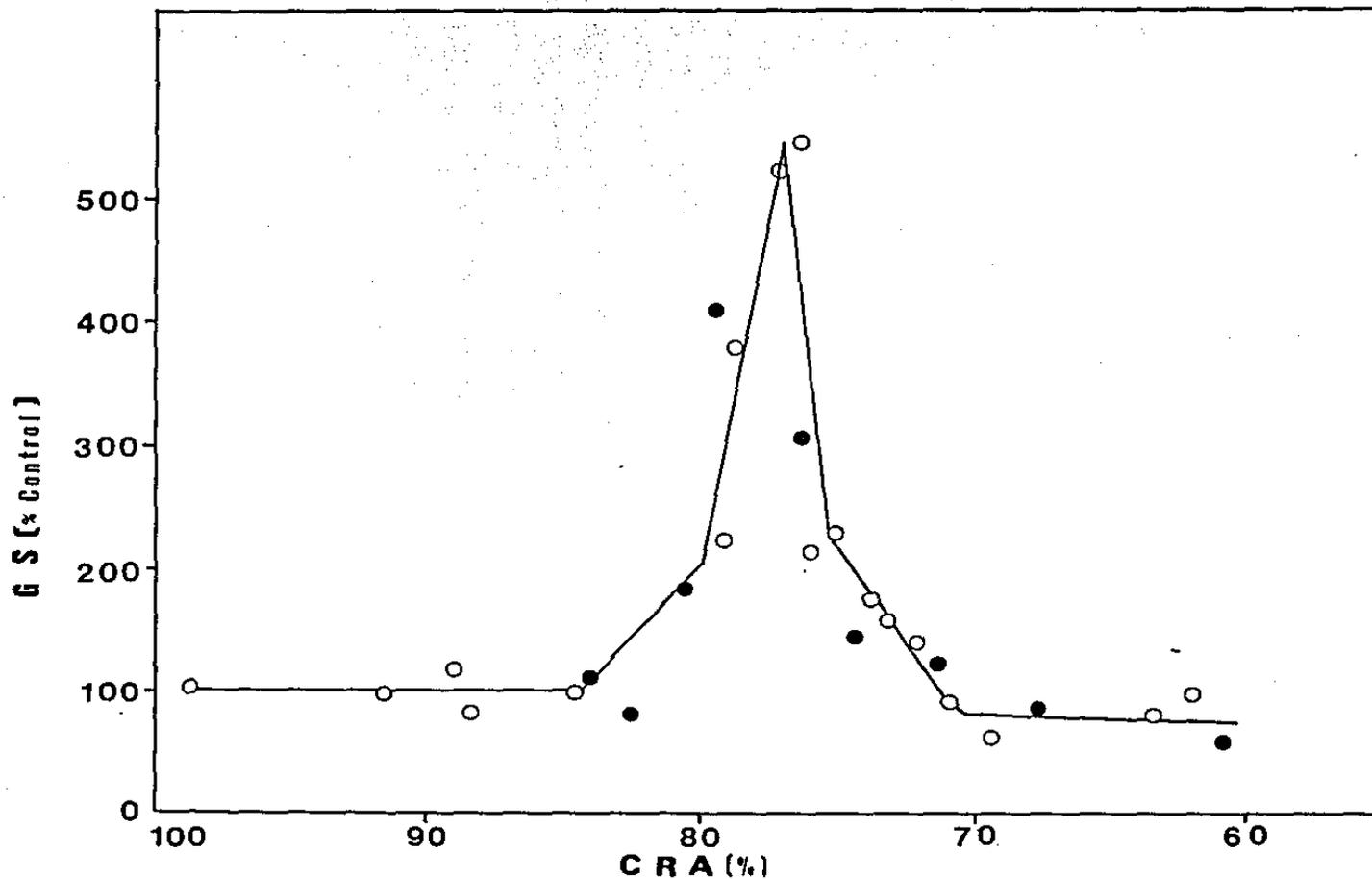


FIG. 8 Cambios en la actividad de la Glutamino Sintetasa (GS) y el contenido relativo de agua (CRA). El 100% corresponde a una actividad de $0.2664 \pm 0.035 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ de γ -glutamil por minuto por miligramo de proteína.
 PLANTA COMPLETA (●)
 EXPLANTE (○)

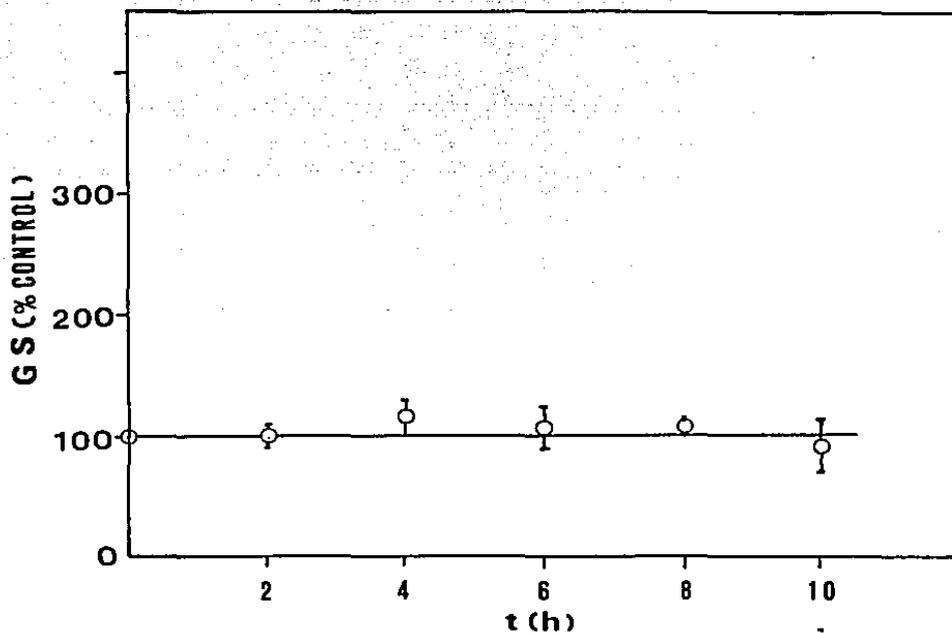


FIG. 9 Actividad de Glutamino Sintetasa (GS) de explantes colocados en agua, en función del tiempo. El 100% corresponde a una actividad de $0.2664 \pm 0.035 \times 10^{-3}$ μ mol de γ -glutamil por minuto por miligramo de proteína.

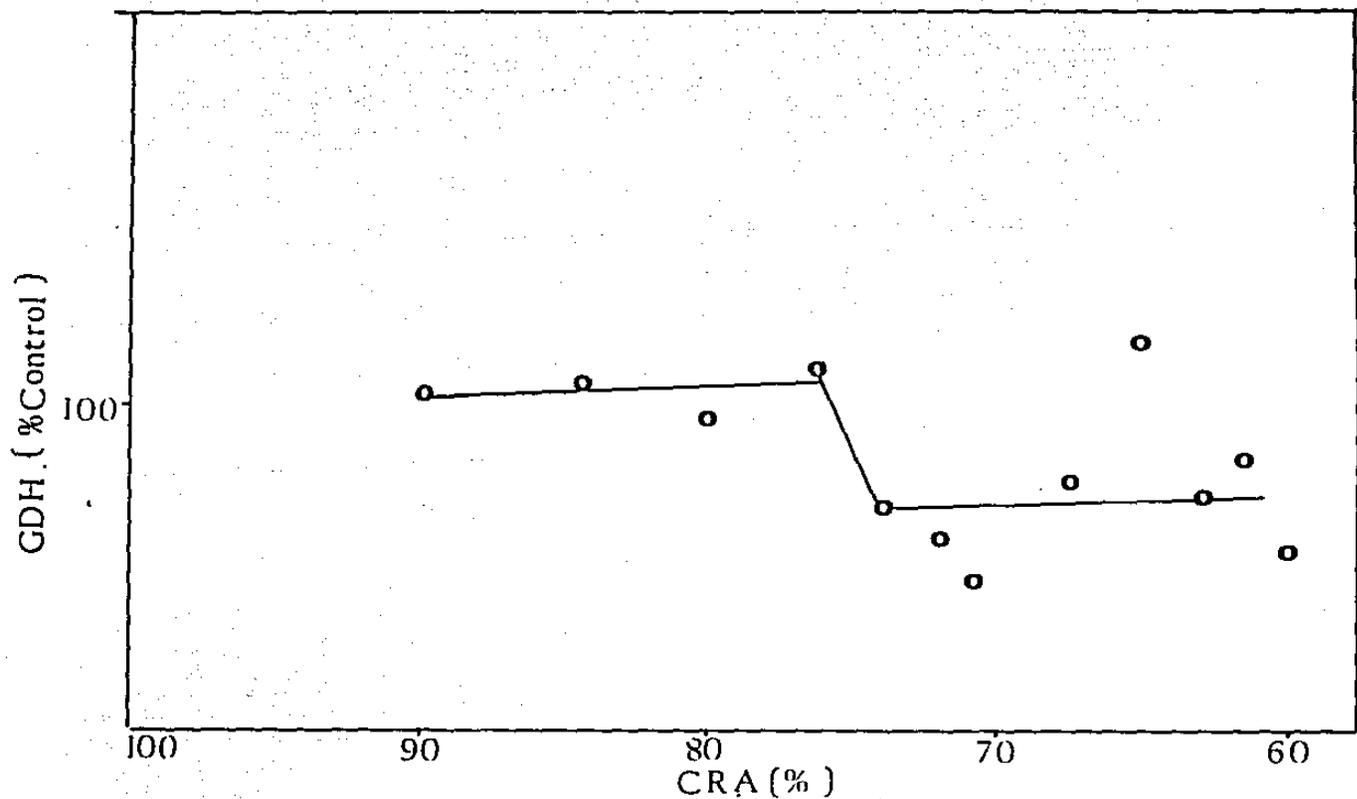


FIG. 10 Actividad de la Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en función del contenido relativo de agua (CRA). El 100% corresponde a una actividad de 0.08 ± 0.004 nmoles de NADH por minuto por miligramo de proteína. EXPLANTE (O)

de GDH no presenta cambios hasta que el explante alcanza valores menores del 72% de CRA; a partir de este valor, la actividad tiende a disminuir.

V. 2.5. Glutamato.

El glutamato ha sido considerado como un posible osmorregulador, especialmente en bacterias (Yancey *et al*, 1982). Sin embargo, en plantas los niveles de glutamato se incrementan o disminuyen en respuesta a la pérdida de agua (Hanowewr y Brazozowska, 1975).

En amaranto, la concentración de glutamato, tanto en explantes como en planta completa, tiende a disminuir a medida que el tejido va perdiendo agua (Fig. 11). Sin embargo, en el explante el nivel de glutamato baja desde valores de CRA mayores a 80% mientras que en la planta completa comienza a disminuir cuando se alcanza un valor de CRA menor del 77%.

V.3. DEPENDENCIA DE LA LUZ DE LA RESPUESTA BIOQUIMICA A LA PERDIDA DE AGUA EN EXPLANTES. EFECTO DE OSCURIDAD.

Se ha descrito que la acumulación de amonio en plantas halófitas como respuesta a estrés salino es un fenómeno dependiente de luz (Pulich, 1986). Asimismo, la actividad de GS es regulada principalmente por carga energética (Miflin *et al*, 1981). Por lo tanto, para conocer si los cambios en la concentración de amonio, de aminoácidos y de glutamato y en la actividad de la GS son procesos dependientes de luz, se sometieron los explantes de Amaranto a estrés con PEG (-0.5 MPa) en oscuridad.

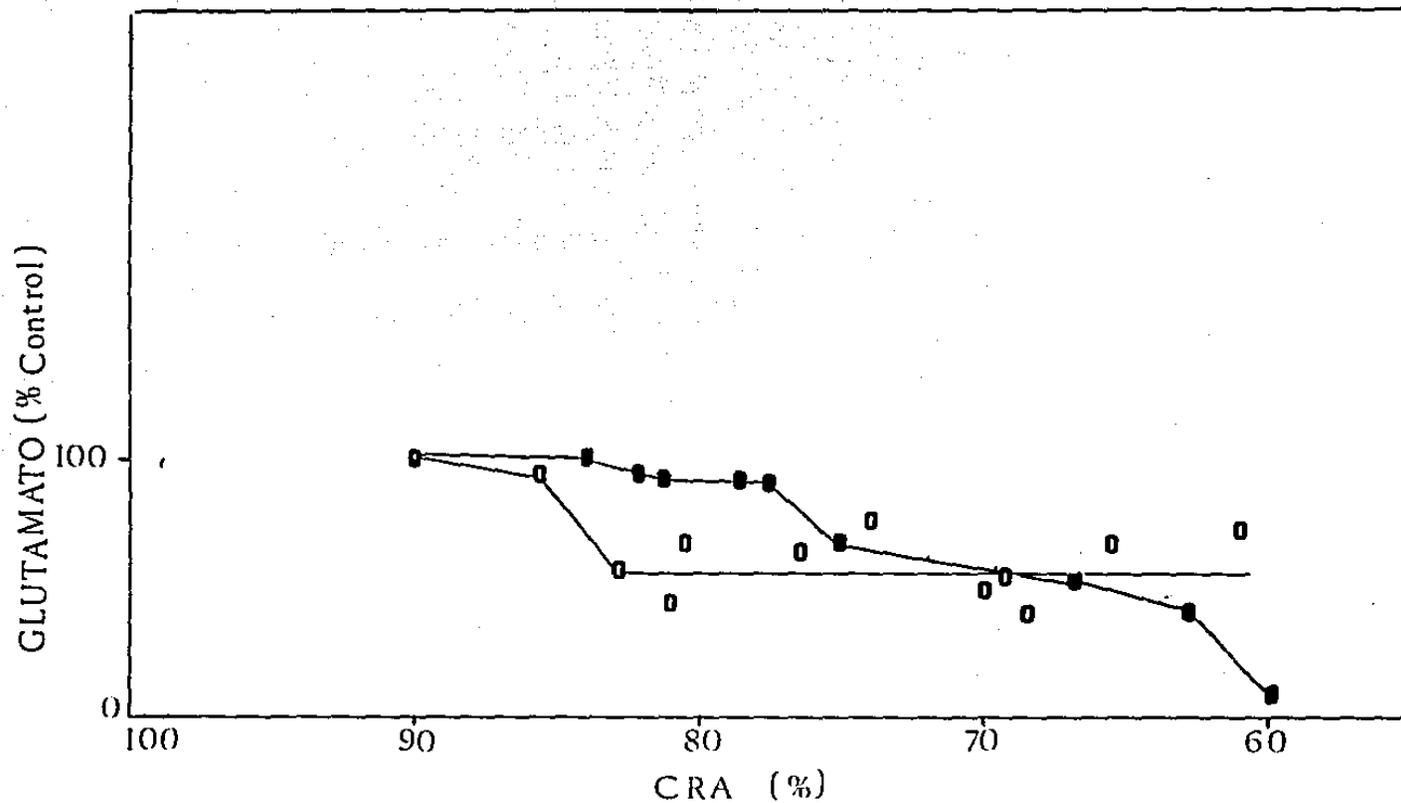


FIG. 11 Cambios en los niveles de glutamato en función del contenido relativo de agua (CRA). El 100% corresponde a 2.34 ± 0.59 mg de glutamato por gramo de peso seco.
 PLANTA COMPLETA (●)
 EXPLANTE (○)

V. 3.1. Determinación de CRA.

La velocidad de la pérdida de agua de los explantes sometidos a PEG en oscuridad es equivalente a la de los explantes sometidos a PEG en luz (fig 12 y 5). Así, a las 10 horas, el tejido alcanzó un valor de CRA de 60%.

V.3.2. Amonio

La acumulación de amonio se observa desde valores de CRA de 84% (Fig. 13). Cuando el tejido ha alcanzado un valor de CRA de 71% aproximadamente, se observa una disminución en los niveles de amonio. Tanto en oscuridad como en luz, la pérdida de agua provoca la acumulación de amonio. Sin embargo, existe un desplazamiento de los dos picos hacia valores menores de CRA con respecto a los observados con luz.

V.3.3. Aminoácidos Totales.

En la figura 14 se muestran los cambios observados en la concentración de aminoácidos totales. A partir de que el tejido alcanza un CRA de 77% y, a medida que va perdiendo agua, existe un incremento en los niveles de los aminoácidos. Sin embargo, alrededor del 70% de CRA, se observó una disminución: por lo tanto, la acumulación de aminoácidos en oscuridad está desplazada a valores de CRA menores que los encontrados en condiciones de luz.

V.3.4. Glutamino Sintetasa.

La actividad de GS de explantes sometidos a estrés con PEG y a

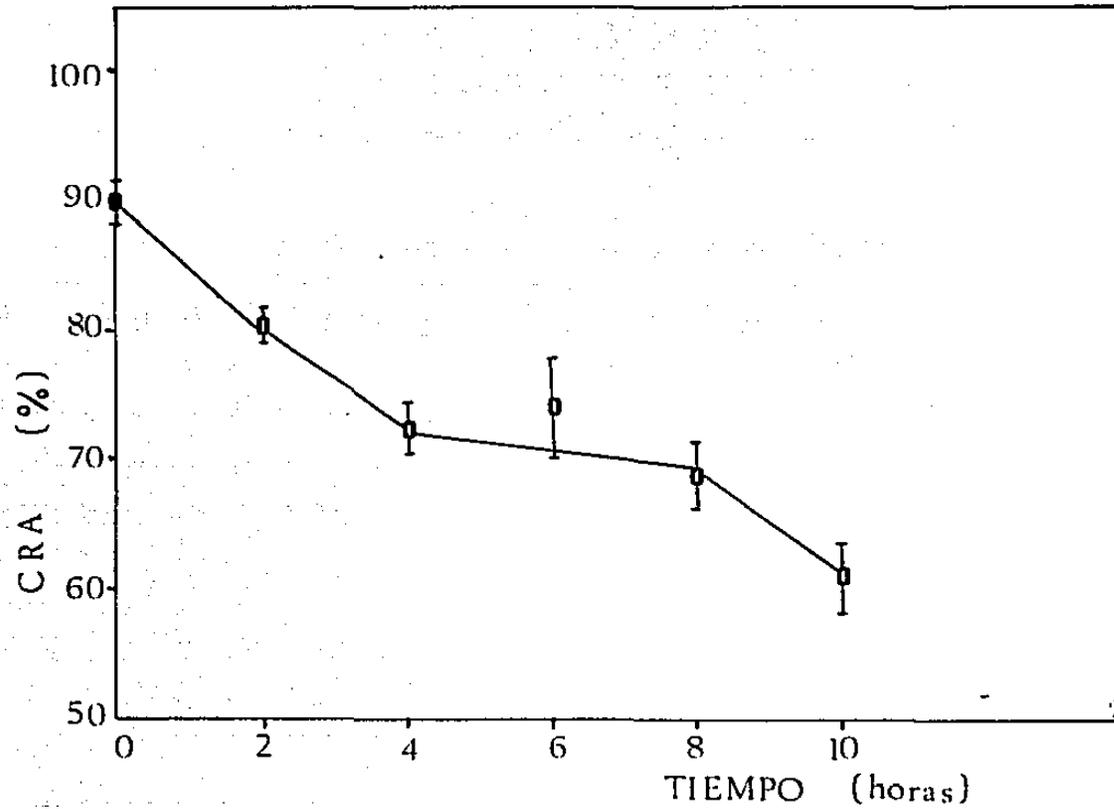


FIG. 12 Efecto de oscuridad sobre los cambios en el contenido relativo de agua (CRA) de explantes sometidos a pérdida de agua con PEG (-0.5MPa) expresados en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones y la desviación estándar.

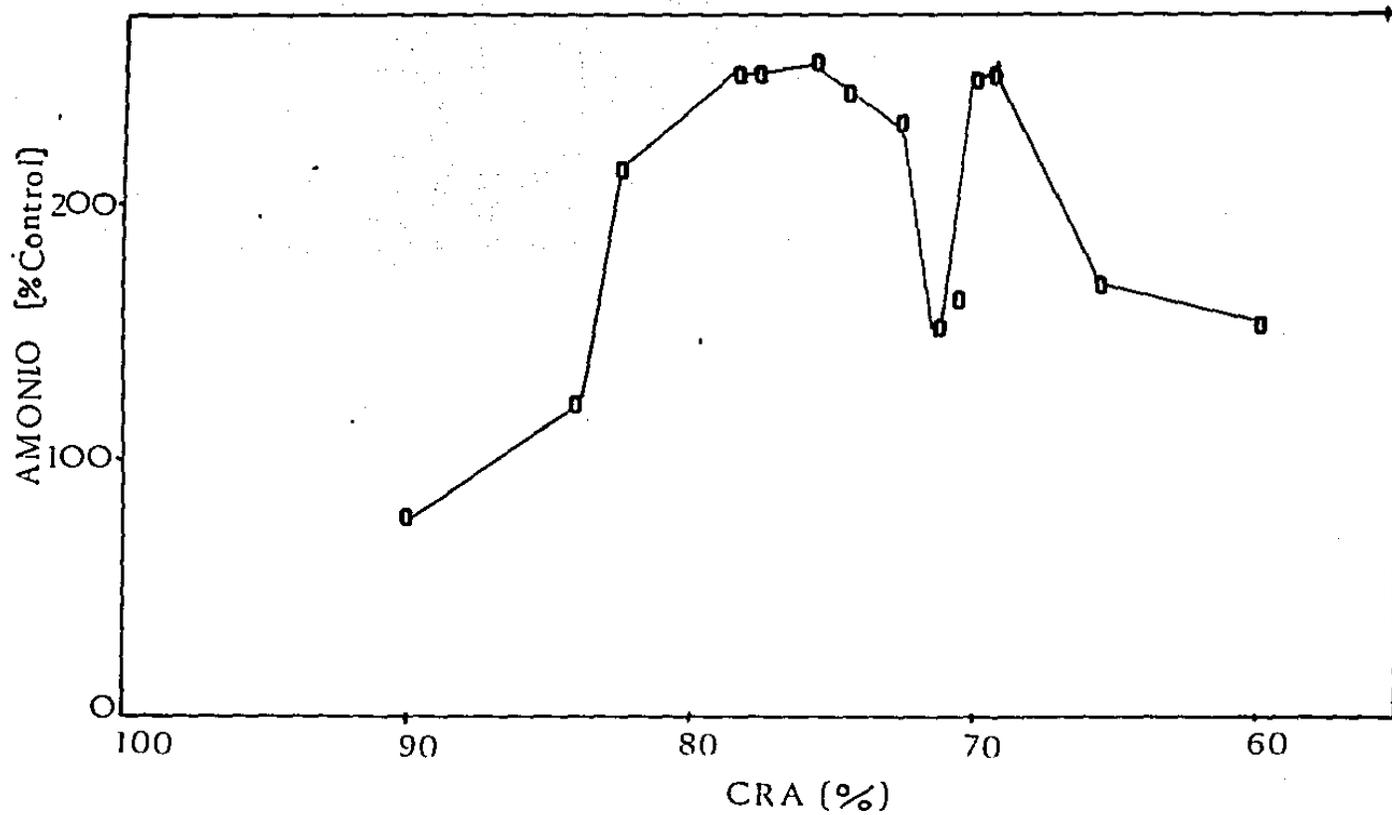


FIG. 13 Efecto de oscuridad sobre los cambios en los niveles de amonio provocados por la pérdida de agua. El 100% corresponde a $50.5 \pm 4.6 \mu\text{m NH}_3$ por gramo de peso seco. EXPLANTE (0)

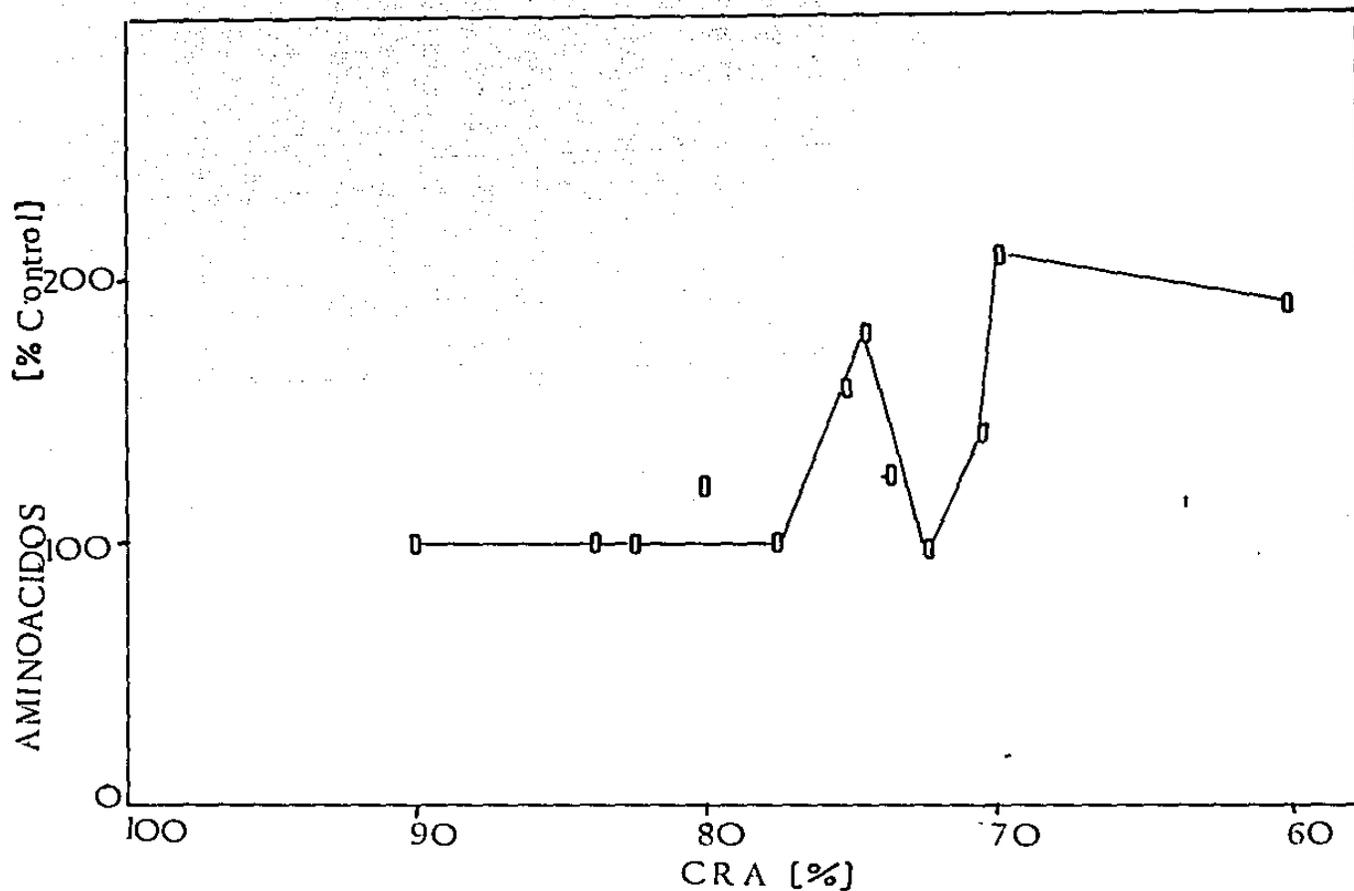


FIG. 14 Efecto de oscuridad sobre los cambios en los niveles de aminoácidos totales provocados por la pérdida de agua. El 100% corresponde a 7.9 ± 1.0 mg de Aa por gramo de peso seco.
EXPLANTE (0)

oscuridad se observa en la figura 15. La actividad de esta enzima tiende a disminuir alcanzándose un valor de 44% con respecto al control. Sin embargo, la actividad se recupera a niveles equivalentes a los del control en el intervalo de 75 a 70% de CRA y posteriormente vuelve a disminuir. Este incremento en la actividad de GS es de menor magnitud al descrito en los explantes sometidos a pérdida de agua en luz.

V.3.5 Glutamato.

Los niveles de glutamato se mantienen constantes hasta valores de 77% de CRA y posteriormente tienden a incrementarse observándose una bajada alrededor del 71% (Fig. 16). Sin embargo, esta bajada no alcanza un valor inferior al del control mientras que en luz la concentración de glutamato siempre fue menor a la del control.

V.4. EFECTO DE NaCl SOBRE EL CRA, LA CONCENTRACION DE AMONIO Y LA ACTIVIDAD DE GS.

El contenido relativo de agua puede ser afectado por exceso de sales en el medio. El NaCl altera la actividad del agua afectando de esta manera el *status* hídrico de la planta (Hasewaga, 1984). Así mismo, los iones afectan directamente las funciones bioquímicas y fisiológicas (Flowers *et al*, 1977). En muchas especies sensibles a NaCl, el calcio puede revertir parcialmente los efectos del sodio (Cramer *et al*, 1986).

Con el objeto de determinar si el calcio puede revertir el efecto de Na⁺ en nuestro sistema, y así evitar el componente iónico del NaCl, se determinó el efecto de CaCl₂ sobre el CRA, la

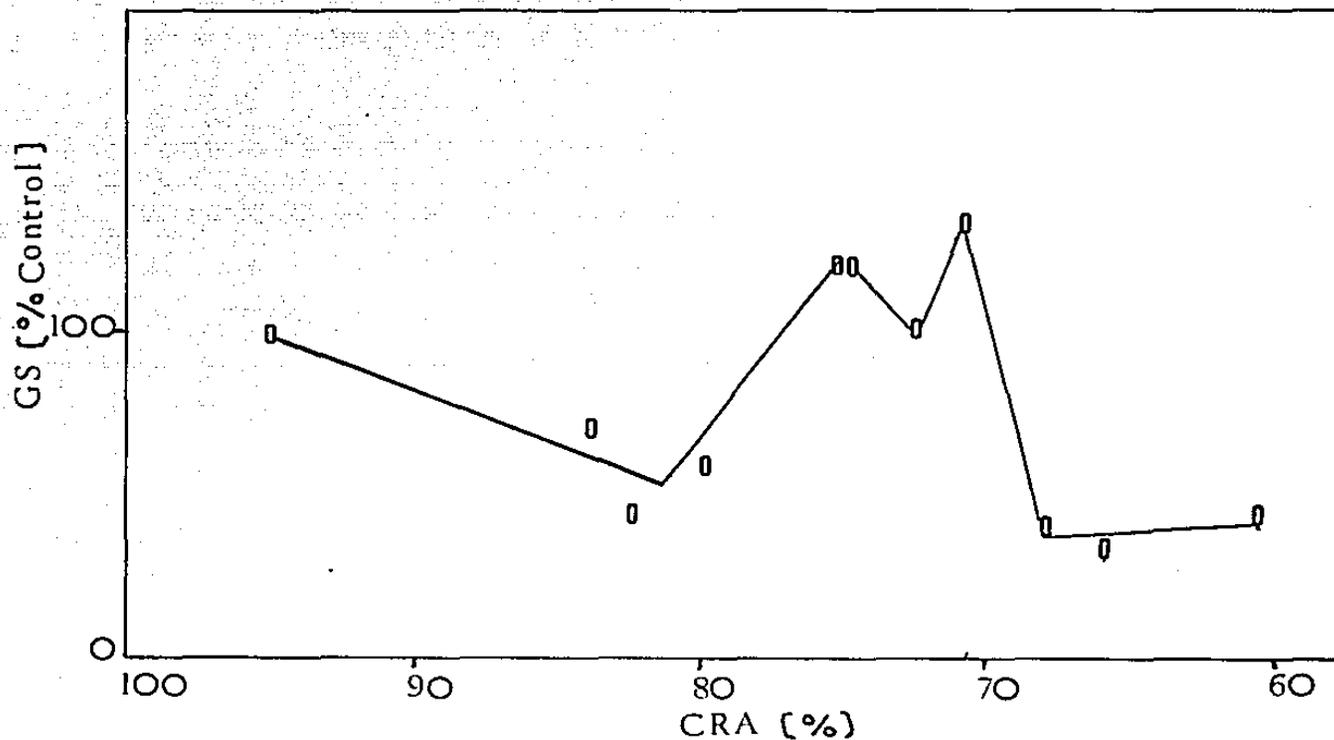


FIG. 15 Efecto de oscuridad sobre los cambios en la actividad de GS provocados por la pérdida de agua. El 100% corresponde a una actividad de $0.2664 \pm 0.035 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ de γ -glutamil por minuto por miligramo de proteína.
EXPLANTE (0)

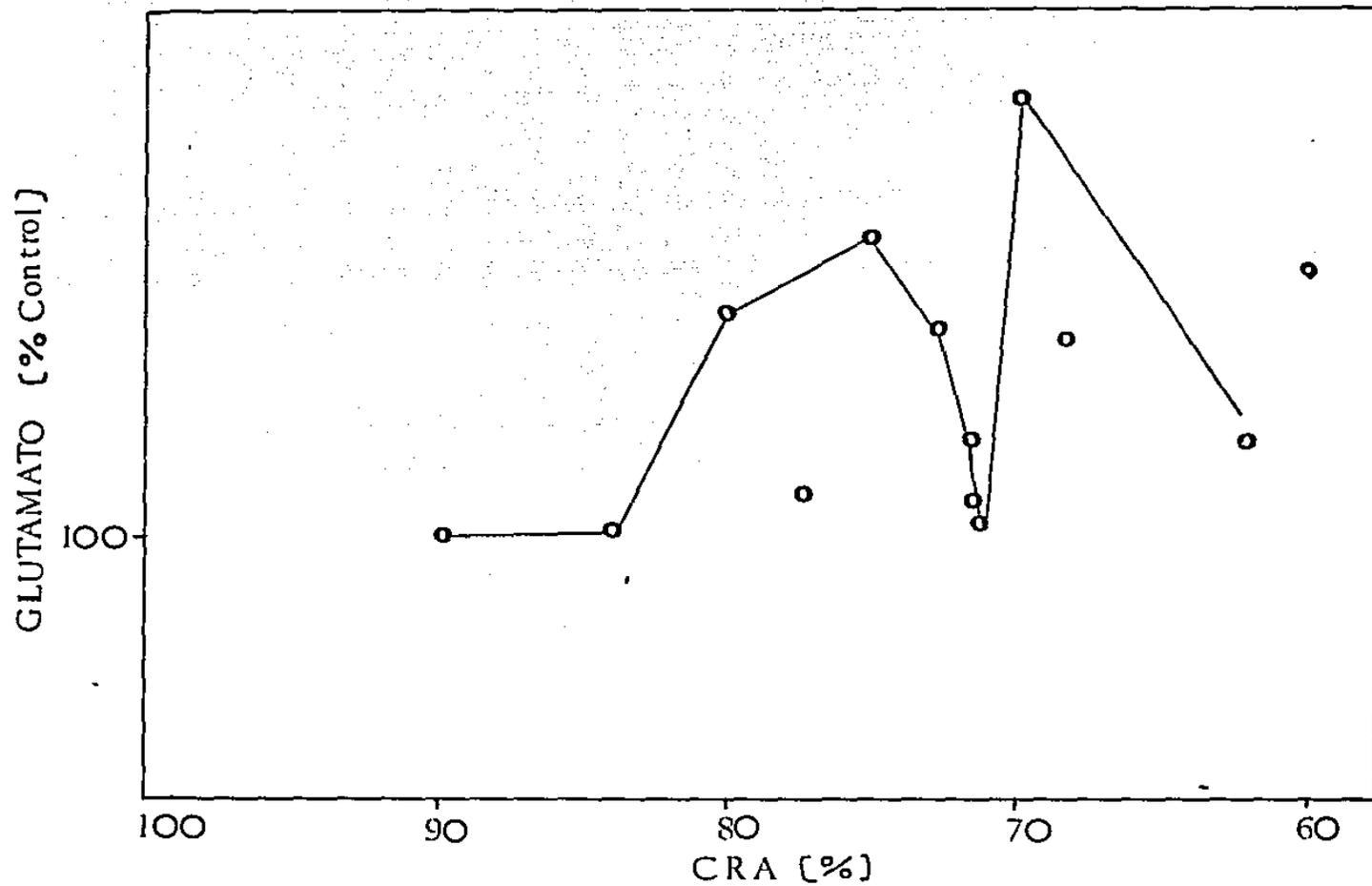


FIG. 16 Efecto de oscuridad sobre los cambios en los niveles de glutamato provocados por la pérdida de agua. El 100% corresponde a 2.34 ± 0.59 mg Glu por gramo de peso seco.
EXPLANTE (0)

concentración de amonio y la actividad de GS en explantes sometidos a estrés salino.

V.4.1. Determinación del CRA.

El efecto de NaCl 150 mM / CaCl₂ 6mM y NaCl 150 mM sobre el CRA en explantes se muestra en la figura 17. El CRA de los explantes sometidos a agobio salino sin y con calcio presenta un valor promedio de 84% en las primeras 8 horas. Sin embargo, a las 4 hrs y a las 26 hrs se observan valores más altos de CRA en los explantes a los que se suministró calcio.

V.4.2 Amonio.

La concentración de amonio tiende a subir en las primeras 4 hrs en los explantes sometidos a agobio salino sin y con calcio (Fig. 18). A partir de las 6 horas, en ambos tratamientos los niveles de amonio son inferiores a los del control aunque en los explantes tratados con calcio, los niveles de amonio se mantienen alrededor de un 65% del control.

V.4.3 Glutamino Sintetasa.

El efecto de NaCl y de NaCl y de CaCl₂ sobre la actividad de GS se muestra en la figura 19. En los explantes sin calcio, la actividad de GS aumenta ligeramente a las 2 hrs. pero posteriormente tiende a disminuir mientras que en los explantes tratados con calcio, a las 4 hrs. se ve el incremento en la actividad y después una brusca disminución.

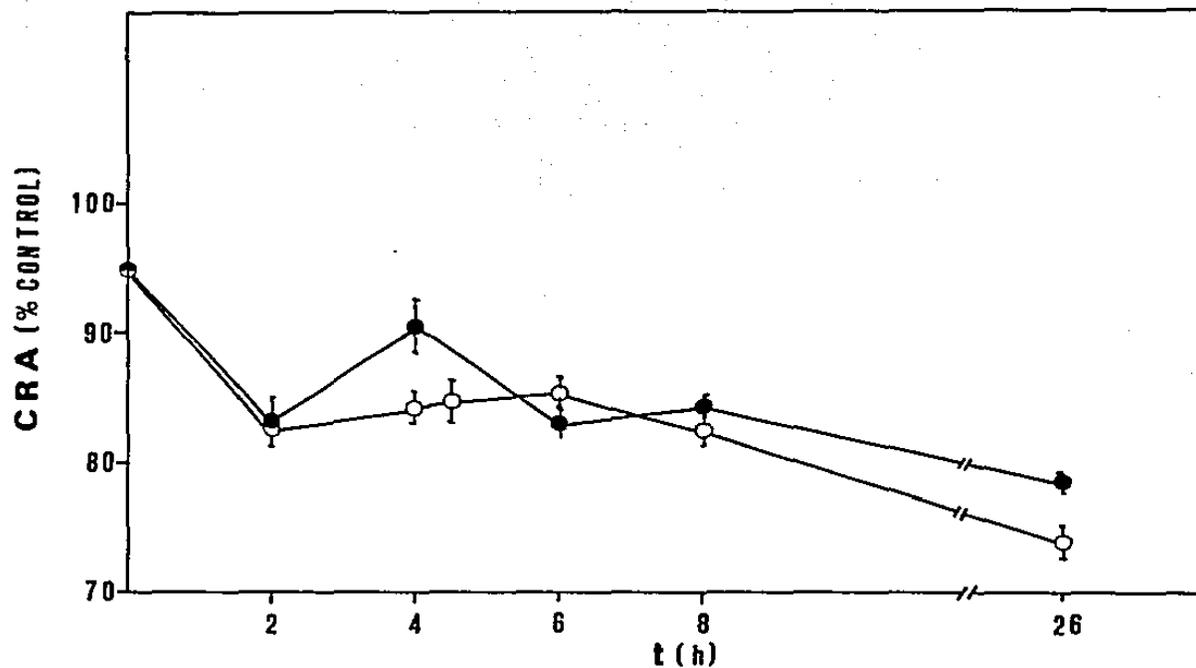


FIG. 17 Efecto de calcio sobre el contenido relativo de agua (CRA) de explantes sometidos a agobio salino. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones y desviación estandar.
NaCl 150 mM (○)
NaCl 150 mM + CaCl₂ 3 mM (●)

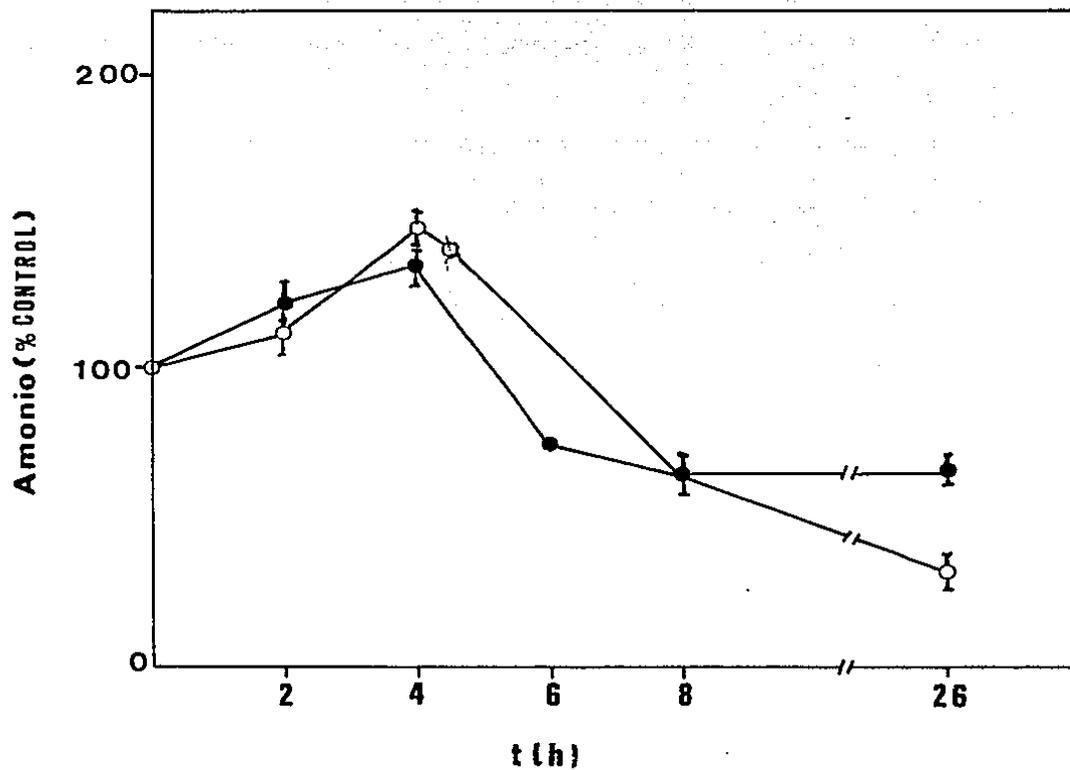


FIG. 18 Efecto de calcio sobre los niveles de amonio de explantes sometidos a agobio salino. Cada punto representa el promedio de 5 determinaciones y su desviación estandar.
NaCl 150 mM (○)
NaCl 150 mM + CaCl₂ 3mM (●)

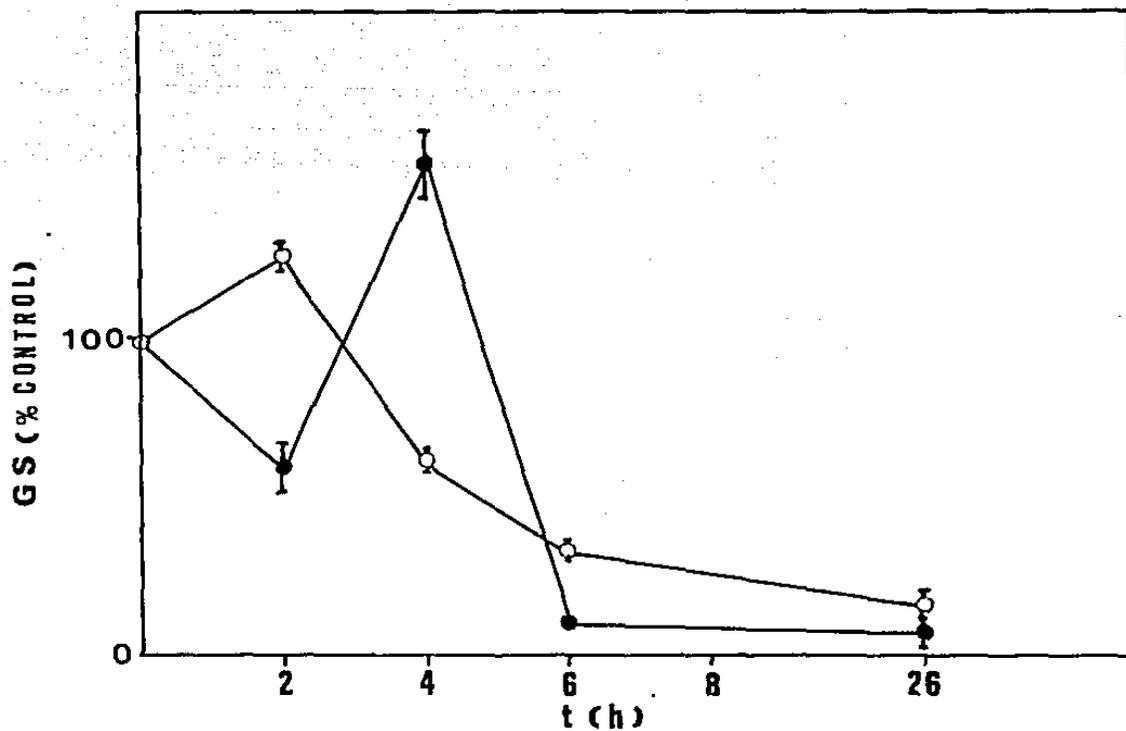


FIG. 19 Efecto de calcio sobre la actividad de GS de explantes sometidos a agobio salino. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones y su desviación estandar.
NaCl 150 mM (○)
NaCl 150 mM + CaCl₂ 3 mM (●)

V.4.4 Planta completa.

La concentración de NaCl utilizada en la planta completa fué de 300mM puesto que con concentraciones menores no se detectaron cambios en el CRA. A las 24 hrs. del tratamiento con NaCl 300mM, el CRA descendió hasta un valor de 80% llegando hasta el 68% al quinto día de tratamiento. Los niveles de amonio empezaron a disminuir al segundo día de tratamiento (manteniéndose constantes alrededor de un valor equivalente al 60% del control (Fig. 20). La actividad de GS se mantuvo equivalente a la del control durante los dos primeros días de agobio pero a partir del quinto día ya no se detectó actividad alguna.

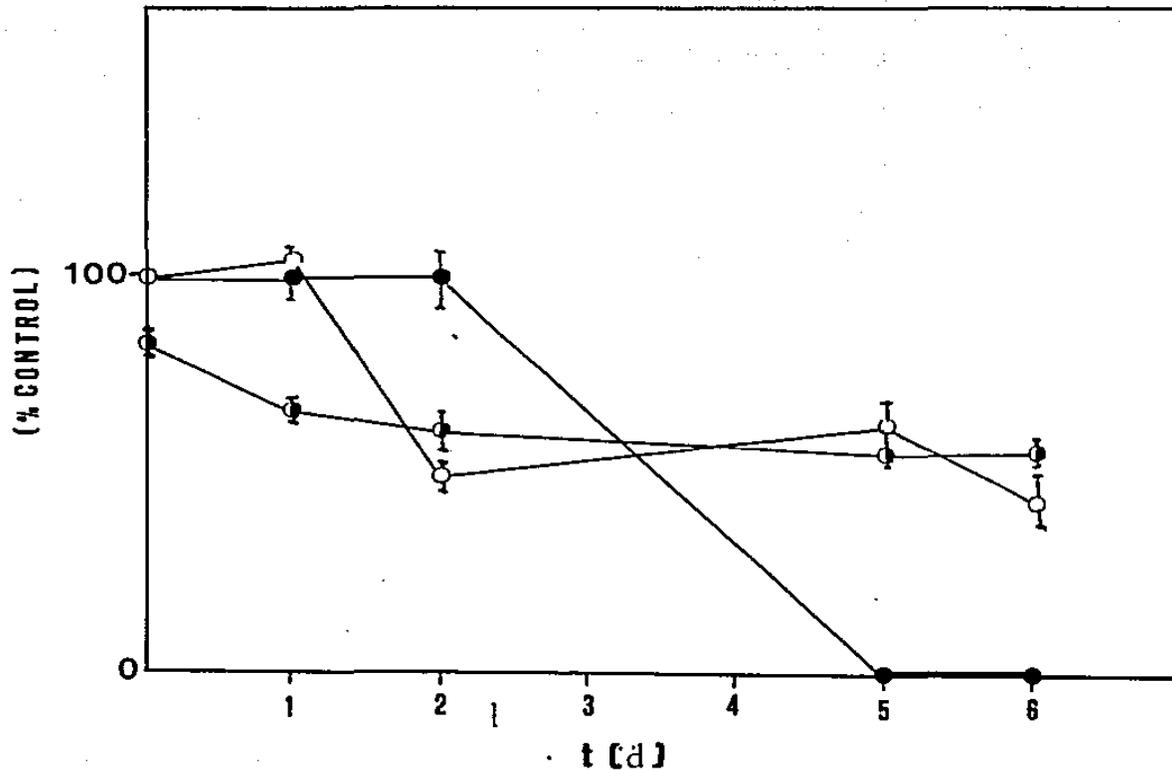


FIG. 20 Efecto de NaCl 300mM sobre el contenido relativo de agua (CRA) (●), los niveles de amonio (○) y la actividad de GS (○). Cada punto representa el promedio de al menos 3 determinaciones y la desviación estandar.
PLANTA COMPLETA

VI. DISCUSION

La asimilación del amonio y el metabolismo de aminoácidos están integralmente involucrados en las respuestas de los vegetales a agobio tanto de déficit de agua como salino. Aunque existen gran cantidad de reportes acerca del efecto del agobio tanto de sequía como de salinidad sobre el metabolismo del nitrógeno, éstos no están dados como secuencia de eventos a medida que la planta va perdiendo agua. Estos eventos han sido descritos en función del tiempo o como cambios en los potenciales de agua provocados por la pérdida de agua. Sin embargo, no se ha podido establecer si el potencial de agua es un parámetro crítico que determine las funciones fisiológicas (Bradford y Hsiao, 1982). Por otro lado, si se ha demostrado una relación entre los cambios en el volumen celular provocados por la pérdida de agua y los cambios en los procesos fisiológicos. Así, la inhibición de la actividad fotosintética tiene lugar a un volumen celular determinado, aún cuando las plantas presenten una sensibilidad diferente a la pérdida de agua (Kaiser, 1982).

En este trabajo se sugiere que, por un lado, los eventos ya descritos involucrados en el metabolismo del nitrógeno pueden ser integrados al relacionarlos con el CRA y, por otro lado, los eventos bioquímicos de respuesta a la pérdida de agua se llevan a cabo aunque la planta no esté en peligro inminente de daño a sus funciones.

Los cambios en la concentración de amonio (fig. 6), en la concentración de aminoácidos libres (fig. 7), en la concentración

de glutamato (fig 11) y en las actividades de GS (fig 8) y de GDH (Fig 10) pueden ser descritos en función del CRA. Estos eventos parecen ser independientes de la velocidad con que ocurra la pérdida de agua ya que se llevan a cabo de manera equivalente en la planta completa, donde la pérdida de agua es más lenta (Fig 4) que en el explante en donde la pérdida de agua es más rápida (Fig.5); a diferencia de lo reportado para la acumulación de otros solutos que parece estar afectada por la velocidad de pérdida de agua (Morgan, 1984).

La acumulación de amonio en respuesta a agobio de sequía y salino (Levitt, 1980 ; Flores and Galston, 1984) ha sido reportada como consecuencia de un desarreglo en la síntesis proteica y una subsecuente desaminación de los aminoácidos liberados. Otra posible fuente de amonio es la nitrato reductasa, pero su actividad se encuentra muy reducida durante la pérdida de agua a valores de CRA mayores al 80% (Sivaramakrishnan *et al*, 1988). Por otro lado, se ha sugerido que la acumulación de amonio en especies halófitas puede ser consecuencia de un efecto del NaCl sobre el metabolismo fotorrespiratorio por efecto de glicina sobre la transformación a serina (Pulich, 1986). El amaranto presenta dos picos de acumulación de amonio en función del CRA (fig 6). Se piensa que el primer pico de amonio puede provenir de la reacción de fotorrespiración. Aunque el Amaranto es una planta C₄, el amonio derivado de este proceso puede exceder al producido por la reducción de nitrato (Martin, F. *et al*, 1983). El segundo pico podría estar relacionado con la desaminación de los aminoácidos acumulados en consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas, ya que el amonio se acumula en forma posterior a la

acumulación de los aminoácidos al expresar ambos eventos en función del CRA (fig. 7).

La acumulación de amonio en respuesta a la pérdida de agua en oscuridad también presenta dos picos. (Fig. 12). Estos dos picos, de menor magnitud, se encuentran desplazados hacia valores de CRA menores. Sin embargo, se considera que la primera elevación de los niveles de amonio no debe provenir de proteólisis puesto que la acumulación de aminoácidos tiene lugar a un valor de CRA menor (Fig.13). Aunque el proceso de fotorrespiración es dependiente de luz, el amonio liberado puede provenir de una activación de la conversión de glicina a serina ya que la serina es un precursor de la síntesis de la glicinabetaína, la cual es acumulada en valores de CRA menores en este mismo sistema (Gamboa, *et al.* 1989).

Se ha sugerido que el amonio liberado durante la pérdida de agua puede provocar daños en el metabolismo en general (Levitt, 1980). El amonio puede alterar tanto el pH celular como la captación del agua (Quebedeaux y Ozburgh, 1973) y los niveles de la enzima glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (Hecht *et al.*, 1988). Por lo tanto, los procesos de asimilación de amonio son parte importante de la respuesta metabólica a la pérdida de agua.

La acumulación temprana de amonio puede ser consecuencia de los procesos de liberación, descritos anteriormente, disparados por la pérdida de agua y la activación posterior de la asimilación de amonio. Estos procesos se pueden llevar a cabo a través de las dos rutas descritas para la asimilación del amonio. La asimilación de amonio en este sistema parece ser a través del ciclo GS/GOGAT, puesto que la GS presenta un incremento en la actividad en el intervalo de CRA que corresponde a la bajada de amonio (Fig.

8). Así mismo, se ha enfatizado que el amonio liberado durante el proceso fotorrespiratorio es asimilado por medio del ciclo GS/GOGAT (Givan *et al*, 1988). Por otro lado, la actividad de la GDH tiende a disminuir a medida que el tejido pierde agua (Fig. 10).

Está bien establecido que la GS está presente en dos compartimentos en las células de hoja de la mayoría de las plantas (Mc Nally *et al*, 1983). Una de las isoformas se localiza en citoplasma (GSI) (Hirel y Gadai, 1980) mientras que la otra se localiza en cloroplasto (GSII) (Hirel *et al*, 1982). Además, el amonio derivado de la fotorrespiración es asimilado por la GS cloroplástica (Wallsgrave *et al*, 1987). En las plantas C_4 , las dos isoformas se encuentran tanto en las células de la vaina vascular como las de mesófilo. Se ha postulado que la asimilación del amonio derivado de la fotorrespiración tiene lugar en el cloroplasto de las células de vaina, mientras que el amonio producido por la reducción del nitrato es asimilado en las células de mesófilo (Yamaya y Oaks, 1988). Por lo tanto, se considera que probablemente solo una de las isoformas de la GS participe en la asimilación del amonio liberado durante la pérdida de agua. Así, el estudio de la compartimentalización de los eventos es de suma importancia.

La actividad de GS está regulada principalmente por carga energética (Miflin, 1981). Este mecanismo de control determina que la actividad pueda variar según el estado fisiológico de la planta. En Amaranto, las variaciones en la actividad de GS se observan en intervalos de CHA donde es probable que no ocurran cambios en la actividad fotosintética, puesto que la

inhibición significativa en la fotosíntesis se lleva a cabo cuando el CRA ha decrecido hasta un 55% (Kaiser, 1982) Sin embargo, la actividad basal de la enzima está ligada a la presencia de luz. En *Lemna*, la ausencia de luz provoca una pérdida rápida de GS extraíble. No obstante, el efecto de la luz sobre las isoformas parece ser diferencial. Así, se ha descrito que la luz provoca una acumulación únicamente del ARN mensajero de GSII (Tingey *et al.*, 1988) Esta acumulación del mRNA de GSII puede ser también resultado del estado metabólico del cloroplasto. En *Pisum sativum*, la fotorrespiración provoca una acumulación cuatro veces mayor del RNA mensajero de GSII y se considera que el amonio puede estar involucrado en este evento (Edwards y Coruzzi, 1989).

La actividad de GS en explantes sometidos a pérdida de agua en oscuridad tiende a disminuir aunque existe una recuperación en la actividad que corresponde al intervalo en el que se observa una disminución en los niveles de amonio (Figs. 13 y 15). Por lo tanto, los cambios provocados por la pérdida de agua en la actividad de GS pueden ser considerados independientes de los sistemas de regulación de esta enzima por luz y podrían estar regulados directamente o indirectamente por los niveles de amonio liberado.

Por otro lado, se ha reportado que existen grandes variaciones en la actividad de GS a lo largo del día (Stewart *et al.*, 1980). Sin embargo, los explantes que se colocaron en agua no presentaron variaciones en la actividad a lo largo del tratamiento (Fig. 9).

El aumento en la actividad de GDH en respuesta a la pérdida de agua ha sido reportada en diversas plantas (Miranda-Ham y

Loyola Vargas, 1987). En Amarantho, la actividad de esta enzima permanece constante hasta un valor de 76% de CRA y después tiende a disminuir. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la vía de asimilación de amonio en las plantas de amarantho sometidas a pérdida de agua sea el ciclo GS/GOGAT.

La acumulación de aminoácidos es una respuesta general a varios tipos de estrés (Levitt, 1980 ; Pulich, 1986; Hipkin, 1982). Se ha reportado que la acumulación de aminoácidos y la consiguiente acumulación de amonio son resultado de una proteólisis que permite, de esta manera, sintetizar nuevos aminoácidos y proteínas a través de la asimilación de amonio (Hipkin, 1982). La acumulación de aminoácidos, en este sistema, es posterior a la liberación de amonio. Como ya se mencionó antes, es posible que solo el segundo pico de amonio corresponda a la desaminación de estos aminoácidos acumulados como resultado de la proteólisis tanto en luz como en oscuridad.

En oscuridad, a diferencia de lo encontrado en los explantes sometidos a déficit de agua en luz, la pérdida de agua provoca un incremento en los niveles de glutamato (Fig. 15). El aumento en la concentración de este aminoácido comienza en el mismo valor que el observado para los aminoácidos totales por lo que se considera que este incremento es resultado del proceso de proteólisis y, puesto que la actividad de la GS en oscuridad es muy reducida, no es utilizado como puede ocurrir en la luz. Así mismo, en el intervalo de CRA donde se observa una recuperación de la actividad de GS, hay una disminución en los niveles de glutamato.

En resumen, los procesos del metabolismo del nitrógeno

estudiados involucrados en la respuesta a la pérdida de agua parecen estar relacionados de la siguiente manera: El primer evento es un incremento en los niveles de amonio posiblemente de origen fotorrespiratorio, el cual es reasimilado por la GS probablemente cloroplástica. La posterior acumulación y desaminación de los aminoácidos posiblemente determina el incremento en los niveles de amonio observados a valores de CRA mas bajos.

Salinidad.

Los mecanismos de tolerancia a salinidad han sido ampliamente estudiados (Flowers *et al*, 1977; Cheeseman, 1988). El efecto adverso de la salinidad puede ser tanto a a nivel de la permeabilidad de la membrana o de la actividad de las diferentes enzimas por una interacción directa de los iones con estos como a nivel del volumen celular al afectar los iones el potencial hídrico (Daines y Gould, 1985; Hasewaga *et al*, 1986) Por lo tanto, la respuesta al agobio salino es muy compleja, especialmente en aquellas plantas que no presentan mecanismos de exclusión o compartimentalización de los iones, consideradas como plantas no halófitas (Grennway and Rana Munns, 1980).

El amaranto es una planta que presenta un uso eficiente de agua y responde a la pérdida de agua acumulando glicinabetaína; y prolina (Gamboa *et al*, 1989). Sin embargo, su tolerancia a NaCl no ha sido estudiada. En la planta completa, a partir del segundo día de estrés, se observó una reducción marcada de los niveles de amonio y de la actividad de GS (Figs.17 y 18). No obstante, el contenido relativo de agua varió poco (Fig.16). Se considera

que el efecto directo de los iones impidió la respuesta a la pérdida de agua. Así mismo, se ha sugerido que en las plantas no halófitas sujetas a estrés salino, el déficit de agua no es el factor limitante del crecimiento (Munns y Termaat, 1986)

La participación e integración de la planta es necesaria durante la respuesta al estrés salino (Cheesman, 1988). Por esto, se sugiere que, en el amaranto, el explante presenta una mayor sensibilidad al NaCl que la planta completa.

Las interacciones del calcio con el sodio en los procesos de tolerancia a salinidad han sido ampliamente estudiadas (La Haye, y Epstein, 1970; Kent y Laüchli, 1985; Cramer et al, 1985). El sodio desplaza al calcio que se encuentra unido a la membrana y también parece provocar la salida de calcio de los compartimentos intracelulares (Lynch y Laüchli, 1988). Por lo tanto, la presencia de calcio exógeno puede revertir algunos efectos tóxicos del sodio.

Los explantes sometidos a agobio salino con calcio no presentaron diferencia ni en los cambios en CRA ni en los niveles de amonio (Figs. 16 y 17). Sin embargo, el incremento en la actividad de la GS se observó solo a las 4 horas de estrés. Aún cuando el calcio no puede revertir por completo los efectos tóxicos del sodio como ión, sí presenta un efecto significativo sobre la actividad de GS de explantes sometidos a agobio salino.

El sistema de transducción de señales que involucra a los fosfoinosítidos y al calcio es afectado por el exceso de NaCl en el medio (Lynch y Laüchli, 1988). Así, el estrés puede provocar alteraciones en los sistemas de transducción de señales. Por lo tanto, se considera de importancia el estudio de la participación

del calcio en los mecanismos de tolerancia a salinidad y pérdida de agua en relación a su papel como segundo mensajero. Se propone que el sistema de explante de amaranto y la respuesta descrita a lo largo de este trabajo pueden ser utilizados para estudiar la participación del calcio en la respuesta a la pérdida de agua a nivel de su función como segundo mensajero.

CONCLUSIONES

1. El Amarantho responde bioquímicamente a pérdidas pequeñas de agua.
2. Los eventos estudiados se pueden expresar en función del CRA independientemente de la velocidad de la pérdida de agua.
3. El amonio que se acumula entre 84 y 80% de CRA no parece provenir de una desaminación de aminoácidos ya que la acumulación de éstos es un evento posterior.
4. En el Amarantho, el amonio parece ser reasimilado por la GS.
5. El cambio en la actividad de GS provocado por la pérdida de agua parece ser independiente a los sistemas de regulación de la enzima sujetos a luz.
6. El amaranto no tolera altas concentraciones de NaCl. Así, en el agobio salino, el efecto del Na^+ es mas importante que la pérdida de agua.

REFERENCIAS

- Berkowitz, G.A. and K.S.Kroll (1988) Acclimation of photosynthesis in *Zea mays* to low water potentials involves alterations in protoplast volume reduction. *Planta* 175: 374-379.
- Bottacin, A., G. Cacco and A. Saccomani (1985) Nitrogen absorption and assimilation in NaCl-resistant and NaCl-susceptible millet genotypes (*Pennisetum americanum*). *Can. J. Bot.* 63: 517-520.
- Boucaud, J. and J.P. Billard (1981) La glutamine synthétase de *Suaeda maritima*. Action *in vivo* et *in vitro* du NaCl. *Physiol. Plant.* 53: 558-564.
- Bradford, K.J. and T.C. Hsiao (1982) Physiological responses to moderate water stress. In: *Physiological Plant Ecology II. Water relations and carbon assimilation. Vol 12B. Encyclopedia of Plant Physiology.* U.L. Lange, P.S. Nobel, C.E. Osmond and A. Ziegler, eds. Springer Verlag.
- Clarke, J.M. and R.C. Durley. (1981). The responses of plant to drought stress. In: *Water stress on plants.* Simpson, G. Ed. Praeger.
- Cocking, E. C. and E.W. Yem (1954) Estimation of aminoacids by ninhydrin. *Biochem J.* XI N.
- Cooke, R.J., J. Olive and D.D. Davies (1979). Stress and protein turnover in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* 64, 1109-1113.
- Cramer, G.R., A. Läuchli and V.S. Polito. (1985) Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol.* 79: 207-211.
- Cramer G.R., A. Läuchli, V.S. and E. Epstein (1986) Effects of NaCl and $CaCl_2$ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiol.* 81: 792-797.
- Cheesman, J.M. (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87, 547-550.
- Chowdhury, S. K. and M.A. Choudhuri (1986) Effects of calcium ions on responses of two jute species under water-deficit stress. *Physiol Plant.* 68: 86-92.
- Daines, R.J. and A.R. Gould (1985) The cellular basis of salt tolerance studied with tissue cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata*. *J. Plant Physiol.* 119: 269-280.
- Edwards, J.W. and G.M. Coruzzi (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The Plant Cell* 1: 241-248.
- Fitter, A.H. and R.K.M. Hay (1983) *Environmental Physiology of Plants.* Academic Press, London.

Flores I. and A.W. Galston. (1984) Osmotic stress induced polyamine accumulation in cereal leaves. II. Relation to aminoacids pools. *Plant Physiol.* 75; 110-113.

Flowers, T.J., P.F. Troke and A.R. Yeo. (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28; 89-121.

Gamboa, A., E. Valenzuela and E. Murillo (1989) Influence of cellular volume on rapid biochemical changes during water loss in *Amaranthus hypochondriacus*. *J. Plant Physiol.* Submitted.

Givan, C.V., K.W. Joy and L.A. Kleczkowski (1988). A decade for photorespiratory nitrogen cycling. *TIBS* 13:434-437.

Greenway, H. and Rana Munns (1980) Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.

Hanower S. and A. Brazozowska (1975) Influence d'un choc osmotique sur la composition des feuilles de cotonier en acides amines libres. *Phytochem.* 14, 1691-1694.

Hasewaga, P.M., R.A. Bressan and A.K. Handa (1986) Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort Science* 21: 1317-1324.

Hecht, U., R. Delmüller, S. Schmidt and H. Mohr. (1988) Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustards seedlings. *Planta* 175: 130-138.

Hipkin C.R., S.A. Everest, T.A.V. Rees, and F.J. Syrett. (1982) Ammonium generation by nitrogen starved cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 154; 587-592.

Hirel, B. and P. Gadal (1980). Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzyme from roots and leaves. *Plant Physiol.* 66: 619-623.

Hirel, B. Perrot-Rechenmann, P., Suzuki, A., Vidal, J. and P. Gadal. (1982) Glutamine synthetase in spinach leaves. Immunological studies and immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* 69: 983-987.

Jager, H.J. and H.R. Meyer (1977) Effects of water stress on growth and protein metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. *Oecologia* (Berl) 30:83-96.

Jarvis, P.B. and H.T. Tyree (1982). Water in tissues and cells. In: *Physiological Plant Ecology II. Water relations and carbon assimilation*. Encyclopedia of Plant Physiology Vol 12-B. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler Eds. Springer Verlag.

Kaur, J., J.S. Sheoran and R. Singh (1985) Effect of water stress on the enzymes of nitrogen metabolism in mung bean (*Vigna radiata* Wilczek) nodules. *Plant, cell and Environ.* 8: 195-220.

Kaiser, W.M. (1982) Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hydro-, meso- and xerophytes under osmotic stress. *Planta* 154, 538-545.

Kent, L.M. and A. Laüchli. (1985) Germination and seedling growth of cotton salinity-calcium interactions. *Plant Physiol* 25; 213-218.

Kramer, P.J.F (1980) Drought, stress, and the origin of adaptations. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Turner and Kramer eds. A Wiley Interscience Publication.

La Haye P.A. and E. Epstein (1971) Calcium and salt tolerance by bean plants. *Plant Physiol* 25; 213-218.

Levitt, J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. Vol II. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, N.Y.

Loyola-Vargas, V.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1984) Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol*, 76, 534-540.

Lynch, J. and A. Laüchli (1988) Salinity affects intracellular calcium in corn root protoplasts. *Plant Physiol*. 87, 351-356.

Martin, F., M.J. Winspear, J.D. Mac Farlane and A. Oaks (1983). Effect of methionine sulfoximine on the accumulation of ammonia in C₃ and C₄ leaves. *Plant Physiol*. 71: 177-181.

Mc Nally, S.F., Hirel, B., Gadat P., Mann, A.F., and G.R. Stewart (1983) Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within leaf. *Plant Physiol*. 72: 22-25.

Miflin, B.J., R.M. Wallsgrave and P.J. Lea (1981). Glutamine metabolism in higher plants. In: *Current Topics of Cellular Regulation*, Vol 20. Academic Press, pp 1-13.

Miranda-Ham M.L. and Loyola -Vargas V.M. (1987) *In vitro* effects of PEG and proline on ammonium assimilation enzymes of maize. *J. Plant Physiol*.

Morilla C.A., Boyer, J.S. and R.H. Hagemann (1973) Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L.) having low leaf water potentials. *Plant Physiol* 51: 817-824.

Morgan J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 35, 299-319.

Munns, R. and A. Termaat (1986) Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol*. 13: 143-160.

Passioura, J.B. (1982) Water in the soil-plant-atmosphere

continuum. In: Physiological Plant Ecology II. Water relations and carbon assimilation. Encyclopedia of Plant Physiology Vol 12-B. O.L. Lange, F.S. Nobel, C.B. Osmond and H.Ziegler Eds. Springer Verlag.

Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.

Pierce, M. and Raschke K. (1978) The relationship between abscisic acid accumulation and leaf turgor. *Plant Physiol.* 61 (Suppl) 25.

Polkahoff-Meyer A. (1981) Biochemical and physiological responses of higher plants to salinity stress. In: Biosaline Research. A look to the future. A.San Pietro Ed. Plenum Press Pp. 245-270.

Pulich, W.M. (1986). Variations in leaf soluble amino acids and ammonium content in subtropical seagrasses related to salinity stress. *Plant Physiol* 80; 283-286.

Quebedeaux and Ozbun (1973). Effects of ammonium nutrition on water stress, water uptake and root pressure in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Physiol.* 52: 677-679.

Rakova, N.M., L.K. Klysher and B.K. Kasymbekov (1978). Effects of sodium sulphate and sodium chloride on activity of the enzymes of primary ammonium nitrogen assimilation in plant roots. *Fiziologia Rasteni* 25: 39-43.

Rains, D.W. (1972). Salt transport in plants in relation to salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 367-388.

Richter, H. (1978) A diagram for the description of water relations in plant cells and organs. *J. Exp. Bot.* 29 (112): 1197-1203.

Rio Portilla M.A. del (1988) El contenido relativo de agua: características en *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis. ENEP Zaragoza, UNAM.

Sinclair, T.R. and M.M. Ludlow (1985) Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Aus. J. Plant Physiol.* 12 (2): 213-217.

Sivaramakrishnan, S., V.Z. Patell, D.S. Flower and J.M. Peacock (1988) Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mild season drought stress. *Physiol Plant.* 74; 418-426.

Stewart, C.R. and Lee, J.A. (1974) The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 129: 279-289.

Storey, R. and Wyn Jones, R.G. (1977) Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochem.* 16:447-456.

Tingey S.V., I.Y. Tsai, J.W. Edwards, E.L. Walker and B.M. Coruzzi (1988) Chloroplast and cytosolic GS are encoded by homologous

nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. J Biol. Chem. 263: 9651-9657.

Wallsgrave, R.M, Turner, J.C.Hall, N.P., Kendally, A.C., and S.W.J. Bright (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase -Biochemical and genetic analysis. Plant Physiol. 83: 155-158.

Wright, S.T.C. (1977) The relationship between water potential (ψ leaf) and the levels of abscisic acid and ethylene in excised wheat leaves. Planta 134; 183-189.

Wyn Jones, R.G, R. Storey, R.A. Leigh, N. Ahmad, and A. Pollard (1977) A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: Regulation of cell membrane activities in plants. Marré and Ciferri (Eds). Elsevier/North Holland. Amsterdam. pp 121-136.

Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowler and G.N. Somero. (1982) Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. Science 217; 1214-1222.

Yamaya, T. and A. Oaks. (1988) Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. Physiol. Plant. 72: 23-28.

Zabada, T.J, (1974) A water potential threshold for the increase of abscisic acid in leaves. Plant Physiol. 53;125-127.