

88
2 ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO EN UN CULTIVO
EN SUSPENSIÓN DE Bouvardia ternifolia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIO GUTIERREZ RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1990



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

Resumen	1
Introducción	2
1. Descripción de la Nitrato Reductasa	3
2. Toma de Nitrato	5
3. Transporte de Nitrato	6
4. Influencia de Luz	7
5. Influencia de Iones en la Toma de Nitrato	9
6. Influencia de Carbohidratos	10
7. Vías Alternativas Después de la Toma de Nitrato	12
8. Cultivo de Tejidos Vegetales	15
9. <i>Bouvardia ternifolia</i>	16
Objetivos	18
Material y Método	19
1. Determinación de Nitrato	21
1.1. Método de Cataldo	24
2. Registros de pH	26
2.1. Medios Amortiguados	27
2.2. Periodos Largos de Exposición a Nitrato	28
Resultados	30
Discusión	47
1. Altas y Bajas Concentraciones de Nitrato	48
2. Efecto de pH	50
2.1. Medios Amortiguados (Diferentes Concentraciones de Nitrato)	51
2.2. Diferentes pH (Nitrato 10 mM)	52
3. Periodos Largos de Exposición	53
4. Efecto de Potasio	53
5. Efecto de Sacarosa	54
6. Células Incubadas en Murashige-Skoog	55
7. Células sin la Presencia de Nitrato	55
8. Sistema Establecido	56
Conclusiones	57
Bibliografía	58
Agradecimientos	

RESUMEN

Se mantuvieron células en suspensión de *B. ternifolia* desprovistas de nitrato por 24 horas y después se expusieron a diferentes concentraciones de nitrato. En altas y bajas concentraciones se presentó el fenómeno de entrada y salida de nitrato.

Durante la entrada y salida de nitrato hay variaciones de pH desde 4 a 6. Cuando la solución de nitrato fue amortiguada a diferentes pH, la entrada y salida de nitrato fue de menor magnitud a pH 7, que en pH 5.5.

En la solución de nitrato amortiguada y la que no lo fue, la concentración de 10 mM fue en donde mejor se presentó la entrada y salida de nitrato.

En periodos largos de 10 horas se presentó la entrada y salida de nitrato, pero en las 2 últimas horas hubo una caída drástica en la concentración de nitrato externo.

En presencia de potasio, la entrada y salida de nitrato aumentó. En la solución de nitrato sin sacarosa, la entrada y salida disminuyó.

Cuando las células permanecieron por más de 24 horas sin nitrato, éstas expulsaron el nitrato que tenían almacenado y después lo volvieron a tomar.

INTRODUCCION

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes para las plantas, ya que forma parte de un vasto número de constituyentes celulares (proteínas, nucleótidos, etc). Al nitrógeno lo podemos encontrar en diferentes estados de oxidación-reducción, como nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+) y nitrógeno molecular (N_2). Una gran parte del nitrógeno está en forma de N_2 en la atmósfera y constituye hasta un 78% en volumen; una pequeña porción de este N_2 se transforma en NH_4^+ y NO_3^- . El nitrato surge de la oxidación de N_2 por oxígeno y ozono en presencia de luz o radiación ultravioleta y más tarde se precipita al suelo por medio de la lluvia; sin embargo, la mayor parte del nitrato en el suelo se forma por la acción de bacterias que oxidan al amonio produciendo nitrito y a partir de este último nitrato (40).

En el suelo la parte mineral está conformada por arena y arcilla, siendo la arcilla la más abundante. La mayoría de las arcillas son de intercambio catiónico (tienen carga negativa en su superficie), lo que les permite que una gran cantidad de cationes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ , etc se les adhieran y cuando llueve es muy difícil que estos cationes sean lavados del suelo. De manera contraria, aniones como NO_3^- , SO_4^{2-} , y Cl^- son repelidos por las cargas negativas de las arcillas y son fácilmente lavados del suelo. Sin embargo, la mayor parte de las plantas superiores

prefieren nitrato como fuente de nitrógeno, por lo que el NH_4^+ que se encuentra en las arcillas es rápidamente oxidado a nitrato por acción bacteriana. Una vez tomado el nitrato por la planta, se reduce a nitrito por la nitrato reductasa (40).

El nitrógeno es el elemento que generalmente falta en la mayoría de los suelos y se ha tratado de solucionar este problema con el uso de fertilizantes nitrogenados; sin embargo, el uso de sales de nitrato ó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ son de alto costo por su obtención, transportación, almacenamiento y aplicación, lo que representa un grave problema para su utilización en países tercermundistas. Otro problema que se presenta con el uso de sales de nitrato, es que sólo se llega a recuperar cerca de la mitad del aplicado, pues como ya se mencionó se lava fácilmente del suelo por el agua de la lluvia y además porque la mayoría de las plantas toman nitrato como fuente de nitrógeno (40).

1. Descripción de la Nitrato Reductasa

La nitrato reductasa es la enzima que interviene en la reducción de nitrato a nitrito y se considera como una enzima redox, porque contiene transportadores internos de electrones, los cuales se reducen durante la catálisis (figura 1). Por esto, se dice que la nitrato reductasa es una pequeña cadena de electrones.

La inducción de la nitrato reductasa por nitrato ha sido ampliamente estudiada (5,6,15,24,26,28,29,35,43,44). Cuando la planta se expone a nitrato, después de un periodo lag de actividad, ésta aumenta rápidamente en algunas horas y más tarde los niveles pasan a un estado estable de actividad; así, la

nitrato reductasa sigue el patrón clásico de inducción de una

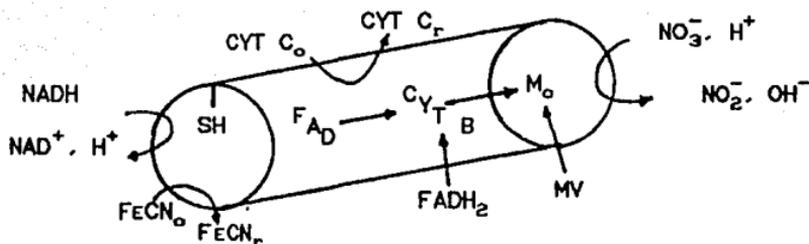


Figura 1. Modelo catalítico de la nitrato reductasa (una subunidad solamente) (6).

enzima por el sustrato. Morgan *et al* en 1985 (26), concluyeron que la inducción de la nitrato reductasa puede ocurrir en bajas o altas concentraciones de nitrato (0.05 y 20 mM), siendo más clara esta inducción en la de baja concentración de nitrato. De esta manera, sólo se requiere poca cantidad de nitrato, para iniciar la inducción de la nitrato reductasa (24,26).

La nitrato reductasa es una enzima que se sintetiza de novo en respuesta a la aplicación de nitrato, pues después de que la inducción de actividad ha terminado comienza a disminuir la cantidad de nitrato reductasa, sucediendo lo mismo cuando las plantas son transferidas de luz a oscuridad. Esta disminución en los niveles de cantidad de nitrato reductasa pueden ser explicados, en base a que enzimas como proteínasas degradan fácilmente a esta enzima (6,28,35,44).

2. Toma de Nitrato

Para estudios de toma de nitrato se han usado análogos como el $^{36}\text{ClO}_3^-$, $^{13}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$ (10,11,13,16,19,20,23,24,26).

Se ha determinado que el intercambio citoplasmático de nitrato en células de cebada es de 17 minutos aproximadamente, por lo que la toma de nitrato debe determinarse a cortos periodos de tiempo (10 minutos) (11). Cuando raíces de cebada son pretratadas con nitrato a una baja concentración (10 μM), su periodo de toma de nitrato es mucho mayor que las raíces que tuvieron un pretratamiento de alta concentración de nitrato (100 y 200 μM) (11). De esta manera, las plantas que tienen un bajo status de nitrato absorben más nitrato y las plantas de un alto status de nitrato su toma es más reducida.

Deane-Drummond y Glass en 1983 (11), establecieron que en periodos cortos de tiempo, pueden estar actuando los siguientes mecanismos en raíces de cebada:

- 1) Una entrada de nitrato que está determinada por la concentración externa y que es dependiente del status de nitrato de la raíz.
- 2) Una salida de nitrato directamente relacionada a una concentración de nitrato interna.
- 3) Una interacción entre 1 y 2, dan el flujo neto de nitrato.

Se ha propuesto que cuando aumenta el periodo de toma de nitrato, puede ocurrir al mismo tiempo síntesis de proteínas que se encuentran en la membrana plasmática y que son moduladoras del transporte de nitrato (21,24,26). Además, se ha establecido que las células epidérmicas de la raíz, son el sitio en donde se

acumula más nitrato, pues para otros iones como el potasio en estas células es donde se acumula más (18,24,26,38).

3. Transporte de Nitrato

Se ha estudiado muy poco el transporte de nitrato a través de la membrana plasmática y aún no se conoce como se lleva a cabo.

Brauer en 1988 (4), caracterizó dos ATPasas en células de raíz de maíz y encontró que una de éstas era sensible a nitrato, mientras que la otra no lo era. La ATPasa que fue sensible a nitrato se encontró en la membrana vacuolar y la no sensitiva en la membrana plasmática. Con el aislamiento de vesículas tonoplásticas se han podido caracterizar bien estas ATPasas, llegando incluso a establecerse un modelo para el transporte de nitrato a través de la membrana vacuolar (figura 3) (3). Es probable que las ATPasas que se encuentran en la membrana plasmática bombeen protones hacia el exterior de la célula, formando un gradiente electroquímico y por un mecanismo *symport* el nitrato se transporte al interior de la célula (8,42,48). Esto se ha establecido ya que la densidad de las ATPasas en la membrana plasmática y vacuolar son muy similares, 1.15-1.5 y 1.0-1.13 g/cc respectivamente (48).

Ward *et al* en 1988 (50), encontraron que hay una pequeña cantidad de nitrato reductasa asociada a la membrana plasmática (4%) por lo que no solamente es citoplasmática como se venía sosteniendo. Al exponer raíces de cebada a fragmentos de Inmunoglobulina G (IgG) específica para la nitrato reductasa, la toma y la reducción de nitrato se inhibieron al mismo tiempo.

Concluyeron que es probable que haya una relación entre el transporte de nitrato y la nitrato reductasa asociada a la membrana plasmática, pues esta enzima puede ser un complejo que al mismo tiempo reduce y transporta nitrato a través de la membrana plasmática. Sin embargo, de manera contraria la nitrato reductasa asociada a la membrana plasmática y la proteína que transporta nitrato pueden ser dos moléculas distintas, pero que pueden estar relacionadas porque tienen una estructura similar, ya que ambas son inhibidas por los fragmentos de IgG.

Posteriormente, Sussman y Harper en 1989 (46) citaron que el transporte de nitrato se lleva a cabo por una proteína acarreadora en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Tratar de comprender cuales son los mecanismos del transporte de nitrato en la célula, ha sido uno de los problemas a resolver durante los últimos años, pues hasta que se aisle y caracterice la proteína que transporta nitrato a través de la membrana plasmática, se aclararán muchas interrogantes acerca de la entrada, salida, reducción y transporte de nitrato.

4. Influencia de Luz

Se ha determinado que la asimilación de nitrato por raíces en plantas está íntimamente relacionada con las reacciones fotosintéticas, ya que este proceso se acelera cuando la planta esta expuesta a luz. Las raíces son capaces de asimilar nitrato en obscuridad, haciendo uso de NADH reducido durante la fotosíntesis, que es transportado a la raíz (1,28,34,44). Naik et al en 1982 (28), sugirieron que la luz no juega un papel directo en la

asimilación de nitrato y estableció que es importante en los siguientes eventos:

- 1) Estimula la toma de nitrato.
- 2) Promueve la transferencia de nitrato de una poza de almacenamiento a una poza metabólica en las células.
- 3) Activa la nitrato reductasa existente.
- 4) Las reacciones fotosintéticas proveen de NADH para la asimilación de nitrato.

El papel de la luz parece ser sólo la de abastecer de NADH para la asimilación de nitrato, por lo que la luz no es obligatoria para la reducción de nitrato a nitrito; sin embargo, algunos autores han propuesto que la luz es esencial para la toma y asimilación de nitrato (2,28).

Se ha establecido que puede haber una competencia por el NADH reducido durante la fotosíntesis, entre la cadena respiratoria y la enzima nitrato reductasa (1,2,28,34). Bajo condiciones anaeróbicas cuando la cadena respiratoria está inhibida, se efectúa la reducción de nitrato mientras que en condiciones aeróbicas el NADH es utilizado por la cadena respiratoria. Entonces, si durante la fotosíntesis la respiración mitocondrial está inhibida o es muy baja, el NADH lo utiliza la nitrato reductasa. Cuando la planta está en obscuridad el NADH pasa a ser utilizado por la cadena respiratoria, por lo que la toma de nitrato disminuye (28).

Reed et al en 1982,1983 (33,34), establecieron que no hay una competencia entre la nitrato reductasa y la cadena respiratoria, pues la luz aumenta los niveles de NADH durante la fotosíntesis, por lo que su concentración aumenta en el citoplasma,

satisfaciéndose los requerimientos de la nitrato reductasa y respiración mitocondrial. Es probable que el NADH pueda originarse del ciclo de Calvin (triosa-P deshidrogenasa), aunque también se ha propuesto que el origen de NADH puede provenir de la mitocondria (ciclo de Krebs) (28,34), porque en condiciones de obscuridad se reduce nitrato en hojas de cebada.

5. Influencia de Iones en la Toma de Nitrato

Se ha encontrado en varios estudios, que algunos iones pueden influir en la toma de nitrato, como el NH_4^+ , Cl^- , Na^+ , K^+ , etc. (3,9,10,12,16,21,30,36,37,42,51).

Cuando se exponen raíces de cebada a Cl^- , la toma de nitrato se ve disminuida (10). La acumulación de Cl^- en la vacuola causa una disminución en la toma de nitrato a través de la membrana plasmática y algunos autores han establecido que podría generarse una señal de retroalimentación negativa que proviene de la interacción entre el NO_3^- y Cl^- en la vacuola, lo que provoca que no se tome más nitrato a través de la membrana plasmática (9,10,11,16); sin embargo, Glass *et al* en 1985 (16), encontraron que la toma de nitrato es insensible al status de nitrato y Cl^- vacuolar. Concluyeron que probablemente la inhibición de transporte de nitrato puede ocurrir en el tonoplasto por la acumulación de NO_3^- y Cl^- , lo cual permite incrementar la concentración de nitrato en el citoplasma y/o aumentar el transporte de nitrato a otros órganos de la planta, al mismo tiempo que se aumenta la toma de nitrato a través de la membrana plasmática (16,24). Deane-Drummond y Glass en 1983 (12),

propusieron que el origen de la señal de retroalimentación negativa puede ser de vacuola, citoplasma, de un paso intermedio en la asimilación de nitrato a aminoácido, del transporte de nitrógeno al tallo, de la reducción de nitrato en la raíz, del transporte de NADH proveniente de reacciones fotosintéticas, etc.

El NH_4^+ inhibe la toma y reducción de nitrato (12,21,44,51). Deane-Drummond y Glass en 1983 (12), establecieron que la sensibilidad al NH_4^+ , es una función del status de nitrato en plantas de cebada, pues cuando las plantas tuvieron un pretratamiento con $10 \mu\text{M}$ de nitrato, la toma de nitrato se vió fuertemente afectada por la presencia de NH_4^+ en el medio, pero las plantas que tuvieron un pretratamiento de 100 y 200 μM de nitrato, la presencia de NH_4^+ no afectó la toma de nitrato.

Oaks en 1974 (29), determinó que en un cultivo en suspensión de Soya, la presencia de NH_4^+ inhibe la actividad de la nitrato reductasa, por lo que no se puede reducir al nitrato presente en el medio y al mismo tiempo la toma de nitrato no se puede dar.

En plantas de amaranto, se ha encontrado que el Na^+ estimula la toma de NO_3^- , aumentando la actividad de la nitrato reductasa al mismo tiempo. Cuando las plantas de amaranto se colocan en presencia de Na^+ y NO_3^- en el medio, la toma de nitrato aumenta grandemente en comparación con los tratamientos sin Na^+ ; sin embargo, no es muy claro por qué se dá esta estimulación en presencia de Na^+ (30).

6. Influencia de Carbohidratos

Durante la fotosíntesis los niveles de carbohidratos aumentan

en el tejido y se ven afectados por las fluctuaciones del ciclo día-noche. Durante la noche se hace uso de las reservas de carbohidratos para la asimilación de nitrato (39).

Ruffy *et al* en 1989 (39), propusieron que hay tres etapas que afectan el status de carbohidratos en la planta:

- 1) Durante la fotosíntesis la planta incrementa los niveles de carbohidratos, almacenandolos en los mismos tejidos fotosintéticos.
- 2) Durante la noche se utilizan las reservas de carbohidratos para la toma y reducción de nitrato en la raíz.
- 3) Cuando el periodo de oscuridad se alarga más allá del tiempo normal (12 horas), los niveles de carbohidratos disminuyen grandemente, por lo que la toma y reducción de nitrato también disminuyen.

Por otro lado, Ruffy *et al* no encontraron una relación entre el status de carbohidratos y el transporte de nitrógeno de la raíz a tallo y hoja, pues cuando se expusieron plantas a 12 horas de oscuridad, el transporte de nitrógeno disminuyó, pero cuando se extendió el periodo de oscuridad, el transporte de nitrógeno aumentó tanto como cuando la planta estaba en presencia de luz.

Aslam y Huffaker en 1984 (2), observaron que bajo condiciones aeróbicas y de oscuridad, los carbohidratos almacenados durante la fotosíntesis se utilizan para la asimilación de nitrato en hojas de cebada. Sin embargo, otros estudios han mostrado que bajo oscuridad la toma y asimilación de nitrato no se puede llevar a cabo. Aslam y Huffaker, establecieron que lo anterior puede deberse a que el status de carbohidratos fue muy bajo en las hojas utilizadas en esos estudios.

Bajo condiciones de obscuridad, el periodo de reducción de nitrato fue dependiente del status de carbohidratos en las hojas. A su vez el status de carbohidratos fue regulado por la duración de exposición a luz y obscuridad a que fueron sometidas las plantas durante su crecimiento, pues las plantas que crecieron continuamente en presencia de luz, su status de carbohidratos fue superior en comparación a las plantas que tuvieron un fotoperiodo normal (2).

En obscuridad los carbohidratos exógenos como glucosa, fructosa y sacarosa incrementaron la reducción de nitrato en hojas que fueron deficientes en carbohidratos. Por esto, Aslam y Huffaker concluyeron que la luz no juega un papel directo en la reducción de nitrato, aunque la aumente grandemente.

7. Vías Alternativas Despues de la Toma de Nitrato

Una vez que las células de la raíz han tomado el nitrato, éste puede seguir varios caminos (fig. 2), que se resumen en los siguientes puntos:

- 1) El nitrato puede transportarse inmediatamente a otros órganos.
- 2) Ser asimilado a aminoácido en el citoplasma y ser aprovechado por la misma célula o transportarse a otros órganos de la planta en forma de aminoácido.
- 3) Ser almacenado en la vacuola.
 - a) De la vacuola transportarse a otros órganos de la planta.
 - b) Transportarse al citoplasma y reducirse a nitrito por la nitrato reductasa.

Se ha sugerido que hay dos pozas distintas después de la toma

de nitrato en células vegetales: una gran poza de almacenamiento, no accesible a la reducción; y por el otro lado, una pequeña poza metabólica, en la cual el nitrato es rápidamente reducido por la nitrato reductasa (17,28,44).

El nitrato almacenado en la vacuola puede ser transportado a otros órganos de la planta; sin embargo, pocos estudios se han hecho acerca del transporte del nitrato a través de la membrana de la vacuola (tonoplasto). Para éste tipo de estudios se han aislado vesículas tonoplásticas, en las cuales se ha encontrado una ATPasa que es sensible a las altas concentraciones de nitrato (3,8,25,42,48).

Blumwald y Poole en 1985 (3), propusieron un modelo (figura 3), en el que establecieron que cuando el nitrato pasa de una poza de almacenamiento a una poza metabólica, se transporta nitrato a través del tonoplasto.

El nitrato que pasa del citoplasma al interior de la vacuola provoca una disipación del gradiente de membrana ($\Delta\psi$) y una vez que el nitrato se ha almacenado en la vacuola, más tarde puede ser transportado al citoplasma por un mecanismo simport NO_3^-/H^+ provocando una disipación del gradiente de pH (ΔpH).

Las altas concentraciones de nitrato en el citoplasma inhiben a la ATPasa que se encuentra en la membrana vacuolar. Cuando la concentración de nitrato disminuye, el gradiente de pH se recupera por la acción de la ATPasa que bombea H^+ al interior de la vacuola.

Blumwald y Poole concluyeron que en las células intactas puede haber un mecanismo como la luz, que regula el transporte de

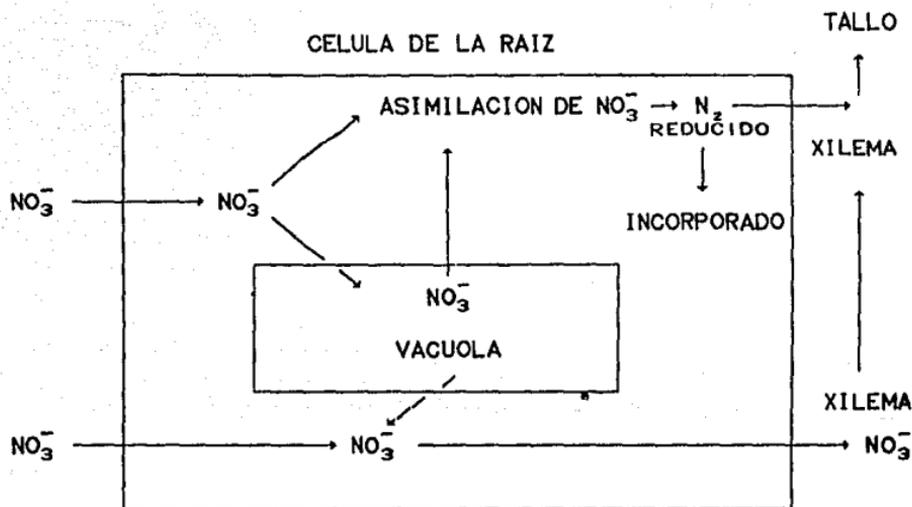


Figura 2. diferentes vías que puede seguir el nitrato una vez que es tomado por la célula.

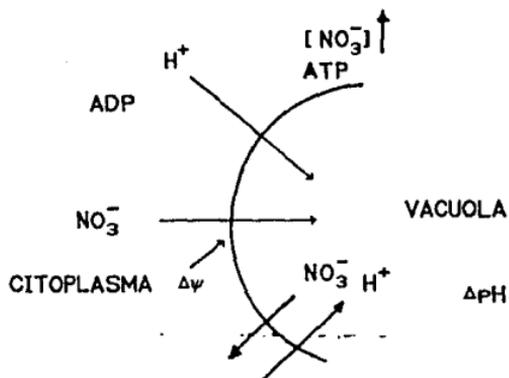


Figura 3. Modelo propuesto por Blumwald y Poole, para el transporte de nitrato a través de la membrana vacuolar (3).

nitrato de una poza de almacenamiento a una poza metabólica.

Se ha estimado que la vacuola puede contener de un 60-90% del nitrato total de la célula (17,25). La cantidad de nitrato almacenado puede ser afectada por factores como la toma de nitrato, periodo de reducción, luz, etc (17).

8. Cultivo de Tejidos Vegetales

Durante los últimos años el cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado como una herramienta para la resolución de problemas fisiológicos, bioquímicos, genéticos, etc y se ha aplicado a un gran número de especies para su establecimiento en cultivo.

La iniciación del cultivo celular prácticamente se puede iniciar a partir de cualquier parte de la planta (tallo, hoja, raíz, antera, ovario, etc); sin embargo, la inducción de callo (masa de células desdiferenciadas) a partir del explante de la planta, depende del balance hormonal (auxinas y citocininas generalmente) y de condiciones de cultivo como temperatura, fotoperiodo, y en algunos casos del tipo de explante de la planta.

Una vez que se han establecido las condiciones para la inducción y mantenimiento del cultivo de callos, se puede iniciar el cultivo en suspensión por la transferencia de pequeñas piezas de callo a un medio líquido, el cual se mantiene en agitación durante la incubación. El establecimiento del cultivo en suspensión depende algunas veces de si el callo es friable o bien si hay que agregar hormonas para un buen crecimiento de las células en suspensión. Durante la primera incubación en medio líquido, algunas células se liberan del explante y se multiplican;

de ésta manera, el subcultivo o cultivos posteriores al cultivo madre, consistirán en células libres o pequeños agregados celulares (45).

Las células en suspensión siguen una típica curva de crecimiento (# de células contra tiempo). Se pueden detectar varias fases en la curva de crecimiento; la primera fase se llama logarítmica y es donde pocas células se dividen. En la segunda fase la población crece de una manera exponencial, y de esta fase se pasa a una tercera que es la lineal, donde la velocidad de división celular y crecimiento es máximo. Al término de la fase lineal, las células entran a una fase de desaceleración, en la cual la división celular disminuye. La última fase se llama estacionaria y es donde la población deja de crecer, ya no hay aumento en el número de células en el cultivo en suspensión.

La viabilidad de las células en fase estacionaria depende de la especie y de la naturaleza de factores de crecimiento; por ejemplo, las células que llegan a fase estacionaria por limitación de nitrógeno, retienen una mayor viabilidad en comparación con células que llegaron a estar desprovistas de carbohidratos (45).

9. *Bouvardia ternifolia*

B. ternifolia (Cav)Schl. o "trompetilla" pertenece a la familia Rubiaceae, del orden de la Rubiales. Es una planta que puede ser herbácea o arbustiva, mide de 1 a 1.5 m de altura. Sus hojas miden de 3 a 6 cm de largo, tiene peciolo clípticos, lanceolados o acuminados, la base es redondeada y de borde entero. Sus flores son rojas de 2 a 2.5 cm de largo, agrupadas en cimas terminales.

La forma de su flor semeja a una trompetilla y de ahí su nombre común (41).

Florece durante los meses de Julio a Septiembre, y esta ampliamente distribuida en el valle de México, siendo más abundante en la zona sur; sin embargo, también se llega a distribuir hasta Texas (14,41).

Estudios de laboratorio realizados con anterioridad han demostrado que *B. ternifolia* puede considerarse como uno de los mejores cultivos para realizar estudios bioquímicos, fisiológicos, etc. (14,41), ya que presenta una rápida proliferación celular en cultivo, no acumulación de productos tóxicos, un cultivo en suspensión homogéneo, con un tiempo de duplicación poblacional de 24 a 36 horas y es posible obtener callo a partir de hoja, raíz y tallo (14,41).

Estas características hacen de *B. ternifolia* idónea para el estudio de entrada y salida de nitrato en un cultivo en suspensión.

OBJETIVOS

Existe el antecedente del comportamiento de entrada y salida de nitrato en células de *Bouvardia ternifolia* (14,41), por lo que en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

- 1) Establecer un sistema en cultivo en suspensión de *B. ternifolia* en fase estacionaria, en el cual se pueda determinar los periodos de entrada y salida después de 24 horas desprovistas de nitrato.
- 2) Probar diferentes concentraciones de nitrato, para conocer el efecto sobre la entrada y salida de nitrato en un corto tiempo de 4.5 horas.
- 3) Determinar en tiempos largos de 10 horas, si el fenómeno de entrada y salida de nitrato sigue un mecanismo cíclico.
- 4) Determinar cual es el efecto del pH del medio en el cual las células se encuentran en suspensión, utilizando medios amortiguados y no amortiguados, para conocer si la entrada y salida está influida por el pH extracelular.

MATERIAL Y METODO

La inducción de callo de *B. ternifolia* se generó a partir de hoja y se mantuvo haciendo resiembras cada 20 días. Los explantes de hoja se sembraron en frascos gerber con 20 ml de medio de cultivo sólido Murashige-Skoog (27), con agar 0.8%, sacarosa 3%, 1 mg/l de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.005 ppm de cinetina (K). Los frascos se incubaron en cámaras de crecimiento a 25°C con luz continua. Cuando se observaron los primeros cúmulos de células, se procedió a separarlas del resto del explante y se sembraron en frascos con el mismo medio y la misma concentración de 2,4-D y K.

Para iniciar el cultivo en suspensión, se disgregó el callo lo más posible con el fin de obtener pequeños agregados en el cultivo madre, estos pequeños agregados se sembraron en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio de cultivo Murashige-Skoog (27) con las mismas concentraciones de 2,4-D y K que en el medio de inducción y mantenimiento de callo. Para todos los casos el pH del medio se ajustó a 5.8 con soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, ambas a una concentración de 0.5 M; el medio de cultivo (sólido y líquido) se esterilizó a 121°C ó 1.15 Kg/cm² de presión durante 20 minutos. Después de 10 días de cultivo se hicieron resiembras a partir del cultivo madre tomando 5 ml del

medio de cultivo en agitación con una pipeta estéril, tratando de desechar los agregados más grandes y tomando sólo los más pequeños. De esta manera, los subcultivos posteriores tendrían pequeños agregados y células libres.

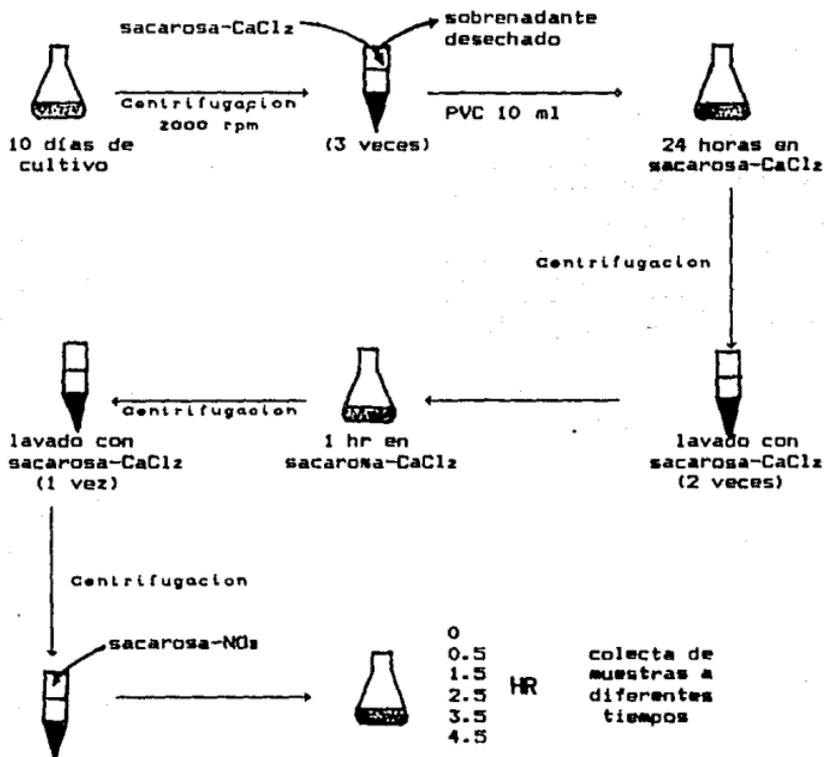


Figura 5. Desarrollo experimental desde el cultivo de células en suspensión de *B. ternifolia* en fase estacionaria (10 días), hasta la colecta de muestras para la determinación de nitrato.

1. Determinación de nitrato

Para la determinación de entrada y salida de nitrato en el cultivo en suspensión, se sembraron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo con un "paquete de volumen celular" (PVC) inicial de 2 ml y se incubaron en cámaras de crecimiento con agitación rotatoria de 110 rpm y 25°C (14,41).

A los 10 días de cultivo se alcanza la fase estacionaria y es en esta etapa en la que se utilizan las células para hacer las determinaciones de entrada y salida de nitrato (figura 5) (41). Fue necesario lavar las células para eliminar el medio nutritivo Murashige-Skoog en el que se encontraban creciendo, ya que este medio contiene nitrógeno, lo que pudo haber alterado los resultados de entrada y salida de nitrato en el cultivo en suspensión. Por otro lado, se consideró que las células deberían permanecer algún tiempo en una solución de lavado-incubación para eliminar el exceso de nitrato y para que al mismo tiempo se dejaran desprovistas de nitrato.

Se consideró realizar los lavados e incubación en una solución que mantuviera un potencial osmótico y que la célula al ser expuesta no sufriera un choque osmótico, además de que hubiera una fuente de carbono para que las células llenaran sus requerimientos energéticos. Por ésto se utilizó sacarosa, considerando éste compuesto propicio, ya que se utiliza en la mayoría de los medios nutritivos. La concentración de sacarosa que se utilizó en la solución fue del 3% (p/v). También, se decidió utilizar una solución de CaCl₂ (5 mM), ya que el Ca²⁺ ayuda a mantener la

permeabilidad de la membrana de la célula.

De esta manera, la solución de lavado-incubación fue sacarosa-CaCl₂.

A los 10 días de cultivo, las células se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos para obtener un PVC de 10 ml y al mismo tiempo lavar las células con sacarosa-CaCl₂ (figura 5), agregando 30 ml de esta solución a los 10 ml del PVC obtenidos. En cada lavado las células se centrifugan, se les agrega la solución de sacarosa-CaCl₂ y se agitan para homogeneizar el medio. En ésta primera etapa se hacen 3 lavados, dejando las células en solución de sacarosa-CaCl₂ desprovistas de nitrato por 24 horas, para después volver a lavarlas con sacarosa-CaCl₂ 2 veces y dejarlas 1 hora más en ésta solución para eliminar el nitrato que pudieron haber sacado las células en el tiempo que se les dejó desprovistas de nitrato. Cuando se cumple 1 hora solamente se lavan las células una vez más y se les agrega la solución de sacarosa (3%) y nitrato a diferentes concentraciones colocándolas en agitación a 110 rpm. Para los diferentes tratamientos de nitrato se utilizó Ca(NO₃)₂ (tabla 1).

Para las determinaciones de nitrato, se toman muestras del del medio externo en que se encuentran las células en suspensión. Las muestras se toman en tubos Eppendorf con aproximadamente 1.0 ml del medio en agitación a diferentes tiempos (0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 hrs) (figura 6).

Una vez que las muestras se han tomado a diferentes tiempos, se procede a centrifugarlas a 12000 rpm en una microfuga durante 3.5

Tabla 1. Concentraciones de nitrato probadas para determinar los periodos de entrada y salida de nitrato en células en suspensión de *B. ternifolia*.

0.2	mM
5	"
10	"
15	"
25	"
50	"
75	"

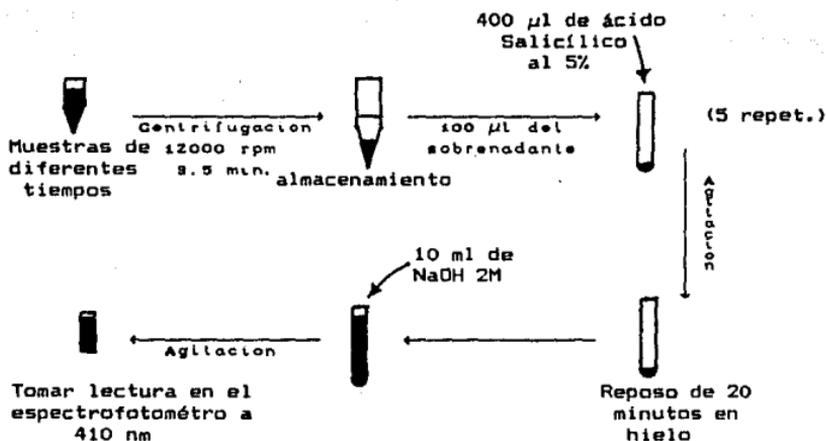


Figura 6. Toma de muestras del medio en agitación para la determinación de nitrato a diferentes tiempos.

minutos para que las células que se llegaron a tomar durante la colecta de la muestra se desechen y del sobrenadante se haga la determinación de nitrato por el método de Cataldo (7,41).

Las muestras con el sobrenadante fueron congeladas para la posterior determinación de nitrato.

1.1. Método de Cataldo

El método de Cataldo *et al* (7), basado en la nitrificación del ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico) (figura 7), consiste en agregar 400 μ l de ácido salicílico al 5% (diluido en ácido sulfúrico concentrado) en tubos de ensayo de 20 ml, 100 μ l del sobrenadante que contiene nitrato y los tubos se agitan para dejarlos reposar por 20 minutos. La reacción es extremadamente exotérmica, por lo que los tubos de ensayo deben mantenerse en hielo. Después, se agregan 10 ml de NaOH 2 M a cada tubo de ensayo para que se tenga un pH aproximado de 12 y se agiten los tubos en un vortex para evitar gradientes, después de que se enfria la solución se lee a 410 nm en un espectrofotómetro (7).

Sólo se midió el nitrato que se encontraba en el medio exterior celular.

El método de Cataldo no se ve afectado por iones como el NH_4^+ , Cl^- , NO_2^- , etc. Para cada determinación de nitrato se hicieron 3 repeticiones obteniendo la media, porcentaje y error estandar. La entrada y salida de nitrato a diferentes tiempos se determinó como el porcentaje de nitrato en el exterior celular. En las diferentes gráficas mostradas, el tiempo cero siempre corresponde

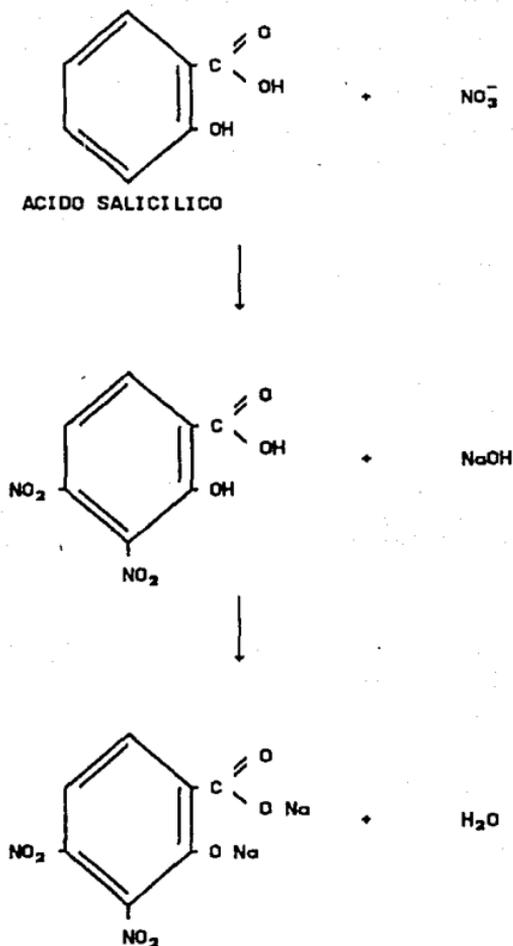


Figura 7. Nitrificación del ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), diluido en ácido sulfúrico concentrado.

al 100 %, pues es cuando se agrega la solución de sacarosa (3%) y nitrato a diferentes concentraciones, esto después de que las células estuvieron desprovistas de nitrato por 24 horas. Si al tiempo de 2.5 el porcentaje es de 120, la diferencia del 20% con respecto al tiempo cero, indica que hay una salida de nitrato que estaba almacenado en la célula. Si en un principio hay una entrada, entonces el porcentaje disminuirá a un valor menor al 100% inicial. En las siguientes horas puede registrarse otra entrada o salida de nitrato, por lo que el porcentaje disminuirá o aumentará según sea el caso. De esta manera, la salida de nitrato de las células se considera como un incremento en la concentración de nitrato en el medio exterior; es decir, un incremento en el porcentaje de nitrato externo y de manera contraria la entrada de nitrato a la célula se considera como una disminución en el porcentaje de nitrato externo.

En concentraciones mayores de 10 mM de nitrato, las muestras para la determinación de nitrato se diluyeron en una proporción de 1 a 10 con agua destilada, pues el rango para hacer la determinación de nitrato por el método de Cataldo sin hacer diluciones es de 0.2 a 10 mM; Así, cuando se usan concentraciones mayores de nitrato, se deben diluir las muestras.

2. Registros de pH

Cuando las células cumplieron 10 días de cultivo, se hicieron registros de pH en el cultivo en suspensión de *B. ternifolia* (medio Murashige-Skoog), así como al término de las 24 horas de

permanecer desprovistas de nitrato y después cada hora, cuando se les agregó la solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM.

2.1. Medios amortiguados

Más tarde, se procedió a usar medios amortiguados a pH 6 con dos amortiguadores: Bis-Tris (bis[2-hidroxietil]imino-tris [hidroximetil]-metano y Mes (ácido 2-[morfolino]etano-sulfónico) (40 mM). La solución en la que el pH se amortiguó fue la de sacarosa (3%) y nitrato a diferentes concentraciones: 1, 10 y 20 mM de nitrato (tabla 2). Todo el procedimiento de lavado-incubación fue el mismo, sólo que en la última se modificó (figura 5).

Posteriormente para observar si a diferentes pH se seguía el fenómeno de entrada y salida de nitrato, se procedió a amortiguar el pH a 5.5 y 7 en la solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM (tabla 3). En este caso sólo se utilizó el amortiguador Mes.

Por otro lado, se utilizaron medios en los que se eliminó el nitrato, después de que las células estuvieron desprovistas de nitrato por 24 horas, para detectar si la ausencia de nitrato en el medio externo producía una entrada y salida de nitrato.

Otro tratamiento fue eliminar la sacarosa de la solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM con pH amortiguado a 5.5 con Mes. De manera conjunta, en otro tratamiento se utilizó KNO_3 10 mM en sustitución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ con sacarosa (3%) y con pH amortiguado a 5.5 con Mes.

Después de que las células cumplieron 10 días de cultivo, se

Tabla 2. Solución amortiguada a pH 6 con sacarosa (3%) y nitrato a diferentes concentraciones.		
[NO ₃] ⁻ (mM)	pH	Amortiguador
1	6	Bis-Tris y Mes
10	6	Bis-Tris y Mes
20	6	Bis-Tris y Mes

Tabla 3. Solución amortiguada a diferentes pH con sacarosa (3%) y nitrato.		
[NO ₃] ⁻ (mM)	pH	Amortiguador
10	5.5	Mes
10	7	Mes

lavarón con medio Murashige-Skoog (sin ninguna fuente de nitrógeno), sacarosa 3% y pH ajustado a 5.8 (sin amortiguar). Esta solución se sustituyó por la de sacarosa-CaCl₂. De esta manera, las células se dejaron desprovistas de nitrato en medio Murashige-Skoog por 24 horas, para después lavarlas y exponerlas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM.

2.2. Periodo Largo de Exposición a Nitrato

Finalmente el último tratamiento consistió en exponer a las células a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM con pH

amortiguado a 5.5 con Mes, sólo que en este caso se hicieron determinaciones de nitrato cada hora, en 10 horas de exposición en esta solución.

RESULTADOS

El primer evento que ocurrió en las células expuestas a una concentración baja de 0.2 mM de nitrato (figura 8), fue una salida de nitrato en la primera media hora y alcanzó 121%. Como ya se mencionó, esta diferencia del 21% con respecto al tiempo cero (100%), indica que hubo una salida de nitrato que estaba almacenado en la célula. Después de la salida hay una entrada de nitrato donde el porcentaje de nitrato externo disminuyó a 88% y se prolongó por 3 horas. En la última hora se registró una entrada de nitrato que alcanzó un 109%.

A una concentración de 5 mM, solamente hubo una pequeña entrada de nitrato en la primera media hora (94%), para después volver a salir el nitrato de las células por una hora (101%) y después otra ligera entrada en las siguientes 3 horas disminuyendo el porcentaje a 86% (figura 8).

En la concentración de 10 mM las diferencias entre el porcentaje de nitrato externo máximo y mínimo se hacen más grandes, ya que a las 0.5 y 1.5 horas se registró una entrada de nitrato decreciendo el porcentaje hasta un 82% (figura 9). Posteriormente se registró un aumento en el porcentaje de nitrato externo (salida de nitrato) llegando a un 90%. En la siguiente hora volvió a haber una entrada de nitrato (79%) y más tarde una

ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO

31

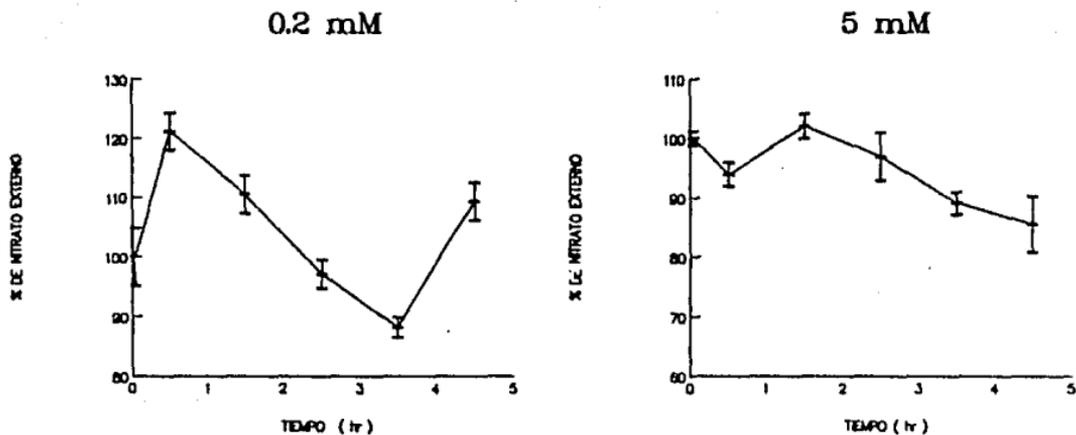


Figura 8. Células de *B. ternifolia* expuestas a concentraciones bajas y medianas de nitrato, después de un periodo de 24 horas desprovistas de nitrato.

ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO

10 mM

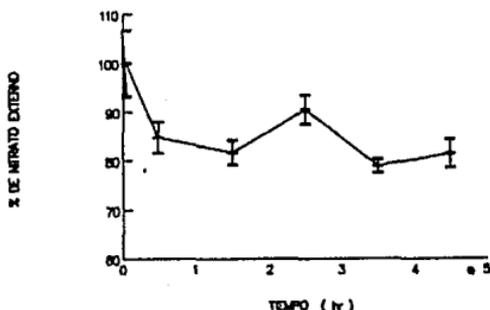


Figura 9. Células de *B. ternifolia* expuestas a una concentración de 10 mM de nitrato, después de un periodo de 24 horas desprovistas de nitrato.

ligera salida de nitrato durante una hora (81%).

En la concentración de 15 mM durante las 4.5 horas sólo se registró una entrada de nitrato que llegó a alcanzar un 86% (figura 10). Para la concentración de 25 mM de nitrato, el primer registro fue una salida de nitrato en la primera hora y media (107%); en la siguiente hora hubo una entrada de nitrato (94%); y después permaneció constante la cantidad de nitrato externo por 2 horas (95%) (figura 10).

A una concentración alta de nitrato (50 mM), durante la primera hora y media se registró una salida de nitrato de hasta 120%

ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO

33

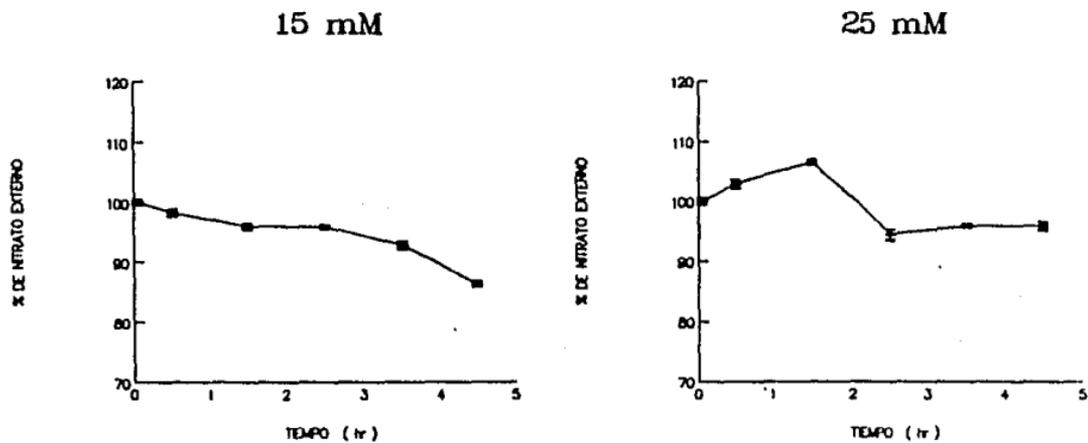


Figura 10. Células de *B. ternifolia* expuestas a concentraciones medianamente altas de nitrato, después de un periodo de 24 horas desprovistas de nitrato.

ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO

34

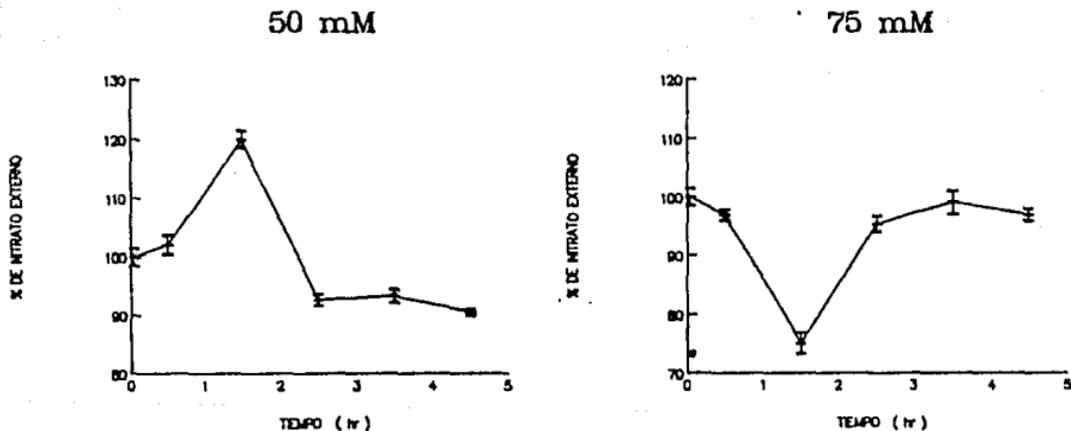


Figura 11. Células de *B. ternifolia* expuestas a concentraciones altas de nitrato, después de un periodo de 24 horas desprovistas de nitrato.

(figura 11). De manera contraria, se registró una entrada de nitrato de hasta 75% en 75 mM; sin embargo, a partir de dos horas y media de exposición a nitrato la entrada y salida de nitrato tienden a estabilizarse en ambas concentraciones, en 50 mM el equilibrio es entre 90-93% y en 75 mM es entre 95-99%.

Los registros de pH cuando las células alcanzaron la fase estacionaria (10 días) fueron de 4.3, cuando en un inicio el pH fue ajustado a 5.8. Después de que las células se lavaron y se dejaron 24 horas desprovistas de nitrato, el pH registrado fue de 4.5. Cuando las células se expusieron a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM, los registros de pH cada hora indicaron que

VARIACION DE pH DURANTE LA ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO

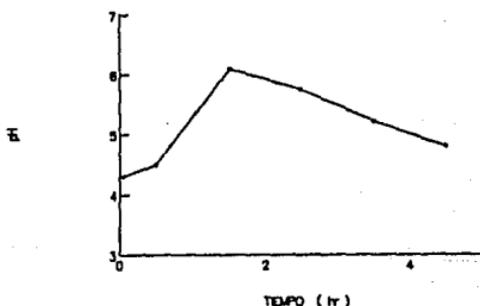


Figura 12. Determinación de pH en el medio en agitación, cada hora después de agregar la solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM.

había aumento o disminución de pH entre rangos no mayores de 4 y 6 (figura 12). Estas variaciones de pH en el medio durante la entrada y salida de nitrato por las células hicieron que se procediera a usar medios amortiguados.

En la segunda parte de este trabajo, se utilizaron medios amortiguados a pH 6 con dos amortiguadores: Bis-Tris y Mes, a concentraciones de 1, 10 y 20 mM de nitrato.

Las células que estuvieron expuestas a una concentración de 1 mM de nitrato amortiguado a pH 6 con Bis-Tris (figura 13), durante la primera media hora sólo se registró una pequeña salida de nitrato (10%). En las siguientes 4 horas se registró una entrada de nitrato que fue bastante prolongada, llegando hasta un 67%. Cuando las células se mantuvieron en las mismas condiciones pero con amortiguador Mes (figura 13), también en la primera media hora se registró una salida de nitrato, aunque de mayor tamaño que en el tratamiento con Bis-Tris (117%). Después de ésta salida se inicia una entrada de nitrato por una hora (84%), pero no se prolonga como en el medio con Bis-Tris, ya que después se inicia otra vez una salida de nitrato por 2 horas que alcanzó un 98% y en la última hora una ligera entrada de nitrato (92%).

Cuando se expusieron las células a una concentración moderada de nitrato de 10 mM, las tendencias tanto en el tratamiento con Bis-Tris y Mes fueron muy similares (figura 14). En un inicio una pequeña salida y después una entrada de nitrato, que en el caso del tratamiento con Bis-Tris termina a las dos y media horas y con Mes se termina a la hora y media. Más tarde, en ambos tratamientos

MEDIO AMORTIGUADO A pH 6

57

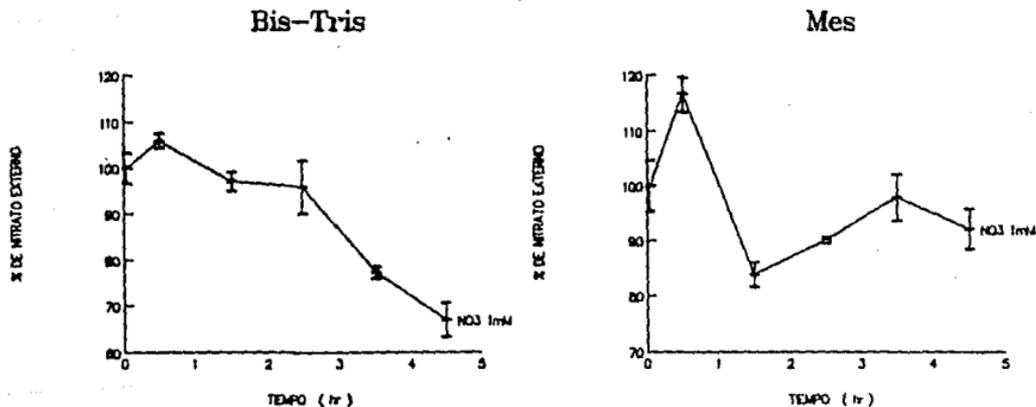


Figura 13. Células de *B. ternifolia* expuestas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 1 mM con pH amortiguado a 6 con Bis-Tris y Mes, después de un periodo de 24 horas desprovistas de nitrato.

MEDIO AMORTIGUADO A pH 6

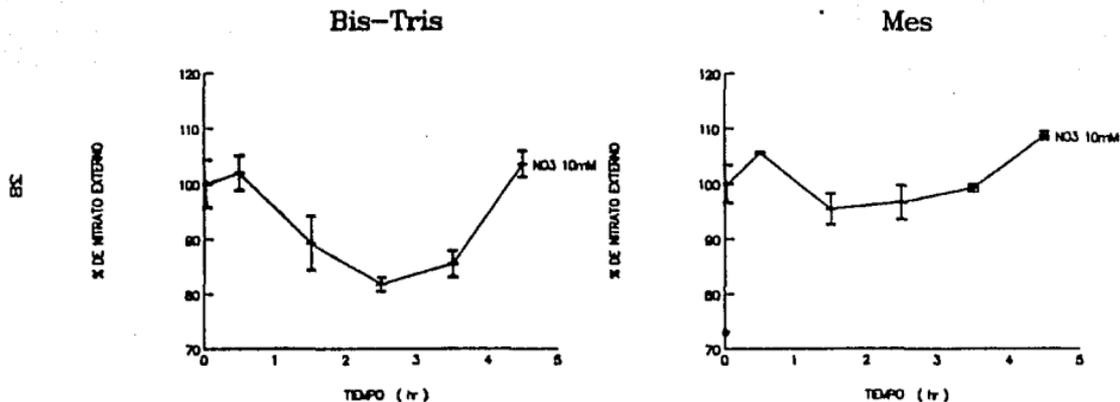


Figura 14. Células de *B. ternifolia* expuestas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM con pH amortiguado a 6 con Bis-Tris y Mes, después de un periodo de 24 horas desprovistas de nitrato.

MEDIO AMORTIGUADO A pH 6

39

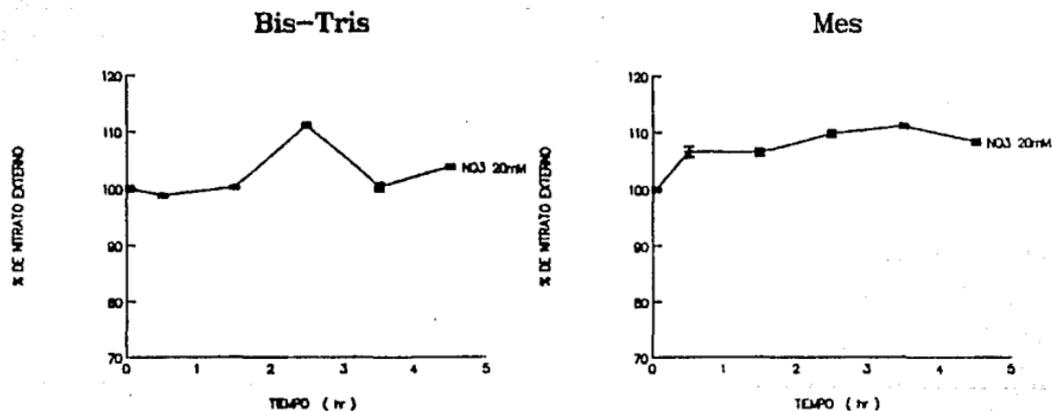


Figura 15. Células de *B. ternifolia* expuestas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 20 mM con pH amortiguado a 6 con Bis-Tris y Mes, después de un periodo de 24 horas desproviatas de nitrato.

se inicia una salida de nitrato que alcanzó un porcentaje de nitrato externo máximo de 104 y 109% para Bis-Tris y Mes respectivamente.

Cuando las células fueron expuestas a concentraciones moderadamente altas de 20 mM de nitrato, en el tratamiento con Bis-Tris (figura 15), en la primera hora y media la cantidad de nitrato externo permaneció casi constante, alrededor del 100% inicial (99 y 100%). En la siguiente hora hubo una salida de nitrato (111%) y después hubo una entrada de nitrato disminuyendo el porcentaje de nitrato externo a 100%. En la última hora ocurrió una salida de nitrato que sólo alcanzó un 104%. En el caso del tratamiento con Mes (figura 15), durante tres horas y media se registró una salida de nitrato en las células, sólo que ésta fue ligera, ya que alcanzó un valor máximo de 111%. En la última hora sólo se registró una entrada salida de nitrato que disminuyó a 108%. Las diferencias máximas y mínimas del porcentaje de nitrato externo fueron del 13% para Bis-Tris y del 11% para Mes.

Una vez terminada esta parte, se consideró que los tratamientos con Mes y Bis-Tris presentaron un comportamiento muy similar en la concentración de 10 mM de nitrato, que fue donde mejor se presentó el fenómeno de entrada y salida de nitrato.

Cuando la solución de sacarosa (3%) y nitrato (10 mM) fue amortiguada a pH 5.5, el porcentaje de nitrato externo disminuyó conforme al tiempo, esta entrada de nitrato se prolongó tres horas y media y alcanzó un valor de 83% (figura 16). En la siguiente hora se registró una salida de nitrato, que casi llegó a su valor

MEDIO AMORTIGUADO

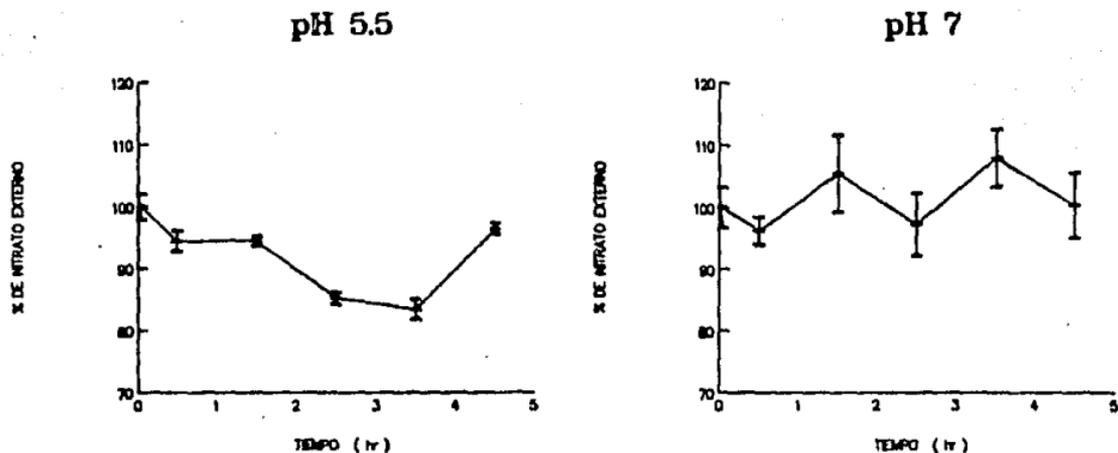


Figura 16. Células de *B. ternifolia* expuestas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM a diferentes pH amortiguados con Mes.

inicial del 100% (97%).

En el medio que fue amortiguado a pH 7, el fenómeno de entrada y salida de nitrato se disminuye en comparación de pH 5.5 (figura 16), pues se registraron 3 entradas y 2 salidas de nitrato de las células; sin embargo, son más reducidas que en pH 5.5.

MEDIO AMORTIGUADO A pH 5.5 NITRATO 10 mM

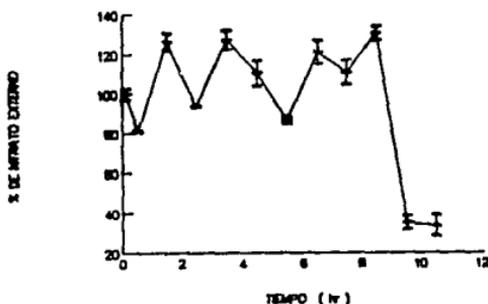


Figura 17. Células de *B. ternifolia* expuestas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM con pH amortiguado a 5.5 con Mes. La duración de la exposición fue de 10.5 horas.

El tratamiento en que las células fueron expuestas a sacarosa (3%) y nitrato 10 mM, con pH amortiguado a 5.5 con Mes por 10 horas de exposición (figura 17), durante la primera media hora se registró una entrada de nitrato (81%) y en la siguiente hora una salida de nitrato que llegó a rebasar el 100% y alcanzó un

porcentaje de 126%. En la siguiente hora hubo de nuevo una entrada de nitrato y alcanzó un valor de 94%, después ocurrió una salida de nitrato de las células y alcanzó un valor de 127%. En las anteriores horas (de 0 a 3.5) siempre se registró una entrada y una subsecuente salida de nitrato, pero después de tres horas y media de exposición a nitrato se registró una entrada de nitrato que se prolongó por 2 horas (87%). En las 3 horas siguientes hubo de nuevo una salida y una entrada de nitrato (121, 111 y 130%). Después de ocho horas y media de exposición a nitrato, el porcentaje de nitrato externo disminuyó drásticamente a un 35% y fue una entrada de nitrato que se prolongó hasta la siguiente hora (33%).

Se llevaron 4 tratamientos control para saber si en estos se presentaba el fenómeno de entrada y salida de nitrato. En el primer control (figura 18), se utilizó KNO_3 10 mM en lugar de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Durante la primera hora y media se registró una entrada de nitrato (64%) y en las siguientes 3 horas el porcentaje de nitrato comenzó a aumentar y alcanzó un valor máximo de 98%. En este tratamiento se corroboró que también con KNO_3 se presenta el fenómeno de entrada y salida de nitrato.

El segundo control consistió en exponer a las células a una solución de nitrato 10 mM pero sin sacarosa (figura 18). En la primera hora y media de exposición, las células sacaron nitrato al medio exterior alcanzando un valor máximo de 116%. En la siguiente hora hubo una ligera entrada de nitrato (112%) y después otra salida de nitrato que también es ligera (117%). Sólo en la última

MEDIO AMORTIGUADO A pH 5.5

44

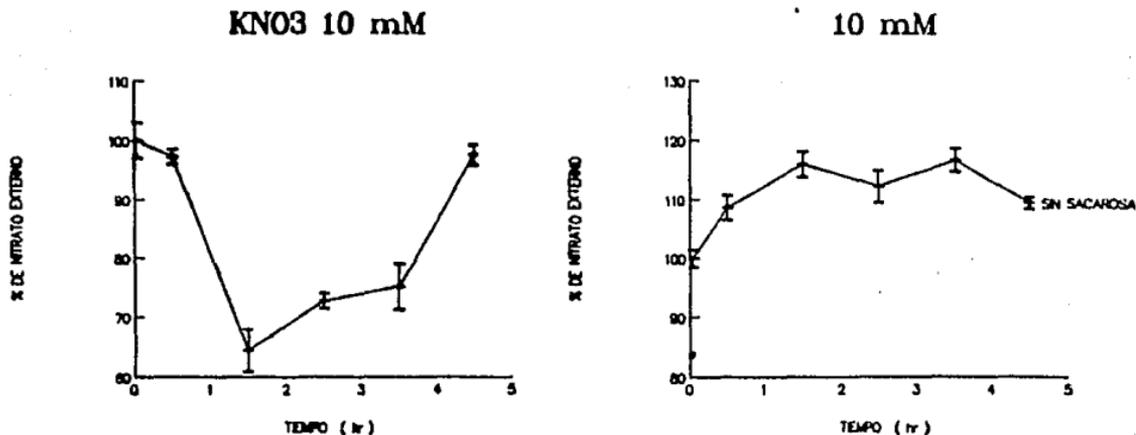


Figura 18. Células de *B. ternifolia* expuestas a una solución de sacarosa (3%) y KNO₃ 10 mM con pH amortiguado a 5.5 con Mes. En un segundo tratamiento las células se expusieron a una solución de nitrato 10 mM sin sacarosa y con pH amortiguado a 5.5 con Mes.

ENTRADA Y SALIDA DE NITRATO

45

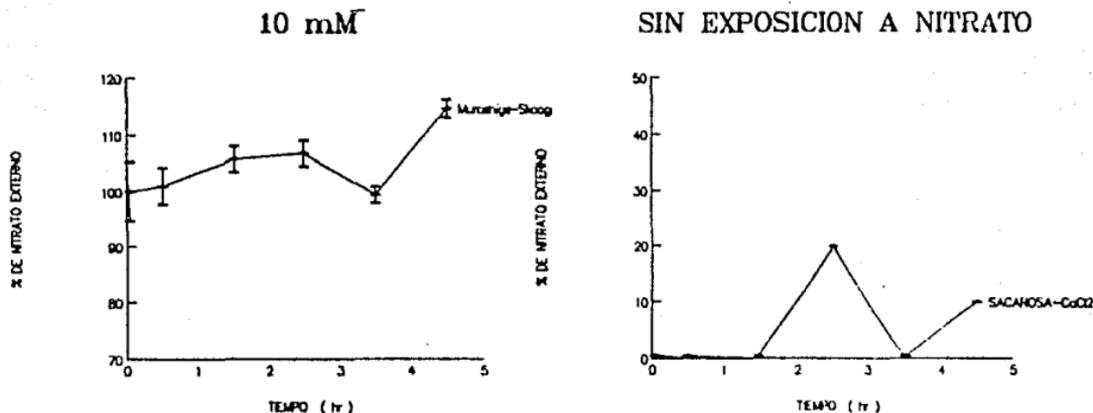


Figura 19. Células de *B. ternifolia* que fueron incubadas 24 horas en medio Murashige-Skoog (sin ninguna fuente de nitrógeno) y después expuestas a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM. Un segundo tratamiento consistió en dejar a la células en la solución de sacarosa-CaCl₂ por más de 24 horas.

hora se registró una entrada de nitrato que fue un poco más marcada y que alcanzó un valor de 109%.

En el tercer control se mantuvieron células incubadas en medio Murashige-Skoog por 24 horas, pero sin ninguna fuente de nitrógeno en el medio, con pH ajustado a 5.8 (sin amortiguar) (figura 19). Cuando se cumplieron 24 horas, las células se expusieron a una solución de sacarosa (3%) y nitrato 10 mM (ya que fue la concentración en la que mejor se presentó el fenómeno de entrada y salida de nitrato de los tratamientos donde el pH no fue amortiguado). Durante dos horas y media de exposición a nitrato se registró una salida de nitrato que alcanzó un valor máximo de 107% y en la siguiente hora hubo una entrada de nitrato (99%). En la última hora se registró una salida de nitrato que fue más marcada que la primera (114%).

En el último control las células nunca estuvieron en la presencia de nitrato (figura 19), sólo se mantuvieron en la solución de sacarosa-CaCl₂ después de que cumplieron 24 horas desprovistas de nitrato. Esto se hizo con la finalidad de saber si las células eran capaces de sacar y meter nitrato que tuvieran almacenado en ausencia de nitrato en el medio externo. En la primera hora y media, el porcentaje de nitrato externo permaneció constante (0%). Después de hora y media se registró una salida de nitrato que alcanzó un valor máximo de 19%. El nitrato almacenado salió de las células y se volvió a tomar del medio externo en la siguiente hora (0%). En la última hora se registró de nuevo una salida de nitrato (10%).

DISCUSION

Algunos autores han demostrado que la presencia de nitrato en el medio externo, estimula la entrada de nitrato en raices de Cebada y Maiz (5,6,24,26,28,44,). Además, debe considerarse que la toma neta de nitrato es la diferencia entre la entrada y salida de nitrato a través de la membrana plasmática (10,19,21,24,31,32). Una probable inhibición del sistema de transporte para el nitrato debido a altas concentraciones de nitrato en la célula y el aumento en la salida de nitrato, son factores que pueden afectar la toma neta de nitrato en la célula (21). MacKown en 1981 (20), propuso que la acumulación de nitrato en la vacuola, parece ser un factor que restringe la entrada y que al mismo tiempo aumenta la salida de nitrato de la célula.

Cuando se expusieron raices de Cebada a concentraciones de 10, 50, 100 y 750 μM , la salida de nitrato era mayor conforme la concentración de nitrato aumentaba en el medio externo (11). Además, se ha encontrado que iones como el NH_4^+ pueden estimular la salida de nitrato en raices de Cebada (12).

Una vez que el nitrato es expulsado de la célula, más tarde puede ser reabsorbido (21,22).—La salida de nitrato de la célula sirve como un proceso pasivo y que es independiente de los procesos de toma de nitrato. Por esto la salida de nitrato puede servir como un proceso regulador de la entrada y concentración

citoplasmática de nitrato (11,23,24,31). Sin embargo, deben considerarse otros factores que pueden hacer disminuir la toma de nitrato en la raíz (11). Mackown *et al* en 1983 (22), encontraron que en raíces de maíz hay una relación recíproca entre la salida y reducción de nitrato, pues cuando hay un aumento en la salida hay una disminución en la reducción de nitrato. De manera contraria cuando disminuye la salida aumenta la reducción de nitrato. El nitrato que entraba ($^{15}\text{NO}_3^-$) era más rápidamente reducido que el nitrato endógeno ($^{14}\text{NO}_3^-$).

Cuando las plantas tienen una mediana deficiencia o permanecen desprovistas un corto periodo de un nutriente, puede haber un aumento en la toma en una consecuente exposición al nutriente. Recientes estudios han confirmado que en plantas que permanecieron desprovistas de nitrato por 3 días, la toma de nitrato se incrementó cuando se expusieron a una solución con nitrato (19,47). Cuando plántulas de Cebada fueron desprovistas de nitrógeno, la entrada de nitrato fue estimulada, pero fue restringida la entrada y salida de nitrato cuando las plántulas tuvieron un alto status de nitrógeno (19).

1. Altas y Bajas concentraciones de Nitrato

Cuando células de *B. ternifolia* se expusieron a concentraciones bajas de nitrato (0.2 y 1 mM), el primer evento que ocurrió fue una salida de nitrato. Este aumento de nitrato en el medio externo muestra que las células almacenan nitrato antes de que sean desprovistas de nitrato; además, este nitrato almacenado no es asimilado aún cuando las células estuvieron sin nitrato por 24

horas.

Las células son capaces de mantener variables cantidades de nitrato almacenado y no asimilarlo aún después de 24 horas sin la presencia de nitrato. Esto se muestra en la concentración de 0.2 mM, donde el porcentaje de nitrato externo aumentó de un 100% inicial a 121% en la primera media hora, habiendo una diferencia de 21%. El 21% corresponde a una concentración de 0.042 mM. En altas concentraciones de 25 y 50 mM de nitrato también el primer evento que ocurrió fue una salida de nitrato. En 25 mM la cantidad de nitrato que salió de las células fue del 6% en la primera hora y media, este porcentaje corresponde a una concentración de 1.5 mM. Para la concentración de 50 mM la cantidad de nitrato que salió de las células fue del 19% en una hora y media y corresponde a una concentración de 9.5 mM. Esto refleja que la cantidad de nitrato almacenado en las células de *B. ternifolia* va de concentraciones de 0.042 a 9.5 mM, cantidades bajas y medianas de nitrato.

Se ha estimado que la concentración citoplasmática de nitrato en células de raíz de *Pisum* es de 5 a 15 mM, una concentración muy cercana a la estimada de la que se almacena en células de *B. ternifolia*; sin embargo, como la poza metabólica es más pequeña que la poza de almacenamiento, es probable que la concentración de nitrato vacuolar almacenado en *Pisum* sea mayor a la citoplasmática (31).

La salida de nitrato fue mayor conforme se aumentó la concentración de nitrato, obteniéndose resultados similares a un estudio realizado con raíces de Cebada (12).

En esta primera parte, se consideró que la concentración de 10 mM de nitrato fue en la que mejor se presentó el fenómeno de entrada y salida de nitrato en células en suspensión de *B. ternifolia*, ya que en esta concentración de nitrato no se rebasó el 100% inicial, pues una vez que disminuyó el porcentaje de nitrato externo, éste sólo llegó a aumentar a un 90%.

En las diferentes concentraciones probadas siempre se presentó una entrada y una salida de nitrato a excepción de 15 mM donde sólo hubo una entrada de nitrato en las 4.5 horas de exposición a nitrato. La entrada y salida de nitrato ocurre a bajas, medianas y altas concentraciones de nitrato y no es dependiente de la concentración externa de nitrato.

2. Efecto de pH

Las determinaciones de pH en el medio Murashige-Skoog y cada hora cuando las células se expusieron a nitrato, indicaron que había grandes variaciones en el pH, pues éste osciló entre 4 y 6 (figura 12). En cultivos en suspensión de Zanahoria e *Ipomea sp.*, el pH inicial del medio de cultivo fue ajustado a 5, pero después de 10 días de cultivo el pH disminuyó a rangos de 4 y en algunos casos disminuyó hasta 3.8 (36,49). Cuando se agregó nitrato al cultivo en suspensión de Zanahoria, el pH del medio disminuía conforme aumentaba la concentración de nitrato (48). Por lo que los medios de cultivo utilizados tuvieron una baja capacidad de amortiguamiento, lo que también sucedió con el medio Murashige-Skoog.

Deane-Drummond y Glass en 1982 (10), observaron el efecto de pH

en la toma de nitrato en soluciones con pH desde el rango de 4 a 9 (pH inicial sin amortiguar) en raíces de Cebada. En el pH ácido la toma de nitrato fue mayor en comparación a un pH básico, por lo que la sensibilidad de toma de nitrato sobre el pH, puede ser función de la especie y del status de nitrato en el tejido.

2.1. Medios Amortiguados (Diferentes concentraciones de Nitrato)

Por las variaciones de pH en el medio, se pensó en un principio que estos resultados podrían apoyar la idea de que las ATPasas que se encuentran en la membrana plasmática bombeaban protones al medio exterior celular formando un gradiente electroquímico, el cual era aprovechado para transportar nitrato a través de la membrana plasmática por un mecanismo simport o antiport, por lo que las variaciones de pH se presentaban por el gradiente electroquímico formado. Sin embargo, los resultados mostrados en los que se utilizó nitrato a 1, 10 y 20 mM con pH amortiguado a 6 con dos amortiguadores (Bis-Tris y Mes), indicaron que si se presentó el fenómeno de entrada y salida de nitrato. En los 6 tratamientos tanto con Bis-Tris y Mes (figura 13, 14 y 15), el primer evento que ocurrió fue una salida de nitrato de las células a excepción de 20 mM con Bis-Tris, en la que primero se mantuvo constante la cantidad de nitrato externo en hora y media para después haber una salida de nitrato en la siguiente hora (figura 15).

Esta salida de nitrato que se presentó como primer evento fue de la misma magnitud que en los tratamientos donde no se amortiguó el pH. En la concentración de 1 mM (figura 13), el tratamiento con

Bis-Tris registró una salida de nitrato en la primera media hora y alcanzó un porcentaje de 6. En el otro tratamiento con Mes, hubo una salida de nitrato en la primera media hora y el valor alcanzado fue de 17%. El 6 y 17% corresponden a una concentración de 0.06 y 0.17 mM para Bis-Tris y Mes respectivamente.

En el tratamiento con 10 mM, la salida de nitrato en los tratamientos con Bis-Tris y Mes fueron del 2 y 6% respectivamente. Estos porcentajes corresponden a una concentración de 0.2 y 0.6 mM con respecto al 100% inicial que fue de 10 mM.

Para la última concentración de 20 mM, el porcentaje alcanzado en Bis-Tris y Mes fueron del 11 y 7% y corresponden a 2.2 y 1.4 mM respectivamente. La cantidad de nitrato que salió de las células fue similar a los tratamientos donde el pH no fue amortiguado.

La concentración de 10 mM de nitrato, en el tratamiento con Bis-Tris y Mes, se consideró que fue la mejor, porque durante cuatro horas y media de exposición de las células a la solución, se presentó claramente el fenómeno de entrada y salida de nitrato alcanzando un 106% como porcentaje máximo. Por esto se procedió a utilizar esta concentración para una parte posterior de este trabajo, que consistió en probar diferentes pH con Mes. Sólo se utilizó Mes ya que el rango de amortiguación es mayor para Mes que para Bis-Tris. Los pH probados fueron 5.5 y 7.

2.2. Diferentes pH (Nitrato 10 mM)

Posteriormente, se pretendía conocer si a diferentes pH se daba el fenómeno de entrada y salida de nitrato y efectivamente a diferentes pH ocurrió la entrada y salida de nitrato,

presentándose un comportamiento muy similar en pH 5.5 como en el tratamiento de pH 6 con 10 mM de nitrato, sólo que en éste caso no se había presentado en la primera media hora una pequeña salida de nitrato (figura 14 y 16). Para el caso de pH 7, la cantidad de nitrato externo se mantuvo casi constante durante las 4.5 horas, alrededor del 100% inicial (figura 16). De esta manera, se consideró que el mejor tratamiento fue el de pH 5.5, porque presentó un comportamiento similar a los tratamientos de 10 mM de nitrato y pH amortiguado a 6 con Bis-tris y Mes (figura 15).

Cuando las células se expusieron a nitrato 10 mM con pH 5.5 el fenómeno de entrada y salida de nitrato se presentó claramente, y presentó un comportamiento similar al tratamiento de pH 6 y nitrato 10 mM (sin pH amortiguado) (figura 9,14).

3. Periodos Largos de Exposición

Cuando células de *B. ternifolia* se expusieron a un periodo largo de 10 horas a una solución de 10 mM de nitrato y pH amortiguado a 5.5, se presentó claramente el fenómeno de entrada y salida de nitrato durante las primeras ocho horas y media, pero a las nueve y diez horas y media el porcentaje de nitrato disminuyó drásticamente a valores de 35 y 33% respectivamente (figura 18). Esta caída en el porcentaje pudo deberse a que las células después de que estuvieron un largo tiempo de exposición, asimilaban el nitrato que llegaron a expulsar dos horas antes.

4. Efecto de Potasio

Para conocer si con KNO_3 se presentaba el fenómeno de entrada y

salida de nitrato en células de *B. ternifolia*, se utilizó a una concentración de 10 mM, con sacarosa(3%) y pH amortiguado a 5.5, en las mismas condiciones que en el tratamiento con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

En la exposición a KNO_3 hubo una entrada de nitrato y una salida de nitrato que fueron bastantes evidentes y que fueron de mayor magnitud en comparación al tratamiento con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (figura 15).

Ruffy *et al* en 1981 (37), encontraron que raíces de Trigo desarrollaron un periodo máximo de toma de nitrato cuando se mantuvieron en presencia de potasio; además, el transporte de nitrato de raíz a tallo también aumentó cuando el potasio estaba presente. La toma de nitrato fue mayor con KNO_3 (20%) que con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pero menor la reducción cuando en el medio había KNO_3 . Ruffy *et al* concluyeron que es probable que el potasio estimule las ATPasas de la membrana plasmática para formar un gradiente electroquímico el cual se aprovecha para el transporte de nitrato al interior de la célula, además de que el potasio y nitrato sean transportados juntos al xilema y por eso el transporte fue estimulado cuando había potasio en el medio externo.

5. Efecto de Sacarosa

Cuando se eliminó la sacarosa del medio, las dos salidas de nitrato que se registraron en las 4.5 horas de exposición fueron de poca magnitud, ya que el nitrato que salió en la primera hora y media (17%) sólo un 5% se llegó a tomar del medio externo. Por lo que la sacarosa puede ser un factor determinante en la entrada y salida de nitrato, ya que puede ser un origen de energía para la

célula y si los procesos de transporte de nitrato a través de la membrana plasmática requieren energía, cuando no hay sacarosa entonces el fenómeno de entrada y salida de nitrato se ve disminuido.

6. Celulas Incubadas en Murashige-Skoog

El tratamiento en el que las células fueron incubadas en medio Murashige-Skoog sin ninguna fuente de nitrógeno, se hizo con la finalidad de conocer si las células eran capaces de tomar y expulsar nitrato, una vez que cumplieran 24 horas incubadas con la presencia de otros nutrientes como Mg^{2+} , Fe^{2+} , SO_4^{2-} , Zn^{2+} etc.

Cuando las células fueron expuestas a sacarosa (3%) y nitrato 10 mM después de haber cumplido su incubación en medio Murashige-Skoog, se presentó el fenómeno de entrada y salida de nitrato, aunque en las primeras dos horas y media sólo se registró una salida de nitrato, pero en la siguiente hora hubo una entrada de nitrato y después de nuevo una salida de nitrato que fue de mayor magnitud que la primera.

7. Celulas Sin la Presencia de Nitrato

Cuando las células cumplieron 24 horas sin nitrato, se lavaron y se les volvió a dejar sin la presencia de nitrato. Se registraron 2 salidas y una entrada de nitrato, por lo que durante el tiempo que permanecieron sin nitrato por 24 horas, las células probablemente también expulsaron y tomaron nitrato. En éste tratamiento se demuestra que no es posible dejar sin nitrato completamente a las células de nitrato, pues hay salida y después

una entrada de nitrato.

Las células de *B. ternifolia* probablemente siguen una dinámica de mantenimiento de nitrato dentro de la célula a pesar de que no hay nitrato en el medio externo, pues sigue habiendo nitrato en las células aún cuando permanecieron 24 horas sin presencia de nitrato en el medio y es probable que durante este tiempo sólo asimilen una pequeña cantidad.

La interacción de la poza de nitrato vacuolar y citoplasmática puede ser muy compleja, ya que del nitrato que pasa al citoplasma (tomado del medio externo), puede transportarse a la vacuola o bien salir de nuevo. El nitrato de la vacuola se transporta al citoplasma y del citoplasma al medio exterior y el nitrato que está en el medio exterior puede volverlo a tomar la célula.

8. Sistema Establecido

Podemos considerar que el sistema establecido en el que se emplearon células en suspensión de *B. ternifolia* en fase estacionaria, con un periodo de 24 horas sin la presencia de nitrato y su consecuente exposición a éste, es bueno para determinar la entrada y salida de nitrato sin el uso de análogos de nitrato como $^{30}\text{ClO}_3^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$ ó $^{15}\text{NO}_2^-$.

CONCLUSIONES

El fenómeno de entrada y salida de nitrato se presentó en altas y bajas concentraciones de nitrato en el medio y no fue dependiente de su concentración externa.

Durante la exposición de la células a nitrato, se registraron variaciones de pH, cuando el pH fue ácido, la entrada y salida de nitrato fue de mayor magnitud en comparación a pH neutro.

La concentración de 10 mM de nitrato fue la que presentó mejores resultados, respecto a una mejor apreciación de la entrada y salida de nitrato, tanto en los medios con pH amortiguado como en los que no fue amortiguado.

La sacarosa parece ser un factor determinante en la entrada y salida de nitrato, pues cuando se elimina del medio, el fenómeno de entrada y salida de nitrato se ve disminuido.

Con KNO_3 (10 mM), la entrada y salida de nitrato fue de mayor magnitud en comparación con $Ca(NO_3)_2$.

Se propone que solo una pequeña cantidad de nitrato se llega a incorporar a las células durante el periodo en que permanecieron desprovistas de nitrato, pues cuando las células permanecieron por más de 24 horas sin nitrato en el medio externo, éstas expulsaron el nitrato que tenían almacenado y después lo volvieron a tomar.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrol, Y.P., Sawhney, S.K. and Naik, M.S. 1983. Light and dark assimilation of nitrate in plants. *Plant Cell and Environment* 6:595-599.
2. Aslam M. and Huffaker, R.C. 1984. Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of Barley under aerobic conditions. *Plant Physiol* 75:623-628.
3. Blumwald E. and Poole, R.J. 1985. Nitrate storage and retrieval in *Beta vulgaris*: effects of nitrate and chloride on proton gradients in tonoplast vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3683-3687.
4. Brauer D., Hsu A-F and Tu S-I. 1988. Factors associated with the instability of nitrate-insensitive proton transport by maize root microsomes. *Plant Physiol* 87:598-602.
5. Butz R. and Jackson, W.A. 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry* 16:409-417.
6. Campbell, W.H. 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Plant Physiol* 74:214-219.
7. Cataldo, D.A., Haroon M., Schader, L.F. and Young, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitritation of salicylic acid. *Com Soil Sci and Plant Analysis* 6:71-80.
8. Churchill, K.A., Holaway, B. and Sze H. 1983 Separation of two types of electrogenic H⁺-pumping ATPases from Oats roots. *Plant Physiol* 73:921-928.
9. Cram, W.J. 1973. Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plants cells. *J Exp Bot* 24:328-341.
10. Deane-Drummond, C.E. and Glass, A.D.M. 1982. Studies of nitrate influx into Barley roots by the uses of ³⁰ClO₃⁻ as a tracer for nitrate. Interactions with chloride and other ions. *Can J Bot* 60:2147-2153.
11. Deane-Drummond, C.E. and Glass, A.D.M. 1983. Short term studies of nitrate uptake into Barley plants using ion-specific electrodes and ³⁰ClO₃⁻. *Plant Physiol* 73:100-104.

12. Deane-Drummond, C.E. and Glass, A.D.M. 1983. Short studies of nitrate uptake into Barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. *Plant Physiol* 73:105-110.
13. Deane-Drummond, C.E. and Thayer, J.R. 1986. Nitrate transport characteristics in *Hordeum vulgare* L. seedlings using three different tracer techniques. *J Exp Bot* 37:429-439.
14. Fernández L. and Sánchez, J.E. 1981. *In vitro* culture of *Bouvardia ternifolia*. *Can J Bot* 60:917-921.
15. Gallagher, L.W., Khairy M.S., Rains, D.W., Qualset, C.O. and Huffaker, R.C. 1983. Nitrogen assimilation in common wheats differing in potential nitrate reductase activity and tissue nitrate concentrations. *Crop Science* 23:913-918.
16. Glass, A.D.M., Thompson, R.G. and Bordeleau L. 1985. Regulation of NO_3^- influx in Barley. *Plant Physiol* 77:379-381.
17. Granstedt, R.C. and Huffaker, R.C. 1982. Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. *Plant Physiol* 70:410-413.
18. Iren, F.V. and Sluijs, P.B-V. 1980. Symplastic and apoplasmic radial ion transport in plants roots. *Planta* 148:130-137.
19. Lee, R.B. and M.C. Drew. 1986. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in Barley roots. *J Exp Bot* 37:1768-1779.
20. MacKown, C.T., Volk, R.J. and Jackson, W.A. 1981. Nitrate accumulation, assimilation, and transport by decapitated corn roots. *Plant Physiol* 68:133-138.
21. MacKown, C.T., Volk, R.J. and Jackson, W.A. 1982. Nitrate assimilation by decapitated corn root systems: effect of ammonium during induction. *Plant Science Letter* 24:295-302.
22. MacKown, C.T., Jackson, W.A. and Volk, R.J. 1983. Partitioning of previously accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta* 157:8-14.
23. MacKown, C.T. 1987. Nitrate uptake and assimilation following nitrate deprivation. *J Exp Bot* 38:1079-1090.
24. MacKown, C.T. and McClure, P.R. 1988. Development of accelerated net nitrate uptake. *Plant Physiol* 87:162-166.
25. Martinoia E., Heck U. and Wiewkem A. 1981. Vacuoles as a storage compartments for nitrate in Barley leaves. *Nature* 289:292-294.
26. Morgan, M.A., Jackson, W.A. and Volk, R.J. 1985. Concentration-dependence of the nitrate assimilation pathway in maize roots. *Plant Science* 38:185-191.

27. Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15:473-497.
28. Naik, M.S., Abrol, Y.P., Nair, T.V.R. and Ramarao, C.S. 1982. Nitrate assimilation it's regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. *Phytochemistry* 21:495-504.
29. Oaks A. 1974. The regulation of nitrate reductase in suspension cultures of Soybean cells. *Bioch Biophys Acta* 372:122-126.
30. Ohta D., Match T. and Takahashi E. 1988. Sodium-stimulated NO_3^- uptake in *Amaranthus tricolor* L. plants. *Plant Physiol* 87:223-225.
31. Oscarson, P. Ingemarson, B., Ugglas M. and Larsson, C.M. 1987. Short-term studies of NO_3^- uptake in *Pisum* $^{15}\text{NO}_3^-$. *Planta* 170:550-555.
32. Pearson, C.J., Volk, R.J. and Jackson, W.A. 1981. Daily changes in nitrate influx, efflux and metabolism in maize and Pear millet. *Planta* 152:319-324.
33. Reed, A.J. and Calvin, D.T. 1982. Light and dark controls of nitrate reduction in Wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. *Plant Physiol* 69:508-513.
34. Reed, A.J., Calvin, D.T., Sherrad, J.M. and Hageman, R.H. 1983. Assimilation of [^{15}N]nitrate and [^{15}N]nitrite in leaves of five plants species under light and dark conditions. *Plant Physiol* 71:291-294.
35. Remmler, J.L. and Campbell, W.H. 1986. Regulation of corn leaf nitrate reductase (synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein). *Plant Physiol* 80:442-447.
36. Rose D. and Martin, S.M. 1975. Effect of ammonium on growth of plant cells (*Pomoea* sp.) in suspension cultures. *Can J Bot* 53:1942-1949.
37. Ruffy, T.W., Jackson, W.A. and Raper D. 1981. Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. *Plant Physiol* 68:605-609.
38. Ruffy, T.W., Thomas, J.F., Remmler, J.L., Campbell, W.H. and Volk, R.J. 1986. Intercellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol* 82:675-680.
39. Ruffy, T.W., MaCkown, C.T. and Volk, R.J. 1989. Effects of altered carbohydrate availability on whole plant assimilation of $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol* 89:457-463.

40. Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1985. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Co. 540 pp.
41. Sánchez, E.A.M. 1989. El posible papel del nitrato como osmoregulador en células de *Bouvardia ternifolia*. Tesis Profesional (Biología), Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 67 pags.
42. Schumaker, H.S. and Sze H. 1987. Decrease of pH gradients in tonoplast vesicles by NO_3^- and Cl^- : evidence for H^+ -coupled anion transport. Plant Physiol 83:490-496.
43. Somers, D.A., Tsung-Ming K., Kleinhofs A., Warner, R.L. and Oaks A. 1983. Synthesis and degradation of Barley nitrate reductase. Plant Physiol 72:949-952.
44. Srivastava, H.S. 1980. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Phytochemistry 19:725-733.
45. Street, H.E. Applications of cell suspension cultures. In: Reinert J. and Bajaj, Y.P.S. (ed.): Plant Cell, Tissue, and Organ culture, pp. 649-65. New York. Springer-Verlag. 1977.
46. Sussman, M.R. and Harper, J.F. 1989. Molecular Biology of the plasma membrane of higher plants. Plant Cell 1:953-960.
47. Teyker, R.H. 1988. Exogenous $^{15}\text{NO}_3^-$ influx and endogenous $^{14}\text{NO}_3^-$ efflux by two maize (*Zea mays* L.) inbreds during nitrogen deprivation. Plant Physiol 86:778-781.
48. Tu S-I, Nagahashi G. and Brouillete, J.N. 1987. Proton pumping kinetics and origin of nitrate inhibition of tonoplast-type H^+ -ATPase. Arch Biochem Biophys 256:625-637.
49. Veliky, A.I. and Rose D. 1973. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell culture. Can J Bot 51:1837-1844.
50. Ward, M.R., Tischner R. and Huffaker, R.C. 1988. Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of Barley seedlings. Plant Physiol 88:1141-1145.
51. Zink, M.W. and Veliky, I.A. 1977. Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductases in cultured *Ipomoea* cells. Can J Bot 55:1557-1568.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ezequiel Murillo G. director de la tesis, por sus asesorías y críticas para la buena realización de éste trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 104 y Cultivo de Tejidos vegetales del Dpto. de Bioquímica Vegetal (División de Estudios de Posgrado), Facultad de Química, U.N.A.M. por su amistad.

A la M. en C. Minerva L. González I., Dra. Judith G. Márquez G., M.en C. Guillermo Laguna H. y M. en C. Alicia E. Brechú F. por las revisiones y críticas a la presente tesis.

A los compañeros del laboratorio de Citología Vegetal de la Facultad de Ciencias.