



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"INFLUENCIA DE LA GLICINA ·BETAINA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION
DE *Bouvardia ternifolia* SOMETIDAS A ESTRES
HIDRICO Y SALINO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE VALDEZ ARELLANO



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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.

I N D I C E

LISTA DE FIGURAS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1) Cultivo de tejidos vegetales.....	1
1.2) Características de <i>Bouvardia ternifolia</i>	4
1.3) Estrés hídrico y salino.....	5
1.4) Osmorregulación.....	8
1.5) Solutos compatibles.....	10
1.6) Glicina betaína.....	12
1.7) Daños causados por salinidad.....	15
1.8) Adaptación y compartimentalización en condiciones salinas.....	17
1.9) Adaptación a estrés hídrico.....	19
II. OBJETIVOS.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
A) Materiales.....	23
3.1) Material biológico.	
3.2) Material de vidrio.	
3.3) Equipo.	
3.4) Reactivos	
B) Métodos.....	26

3.5) Preparación de los medios de cultivo.....	26
3.5.1) Para la germinación de las semillas de <i>Bouvardia ternifolia</i>	26
3.5.2) Para el establecimiento del cultivo en suspensión.....	26
3.6) Esterilización de las semillas.....	27
3.7) Inducción de callos de <i>B. ternifolia</i>	27
3.8) Establecimiento del cultivo en suspensión.....	28
3.9) Parámetros de crecimiento.....	29
3.9.1) Peso seco.....	30
3.9.2) Porcentaje de paquete de volumen celular (%PVC).....	30
3.9.3) Volumen celular (por diferencia en la toma de $^3\text{H}_2\text{O}$ / ^{14}C -Sorbitol).....	30
3.9.4) Síntesis de ADN (^3H -Timidina).....	31
3.9.5) Síntesis de proteínas (^{35}S -Metionina).....	31
3.9.6) Determinación de proteína total (Lowry).....	32
IV. RESULTADOS.....	35
4.1.) Curva control	35
4.2.) Curvas en estrés hídrico.....	36
4.3.) Curvas en estrés salino.....	38
4.4.) Efecto de glicina betaína sobre estrés hídrico y salino.....	39

4.5.) Síntesis de ADN y proteínas.....	44
4.6.) Síntesis de proteínas totales (Lowry).....	50
4.7.) Cambios de volumen periplásmico.....	50
4.8.) Tablas de resultados con promedios y error estandar.....	51
V. DISCUSIÓN.....	64
5.1.) Curvas de crecimiento en condiciones de estrés hídrico.....	64
5.2.) Efecto de NaCl sobre células en suspensión de <i>Bouvardia ternifolia</i>	65
5.3.) Efecto de glicina betaína sobre NaCl 150mM.....	66
5.4.) Efecto de glicina betaína sobre estrés hídri- co (PEG 25%).....	67
5.5.) Efecto de glicina betaína sobre la síntesis de ADN y proteínas.....	68
5.6.) Efecto de glicina betaína sobre los cambios de volumen en estrés hídrico.....	70
VI. CONCLUSIONES.....	71
VII. REFERENCIAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAO
1(a). Curva control de crecimiento en medio MS (%PVC).....	36
1(b). Curva normal de crecimiento en medio MS (peso seco).....	36
2(a). Efecto de PEG sobre el crecimiento de células en sus- pensión de <i>Bouvardia ternifolia</i> (peso seco).....	37
2(b). Efecto de PEG sobre el crecimiento de células en sus- pensión de <i>Bouvardia ternifolia</i> (%PVC).....	37
3(a). Efecto de NaCl en células en suspensión de <i>Bouvardia ternifolia</i> (peso seco).....	40
3(b). Efecto de NaCl en células en suspensión de <i>Bouvardia ternifolia</i> (%PVC).....	40
4(a). Efecto de Glicina betaína en células en estrés hídri- co con PEG 25% (peso seco).....	41
4(b). Efecto de Glicina betaína en células en estrés hídri- co con PEG 25% (%PVC).....	41
5(a). Efecto de Glicina betaína sobre células en suspensión de <i>B. ternifolia</i> en condiciones salinas (peso seco)....	42
5(b). Efecto de Glicina betaína sobre NaCl en células en suspensión de <i>B. ternifolia</i> (%PVC).....	42
6 . Efecto de Glicina betaína sobre células en estrés hídri- co a partir del cuarto día de crecimiento (%PVC).....	46
7(a). Efecto de Glicina betaína sobre la síntesis de ADN (³ H-CPM/mg peso seco).....	47
7(b). Efecto de Glicina betaína sobre la síntesis de ADN (³ H-CPM/mg de proteína).....	47

7(c). Efecto de Glicina betaína sobre la síntesis de ADN (^3H -CPM/%PVC).....	48
8(a). Efecto de Glicina betaína en la síntesis de proteínas (^{35}S -CPM/%PVC).....	48
8(b). Efecto de Glicina betaína en la síntesis de proteínas (^{35}S -CPM/mg de peso seco).....	49
8(c). Efecto de Glicina betaína en la síntesis de proteínas (^{35}S -CPM/mg de proteína).....	49
9 . Proteínas totales en cultivo en suspensión de <i>Bouvardia</i> <i>ternifolia</i>	51
10. Volumen periplásmico por diferencia en la toma de $^3\text{H}_2\text{O}$ / ^{14}C -Sorbitol.....	51

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1) CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

El cultivo de tejidos vegetales es una serie de técnicas que consisten en obtener el crecimiento y la multiplicación ilimitada de células o tejidos de origen vegetal, cultivados "in vitro" en condiciones asépticas y perfectamente controladas. Las células se colocan en un medio nutritivo sólido o en suspensión (medio líquido) (Villalobos, 1985).

La historia del cultivo de tejidos vegetales se remonta a los años 1860-1861, en los que Sacko (1860) y Knops (1861) descubren que los compuestos orgánicos son las sustancias más importantes que absorben las plantas para su crecimiento y desarrollo. Estas observaciones traen como consecuencia, la elaboración de una sustancia nutritiva denominada solución Knops, empleada hasta la actualidad y que históricamente se usó como componente básico de los medios de cultivo (Villalobos, 1985).

A principio de siglo, la importancia de estas técnicas, al menos a nivel fundamental, es expuesta por el botánico alemán G.Haberland. Sin embargo, fue preciso esperar más de 30 años para que los resultados obtenidos por A.Carell, en 1912, con células animales fueran también observados en células vegetales. Los primeros éxitos conseguidos por R.G Gautheret en Francia y por J.P.White en EUA demostraban la posibilidad de cultivar tejidos vegetales fuera del contexto de la planta, de manera indefinida y en forma de masas celulares indiferenciadas (Villalobos, 1985).

El perfeccionamiento de las técnicas permitió a W.H.Muir, A.C.Hildebrandt y A.J.Riker, en Alemania, establecer en 1954 los primeros cultivos de células vegetales en suspensión, comparables a los practicados con los microorganismos (por ejemplo bacterias y hongos microscópicos) (Villalobos, 1985).

Al principio, los cultivos vegetales hallaron aplicaciones muy importantes en agronomía y en horticultura en cuanto al incremento de la productividad y el mejoramiento de los vegetales. En 1952, G.Morell y Cl.Martin, en Francia, demostraron que algunos tejidos vegetales, meristemáticos, son capaces de desarrollarse "in vitro" a plantas completas. El resultado fue origen de una verdadera revolución en el campo de la producción vegetal; permitió además el surgimiento de técnicas de micropropagación, que actualmente se desarrollan a escala comercial para la reproducción rápida de un gran número de especies vegetales (Villalobos, 1985).

Además estas técnicas son empleadas actualmente para realizar estudios de fisiología, bioquímica, genética, biología molecular, etc; así como para contribuciones prácticas en la multiplicación y mejoramiento de plantas útiles para el hombre (Fernández, 1979).

Existen diferentes modalidades de cultivos, y los más comunes son el cultivo de órganos, de embriones, de callos y cultivo en suspensión. Este último consiste de células aisladas y pequeños agregados que permanecen dispersos mientras se cultivan en medio líquido con agitación constante (Fernández, 1979).

Para el establecimiento de un cultivo en suspensión, frecuentemente se parte de un callo friable (las células se

disgregan fácilmente) para que al colocarlo en un medio líquido en agitación constante se disperse rápidamente. Después de 2 ó 3 semanas se produce una suspensión de células en crecimiento activo (Dixon, 1985).

La suspensión de células puede propagarse transfiriendo una alícuota del cultivo a medio fresco; después de 2 ó 3 transferencias, el cultivo se estabiliza de tal forma que el número de células en un tiempo dado después de la inoculación es comparable a la densidad celular al mismo tiempo de la siguiente transferencia. Para la mayoría de los cultivos de células en suspensión la densidad celular inicial mínima debe ser de 0.5 a 2.5×10^5 células por mililitro (Fernández, 1979).

El crecimiento de células en suspensión se puede determinar por varios parámetros como son: número de células, peso fresco, peso seco, volumen celular, cantidad de proteína, cantidad de ADN ó índice mitótico (Dixon, 1985).

Para determinar la curva de crecimiento de un cultivo se recomienda utilizar varios parámetros de los antes mencionados ya que la forma de la curva cambia dependiendo de que parámetro se utilice y el periodo de tiempo durante el cual se hagan las determinaciones (Fernández, 1979).

Para la mayoría de los cultivos en suspensión, la gráfica de crecimiento con respecto al tiempo de incubación muestra cuatro fases características. Después de la primera inoculación se presenta una fase lag en donde las células se preparan a dividir, posteriormente las células desarrollan una fase exponencial de crecimiento en donde su velocidad de división es máxima seguida de

una fase de crecimiento lineal. La división celular disminuye durante la fase de desaceleración progresiva. Durante la fase estacionaria el número de células se mantiene más o menos constante por un período de tiempo hasta que el número de células empieza a disminuir por lisis celular en dicha fase. No todos los cultivos en suspensión muestran el patrón típico de crecimiento (Fernández, 1979).

1.2) CARACTERÍSTICAS DE *Bouvardia ternifolia*.

Bouvardia ternifolia, también conocida popularmente con el nombre de "trompetilla", es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Rubiaceae y del orden de las Rubiales. Mide de 1m a 1.5m de altura; posee hojas con peciós lanceolados, base redondeada y borde entero, sus flores están agrupadas en cimas, son de color rojo y sus pétalos están fusionados formando un tubo. Esta planta es reconocida como medicinal y es utilizada contra varios tipos de afecciones como por ejemplo en hemorragia nasal. Se ha mostrado que contiene dos anticarcinógenicos "ciclo hexapeptidos" (Johnson, R.K. y M.P. Chitnis, 1978; Jolad, D.S. et al., 1977).

En cultivo de tejidos, *Bouvardia ternifolia* cuenta con las siguientes características : un rápido crecimiento tanto en medio sólido como líquido; es posible obtener además callo a partir de cualquier parte de la planta y de aquí cultivo en suspensión con ciclo de crecimiento corto, y capacidad para regenerar plantas a partir de callo (Sanchez de Jiménez y Fernández, 1983).

Conociendo las ventajas que presenta el cultivo de tejidos, es

claro que debe considerarse en todo momento como posible sistema experimental, como una herramienta más para realizar estudios sobre los posibles procesos bioquímicos que pudieran estar dándose en las células vegetales; ya sean procesos metabólicos normales, o por cambios en su medio ambiente propiciados por diversos factores como por ejemplo la sequía y salinidad.

La osmorregulación (mecanismo por el cual las células tienden a mantener en equilibrio su potencial osmótico interno con el del medio externo) es uno de éstos procesos bioquímicos de gran importancia, por lo que existe mucho interés por conocer más acerca de la habilidad de las células de organismos superiores para regular su potencial osmótico interno. Aunque es considerable el conocimiento de éste proceso en ciertas algas, en lo que respecta a plantas superiores, la comprensión de la osmorregulación es mucho más limitada (Handa, A.K. et al., 1982).

Existen sustancias denominadas solutos citoplasmáticos compatibles, los cuales se cree están involucrados en la respuesta osmorregulatoria de las plantas, actuando como solvatores de proteínas y membranas que de otro modo sufrirían por la pérdida de agua o por la presencia excesiva de iones (Higgins, C.F. et al., 1987).

1.3) ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO.

El término estrés ha sido generalmente empleado para indicar un estado de tensión, el cual puede conducir a un desequilibrio. Biológicamente hablando, Jacobo Levitte (1972) sugiere que el

estrés es un cambio en las condiciones, las cuales pueden reducir ó cambiar adversamente el crecimiento de un ser vivo o las funciones normales de su desarrollo.

No obstante, el término estrés ha sido difícil de definir considerando hasta que punto es válido establecer que un ser vivo se encuentra bajo estrés, si aún en condiciones extremas, como por ejemplo, suelos altamente salinos o que tienen un escaso suministro de agua, son capaces de realizar sus funciones vegetativas y reproductivas.

El estrés osmótico puede ser causado ya sea por la pérdida de agua (estrés hídrico) ó por salinidad, la cual posee dos componentes: la pérdida de agua y el daño por presencia de iones (Valenzuela, E. 1989).

Experimentalmente el estrés de agua puede ser causado por solutos impermeables como el polietilén glicol (PEG), mientras que el estrés salino es causado por varios iones, principalmente sodio y cloro, los que sí pueden ser transportados dentro y fuera de la célula (Ben Hayyim, 1987).

Por lo tanto, el estrés hídrico y salino no son completamente el mismo fenómeno aunque ambos someten a los organismos a una disminución del potencial osmótico, lo que influye de manera importante en su desarrollo y metabolismo.

Para comprender mejor el cómo se provoca estrés osmótico en una célula, es importante comprender el potencial hídrico ó estado termodinámico del agua en una célula. Dicho potencial tiene dos componentes: uno de signo negativo que es el potencial osmótico y otro de signo positivo que es el potencial de turgencia. El

primero representa a la concentración de moléculas (es negativo porque a mayor concentración de moléculas, es menor la cantidad relativa de agua y con ello un menor efecto de ésta sobre el sistema); el segundo es la presión hidráulica que se ejerce sobre un sistema físicamente contenido como lo es la célula (Murillo,G., 1989).

Si el potencial osmótico interno es más negativo que el exterior (esto es, hay más moléculas) el agua entra a la célula hasta que el volumen de la célula es limitante, en este momento se crea una presión de turgencia de signo positivo que hará igualar el potencial de agua dentro y fuera de la célula, lograndose de esta manera el equilibrio (Murillo,G., 1989).

Fuera de una célula sólo puede haber cambios de potencial osmótico, mientras que dentro puede haber tanto cambios de potencial osmótico como de turgencia. Una célula metabólicamente activa siempre es turgente (Murillo, G., 1989).

En estrés hídrico, cuando una célula pierde agua, pierde primero su potencial de turgencia (se hace flácida) y si continua la pérdida de agua, sus metabolitos se concentran y con ello su potencial osmótico se hace cada vez más negativo, produciendose daños y la posterior muerte celular (Murillo,G., 1989).

En el caso de estrés salino, el daño puede ser más severo, debido a que al existir un potencial osmótico más negativo en el exterior por la presencia de iones (sodio,cloro), la célula tiende primero a sacar agua, disminuyendo así su potencial de turgencia y haciendo más negativo su potencial osmótico. Este causa daños celulares, y a su vez el efecto dañino se intensifica debido a que

también los iones tienden a entrar y salir para tratar de equilibrar los potenciales; sin embargo, llega un punto en el que la concentración de iones es tan alta que resulta tóxica para la célula (Poljakoff-Mayber, 1982).

1.4) OSMORREGULACIÓN.

La adaptación de los organismos a fluctuaciones en la osmolaridad de sus alrededores es fundamental para sobrevivir. La habilidad para sobrevivir a estrés osmótico no es sólo de importancia biológica, sino que es también de considerable relevancia económica, por ejemplo para el desarrollo de plantas cultivables para incrementar las áreas agrícolas de tierras semiáridas (Higgins, et al., 1987).

Unas pocas especies halotolerantes, por ejemplo la *Halobacteria*, están permanentemente adaptadas a alta osmolaridad y mantienen una alta concentración iónica citoplasmática. En estas especies, las enzimas intracelulares son altamente resistentes a los efectos desnaturalizantes de la alta concentración iónica (el rango de osmolaridad en el que vive una célula en condiciones normales es de 0.1 a 1 megapascals).

La mayoría de las especies, sin embargo, normalmente viven y crecen en medios ambientes de baja ó mediana osmolaridad. Estas especies mantienen una concentración iónica relativamente baja dentro del citoplasma y fuera de él; las enzimas intracelulares son frecuentemente sensibles al incremento en la concentración de iones en el citoplasma (Higgins, et al., 1987).

La regulación osmótica (osmorregulación) consiste básicamente

en la acumulación de moléculas dentro de la célula, evitando de esta manera la salida de agua y posibilitando la reentrada de la misma del medio celular externo. El ajuste osmótico depende del número de moléculas que se acumulen, más no del tamaño y naturaleza de éstas; así que teóricamente, un ión de potasio es equivalente a una molécula de sacarosa. Por otra parte, una enorme molécula de almidón no ayuda en mucho al ajuste osmótico, mientras que sus glucosas liberadas pueden producir un importante ajuste (Murillo, G., 1989 ; Poljakoff-Mayber, 1982).

Un ajuste osmótico rápido y eficiente determinará el éxito adaptativo de una planta no halófito en condiciones limitantes de agua, permitiéndole continuar creciendo sin perder más agua (Schulze, 1986).

Desde esta perspectiva, la célula tiene dos alternativas: usar iones inorgánicos, o bien moléculas orgánicas sintetizadas "de novo" a partir de la actividad fotosintética (Wyn Jones y Storey, 1981; Wyn Jones y Pollard, 1982).

Es energéticamente menos costoso el uso de iones comunes por ser los más abundantes del medio : sodio, cloro, potasio, nitrato, etc., sin embargo, los iones tienen la desventaja de interaccionar desfavorablemente con las membranas, las proteínas y demás elementos celulares (Murillo, G., 1989).

El sodio puede ser muy abundante y es utilizado con mucha frecuencia como osmolito, pero sus efectos pueden ser letales. Las plantas mesófitas prefieren usar el potasio como osmolito, pero aún este puede tener efectos nocivos en los sistemas celulares. El resto de los iones del suelo son inadecuados como osmolitos por

razones particulares entre las que están también su toxicidad a altas concentraciones (Poljakoff-Mayber, 1982).

Sin embargo, las plantas en general llevan a cabo un ajuste osmótico rápido y eficiente con iones inorgánicos, y aunque estos son transportados a la vacuola para minimizar sus efectos deletéreos, las concentraciones citoplasmáticas pueden ser altas. Por otra parte, algunas plantas acumulan además moléculas orgánicas tales como la glicina betaína y prolina. Este fenómeno llevó a la formulación de una hipótesis de ajuste osmótico propuesta por Wyn Jones a mediados de los setentas (Bardy et al., 1984). Esta hipótesis propone que la acumulación de iones se hace principalmente en la vacuola; pero como los sistemas citoplasmáticos también están bajo el influjo de estos iones, es necesario que estén protegidos por moléculas tales como la glicina betaína y la prolina. . En otras plantas esto no ocurre porque acumulan moléculas tales como azúcares los cuales no tienen el efecto deletéreo de los iones inorgánicos aunque son energéticamente más costosos (Perry et al., 1987) .

Por lo tanto, la adaptación osmótica a un decremento de potencial externo de agua es alcanzada por acumulación de osmolitos y la disminución del potencial de agua interno. Esto aparentemente facilita la toma de agua por parte de las células para mantener su turgencia (Poljakoff-Mayber, 1982).

1.5) SOLUTOS COMPATIBLES.

Un soluto compatible es operacionalmente definido como una sustancia no inhibitoria y con función metabólica que se acumula cuando la planta esta sometida a bajos potenciales de agua

(Borowitzka y Brown, 1974).

Como el potasio intracelular se incrementa en respuesta a un incremento en la osmolaridad, un punto eventualmente sería tender a que el incremento de la concentración iónica intracelular inhiba la actividad enzimática normal, de este modo, en un medio con alta osmolaridad, podría ser una ventaja si la célula fuera capaz de acumular un soluto alternativo que provocara un menor efecto deletéreo sobre las funciones enzimáticas (Higgins, et al., 1987).

La mayoría de los organismos, incluyendo plantas superiores, invertebrados marinos, cianobacterias y las enterobacterias, han adoptado estrategias similares para sobreponerse a este problema; ellos acumulan solutos compatibles para reemplazar al potasio (Higgins, et al., 1987).

Una variedad de solutos compatibles, incluyendo azúcares, son acumulados principal o exclusivamente, en el citoplasma por diferentes especies. Probablemente la mayoría de los solutos compatibles universalmente adoptados son los aminoácidos N-sustituibles, particularmente glicina betaína y prolina (Higgins et al., 1987). Por ejemplo, la osmotolerancia de ciertas variedades de cebada y otras cosechas está frecuentemente asociadas con la habilidad para acumular altas concentraciones de glicina betaína. Existen muchas otras evidencias que correlacionan el incremento en la acumulación de glicina betaína ó prolina en plantas superiores evolutivamente diversas con el incremento en la concentración de NaCl (Le Rudulier et al., 1984).

Se han producido suficientes evidencias para demostrar que la

acumulación de estos osmoprotectores es de valor adaptativo más que un reflejo de daño metabólico, esto porque su acumulación es inmediata al efecto de estrés, previniendo de ésta manera que se presente un daño irreversible en las células; mas no se empieza a acumular cuando el daño ya se ha presentado. Por otro lado, no se ha encontrado una relación entre la resistencia a sequía y potencial de acumulación de prolina, aunque sí se ha encontrado esta relación en el caso de glicina betaína (Grumet y Hanson, 1986).

Como propiedades especiales, ambos, glicina betaína y prolina son extremadamente solubles en agua (respectivamente: 157gr/100ml de agua a 19 °C y 162 gr/100ml a 25 °C) y son dipolares sin carga neta a pH fisiológico (Wyn Jones y Pollard, 1982).

Estos solutos no sólo actuan como solutos osmóticos en el volumen de agua del citoplasma, sino que también pueden contribuir a una estabilidad macromolecular, lo cual lleva al mantenimiento de la integridad metabólica, llegando a ser importante en adición a algún requerimiento específico para la regulación del volumen y/ó la presión celular (Wyn Jones y Pollard, 1982).

1.6) GLICINA BETAÍNA.

La glicina betaína es un derivado trimetilado del aminoácido glicina, con los tres grupos metilo adheridos al nitrógeno (N,N,N-trimetilglicina). Es un compuesto que se acumula en las células de un amplio rango de especies vegetales en respuesta a estrés hídrico o salino. Por ejemplo, en trigo, cebada, arroz

(Hanson y Scott, 1980; Wyn Jones y Storey, 1981; Coughlan y Wyn Jones, 1982) y otras especies, la glicina betaína se ha encontrado en concentraciones relativas de 1-2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco. Esta concentración se incrementa 2-3 veces cuando se somete a la planta a estrés hídrico ó salino. Este componente se encuentra también en varias especies halófitas, especialmente miembros de las quenopodiaceae, a concentraciones de 10-100 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco dentro de condiciones salinas (Wyn Jones and Storey, 1981).

Se ha propuesto que la acumulación de éste compuesto en las especies vegetales es de gran importancia en la respuesta al estrés porque tiene un significado adaptativo . Se propone también que actúa como un osmótico no tóxico localizado preferencialmente en el citoplasma y en el cloroplasto, donde puede actuar como un protector de enzimas (Wyn Jones y Storey, 1981; Robinson, 1986; Grumet y Hanson, 1986), en la compartimentalización de iones (Ahmad et al., 1987), en la estabilización de membranas (Jolivet, 1982) y en la replicación del ADN a nivel bacteriano (Meury, 1988).

La vía de síntesis de glicina betaína ha sido estudiada en dos tipos de plantas C-3 (Hitz et al., 1981; Coughlan y Wyn Jones, 1982) una quenopodiacea y la otra gramínea.

La P-colina que es oxidada a betaínaldehído y posteriormente a glicina betaína, proviene de serina fotorrespiratoria en las quenopodiaceas (Coughlan y Wyn Jones, 1982). En las gramíneas proviene de la degradación de fosfolípidos (Hanson y Rhodes, 1983; McDonnell y Wyn Jones, 1988). La oxidación de la P-colina

se lleva a cabo en el cloroplasto (Hanson y Scott, 1980) y es influenciada por la luz ; de ahí es exportada al citoplasma donde se acumula. Se ha encontrado una isoenzima de la reacción de betaína aldehído a glicina betaína en el citoplasma (Weigel y Hanson, 1988) pero la mayor parte de la síntesis se dá en el cloroplasto.

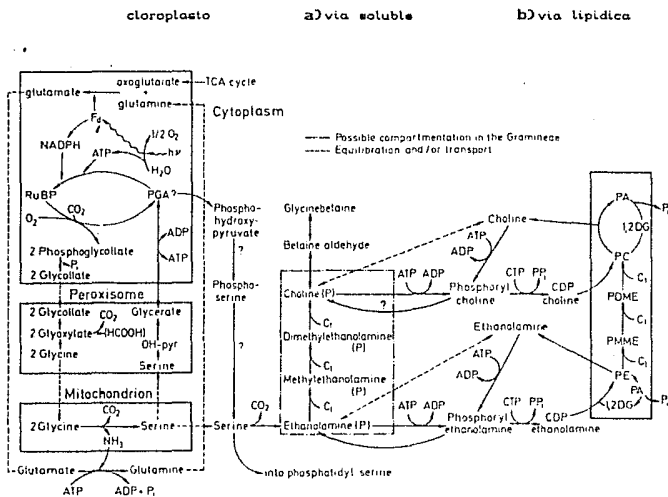


Figura 1. Posibles vías de biosíntesis de glicina betaína y su relación con fotorespiración y el metabolismo de lípidos.

--- Equilibrio y / o transporte. --- Posible compartimentalización en las Gramineae.

1.7) DAÑO CAUSADO POR SALINIDAD.

El daño causado a las plantas por salinidad puede ser osmótico, tóxico o nutricional.

El efecto osmótico resultante de la salinidad del suelo puede perturbar el balance de agua de la planta, reducir la turgencia y a su vez inhibir el crecimiento. Directamente también puede afectarse el cierre estomatal y reducirse la fotosíntesis (Poljakoff- Mayber, 1982).

Estas alteraciones pueden resultar ya sea por dificultad en la toma de agua y transporte dentro de la planta o por efectos tóxicos causados por exceso de iones minerales (Poljakoff-Mayber, 1982).

La salinidad afecta en algunas plantas enzimas respiratorias. Estimula el consumo de oxígeno. Otros reportes indican que el aumento de componentes fosforilados decrece debido a salinidad, y que se da una depresión de la fosforilación oxidativa (Poljakoff-Mayber, 1982).

La propia fosforilación puede ser afectada ó la actividad de ATPasa, ó algunos otros mecanismos relacionados con ATP pueden ser estimulados o inhibidos por salinidad. Los cambios en la actividad de ATPasa estan conectados aparentemente con la toma de iones y

ésto con la adaptación osmótica (Poljakoff-Mayer, 1982).

Contrarrestando estos efectos osmóticos por adaptación osmótica de la planta, se involucraría una excesiva acumulación de iones, ó síntesis de otros osmolitos (sustancia con actividad química que contribuye a la osmolaridad interna de las células), y de este modo es difícil diferenciar los efectos tóxicos de la acumulación de iones.

En general, el daño causado a plantas superiores por salinidad se manifiesta en muchas vías y afecta el balance y metabolismo del agua y hormonas, así como también cambios estructurales (Poljakoff-Mayber, 1982).

Una comparación de los diferentes efectos de salinidad sobre glicofitas y halófitas da la impresión de que hay alguna similitud en la respuesta de ambos grupos de plantas, pero en halófitas, la mayoría de los efectos típicos aparecen a mucho más altas concentraciones de salinidad que en glicófitas (Poljakoff-Mayber, 1982).

La acumulación de solutos en células vegetales es un aspecto nutricional general. Sin embargo, la acumulación de solutos inorgánicos puede inducir un desequilibrio interno entre los varios iones nutricionales necesarios como una manifestación de signos de deficiencia. Metabólicamente éstos efectos pueden ser considerados tóxicos en la naturaleza (Poljakoff-Mayber, 1982).

La interacción entre sodio y calcio ha sido extensamente investigada. Uno de los puntos estudiados ha sido el papel del calcio en el transporte selectivo de cationes, específicamente potasio en células vegetales (Kent y Lauchli, 1985; Ben-Hayyim,

1987).

Cramer y sus colaboradores (1985, 1986) han demostrado que uno de los problemas que se presentan en las células sometidas a estrés salino, es que el sodio desplaza al calcio asociado a la membrana celular, alterando la estabilidad e integridad de la misma. Por otro lado, se sabe que la relación celular sodio/potasio es de gran importancia para el metabolismo. Comunmente se acepta que a altas concentraciones de NaCl, se establece una competencia entre sodio y potasio que reduce los niveles de potasio intracelular. Los altos niveles de potasio intracelular han sido correlacionados con altos niveles de tolerancia a salinidad (Croughan et al., 1979; Watad et al., 1983; Ben-Hayyim, 1985, 1987).

La inhibición del crecimiento en condiciones salinas puede explicarse entonces debido a :

1) Utilización de fotosintatos no para crecer, sino para osmorregulación.

2) Desviación de la energía derivada de la respiración para síntesis de osmolitos orgánicos ó para el mantenimiento de los mecanismos de toma de iones, ó para la necesidad de reparar daños causados por los eventos celulares inusuales.

3) Daño a las proteínas enzimáticas expuestas a los bajos potenciales de agua y a la relativa alta concentración de iones, y; cierre parcial de estómas e interferencia con la toma de CO₂ (Poljakoff-Mayber, 1982).

1.8) ADAPTACION OSMÓTICA Y COMPARTAMENTALIZACIÓN EN

CONDICIONES SALINAS.

El efecto adverso de bajo potencial de agua externo puede ser remediado por toma de electrolitos ya sea en la vacuola ó en el citoplasma, pero esta toma crea daño por exceso de iones (Valenzuela,E., 1989).

Por tanto, las posibles adaptaciones varían entre la exclusión de sodio y cloro o bien la rápida toma de esos iones para usarlos como solutos iónicos principales en las células (Greenway y Munns, 1980).

Dentro de condiciones naturales, cuando el potencial de agua del medio de la raíz decrece y la planta usualmente responde con un decremento en su potencial de agua; esto es usualmente considerado como una adaptación osmótica que le permite mantener el gradiente de potencial de agua y una adecuada turgencia. El mantenimiento de la turgencia es una condición obligatoria para el crecimiento de la planta. Hay aparentemente un nivel crítico de presión de turgencia por abajo del cual la extensión del crecimiento es imposible. Por lo tanto, alguna disminución en la turgencia debido a salinidad, es responsable de inducir inhibición del crecimiento (Valenzuela,E., 1989).

La adaptación osmótica mantiene la turgencia, así que un decremento en el potencial de agua del tejido no es necesariamente acompañado por un decremento en el contenido relativo de agua (Poljakoff-Mayber, 1982).

Son usualmente las halófitas las que mantienen el gradiente de toma de agua por acumulación de iones. La inhabilidad de las

glicófitas para adaptarse osmóticamente dentro de condiciones salinas, es a veces atribuida a su incapacidad para acumular suficientes iones para contrarrestar los del ambiente externo. El sodio y el potasio son los dos principales cationes responsables para la adaptación osmótica en éstas halófitas (Poljakoff-Mayber, 1982).

Una alta concentración de éstos iones inhibiría fuertemente la mayoría de las reacciones enzimáticas. Sin embargo, como las reacciones enzimática continúan en el citoplasma, fue hipotetizado que la compartimentalización de los iones dentro de la célula prevendría la exposición de las enzimas a éstos efectos tóxicos (Poljakoff-Mayber, 1982).

La mayoría del sodio está aparentemente localizado en la vacuola, la que constituye aproximadamente el 80% del volumen celular, mientras que el potasio es más abundante en el citoplasma. Sin embargo, la osmorregulación en el citoplasma cuando la concentración de electrolitos es menor que en la vacuola, se cree es alcanzada principalmente por incremento en la concentración de solutos orgánicos, específicamente glicina betaína (Storey y Wyn Jones, 1975; Grieve y maas, 1984), prolina (Lone et al., 1987) y sacarosa (Perry et al., 1987).

En varios sistemas vegetales se ha demostrado que el efecto diferencial de altas concentraciones de NaCl está parcialmente relacionado con bajas concentraciones de calcio; tales estudios apoyan la idea de que el efecto protector del calcio se debe al mantenimiento de la integridad de la membrana, lo que evita la salida de potasio (Kurt, 1986; Ben-Hayyim et al. 1987).

1.9) ADAPTACIÓN OSMÓTICA EN ESTRÉS HÍDRICO.

A lo largo del desarrollo evolutivo, las plantas han desarrollado una gran cantidad de estrategias adaptativas para sobrevivir en escasez de agua; ésto ha traído como consecuencia que muchas especies vegetales regulen su metabolismo y fisiología de diversas maneras en función de la cantidad de agua disponible.

Se ha propuesto que las plantas, al perder agua, sufren un cambio en su potencial hídrico (éste se hace más negativo), y como consecuencia a dicho cambio, se dispara una serie de mecanismos que le permiten evitar que siga perdiendo más agua. Algunos de esos mecanismos que se han propuesto son : la toma de iones tales como sodio y potasio y la síntesis y acumulación de solutos orgánicos tales como glicina betaína, prolina, azúcares, malato, citrato y oxalato. Con estas estrategias la célula vegetal aumenta su potencial osmótico (lo hace más negativo) con lo que impide mayor pérdida de agua. De esta manera le es posible a la célula mantener la turgencia y sobrevivir (Greenway y Munss, 1980; Hanson y Hitz, 1982; Wyn Jones y Storey, 1985).

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas en el siguiente trabajo consisten en determinar si el polietilen glicol (PEG) y el NaCl inhiben el crecimiento de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia*, y de ser así, establecer si en presencia de glicina betaína se libera a las células de ésta inhibición y a que nivel lo hace.

En la actualidad, la técnica de cultivo de tejidos vegetales, es una herramienta muy importante para la construcción de sistemas o modelos experimentales con mayores posibilidades de control. Tales sistemas son de gran ayuda para realizar estudios, por ejemplo, de fisiología, genética, bioquímica y biología molecular.

Algunas de las características que hacen del cultivo de tejidos un material experimental adecuado, son la relativa facilidad de crecer, su mantenimiento bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas, evitando así las variaciones del clima y del suelo, además de que se cultivan asépticamente, eliminándose los problemas asociados por contaminación con microorganismos. Además proporcionan material abundante y más homogéneo durante todo el año sin depender de ciclos ecológicos, etc.

Características como las antes mencionadas se presentan en el cultivo de tejidos de *Bouvardia ternifolia* (establecido por Fernández, S.B.L. 1979), por lo que se tomó como sistema experimental para el estudio del efecto de la glicina betaína sobre el crecimiento de tejidos vegetales en condiciones de estrés hídrico y salino.

Se ha determinado que este compuesto puede ser capaz de solvatar a proteínas y membranas que de otro modo sufrirían por la pérdida de agua o por la presencia excesiva de iones (Higgins, C.F. et al., 1987).

Por otro lado, se ha determinado que algunas enterobacterias utilizan la glicina betaína de un modo más específico. En estos

casos parece que tiene un efecto sobre la división celular, probablemente liberando la inhibición por estrés de la actividad de ADN polimerasa (Meury, 1988).

II. OBJETIVOS

A partir de las anteriores evidencias, se plantean los siguientes objetivos :

1) Determinar la curva control de crecimiento de *Bouvardia ternifolia* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

2) Establecer las concentraciones adecuadas de PEG (estrés hídrico) y NaCl (estrés salino) para lograr una inhibición del crecimiento que pudiera servir de base para el resto de los experimentos.

3) Determinar si la glicina betaína libera del estrés a las células en suspensión y a qué concentración lo hace más eficientemente.

4) Determinar cual es el nivel al que actúa la glicina betaína.

III. MATERIALES Y METODOS

A) MATERIALES.

3.1) El material biológico utilizado fueron semillas de *Bouvardia ternifolia*.

3.2) Material de vidrio

3.3) Equipo :

Estufa con agitador magnético.

Campana de flujo laminar.

Potenciómetro.

Balanza analítica.

Micropipetas (0-20 μ l y 50-250 μ l).

Autoclave.

Centrífuga.

Contador de centelleo.

Camara de crecimiento a 28 $^{\circ}$ C.

Plataforma de agitación constante a 100 rpm.

Refrigerador a -70 $^{\circ}$ C.

Sistema Millipore.

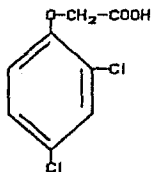
3.4) Reactivos.

Acido tricloroacético (TCA), etanol, hipoclorito de sodio, 3 H₂O, 14 C-sorbitol, 3 H-timidina, 35 S-metionina , glicina betaína, polietilen glicol peso molecular 6000 (PEG).

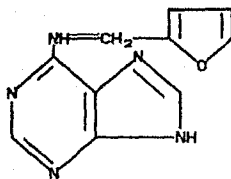
Los reactivos utilizados para la preparación de los medios de cultivo se muestran en el siguiente cuadro :

cuadro # 1	
MEDIO BASAL (MURASHIGE AND SKOOG 1962)	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mg/ml
Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440.000
Nitrato de Amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$)	1650.000
Nitrato de Potasio (KNO_3)	1900.000
Yoduro de Potasio (KI)	0.830
Cloruro de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)	170.000
Acido Bórico (H_3BO_3)	6.200
Molibdato de Sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.250
Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370.000
Sulfato de Manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.900
Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.600
Sulfato de Hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.800
E. D. T. A. (2Na)	37.300
Mio-Inositol	100.000
Acido Nicotínico	0.500
Tiamina HCl	0.100
Piridoxina HCl	0.500
Glicina	2.000
Sacarosa	30000.000
Agar	0.8%
pH = 5.8	

Los Fitorreguladores Utilizados Fueron :



ACIDO 2, 4- DICLOROFENOXIACÉTICO



CINETINA (6-FURFURILAMINOPURINA)

Para evitar la precipitación de sales, es recomendable añadir las soluciones en el orden indicado a un volumen de agua determinado (a un volumen al que sumado el de todas las soluciones casi se llegue al volumen final requerido).

B) METODOS.

3.5) Preparación de los medios de cultivo.

A un volumen de agua determinado, se le agregaron las soluciones nutritivas en el orden antes indicado (manteniéndose en agitación constante al ir agregandolas para tener una mezcla homogénea). Después se añadió la sacarosa y los fitorreguladores al control; para el caso de los tratamientos se agregó además PEG y glicina betaína, ajustándose posteriormente el pH a 5.8 con solución de NaOH 0.1N (en ocasiones es necesario ajustar con HCl 0.1N). Después se aforó al volumen requerido.

3.5.1) Para la germinación de las semillas e inducción de callo es necesario utilizar medio sólido M-S sin fitorreguladores, por lo que se le añadió agar al 0.8% y se calentó agitando constantemente hasta que se disolvió y el medio se tornó transparente. El medio se colocó en frascos de vidrio pequeños de boca ancha con 25ml de medio cada uno.

3.5.2) Para el establecimiento del cultivo en suspensión, el medio sin agar se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 125ml con

25ml de medio por matr az.

Tanto los frascos de v idrio como los matraces se taparon con papel aluminio y se reforzaron con ligas de h ule. Ambos se esterilizaron en autoclave a 120  C durante 15 minutos.

3.6) Esterilización y siembra de las semillas de *Bouvardia ternifolia* (Fern andez, L., 1979).

- a) Las semillas son lavadas en agua corriente durante 30 minutos.
- b) Se colocan en etanol al 70% durante 1 minuto.
- c) Se elimina el etanol y se lava 2 veces con agua destilada estéril.
- d) Se esterilizan las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos.
- e) El hipoclorito es eliminado con cuatro lavadas en agua estéril.
- f) Se sembraron en medio MS (sin fitoreguladores) en condiciones estériles para su germinación.

3.7.) Inducción de Callo de *Bouvardia ternifolia*.

El medio utilizado fue el MS basal (cuadro #1) añadiendo 1mg/l de 2,4-D y 0.005mg/l de cinetina como fitoreguladores (Fern andez, F., 1979).

La inducción se realizó a partir de fracciones de hoja obtenidas de plántulas originadas de la germinación de las semillas de *Bouvardia ternifolia* en condiciones estériles.

La hoja se seccion  transversalmente y se colocó en el medio de

inducción de tal forma que la parte donde se realizó el corte este en contacto con el medio de cultivo. Se incuban en el cuarto de crecimiento a 26 °C y luz continua durante un período de 3 a 4 semanas.

3.8.) Establecimiento del cultivo de células en suspensión.

Los callos más friables fueron los seleccionados para iniciar el cultivo en suspensión, ya que tienden a disgregarse más fácilmente. El medio de inducción de callo y el medio de mantenimiento en cultivo en suspensión llevan las mismas concentraciones de sales, vitaminas y fitorreguladores.

El medio que se utilizó fue el MS líquido con 1mg/l de 2,4-D y 0.005mg/l de cinetina.

Para la iniciación del cultivo se partió de 0.7-1gr de callo friable, disgregándolo lo más posible dentro de un matraz Erlenmeyer de 125ml con 25ml de medio líquido, incubándolo después en una plataforma de agitación rotacional a 100rpm, 26 °C y en la obscuridad.

Después de 14 a 16 días de incubación se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, y se resembró en medio nuevo cada 10 días para propósitos de mantenimiento, pues la viabilidad empieza a disminuir al acercarse a dicha fase.

Al inocular inicialmente las células en suspensión para determinar las curvas de crecimiento, se midió el paquete de volumen celular (PVC) por cada 10 ml para tener este dato como referencia para que al realizar los experimentos, siempre se empiece con un paquete igual de células en todos los casos.

Para el inicio de las curvas de crecimiento (control y

tratamientos), se prepararon 30 matraces de 125ml con 25ml de medio los cuales se inocularon con 0.6ml de células empaquetadas por cada 10ml de medio liquido. Se muestreó los días 2,4,6,7,8,9,10,12,14 y 16 con 3 repeticiones para cada muestra, determinando el peso seco y PVC.

Después de haber determinado la curva normal de crecimiento, se procedió a establecer el cultivo en condiciones de estrés hídrico y salino en donde la inhibición del crecimiento en dichas condiciones fuera clara pero no severa. Para tales propósitos, se utilizaron 3 concentraciones de polietilén glicol como estresante hídrico (10, 15 y 25 %), y 2 concentraciones de NaCl (150 y 300 mM).

Esto nos llevaría a seleccionar una concentración de PEG y otra de NaCl que estuviera inhibiendo el crecimiento claramente en comparación con la curva normal.

En el siguiente paso se determinó el efecto de la glicina betaína sobre éstas condiciones de estrés, probándose para tales fines 3 concentraciones de esta molécula (1, 10 y 50mM), de las cuales se seleccionaría la que liberara más eficientemente del estrés impuesto (se interpretaría como una liberación del estrés la reanudación del crecimiento).

3.9.) Parámetros de crecimiento para el cultivo en suspensión de *Bouvardia ternifolia*.

Los parámetros utilizados tanto para el control como para los tratamientos fueron los siguientes :

- a) Peso Seco.

- b) Porcentaje de paquete de volúmen celular (PVC).
- c) Volumen celular (por diferencia en la toma de $^3\text{H}_2\text{O}$ / ^{14}C -sorbitol) (Dracup, M., et al., 1986 ; Gibss, J., et al., 1989).
- d) Síntesis de ADN con ^3H -timidina.
- e) Síntesis de proteínas con ^{35}S -metionina.
- f) Determinación de proteína total por el método de Lowry.

3.9.1) La determinación del peso seco es una medida adecuada del crecimiento y una manera de evaluarlo es la siguiente : se toma una alícuota de 10ml de células en suspensión; se filtran a vacío sobre un papel filtro bien seco previamente pesado (peso inicial); se lavan rápidamente con agua destilada y se ponen a secar en una estufa a 60°C durante 24 horas hasta obtener un peso constante (peso final). El peso final menos el peso inicial, corresponde al peso seco total del tejido.

3.9.2) El %PVC se obtiene colocando una alícuota de 10ml de células en suspensión dentro de un tubo de centrifuga graduado de 15ml, y centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos. El paquete de células se reporta en porcentaje. Este paquete puede ser utilizado también para la determinación de peso seco.

3.9.3) La determinación del volúmen celular se llevó a cabo por la diferencia en la toma de $^3\text{H}_2\text{O}/^{14}\text{C}$ -sorbitol.

- a) Se tomaron 10ml de células en suspensión.
- b) Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

- c) Se descartó el sobrenadante.
- d) Al paquete obtenido se le añadió $^3\text{H}_2\text{O}$ y ^{14}C -sorbitol diluido en 4ml de medio MS ó MS + PEG y MS + PEG + GB.
- e) Se resuspendió y se agitó constantemente durante 10 minutos.
- f) Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.
- g) Se eliminó el sobrenadante lo más posible.
- h) El paquete celular se congeló a -70°C durante 15 minutos y se descongeló después a más o menos 30°C (repetir por lo menos 3 veces para romper bien las células).
- i) Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.
- j) Se tomaron 50 μl ó 100 μl de sobrenadante y se colocaron en un vial con 2.5ml de líquido de centelleo y después de 30 minutos se determinaron las CPM en un contador de centelleo durante 2 minutos.

3.9.4) y 3.9.5) La determinación de síntesis de ADN y Proteínas, se realizó en condiciones estériles añadiendo 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina y 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina en un matríz con células en suspensión.

- a) Se incubó a 26°C durante 4 días después de agregar la reactividad.
- b) Se tomó un mililitro de muestra cada 12 horas.
- c) Se congeló a -70°C durante 15 minutos y se descongeló a 30°C por lo menos 3 veces (agitando en vortex cada vez).
- d) Se agregaron 5ml de TCA frío al 20%.
- e) Se agitó y se dejó reposar en hielo 1 hora.
- f) Se filtró en un sistema Millipore con membranas de fibra de

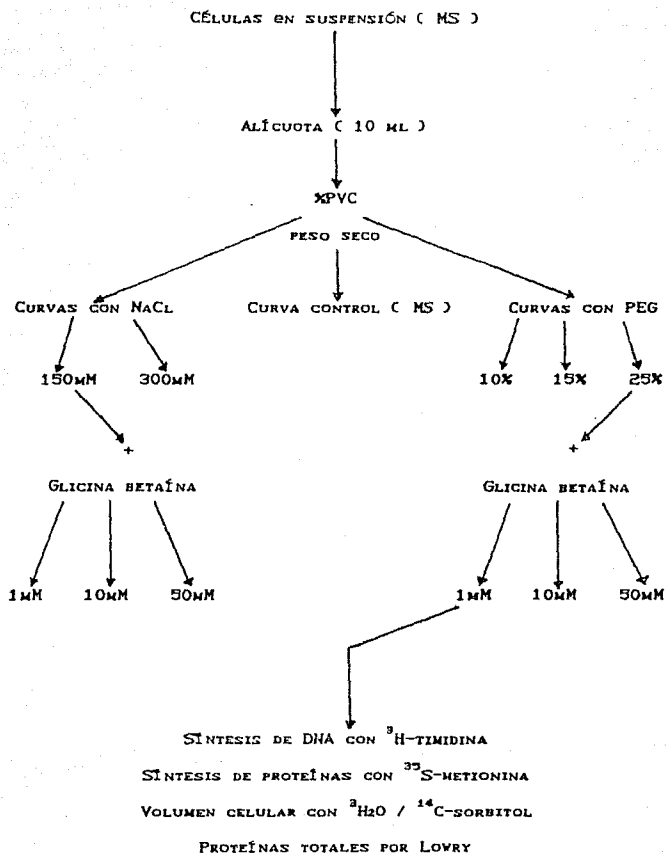
vidrio.

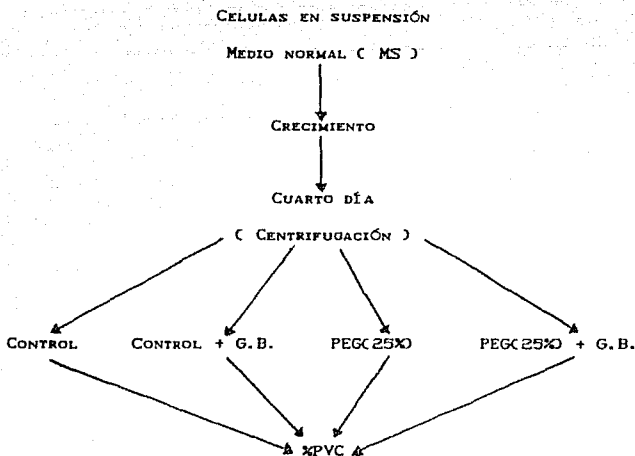
- g) Se lavó con abundante TCA al 20%.
- h) Enseguida se lavó con etanol.
- i) Se dejaron secar las membranas de fibra de vidrio frente a una lámpara
- j) Después de que se secaron, se colocaron en un vial y se les agregó 2.5ml de líquido de centelleo.
- k) Se leyó en el contador de centelleo durante 2 minutos.

3.9.6.) La determinación de proteína total se realizó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

- a) Se tomaron 5 ml de células en suspensión.
- b) Se lavaron las muestras que contenían PEG con medio MS para evitar su interferencia en la lectura.
- c) Las células se rompieron con el politrón.
- d) Se tomó una alícuota de 100 μ l se llevó a 1ml con agua destilada.
- e) Al mililitro de muestra se le agregó 1ml de agua, 1ml de reactivo A (mezcla 1:1 de CTC, SDS, NaOH y agua destilada).
- f) Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- g) Se le agregó 0.5 ml de reactivo B (mezcla 1:6 de folin-ciocalteus con agua destilada).
- h) Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para leer después en el espectrofotómetro a 750nm.

MATERIAL Y METODO





(SE DETERMINÓ CADA 24 HORAS EN UN PERÍODO DE 4 A 8 DÍAS)

VOLUMEN CELULAR POR DIFERENCIA $^3\text{H}_2\text{O}$ / ^{14}C -SORBITOL

(SE DETERMINÓ CADA 24 HORAS EN UN PERÍODO DE 4 A 8 DÍAS)

SÍNTESIS DE DNA CON ^3H -TIMIDINA

(SE DETERMINÓ CADA 12 HORAS EN UN PERÍODO DE 4 A 8 DÍAS)

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS CON ^{35}S -METIONINA

(SE DETERMINÓ CADA 12 HORAS EN UN PERÍODO DE 4 A 8 DÍAS)

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL METODO DE LOWRY

(SE DETERMINÓ CADA 24 HORAS EN UN PERÍODO DE 4 A 8 DÍAS)

IV.) RESULTADOS.

Todos los resultados (promedios y error estandar) de las figuras que a continuación se presentan, se encuentran al final de la sección de resultados.

4.1) Curva control de crecimiento en cultivo en suspensión.

A partir de las secciones de hoja, se generó un callo bastante friable, el cual fue transferido a medio líquido para el establecimiento de un cultivo en suspensión. Se determinó su curva de crecimiento con un inóculo inicial de 0.6 PVC/10ml de células en suspensión alcanzándose la fase estacionaria a los 16 días después del inóculo, tomando como parámetros de crecimiento el %PVC y peso seco. Figuras 1(a) y 1(b).

4.2) Curvas de crecimiento en condiciones de estrés hídrico.

Establecida la curva de crecimiento en condiciones normales, se procedió a determinar el crecimiento en condiciones de estrés hídrico. Como se desconocía la concentración de PEG óptima para trabajar, es decir, la concentración en la cual se inhibiría el crecimiento, pero que no fuera tan drástico como para dañar irreversiblemente a las células, se probó el efecto de 3 concentraciones distintas de PEG 6000, 10, 15 y 25 %.

A partir de ésto se obtuvieron algunos datos inesperados, el 10 y 15% de PEG en vez de producir una inhibición estimuló el crecimiento aún por encima del control. Sin embargo, cuando se añadió PEG 25 %, el crecimiento se abatió hasta permanecer constante; por lo tanto, esta concentración fue la elegida para la realización de posteriores experimentos. Figuras 2(a) y 2(b).

**CURVA DE CRECIMIENTO DE *B.ternifolia*
EN CELULAS EN SUSPENSION**

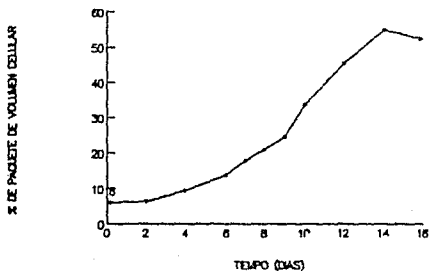


Figura 1(a)

**CURVA DE CRECIMIENTO DE *B.ternifolia*
EN CELULAS EN SUSPENSION.**

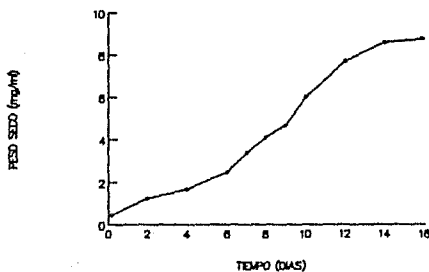


Figura 1(b)

Fig. 1(a) y 1(b). Cinéticas realizadas con células en suspensión de hoja de *Bouvardia ternifolia* en medio MS con 2,4-D (1ppm) y cinetina (0.005ppm) como fitorreguladores. Se incubó a 22°C en la oscuridad con agitación rotacional constante.

EFECTO DE PEG SOBRE EL PESO SECO DE *Bouvardia ternifolia*

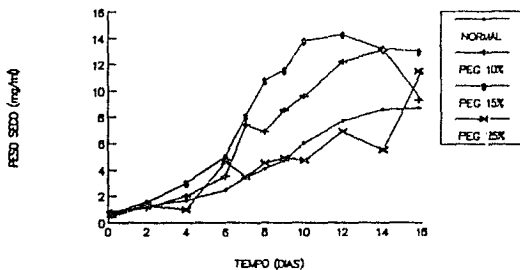


Figura 2(a).

EFECTO DE PEG SOBRE EL % PVC DE *Bouvardia ternifolia*.

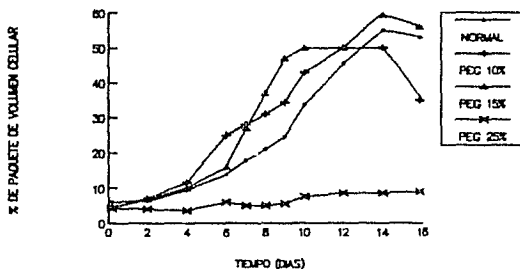


Figura 2(b)

Fig. 2(a) y 2(b). Clnélicas realizadas con células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* en medio de cultivo "MS" en presencia de polietileno glicol (10, 15 y 25%) como estresante hídrico. El mantenimiento fue en oscuridad a 26°C y en agitación rotacional constante. Cada punto es el promedio de 3 repeticiones.

4.3) curvas de crecimiento en condiciones de estrés salino.

Nuevamente, tomando como parámetros de crecimiento al %PVC y peso seco, se probaron 2 concentraciones de NaCl, 150 y 300mM, con el fin de seleccionar aquella que disminuyera el crecimiento pero sin dañar severamente al cultivo; ver figuras 3(a) y 3(b). Se observó que a 300mM de NaCl el peso seco disminuyó considerablemente, tendiendo a hacerlo cada vez más conforme al transcurso del tiempo; algo parecido pero no tan marcado se presentó también con respecto al porcentaje de paquete de volumen celular. Por lo tanto el comportamiento de las curvas de crecimiento sirvieron para interpretar que las células con 300mM de NaCl no estaban creciendo e inclusive podrían estar tendiendo a morir y disminuir considerablemente su población, lo que influiría definitivamente sobre el efecto real que pudiera tener la glicina betaína sobre dicho cultivo.

Al final del experimento, la concentración elegida para probar sobre ella el efecto de glicina betaína fue de 150mM, esto porque basandose en las curvas de crecimiento, se veía que su crecimiento disminuía con respecto a la curva control, pero sin embargo había una tendencia a seguir creciendo.

4.4.) Efecto de glicina betaína sobre cultivos sometidos a estrés hídrico y salino.

Después de haber establecido las concentraciones de PEG y NaCl con las cuales inducir un efecto de estrés, el paso siguiente y más importante fue el determinar el efecto que pudiera tener la glicina betaína sobre estas condiciones.

Inicialmente, fue necesario manejar tres tratamientos con diferentes concentraciones de glicina betaína (1, 10 y 50mM) para establecer cual de ellas liberaba más eficientemente del estrés impuesto a las células, tomando como criterio la reanudación del crecimiento en base a los parámetros de %PVC y peso seco.

Estos experimentos nos mostraron que en condiciones de estrés hídrico, la glicina betaína tiene mayor efecto conforme la concentración es más baja. Figuras 4 (a) y 4 (b).

Respecto al estrés salino, hay una mayor liberación del crecimiento a medida que la concentración de glicina betaína se aumenta. Figuras 5 (a) y 5 (b).

EFFECTO DE NaCl SOBRE EL PESO SECO DE *B.ternifolia*

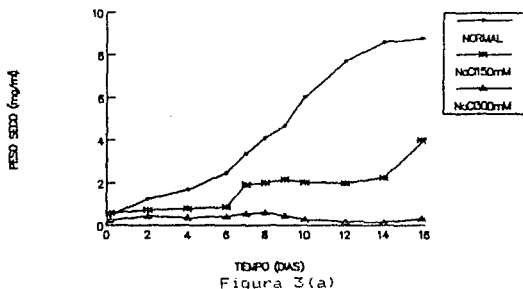


Figura 3 (a)

EFFECTO DE NaCl SOBRE EL % PVC DE *B.ternifolia*

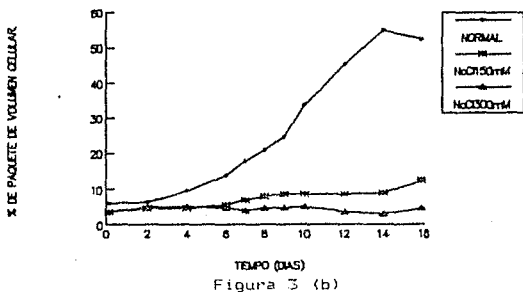


Figura 3 (b)

Cinéticas de crecimiento de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* obtenidas a partir de hoja sometidas a condiciones salinas con NaCl 150mM. Las condiciones de crecimiento fueron en oscuridad con agitación rotacional constante a 20°C. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones.

EFFECTO DE GLICINA BETAINA SOBRE EL PESO SECO EN ESTRES HIDRICO (PEG 25%)

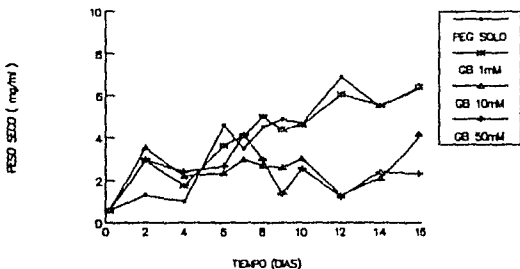


Figura 4(a)

EFFECTO DE GLICINA BETAINA SOBRE EL %PVC EN ESTRES HIDRICO (PEG 25%)

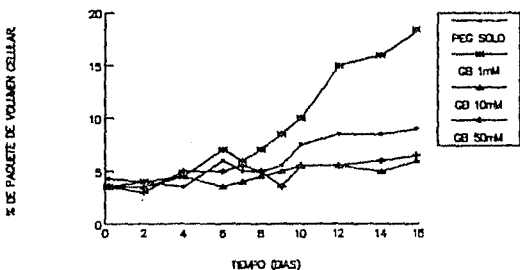


Figura 4 (b)

Fig. 4(a) y 4(b). Determinación del efecto de glicina betaina sobre la cinética de crecimiento de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* en condiciones de estrés hídrico causado por 25% de PEG. Se incubaron a 20°C en oscuridad con agitación rotacional constante. Cada punto es el promedio de 3 repeticiones.

EFFECTO DE GLICINA BETAINA SOBRE EL PESO SECO EN SALINIDAD (NaCl 150mM)

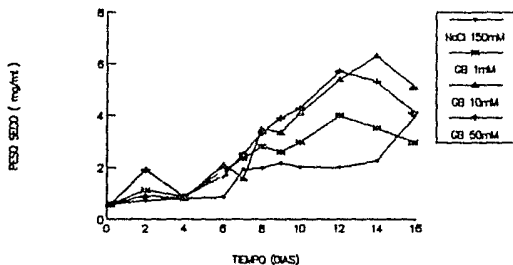


Figura 5 (a)

EFFECTO DE GLICINA BETAINA SOBRE EL % PVC EN CONDICIONES SALINAS

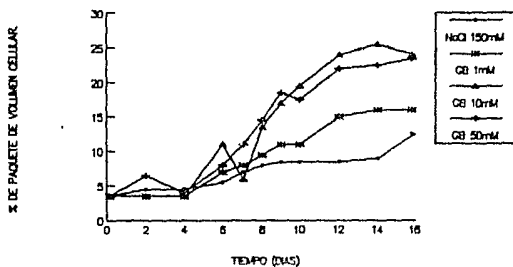


Figura 5 (b)

Fig. 5(a) y 5(b). Influencia de la glicina betaina sobre el crecimiento de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* en condiciones salinas (NaCl 150mM) durante 16 días. El cultivo se mantuvo a 26°C en oscuridad con agitación rotacional constante. Cada punto es el promedio de 3 repeticiones.

Comparando ambos tratamientos, uno se puede dar cuenta claramente en éste caso, que se trata de dos fenómenos muy distintos, y que así mismo los mecanismos de acción de la glicina betaína son también diferentes.

En el primer caso, la glicina betaína probablemente esté actuando de una manera más específica, y su efecto no sea puramente osmótico. Esto lo podemos deducir de la relativamente pequeña concentración de glicina betaína (1mM) a la que libera más eficientemente del estrés a las células, por lo que no podría contribuir grandemente como un osmolito para regular el potencial osmótico interno y proteger a la célula, ésto debido a que para tal regulación, lo importante para la célula es el número de moléculas orgánicas o no orgánicas pero que estén contribuyendo a un ajuste osmótico en el interior celular.

Sobre salinidad, la glicina betaína está actuando preferentemente como un osmorregulador, debido a que contrarresta más eficientemente el estrés conforme se incrementa su concentración, cosa que no ocurre en el caso de estrés hídrico.

Recordando los objetivos planteados, hasta aquí podemos deducir que la glicina betaína tiene un efecto osmótico sobre estrés salino, por lo que nuestra pregunta queda resuelta con respecto a éste fenómeno. Sin embargo, su efecto sobre estrés hídrico todavía no queda bien claro, por lo que se realizaron una serie de experimentos en donde se obtuvieron los siguientes resultados:

4.5) SÍNTESIS DE ADN (^3H -TIMIDINA) Y PROTEÍNAS (^{35}S -METIONINA).

Basandose en los datos de la curva control de crecimiento, se determinó que a partir del cuarto día, la fase exponencial de crecimiento se iniciaba y que en éste momento debía de iniciarse la determinación de síntesis de ADN, utilizando como marcador la incorporación de ^3H -Timidina. Esto debido a que en dicha fase la división celular y por lo tanto la síntesis de ADN es más activa.

Después de iniciar el cultivo tanto en el control como en los tratamientos, se dejó crecer a las células. Al cuarto día se añadió la ^3H -Timidina, y se determinó la marca cada 12 horas hasta el octavo día (4,5,6,7 y 8 día). Esto produjo resultados inesperados. La síntesis de DNA fué mayor en los tratamientos estresados con PEG 25% y PEG+GB que en el control. Al parecer, la glicina betaína estimula la síntesis de DNA y aún el PEG por sí sólo estimula una mayor síntesis sobre el control.

Debido a que tales resultados eran totalmente contrarios a lo que teóricamente se podría esperar (por lo menos el control debía de sintetizar más que los tratamientos, ya que no estaba sometido a ninguna condición adversa), sedudó de tales resultados. Esto provocó que se especulára sobre una posible contaminación bacteriana en los medios con mayor síntesis, y respecto a si tal incremento de síntesis en los tratamientos se estaba dando realmente en las condiciones de estrés que nos interesaban ó si bien, las células se adaptaban rápidamente en los primeros días, y entonces dichos resultados eran producto de células ya adaptadas

hasta el cuarto día (en que se inicia la determinación) y que tendían a normalizar su metabolismo; y no de células realmente estresadas. Por lo tanto, se procedió a repetir el experimento iniciándose el cultivo en medio control MS; centrifugando las células al cuarto día de crecimiento (inicio de la fase exponencial) y añadiendo aquí el medio estresante con PEG y PEG+GB en los tratamientos. Antes de proceder con el experimento, para estar seguros del efecto de estrés, se determinó previamente el efecto en base al %PVC , observandose realmente el efecto de dicho estrés (figura 6) . De alguna manera se estaba tratando de determinar la síntesis de ADN en condiciones reales de estrés en el momento en que la división celular fuera más activa.

Se llevó además un control de contaminación durante las determinaciones de ADN y proteínas inoculando muestras de medio en cajas de petri con medio de agar nutritivo, ésto con el fin de salir de dudas con respecto a si los datos estaban influenciados por algún tipo de contaminación.

Los resultados volvieron a ser los mismos, la tendencia era la misma que en el primer experimento, y ahora sólo quedaba el tratar de encontrar una interpretación adecuada al fenómeno que se estaba presentando. Los datos se graficaron contra varios parámetros de crecimiento para reafirmar que el fenómeno realmente se presentaba. (Figuras 7(a), 7(b) y 7(c)).

La determinación de síntesis de proteínas se realizó con el isótopo ^{35}S -Metionina; y la metodología es idéntica a la determinación de ADN, por lo que ambos experimentos se realizaron a la par, observándose la misma tendencia en los resultados (la síntesis fué mayor en los tratamientos con PEG+GB seguida del tratamiento con PEG 25% y la mínima para el control respectivamente). Ver Figuras 8(a), 8(b) y 8(c) .

EFFECTO DE GLICINA BETAINA EN CELULAS EN SUSPENSION EN ESTRES HIDRICO (4o DIA).

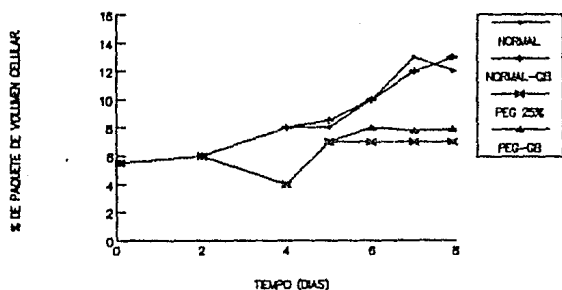


Figura 6

Fig. 6. Efecto de glicina betaina sobre células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* sometidas a estrés hídrico con polietilén glicol a partir del cuarto día de crecimiento. Del día 1 al 4 se crecieron en medio "MS" con 2,4-D y cinetina, pero sin PEG. Se mantuvieron en oscuridad a 20°C con agitación rotacional constante durante un período de 8 días.

EFFECTO DE GLICINA BETAINA SOBRE LA SINTESIS DE ADN POR PESO SECO

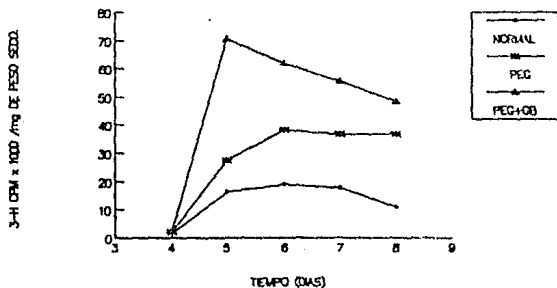


Figura 7 (a)

EFFECTO DE GLICINA BETAINA EN SINTESIS DE ADN POR mg DE PROTEINA

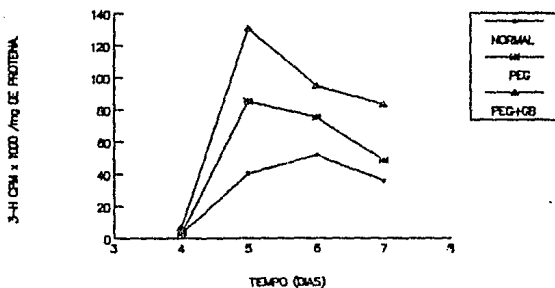


Figura 7 (b)

Fig. 7(a), 7(b) y 7(c). Efecto de la glicina betaina sobre la síntesis de ADN en células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* sometidas a estrés hídrico, determinando incorporación de ³H-Timidina a dicha síntesis durante un período del cuarto al octavo día de crecimiento.

EFECTO DE GLICINA BETAINA EN SINTESIS DE ADN POR %PVC

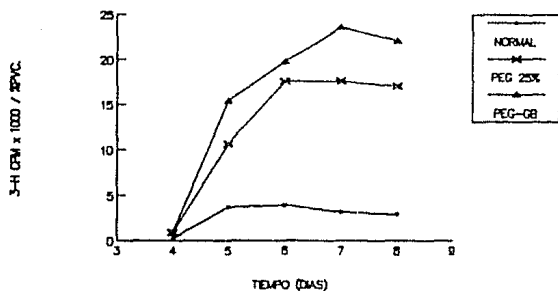


Figura 7 (c)

EFECTO DE GLICINA BETAINA EN SINTESIS DE PROTEINAS POR %PVC

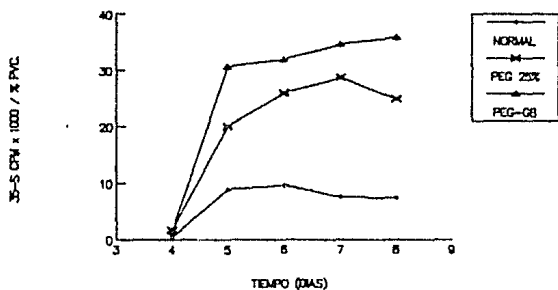


Figura 8 (a)

Fig. 8(a), 8(b) y 8(c). Efecto de la glicina betaina sobre la síntesis de proteínas en células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* sometidas a estrés hídrico. La síntesis de proteínas se determinó estimando la incorporación de 35 S-Metionina en el cultivo celular del cuarto al octavo día de crecimiento.

EFFECTO DE GLICINA BETAINA SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS POR PESO SECO

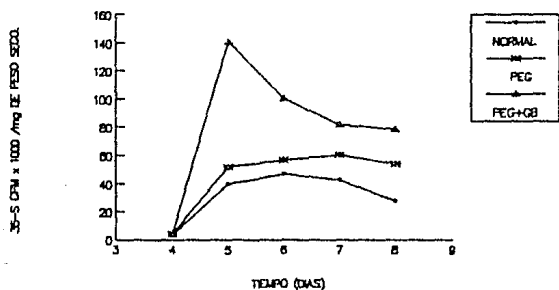


Figura 8 (b)

EFFECTO DE GLICINA BETAINA EN SINTESIS DE PROTEINAS POR mg DE PROTEINA

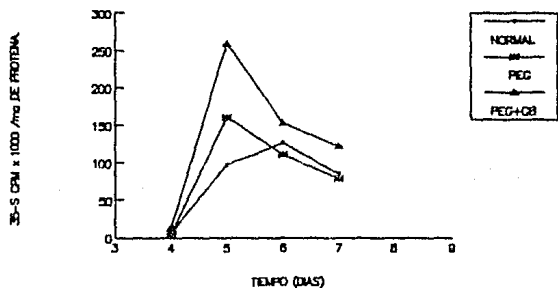


Figura 8(c)

4.6) SÍNTESIS DE PROTEÍNAS TOTALES (LOWRY).

Como un parámetro más de crecimiento, y para correlacionar de algún modo los resultados con los de síntesis de proteínas (^{35}S -Metionina), se realizó la determinación de proteínas totales por el método de Lowry; encontrándose resultados muy parecidos aunque no tan claramente. Ver Figura (9).

4.7) CAMBIOS DE VOLUMEN PERIPLASMICO POR DIFERENCIA EN LA TOMA DE $^3\text{H}_2\text{O}$ / ^{14}C -sorbitol.

Experimentos realizados del cuarto al octavo día en condiciones de estrés hídrico.

Los resultados graficados respecto al cambio en el porcentaje de volumen inicial, muestran una ligera disminución del volumen inmediatamente después de cambiar las células de medio. Esto tal vez debido a un ligero choque osmótico por los solutos del medio de cultivo nuevo. El control tiende a aumentar el volumen conforme transcurre el tiempo. Sin embargo, los tratamientos siguen disminuyendo el volumen debido al estrés impuesto, y después presentan una recuperación del 7 al 8 día probablemente como resultado de una posible adaptación osmótica. Los tratamientos (PEG 25% y PEG+GB) prácticamente no presentan diferencias entre sí respecto a cambios de volumen en condiciones de estrés. (Figura 10) .

PROTEINAS TOTALES DE UN CULTIVO EN SUSPENSION DE *B. ternifolia* (LOWRY).

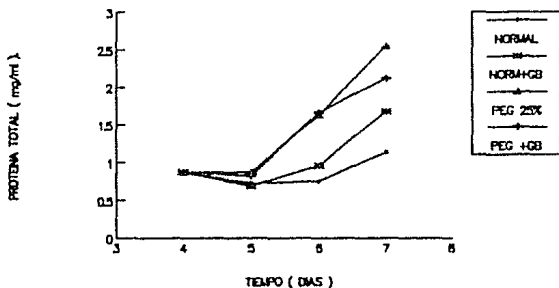


Figura (9)

Fig. 9. Determinación de proteínas totales por el método de Lowry sobre células en suspensión de *B. ternifolia* en condiciones normales y tratadas con PEG y PEG más glicina betaína. La estimación se realizó del cuarto al séptimo día de crecimiento.

VOLUMEN PERIPLASMICO POR DIFERENCIA EN EN LA TOMA DE $^3\text{-H}_2\text{O}$ / $^{14}\text{-C}$ -SORBITOL

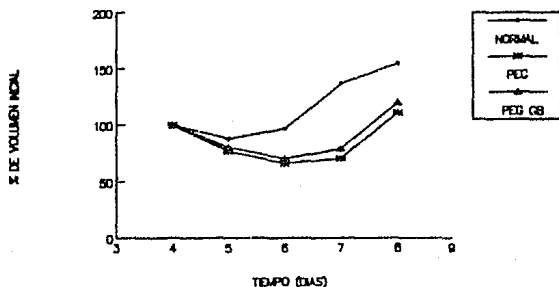


Figura (10)

Fig.10. Efecto de glicina betaína sobre los cambios de volumen celular en un cultivo en suspensión de *B. ternifolia* en condiciones de estrés hídrico. La determinación se hizo por diferencia en la toma de $^3\text{H}_2\text{O}$ / ^{14}C -Sorbitol del cuarto al octavo día de crecimiento.

Tablas De Resultados:

1. a		
CURVA NORMAL DE CRECIMIENTO (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	5.95	0.125
2	6.26	0.110
4	6.92	0.167
6	13.83	0.134
7	20.16	0.820
8	23.10	0.136
9	24.90	1.067
10	33.60	0.720
12	45.3	0.508
14	55.60	0.544
16	52.00	1.200

1. b		
CURVA NORMAL DE CRECIMIENTO (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.45	0.024
2	1.23	0.005
4	1.65	0.023
6	2.47	0.300
7	3.85	0.169
8	4.49	0.077
9	4.73	0.176
10	6.04	0.059
12	7.74	0.087
14	8.64	0.235

2. b		
EFECTO DE FEG 10% SOBRE <i>B. ternifolia</i> (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	4.45	0.68
2	7.00	0.29
4	11.50	0.68
6	25.00	2.35
7	28.00	1.41
8	31.00	0.47
9	34.50	0.23
10	43.00	0.21
12	50.00	0.82
14	50.00	0.55
16	35.00	0.62

2.a Efecto de PEG 10% sobre <i>B. terrestris</i> (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.60	0.019
2	1.10	0.036
4	2.00	0.047
6	3.50	0.036
7	7.41	0.041
8	6.93	0.470
9	8.96	0.018
10	9.60	0.030
12	12.20	0.108
14	13.11	0.072
16	9.90	0.124

2.b Efecto de PEG 15% sobre <i>B. terrestris</i> (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	4.5	0.021
2	6.7	0.108
4	10.0	0.125
6	16.0	0.094
7	27.0	0.141
8	37.0	0.490
9	47.0	0.950
10	50.0	0.329
12	50.0	0.535
14	60.0	0.108
16	56.0	0.354

2.a Efecto de PEG 15% sobre <i>B. terrestris</i> (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.7	0.033
2	1.5	0.230
4	3.0	0.308
6	5.0	0.180
7	8.1	0.075
8	10.8	0.115
9	11.6	0.318
10	13.8	0.160
12	14.3	0.225
14	13.2	0.295
16	13.0	0.012

2. b		EFECTO DE FEG 25% SOBRE <i>B. ternifolia</i> (promedio de 3 repeticiones)	
TIEMPO (DIAS)	% PVC		ERROR ESTANDAR
0	4.2		0.059
2	4.0		0.165
4	3.5		0.147
6	6.0		0.820
7	5.0		0.320
8	5.0		0.258
9	5.5		0.236
10	7.5		0.094
12	0.5		0.070
14	4.5		0.235
16	9.0		0.216

2. a		EFECTO DE FEG 25% SOBRE <i>B. ternifolia</i> (promedio de 3 repeticiones)	
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO (mg/ml)		ERROR ESTANDAR
0	0.6		0.040
2	1.3		0.120
4	0.9		0.059
6	4.0		0.339
7	3.5		0.124
8	4.5		0.321
9	4.9		0.212
10	4.7		0.204
12	6.9		0.268
14	5.5		0.036
16	11.5		1.152

3. b		EFECTO DE NaCl 150mM SOBRE <i>B. ternifolia</i> (promedio de 3 repeticiones)	
TIEMPO (DIAS)	% PVC		ERROR ESTANDAR
0	3.5		0.040
2	1.5		0.349
4	4.5		0.094
6	5.5		0.080
7	7.0		0.124
8	6.0		0.141
9	0.5		0.047
10	0.5		0.125
12	0.5		0.072
14	9.0		0.047
16	12.5		1.075

3. a Efecto de NaCl 150mM sobre <i>B. ternifolia</i> (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.073
2	0.71	0.012
4	0.79	0.017
6	0.85	0.007
7	1.92	0.016
8	1.98	0.004
9	2.16	0.097
10	2.01	0.024
12	2.00	0.029
14	2.25	0.103
16	4.00	0.125

3. b Efecto de NaCl 200mM sobre <i>B. ternifolia</i> (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.124
2	5.0	0.098
4	5.0	0.095
6	4.5	0.041
7	4.0	0.082
8	4.5	0.062
9	4.7	0.080
10	5.0	0.085
12	3.5	0.339
14	3.0	0.648
16	4.5	0.047

3. a Efecto de NaCl 300mM sobre <i>B. ternifolia</i> (promedio de 9 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.22	0.012
2	0.48	0.031
4	0.35	0.008
6	0.40	0.021
7	0.53	0.026
8	0.59	0.022
9	0.45	0.005
10	0.26	0.008
12	0.17	0.009
14	0.14	0.007
16	0.31	0.043

4. b Efecto de Olicina betaína 1mM sobre FEG 25% (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.041
2	4.0	0.072
4	4.5	0.090
6	7.0	0.082
7	6.0	0.101
8	7.0	0.094
9	8.5	0.062
10	10.0	0.235
12	15.0	0.849
14	12.5	0.408
16	18.5	1.870

4. a Efecto de Olicina betaína 1mM sobre FEG 25% (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO (mg/ml)	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.072
2	2.95	0.460
4	1.75	0.024
6	3.66	0.110
7	6.31	0.085
8	5.00	0.094
9	4.42	0.104
10	4.64	0.235
12	6.08	0.102
14	5.56	0.423
16	6.41	0.216

4. b Efecto de Olicina betaína 10mM sobre FEG 25% (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.082
2	3.5	0.096
4	4.5	0.232
6	3.5	0.054
7	4.0	0.072
8	4.5	0.160
9	5.0	0.125
10	5.5	0.141
12	5.5	0.047
14	5.0	0.205
16	17.5	2.065

4. a Efecto de GLICINA BETAÍNA 10mM SOBRE PEG 25% (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DÍAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.125
2	3.53	0.141
4	2.20	0.041
6	2.35	0.062
7	2.00	0.227
8	2.70	0.094
9	2.62	0.098
10	3.03	0.250
12	1.20	0.152
14	2.11	0.165
16	4.10	0.054

4. b Efecto de GLICINA BETAÍNA 50mM SOBRE PEG 25% (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DÍAS)	* PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.082
2	3.0	0.062
4	5.0	0.294
6	5.0	0.250
7	5.5	0.141
8	5.0	0.309
9	3.5	0.125
10	5.5	0.094
12	5.5	0.169
14	6.0	0.082
16	6.5	0.169

4. a Efecto de GLICINA BETAÍNA 50mM SOBRE PEG 25% (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DÍAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.012
2	2.96	0.093
4	2.41	0.047
6	2.09	0.049
7	4.16	0.073
8	3.00	0.082
9	1.37	0.072
10	2.56	0.095
12	1.20	0.094
14	2.40	0.082
16	2.72	0.082

4. a Efecto de GLICINA BETAÍNA 10mM SOBRE FEG 25%		
(promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.125
2	3.53	0.141
4	2.20	0.041
6	2.35	0.002
7	2.99	0.227
8	2.70	0.094
9	2.62	0.090
10	3.03	0.259
12	1.20	0.152
14	2.11	0.165
15	4.19	0.054

4. b Efecto de GLICINA BETAÍNA 50mM SOBRE FEG 25%		
(promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.002
2	3.0	0.002
4	5.0	0.294
6	5.0	0.250
7	5.5	0.141
8	5.0	0.309
9	3.5	0.125
10	5.5	0.094
12	5.5	0.169
14	6.0	0.002
15	6.5	0.169

4. a Efecto de GLICINA BETAÍNA 50mM SOBRE FEG 10%		
(promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.012
2	2.96	0.093
4	2.41	0.047
6	2.69	0.049
7	4.16	0.073
8	3.09	0.002
9	1.37	0.072
10	2.56	0.099
12	1.29	0.094
14	2.49	0.002
15	2.32	0.002

5. b EFECTO DE GLICINA BETAÍNA 1mM SOBRE NaCl 150mM (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.062
2	3.5	0.072
4	3.5	0.071
6	7.0	0.314
7	6.0	0.125
8	9.5	0.169
9	11.0	0.623
10	11.0	0.491
12	15.0	0.294
14	16.0	0.816
16	13.5	0.623

5. a EFECTO DE GLICINA BETAÍNA 10mM SOBRE NaCl 150mM (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.013
2	1.11	0.048
4	0.87	0.025
6	1.07	0.014
7	2.36	0.085
8	2.80	0.110
9	2.60	0.082
10	2.90	0.047
12	4.00	0.094
14	3.54	0.072
16	2.96	0.085

5. b EFECTO DE GLICINA BETAÍNA 10mM SOBRE NaCl 150mM (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.119
2	3.5	0.082
4	3.5	0.163
6	11.0	0.623
7	6.0	0.442
8	13.5	0.408
9	17.0	0.360
10	19.5	0.827
12	24.0	0.624
14	25.5	0.400
16	24.0	0.755

5.a EFECTO DE GLICINA BETAÍNA 10mM SOBRE NaCl 150mM (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.012
2	0.91	0.041
4	0.79	0.028
6	2.08	0.027
7	1.58	0.068
8	3.50	0.044
9	3.37	0.059
10	4.10	0.090
12	5.40	0.125
14	6.33	0.072
16	5.09	0.047

5.b EFECTO DE GLICINA BETAÍNA 50mM SOBRE NaCl 150mM (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	% PVC	ERROR ESTANDAR
0	3.5	0.082
2	6.5	0.235
4	4.0	1.247
6	8.0	0.216
7	11.0	0.408
8	14.5	0.624
9	18.5	0.401
10	17.5	1.027
12	22.0	0.623
14	22.5	0.595
16	23.5	0.408

5.a EFECTO DE GLICINA BETAÍNA 50mM SOBRE NaCl 150mM (promedio de 3 repeticiones)		
TIEMPO (DIAS)	PESO SECO mg/ml	ERROR ESTANDAR
0	0.57	0.027
2	1.89	0.082
4	0.87	0.074
6	1.68	0.130
7	2.53	0.014
8	3.35	0.118
9	3.92	0.090
10	4.30	0.085
12	5.71	0.036
14	5.31	0.085
16	4.10	0.249

EFECTO DE G.B. EN CÉLULAS EN ESTRÉS HÍDRICO A PARTIR DEL CUARTO DÍA			
B			
tiempo (días)	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+GB 1mM
0	5.5	5.5	5.5
2	6.0	6.0	6.0
4	8.0	4.0	4.0
5	8.0	7.0	7.0
6	10.0	7.0	8.0
7	13.0	7.0	7.5
8	12.0	7.0	7.5

EFECTO DE PEG 25% + G.B 1mM SOBRE LA SÍNTESIS DE ADN 7(a) (³ H-TIMIDINA CPM/mg P.SECO)			
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+GB 1mM
0			
2			
4	1483	2109	7720
5	16200	27442	70681
6	19052	98270	62024
7	17888	36865	55670
8	10928	96064	46518

EFECTO DE PEG 25% + G.B 1mM SOBRE LA SÍNTESIS DE ADN 7(b) (³ H-TIMIDINA CPM/mg DE PROTEÍNA)			
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+GB 1mM
0			
2			
4	3010	2887	6767
5	40244	85434	130606
6	51799	75416	94965
7	35776	48460	83505
8	61735	125250	184575

EFECTO DE PEG 25% + G.B 1mM SOBRE LA SÍNTESIS DE ADN 7(c) (³ H-TIMIDINA CPM/ MPVC)			
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+GB 1mM
0			
2			
4	205.8	880.6	1987.9
5	3647.2	10663.4	15448.8
6	3905.6	17604.2	19847.7
7	3137.3	17642.7	29604.3
8	2932.4	17115.8	22124.4

EFFECTO DE PEG 25% + G.B IMM SOBRE LA SINTESIS DE			
8Ca)	PROTEINAS (³⁵ S-METIONINA CFM/mg peso seco)		
tiempo	normal (MS)	PEG 25 %	PEG 25%+OB IMM
0			
2			
4	3384.60	4031.13	16000.00
5	39361.90	51605.95	140494.00
6	46624.14	56479.97	100166.50
7	42535.30	60214.40	81027.20
8	27647.00	53849.80	76698.90

EFFECTO DE PEG 25% + G.B IMM SOBRE LA SINTESIS DE			
8Cb)	PROTEINAS (³⁵ S-METIONINA CFM/mg de proteina)		
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+OB IMM
0			
2			
4	6868.37	5518.10	14103.40
5	97726.20	160659.60	259609.90
6	126763.30	111300.60	153369.00
7	85070.60	79167.30	122740.80
8	156181.60	182971.20	299388.50

EFFECTO DE PEG 25% + G.B IMM SOBRE LA SINTESIS DE			
8Cc)	PROTEINAS (³⁵ S-METIONINA CFM/MFVC)		
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+OB IMM
0			
2			
4	469.6	1683.0	1535.0
5	8856.4	20052.6	30708.1
6	9557.0	25980.7	32059.9
7	7430.0	28816.9	34694.7
8	7418.6	25001.7	35886.7

9			
PROTEINAS TOTALES (LOWRY) mg/ml			
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+OB IMM
0			
2			
4	0.547	1.220	1.175
5	0.725	0.873	0.828
6	0.754	1.694	1.672
7	1.141	2.548	2.120
8			

CAMBIOS EN % DE VOLUMEN INICIAL POR LA DIFERENCIA EN LA TOMA DE H_2O C-Sorbitol			
10			
tiempo	normal (MS)	PEG 25%	PEG 25%+OB 1mM
0			
2			
4	100	100	100
5	88	77	80
6	97	66	70
7	197	70	79
8	155	111	120

V. DISCUSIÓN

5.1.) Curvas de crecimiento en condiciones de estrés hídrico.

Los datos nos muestran que 10 y 15% de PEG sobre el cultivo estimulan el crecimiento (%PVC y peso seco) aún por encima del control. Estos resultados aparentemente son ilógicos debido a que el PEG es una sustancia deshidratante, la que además no penetra a la célula, por lo que no podría estar siendo incorporada al metabolismo celular para incrementar su crecimiento. Sin embargo, una posible explicación podría ser que el PEG al producir un efecto de estrés hídrico, induzca un incremento en la tasa metabólica (síntesis macromolecular).

Con respecto a los datos de peso seco, se muestra este posible incremento en la tasa metabólica en los tratamientos con 10 y 15% de PEG, sin embargo, esto no parece suceder en el tratamiento con PEG 25%, ya que prácticamente no se observa un incremento en el peso seco y sigue más o menos la misma tendencia que el normal. El cambio de por ciento de paquete de volumen celular en PEG 10 y 15% también se encuentran sobre el normal, tal vez debido a que no es un efecto de estrés drástico, el que sin embargo acelera el metabolismo, permitiéndoles seguir incorporando agua y crecer aún por sobre el tratamiento normal. De aquí podríamos deducir que al producirse un efecto drástico de estrés hídrico a la concentración de 25% de PEG, se disminuye considerablemente el volumen (%PVC), las células pierden la capacidad de tomar agua por los potenciales de agua tan negativos, lo que propicia que la célula

no tenga tampoco las posibilidades de incorporar eficientemente solutos del medio de cultivo y utilizarlos para aumentar su peso seco, lo que podría estar sucediendo a 10 y 15% de PEG. Debido a ésto no se observa un incremento considerable de peso seco en 25% de PEG.

Lo importante de este punto fue que se logró imponer un efecto de estrés hídrico con PEG 25%, abatiéndose el %PVC inmediatamente y permaneciendo constante a lo largo de los 16 días en los que el control alcanzó la fase estacionaria.

En base a ésto, consideramos que el cultivo era capaz de mantener viva a una población celular más o menos constante ya que el %PVC no disminuía, aunque tampoco incrementaba considerablemente. Apoyándose sobre los datos respecto al peso seco, se observó que éste sí se incrementaba a lo largo del tiempo, lo que nos permitió interpretar que el cultivo, aún en éstas condiciones, seguía sintetizando macromoléculas para su metabolismo, aunque ésto no se reflejara claramente con respecto al %PVC. Por lo tanto, la condición de estrés hídrico se había impuesto sin ser tan drástico como para matar al cultivo de células en suspensión, por lo que la concentración de 25% de PEG fue seleccionada para probar sobre ella el efecto de la glicina betaína.

5.2.) Efecto de NaCl sobre células en suspensión de *Bouvardia ternifolia*.

En los resultados se observó que el NaCl 300mM es demasiado

daño para el cultivo, e incluso tiende a disminuir el cultivo gradualmente por debajo del inóculo inicial, evitando que las células sigan creciendo (en ambos parámetros de crecimiento, peso seco y %PVC, se ve el efecto).

Debido a que el NaCl penetra a la célula, la toxicidad además de la deshidratación a 300mM es tan drástica, que las células son incapaces de responder eficientemente a tal choque, no les es posible compartimentalizar tales cantidades de NaCl, y por lo tanto se daña irreversiblemente la integridad de sus proteínas y membranas, lo que trae consigo la total desestabilidad celular.

Cuando se aplica 150mM de NaCl se nota que es menos tóxico, el %PVC se abate respecto al normal, pero permanece más o menos constante respecto al %PVC inicial (incluso hay un ligero incremento del 6 al 16 día). El peso seco nos indica lo mismo.

A ésta concentración, las células son capaces de soportar todavía los efectos de deshidratación y toxicidad por exceso de iones, el cultivo no muere aunque su crecimiento respecto al tratamiento normal es bastante inferior.

Debido a lo antes expuesto, la concentración de NaCl elegida para probar el efecto de glicina betaína fue 150mM.

5.3.) Efecto de glicina betaína sobre NaCl 150mM.

En condiciones de estrés salino, la glicina betaína libera del estrés impuesto a las células con mayor eficiencia a medida que se incrementa su concentración. Se puede interpretar que de 1mM a 10mM, la glicina betaína es incorporada y utilizada gradualmente como un soluto compatible que le servirá a la célula como osmoprotector, es decir, le ayudará a proteger sus membranas,

proteínas y macromoléculas en general, del efecto tóxico y deshidratante del NaCl, permitiéndoles a las células reanudar su crecimiento en comparación de cuando la glicina betaína está ausente.

A partir de 10mM en adelante (50mM), la glicina betaína está por arriba de la que podría ser utilizada para la liberación del estrés, por eso las diferencias en el crecimiento entre 10 y 50 mM son mínimas.

De ésta manera, la función de la glicina betaína en condiciones de estrés salino es la de una molécula osmoprotectora, ya que a mayor cantidad de moléculas, mayor la eficiencia en la liberación del estrés salino.

Esto nos permite responder la pregunta con respecto al efecto de la glicina betaína sobre salinidad en un cultivo de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia*. La glicina betaína tiene un efecto osmoprotector, contribuye como soluto compatible a contrarrestar el estrés osmótico causado por salinidad, como un mecanismo para permitirle a la célula seguir tomando agua y crecer.

5.4.) Efecto de Glicina betaína sobre estrés hídrico (PEG 25%).

Respecto al estrés hídrico, la glicina betaína tiene un mayor efecto, es decir, libera del efecto de estrés de una manera más eficiente a la concentración de 1mM con respecto a 10 y 50mM, esto nos indica que la glicina betaína no está siendo utilizada como osmoprotector, ya que si fuera así, la liberación del estrés sería mayor a más altas concentraciones, porque para la osmorregulación

eficiente, es importante un número mayor de moléculas compatibles. Por lo tanto, la glicina betaína está siendo utilizada o su efecto es más específico que el de ser una molécula simplemente osmoprotectora en éste caso. Ahora bien, uno se podría preguntar el porqué si a 1mM libera más eficientemente del estrés, porque no hace lo mismo a 10 y 50 mM si existe aquí la suficiente glicina betaína como para tomar ese 1mM y discriminar el exceso, liberando de ésta manera de igual forma que el 1mM original. La respuesta podría ser que se trate de un fenómeno en el cual la glicina betaína tiene un efecto específico sobre el estrés y su respectivo abatimiento, es decir, que existe una concentración óptima de glicina betaína a la cual se libera del estrés hídrico, y que a mayores concentraciones el efecto específico no se presenta e inclusive se revierte, o sea que no es una respuesta favorable que se presente de una manera lineal con respecto a la glicina betaína.

Este resultado apoya la hipótesis de que su efecto en plantas superiores como en el caso de la bacteria *E.coli*, podría ser más específicamente sobre la ADN polimerasa (para profundizar más sobre éste efecto se eligió entonces la concentración de 1mM de glicina betaína).

5.5.) Efecto de glicina betaína sobre la síntesis de ADN y proteínas.

En general, los resultados muestran un incremento en la síntesis de macromoléculas (ADN y proteínas) por efecto de la glicina betaína en condiciones de estrés hídrico. La síntesis en dichas condiciones (incluso solamente con PEG 25%) se encuentra

aún por sobre el control y es en éste punto en el que se presentan dificultades para su interpretación.

Una explicación probable podría ser la inducción del incremento en la tasa metabólica celular a causa del estrés impuesto, y un incremento aún mayor en presencia de glicina betaína. Corroborando ésto con los datos de peso seco, la misma explicación con respecto a PEG 25% por sí sólo no corresponden, ya que no se muestra incremento de peso seco pero sí un aumento en la síntesis de macromoléculas. La explicación sería que al presentarse un estrés hídrico bastante fuerte como el causado por PEG 25%, las células pierden volumen pero además aceleran su metabolismo y sintetizan macromoléculas pero a base de precursores o sustratos intracelulares previamente almacenados (por ejemplo, se habla de la existencia de pozas de aminoácidos). En éstas condiciones de estrés, las células ya no pueden incorporar solutos del medio extracelular, por lo tanto tienen que hacer uso de los recursos que tienen dentro; ésto causa que no se de un incremento considerable de peso seco. Aunado a ésto, la glicina betaína estimula una mayor síntesis de ADN y proteínas cuando esta junto con PEG 25%.

Esto quiere decir que efectivamente la glicina betaína tiene un efecto específico sobre la síntesis de ADN y proteínas y no actúa como molécula osmoprotectora en condiciones de estrés hídrico. Por lo tanto, preliminarmente se podría especular con respecto a que exista una respuesta similar de la glicina betaína tanto en enterobacterias (*E.coli*) como en algunas plantas superiores cuando se les somete a condiciones de estrés osmótico.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

5.8.) Efecto de glicina betaína sobre los cambios de volúmen en estrés hídrico.

Respecto a los cambios de % de volumen inicial a través del tiempo en condiciones de estrés hídrico, los datos muestran que al parecer, no existen diferencias muy marcadas entre los tratamientos con 25% de PEG y con PEG en presencia de glicina betaína. Esto podría implicar o apoyar la hipótesis de que la glicina betaína en éstas condiciones actúa de una manera específica sobre algunas molécula o fenomeno en particular, y que no tiene un efecto osmótico por lo que no actúa o interfiere sobre la toma de agua o sobre el incremento en la concentración iónica interna, o bién para proteger a las proteínas y membranas del efecto deshidratante.

La disminución del % de volumen en los tratamientos con 25% de PEG, se pueden deber al choque osmótico que sufren las células cuando se les agrega el PEG. La recuperación que se observa del sexto al octavo día es quizá una señal de una posible adaptación a tales condiciones por parte de las células.

VI. CONCLUSIONES.

A.) ESTRÉS SALINO:

- 1.) El crecimiento de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* se inhibe con NaCl 150mM.
- 2.) La inhibición es liberada con más eficiencia conforme aumenta la concentración de glicina betaína.
- 3.) El efecto de la glicina betaína sobre células en salinidad (150mM) parece ser osmótico.

B.) ESTRÉS HÍDRICO:

- 4.) El PEG a 10 y 15% no produce un efecto drástico de estrés, y posiblemente induzca un incremento en la tasa metabólica de las células.
- 5.) El crecimiento de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* se inhibe con 25% de PEG.
- 6.) La inhibición es parcialmente liberada con 1mM de glicina betaína.
- 7.) La liberación no se presenta con 10 y 50mM de glicina betaína. Por lo tanto su efecto es específico a 1mM.
- 8.) El PEG a 25% produce una disminución de los cambios de volumen periplásmico (medido como la diferencia de toma de $^3\text{H}_2\text{O}/^{14}\text{C}$ -sorbitol) durante cuatro días comparado con el control.
- 9.) La glicina betaína no parece alterar el efecto de PEG 25% sobre la pérdida de volumen celular.
- 10.) El PEG parece estimular tanto la síntesis de ADN como la de proteínas (incremento en la tasa metabólica).
- 11.) Cuando la glicina betaína esta presente junto con el PEG 25%, el estímulo tanto de ADN como de proteínas parece ser aún mayor.
- 12.) La glicina betaína no parece influir sobre cambios de volumen celular (ajuste osmótico), pero sí parece tener un efecto sobre la síntesis de macromoléculas, por encima del efecto del propio PEG.

VII. REFERENCIAS :

1.) Ahmad, N. R.G Wyn Jones y W. Jetshke (1987). Effect of exogenous glycinebetaine on Na⁺ transport in barley roots. J Ex Botany. 191: 913-921.

2.) Bardy, C.J. Gibson, T.S., Barlow, E.W.R. Speirs, y J., Wyn Jones, R.G. (1984). Salt tolerance in plants. I. Ions, compatible organic solutes and the stability of plant ribosomes. Plant Cell Environ. 7: 571

3.) Ben-Hayyin, G. (1987). Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured citrus cells. Plant Physiol. 85: 430-433.

4.) Ben-Hayyin, G., P. Spiegel-Roy, H. Newmann (1985). Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. Plant Physiol. 78: 144-148 .

5.) Borowitzka, L.J. y A.D. Brown. (1974). The salt relations of marine and halophylic species of the unicellular green alga *Dunaliella*. the role of glycerol as a compatible solute. Arch Microbiol. 96: 137-142.

6.) Coughlan, S.J. y R.G. Wyn Jones. (1982). Glycine betaine biosynthesis and its control in detached leaves of spinach. Planta. 154: 6-17.

7.) Cramer, G.R., A. Lauchli y V.S. Politr. (1985). Displacement of Ca⁺⁺ by Na⁺⁺ from the plasmalemma of root. A primary response to salt stress. Plant Physiol. 79: 207-211.

8.) Croughan, J.P., S.J. Stnvaek, y D.W. Rains. (1979). Selection of a NaCl-tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Sci. 18: 959-963.

9.) Dracup, M., J. Gibss, C.E.E. Stuiwer, H. Greenway y J.J. Flowers. (1986). Determination of free space, growth, solute concentration and parameters of water relations of suspension cultured tobacco cells. Plant Cell and Environment. 9: 693-701.

10.) Fernández, S.M.B.L. (1979). Metabolismo nitrogenado en cultivo de tejidos de *Bouvardia ternifolia*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM.

11.) Gibss, J., M. Dracup, H. Greenway y J.A. Mc Comb. (1989). Effects of high NaCl on growth, Turgor and internal solutes of tobacco callus. Plant Physiol. 134: 61-69.

12.) Gorman, D. (1963). Flores y Plantas de México. U.N.A.M.

13.) Greenway, H. y Rana Munns. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann Rev Plant Physiol.* 31:149-190.

14.) Grieve, C.M. y E.U. Maas. (1984). Betaine accumulation in salt stressed sorghum. *Physiol Plant.* 61: 167-171.

15.) Grumet, R. y A.D. Hanson. (1986). Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycine betaine accumulation in barley. *Aust J Physiol.* 13: 353-364.

16.) Handa, A.K., Bressan, R.A., Handa, S. y Hasegawa, M.P. (1982). Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medium containing polyethylene glycol. *Plant Physiol.* 69: 514-521.

17.) Hanson, A.D., y N.A. Scott. (1980). Betaine synthesis from radioactive precursors in attached water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* 66: 342-348.

18.) Hanson, A.D. y W.D. Hitz. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann Rev Plant Physiol.* 33:163-203.

19.) Hanson, A.D. y D. Rhodes. (1983). ¹⁴C Tracer evidence for synthesis of coline and betaine via phosphatidyl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant Physiol* 71: 692-700.

20.) Higgins, C.F.; John Cairney; Douglas, A. Stirling; Lesley Sutherland y Ian, R. Booth. (1987). Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signals?. *TIBS*, September: 339-344.

21.) Hitz, W.D., D. Rhodes y A.D. Hanson. (1985). Radiotracer evidence implicating phosphoril and phosphatidyl bases as intermediates in betaine synthesis by water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* 68: 814-822.

22.) Johnson, R.K. y M.P. Chitnis. (1978). Antineoplastic and biochemical effects in murine tumors of bouvardin. A Cyclic hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 19: 218.

23.) Joland, D.S., J.J. Hofmann., J.S. Torrance., M.R. Wiedhope., R.J. Cole y K.S. Aroba. (1977). Bouvardin and deoxibouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J. Am. Chem. Soc.* 99: 8040-8044.

24.) Kent, L.M., y A. Lauchli. (1985). Germination and seedling growth of cotton salinity-calcium interactions. *Plant Cell Environ* 8: 155-159.

25.) Kurt, E., G.R. Cramer, A. Lauchli, y E. Epstein. (1986).

- Effects of NaCl and CaCl₂ on cell enlargement and cell production in cotton roots. *Plant Physiol.* 82: 1102-1106.
- 26.) Le Rudulier, D; Strom, A.R; Dandekar, A.M; Smith, L.T; Valentine, R.C. (1984). Molecular Biology of osmoregulation. *Science* 224: 1064-1068.
- 27.) Levitt, J. (1972). Responses of plants to environmental stress. Academic Press. U.S. pp. 1-6.
- 28.) Lone, M.I., J.S.H. Kueh, R.G. Wyn Jones y S.W.J. Bight. (1987). Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *J Exp Botany* 188: 479-490.
- 29.) Lowry, O H; Rosebrough N.J; Farr A.L. Randal R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- 30.) Murillo, G.E. (1989). El ajuste osmótico de *Amaranthus hypochondriacus*: una aproximación hipotética. En : Cuaderno de posgrado #27 Bioquímica Vegetal. Editado por DEPg. División de Bioquímica Vegetal. Facultad de Química. UNAM. pp. 239-271.
- 31.) Meury, J. (1988). Glycinebetaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 149: 232-239.
- 32.) McDonnell, E. y R.C. Wyn Jones. (1988). Glycine betaine biosynthesis and accumulation in unstressed and salt-stressed wheat. *J Exp Botany.* 201: 421-430.
- 33.) Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- 34.) Perry, C.A., Leigh, R.A., Tomos, A.D., Wyse, R.E., Hall, J.L. (1987). The regulation of turgor pressure during sucrose mobilization and salt accumulation by excised storage-root tissue of redbeet. *Planta.* 170: 353-361.
- 35.) Poljakoff-Mayber, A. (1982). Biochemical and physiological responses of higher plants to salinity stress. In: Biosaline Research (Edited by Anthony San Pietro). Indiana University. Bloomington, Indiana. pp. 245-269.
- 36.) Robinson, S.P. (1985). Osmotic adjustment by intact isolated chloroplasts in response to osmotic stress and its effects on photosynthesis and chloroplast volume. *Plant Physiol.* 79: 996-1002.
- 37.) Sanchez de Jiménez, E. y Fernández, L. (1983). Biochemical parameters to assess cell differentiation of *Bouvardia ternifolia* Schlecht callus. *Planta.* 158: 377-383.

38.) Schulze Ed. (1986). Whole-plant response to drought. Aust. J. Plant Physiol. 13: 127-141.

39.) Storey, R. y R.G. Wyn Jones. (1975). Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. Plant Sci Letters. 4: 161-168.

40.) Valenzuela, E. (1989). Influencia del contenido relativo de agua sobre los niveles de los solutos compatibles glicina betaina y prolina durante la pérdida de agua en *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM.

41.) Villalobos, A.V.M. (1985). Fundamentos teóricos-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Laboratorio de biotecnología, centro de genética, colegio de postgraduados, chapingo. México. pp. 1-11.

42.) Watad, A.A., L. Reinhold y A.L. Lerner. (1983). Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. Plant Physiol. 73: 624-629.

43.) Weigel, P., C. Lerma y A.D. Hanson. (1988). Choline oxidation by intact spinach chloroplasts. Plant Physiol. 86: 54-60.

44.) Wyn Jones, R.G. y R. Storey. (1981). Betaines. In: Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. L.L. Paleg and D. Aspinall (Eds). Academic Press Sydney. pp. 171-208.

45.) Wyn Jones, R.G. y Pollard, A. (1982). Towards a physical chemical characterisation of compatible solutes. In "Biophysics of water" (Eds. F. Franks and S.F. Mathias). New York. pp. 335-339.