



96
26

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL ESTRES OSMOTICO SOBRE LA
PROTEINA BETAINA ALDEHIDO DESHIDROGENASA
DE HOJAS DE *Amaranthus hypochondriacus*, L.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P R E S E N T A :

RICARDO RAJSBAUM GORODEZKY



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

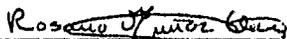
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. GRACIELA MEZA RUIZ
Vocal: Prof. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
Secretario: Prof. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
1er. Suplente: Prof. ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES
2do. Suplente: Prof. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto E
Departamento de Bioquímica, Laboratorio 102

Asesor del Tema:



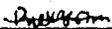
DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

Supervisor Técnico:



BIOL. CARLOS MUJICA JIMENEZ

Sustentante:



RICARDO RAJSBAUM GORODEZKY

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló con el donativo de CONACYT (1713-N9209) y el apoyo de Fundación UNAM por medio del programa de Iniciación temprana a la investigación y docencia.

Al Dr. A. Hanson por haber proporcionado el anticuerpo anti-BADH de espinaca

A Roberto Velasco Garcia por la donación de la BADH purificada de *Pseudomonas aeruginosa*.

A la familia Irlés por la asesoría proporcionada en computación.

Agradezco de manera especial el apoyo de la Dra. Rosario Muñoz Clares por haberme recibido en el laboratorio, por toda su enseñanza y su asesoría sin la cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio y en especial a Carlos Mújica por todo el tiempo que me otorgó, así como por toda la ayuda y apoyo sin la cual el trabajo experimental no hubiera sido posible.

DEDICATORIAS

Esta tesis la dedico con todo cariño a mis padres, Clara y Benito, que me dieron toda su paciencia y comprensión en todo momento. Este trabajo es de y para mis padres porque yo soy gracias a ellos. Ellos son la razón de mi superación.

A mis hermanos Ari y Sergio que son más que amigos que han estado cerca o lejos pero siempre a mi lado. Por la admiración que les tengo.

A mis abuelos y tíos que son todos parte muy importante de mi vida y que me motivan a seguir adelante.

A Claudine por su apoyo, confianza, cariño, paciencia, comprensión....., por estar cerca de mi y por tantas, tantas razones que no cabrían en esta tesis. Simplemente gracias por estar aquí.

A mis amigos Lalo Infante, Lalo Pacheco, Manuel Peña, Sandra y Jorge, Lourdes, Angel, Arturo, Alberto, Alexander, Alejandra, Arcadio y todos los demás Qfos y no Qfos que tuvieron que aguantar mis buenos y malos momentos. Sin ellos la carrera hubiera sido inaguantable. Porque espero que estas amistades nunca terminen.

A mis amigos de toda la vida: Ismael, Jacobo, Amy, Elías, Fernanda y David, a los que no hay palabras que puedan expresar lo que su compañía significa para mí. A ellos que son con los que he pasado los mejores momentos de mi vida. A ellos que son los que me dan ánimos para seguir adelante.

INDICE

	pág
I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCION	5
1. El agua	5
1.1. Potencial hídrico y potencial químico	5
1.2. Potencial osmótico del agua y su relación con el estrés osmótico	7
2. Estrés hídrico	8
2.1. Estrategias de respuesta al estrés hídrico	8
2.2. Respuestas bioquímicas y moleculares de adaptación al déficit de agua en las plantas	12
3. Estrés salino	15
III. GENERALIDADES	19
IV. ANTECEDENTES	23
1. Acido abscísico (ABA)	23
2. Antecedentes del amaranto	29
3. Osmolitos compatibles	31
3.1. Glicina betaina	32
3.1.1. Biosíntesis de la glicina betaina	39
4. Betaina aldehído deshidrogenasa (BADH)	43
4.1. Reacción catalizada y propiedades cinéticas de la BADH	43
4.2. Mecanismo de reacción de la BADH	44
4.3. Propiedades moleculares	47
4.4. Regulación	53
V. OBJETIVOS	54
1. Objetivos generales	54
2. Objetivos particulares	54
VI. MATERIAL Y METODOS	55
1. Material biológico	55
2. Equipo, Material, Reactivos y Soluciones	55
3. Metodología	55
3.1. Extracción y purificación de BADH de hojas de amaranto	55
3.2. Ensayo de la actividad enzimática	57

3.3. Determinación de proteína	58
3.4. Electroforesis	59
3.5. Obtención de anticuerpo anti-BADH	62
3.6. Purificación parcial de los anticuerpos	63
3.7. Inmunoprecipitación de la proteína BADH	64
3.8. Western blot	64
3.9. Tratamientos de estrés osmótico	65
VII. RESULTADOS	67
1. Purificación de la BADH	67
2. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-BADH	75
3. Variación en la proteína BADH de hojas de amaranto en respuesta al estrés osmótico	83
VIII. DISCUSION	93
1. Purificación de la BADH	93
2. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-BADH	95
3. Variación en la proteína BADH de hojas de amaranto en respuesta al estrés osmótico	99
IX. CONCLUSIONES	105
X. PERSPECTIVAS	106
XI. APENDICE	107
1. Equipo	107
2. Material	107
3. Reactivos	108
4. Preparación de Soluciones	109
XII. REFERENCIAS	113

Abreviaturas

ABA- Ácido abscísico.
ASB- Albumina de suero bovino.
ALDH- Aldehído deshidrogenasa.
ATP- Trifosfato de adenosina.
BA- Betaina aldehído.
BADH- Betaina aldehído deshidrogenasa.
BCIP- Sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina.
C₃- Plantas que fijan CO₂ exclusivamente por vía ciclo de Calvin.
C₄- Plantas que poseen el ciclo de ácidos dicarboxílicos C₄ además del ciclo de Calvin.
CAM- Metabolismo ácido de las crasuláceas.
CMO- Colina monooxigenasa.
CTP- Trifosfato de citidina.
cDNA- DNA complementario.
DNA- Ácido desoxiribonucleico.
DTNB- Ácido 5-5'-ditio-bis (2-nitrobenzico).
EDTA- Ácido etilendinitrotetraacético.
g- Gravedad.
GB- Glicina betaina.
IgG- Inmunoglobulina G.
kDa- Kilodalton.
MgCl₂- Cloruro de magnesio.
MPa- Megapascal.
NaCl- Cloruro de sodio.
NBT- Cloruro de nitroazul de tetrazolio.
PAGE- Electroforesis en gel de poli(acrilamida).
PEG- Polietilenglicol.
PM- Peso molecular.
RNAm- ácido ribonucleico mensajero.
SDS- Dodecil sulfato de sodio.
TBS- Amortiguador tris-salino (Tris 50 mM, NaCl 200mM)
TBST- TBS más Tween 20 al 0.05 % (v/v)
TEMED- N,N,N',N'-tetrametilendiamina.
U- Unidades de actividad enzimática

1 RESUMEN

Numerosos organismos responden al estrés osmótico sintetizando grandes cantidades de compuestos llamados osmolitos. Cuando éstos se acumulan en el citoplasma, ayudan a la célula a mantener su contenido de agua sin interferir con los procesos metabólicos y protegen a las macromoléculas de los efectos nocivos de los iones inorgánicos. La glicina betaina, que se sintetiza en las plantas a partir de la colina, es uno de los osmolitos más efectivos. La enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) cataliza el último paso irreversible de su síntesis. Se sabe que la actividad de esta enzima se incrementa en respuesta a estrés osmótico. En este trabajo se investigaron los posibles cambios en los niveles de la proteína BADH en el *Amaranthus hypochondriacus* L. en respuesta a diferentes condiciones de estrés osmótico. Para este propósito se obtuvieron anticuerpos policlonales contra la enzima purificada de hojas de amaranto, que se utilizaron para explorar los siguientes aspectos: 1) El efecto del déficit de agua y de la concentración alta de sales (NaCl) sobre la cantidad relativa de la proteína BADH y 2) el posible papel mediador del ácido abscísico en esta respuesta. Para esto se trataron las hojas con cloruro de sodio (NaCl), polietilenglicol (PEG) y ácido abscísico (ABA) durante 6 h. La proteína BADH se cuantificó por inmunoelectrotransferencia y densitometría, mientras que la actividad enzimática se evaluó midiendo, mediante espectrofotometría, la transformación de NAD^+ en NADH. Los resultados de este trabajo demostraron la existencia de una cierta cantidad de proteína BADH que no muestra actividad en las hojas no sometidas a déficit de agua, mientras que en las hojas que se hallan bajo estrés osmótico durante un plazo corto, se manifiesta un incremento en la proteína BADH menor al aumento de la actividad enzimática. En base a

estos resultados se postula que a corto plazo el déficit de agua causa una activación de la enzima preexistente. Por su parte, el ácido abscísico promueve el aumento de la actividad enzimática en menor proporción que los tratamientos causantes de estrés osmótico, lo que sugiere que éstos conllevan a un aumento de la actividad de BADH por vías de transducción de señales diferentes en cada caso. Por otro lado, con el ácido abscísico no se observa un aumento en la cantidad relativa de proteína BADH, por lo que es posible que esta fitohormona esté involucrada en la activación de la enzima, aunque puede haber otros mecanismos de activación.

II. INTRODUCCION

1. El Agua

El agua es la sustancia más abundante en todos los seres vivos, en la que se llevan a cabo la mayoría de las reacciones químicas necesarias para la vida. La importancia del agua en los organismos vivos resulta de sus propiedades fisicoquímicas únicas como son, entre otras, su alto calor específico (4.2 J/g), su calor de vaporización, que es el más alto conocido (2441 J/g a 100^o C) y de fusión (333.6 J/g). El alto calor específico del agua tiende a estabilizar las temperaturas de los organismo vivos y de su medio ambiente. El alto calor de vaporización del agua hace que la evaporación de ésta tenga un efecto pronunciado de enfriamiento y su condensación de calentamiento (Kramer, 1969).

Otra de las características muy importantes del agua es que es una molécula polar. Esto se debe a que la unión de dos átomos de hidrógeno con una de oxígeno no es lineal, lo que provoca una distribución asimétrica de las cargas. Además, el oxígeno es un átomo fuertemente electronegativo, por lo que atrae con gran fuerza los electrones del hidrógeno, dejando la región alrededor de los átomos de hidrógeno con una carga positiva neta. Esta característica permite al agua ser un excelente disolvente, ya que es capaz de debilitar los enlaces iónicos o de hidrógeno de algunos compuestos y solvatarlos. De esta manera pueden quedar libres átomos y moléculas con cargas eléctricas que pueden ejercer fuerzas de atracción y repulsión sobre otras moléculas.

1.1. Potencial hídrico y potencial químico

El potencial químico es el cambio en energía libre que se produce por agregar una cantidad unitaria de una sustancia. Para un soluto disuelto en agua, el potencial químico es

aproximadamente proporcional a la concentración de soluto. El potencial químico se calcula de la siguiente manera (Fitter y Hay, 1981).

$$\mu_i = RT \ln a_i \quad (1)$$

en donde, μ_i = potencial químico de una sustancia i , R = constante de los gases (8.314 J/mol K), T = temperatura en kelvins y a_i = actividad de la sustancia i (concentración).

Un soluto en difusión tiende a moverse de regiones con alto potencial químico a regiones de bajo potencial.

El potencial hídrico es el potencial químico del agua en un sistema o parte de un sistema, expresado en unidades de presión, comparado con el potencial químico del agua pura a la presión atmosférica y a la misma temperatura (Fitter y Hay, 1981):

$$\Psi = (\mu_w - \mu_w^*) / V_w \quad (2)$$

en donde, Ψ = potencial hídrico, μ_w = potencial químico del agua, μ_w^* = potencial químico del agua pura a la presión atmosférica y a la misma temperatura que el sistema y V_w = volumen molar parcial del agua (18 cm³ / mol).

Por lo tanto, así como los solutos se difunden en respuesta a diferencias en el potencial químico del soluto, el agua se difunde en respuesta a diferencias en el potencial hídrico. Cuando el potencial hídrico es mayor en una región que en otra y no hay barrera impermeable que impida la difusión, el agua se difunde desde la región con potencial elevado a la de bajo potencial.

El potencial hídrico resulta de las acciones combinadas pero opuestas de los potenciales de presión y osmótico (Fitter y Hay, 1981):

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_s \quad (\Psi = p + s) \quad (3)$$

en donde, Ψ = potencial hídrico total, Ψ_p = potencial de presión o simplemente presión y Ψ_s = potencial osmótico.

1.2. Potencial osmótico del agua y su relación con el estrés osmótico

Cuando existe una barrera física formando dos compartimentos diferentes, como es el caso de las membranas biológicas, en las que el paso de los iones a través de la membrana queda restringido debido al tamaño del ión acompañado de las moléculas de agua que lo solvatan, sólo es posible el flujo de moléculas de agua de un compartimento a otro. Este recurso es utilizado para equilibrar las concentraciones de solutos en ambos compartimentos (ósmosis). Así, si de un lado de la membrana hay una solución y del lado opuesto hay otra con diferente concentración, habrá ósmosis. La solución más concentrada tendrá el potencial hídrico menor (más negativo), de manera que el agua se difundirá hacia ella desde la otra solución hasta que aumente la presión (siempre y cuando el agua esté confinada) hasta un punto en que su potencial hídrico sea igual al de la solución menos concentrada. Este efecto es sumamente importante cuando un organismo está bajo estrés osmótico (hídrico o salino).

Cuando una planta absorbe pocas cantidades de agua debido a su baja disponibilidad, las células deben ceder agua de su interior para equilibrar las concentraciones de los iones que se encuentran fuera de ellas. De esta manera, las células sufrirían de plasmólisis y muerte. Esto puede ser contrarrestado por la acumulación o la síntesis de osmolitos por la propia célula, que al reducir el potencial hídrico evitan la pérdida de agua y por lo tanto regulan la turgencia de las células. La acumulación de solutos es un aspecto importante de la adaptación de las plantas al déficit de agua (Morgan, 1984) y al estrés salino (Wyn Jones y col., 1977; Greenway y Munns, 1980). Las células deben adaptarse a potenciales hídricos del

exterior bajos manteniendo el volumen y la turgencia, por lo que deben mantener un potencial de solutos bajo. El ajuste osmótico por acumulación de solutos es una respuesta frente al déficit de agua, pero cuando los solutos acumulados son iones inorgánicos, puede existir lesión ocasionada por su interacción con proteínas u otras estructuras macromoleculares (Hochachka y Somero, 1984).

2. Estrés Hídrico

El término "estrés" se define como cualquier factor fisicoquímico o ambiental capaz de producir una lesión permanente en el organismo vivo (Levitt, 1980 a,b), por lo que es importante distinguir entre las respuestas que representan síntomas de lesión o incidentales provocadas por las condiciones de estrés, de las respuestas que son realmente de adaptación, que favorecen el crecimiento continuo durante el estrés o durante su recuperación (Hanson y Hitz, 1982).

2.1. Estrategias de Respuesta al Estrés Hídrico

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación al estrés hídrico y salino, los cuales pueden ser clasificados de manera general en tres niveles: escape, evasión y tolerancia (Levitt, 1972). El mecanismo más complejo involucra la interacción de los productos de muchos genes.

A) ESCAPE

El mecanismo de escape consiste en que el ciclo de vida de las plantas es regulado de manera que éstas sufren pocas veces del estrés hídrico. Para esto, las semillas germinan

rapidamente despues de la lluvia, crecen, se reproducen y dan semillas antes de que el agua se extinga. Asi pueden sobrevivir los periodos de sequia en una forma adecuada

Este mecanismo se basa en asegurar la produccion de la semilla, independientemente de la cantidad de lluvia que exista. El tiempo que transcurre desde que ésta germina hasta que la planta madura es corto y, por lo general, el proceso se lleva a cabo durante el periodo de lluvia.

Las plantas que utilizan este mecanismo deben ser poco dependientes de la cantidad de luz solar, ya que deben ser capaces de desarrollarse durante periodos de lluvia en los cuales puede ser menor la intensidad de la luz (Ludlow y Muchow, 1988).

B) EVASION

La evasión ocurre en plantas que tienen tejidos muy sensibles a la deshidratación, por lo que son capaces de almacenar grandes cantidades de agua lo que evade a los periodos de sequia. Este tipo de mecanismo se puede encontrar en algunas plantas desérticas con metabolismo ácido de las crasuláceas (metabolismo CAM).

Aquí, las plantas desarrollan raíces muy profundas para maximizar la toma de agua (Sheriff y Ludlow 1984, Sheriff y col. 1986). Durante periodos de calor y sequia, los estomas se cierran para reducir el intercambio de gases y, por lo tanto, la pérdida de vapor de agua, ya que son muy sensibles a una disminución del potencial hídrico de las hojas (Ludlow e Ibaraki, 1979; Ludlow y col., 1983; Ludlow y col., 1985). Una vez que se han cerrado los estomas, comienza el movimiento de las hojas, lo que reduce la absorción de radiación solar. Esto tiene como consecuencia una baja de la temperatura de las hojas de 12 a 15 °C, reducciones en las diferencias de presión de vapor y en la pérdida de agua.

C) TOLERANCIA

La tolerancia se lleva a cabo en plantas que tienen tejidos que pueden tolerar la deshidratación de manera limitada. Estas plantas tienen la capacidad de sintetizar osmolitos protectores no tóxicos que permiten retener agua en los tejidos.

El ajuste osmótico contribuye a mantener la turgencia de las células, lo cual permite que se sigan llevando a cabo las actividades celulares normales. Con esto, se mantiene la adquisición de carbono para la síntesis de compuestos orgánicos, por medio de la apertura de los estomas. Tampoco se ve interrumpida la fotosíntesis y, por lo tanto, continúa la expansión de las hojas. También hay aumento en la toma de agua y se mantiene la extensión de las raíces como es el caso del mecanismo de evasión. Sin embargo, si la cantidad de agua absorbida no compensa la pérdida, no se puede evitar la pérdida de agua debido a la continua adquisición de carbono que al consumir agua, provoca deshidratación (Ludlow y col., 1985; Ludlow, 1987b) (Fig. 1).

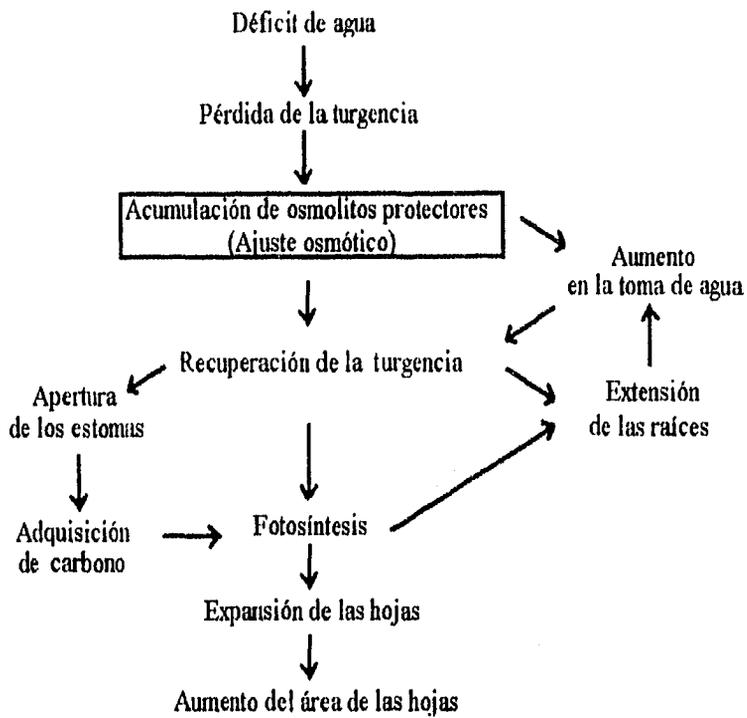


Fig. 1. Efectos del ajuste osmótico durante el déficit de agua.

2.2. Respuestas bioquímicas y moleculares de adaptación al déficit de agua en las plantas.

Se ha observado que una de las respuestas para controlar la pérdida de agua de las plantas es la regulación del intercambio gaseoso entre las hojas y la atmósfera. Esto se lleva a cabo por la apertura o cierre de los estomas, que evitan la pérdida de vapor de agua por transpiración. Generalmente, los estomas no responden hasta que se alcanza un umbral con bajos rangos de potencial hídrico, entre -0.2 y -1.0 MPa (Begg y Turner, 1976; Ludlow, 1980).

Al llevarse a cabo el cierre de los estomas se corre el riesgo de incrementar la temperatura de las hojas cuando éstas mantienen su orientación hacia la luz y cuando la velocidad del viento y la presión de vapor atmosférica se mantienen constantes. Esto es debido a que la radiación que reciben las hojas no puede ser disipada por medio del enfriamiento por evaporación (Ehder y col., 1978; Rawson y col., 1978). La temperatura puede incrementarse entre $5-10$ °C con relación a la temperatura del aire, lo que puede afectar las propiedades cinéticas de las enzimas (Somero y Low, 1976; Teeri, 1980) y provocar lesiones por calor (Berry y Björkman, 1980; Raison y col., 1980; Smillie y Nott, 1979). Por lo tanto, todas las plantas tienen la capacidad, en mayor o menor proporción, de cambiar el ángulo de las hojas durante el estrés para evitar el sobrecalentamiento (Begg, 1980). Estos movimientos minimizan el daño por altas temperaturas y deshidratación (Ludlow y Björkman, 1984; Ludlow, 1987c).

Otra consecuencia del cierre de los estomas es la disminución de la velocidad de la fotosíntesis debido a que se reduce la adquisición de CO_2 (de 40 a 16 mg de CO_2 $\text{dm}^{-2}\text{hr}^{-1}$) por la restricción en el intercambio gaseoso. Sin embargo, en las primeras horas del déficit

crónico de agua, la baja adquisición es compensada por el carbono que proviene del transporte de los fluidos de la planta (floema) (Begg y Turner, 1976, Boyer y McPherson, 1975, Johnson y Moss, 1976, Jurgens y col., 1978, Sung y Krieg, 1979).

A nivel molecular, la pérdida de agua provoca la inducción de genes que dan como resultado productos que protegen las estructuras celulares de los efectos nocivos de la reducción de la cantidad de agua en la célula. Estos genes son llamados genes *lea* y fueron identificados inicialmente como genes que son expresados durante las fases de maduración y desecación del desarrollo de la semilla (Baker y col., 1988). La mayoría de estos compuestos son predominantemente hidrofílicos y se localizan principalmente en el citoplasma. Entre sus funciones está la de secuestrar iones, la protección de otras proteínas o membranas y la renaturalización de proteínas desdobladas (Bray, 1993) (Fig. 2). Una de estas proteínas *lea*, cuya función es secuestrar iones que se acumulan durante la deshidratación celular, tiene una secuencia consenso que se repite al menos 13 veces y que forma una α -hélice anfipática. La cara hidrofóbica es importante para formar un homodímero y la cara externa con carga está involucrada en el secuestro de iones (Dure, 1993). Esto da una idea de la complejidad que pueden tener los diferentes productos de estos genes que se expresan en respuesta al estrés hídrico.

El ajuste osmótico es una respuesta a la pérdida de agua sumamente importante. Este ajuste se logra manteniendo el potencial osmótico durante el déficit de agua. Una reducción en el potencial hídrico celular por debajo del potencial hídrico externo, como resultado de una disminución del potencial osmótico, permite al agua entrar a la célula. El potencial osmótico dentro de la célula es reducido por medio de la acumulación de osmolitos compatibles en el citoplasma.

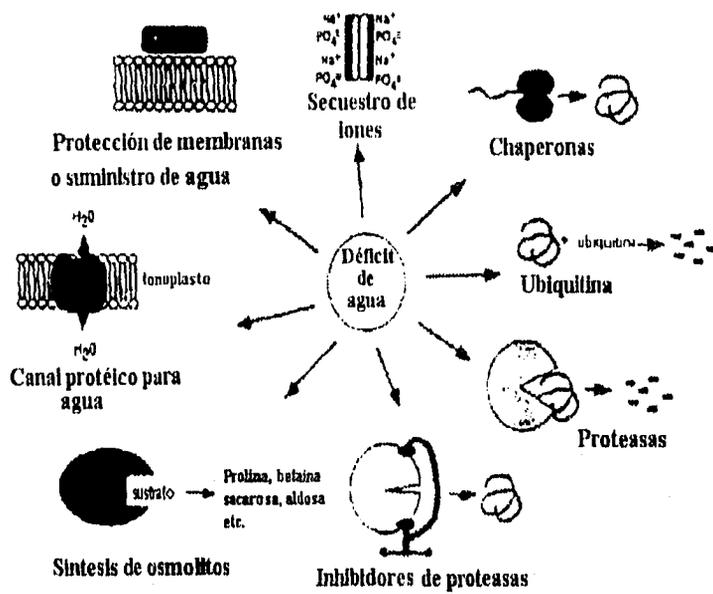


Fig. 2. Probables funciones de los productos de los genes que son inducidos por el déficit de agua. Estos productos son sintetizados para mantener las funciones celulares durante períodos de pérdida de agua cuando hay un ajuste osmótico. Tomado de Bray (1993).

3 Estrés Salino

El estrés salino es provocado por diferentes tipos de sales, siendo la más importante el NaCl, debido a su abundancia en la tierra.

Existe una relación inseparable entre el estrés hídrico y el salino, ya que la adición de sal al agua disminuye el potencial osmótico y, por lo tanto, evita la difusión del agua. De esta manera, cuando una planta es transferida de un medio bajo en sales a uno alto, inmediatamente sufre una deshidratación por ósmosis. Esta deshidratación tiene consecuencias comparables a las observadas con el estrés hídrico. Por ejemplo, la adición de NaCl al medio de crecimiento de plantas de cebada da como resultado un incremento en la actividad de RNAs (Arad y Richmond, 1976). Este incremento constituye una lesión por estrés hídrico, lo que indica que el estrés salino induce una lesión por estrés hídrico (osmótico) secundario (Mercado y col., 1974).

Otros efectos del estrés salino se deben a que las sales pueden penetrar a las células y causar un daño directo. Por ejemplo, el estrés salino puede ocasionar, por la pérdida de agua que conlleva, el cierre de los estomas y por tanto, la reducción de la transpiración. Sin embargo, si la sal puede entrar a las células guarda, puede revertir el gradiente osmótico llevando a una apertura de los estomas y por lo tanto incrementar la transpiración (Sen y Chawan, 1975).

La exposición de una planta a NaCl provoca una clara disminución en el crecimiento de las hojas que suele ser proporcional al potencial osmótico de la solución externa. La reducción de la velocidad de expansión del área de la hoja es una respuesta de corto plazo, ya que se da en el transcurso de un día de exposición a la sal. Este efecto probablemente está gobernado por la respuesta de las raíces al potencial hídrico bajo del suelo, y esta respuesta

se comunica al resto de la planta por medio de reguladores de crecimiento (Munns y Termaat, 1986).

La disminución en el crecimiento debido al estrés salino también se ha explicado por la absorción limitada de iones nutrientes debido a la competencia del NaCl. El efecto de Na^+ en la toma de K^+ es doble. A concentraciones bajas, Na^+ puede incrementar la toma de K^+ , mientras que la disminuye a altas concentraciones (Levitt, 1980b). También los iones cloruro y sulfato tienen un efecto negativo en la toma de nutrientes, causando una disminución en el contenido de fósforo total e inorgánico (Zhukovskaya, 1962).

La lesión provocada directamente por los iones, y no por el estrés osmótico secundario, se debe a efectos tóxicos de la sal directamente sobre la membrana plasmática o, después de atravesar la membrana y llegar al protoplasto, sobre los sistemas bioquímicos y genéticos. Se ha visto que el Cl^- suele ser más tóxico que el Na^+ , ya que llega a matar o lesionar gravemente al arroz (Tagawa e Ishizaka, 1963) y zarzamoras (Ehlig, 1964).

El NaCl reduce la fotosíntesis en algunas plantas, lo que puede tener como consecuencia la disminución de la velocidad de crecimiento. El Na^+ disminuye, en algunas plantas, la velocidad de respiración, lo que altera la síntesis de carbohidratos y la obtención de energía. Sin embargo, se ha observado que en muy pocas plantas se ve afectada la fotofosforilación, por lo que no hay razón para pensar que haya una disminución en la síntesis de ATP. El NaCl disminuye la síntesis de proteínas e incrementa su hidrólisis en muchas plantas, sin embargo, aumenta la síntesis de proteínas relacionadas con la resistencia al estrés y de enzimas involucradas en la síntesis de osmolitos compatibles, así como la síntesis de proteínas encargadas del secuestro de iones. Por otra parte, estos iones interactúan con los ácidos nucleicos y los desestabilizan, aunque también inducen un

aumento en el RNAm de las proteínas que se sintetizan en respuesta al estrés. Finalmente, los iones pueden tener un efecto de activación o de inhibición sobre diferentes tipos de enzimas, por lo cual existe una alteración en la síntesis de metabolitos (Levitt, 1980b; Munns y Termaat, 1986; Weretilnyk y Hanson, 1989, Cayley y col., 1992).

En la figura 3 se resumen los efectos del estrés con Na^+ .

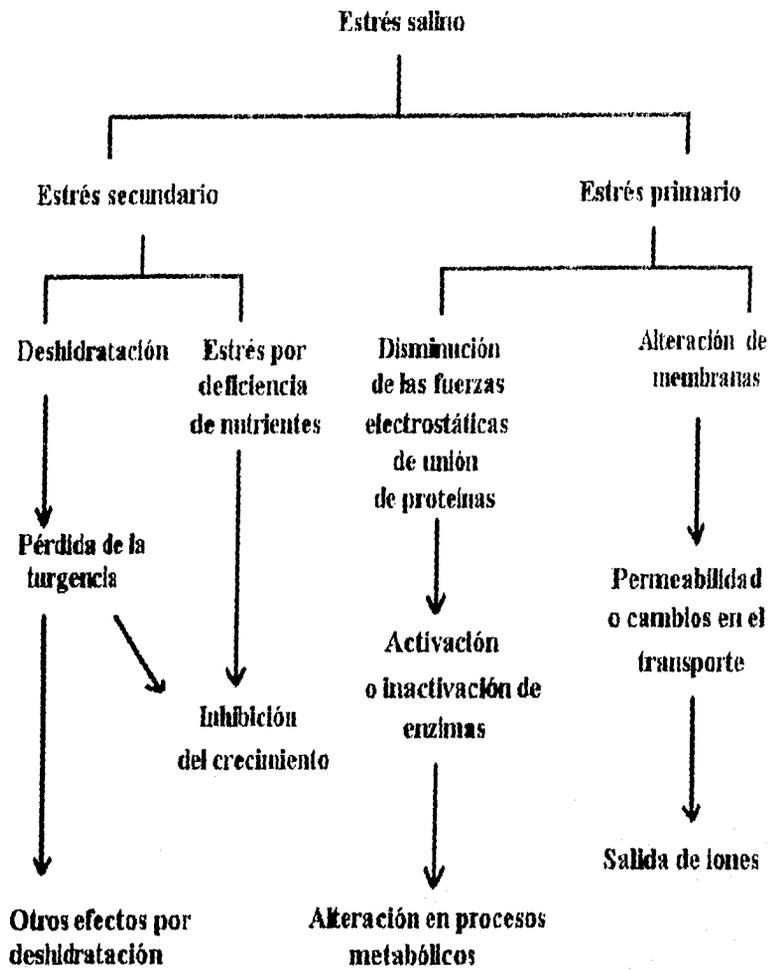


Fig. 3. Posibles efectos del estrés salino.

III. GENERALIDADES

El agua es una sustancia indispensable para cualquier forma de vida ya que presenta características fisicoquímicas especiales. Debido a esto, todos los organismos han desarrollado como respuesta evolutiva, una serie de mecanismos para evitar la pérdida de agua, así como la adaptación a medios que presentan poca cantidad de este líquido. Para mantener el contenido de agua en las células, se acumulan grandes cantidades de solutos en el citoplasma lo que reduce el potencial osmótico. La acumulación de los solutos en el citoplasma debe ser no tóxica, lo cual sólo se cumple a través de algunos compuestos orgánicos neutros. Uno de los más importantes de éstos es la glicina betaina, que se sintetiza por la enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8). En plantas, esta enzima está localizada en el cloroplasto (Fig. 4), donde también se localizan la mayoría de las enzimas responsables de la fotosíntesis.

El flujo de agua del suelo a la atmósfera a través de toda la planta es continuo y se da siguiendo un gradiente de potencial hídrico, moviéndose de un sistema de alta energía libre al de baja energía libre hasta llegar al equilibrio. Esto quiere decir que el agua suele fluir de las zonas de mayor concentración (de agua) a las de menor concentración. Así, se mueve del suelo hacia la atmósfera pasando por el xilema, que es un sistema vascular que transporta agua y solutos a las diferentes partes de la planta (Fig. 4). Cuando la cantidad de agua que es cedida a la atmósfera es mayor que la que se recibe del suelo, la planta empieza a perder agua y sufre de un estrés hídrico.

En la planta, uno de los mecanismos de control de la pérdida de agua es el cierre de los estomas que se localizan en la epidermis y sirven para controlar el intercambio gaseoso entre el tejido de la hoja y la atmósfera. Cada estoma consiste de dos células llamadas

guarda que rodean un orificio en la epidermis (Fig. 4). El tamaño de la apertura entre las células guarda incrementa o disminuye como resultado de cambios en la turgencia de las células guarda. El incremento de la turgencia en estas células conlleva la apertura, debido a que al aumentar el volumen de la célula la pared celular disminuye su grosor, por lo que aumenta el espacio que existe entre ambas células guarda. La disminución de la turgencia produce el fenómeno contrario al descrito. Para evitar que continúe la pérdida de agua, la planta cierra los estomas para disminuir el intercambio gaseoso y, por lo tanto, la pérdida de agua por transpiración.

Para que la planta pueda regular el intercambio gaseoso es necesaria la presencia de algunas hormonas que permitan dar la señal del cierre de los estomas. Una de estas sustancias es el ABA, la cual también tiene otras funciones como la de ser un inductor en la síntesis de proteínas, por lo que pudiera estar relacionado con el aumento de la actividad de las enzimas importantes en la respuesta al estrés osmótico.

Una de las mayores preocupaciones de los países en vías de desarrollo es el de solucionar los problemas de desnutrición con los bajos recursos económicos que se tienen. En México se cuentan con grandes extensiones de tierra de buena calidad para la agricultura, sin embargo no todas las regiones tienen un clima que favorezca los cultivos. Siendo los alimentos de origen vegetal una buena posibilidad para abastecer a la población de alimentos económicos, se empieza a buscar apoyo en la ciencia para poder controlar la acción negativa del clima. Por lo tanto es necesario conocer perfectamente los diferentes mecanismos que estén involucrados en dar resistencia a las plantas a las condiciones ambientales adversas. Así, todos los estudios deben estar enfocados a la posibilidad de realizar ingeniería genética

que permita el mejoramiento de las especies y, por lo tanto, el contar con mejores cultivos para la alimentación y para el simple mejoramiento ecológico y ambiental

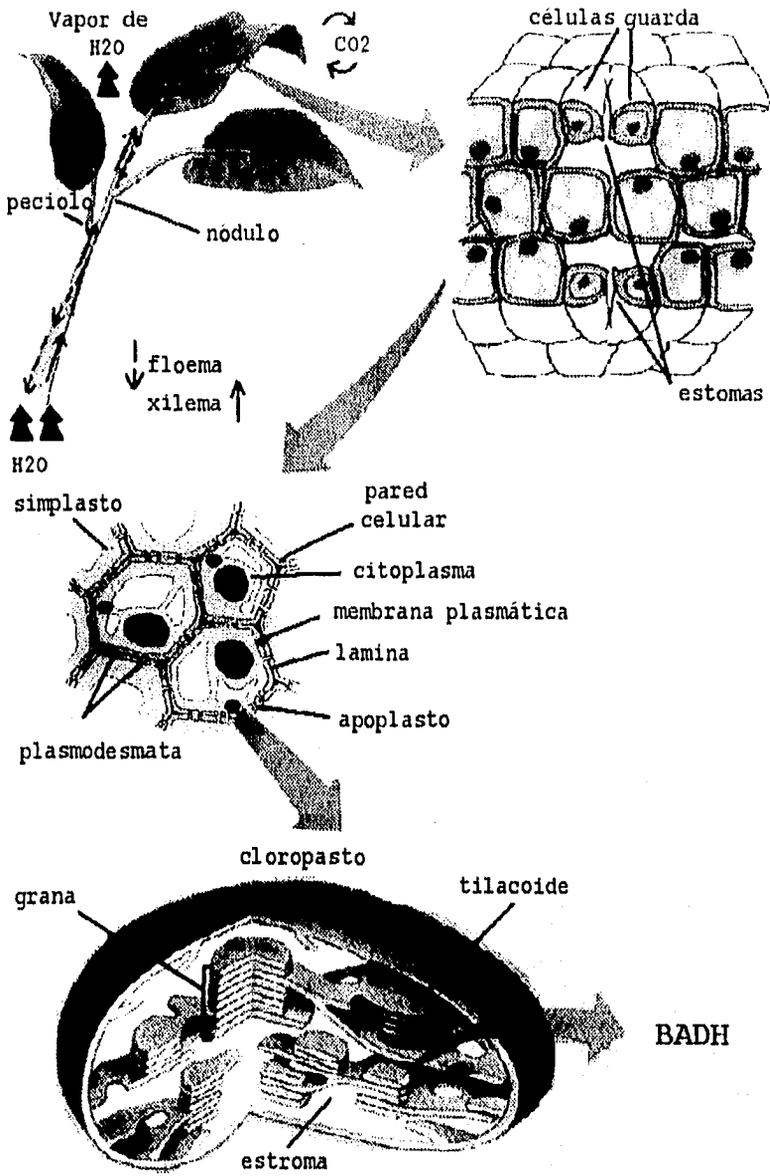
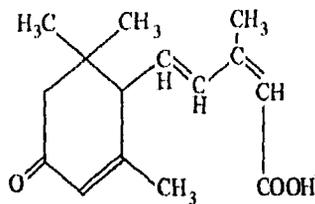


Fig.4. Representación esquemática de una planta

IV. ANTECEDENTES

I. Acido abscisico

En los años 1950's se descubrió que el ácido abscisico (ABA) era una fitohormona que afectaba la abscisión de las hojas (fenómeno de ocurrencia periódica que provoca la separación de las hojas de las plantas) y la latencia de los retoños. El ABA es un sesquiterpeno derivado del mevalonato (Li y Walton, 1987; Zeevaart y Creelman, 1988). El compuesto natural y activo es el isómero D(+). Su fórmula química se muestra a continuación:



El ABA ha sido detectado en gran cantidad de plantas. Tiene un peso molecular de 264.31 g/mol. Normalmente se encuentra en las plantas en concentraciones de 0.01 a 1 ppm (0.0378-3.78 μ M) hasta 4 ppm (15 μ M). Es sensible a la luz y lentamente transformado a trans-ABA por la radiación ultravioleta de la luz solar. Es transportado en los peciolo de algodón a una velocidad de 22.4 mm/h independientemente de la concentración o del tamaño del peciolo (Levitt, 1972).

Debido a que es un sesquiterpeno (por lo tanto isoprenoide), el ABA es sintetizado por la vía biosintética de los carotenoides y está relacionado con el carotenoide de la vitamina A. La 9'-cis-neoxantina es transformada a xantoxina la cual a su vez es oxidada a

ABA-aldehído que es convertida a ABA por la enzima ABA aldehído oxidasa. La luz parece estimular su formación a partir de los productos de la fotooxidación de la xantofila (Parry, 1993).

El ABA es una hormona que está íntimamente ligada a la función de los estomas (Raschke, 1975). Se sabe que para que exista síntesis de ABA inducida por la deshidratación se requiere la transcripción (Guerrero y Mullet, 1986), llevando esto a la acumulación de ABA debido a la pérdida de la turgencia de las células (Creelman y Zeevaart, 1985). Los niveles de ABA se ven incrementados en tejidos sometidos a estrés osmótico por desecación, sal o frío (Henson, 1984, Mohapatra y col., 1988).

Estudios realizados con hormonas animales han demostrado que el mecanismo de acción hormonal tiene dos aspectos principalmente, como son la regulación de la transcripción por la unión de hormonas esteroides a los factores de transcripción (Beato, 1989) y la activación de factores reguladores por medio de segundos mensajeros (Deutsch y col., 1988). Aunque el mecanismo de acción del ABA no se conoce completamente debido a que no se han caracterizado sus receptores, se ha implicado la participación de segundos mensajeros, ya que la respuesta a ABA es dependiente de Ca^{2+} (Napier y col., 1989; Schroeder y Hedrich, 1989).

El ABA actúa en el exterior de las células guardas (Hartung, 1983) provocando la pérdida de K^+ y Cl^- con la consecuente reducción en la turgencia por pérdida de agua por medio de ósmosis y por lo tanto el cierre de los estomas. El ABA debe interactuar con receptores membranales y/o lípidos membranales ocasionando la liberación de trifosfato de inositol (IP_3). Se ha observado en animales que es un importante segundo mensajero (Berridge e Irvine, 1989) y que en plantas superiores puede inducir la liberación de Ca^{2+} de

las vacuolas (Brosnan y Sanders, 1990; Drobak y Ferguson, 1985; Ranjeva y col., 1988; Schumaker y Sze, 1987) El Ca^{2+} puede actuar también como un segundo mensajero provocando la inactivación del canal de internalización de K^+ , sin afectar el canal de externalización (Blatt y col., 1990). Este mecanismo puede también estar relacionado con la producción de segundos mensajeros que permitan la activación de proteínas por fosforilación, en respuesta al estímulo por ABA (Skriver y Mundy, 1990).

Se han diseñado modelos en los que se sugiere que el estrés osmótico se percibe primero por las células como perturbaciones del plasmalema. Esto es ocasionado por la pérdida de la turgencia seguido por un incremento de ABA citosólico y apoplástico debido a la síntesis de novo y/o liberación de la hormona secuestrada en los organelos (Zeevaart y Creelman, 1988). Aunque se puede explicar la liberación de la hormona de los organelos por la presencia de gradientes de iones, el incremento en ABA libre depende de la síntesis genética de novo. Por lo tanto una serie de genes pueden ser inducidos rápidamente por la pérdida de la turgencia, y así regular los niveles de ABA libre en la célula (Guerrero y Mullet, 1986) (Fig. 5).

Trabajos realizados con mutantes de cebada indican que enzimas como aldehído oxidasas pueden controlar la acumulación de ABA en respuesta a estrés hídrico (Walker-Simmons y col., 1989), tras lo cual los niveles acumulados de ABA inducen la expresión de genes específicos llamados genes *rab* (respuesta a ABA) (Skriver y Mundy, 1990). Las proteínas codificadas por los genes *rab* tienen como principal característica una alta hidrofiliicidad y un alto contenido de aminoácidos no cargados e hidroxilados. De esta manera, las proteínas celulares pueden ser estabilizadas durante la deshidratación por medio de las interacciones con las proteínas *rab* (Dure y col., 1989). Uno de los dominios de las

proteínas *rab* que está cargado positivamente, puede unirse a los ácidos nucleicos (Mundy y Chua, 1988). Esta proteína se une a una cadena sencilla de DNA y permanece unida en altas concentraciones de sal. Esto indica que algunos genes dependientes de ABA pueden codificar proteínas que se unen al DNA para regular la transcripción (Skriver y Mundy, 1990).

Lo anterior y otras evidencias demuestran que cambios en los niveles de ABA y en la expresión de genes *rab* incrementan la tolerancia al estrés osmótico, por mecanismos como pueden ser la inducción de la síntesis de osmolitos protectores como prolina y glicina betaina (Rhodes y col., 1986). Aún no está totalmente claro este mecanismo, ya que aunque la aplicación externa de ABA puede inducir la acumulación de prolina y glicina betaina en hojas con turgencia normal, no se alcanzan los mismos niveles que se encuentran en hojas de plantas bajo estrés osmótico que acumulan ABA (Stewart y Voetberg, 1987; Ishitani y col., 1995).

Estudios realizados con mutantes bloqueados en la ruta biosintética de ABA y el uso de ABA exógeno han demostrado que existen 3 vías por las que se lleva a cabo la expresión de genes en respuesta al déficit de agua. Existen genes inducidos por deshidratación que requieren niveles altos de ABA para que se lleve a cabo su expresión, por lo que en ausencia de ABA no existe expresión alguna de estos genes (Cohen y Bray, 1990; Pla y col., 1991; Lang y Palva, 1992). Por otro lado, existen genes que se expresan durante la deshidratación y que no dependen de ABA. Por lo tanto, estos genes no responden al ABA exógeno (Guerrero y col., 1990; Yamaguchi-Shinozaki y col., 1992). Por último, existen una serie de genes que responden al estímulo de ABA, pero no requieren necesariamente de éste último para su expresión. Estos genes son inducidos por ABA exógeno pero también por el déficit

de agua (Gilmour y Thomashow, 1991; Nordin y col., 1991; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993) (Fig 5).

El lugar de mayor almacenamiento de ABA parece ser el cloroplasto y esto es debido a su pH alcalino (Milborow, 1983; Walton, 1980), mientras que su liberación al citoplasma depende de la acidificación del estroma como respuesta al estrés osmótico (Hartung y col., 1981).

El ABA interactúa directamente con la bomba de K^+ / H^+ que se localiza en la membrana plasmática, lo que provoca la inhibición de la salida de protones y el suministro de potasio (Marrè, 1979).

Trabajos realizados en cebada demuestran que la adición de ABA al medio de crecimiento incrementa de manera importante la cantidad de RNAm de la proteína BADH. Sin embargo, este incremento es en menores proporciones cuando la incubación se realiza en presencia de NaCl. Esto indica que debe existir la participación de otro intermediario en esta respuesta. (McCue y Hanson, 1992; Ishitani y col., 1995).

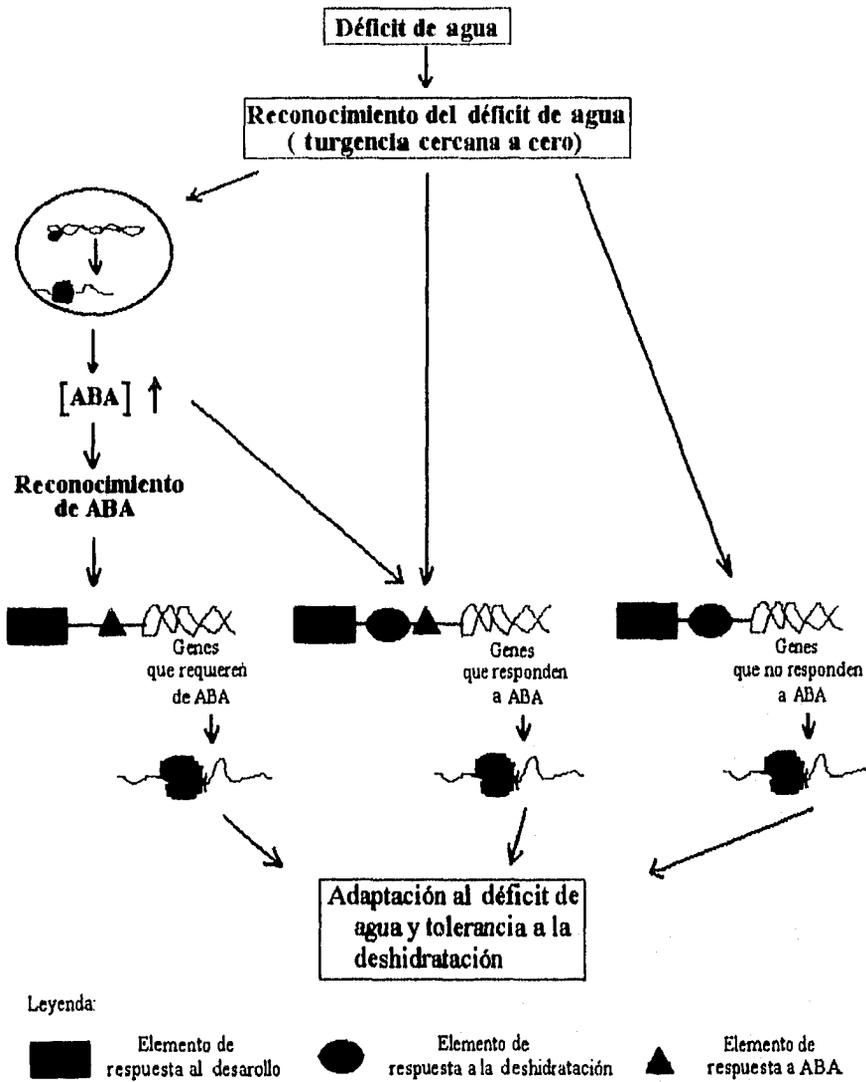


Fig. 5. Vías por las que se lleva a cabo la expresión de genes en respuesta al déficit de agua. Se muestran los genes que requieren de ABA para su expresión, los genes independientes de ABA y los que responden a ABA.

2. Antecedentes del amaranto

El amaranto es una planta muy antigua, su presencia en México data desde el año 4000 A.C. en Tehuacan, Puebla, por lo que es uno de los cultivos para alimento más antiguo que se conoce. Este grano fue un importante nutriente para las civilizaciones azteca, maya e inca. Se usó para preparar un pan especial utilizado en las ceremonias religiosas y por esta razón su cultivo fue prohibido por los españoles cuando llegaron a América (Teutonico y Knorr, 1985).

El amaranto es de importancia agronómica ya que tanto la semilla como la hoja contienen una alta concentración de proteína de alta calidad, superior a la de soya y pescado, debido especialmente a su alto contenido de lisina (Downtown, 1973) y en aminoácidos con azufre (Segura-Nieto y col., 1992). Debido a ello, este cultivo ha recibido considerable atención como un suplemento de cereales y legumbres para evitar la desnutrición proteica (Valdés-Rodríguez y col., 1993).

El amaranto es una planta con metabolismo C-4, mesofítica, no resistente a la sequía pero que muestra un uso de agua muy eficiente (300 g de agua transpirada/ g de materia seca producida), mientras que el trigo y la cebada, que son plantas C-3, tienen un mayor consumo de agua por gramo de materia seca (540 y 520 respectivamente) (Larcher, 1975).

Dado que el amaranto no es resistente a la sequía, no presenta características morfológicas o fisiológicas semejantes a las que se han descrito en plantas resistentes. El amaranto no cuenta con un sistema radicular excepcionalmente grande, no tiene tallos suculentos, no cuenta con hojas pequeñas ni suberizadas, no tiene estomas sumergidos y no tiene vellosidades. Sin embargo, una característica que llama la atención en el amaranto es su

rápida toma de agua para restablecer la turgencia de sus hojas, ésta se lleva a cabo en aproximadamente 20 minutos.

Dado que el amaranto es una dicotiledonea mesofílica, no resistente a sequía, es posible esperar cambios y reajustes en esta planta para adaptarse a la pérdida de agua.

Del Río Portilla (1988) encontró que el amaranto presenta un punto de marchitez permanente de 37% contenido relativo de agua y el punto de daño celular en 42% contenido relativo de agua.

Se ha encontrado en el amaranto que, después de ser sujeto a 6 h de estrés hídrico con una solución de polietilenglicol (PEG), hay un incremento en amonio, glicina betaina y en la actividad de la enzima glutamato sintetasa, mientras que hay una reducción en la cantidad relativa de agua de un 90% a un 70%. Cuando se exponen las plantas a un estrés más prolongado se observa que en un periodo de seis días el contenido relativo de agua disminuye de 90% a 60% acompañado de un incremento en amonio, glicina betaina, prolina y la actividad de la enzima glutamato sintetasa. Se ha sugerido que la estimulación de la fotorrespiración en las etapas tempranas del estrés produce el incremento de amonio para la subsecuente síntesis de glicina betaina (Gamboa y col., 1991).

Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993) lograron la extracción y purificación de la BADH de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. Por otro lado, demostraron que existe un incremento de la actividad de BADH de hojas sometidas a déficit de agua durante 4 hr., que coincide con un aumento de la concentración de glicina betaina, lo cual es un tiempo mucho más corto que el que se había encontrado para otras plantas y parece ser demasiado corto para pensar en la síntesis "de novo" de la proteína BADH.

3. Osmolitos Compatibles

Los solutos osmóticos compatibles son compuestos neutros excluidos de la superficie de las proteínas y de su esfera de hidratación inmediata, que tienden a estabilizar la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas (Wyn Jones y col., 1977; Hochachka y Somero, 1984; Low, 1986). Estos compuestos incluyen aminoácidos como la prolina, sales cuaternarias de amonio como la glicina betaina, polioles como el glicerol, y azúcares como la sacarosa (Low, 1986). Estos solutos también interactúan con membranas estables o proteínas de unión a membranas y están implicados en fenómenos de crioprotección (Schwab y Heber, 1984; Steponkus, 1984).

Una gran cantidad de estudios apoyan la idea de que la acumulación de prolina, glicina betaina y otras sales cuaternarias de amonio puede ser importante en la adaptación de las plantas a ambientes muy secos o salinos (Stewart y Lee, 1974; Stewart y col., 1979; Treichel y col., 1984; Puhlich Jr., 1986) y tienen efectos protectores contra el estrés osmótico (Strom y col., 1983; Le Rudulier y col., 1984; Handa y col., 1986).

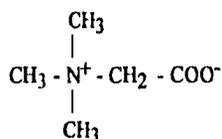
Se ha observado en algas marinas que los alcoholes polihídricos como el glicerol y sorbitol son importantes en el desarrollo de tolerancia a medios salinos (Ginzburg y col., 1983; Gilmour y col., 1984). El sorbitol incrementa la tolerancia térmica en cloroplastos aislados (Seemann y col., 1986).

Así, con la síntesis de osmolitos compatibles no tóxicos para las células, se puede reducir al máximo el daño a proteínas y otras macromoléculas causado por déficit de agua, estrés salino, estrés por altas temperaturas y deshidratación asociada con el congelamiento (Wyn Jones y col., 1977; Steponkus, 1984; Low, 1986). Los solutos compatibles en

plantas generalmente se presentan en cantidades importantes en el citoplasma de las células (Hall y col., 1978; Leigh y col., 1981, Pahllich y col., 1983), ya que de no ser así no serían lo suficientemente efectivos para contrarrestar el estrés osmótico (Wyn Jones y col., 1977). Para esto se requiere que estos solutos sean los principales que se acumulen en el citoplasma y que los solutos tóxicos no compatibles (como iones inorgánicos) sean secuestrados en vacuolas (Hall y col., 1978; Leigh y col., 1981, Pahllich y col., 1983). Además es necesario que los sistemas enzimáticos y las membranas puedan tolerar las altas concentraciones de los solutos compatibles (Wyn Jones y col., 1977).

3.1. Glicina Betaína

La glicina betaína (N,N,N-trimetil glicina) es una sal cuaternaria de amonio por lo que tiene una carga positiva neta. Además contiene un grupo carboxílico que también le da la posibilidad de tener una carga negativa dependiendo de las condiciones de pH del medio en el que se encuentra, por lo que a pH fisiológico la molécula es neutra. Estas cargas eléctricas le confieren a la molécula actividad osmótica que le permite participar en los mecanismos de respuesta al estrés osmótico. Su estructura química es la siguiente:



La glicina betaína es sintetizada por numerosas plantas principalmente las pertenecientes a las familias quenópodos y gramíneas. La capacidad de sintetizar y acumular glicina betaína se asocia con la adaptación a medios salinos, aunque no todas las plantas que

sintetizan este osmolito son halófitas, y no todas las halófitas acumulan glicina betaina (Hitz y Hanson, 1980; Storey y col., 1977; Wyn Jones y Storey, 1981).

Se han encontrado concentraciones de glicina betaina de hasta de 0.3 M (20 veces la concentración de toda la hoja) en cloroplastos aislados de espinacas crecidas bajo estrés salino (Robinson y Jones, 1986; Schropel y col., 1988). Estas concentraciones podrían contribuir significativamente al ajuste osmótico del cloroplasto, facilitando el mantenimiento de su volumen y capacidad fotosintética en bajos potenciales de agua (Robinson y Jones, 1986).

La glicina betaina cumple con los requerimientos necesarios para actuar como un soluto compatible, ya que prácticamente no inhibe la actividad enzimática (Flowers y col., 1978; Wyn Jones y col., 1977) y la traducción del RNAm *in vitro* (Brady y col., 1984; Gibson y col., 1984), comparado con las concentraciones equivalentes de iones inorgánicos.

La glicina betaina protege a las membranas de las raíces de *Beta vulgaris* contra la inestabilidad al calor (Jolivet y col., 1982) y a los tilacoides de espinaca contra el estrés al congelamiento (Coughlan y Heber., 1982). Ofrece protección parcial contra la inhibición que pueden causar el NaCl y KCl a algunas enzimas de plantas superiores (Manetas y col., 1986; Matoh y col., 1988; Pollard y Wyn Jones, 1979; Schwab y Gaff, 1990; Wyn Jones y col., 1977). Por otro lado, se ha observado que la glicina betaina puede influir de manera directa o indirecta en la acumulación de Na^+ en las vacuolas (Wyn Jones, 1980).

La glicina betaina protege a la fosfoenolpiruvato carboxilasa de la inactivación en soluciones diluidas ya que esta enzima parece funcionar en una forma polimérica que se mantiene solo en altas concentraciones de la enzima, por lo que la glicina betaina excluye la esfera de hidratación de la enzima que le permite permanecer en su forma polimérica

(Manetas, 1990; Nikolopoulos y Manetas, 1991; Selinoti y col., 1987) Protege frente a desnaturalización por calor a enzimas de plantas superiores (Laurie y Stewart, 1990; Nash y col., 1982; Nikolopoulos y Manetas, 1991; Paleg y col., 1981; Shomer-Ilan y col., 1991; Smirnoff y Stewart, 1985).

La glicina betaína retarda la pérdida de la actividad fotosintética de cloroplastos aislados (Génard y col., 1991) y protege al fotosistema II de tilacoides de espinaca de los efectos inhibitorios del NaCl, previniendo la disociación de proteínas (Murata y col., 1992; Papageorgiou y col., 1991).

Las concentraciones de glicina betaína que se requieren normalmente para obtener los resultados arriba mencionados suelen ser mayores a 0.5 M, aunque hay casos en los que es suficiente una concentración 10 mM (Génard y col., 1991).

Algunos estudios realizados en *Escherichia coli* (cepa K-12) crecidas en un medio hiperosmótico que contenía 0.5 M de NaCl demostraron que si se agregaba al medio de crecimiento 1 mM de glicina betaína, se incrementaba la velocidad de crecimiento en mayor proporción que si se agregaba prolina, demostrando así que la betaína es más efectiva que la prolina como osmoprotector. La colina, que es convertida a glicina betaína por *E. coli*, tenía un efecto intermedio en la velocidad de crecimiento. La acumulación tanto de prolina como de glicina betaína reducía las cantidades citoplasmáticas de K^+ , glutamato y trehalosa, que son los principales solutos acumulados en ausencia de los osmoprotectores, lo que da como resultado la disminución de las interacciones negativas entre estos solutos y algunas moléculas como el DNA y las proteínas. La acumulación de estos osmoprotectores (glicina betaína y prolina) se acompaña por un incremento alto (del 20 al 50 %) en el volumen de agua citoplasmático por unidad de peso celular seco. Este efecto es mayor para la glicina

betaina que para la prolina (Cayley y col. 1992) Petronini y col (1992) realizaron estudios parecidos utilizando células SV-3T3 crecidas también en medios hiperosmóticos de 250 mM de NaCl (0.5 osM) donde observaban una inhibición de la síntesis general de proteínas celulares y de la velocidad de proliferación celular. La adición de 10-25 mM de glicina betaina al medio de cultivo hiperosmótico prevenía en un 90 % la inhibición de la proliferación. Así mismo, la adición de 25 mM de glicina betaina lograba recuperar en un 50% a 100% la síntesis de proteínas. También se evitaba la pérdida del volumen celular en un 30 %. Higgins y col. (1987 y 1988) observaron que tanto en *E. coli* como en *Salmonella typhimurium* la osmolaridad externa regula la transcripción de genes que codifican para transportadores de alta afinidad para K^+ y glicina betaina y que el mecanismo puede ser activado por una alta concentración de K^+ por medio de una interacción directa con el DNA. Así, se establece que algunos organismos, como *E. coli*, no cuentan con los genes que codifican para los intermediarios de la biosíntesis de la glicina betaina y por lo tanto no son capaces de sintetizarla. Sin embargo, si tienen la capacidad de importarla del exterior y de esta manera puede ejercer su efecto osmoprotector.

Algunos miembros de la familia Chenopodiaceae pueden acumular grandes cantidades de glicina betaina alcanzando valores más altos de 100 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco en las hojas cuando se exponen a estrés salino. También se han encontrado altos niveles de glicina betaina en hojas de especies de distintas familias de dicotiledóneas no relacionadas entre sí. Utilizando la técnica de espectrometría de bombardeo rápido de átomos se encontraron niveles mayores a los arriba mencionados en *Lycium ferocissimum* Miers (Solanaceae), *Helianthus annuus* L. (Asteraceae), *Convolvulus arvensis* L. (Convolvulaceae) y *Amaranthus caudatus* L. (Amaranthaceae), al someter estas plantas a

estrés salino y pueden, además, convertir colina exógena a betaina aldehído y ésta a su vez a glicina betaina. Así mismo, *Nicotiana tabacum* L. y *Lycopersicon lycopersicum* L. (Solanaceae), *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) e *Ipomea purpurea* L. (Convolvulaceae) también contienen glicina betaina pero en niveles mucho menores (0.1-0.5 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco). Se encontró que todas estas especies contenían la enzima BADH, lo que indica que la ruta metabólica de colina \rightarrow betaina aldehído \rightarrow glicina betaina puede haber surgido por descendencia vertical a partir de un ancestro común angiosperma temprano y pudo dispersarse entre las plantas que florecen, aunque no en todos los casos se exprese fuertemente (Fig. 6) (Weretilnyk y col., 1989). En este trabajo proponen que la capacidad para sintetizar glicina betaina está mucho más distribuida que la capacidad para acumularla y, si la capacidad de síntesis de la glicina betaina es común pero su acumulación ocurre sólo en algunas familias o géneros, podría ser que la glicina betaina tuviera otras funciones además de ser un importante osmolito citoplásmico. Podría ser que actuara como un osmolito esencial en alguna célula específica, por lo que su concentración en el tejido en general se mantendría baja, o que funcionara como un donador de metilos, como sucede en el hígado de los mamíferos (Skiba y col., 1982).

Las familias de dicotiledóneas en las que se ha reportado acumulación de glicina betaina son: Chenopodiaceae, Amaranthaceae y Portulacaceae (Caryophyllales); Malvaceae (Malvales); Convolvulaceae y Cuscutaceae (Polemoniales); Solanaceae (Scrophulariales); Avicenniaceae (Lamiales); Asteraceae (Asterales); Compositae; Plumbaginaceae; Gramineae; Leguminaceae (Weretilnyk y col., 1989) (Fig. 6).

La determinación cuantitativa de la glicina betaina se ha realizado por diferentes métodos como espectrometría de bombardeo atómico rápido (Cotter y col., 1982),

fragmentación por fisión y desorción con laser (Schueler y Krueger, 1979), ionización térmica (Glish y Smith, 1983), desorción de campo (Brent y col., 1973; Lehmann y col., 1978; Sano y col., 1982), ionización química por exposición directa (Cotter y col., 1982) y espectrometría secundaria de masa iónica (Day y col., 1979; Unger y col., 1981). El primero de ellos, la espectrometría de bombardeo atómico rápido, presenta una alta sensibilidad, siendo el límite más bajo de detección para el n-propil éster de la glicina betaina de 0.05 nanomoles por microlitro de glicerol. La betaina aldehído puede ser derivada al di-n-butil o di-n-propil acetal que puede ser detectado en una concentración de hasta 5 y 10 picomoles por microlitro de glicerol, respectivamente (Rhodes y col., 1987).

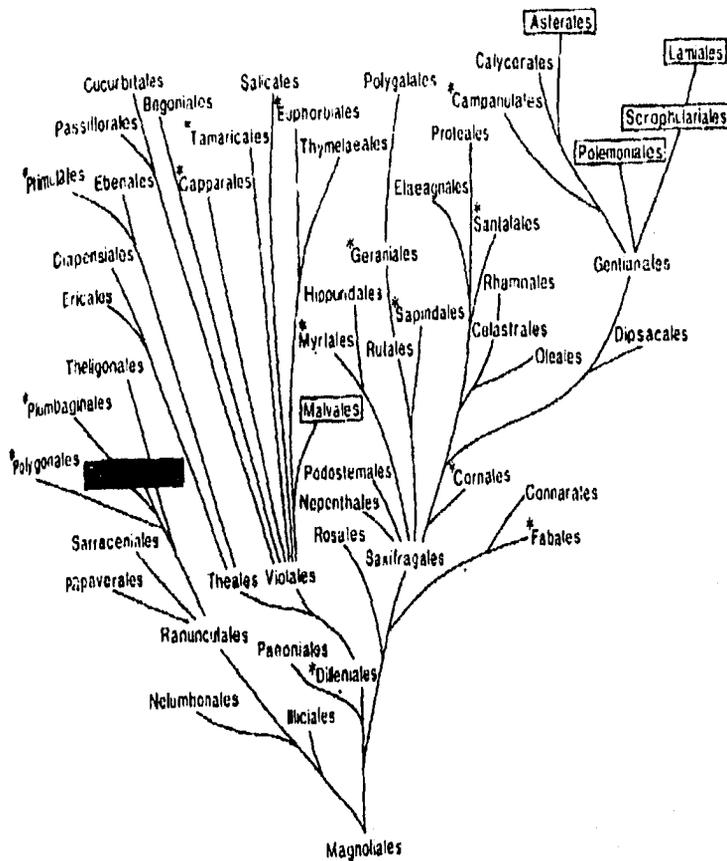


Fig. 6. Arbol filogenético de los órdenes de dicotiledóneas de acuerdo a Takhtajan (1969). En los cuadros se muestran los órdenes que presentan familias que acumulan glicina betaína. El amaranto pertenece al orden de las Caryophyllales, que se muestra en el cuadro sombreado. Los asteriscos denotan 14 órdenes en los que no se ha encontrado alguna especie que acumule glicina betaína, aunque no se han estudiado todas las especies de cada orden. Tomado de Weretilnyk y col. (1989).

3.1.1. Biosíntesis de la glicina betaina

La síntesis de glicina betaina parece ser diferente en quenópodos y en gramíneas. Los estudios realizados con C^{14} en cebada, remolacha, espinaca, microorganismos y en células de hígado de mamíferos, indican 3 rutas principales de síntesis de glicina betaina. una con la participación de intermediarios fosforilados, otra que involucra intermediarios fosfatídilicos y la última en la que no participan intermediarios fosforilados. En cebada, microorganismos y células de hígado de mamíferos la fosfatidilcolina es el precursor en la síntesis de glicina betaina (Hitz y col., 1981). En espinaca (Coughlan y Wyn Jones, 1982) la síntesis de glicina betaina se lleva a cabo sin la participación de intermediarios fosforilados (etanolanina → monometiletanolamina → dimetiletanolamina → colina → betaina aldehído → glicina betaina) (Fig.7).

En la remolacha sí participan intermediarios fosforilados (etanolanina → fosforiletanolamina → fosforilmonometiletanolamina → fosforildimetiletanolamina → fosforilcolina → colina → betaina aldehído → glicina betaina) (Hanson y Rhodes, 1983) (Fig. 8), por lo que es probable que la síntesis de glicina betaina tenga varias rutas metabólicas, llevándose a cabo de preferencia la que utiliza intermediarios solubles.

Así, la fosforilcolina que es oxidada a betaina aldehído y posteriormente a glicina betaina proviene de serina fotorespiratoria, en las quenopodiáceas (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 fosforilcolina y/o de la fosfatidilcolina hasta glicina betaina se lleva a cabo en el cloroplasto (Hanson y Scott, 1980) y es influenciada por la luz (Weigel y col., 1986). De ahí, la glicina betaina es exportada al citoplasma donde se acumula.

El donador de los metilos para la síntesis de la colina parece ser S-adenosilmetionina (SAM) cuando la colina es producto de intermediarios fosfatidílicos (Livesey, 1984; Giovanelli y col., 1985). Para los intermediarios fosforilados, el grupo donador de metilos parece ser el metiltetrahidrofolato, que se obtiene por reducción del formiltetrahidrofolato (Bowman y Rohringer, 1970).

Mudd y Datko (1986) sugirieron que la vía más importante de síntesis de fosfatidilcolina en plantas superiores es a partir de fosforilcolina vía CDP-colina, aunque también se lleva a cabo vía intermediarios fosfatidílicos (Fig. 8).

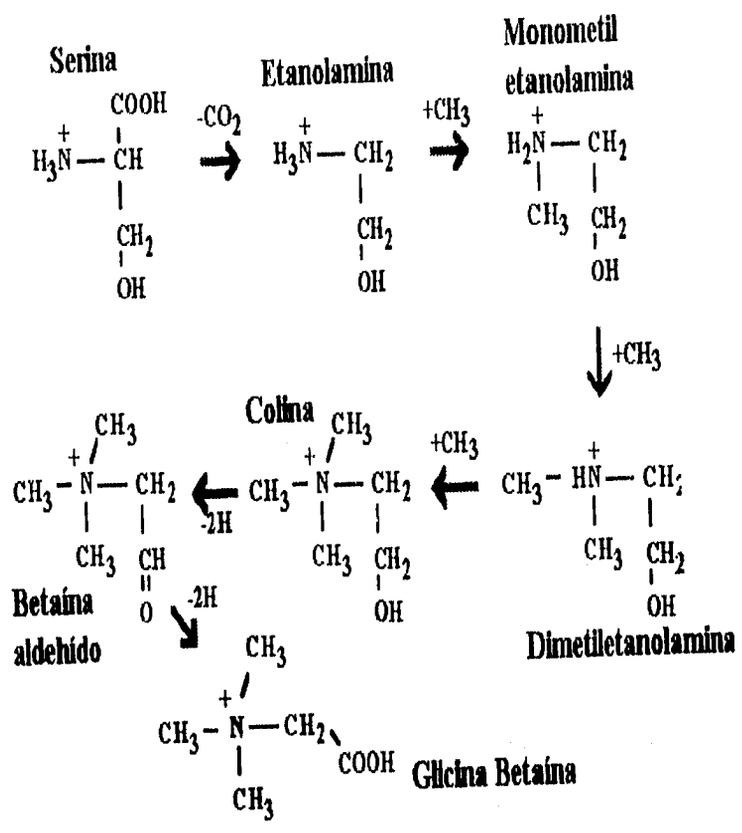


Fig. 7. Síntesis de glicina betaina sin la participación de grupos fosforitados. Se muestran todos los intermediarios representados con sus fórmulas químicas. Esta vía de síntesis de glicina betaina se demostró en espinaca (Coughlan y Wyn Jones, 1982).

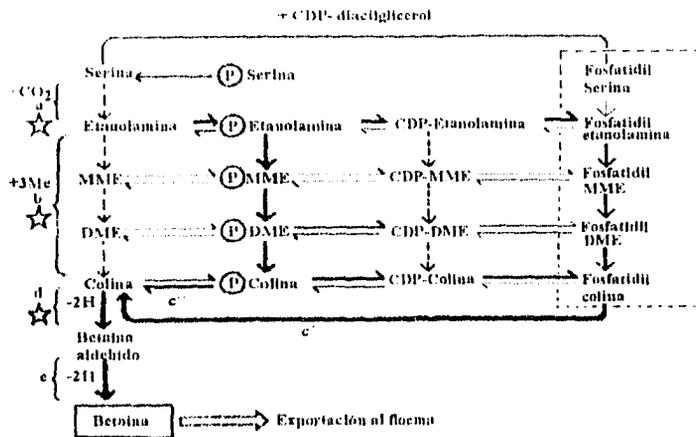


Fig. 8. Posibles rutas metabólicas para la síntesis de glicina betaina en plantas. Las flechas gruesas demuestran los resultados obtenidos en estudios isotópicos en cebada y/o remolacha. Las flechas delgadas denotan otros pasos que posiblemente se lleven a cabo en plantas, basados en evidencias isotópicas o enzimáticas. Las flechas discontinuas identifican rutas hipotéticas para las cuales hay pocas evidencias. Las estrellas muestran posibles puntos de control. (a) Descarboxilación de la serina por la fosfatidilserina descarboxilasa detectada en espinaca (Kates y Marshall, 1975). (b) Metilación de etanolamina por la fosfolípido metil transferasa (PMT) que utiliza S-adenosilmetionina como donador de metilos; PMT I convierte la fosfatidiletanolamina a fosfatidilmonometiletanolamina (fosfatidil MME). PMT II cataliza las dos metilaciones en dos pasos de fosfatidil MME pasando por fosfatidildimetiletanolamina (fosfatidil DME) a fosfatidilcolina (Hirata y Axelrod, 1980; Kates y Marshall, 1975; Wächter y Lester, 1973). (c) Hidrólisis de fosfatidilcolina por la fosfolipasa D (Roughan y Slack, 1976). (c') Hidrólisis de la fosforilcolina por la fosforilcolina fosfatasa (Tanaka y col., 1966). (d) Oxidación de la colina a betaina aldehído por la colina monooxigenasa (Brouquisse y col. 1989). (e) Último paso de la síntesis de glicina betaina con la oxidación de la betaina aldehído catalizada por la betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) (Pan y col., 1981). Tomado de Hanson y Hitz (1982).

4. Betaina aldehído deshidrogenasa (BADH)

4.1. Reacción catalizada y propiedades cinéticas de la enzima BADH

La glicina betaina se produce por una oxidación en dos pasos de la colina pasando por betaina aldehído (BA). En plantas, el primer paso es catalizado por la colina monooxigenasa (CMO) y el segundo por la betaina aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8), siendo este último irreversible. Las dos enzimas están localizadas en el estroma del cloroplasto (Brouquisse y col., 1989; Weretilnyk y Hanson 1989).

La reacción catalizada por la BADH es la siguiente (Hanson y col., 1985)



En plantas, la BADH es altamente específica para betaina aldehído (Nagasawa y col., 1976; Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa y col., 1990), que puede ser un inhibidor a altas concentraciones. Probablemente esta inhibición no tenga relevancia a nivel fisiológico, ya que es poco probable que se alcancen concentraciones tan altas de BA en el cloroplasto como para causar esta inhibición (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). La enzima de plantas (Weretilnyk y Hanson, 1989; Pan y col., 1981) y de bacterias (Nagasawa y col., 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori y col., 1992) puede usar como cofactor tanto NAD^+ como NADP^+ siendo más afín al primero cuando se trata de la de plantas (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

La enzima de amaranto es ligeramente activada por K^+ cuando las concentraciones de sustratos son altas, pero de manera significativa cuando las concentraciones de sustratos son bajas (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Esto podría tener significado fisiológico, ya que bajo condiciones de estrés el cloroplasto acumula altas concentraciones de K^+ (Hanson y Hitz, 1982; Schröppel-Meier y Kaiser, 1988), por lo que este ion podría

jugar un papel en la regulación de la actividad de la enzima. De igual manera, prolina y sacarosa son activadores de esta enzima, y como en el caso del K^+ , la activación depende de las concentraciones de sustrato presentes en el ensayo. Se ha reportado previamente que bajo condiciones de estrés hídrico las hojas de amaranto acumulan prolina (Gambao y col., 1991).

4.2. Mecanismo de reacción de la BADH

En las diferentes betaína aldehído deshidrogenasas conocidas existe un residuo de cisteína muy conservado (Weretilnyk y Hanson, 1990; Boyd y col., 1991; McCue y Hanson, 1992), el cual es un candidato idóneo para estar en el sitio activo de la BADH. Igualmente en todas las ALDHs se ha encontrado una cisteína esencial para la actividad (Feldman y Weiner, 1972; Dickinson, 1989; Hempel y col., 1993), la cual se ha propuesto que está involucrada en la catálisis formando un tiohemiacetal intermediario con el aldehído (Jakoby, 1963). Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993) realizaron estudios con DTNB, un reactivo específico para grupos sulfhidrilos, demostrando que este compuesto inactivaba a la enzima, por lo que se concluyó que la BADH de hojas de amaranto tiene residuos de cisteína esenciales para la actividad. Aún más, el efecto protector de ambos nucleótidos solos y en combinación con el otro sustrato o producto apoyan la posibilidad de que estos grupos sulfhidrilo estén en/o cerca del sitio activo.

A partir de cDNA se dedujo la secuencia aminoácida de la enzima de hoja de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1989), de *E. coli* (Boyd y col., 1991) y de betabel (McCue y Hanson, 1992). Se encontró una región de diez aminoácidos altamente conservada, Val-Thr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Lys-Ser-Pro, así como también un residuo de cisteína localizado a 34

residuos del decapeptido (Weretilnyk y Hanson, 1990), por lo cual se postula que estos residuos forman parte del sitio activo de esta proteína.

En base a estudios cinéticos, Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993) han propuesto un mecanismo de reacción para la BADH de amaranto en el que dos grupos pueden estar involucrados en una catálisis ácido-base general. uno protonado, que será el encargado de la protonación del oxígeno del grupo carbonilo y otro no protonado que será el que promueva la desprotonación del H₂O catalítica. De esta manera, el protonado podría ser el grupo sulfhidrilo que formaría el tiohemiacetal intermediario. El NADH es el primer producto en ser producido en la reacción, lo que da como resultado la formación del tioacetal que es atacado por una molécula de agua para permitir la formación del producto glicina betaina. Este último es liberado en primer lugar y después se libera el NADH. El grupo sulfhidrilo quedaría desprotonado, hasta que la misma acidez del medio promoviera la protonación para regenerar la forma inicial de la enzima (Fig. 9).

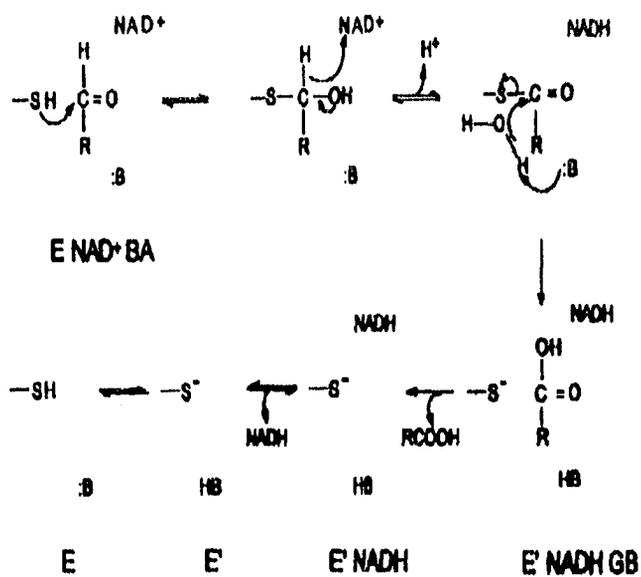


Fig. 9. Mecanismo de reacción propuesto por Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993), para la BADH de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. B es betaina aldehído. HIB es glicina betaina. E es la enzima BADH. E' es la enzima con el grupo sulfhidrilo desprotonado.

4.3. Propiedades moleculares

La BADH de plantas es un homodímero, compuesto de dos subunidades derivadas de un mismo gen nuclear (Weretilnyk y col., 1988). En esto difiere de la BADH de microorganismos, ya que en estos últimos la enzima es tetramérica en su forma activa (Mori y col., 1980; Falkenberg y Strom, 1990; Mori y col., 1992).

En espinaca se ha observado una isoenzima citosólica cuya actividad representa aproximadamente el 10-15% de la actividad total de la BADH de las hojas. (Weretilnyk y col., 1988; Weigel y col., 1986). La BADH cloroplástica que es codificada por un solo gen nuclear, tiene dos alelos designados S (Slow-lento) y F (Fast-rápido). Los productos de estos alelos pueden hibridizar para dar como resultado tanto homodímeros como heterodímeros. Estos se pueden distinguir por su desplazamiento electroforético. Las bandas correspondientes a los homodímeros SS y FF aparecen en diferente posición en el gel nativo, mientras que el heterodímero SF (ó H de híbrido) se observa como tres bandas en el gel nativo. El alelo S es el más común dentro de las muestras de espinaca que se analizaron. El corrimiento en electroforesis SDS y nativa muestra que los homodímeros SS y FF difieren en carga, pero no en peso molecular (Fig. 10) (Weretilnyk y Hanson, 1988).

La BADH de amaranto tiene una masa molecular de 125 kDa y cada subunidad tiene una masa molecular de 64 kDa (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

En 1991 Boyd y col. lograron la clonación de una región de 1476 nucleótidos del genoma de *E. coli* que codificaba para un polipéptido de 490 o 491 aminoácidos que presentaba actividad de BADH. Esta secuencia primaria presentaba una homología de 39-43 % con una aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) encontrada en mamíferos, y era aún mayor (75-77%) cuando se tomaban en cuenta las regiones conservadas. También se observó una

homología alta con la BADH de espinaca, siendo de 38 % y 80 % respectivamente (Tabla 1). Esto sugiere que puede existir un ancestro común para las enzimas BADH y ALDH considerando la divergencia de procariotes a eucariotes. La secuencia primaria de la BADH de remolacha consta de 500 aminoácidos con un 83 % de identidad con la BADH de espinaca (McCue y Hanson, 1992). Esto demuestra la cercanía genética que presentan las plantas, por lo que el funcionamiento de la BADH de las diferentes plantas debe ser muy parecido.

Debido a la gran importancia que presenta la acumulación de glicina betaina en la resistencia a estrés osmótico se ha intentado realizar ingeniería genética, introduciendo el gen que codifica para la BADH al tabaco (*Nicotiana tabacum* L). De esta manera se observó que una planta que no acumula glicina betaina en condiciones normales, puede ser transformada y expresar el gen para la BADH. En estos estudios se observó que las células de la planta podían transportar betaína aldehído a través de la membrana citoplasmática y del cloroplasto, pero al acumularse este compuesto terminaba siendo tóxico para las células, sin embargo, se inducía la expresión del gen de la BADH y se lograba la transformación de la betaína aldehído a la glicina betaina. También se ha observado que esta planta puede ser transformada con el gen que codifica para la colina monooxigenasa, y por lo tanto no es necesario administrar de manera exógena la betaína aldehído, ya que la planta es capaz de sintetizarla por sí sola (Rathinasabapathi y col., 1994; Ishitani y col., 1995). Estos experimentos han sido muy importantes ya que demuestran que es posible realizar ingeniería genética para lograr una mejor adaptación de algunas plantas a medios deficientes en agua.

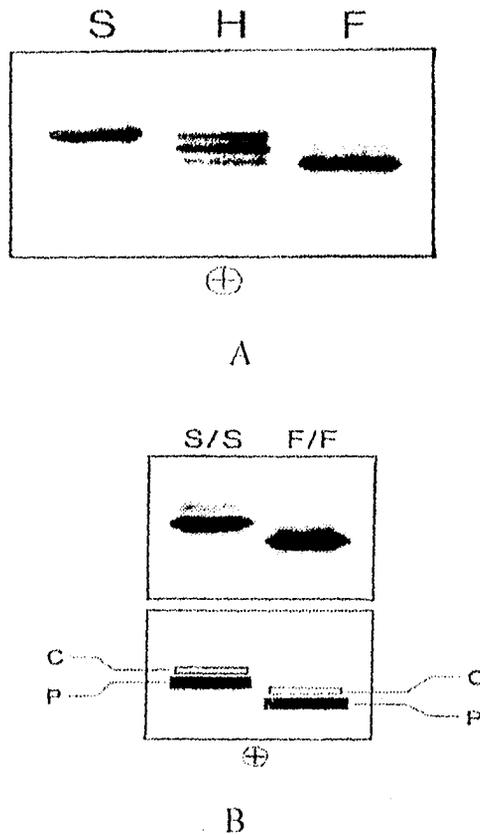


Fig. 10. (A) Electroforesis nativa de la BADH codificada por los diferentes alelos. S es la BADH producto del alelo denominado S (slow), H es el híbrido producto de ambos alelos (heterocigoto) y F es el producto del alelo F (fast) (B) Electroforesis nativa de la BADH de los homodímeros S (S/S) y F (F/F). La banda gruesa corresponde a la isoenzima cloroplástica (P), mientras que la banda difusa corresponde a la isoenzima citoplásmica (C). Para todos los casos que se muestran se utilizó la BADH extraída de hojas de espinaca. Tomado de Weretilnyk y Hanson (1988).

Tabla 1. Porcentajes de homología entre la secuencia protéica de la BADH de *E. coli* y otras secuencias protéicas.

Proteína	% de aminoácidos idénticos ^b	% de aminoácidos sinónimos ^b	% total de aminoácidos ^{c *}	Tamaño del gen (# de amino-ácidos)	Referencia
BADH de Espinaca	38	42	80	497	Weretilnyk y Hanson, 1990
ALDH-2 de Humano	41.8	35.3	77.1	500	Hsu y col., 1988
ALDH-2 de Rata	42	35.1	77.1	500	Farrés y col., 1989
ALDH-2 de Caballo	43.1	33.9	76.9	500	Johansson y col., 1988
ALDH-1 de Rata	39.2	37.3	76.9	500	Dunn y col., 1989
ALDH-1 de Caballo	40.6	35.5	76.1	500	Johansson y col., 1988
ALDH-1 de Humano	39.2	36.9	76.1	500	Johansson y col., 1988
ALDH de <i>Aspergillus nidulans</i>	38.8	37.3	76.1	497	Pickett y col., 1987
ALDH-2 de Bovino	43.5	31.9	75.5	500	Farrés y col., 1989
ALDH de <i>Pseudomonas oleovorans</i>	25.5	37.1	62.7	483	Kok y col., 1989
ALDH-3 de Tumor de Rata	24.9	37.8	62.7	452	Jones y col., 1988

Comparaciones realizadas con programas de computación para predicciones de estructuras secundarias. Comparación de la secuencia primaria aminoacídica de la BADH de *E. coli* con la BADH de espinaca y otras aldehído deshidrogenasas. ^b Para calcular el % de aminoácidos idénticos se utilizaron las alineaciones sobre los 491 aminoácidos totales de la BADH de *E. coli*. ^c Es la suma de las dos columnas anteriores (Boyd y col. 1991).

* Se presentan en orden decreciente de acuerdo a su porcentaje de homología.

Es posible que las aldehído deshidrogenasas evolucionaron a partir de la BADH debido al parecido protéico que presentan entre sí, lo que señala la gran importancia de la enzima original.

4.4. Regulación

Esta enzima parece ser la responsable de uno de los puntos de control y regulación en la síntesis de glicina betaina inducida por el estrés osmótico, ya que se ha observado en espinaca que la actividad de esta enzima se triplica en respuesta a medios salinos (Weigel y col., 1986; Pan, 1983). También se ha demostrado que en las hojas de amaranto, la concentración de glicina betaina se incrementa de 3 a 4 veces bajo el estrés hídrico, así como la actividad de la BADH en las mismas proporciones (Valenzuela y Muñoz-Clares, 1993). Así, el estudio de la BADH toma gran importancia para poder entender los mecanismos que se llevan a cabo como respuestas al déficit de agua y al estrés salino.

En espinaca, el incremento de la actividad de BADH producido por estrés salino es debido a un incremento en la proteína BADH (Weretilnyk y Hanson, 1989). Se ha observado que los niveles de RNAm en las hojas se incrementa hasta cuatro veces cuando las plantas se colocan en un estrés salino gradual (algunos días) (Weretilnyk y Hanson, 1990; McCue y Hanson, 1992).

Se ha observado en cebada que el aumento de la actividad de BADH en respuesta a un medio salino (200 mM NaCl) durante varios días (de 1 a 7 días) se debe a un aumento en la cantidad de proteína BADH. El aumento de proteína BADH se detiene e incluso disminuye su concentración cuando las plantas son liberadas del estrés salino. También se observa una inducción de la síntesis de proteína BADH por estrés hídrico como es la adición de PEG 6000. La proteína BADH puede encontrarse en raíces, hojas que se exponen a la luz y en hojas que se mantienen en la oscuridad, sin embargo, no se observa un aumento de la proteína BADH cuando las hojas están en la oscuridad. Esto quiere decir que la síntesis de la proteína BADH y de glicina betaina no tiene un requerimiento absoluto por la luz, pero la

inducción de la proteína BADH en hojas de cebada bajo estrés salino tiene un requerimiento directo o indirecto por la luz (Arakawa y col., 1992). Lo anterior fue corroborado por Ishitani y col. (1995) al observar el aumento de los niveles de RNAm de la BADH en hojas y raíces de plantas de cebada crecidas bajo estrés salino y que estos niveles disminuían cuando se liberaban del estrés. Los transcritos también se acumulaban en respuesta a estrés hídrico. La adición de ácido abscísico (ABA) durante el crecimiento de las plantas también incrementaba los niveles de RNAm de la BADH aunque esta respuesta era más lenta cuando se comparó con las de estrés salino. Con estos hallazgos se demostró que el ABA sólo podría tener una participación indirecta en la inducción del RNAm de la BADH, por lo que deben existir otras señales para la transcripción de este gen. Por otro lado, es posible que las señales provengan de las raíces, ya que la cantidad de RNAm acumulado en hojas estresadas sin la presencia de las raíces es menor que en las plantas completas (Ishitani y col., 1995). Resultados similares se han observado en remolacha dulce (McCue y Hanson, 1992).

El cloruro de sodio podría también actuar como una señal; sin embargo, si se colocan células de hojas de remolacha en una solución con NaCl 100 mM, que es la concentración apoplástica esperada para una concentración de 500 mM de NaCl en el medio de crecimiento de la planta completa, la cantidad de RNAm de la BADH no sólo no aumenta, sino que incluso disminuye, por lo que el NaCl tampoco parece ser una señal para la inducción del gen de la BADH (McCue y Hanson, 1992).

Un efecto importante en la traducción del RNAm es el tiempo en que se mantienen los niveles de este RNAm en la célula. Debido a que se pueden observar incrementos muy lentos en la cantidad de RNAm después de un estrés salino, pero una disminución muy

rápida después de la liberación del estrés, se concluye que la estabilidad del RNAm es un importante punto de control en la síntesis de la proteína BADH (McCue y Hanson, 1992)

Como ya se mencionó, Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993) lograron la extracción y purificación de la BADH de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. y demostraron que existe un incremento de la actividad de BADH de hojas sometidas a déficit de agua en tan solo 2 hr después de haber comenzado el estrés hídrico, lo que es un tiempo demasiado corto para pensar en una síntesis "*de novo*" de la proteína. Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió investigar si este aumento de la actividad se debe a una síntesis "*de novo*" de la proteína BADH o a la activación de la preexistente, así como la posible participación del ABA como mediador de esta respuesta. Para lograr lo anterior, se purificó la proteína BADH para la obtención de anticuerpos policlonales con los que se estudió la variación de la cantidad de proteína BADH por la técnica de Western blot.

V. OBJETIVOS

1. Objetivos Generales

Estudiar el efecto del estrés osmótico provocado por el PEG y el NaCl sobre la actividad y la cantidad relativa de proteína de BADH de hojas de amaranto e investigar el posible papel mediador del ABA en este efecto.

2. Objetivos Particulares

- 1) Purificación de la proteína BADH mediante cromatografía de exclusión molecular, de intercambio iónico y de afinidad.
- 2) Identificación de la BADH por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes.
- 3) Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína BADH purificada.
- 4) Caracterización de los anticuerpos anti-BADH obtenidos.
- 5) Determinación de la cantidad relativa de proteína BADH en extractos de hojas controles y sometidas a los diferentes tratamientos con PEG, NaCl y ABA.
- 6) Correlacionar la cantidad de proteína BADH con la actividad de esta enzima determinada en los mismos extractos de hojas control y tratadas.

VI. MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico

Hojas de *A. hypochondriacus* L., cultivada en invernadero de 6-12 semanas de edad. Conejo New Zealand. Suero anti-BADH.

2. Equipo, Material, Reactivos y Preparación de Soluciones.

Se presentan en el Apéndice.

3. Metodología

3.1. Extracción y purificación de BADH de hojas de amaranto

Las hojas de *A. hypochondriacus* L. se obtuvieron de plantas de más de 12 semanas de edad. Las hojas se colocaron a la luz del sol durante 5 h con el fin de someterlas a un déficit de agua.

Se homogeneizaron 200 g de hojas estresadas en un mortero con arena usando un amortiguador de pirofosfato de potasio 100 mM, pH 8.5, EDTA 1 mM, 10% (v/v) glicerol y β -mercaptoetanol 10 mM (amortiguador A). El homogeneizado se filtró a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a 110,000 x g durante 30 min. Se agregó sulfato de amonio sólido para obtener 35% de saturación. Se dejó por 30 min en agitación manteniendo el pH en 8.5. Se centrifugó a 27,000 x g por 30 min. El sobrenadante se llevó a 70 % de saturación con sulfato de amonio y se repitió el paso anterior. El precipitado protéico se resuspendió en 10 ml de un amortiguador de fosfatos 25 mM, pH 7.8, conteniendo EDTA 1 mM, 10% (v/v) glicerol y β -mercaptoetanol 10 mM (amortiguador B), tras lo cual se desaló por filtración en gel en una columna de Sephadex G-25 que fue equilibrada y eluida con el mismo amortiguador de resuspensión. La solución se aplicó a una columna de sefarosa Q de flujo rápido (Pharmacia) de 15 ml de volumen de gel, equilibrada con el amortiguador B. Se lavó

la columna con este amortiguador un flujo de 0.7 ml/min durante 3 hr. A continuación se eluyó la enzima con un gradiente lineal de 50-300 mM de cloruro de potasio en el amortiguador B y a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones que contenían actividad se reunieron y se precipitaron con sulfato de amonio al 70 %. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible (2 ml) de un amortiguador fosfato de potasio 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, 10% (v/v) glicerol y β -mercaptoetanol 10 mM (amortiguador C).

Después de desalar en una columna Sephadex G-25 (Pharmacia) equilibrada con amortiguador C, se aplicó la preparación enzimática a una columna de hidroxilapatita (10 ml volumen de gel) equilibrada con amortiguador C, que se corrió a un flujo de 0.5 ml/min. Se lavó la columna con el mismo amortiguador conteniendo fosfatos de 25 mM. La elución se comenzó cuando la absorbancia a 280 nm fue menor a 0.1. Se utilizó para eluir un gradiente lineal de concentración de 25-250 mM de fosfatos, tomando fracciones cada 3 minutos. Las fracciones con actividad se colocaron en una bolsa de diálisis para concentrar en sacarosa, durante toda la noche, tras lo cual se desalaron para quitar la sacarosa siguiendo el método de Penefski (1977). La preparación así obtenida se aplicó a una columna de 5'-AMP-Sefarosa (1 ml de volumen de gel) que fue equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio 25 mM, pH 5.5, EDTA 1 mM, 10 % (v/v) glicerol y β -mercaptoetanol 10 mM (amortiguador D). Al terminar de lavar, esta columna se eluyó con el amortiguador D conteniendo NAD^+ 1 mM y a pH 7. Se reunieron las fracciones que presentaron actividad y se guardó la alícuota a -70 °C en solución concentrada de sacarosa.

Todos los pasos de la purificación se realizaron a 4 °C.

3.2. Ensayo de la actividad enzimática

La oxidación de la betaina aldehído por la BADH y el NAD^+ dan como resultado glicina betaina y NADH, por lo que al ser una reacción de estequiometría 1:1, la aparición de NADH es proporcional a la aparición de glicina betaina y por lo tanto a la actividad enzimática. Por ello, la actividad de la enzima BADH se determinó espectrofotométricamente midiendo la aparición de NADH por medio del incremento en la extinción a 340 nm.

La temperatura se mantuvo a 30 °C usando un baño de agua recirculante con la capacidad de calentar los espacios de las celdas en el espectrofotómetro.

El ensayo se realizó con un amortiguador Hepes/KOH 100 mM, pH 8.2, NAD^+ 0.75 mM y betaina aldehído 0.375 mM en un volumen final de 0.4 ml. La reacción se inició con la adición de la enzima (20 μl) y se midió la extinción obtenida cada 20 segundos hasta 5 minutos.

La actividad enzimática de la BADH fue calculada de la siguiente manera:

$$A = \Delta A \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{400}{V}$$

ΔA = incremento de la absorbancia

A= Actividad enzimática (U/ml)

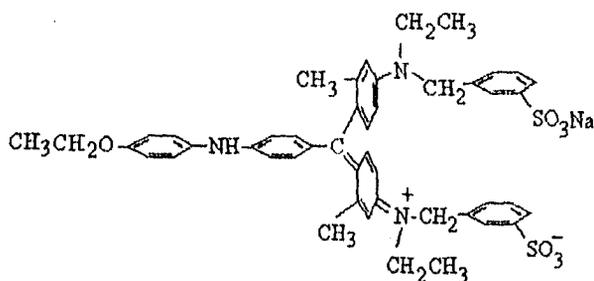
ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6.22 \mu\text{mol}^{-1}\text{ml cm}^{-1}$)

V= Volumen de enzima usado en el ensayo

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 μmol de sustrato en producto en un minuto y a 30 °C.

3.3 Determinación de proteína por el método de Bradford

El colorante azul de Coomassie se une a las proteínas por medio de enlaces electrostáticos con los grupos amino y enlaces no covalentes con las regiones no polares de la proteína. En una solución ácida, la interacción de las proteínas con el azul de Coomassie causa el cambio en la longitud de onda de máxima absorción del colorante de 465 nm a 595 nm. La intensidad del color de la solución a 595 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína. La estructura química del azul de Coomassie es la siguiente:



La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como estándar.

Se realizó una curva patrón de albúmina a diferentes concentraciones, cumpliéndose la linealidad. A las muestras se les realizó las diluciones necesarias hasta obtener una D.O. que interpolara en la curva patrón. Las absorbancias se midieron a 595 nm.

La curva patrón se realizó de la siguiente manera:

conc. de albúmina	0 mg/ml	0.04 mg/ml	0.1 mg/ml	0.2 mg/ml	0.4 mg/ml	0.8 mg/ml
vol. agua	100 µl	98 µl	95 µl	90 µl	80 µl	60 µl
vol. de albúmina 2 mg/ml	0 µl	2 µl	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl
vol. Bradford	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Agitación en vortex. Incubación 15 minutos a temperatura ambiente. Leer a 595 nm en el espectrofotómetro.

Por lo general se agregó entre 1 y 10 µl de la muestra problema.

3.4. Electroforesis

Se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), con una concentración de acrilamida de 10 % (p/v) de acuerdo a Laemmli (1970). El revelado se llevó a cabo por tinción con Coomassie (Solución para teñir el gel, VII) durante 2 h. Se elimina la solución y se coloca la solución para desteñir el gel (VIII) durante 2-4 h.

La preparación del gel para la electroforesis SDS se realizó de la siguiente manera:

	gel separador(10 % acrilamida)	gel apilador(4 % acrilamida)
30 % acrilamida (I)	3.33 ml	0.67 ml
Amortiguador para gel separador (II)	2.50 ml	

Amortiguador para gel apilador (III)		1.25 ml
SDS 10 % (IV)	0.10 ml	0.05 ml
Agua	4.0 ml	3.0 ml

Se elimina el oxígeno disuelto por aplicación de vacío por 15 minutos.

Persulfato de amonio (V)	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.013 ml	0.013 ml
Volumen final	10 ml	5 ml

Se aplica rápidamente el gel separador entre las placas de vidrio y se deja gelificar. A

continuación se coloca el gel apilador.

I) Acrilamida 30 %, Bis-Acrilamida 2.7 %

Compuesto	Concentración
Acrilamida	30 % p/v
Bis-acrilamida	2.7 % p/v

II) Amortiguador para gel separador pH= 8.8

Compuesto	Concentración
Tris	1.5 M

Ajustar el pH a 8.8 con HCl

III) Amortiguador para gel apilador pH=6.8

Compuesto	Concentración
Tris	0.5 M

IV) SDS 10 % (Dodecil sulfato de sodio)

Compuesto	Concentración
SDS	10 % p/v

V) Persulfato de Amonio 10 %

Compuesto	Concentración
Persulfato de Amonio	10 % p/v

VI) Amortiguador para la muestra 2X

Compuesto	Concentración
Tris	0.125 M
SDS	4 % p/v
Glicerol	20 % v/v
β -mercaptoetanol	10 % v/v

VII) Solución para teñir el gel

Compuesto	Concentración
Azul de Cumassie R-250	0.125 % (p/v)
Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético	10 % (v/v)

VIII) Solución para desteñir el gel

Compuesto	Concentración
Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético	10 % (v/v)

IX) Amortiguador para electrodos pH= 8.3 (SDS-PAGE)

Compuesto	Concentración
Tris	0.025 M
Glicina	0.192 M
SDS	0.1 % (p/v)

También se reveló con plata de la siguiente manera:

Se incubó el gel 1 h con 50 % de metanol. A continuación se colocó en la solución del complejo de plata (solución G) y se mantuvo en agitación suave durante 15 min. Se incubó el gel de 5-15 min. en la solución de formaldehído (solución H) hasta la aparición de las bandas. La reacción se detuvo lavando con agua destilada. Entre cada paso se lavó el gel con grandes cantidades de agua destilada.

Se llevó a cabo también electroforesis nativa (PAGE) con una concentración de acrilamida de 8 % (p/v). Las bandas con actividad de BADH se revelaron por actividad incubando el gel a temperatura ambiente con 100 mM Hepes/KOH, pH 8, 0.5 mM betaina aldehído, 1 mM NAD⁺, 20 mg/L metosulfato fenazona y 300 mg/L azul de tetrazolio de acuerdo con Arakawa y col. (1990).

3.5. Obtención de anticuerpos anti-BADH

La banda obtenida en el gel de SDS-PAGE correspondiente a la BADH por peso molecular, se congeló en nitrógeno líquido, se trituró y se emulsificó con adjuvante completo de Freund pasando varias veces la mezcla por la jeringa. Se inocularon aproximadamente 120 µg de proteína a un conejo New Zealand por vía intramuscular. Se extrajeron 5 ml de sangre antes de la inoculación para obtener suero preinmune como control.

Las demás inoculaciones se realizaron con adjuvante incompleto de acuerdo al siguiente esquema de inmunización:

Día	Tratamiento	Sitio de Inoculación	Cantidad
0	sangrado preinmune	vena de la oreja	5 ml
	1a. inoculación	intranuscular	120 µg
15	2a. inoculación	subcutánea	200 µg
21	3a. inoculación	subcutánea	270 µg
28	sangrado de prueba	vena de la oreja	3 ml
33	4a. inoculación	intranuscular	180 µg
38	sangrado final	punción cardíaca	90 ml

3.6. Purificación parcial de los anticuerpos

El antisuero (30 ml) se centrifugó 30 minutos a 20,000 x g. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó lentamente y con agitación constante sulfato de amonio saturado, hasta obtener un 50 % (v/v). Se dejó en agitación durante 2 h. a 4 °C para asegurar la precipitación total de la proteína. A continuación se centrifugó por 1 h. a 20,000 x g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 3 ml de amortiguador TBS pH 7.4. Se prosiguió con la diálisis del resuspendido contra 100 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 200 mM) durante 60 h. con agitación constante y a 4 °C. Se cambió el amortiguador 8 veces durante la diálisis.

Se realizó una SDS-PAGE con el dializado, el sobrenadante de la precipitación y el antisuero original, como control de la precipitación de los anticuerpos.

3.7. Inmunoprecipitación de la proteína BADH

Debido a que la simple adición del anticuerpo a la solución de BADH no causa la inhibición de la actividad enzimática, los complejos antígeno-anticuerpo (enzima-IgG) se precipitaron con la adición de proteína A Sefarosa CL-4B al medio de reacción.

La fracción de sulfato de amonio de 40-55 % de saturación (1.4 mU de actividad de BADH) se incubó con diferentes cantidades del antisuero obtenido frente a BADH purificada de amaranto durante 2 h, seguida de la adición de 40 µl de proteína A sefarosa (1:1 en amortiguador TBS, pH 8) con una incubación de 1 h, ambos pasos a 4 °C. Después se centrifugó a 12000 x g y se determinó la actividad de BADH remanente en el sobrenadante.

3.8. Western blot

Se realizó una SDS-PAGE de las muestras obtenidas de los diferentes tratamientos, en las condiciones ya descritas, colocando la misma cantidad de proteína total en cada carril. Al terminar la corrida se sumergieron en amortiguador de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol 20 % v/v) 12 papeles filtro, el papel de nitrocelulosa y el gel de electroforesis durante 10 min. A continuación se transfirieron las proteínas a un papel de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semihúmeda colocando 9 papeles filtro sobre el electrodo positivo seguido por el papel de nitrocelulosa y después el gel de la electroforesis, cubriéndolo por otros 3 papeles filtro. Se colocó sobre este sandwich el electrodo negativo y se corrió la transferencia durante 1.5 h a 70 mA.

Una vez transcurrido el tiempo de la transferencia, la membrana con las proteínas transferidas se colocó en una solución de bloqueo (leche Carnation 6 % p/v en TBST, pH

7.4) durante 15 h. Por otro lado se tiñó el gel como control de la transferencia. A continuación se eliminó la solución de bloqueo y la membrana se incubó con 15 ml de la solución conteniendo el anticuerpo anti-BADH a una dilución 1:500 en TBST (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 0.05 % v/v, pH 7.4) y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se eliminó la solución con el anticuerpo y se realizaron 2 lavados con TBST de 15 min. cada uno. Se prosiguió con la adición de la solución con el anticuerpo biotilado anti-IgG de conejo a una dilución 1:10 000 en solución TBST. Se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. Al terminar se realizaron 2 lavados con TBST durante 15 min. cada uno.

Se agregó la fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina a una dilución 1:5000 en TBST y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados de 15 min. cada uno con TBS, seguidos por un tercer lavado de 15 min. con amortiguador de sustrato (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM a pH 9.5). Se agregó amortiguador de sustrato con los sustratos NBT y BCIP y se incubó la membrana varios minutos hasta que aparecen las bandas de precipitado que demuestran la presencia de la proteína BADH. Se paró la reacción lavando la membrana de 5 a 10 veces con agua destilada. Finalmente, se dejó secar la membrana y se guardó en la oscuridad.

3.9. Tratamientos de estrés osmótico

Las hojas se obtuvieron de plantas de *A. hypochondriacus* L. crecidas en un invernadero con temperatura controlada (25 °C). Se utilizaron plantas de 6-8 semanas de edad. Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos incubando aproximadamente 5 g de hojas completas durante 6 h en presencia de luz (400 $\mu\text{moles seg}^{-1} \text{m}^{-2}$) a 27-28 °C.

- a) Estrés hídrico: PEG 6000, 17.2 % (p/v) (-1 MPa)
- b) Estrés salino. Cloruro de sodio 500 mM.
- c) ABA 50 μ M (aplicado en la obscuridad 30 minutos antes de la incubación en luz).
- d) Control: Agua destilada.

La proteína BADH se extrajo homogeneizando las hojas tratadas en un mortero con arena usando el amortiguador A. El homogeneizado se centrifugó a 25,000 x g durante 30 min. Se agregó sulfato de amonio sólido para obtener 40 % de saturación. Se centrifugó de nuevo a 25,000 x g por 30 min. El sobrenadante se llevó a 55 % de saturación con sulfato de amonio y se repitió el paso anterior. El precipitado protéico se resuspendió en el menor volumen posible del amortiguador B, tras lo cual se desaló por la técnica de Penefski (1977).

Se determinaron la cantidad de proteína total, la actividad enzimática y la cantidad relativa de proteína en todos los tratamientos.

La cantidad relativa de proteína BADH se puso de manifiesto por medio de un densitómetro modelo Ultrosan XL de Pharmacia.

VII. RESULTADOS

1. Purificación de la BADH

La purificación de la BADH utilizada en el presente trabajo se llevo a cabo de acuerdo a lo publicado por Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993) con algunas modificaciones, descritas en la sección de Métodos y que serán discutidas más adelante.

Se utilizaron hojas de plantas silvestres de amaranto que se expusieron a un déficit de agua previo a la extracción, para incrementar la actividad de BADH. Aún después del tratamiento de estrés hídrico no se logró detectar actividad enzimática en el extracto crudo. Por ello, se precipitó este extracto con sulfato de amonio y posteriormente se resuspendió el precipitado en aproximadamente 1/10 del volumen original, con el objeto de obtener la enzima más concentrada. Sin embargo, se obtenían actividades muy bajas ya que el sulfato de amonio es un inhibidor potente de la actividad enzimática de la BADH (Valenzuela-Soto y Muñoz Clares, 1993). Sólo después de desalar la solución se logró determinar la actividad de BADH. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos durante la purificación, a partir de 200 g de peso fresco de tejido.

La elución de la columna de cromatografía de intercambio iónico (Sefarosa Q de flujo rápido) dió como resultado dos picos de elevada actividad enzimática. El primer pico de actividad coincide con la mayor parte de las proteínas que se identifican a 280 nm. Se tomaron las fracciones 46-65 que incluyen ambos picos de actividad enzimática, con lo que puede eliminarse una cierta cantidad de proteínas contaminantes, recuperando la mayor parte de la enzima (Fig. 11). En este paso se logró purificar 13 veces la proteína BADH.

Con la cromatografía de hidroxilapatita se obtuvo un pico de actividad enzimática bien definido, lográndose eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes (Fig. 12). Así se obtiene una purificación de la BADH de 119 veces hasta este paso.

La actividad total recuperada en el eluido de la columna de 5'-AMP-Sefarosa fue baja, lo que se refleja en un notable descenso en el rendimiento global del proceso de purificación. Por otro lado, la actividad específica se incrementó aproximadamente 25 veces, resultando en alrededor de 3000 veces de purificación de la enzima (Tabla 2) y (Fig. 13).

Por lo tanto, con esta purificación se logró enriquecer la preparación de la enzima BADH, con la eliminación de la mayor parte de las proteínas restantes, como puede observarse en la figura 14 en la que se muestra la SDS-PAGE de las preparaciones de enzima a lo largo de la purificación. El monómero de la BADH corresponde a un peso molecular aproximado de 64 kDa (Fig. 14). En electroforesis no desnaturizante de la enzima nativa puede distinguirse la banda de actividad enzimática que corresponde a BADH en la fracción más purificada (Fig. 15).

Con esta purificación se obtuvo una banda mayoritaria en el gel SDS-PAGE que se utilizó para la obtención de anticuerpos. Debido a que se obtuvo poca cantidad de proteína de la purificación mencionada se realizó una nueva purificación partiendo de 600 g de tejido, con lo que se obtuvo la cantidad de proteína necesaria para la inmunización.

Tabla 2. Resumen de la purificación de BADH

	Proteína total (mg)	Vol. total (ml)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	Veces purificación	Rendi- miento (%)
*Sephadex G-25	1415	74	1637	1.2	—	100
Sefarosa Q de flujo rápido	183	53	2692**	14.7	13	164
Hidroxil- apatita	9	39	1278	137	119	78
5'-AMP Sefarosa	0.099	0.5	336	3395	2935	21

* La fracción obtenida de Sephadex G-25 es el paso inicial de la purificación y por lo tanto se obtiene un rendimiento del 100 %. Lo anterior es debido a que no se pueden obtener lecturas de actividad enzimática en extracto crudo por la alta concentración de pigmentos en la solución. Por otro lado, el amonio es un potente inhibidor de la actividad enzimática (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) por lo que es necesario desalar la resuspensión de la fracción precipitada con sulfato de amonio.

** El KCl es un activador de la actividad enzimática (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993), por lo cual se obtiene un rendimiento mayor al inicial. Es necesario desalar la preparación para conocer la actividad enzimática real.

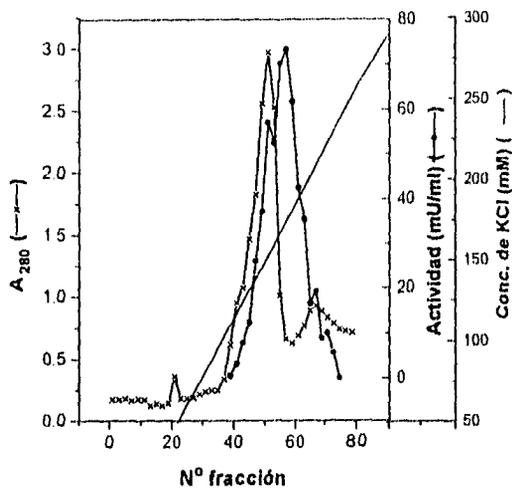


Fig. 11. Perfil de elución de la actividad (---●---) de BADH de una columna de sefarosa Q de flujo rápido. La columna se equilibró con el amortiguador B. La elución se realizó con un gradiente lineal de KCl de 50-300 mM (---). El tamaño de la columna fue de 15 ml de volumen de gel. Las fracciones recolectadas fueron de 2.5 ml c/u. La proteína se determinó por absorbancia a 280 nm (---x---).

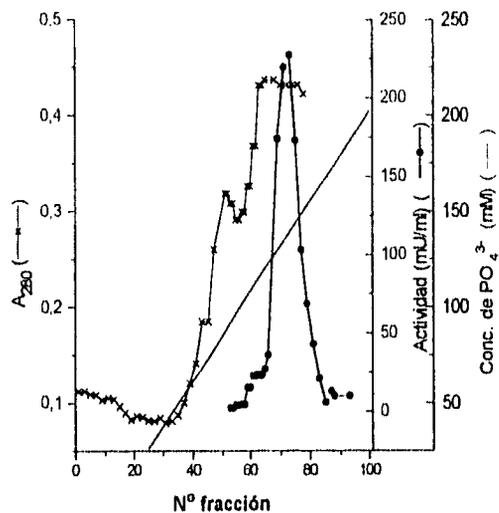


Fig. 12. Perfil de elución de la actividad de BADH (---●---) de una columna de hidroxilapatita. Se equilibró la columna con el amortiguador C. Se aplicó la fracción con actividad de BADH obtenida de la columna de Sefarosa Q. El tamaño de la columna fue de 10 ml de volumen de gel. Se eluyó con un gradiente lineal de concentración de fosfatos de 25-250 mM (---). Las fracciones recolectadas fueron de 2 ml c/u. La proteína se determinó por absorbancia a 280 nm (---x---).

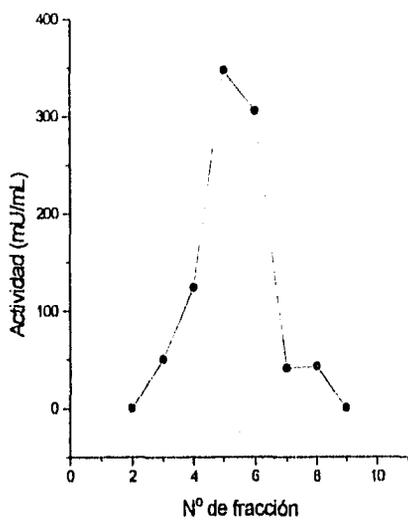


Fig. 13. Perfil de elución de la columna de 5'-AMP-Sepharosa. La columna se equilibró con el amortiguador D. La elución se llevó a cabo con el mismo amortiguador más 1 mM de NAD^+ a pH 7. El tamaño de la columna fue de 1 ml de gel. Las fracciones recolectadas fueron de 250 μl c/u.

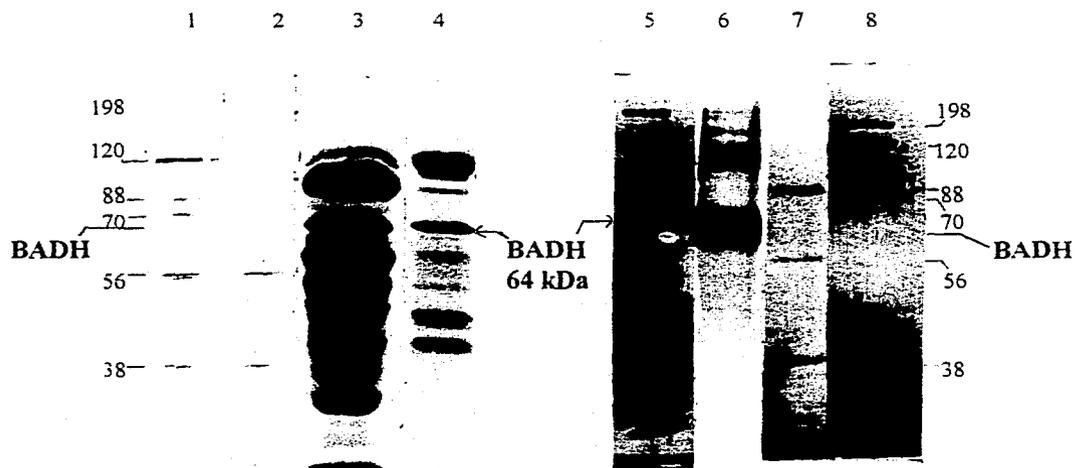


Fig. 14. SDS-PAGE de las fracciones con actividad BADH obtenidas en los diferentes pasos de la purificación.

Carriles: (1) y (2) son 3 µg de marcadores de peso molecular (3) 120 µg de proteína total de la fracción de sulfato de amonio de 40-55 % de saturación. (4) 40 µg de proteína total de una fracción obtenida de la columna de Sefarosa Q de flujo rápido. (5) 6 µg de proteína total de la fracción de la columna de hidroxilapatita. (6) 4 µg de proteína total de la fracción de 5'-AMP-Sefarosa. (7) y (8) son 4 µg de marcadores de peso molecular. El revelado se llevó a cabo por tinción con plata en todos los casos.



Fig. 15. Electroforesis de la BADH nativa. En (1) se colocaron 7 μg de proteína total (1 mU de actividad de BADH) de la fracción de hidroxilapatita. En (2) 5 μg de proteína total (15 mU de actividad de BADH) de la fracción de 5'-AMP-Sefarosa. El revelado se llevó a cabo por actividad como se mencionó en Métodos.

2. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-BADH

Se cortó cuidadosamente la banda del gel de electroforesis que correspondía a la proteína BADH de acuerdo a su peso molecular (Fig. 14) y se utilizó para las inoculaciones como se describe en Métodos. Al día 28, después de 3 inoculaciones, se realizó un sangrado de prueba y con el suero obtenido se llevó a cabo una titulación del anticuerpo anti-BADH por la técnica de dot blot utilizando como antígeno la enzima purificada.

Se observó una reacción positiva sólo con la dilución 1:50 del suero (Fig. 16), por lo que se realizó una última inoculación con el objeto de lograr un incremento en el título de anticuerpos. Se realizó un sangrado en blanco 4 días después, obteniéndose 100 ml, de los cuales se extrajeron 40 ml de suero. Se repitió la titulación por la técnica de slot blot, encontrándose que la dilución máxima para reconocimiento del antígeno es de 1:250, lo que indica mejora en el título, pero aun una baja concentración del anticuerpo anti-BADH. En ninguno de los casos se observó reacción positiva con el suero preinmune.

A continuación se realizó un inmuno-electrotransferencia para determinar la especificidad del suero anti-BADH obtenido usando la preparación de enzima obtenida tras precipitar con sulfato de amonio al 40-55 % extractos obtenidos de hojas de amaranto silvestre, tanto estresados como no estresados. También se utilizó la preparación obtenida de AMP-Sefarosa para compararla con la de sulfato de amonio (Fig. 17). Se detectaron 3 bandas principales, por lo que para comprobar si alguna de estas bandas corresponde a la BADH, se realizó una inmunotitulación en solución utilizando la preparación de BADH obtenida tras precipitación con sulfato de amonio. Sin embargo, no se logró observar la precipitación de la enzima y por lo tanto la inhibición de la actividad enzimática. Por este motivo se utilizó proteína A sefarosa para precipitar los complejos inmunes siguiendo el

procedimiento descrito por Arakawa y col. (1987). A pesar de esto la inhibición de la actividad fue muy baja, por lo que decidimos purificar parcialmente y concentrar el anticuerpo precipitando el antisuero con sulfato de amonio. Después de la diálisis, se obtuvo un volumen final de 6 ml del anticuerpo. Se realizó una SDS-PAGE del antisuero original, de la resuspensión del precipitado y del sobrenadante, para confirmar la precipitación del anticuerpo. En esta electroforesis se observaron bandas predominantes de aproximadamente 65, 55 y 20 kDa tanto en el precipitado como en el antisuero original, que podrían corresponder a la albúmina, a la cadena pesada y a la ligera de los anticuerpos, respectivamente, mientras que en el sobrenadante sólo apareció la banda de 65 kDa de la albúmina. Con esta preparación del anticuerpo se realizaron de nuevo la inmunotitulación tanto en solución como por la técnica de Western blot. Para esto último, se sometió la preparación de la enzima BADH antes mencionada con una actividad de 300 mU/ml a SDS-PAGE preparativa y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que se colocó en una cámara de titulación. Con esta titulación se obtuvo una reacción positiva hasta una dilución 1:2000 (Fig. 18). Se comprobó que el anticuerpo obtenido por Weretilnyk y Hanson (1989) contra la BADH de espinaca reconoce también a la enzima BADH de amaranto.

Para la inmunotitulación de la BADH nativa en solución se usaron diferentes diluciones del anticuerpo para demostrar que el anticuerpo reconoce a la enzima en forma nativa, dando como resultado una disminución importante en su actividad enzimática (Fig. 19), por lo que se puede asegurar que alguna de las bandas que se observan en el Western blot corresponde a la BADH. Para reconfirmar esto, se realizó una electroforesis nativa en la que se aplicó en dos carriles una muestra parcialmente purificada de BADH de amaranto. Se reveló un carril por actividad y el otro por la técnica de Western blot. El resultado mostró

una banda del mismo desplazamiento por ambos revelados (Fig. 20A-2 y 20B-1), lo que indica que el anticuerpo anti-BADH de amaranto reconoce a esta enzima. Por otro lado, en un tercer carril del mismo gel se aplicó una muestra de *Pseudomonas aeruginosa* purificada a homogeneidad. Tras la inmunotransferencia y revelado no se observó ninguna banda, por lo que no hubo reconocimiento por el anticuerpo obtenido frente a la BADH de amaranto (Fig. 20A-1).

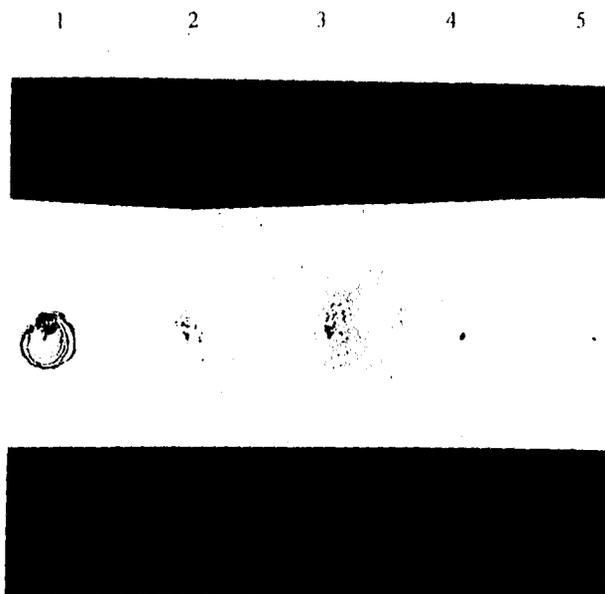


Fig. 16. Titulación del suero anti-BADH, del sangrado de prueba, por la técnica de Dot blot. Se utilizó como antígeno 4 μg de proteína total (aproximadamente 1.6 μg de proteína BADH) de la fracción de AMP-Sefarosa. El revelado se llevó a cabo por la fosfatasa alcalina con el sistema estreptavidina-biotina. Las diluciones utilizadas del suero anti-BADH fueron: (1) 1:50 ; (2) 1:250; (3) 1:500; (4) 1:1000. (5) Suero preinmune en una dilución 1:10.

Una reacción positiva se identifica como un halo de precipitación.

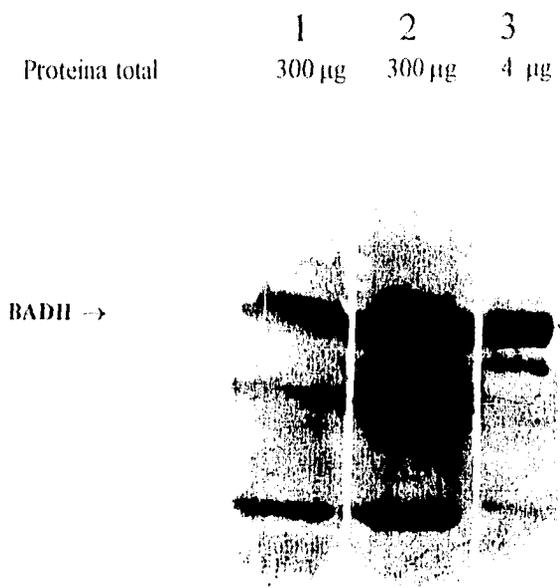


Fig. 17. Western blot de una preparación con actividad BADH obtenida tras precipitación con sulfato de amonio 40-55 % de extractos crudos de hojas de plantas silvestres de amaranto. (1) Hojas controles y (2) hojas estresadas con PEG 6000 durante 6 h. (3) Preparación de enzima obtenida después de la cromatografía en AMP-Sefarosa. La cantidad de proteína total aplicada se indica en cada carril. En el carril 2 se aplicaron 0.2 mU de actividad de BADH, en (3) 13 mU. En la muestra control (1) la actividad de BADH fue indetectable. Para la inmunodetección, se utilizó una dilución 1:100 del suero anti-BADH. El revelado se llevó a cabo usando la fosfatasa alcalina con el sistema de estreptavidina-biotina, como se describe en Métodos.

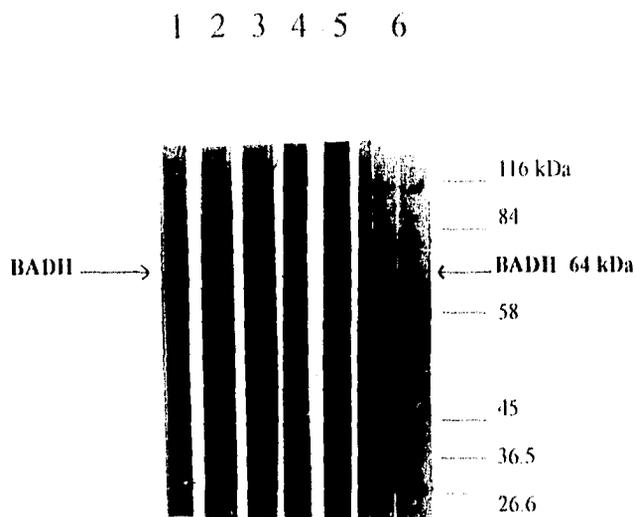


Fig. 18. Titulación del anticuerpo anti-BADH (parcialmente purificado) por la técnica de Western blot. Revelado con la fosfatasa alcalina, sistema estreptavidina-biotina. Se separaron 4.9 mg de proteína total (47.5 mU de actividad de BADH) de la fracción precipitada de 40-55 % con sulfato de amonio en SDS-PAGE preparativa. Para la titulación del anticuerpo anti-BADH parcialmente purificado se utilizó una cámara de titulación, usando las siguientes diluciones del anticuerpo: (1) 1:500, (2) 1:1000, (3) 1:2000, (4) 1:3000. (5) Se usó anticuerpo anti-BADH de espinaca (proporcionado por el Dr. A. Hanson) en una dilución 1:1000. (6) Marcadores de peso molecular preteñidos.

Se observa una reacción positiva con el anticuerpo anti-BADH de amaranto hasta una dilución 1:2000 (carril 3). El anticuerpo anti-BADH de espinaca reconoce a la BADH de amaranto (carril 5).

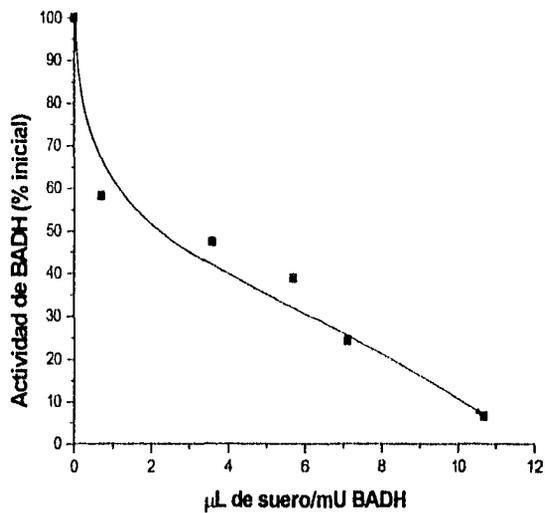


Fig. 19. Inmunoprecipitación de la actividad de BADH de hojas de amaranto. La fracción de sulfato de amonio de 40-55 % de saturación (1.4 mU de actividad de BADH) se incubó con diferentes cantidades del anticuerpo anti-BADH de amaranto parcialmente purificado. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 2 h a 4 °C. A continuación se agregaron 40 μl de proteína A sefarosa y se incubó durante 1 h a 4 °C, tras lo cual se determinó la actividad de BADH remanente en el sobrenadante.

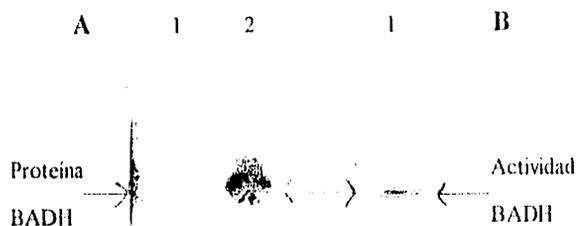


Fig. 20. (A1) Western blot de 2.5 μg de proteina BADH purificada a homogeneidad de *Pseudomonas aeruginosa*. (A2) Western blot de 7 μg de proteina total (aproximadamente 1 mU de actividad de BADH) de la fracción eluida de una cromatografía de hidroxilapatita que presentó actividad de BADH. El Western blot se realizó a partir de una electroforesis no desnaturalizante y se usó el revelado con el anticuerpo anti-BADH de amaranto y la fosfatasa alcalina, sistema estreptavidina-biotina. (B1) Electroforesis nativa de 70 μg de proteina total (aproximadamente 10 mU de actividad de BADH) de la misma fracción de hidroxilapatita que en A2. La banda de proteina con actividad BADH se reveló por actividad como se describe en Métodos.

La banda revelada por actividad de BADH coincide con la banda revelada por el anticuerpo anti-BADH de amaranto. Este anticuerpo no reconoce a la BADH de *P. aeruginosa* (A1).

3. Variación en la proteína BADH de hojas de amaranto en respuesta al estrés osmótico.

Los tratamientos de estrés osmótico se realizaron sumergiendo el peciolo de las hojas en las soluciones respectivas durante 6 h bajo iluminación. A continuación se realizó un inmunoelectrotransferencia de las muestras de hojas control y sometidas a tratamiento con PEG con el fin de evaluar el efecto que el estrés de agua tiene sobre la cantidad relativa de proteína BADH (Fig. 22A). A las mismas muestras se le determinó la actividad específica de BADH (Fig. 21). La cantidad de proteína BADH (medida por densitometría, Fig. 22B) aumenta en las hojas estresadas en muy baja proporción cuando se compara con el aumento de actividad encontrado en estas mismas hojas. Esto se observa claramente cuando se calcula la actividad intrínseca de BADH mediante el cociente de la actividad BADH y la cantidad BADH (Fig. 23).

Después de haber obtenido el resultado anterior se repitió el experimento con los tratamientos restantes. Al término del tiempo de incubación, las hojas sometidas al tratamiento con PEG 6000 mostraron una clara pérdida de la turgencia, al igual que las sometidas al tratamiento con NaCl, mientras que aquellas tratadas con ABA, mostraban un aumento de la turgencia comparado con el control (Fig. 24). Esto se corroboró determinando los cambios en el peso fresco de las hojas, ya que con el tratamiento de PEG habían perdido alrededor de un 25 % del peso fresco original y con el de NaCl alrededor del 15 %, mientras que con ABA las hojas ganaban alrededor de 10 % de agua con respecto a los controles (Fig. 25).

Después de realizar la extracción de la actividad BADH de las hojas tratadas y control, se precipitaron los extractos crudos con sulfato de amonio y se desalaron tras lo

cual se determinó la actividad enzimática en cada uno. Se encontró un aumento de la actividad enzimática de 5 veces después del tratamiento con PEG con respecto al control, mientras que con ABA y NaCl el aumento sólo fue de alrededor de 2 veces (Fig. 26).

También se realizó un western blot con las muestras obtenidas de los 4 tratamientos mencionados (Fig. 27A). Encontramos menor cantidad de proteína BADH en el tratamiento con ABA cuando se comparan con el control, cloruro de sodio o el de PEG (Fig. 27B). Con respecto al efecto de estos tratamientos sobre la actividad intrínseca de la BADH (estimada mediante el cociente de la actividad de BADH y la proteína BADH) se observó un aumento provocado por ABA y PEG, mientras que el NaCl no tuvo un efecto apreciable (Fig. 28).

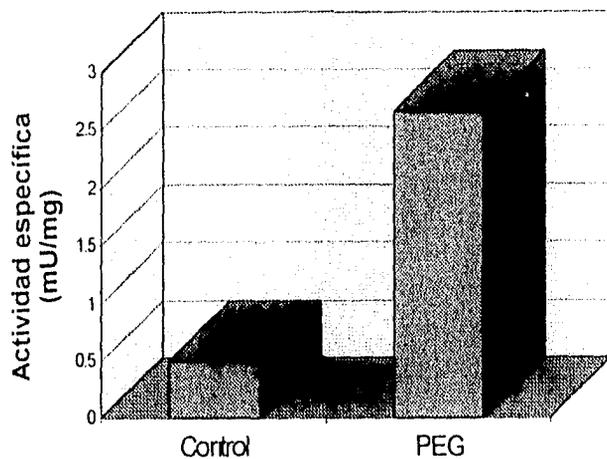


Fig. 21 Efecto del estrés osmótico sobre la actividad de la BADH en hojas de amaranto. La actividad específica se determinó en la fracción de sulfato de amonio de 40-55 % de saturación después de desalar en Sephadex G-25 según el método de Penel'sky (1977).

Los datos que se muestran son el promedio de dos determinaciones tanto para el control como para el tratamiento con PEG.

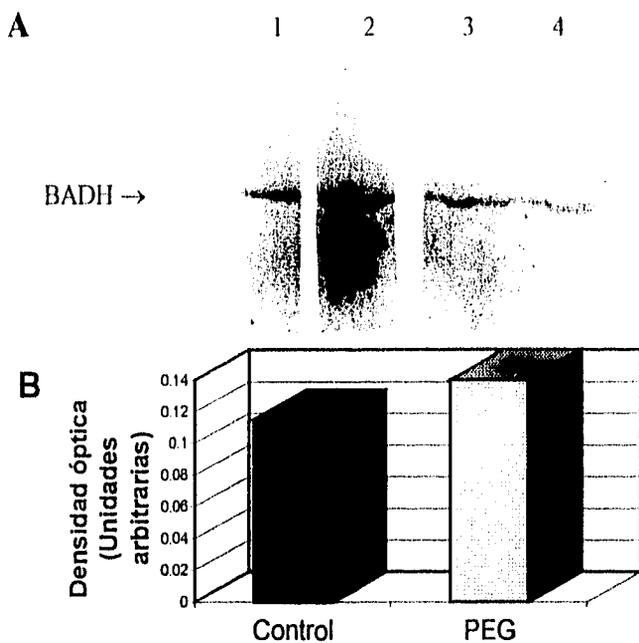


Fig. 22. (A) Efecto del déficit de agua sobre la cantidad relativa de proteína BADH. Western blot de la fracción 40-55 % de sulfato de amonio de hojas control (carril 1 y 2) y de hojas tratadas con PEG (carril 3 y 4). Se aplicaron 50 μ g de proteína total por carril en todos los casos. En este experimento se usaron 2 controles: hojas incubadas 6 h en agua destilada (carril 2) y hojas no sometidas a ningún tratamiento, de las que se extrajo la enzima inmediatamente después de ser cortadas de la planta (carril 1). El revelado se llevó a cabo con el anticuerpo anti-BADH de amaranto, con la fosfatasa alcalina, sistema estreptavidina-biotina.

(B) Densitometría de las bandas de proteína BADH obtenidas por el Western blot (A). El control corresponde al promedio de la densitometría obtenida para los carriles 1 y 2. PEG es un promedio de la densitometría obtenida para los carriles 3 y 4. Los datos que se muestran son del experimento más representativo.

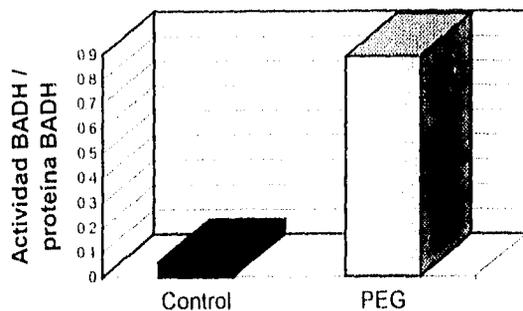


Fig. 23. Efecto del déficit de agua sobre la cantidad de proteína BADH.

Actividad intrínseca de BADH estimada mediante el cociente de la actividad BADH y la proteína BADH determinada por densitometría, en hojas control y tratadas con PEG.

Los datos que se muestran son el promedio de dos determinaciones tanto para el control como para el tratamiento con PEG.

La actividad de la BADH se muestra en la Fig. 21. La proteína BADH se muestra en la Fig. 22B.

1 2 3 4

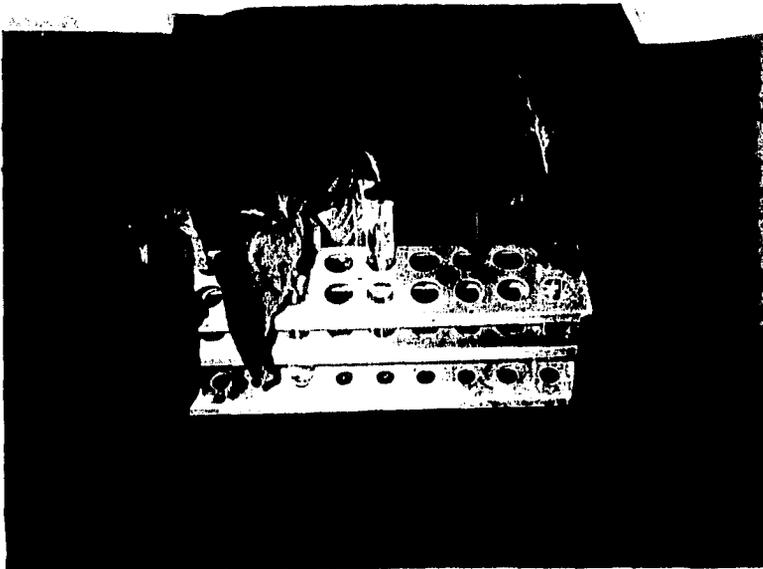


Fig. 24. Cambios de la turgencia de las hojas de amaranto tras 6 h de tratamiento (1) Hojas tratadas con PEG 17.2 % (p/v). (2) Hojas tratadas con NaCl a una concentración de 500 mM. (3) Hojas controles mantenidas en agua destilada. (4) Hojas tratadas con ABA 50 μ M.

Se muestra un experimento típico.

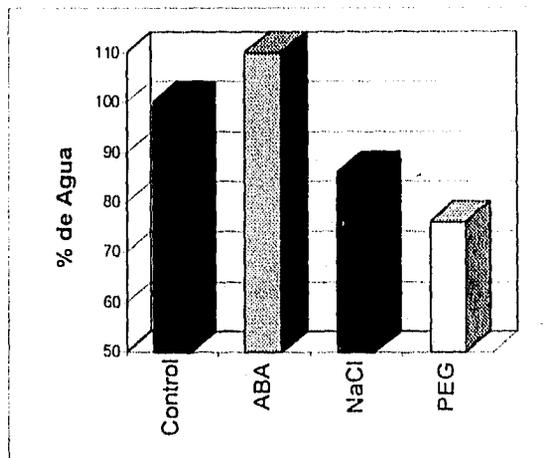


Fig. 25. Efecto del estrés osmótico y del ABA sobre el contenido relativo de agua de las hojas. Expresado como el porcentaje en peso fresco de las hojas tras los diferentes tratamientos con respecto al peso fresco inicial.

Se muestra un experimento típico.

Los datos corresponden a los tratamientos que se muestran en la Fig. 24.

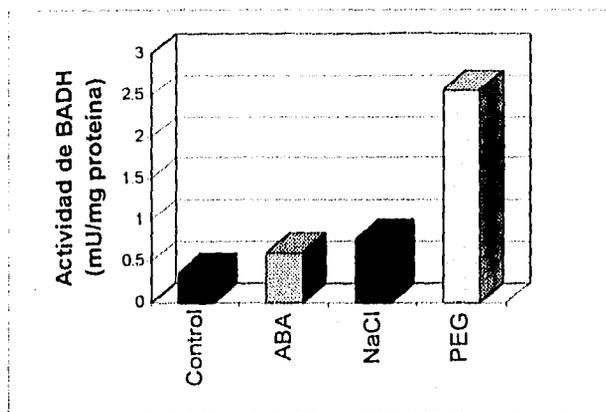


Fig. 26. Efecto del estrés osmótico o del tratamiento con ABA sobre la actividad de BADH en hojas de amaranto. La actividad específica se determinó en la fracción de sulfato de amonio de 40-55 % de saturación después de desalar en Sephadex G-25 según el método de Penefsky (1977).

Se muestra un experimento típico.

Los datos corresponden a los tratamientos que se muestran en la Fig. 24.

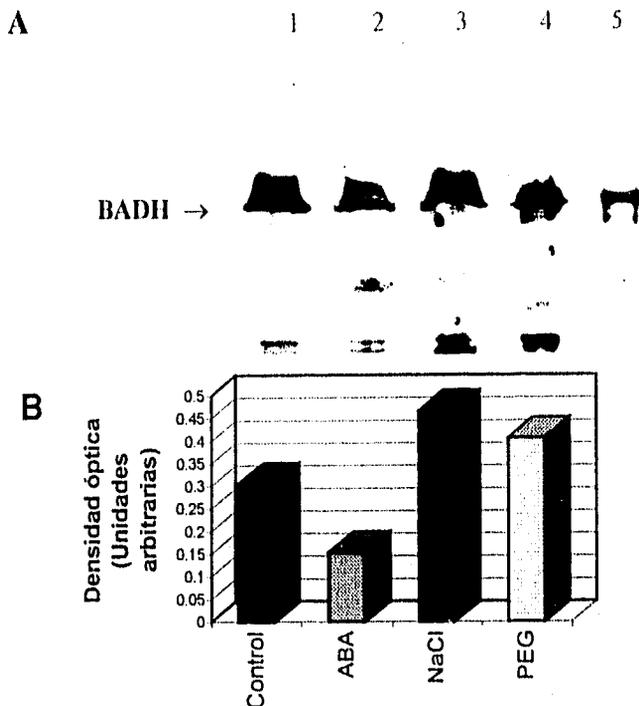


Fig. 27 A) Western blot de las fracciones de sulfato de amonio de 40-55 % de saturación, de extractos crudos de hojas sometidas a los diferentes tratamientos. (1) Hojas control. (2) Hojas tratadas con ABA 50 μM . (3) Hojas tratadas con NaCl 500 mM. (4) Hojas tratadas con PEG 17.2 % (p/v). A cada uno de estos carriles se aplicaron 175 μg de proteína total. En (5) se aplicó una fracción obtenida de hidroxilapatita (3 μg de proteína total). El revelado se llevó a cabo con el anticuerpo anti-BADH de amaranto, con la fosfatasa alcalina, sistema estreptavidina-biotina.

B) Densitometría de las bandas de proteína BADH obtenidas por el Western blot (A). El control es la densitometría obtenida de la proteína BADH del carril 1. ABA corresponde a la del carril 2. NaCl es la densitometría del carril 3 y PEG es la del carril 4. Los datos que se muestran corresponden a los tratamientos de la Fig. 24.

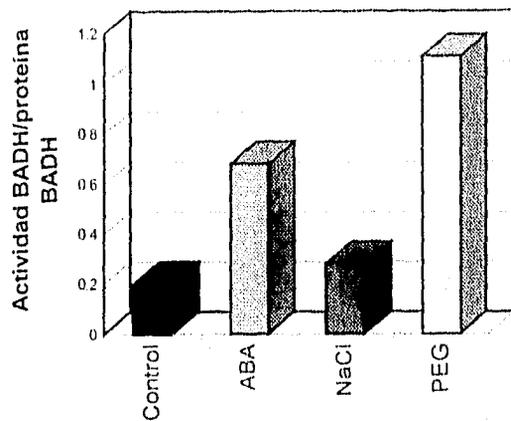


Fig. 28. Cociente de la actividad BADH y la proteína BADH (actividad intrínseca) determinada por densitometría en hojas sometidas a los diferentes tratamientos.

Se muestra un experimento típico.

Las condiciones son las descritas en el pie de la Fig. 24.

VIII. DISCUSION

1. Purificación de la BADH

Para lograr el objetivo general de esta investigación, que era el de conocer la variación de la proteína BADH en respuesta al estrés osmótico, era indispensable obtener la proteína BADH totalmente purificada para la obtención de anticuerpos policlonales específicos. Sin embargo, en este trabajo no se llegó a la purificación total, porque el rendimiento final que se obtiene en la cantidad de proteína es muy bajo y para lograr un título alto de anticuerpos se requiere inocular al conejo con cantidades relativamente altas de proteína. La BADH se encuentra en las hojas de amaranto en una proporción muy baja, aún después de someterlas a estrés osmótico, ya que constituye menos del 0.1 % de la cantidad total de proteínas que se extraen, como se discute más adelante. Por esta razón, fue necesario utilizar bastante tejido para lograr obtener una buena cantidad de enzima, considerando que después del último paso de purificación (5'-AMP-Sefarosa) se obtiene, cuando más, un 20 % de la proteína inicial. Aún sin haber logrado una purificación total, la SDS-PAGE resolvió el objetivo de este estudio de una manera muy satisfactoria, pues con este método fue posible obtener una banda homogénea correspondiente a la BADH en cantidad suficiente para obtener una inmunización eficiente.

El desalado con la columna de Sephadex G-25 utilizada tras el paso de precipitación con sulfato de amonio, tiene como ventaja que además de eliminar esta sal que inhibe la actividad enzimática, también elimina muchos de los pigmentos que pueden interferir con la determinación de la actividad enzimática debido a la alta absorbancia que le confieren a la solución. Además, muchos de estos pigmentos interfieren también con las columnas de cromatografía utilizadas en los pasos de purificación posteriores. Si la eliminación de las

sales se realiza por diálisis, no se eliminan estos pigmentos, y el tiempo requerido para la diálisis es mucho más largo, lo que podría dar lugar a pérdidas de actividad por la acción de proteasas posiblemente presentes en el extracto.

La columna de intercambio iónico (Sefarosa Q de flujo rápido) permite una buena purificación, pero es necesario desalar la preparación para conocer el rendimiento real, ya que la elución de esta columna se realiza con KCl, el cual es un activador de la BADH (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). La columna de hidroxilapatita también permite una buena purificación adicional con relativamente buen rendimiento. El problema se encontró en la columna de 5'-AMP-Sefarosa, ya que aunque mediante esta cromatografía de afinidad se logra eliminar una gran cantidad de proteínas también se pierde una alta proporción de la actividad enzimática, lo que da como resultado un rendimiento muy bajo. Es probable que el bajo rendimiento obtenido en el último paso (21 %), se deba a que el pH óptimo al cual se adhiere la enzima a la matriz de afinidad es de 5.5, y a este pH la enzima es inestable. Sin embargo, el objetivo de este trabajo no era poner a punto un método óptimo de purificación de la enzima, sino la obtención de anticuerpos frente a ella, por lo tanto este procedimiento cumplió con las necesidades para continuar con la inmunización.

Una gran limitante por no haber obtenido la BADH pura es que no se pudo conocer con exactitud la cantidad de proteína correspondiente a ella. Sin embargo, para realizar la inmunización se realizó una estimación de la proteína considerando la actividad específica de esta proteína pura (2.5 U/mg) que fue reportada por Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993). Con esta estimación no se considera a la enzima que pueda estar inactiva, pero que aún así puede estimular la síntesis de anticuerpos. Por otro lado, parece ser que la cuantificación de proteínas por el método de Bradford no es muy efectivo para la

cuantificación de la BADH, ya que al hacer la estimación mencionada encontramos que hay mayor cantidad de proteína BADH que la proteína total que se detecta por Bradford. Así, en la Tabla 2 se tiene, al final de la purificación, 99 µg de proteína total, y 336 mU de actividad de BADH, lo que corresponde por su actividad específica a 134 µg de BADH.

2. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-BADH

La banda que se decidió utilizar para la inoculación, obtenida en SDS-PAGE preparativa, fue aquella que corresponde a aproximadamente 64 kDa y que al realizar la electroforesis con las fracciones obtenidas de los diferentes pasos de la purificación, aumentaba de intensidad conforme la purificación era mayor, lo cual se observa claramente en la Figura 14. Estos hallazgos significan que a medida que la banda es más intensa en relación al resto, la actividad específica también aumenta, indicando que ésta es la BADH y por lo tanto la adecuada para inmunizar.

Más aún, la obtención de anticuerpos se facilita cortando la banda del gel porque el gel de poliacrilamida funciona como un adyuvante, ya que evita que la proteína se difunda con rapidez además de que aumenta el área de contacto, lo que permite que el antígeno permanezca mayor tiempo en el organismo y tenga, por lo tanto, mayores posibilidades de estar en contacto con las células inmunocompetentes.

En realidad, el título obtenido de los anticuerpos anti-BADH no fue muy elevado, lo que podría deberse en parte a que la proteína desnaturalizada es pequeña y de un peso molecular relativamente bajo. Por lo general, los antígenos de mayor tamaño y peso molecular (mayor a 100 kDa) son los que suelen dar mayores títulos de anticuerpos (Klein, 1990). Por otro lado, se sabe que existe una BADH en los mamíferos con alta homología

(entre el 75-77 % como se señala en la Tabla 1) (Boyd y col., 1991). por lo que aunque el conejo está muy alejado filogenéticamente de las plantas, la alta similitud de esta proteína inter-especie puede causar una baja respuesta inmunológica a esta enzima en el conejo. Un factor más que pudo influir en el título final del anticuerpo es la cantidad de proteína inoculada, ya que debido a que ésta no se obtuvo pura, no se conocía la concentración exacta de BADH contenida en la última fracción de la purificación.

Aunque el dot blot y el slot blot dieron reacciones positivas, no se puede asegurar por estas técnicas que el reconocimiento de la BADH por el anticuerpo es específico. Por lo que se realizaron inmunoelectrotransferencias usando la técnica de Western blot. Los resultados mostraron 3 bandas, una de las cuales tenía un peso molecular de 64 kDa que es lo esperado para la BADH y las otras dos bandas con un menor peso molecular (entre 50 y 30 kD). Estas pueden corresponder a proteínas que comparten determinantes antigénicos con la BADH, ya que como los anticuerpos obtenidos son policlonales, hay una mezcla de ellos dirigidos contra otras proteínas, o contra epítopes que podrían estar presentes en diferentes proteínas, sobre todo en otras aldehído deshidrogenasas. Otra posible explicación es que los anticuerpos reconozcan productos de degradación de la BADH. En SDS-PAGE una banda de proteína con prácticamente la mitad del peso molecular original sugiere un producto de degradación. A pesar de esto, se pueden utilizar estos anticuerpos porque se identifica sin duda alguna cual es la banda correspondiente a la BADH, como se explica a continuación.

Para corroborar que el anticuerpo reconoce a la BADH se realizó una inmunoprecipitación de la actividad enzimática. Para este fin es indispensable que el anticuerpo reconozca la forma nativa de la enzima, ya que la inoculación al conejo con la

proteína desnaturalizada resulta en la síntesis de anticuerpos dirigidos contra regiones de la proteína que normalmente no están expuestas cuando ésta se halla en su forma nativa. Si los determinantes antigénicos se hallan dispuestos conformacionalmente de tal forma que no formen la malla necesaria para la precipitación, se requiere de un facilitador de unión. Los anticuerpos por sí mismos no precipitaron a la BADH, por lo que fue necesario el uso de proteína A sefarosa, como fue descrito por Arakawa y col. (1987). La proteína A estafilocócica tiene alta afinidad por la región Fc de los anticuerpos, y al estar unida en forma covalente a la sefarosa, lo que la hace insoluble, facilita la precipitación de los complejos inmunes. Aún utilizando esta metodología no se observó una disminución importante de la actividad enzimática después de la incubación con los anticuerpos, por lo que se decidió concentrar a estos últimos. Para ello, se empleó la precipitación diferencial de los anticuerpos con sulfato de amonio. El resultado fue muy satisfactorio observándose una disminución de la actividad de BADH soluble, debida a que la enzima es reconocida por los anticuerpos e inmunoprecipitada. La inmunoprecipitación es importante no sólo para confirmar el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo, sino también porque puede resultar un método muy atractivo para estudios en los que se requiera obtener la proteína pura en un sólo paso a partir de extractos crudos, como sería en la investigación de una probable modificación covalente de la enzima "*in vivo*".

Otra manera de corroborar que los anticuerpos reconocen a la BADH es sometiendo una preparación de enzima a electroforesis nativa y comparando las bandas obtenidas por el revelado por actividad con las obtenidas por inmunoelectrotransferencia de esta electroforesis nativa. En este experimento se observó que la banda con actividad BADH corre en el gel a la misma altura que la revelada por el anticuerpo (Fig. 20). En la

electroforesis nativa también se pusieron de manifiesto otras bandas, como ocurre en la electroforesis desnaturalizante. Es posible que la banda de menor corrimiento que se observa en la fracción purificada separada en el gel nativo, corresponda a la isoenzima citosólica de la BADH, como reportó Weretilnyk y Hanson (1988) (Fig. 10). Esta isoenzima se encuentra en mucho menor proporción, por lo que no se distinguió en la electroforesis nativa revelada por actividad. Sin embargo, el Western blot es un método tan sensible que puede detectar la banda en cuestión (Figura 20). Las fracciones precipitadas con sulfato de amonio presentaron en estas electroforesis, un corrimiento sin ser bandas definidas, las cuales si podrían corresponder a productos de degradación.

De estos estudios, es interesante resaltar la semejanza inmunológica de la enzima BADH en plantas, pues los anticuerpos obtenidos contra la BADH de espinaca reconocieron también a la de amaranto. Igualmente, Arakawa y col. (1992) demostraron que los anticuerpos obtenidos contra la BADH de espinaca reconocen a la de la cebada, lo que indica que ambas tienen una gran cercanía estructural, que muy posiblemente depende de la existencia de regiones conservadas compartidas. Esto sugiere un ancestro común (Weretilnyk y col., 1989) para algunas especies de plantas. Por otro lado, la BADH de las plantas difiere inmunológicamente mucho de la de bacterias, ya que el anticuerpo contra amaranto es incapaz de reconocer a la BADH de *P. aeruginosa*, tanto en su forma nativa como desnaturalizada. Este resultado coincide con los de Weretilnyk y col. (1989) quienes encontraron que el antisuero obtenido frente a BADH de espinaca no mostraba reacción cruzada alguna con la BADH de *E. coli*, demostrando la ausencia de similitud estructural entre estas dos BADHs. Ello los llevó a sugerir que la BADH de plantas está filogenéticamente alejada de la de *E. coli*, debido además a las diferencias tanto en el tamaño

nativo como en el número de las subunidades de una y otra enzima Boyd y col (1991) mostraron un 38 % de aminoácidos idénticos entre la BADH de espinaca y la de *E. coli* (Tabla 1) que sin embargo, por lo ya señalado, no parecen estar en sitios relevantes de exposición para ser reconocidos por los anticuerpos.

3. Variación en la proteína BADH de hojas de amaranto en respuesta al estrés osmótico.

En un trabajo previo realizado por Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993), se encontró que en las hojas de amaranto existe un incremento de la actividad de BADH en respuesta a déficit de agua en tan sólo 2 h de tratamiento, el cual parece un tiempo demasiado corto para pensar en una síntesis de "novo" de la proteína. El aumento de la actividad de la enzima BADH cuando las hojas se sometían a un estrés hídrico con 17.2 % (p/v) de PEG (-1 MPa) alcanzaba su máximo a las 4 h., momento en que llegaba a un 60 % de contenido relativo de agua (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). En este trabajo se le aplicaron diferentes tratamientos a las hojas de amaranto, con el objeto de analizar si los cambios producidos por el estrés osmótico en actividad corresponden a cambios en la proteína BADH. Los tratamientos se realizaron por 6 h, que es un tiempo suficiente para observar la respuesta en actividad enzimática.

Los resultados de este trabajo indicaron en todos los casos, que los controles tienen proteína BADH, aunque su actividad enzimática es muy baja, lo que sugiere que las hojas de amaranto no estresadas tienen cierta cantidad de enzima BADH inactiva que se activa con los tratamientos de estrés osmótico. Además, las hojas sometidas a déficit de agua con PEG mostraron un aumento de actividad BADH mucho mayor al aumento observado en la

proteína BADH (Figs. 23 y 28). Esto parece indicar, que además de haber síntesis incrementada de proteínas, también podría haber una activación de la enzima preexistente. Los resultados obtenidos en este trabajo son muy interesantes y diferentes a los encontrados con anterioridad por otros autores (McCue y Hanson, 1992, Arakawa y col., 1992 e Ishitani y col., 1995) que habían observado un aumento muy importante tanto en el RNAm como en la proteína BADH a tiempos mayores de 24 h, lo cual justificaba el aumento en la actividad BADH.

El amaranto es muy sensible a cambios osmóticos en su medio de crecimiento, tanto así que el mismo corte de las hojas provocaba una pérdida de la turgencia en las hojas control (Fig. 24). Sin embargo, tiene un uso muy eficiente del agua (Gamboa y col., 1991), por lo que puede recuperar la turgencia en tan sólo 20 min cuando no se han cortado las hojas de la planta. Por esta razón, es posible que los mecanismos de regulación de la actividad de la BADH se lleven a cabo en tiempos mucho más cortos que en plantas más resistentes al estrés osmótico. De hecho, es posible que el uso tan eficiente de agua sea debido a la rápida síntesis de osmolitos protectores como lo es la glicina betaína. La activación por modificación covalente suele ser una respuesta mucho más rápida que la síntesis de "novo", lo que podría explicar el aumento de la actividad enzimática en tiempos tan cortos observada bajo nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, se determinó que las hojas controles y estresadas de plantas silvestres contienen mucha mayor cantidad de proteína BADH inactiva que las plantas cultivadas en invernadero (Fig. 17). Incluso, las hojas sometidas al tratamiento con PEG no presentaron un importante aumento de la actividad de BADH. Estas plantas silvestres tienen mucho más pigmentos que las plantas crecidas en el invernadero, los cuales podrían interferir con la

determinación de actividad enzimática que de este modo podría subestimarse. Por otro lado, existen evidencias de que algunas plantas incrementan su capacidad de tolerancia de periodos de estrés debido al incremento de solutos, cuando han sido previamente expuestas a dicho tratamiento (Morgan, 1984), por lo que es posible que estas plantas hayan sufrido previamente periodos de estrés hídrico y por lo tanto necesitan ser sometidas a tratamientos más fuerte para presentar una respuesta importante. Más aún, la presencia de una alta cantidad de pigmentos es una señal de que estas plantas han sufrido de algún tipo de estrés.

Al realizar el experimento con los cuatro tratamientos (control, ABA, NaCl y PEG) se encontró de nuevo en el tratamiento con PEG un aumento mayor en la actividad de BADH que el aumento en proteína. Los controles que se tuvieron 6 h en agua también mostraron un ligero aumento en la proteína BADH, sin presentar un aumento de la actividad, al compararse con hojas tomadas directamente de la planta. Más aún, las hojas controles también presentaron una pérdida de la turgencia debido al corte, por lo que la señal de síntesis de proteína puede ser asignada por cambios en el volumen celular, como fue discutido por McCue y Hanson (1992).

Los tratamientos con NaCl y ABA dieron como resultado efectos contrarios, ya que con ABA se observó una disminución de la cantidad de proteína BADH con un ligero aumento de actividad enzimática, lo que resulta en un aumento de la actividad intrínseca. Por el contrario, el tratamiento con NaCl produjo un aumento de proteína BADH y un aumento ligero en la actividad. Por ello, la actividad intrínseca de BADH con ABA se incrementa, así como también con PEG, mientras que disminuye con NaCl (Fig. 28). Esto sugiere que los mecanismos que promueven el aumento de la actividad con los tres tratamientos son diferentes, y que el ABA provoca la activación de la enzima sin inducir

síntesis de proteínas, en un corto plazo, ya que otros autores han encontrado un aumento de RNAm a tiempos mayores de 24 h (McCue y Hanson, 1992; Ishitani y col., 1995). Mientras tanto, el NaCl genera alguna señal de síntesis de proteínas, ya que aumenta tanto la actividad de la BADH como la cantidad de proteína. Hay que recordar que la pérdida de agua conlleva al aumento de los niveles de ABA interno, por lo que cualquiera de los tratamientos con NaCl y PEG deben involucrar de alguna manera la acción de ABA. En este aspecto, no se puede saber en ninguno de los tratamientos la contribución que tiene el ABA endógeno en esta respuesta ya que nosotros no determinamos estos niveles. Por otro lado, también hay que considerar que estos experimentos no se llevaron a cabo con la planta completa, por lo que las señales que se generan deben ser dentro de la misma hoja. Ishitani y col. (1995) ya habían observado con anterioridad que la respuesta de la planta a estrés osmótico en ausencia de las raíces es mucho menor, lo que les hizo concluir que las raíces deben estar involucradas en la liberación de algún mensajero, sin embargo, la respuesta no depende totalmente de la presencia de las raíces, como se demuestra en este trabajo.

Múltiples estudios apoyan la idea de que el ABA provoca la liberación de segundos mensajeros como el trifosfato de inositol o la acumulación de Ca^{2+} que son capaces de provocar cambios muy rápidos por medio de la fosforilación de proteínas (Skriver y Mundy, 1990), lo cual se puede correlacionar con nuestros resultados, ya que en este trabajo se observó que el ABA provoca un aumento de la actividad intrínseca de la BADH que puede ser debido a una modificación covalente de la enzima. La señal puede estar relacionada con cambios de volumen celular, ya que el ABA no provoca un déficit de agua pero sí un aumento de la turgencia, aunque también el ABA puede ser responsable directamente de esta señal. Por otro lado, el tratamiento con ABA mostró una menor cantidad de proteína

BADH que incluso el control (Fig. 27), lo que estaría hablando de que el ABA provoca, por un lado, una inhibición de la síntesis de proteína BADH y por otro lado la activación de la proteína existente antes de comenzar el tratamiento. El control con el que se compara, fue sometido al tratamiento con agua destilada durante las 6 h, por lo que es posible que en éste se diera un aumento en la síntesis de BADH debido a que las hojas no soporta el corte de la planta.

El aumento de la proteína BADH en respuesta al tratamiento con NaCl podría explicarse por cambios en el potencial osmótico de la células, que pueden provocar la inducción de genes no dependientes de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993; Bray, 1993). Por otro lado, McCue y Hanson (1992) demostraron que si se aplicaba NaCl a células de remolacha bajaban los niveles de RNAm de BADH, mientras que si utilizaban la planta completa observaban un aumento en este RNAm. Esto quiere decir que la síntesis de proteína BADH no es una respuesta directa a la sal, sino que debe existir algún mensaje que permita la síntesis de proteína. En nuestro caso puede haber alguna señal producida por el cambio en el potencial osmótico.

El aumento de la actividad intrínseca de la BADH por el tratamiento con PEG debe tener una vía de transducción de señales diferentes a las que se producen en respuesta a NaCl y ABA, ya que el PEG no entra a las hojas por su tamaño molecular, por lo que su acción depende totalmente del déficit de agua y por lo tanto de la pérdida de la turgencia, mientras que el NaCl tiene la capacidad de penetrar a las células y causar cambios directamente dentro de la célula. Así mismo, el ABA también penetra a las hojas y puede causar su efecto uniéndose a receptores de membrana que provoquen la liberación de segundos mensajeros (Hartung, 1983).

Estos resultados permiten desarrollar la hipótesis de que en respuesta al estrés osmótico exista alguna modificación covalente de la proteína BADH. Así, se abren nuevos caminos de estudio para lograr comprender los mecanismos que promueven la resistencia y la adaptación de las plantas a medios deficientes en agua o con altas concentraciones de sales. La fosforilación es un candidato idóneo para la activación de la enzima, ya que este tipo de modificación covalente es muy común en las proteínas. Además, el análisis estructural por programas de computación a partir de la secuencia primaria de la BADH de espinaca, indican que existe un sitio de muy alta hidrofiliidad que tiene la secuencia consenso para fosforilación por la protein cinasa C.

La importancia de estos estudios radica en la necesidad de obtener plantas transformadas que resistan la sequía y por lo tanto permitan tener cultivos más productivos. Estudios realizados por Rathinasabapathi y col. (1994) e Ishitani y col. (1995) demuestran que es posible realizar ingeniería genética, introduciendo el gen de la BADH a plantas que no lo tienen (en estos casos la planta utilizada fue el tabaco), volviéndolas más resistentes al estrés osmótico por la síntesis de glicina betaína, prácticamente en iguales proporciones que las plantas que sí la producen de forma natural. Sin embargo, aún con estos hallazgos, no es posible todavía obtener cultivos transgénicos de mayor resistencia al estrés osmótico, ya que no se conocen todos los mecanismos de activación y de regulación de las enzimas involucradas en esta respuesta. De esta manera, es de gran importancia conocer todos los mecanismos de adaptación antes de realizar la manipulación genética, ya que de no ser así, se pondrían en riesgo los cultivos de interés agrícola. Así, se obtendrían plantas capaces de resistir ambientes extremos de manera satisfactoria y con la posibilidad de controlar esta respuesta.

Con este trabajo se comienza una nueva línea de investigación sobre la proteína BADH que no había sido explorada con anterioridad. El estudio de la posible activación por modificación covalente de la BADH podrá poner en claro muchos de los mecanismos de respuesta que hasta ahora siguen siendo dudosos.

IX. CONCLUSIONES

Con este trabajo se abre un nuevo camino en la investigación de los mecanismos de inducción de la enzima BADH en respuesta al estrés osmótico. A continuación se enumeran los resultados más destacables de este trabajo y las conclusiones que de ellos se derivan:

- 1) Se obtuvieron anticuerpos policlonales frente a la enzima BADH purificada de hojas de amaranto. Estos anticuerpos reconocen a la BADH, por lo que fueron utilizados para el estudio de la cantidad relativa de proteína BADH.
- 2) La BADH de amaranto tiene alta homología inmunológica con la BADH de espinaca, mientras que no la tiene con la de *P. aeruginosa*.
- 3) La respuesta a corto plazo de la actividad BADH a estrés osmótico parece estar dada, en gran parte, por un mecanismo de activación de la enzima BADH preexistente. Esto debido a que en las hojas de plantas controles que no han sido sometidas a ningún tratamiento de estrés, se encuentra proteína BADH inactiva, y que el aumento en la actividad enzimática que se observa como resultado de los tratamientos, es mayor que el aumento en la proteína BADH.
- 4) El tratamiento con ABA provoca un aumento en la actividad intrínseca de la BADH, así como también el tratamiento con PEG, a diferencia del tratamiento con NaCl, por lo que el ABA podría estar involucrado en estos mecanismos de activación.

5) A pesar de que tanto el ABA como el PEG inducen un aumento de la actividad intrínseca de BADH en hojas de amaranto cuando son comparados con un control, las vías de transducción de señales que conducen al incremento en la proteína BADH y/o activación de la enzima parecen ser diferentes para cada uno de ellos.

X. PERSPECTIVAS

Con este estudio se obtuvieron evidencias de una posible activación de la enzima que constituiría fundamentalmente la respuesta a corto plazo de esta actividad enzimática al estrés osmótico. Estos resultados difieren de los obtenidos cuando se realizan tratamientos a largo plazo en otras plantas. Por esta razón, creemos necesario continuar con esta vía de investigación para poder llegar a conocer los diversos mecanismos de respuesta a un efecto tan importante como es el déficit de agua.

Los anticuerpos obtenidos en este trabajo podrán ser utilizados para realizar estudios "*in vivo*" de modificación covalente por técnicas isotópicas e inmunoprecipitación. Así, este trabajo pone las bases para continuar con estos estudios mencionados. Por otro lado, surge la necesidad de estudiar las vías de transducción de señales que pueden estar involucradas en esta respuesta, donde el ABA puede participar de manera importante.

APENDICE

XI. APENDICE

1. Equipo

Agitador magnético Thermolyne
Ultracentrífuga Sorvall
Potenciómetro Beckman
Refrigeradores a 4 °C
Congeladores de 0 °C, -20 °C y -70 °C
Densitómetro Pharmacia LKB Ultrosan XL
Equipo de Electroforesis Hoefer Scientific
Equipo de ultrafiltración Nalgene
Cámara de transferencia semi-húmeda Pharmacia LKB
Espectrofotómetro Beckman DU 7500 con baño recirculante de agua a temperatura controlada
Transiluminador de luz blanca
Cámara para titulación BioRad
Columnas para cromatografía
Colector de fracciones Pharmacia LKB
Bombas de flujo regulado Pharmacia LKB
Computadoras
Balanza analítica Ohaus
Vortex Thermolyne
Cámara de agitación orbital con temperatura controlada Lab Line instruments

2. Material

Algodón
Cajas de petri
Celdas de plástico para espectrofotómetro
Embudo de filtración rápida
Gasa
Gradilla
Jeringas de 3 ml
Matraces volumétricos
Matraces erlenmeyer
Mechero
Microjeringas Hamilton de 25 y 50 µl
Micropipetas automáticas de 40-200 y 200-1000 µl
Papel filtro
Papel de nitrocelulosa
Papel para medir pH entre 5.5-7.2 y 7-8.5
Pinzas
Pipetas graduadas
Pipetas pasteur

Pipetas volumétricas
Probetas graduadas
Tijeras
Tubos de ensayo
Tubos ependorf de 500 μ l y 1.5 ml
Tubos para centrifuga
Vasos de precipitado

3. Reactivos

ABA (Acido abscisico) Sigma
Acido acético Merck
Acido citrico Merck
Acido clorhidrico Merck
Acido ortofosfórico Merck
Acrilamida Sigma
Adyuvante completo de Freund
Alcohol 96 % Merck
Anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado con biotina (Serotec)
Arena de mar Sigma
Azul brillante de Coomassie G-250 Beringer
Azul brillante de Coomassie R-250 Beringer
Azul de tetrazolio Sigma
Betaina aldehido Sigma
Bis-Acrilamida Sigma
BSA (Albumina sérica bovina) Gibco BRL
Cloruro de magnesio Sigma
Cloruro de potasio Sigma
Cloruro de sodio Sigma
EDTA (ácido dinitrotetraacético) Merck
Formaldehido Merck
Fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina Promega
Fosfato monobásico de potasio Sigma
Fosfato dibásico de potasio Sigma
Fosfato de potasio Sigma
Glicerol Merck
Glicina Sigma
Hepes (N-(2-Hydroxyetil)piperi-zina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)) Sigma
Hidróxido de amonio Sigma
Hidróxido de potasio Sigma
Hidróxido de sodio Sigma
Hidroxilapatita BioRad
Leche descremada Carnation
 β -mercaptoetanol Sigma
Metanol Merck

Metosulfato fenazona Sigma
 NAD⁺ (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido) Sigma
 Nitrato de plata Sigma
 Pirofosfato de potasio Merck
 Polietilenglicol 6000 Sigma
 Proteína A sefarosa CL-4B Pharmacia
 Sacarosa
 SDS (Dodecil sulfato de sodio) Sigma
 Sefarosa 5'-AMP Pharmacia
 Sephadex G-25 BioRad
 Sefarosa Q de flujo rápido Pharmacia
 Sulfato de amonio ultrapuro Gibco BRL
 Tris (Hidroximetil-aminometano) Sigma
 Tween 20 Sigma

4. Preparación de soluciones

A) Amortiguador de extracción de pirofosfato de potasio pH=8.5

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Pirofosfato de potasio	100 mM	33.0348 g.	1 l.
EDTA (ácido etilendinitritotera-acético)	1 mM	0.3720 g.	1 l.
Glicerol	10 % (V/V)	100 ml	1 l.
β-mercaptoetanol	10 mM	643 ml	1 l.

Se ajusta el pH a 8.5 con HCl

B) Amortiguador de fosfatos pH=7.8 para columnas G-25 y de flujo rápido

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Fosfato monobásico de potasio	25 mM	3.4022 g.	1 l.
EDTA (ácido etilendinitritotera-acético)	1 mM	0.3720 g.	1 l.
Glicerol	10 % (V/V)	100 ml	1 l.
β-mercaptoetanol	10 mM	643 ml	1 l.

Se ajusta el pH a 7.8 con KOH

B.1) Amortiguador B más 50 mM de KCl

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
KCl	50 mM	3.7280 g.	1 l. de amortiguador B

B.2) Amortiguador B más 300 mM de KCl

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
KCl	300 mM	22.3680 g.	l. de amortiguador B

C) Amortiguador de fosfatos pH=7.5 para columna de hidroxilapatita

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Fosfato monobásico de potasio	10 mM	1.3609 g.	l.
EDTA (ácido etilendinitrotera-acético)	1 mM	0.3720 g.	l.
Glicerol	10 % (V/V)	100 ml	l.
β -mercaptoetanol	10 mM	643 ml	l.
Ajustar pH a 7.5 con KOH			

D) Amortiguador de fosfatos pH= 5.5 para columna de 5'-AMP-Sefarosa.

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Fosfato monobásico de potasio	25 mM	3.4022 g.	l.
EDTA (ácido etilendinitrotera-acético)	1 mM	0.3720 g.	l.
Glicerol	10 % (V/V)	100 ml	l.
β -mercaptoetanol	10 mM	643 ml	l.
Ajustar pH a 5.5 con KOH			

D.1) Amortiguador D más 1 mM NAD⁺

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
NAD ⁺	1 mM	0.6634 g.	l. de amortiguador D

E) Amortiguador Hepes/KOH pH 8.2, NAD⁺ 0.75 mM, betaina aldehído 0.375 mM para ensayo de actividad

Compuesto	Concentración	volumen	Concentración final
Hepes/KOH pH=8.2	400 mM	100 ml.	100 mM
NAD ⁺	20 mM	15 ml	0.75 mM
Betaina aldehído	10 mM	15 ml	0.375 mM
Agua		250 ml	
Enzima		20 μ l	
incubación a 30 ^o C			

E.1) Hepes/KOH pH 8.2

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
-----------	---------------	----------	---------------

Hepes (N-(2-Hydroxyetil)piperizina-N'-{ácido 2-etanosulfónico}) 400 mM 23.8300 g 0.250 l

Ajustar el pH a 8.2 con KOH

E.2) NAD⁺ 20 mM

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
NAD ⁺ (β-Nicotinamida adenina dinucleotido)	20 mM	0.6634 g	0.05 l.

E.3) Betaina aldehído 10 mM

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Betaina aldehído	10 mM	0.0511 g.	0.05 l.

F) Bradford para cuantificación de proteínas

Compuesto	Concentración
Azul brillante de Cumassie G-250	0.01 % (p/v)
Etanol	4.7 % (p/v))
Ácido Fosfórico (ortofosfórico)	8.5 % (p/v)

Se disuelven 100 mg de Azul brillante de Cumassie G-250 (CBB) en 50 ml de etanol al 96 %. Se adiciona a esta solución 100 ml de ácido fosfórico al 85 % (P/V). Se afiora la solución a 1 l con agua. Se deja en agitación toda la noche. Se filtra y se guarda en frasco ambar protegiendo de la luz.

G) Solución de complejo de plata para revelado de la electroforesis

Se prepara una solución de 0.4 g de AgNO₃ en 4 ml de agua y una solución de 21 ml de 0.36 % de NaOH y 2.75 ml de NH₄OH al 30 %. A la mezcla de NaOH y NH₄OH se agrega gota a gota la solución de plata con agitación. Se afioró a 100 ml.

H) Solución de formaldehído para revelado de la electroforesis por tinción con plata.

Se prepara una solución de 2.5 ml de ácido cítrico al 1 % y 270 µl de formaldehído al 35 % llevando el volumen a 500 ml con agua.

I) Solución para desteñir el gel

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Metanol	50 % (v/v)	500 ml	1 l.
Ácido acético	10 % (v/v)	50 ml	1 l.

J) Amortiguador de transferencia

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
-----------	---------------	----------	---------------

Tris	20 mM	2.4228 g	1 l
Glicina	150 mM	11.2605 g	1 l
Metanol	20 % (v/v)	200 ml	

K) Amortiguador TBS pH=7.4

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Tris	0.05 M	6.06 g.	1 l
NaCl	0.2 M	11.7 g.	1 l.

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

L.1) Amortiguador TBST (TBS con Tween 20)

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Tween 20	0.05 % (V/V)	0.2 ml.	0.4 l. de solución M

M) Amortiguador de Bloqueo

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Leche descremada marca Carnation	6 % (P/V)	1.2 g.	0.02 l. de solución N.1 (TBST)

N) Amortiguador para el sustrato de fosfatasa alcalina

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Tris	0.1 M	1.21 g.	0.1 l
NaCl	0.1 M	0.58 g.	0.1 l.
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	0.05 M	1.02 g.	0.1 l.

Ajustar el pH a 9.5 con HCl

O) Solución de ácido abscisico 50 mM

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Acido abscisico	50 mM	0.0007 g.	0.05 l.

Se pesan aproximadamente 0.0007 g. de ácido abscisico en un tubo ependorff y se adiciona 1 ml de etanol. Agitar en vortex hasta la completa disolución. La solución anterior se lleva a 50 ml con agua desionizada y agitar. Todos los pasos se llevan a cabo evitando el contacto con la luz.

P) Solución de Cloruro de Sodio 500 mM

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
NaCl	500 mM	1.4610 g.	0.05 l

Q) Solución de polietilenglicol 17.2 % (p/v)

Compuesto	Concentración	Cantidad	Volumen total
Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)	17.2 % (P/V)	8.6 g.	0.05 l.

XII. REFERENCIAS

- Arad, S., & Richmond, A.E. (1976). Leaf cell water and enzyme activity. *Plant Physiol.* **57**, 656-658.
- Arakawa, K., Katayama, M., & Takabe, T. (1990). Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of Barley. *Plant Cell Physiol.* **31**, 797-803.
- Arakawa, K., Mizuno, K., Kishitani, S., & Takabe, T. (1992). Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in Barley. *Plant Cell Physiol.* **33**, 833-840.
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T., & Akazawa, T. (1987). Purification of betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* **101**, 1485-1488.
- Baker, J., Steele, C., & Dure, L. III (1988). Sequence and characterization of 6 *lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* **11**, 277-291.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344.
- Begg, J.E. (1980). Morphological adaptations of leaves to water stress. In *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress* (Turner, N.C., Kramer, P.J.) pp. 33-35. Wiley. New York .
- Begg, J.E., & Turner, N.C. (1976). Crop water deficits. *Adv. Agron.* **28**, 161-217.
- Berridge, M.J., & Irvine, R.F. (1989). *Nature* **341**, 197-205.
- Berry, J., & Björkman, O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491-543.
- Blatt, M.R., Thiel, G. & Trentham, D.M. (1990). Reversible inactivation of K⁺ channels of Vicia stomatal guard cells following the photolysis of cage inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature*, **346**, 766-769.
- Bowman, M.S., & Rohringer, R. (1970). Formate metabolism and betaine formation in healthy and rust-infected wheat. *Can. J. Bot.* **48**, 803-811.
- Boyd, L.A., Adam, C., Pelcher, L.E., McHughen, A., Hirji, R., & Selvaraj, G. (1991). Characterization of an Escherichia coli gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDH's and a plant BADH. *Gene.* **103**, 45-52.

- Boyer, J.S., & McPherson, H.G. (1975). Physiology of water deficits in cereal crops. *Adv. Agron.* **27**, 1-23.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brady, C.J., Gibson, T.S., Barlow, E.W.R., Speirs, J., & Wyn Jones, R.G. (1984). *Plant Cell Environ.* **7**, 571-578.
- Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**, 1035-1040.
- Brent, D.A., Rouse, D.J., Sammons, M.C., & Bursey, M.M. (1973). Field desorption mass spectrometry quaternary ammonium salts. *Tetrahedron Lett.* **42**, 4127-4130.
- Brosnan, J.M., & Sanders, D. (1990). Inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} release in beet microsomes is inhibited by heparin. *FEBS Lett.* **260**, 70-72.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F., & Hanson, A.D. (1989). Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplasts stroma. *Plant Physiol.* **90**, 322-329.
- Cayley, S., Lewis, B.A., & Thomas Record, M. Jr. (1992). Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**, 1586-1595.
- Cohen, A., & Bray, E.A. (1990). Characterization of three mRNAs that accumulate in wilted tomato leaves in response to elevated levels of endogenous abscisic acid. *Planta* **182**, 27-33.
- Cotter, R.J., Hansen, G., & Jones, T.R. (1982). Mass spectral determination of long chain quaternary amines in mixtures. *Anal. Chim. Acta* **136**, 135-142.
- Coughlan, S.J., & Heber, U. (1982). The role of glycinebetaine in the protection of thylakoids against freezing stresses. *Planta* **156**, 62-69.
- Coughlan, S.J., & Wyn Jones, R.G. (1982). Glycine betaine biosynthesis and its control in detached leaves of spinach. *Planta* **154**, 6-17.
- Creelman, R.A., & Zeevaart, J.A.D. (1985). *Plant Physiol.* **77**, 25-28.
- Day, R.J., Unger, S.E., & Cooks, R.G. (1979). Ionization of quaternary nitrogen compounds by secondary ion mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 501-502.
- Del Rio Portilla, M.A. (1988). El contenido relativo de agua. Características en *Amaranthus*

- hypochondriacus*, L. Tesis de Licenciatura. ENEP Zaragoza. México.
- De Silva, D.L.R., Hetherington, A.M., & Mansfield, T.A. (1985). Synergism between calcium ions and abscisic acid preventing stomatal opening. *New Phytol.* **100**, 473-482.
- Deutsch, P.J., Hoefler, J.P., Jameson, J.L., & Habener, J.F. (1988). Cyclic AMP and phorbol ester-stimulated transcription mediated by similar DNA elements that bind distinct proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7922-7926.
- Dickinson, F.M. (1989). Aldehyde dehydrogenase: kinetics and mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 299-300.
- Downtown, W.J.S. (1973). *Amaranthus edulis*: a high lysine grain amaranth. *World Crops* **25**, 20.
- Drabak, B.F., & Ferguson, I.B. (1985). Release of Ca^{2+} from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 1241-1246.
- Dunn, T.J., Koleske, A.J., Lindahl, R., & Pitot, H.C. (1989). Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat. *J. Biol. Chem.* **264**, 13057-13065.
- Dure, L. III (1993). Repeating 11-mer amino acid motive and plant desiccation. *Plant J.* **3**, 363-369.
- Dure, L. III, Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., & Sung, Z.R. (1989). Common amino acid sequence domains among the *LEA* proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **12**, 475-486.
- Ehder, W.I., Idso, S.B., Jackson, R.D., & Reginato, R.J. (1978). Wheat canopy temperature: relation to plant water potential. *Agron. J.* **70**, 251-256.
- Ehlig, C.F. (1964). Salt tolerance of raspberry, boysenberry, and blackberry. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **85**, 318-324.
- Falkenberg, P., & Strom, A.R. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **1034**, 253-259.
- Farres, J., Guan, K.-L., & Weiner, H. (1989). Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase deduced from cDNA sequences. *Emr. J. Biochem.* **180**, 67-74.

- Feldman, R.L., & Weiner, H. (1972) Horse liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **247**, 267-272.
- Fitter, A.H., & Hay, R.K.M. (1981) Environmental physiology of plants. pp 118-167
Academic Press, London.
- Flowers, T.J., Hall, J.L., & Ward, M.E. (1978). Salt tolerance in the halophyte, *Suaeda maritima* (L.) Dum.: properties of malic enzyme and PEP carboxylase. *Ann. Bot.* **42**, 1065-1074
- Gamboa, A., Valenzuela, E.M., & Murillo, E. (1991). Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J. Plant Physiol.* **137**, 586-590.
- Génard, H., Le Saos, J., Billard, J.P., Trémolières, A., & Boucaud, J. (1991). Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* **29**, 421-427.
- Gibson, T.S., Speirs, J., & Brady, C.J., (1984). Salt-tolerance in plants. II. In vivo translation of m-RNAs from salt-tolerant and salt-sensitive plants on wheat germs ribosomes. Responses to ions and compatible organic solutes. *Plant Cell Environ.* **7**, 579-587.
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F., & Boney, A.D. (1984). *J. Exp. Bot.* **35**, 18-27.
- Gilmour, S.J., & Thomashow, M.F. (1991). *Plant Mol. Biol.* **16**, 1233-1240.
- Gilroy, S., Read, N.D., & Trewavas, A.J. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, **343**, 769-771.
- Ginzburg, M.E., Brownlee, C., & Jennings, D.H. (1983). *Plant, Cell Environ.* **6**, 381-384.
- Giovanelli, J., Mudd, S.H., & Datko, A.H. (1985). *Plant Physiol.* **78**, 555-560.
- Glish, G.L., & Smith, D.H. (1983). Thermal ionization of quaternary ammonium salts. *Int. J. Mass Spectrom Ion Phys.* **50**, 143-149.
- Grattan, S.R., & Grieve, C.M. (1985). Betaine stress in wheat in relation to nitrogen stress and transient salinity stress. *Plant and Soil.* **85**, 3-9.
- Graziana, A., Fosset, M., Ranjeva, R., Hetherington, A.M., & Lazdunski, M. (1988). Ca²⁺ channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca²⁺ entry into protoplasts. *Biochem.* **27**, 764-768.

- Greenway, H., & Munns, R. (1980). Mechanism of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 149-190.
- Guerrero, F., Jones, J., & Mullet, J. (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* **15**, 11-26.
- Guerrero, F., & Mullet, J.E. (1986). Increased abscisic acid biosynthesis during plant dehydration requires transcription. *Plant Physiol.* **80**, 588-591.
- Hall, J.L., Harvey, D.M.R., & Flowers, T.J. (1978). Evidence for the cytoplasmic localization of betaine in leaf cells of *Suaeda maritima*. *Planta* **140**, 59-62.
- Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M., & Bressan, R.A. (1986). *Plant Physiol.* **80**, 938-945.
- Hanson, A.D., & Hitz, W.D. (1981). ¹⁴C tracer evidence for phosphoryl-base intermediates in stress-induced synthesis of choline and betaine. *Plant Physiol.* **67S**, 122 (Abstr).
- Hanson, A.D., & Hitz, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficit. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 163-203.
- Hanson, A.D., & Rhodes, D. (1983). ¹⁴C tracer evidence for synthesis of coline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant Physiol.* **71**, 692-700.
- Hanson, A.D., May, A.M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G.C., & Rhodes, D. (1985). Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3678-3682.
- Hanson, A.D., & Scott, N.A. (1980). Betaine synthesis from radioactive precursors in attached water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* **66**, 342-348.
- Hanson, A.D., & Wyse, R. (1982). Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity. *Plant Physiol.*
- Hart, G.J., & Dickinson, F.M. (1985). Kinetic properties of highly purified preparations of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **203**, 617-627.
- Hartung, W. (1983). The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Environ.* **6**, 427-428.
- Hartung, W., Heilmann, B., & Gimmter, H. (1981). *Plant Sci. Lett.* **22**, 235-242.

- Hempel, J., Nicholas, H., & Lindahl, R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Science* **2**, 1890-1900.
- Henson, I.E. (1984). Effects of atmospheric humidity on abscisic acid accumulation and water status in leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot. (London)* **53**, 1-11.
- Hepler, P.K., & Wayne, R.O. (1985). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 397-439.
- Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L., & Booth, I.R. (1987). *Trends Biochem. Sci.* **12**, 339-344.
- Higgins, C.F., Dorman, C.J., Stirling, D.A., Waddell, L., Booth, I.R., May, G., & Brewer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Cell* **52**, 569-584.
- Hirata, F., & Axelrod, J., (1980). Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* **209**, 1082-1090.
- Hitz, W.D., & Hanson, A.D. (1980). Determination of glycine betaine by pyrolysis gas chromatography in cereals and grasses. *Phytochemistry* **19**, 2371-2374.
- Hitz, W.D., Rhodes, D., & Hanson, A.D. (1981). Radiotracer evidence implicating phosphoryl and phosphatidyl bases as intermediates in betaine synthesis by water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* **68**, 814-822.
- Hochachka, P.W., & Somero, G.N. (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.
- Hsu, L.C., Bendel, R.E., & Yoshida, A. (1988). Genomic structure of the human mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene. *Genomics* **2**, 57-65.
- Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S.Y., & Takabe, T. (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol.* **27**, 307-315.
- Jakoby, W.B. (1963). Aldehyde Dehydrogenase. In: *The Enzymes*, (Boyer, Lardy, and Myrback eds.) 2nd ed., vol. 7, pp. 203-221. Academic Press, New York.
- Johanson, J., von Bahr-Lindström, H., Jeck, R., Woenckhaus, C. & Jörnvall, H. (1988). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase from horse liver: correlations of the same

- species variants from both the cytosolic and the mitochondrial forms of an enzyme. *Eur. J. Biochem.* **172**, 527-533.
- Johnson, R.R., & Moss, D.N. (1976). Effect of water stress on $^{14}\text{CO}_2$ fixation and translocation in wheat during grain filling. *Crop Sci.* **16**, 697-701.
- Jolivet, Y., Larher, F., & Hamelin, J. (1982). Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci. Lett.* **25**, 193-201.
- Jones Jr., D.E., Brennan, M.D., Hempel, J., & Lindahl, R. (1988). Cloning and complete nucleotide sequence of a full-length cDNA encoding a catalytically functional tumor-associated aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1782-1786.
- Jorgens, S.K., Johnson, R.R., & Boyer, J.S. (1978). Dry matter production and translocation in maize subjected to drought during grain fill. *Agron. J.* **70**, 678-682.
- Kates, M., & Marshall, M.O. (1975). Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plants Lipids (Galliard, T., Mercer, E.L.), pp. 115-159. London: Academic.
- Klein, J. (1990). Immunology. In *Antigens and other lymphocyte activating substances*. pp. 269-293. Blackwell Scientific Publications. New York.
- Kok, M., Oldenhuis, R., Van der Linden, M.P.G., Meulenberg, C.H.C., Kingma, J., & Witholt, J. (1989). The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 5442-5451.
- Kramer, P.J. (1969). *Plant Soil Water Relationship A Modern Synthesis*. McGraw Hill Book Company N.Y., Cap. 1, pp. 59-60.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang, V., & Palva, E.T. (1992). *Plant Mol. Biol.* **20**, 951-962.
- Laurie, S., & Stewart, G.R. (1990). The effects of compatible solutes on the heat stability of glutamine synthetase from chickpeas grown under different nitrogen and temperature regimes. *J. Exp. Bot.* **41**, 1415-1422.
- Lehmann, W.D., Schulten, H.-R., & Schröder, N. (1978). Determination of choline and acetylcholine in distinct rat brain regions by stable isotope dilution and field

- desorption mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom* **5**, 591-595.
- Leigh, R.A., Ahmad, N., & Wyn Jones, R.G. (1981) Assessment of glycine betaine and proline compartmentation by analysis of isolated beet vacuoles. *Planta* **153**, 34-41.
- Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandeker, A.M., Smith, L.T., & Valentine, R.C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**, 1064-1068.
- Levitt, J.V. (1972), Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York.
- Levitt, J.V. (1980a), Responses of Plants to Environmental Stresses. 2nd ed., Vol. 1. Academic Press, New York.
- Levitt, J.V. (1980b), Responses of Plants to Environmental Stresses. 2nd ed., Vol 2. Academic Press, New York.
- Li, Y., & Walton, D.C. (1987). Xanthophylls and abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean leaves. *Plant Physiol.* **85**, 910-915.
- Livesey, G. (1984). *Trends Biochem. Sci.* **9**, 27-29.
- Low, P.S. (1986). *Int. Congr. Comp. Physiol. Biochem.*,
- Ludlow, M.M. (1980). Adaptive significance of stomatal responses to water stress. In *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, (Turner, N.C., Kramer, P.J.) pp. 123-138. New York: Wiley.
- Ludlow, M.M. (1987b). Contribution of osmotic adjustment to the maintenance of photosynthesis during water stress. In: Biggins, J. (ed.), *Progress in Photosynthesis Research*, pp. 161-168. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Ludlow, M.M. (1987c). Light stress at high temperature. In: Kyle, D. Artntzen, C. and Osmond, C.B.(eds.), *Photoinhibition, Topics in Photosynthesis*, Vol. 9, pp. 89-110. Elsevier, Amsterdam.
- Ludlow, M.M. (1989). Strategies of Response to Water Stress. Structural and functional responses to environmental stresses. Academic Publishing. The Netherlands. pp. 269-281.
- Ludlow, M.M. & Björkman, O. (1984). Paraheliotropic leaf movement in sitrato as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: damage by excessive light and heat. *Planta.* **161**, 505-518.

- Ludlow, M.M., Chu, A.P.C., Clements, R.J. & Kerslake, R.G. (1983). Adaptation of species of *centrosema* to water stress. *Aust. J. Plant Physiol.* **10**, 119-130.
- Ludlow, M.M., Fisher, M.J. & Wilson, J.R. (1985). Stomatal adjustment to water deficit in three tropical grasses and a tropical legume grown in controlled conditions and in the field. *Aust. J. Plant Physiol.* **12**, 131-149.
- Ludlow, M.M. & Ibaraki, K. (1979). Stomatal control of water loss in siratro (*Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb.), a tropical pasture legume. *Ann. Bot.* **43**, 639-647.
- Ludlow, M.M. & Muchow, R.C. (1988). Critical evaluation of the possibilities for modifying crops for higher production per unit of precipitation. ICRISAT Research on Drought Problems in the Arid and Semi-Arid Tropics. Proc. International Consultants Meeting 17-20 November 1986, ICRISAT Center India Patancheru, A.P. 502 324, India: ICRISAT.
- Manetas, Y. (1990). A re-examination of NaCl effects on phosphoenolpyruvate carboxylase at high (physiological) enzyme concentrations. *Physiol. Plant.* **78**, 225-229.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y., & Karabourniotis, G. (1986). Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase of C₄-halophytes. *Plant Cell Environ.* **9**, 145-151.
- Marrè, E. (1979). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**, 273-288.
- Matoh, T., Yasuoka, S., Ishikawa, T., & Takahashi, E. (1988). Potassium requirement of pyruvate kinase extracted from leaves of halophytes. *Physiol. Plant.* **74**, 675-678.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C. & Hetherington, A.M. (1990). Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature.* **143**, 186-188.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C., Sarsag, M., Webb, A.A.R., & Hetherington, A.M. (1991). Involvement of second messengers in the action of ABA. In: *Abscisic acid. Physiology and Biochemistry* (Davies, W.J. and Jones, H.J. eds.) pp. 137-152. Bios Scientific Publishers. Oxford.
- McCue, F.K., & Hanson D.A. (1992). Effects of soil salinity on the expression of betaine aldehyde dehydrogenase in leaves: investigation of hydraulic, ionic and biochemical signals. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 555-64.
- McDonnell, E., & Wyn Jones, R.G., (1988). Glycine-betaine biosynthesis and accumulation

- in unstressed and salt-stressed wheat. *J. Exp. Bot.* **39**, 421-430
- Mercado, B.T., Malabayabas, C.A., & Gumasing, S.R. (1974). Growth of some rice varieties in NaCl-salinated soil as effected by the season. *Philipp Agric.* **58**, 40-49
- Milborrow, B. V. (1983). In "Abscisic acid". (F.T. Adicot, ed.), pp. 79-111. Praeger, New York.
- Mohapatra, S.S., Poole, R.J., & Dhindsa, R.S. (1988). Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* **87**, 468-473.
- Morgan, J.M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 299-319.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y., & Yamada, H. (1980). Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 3015-3016.
- Mori, N., Yoshida, N., & Kitamoto, Y. (1992). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Fermt. Bioeng.* **73**, 352-356.
- Mudd, S.H., & Datko, A.H. (1986). Phosphoethanolamine bases as intermediates in phosphatidylcholine synthesis by *Lemna*. *Plant Physiol.* **82**, 126-135.
- Mundy, J., & Chua, N.H. (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* **7**, 2279-2286.
- Munns, R., & Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 143-160.
- Murata, N., Mohanty, P.S., Hayashi, H., & Papageorgiou, G.C. (1992). Glycine-betaine stabilizes the association of extrinsic protein with the photosynthetic oxygen-evolving complex. *FEBS Lett.* **296**, 187-189.
- Nakasawa, T., Kawabata, Y., & Ogata, K. (1976). Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 1743-1749.
- Napier, J.A., Chapman, J.M., & Black, M. (1989). Calcium-dependent induction of novel proteins by abscisic acid in wheat aleurone tissue of different developmental stages. *Planta* **179**, 156-164.

- Nash, D., Paleg, L.G., & Wiskich, J.T. (1982). Effect of proline, betaine and some other solutes on the heat stability of mitochondrial enzymes. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**, 47-57.
- Nikolopoulos, D., & Manetas, Y. (1991). Compatible solutes and in vitro stability of *Salsola soda* enzymes: proline incompatibility. *Phytochemistry* **30**, 411-413.
- Nordin, K., Heino, P., & Palva, E.T. (1991). Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh. Plant Mol. Biol.* **16**, 1061-1071.
- Pahlich, E., Kerres, R., & Jäger, H.J. (1983). *Plant Physiol.* **72**, 590-591.
- Paleg, L.G., Douglas, Y.J., van Daal, A., & Keech, D.B. (1981). Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol.* **8**, 107-114.
- Paleg, L.G., Stewart, G.R., & Bradbeer, J.W. (1984). Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* **75**, 974-978.
- Pan, S.M. (1983). The effect of salt stress on the betaine aldehyde dehydrogenase in spinach. *Taiwania* **28**, 128-137.
- Pan, S.M., Moreau, R.A., Yu, C., & Huang, A.H.C. (1981). Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase. *Plant Physiol.* **67**, 1105-1108.
- Papageorgiou, G.C., Fujimura, Y., & Murata, N. (1991). Protection of the oxygen-evolving Photosystem II complex by glycinebetaine. *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 361-366.
- Parry, A.D. (1993). Abscisic acid metabolism. *Methods Plant Biochem.* **9**, 381-402.
- Penefsky, H.S. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 2891-2899.
- Petronini, P.G., De Angelis, E.M., Borghetti, P., Borghetti, A.F., & Wheeler, K.P. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem. J.* **282**, 69-73.
- Pickett, M., Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Elliott, R., Davies, R.W., Lackington, R.A., Scazzocchio, C., & Sealy-Lewis, H.M. (1987). Cloning and characterization of the *aldA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **51**, 217-226.
- Pla, M., Gómez, J., Goday, A., & Pagès, M. (1991). Regulation of the abscisic acid-responsive gene *rab28* in maize *viviparous* mutants. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 394-400.

- Pollard, A., & Wyn Jones, R.G., (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **144**, 291-298.
- Pulich, W.M., Jr. (1986). *Plant Physiol.* **80**, 283-286.
- Raison, J.K., Berry, J.A., Armond, P.A., & Pike, C.S. (1980) Membrane properties in relation to the adaptation of plants to temperature stress. In *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, (Turner, N.C., Kramer, P.J.) pp. 261-273. Wiley, New York.
- Ranjeva, R., Carrasco, A., & Boudet, A.M. (1988). Inositol trisphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cells. *FEBS Lett.* **230**, 137-141.
- Raschke, K. (1975). Stomatal action. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**, 309-340.
- Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A., & Hanson, A.D. (1994). Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* **193**, 155-162.
- Rawson, H.M., Turner, N.C., & Begg, J.E. (1978). Agronomic and physiological responses of soybean and sorghum crops to water deficit. IV. Photosynthesis, transpiration and water use efficiency of leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **5**, 195-209.
- Rhodes, D., Handa, S., & Bressan, R.A. (1986). Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* **82**, 890-903.
- Rhodes, D., Rich, J.P., Myers, A.C., Reuter, C.C., & Jamieson, G.C. (1987). Determination of betaines by fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Physiol.* **84**, 781-788.
- Robinson, S.P., & Jones, G.P. (1986). Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 659-668.
- Roughan, P.G., & Slack, C.R. (1976). Is phospholipase D really an enzyme? A comparison of *in situ* and *in vitro* activities. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, 86-95.
- Sano, M., Ohya, K., Kitaoka, H., & Ito, R. (1982). Field desorption mass spectrometry of betaine hydrohalides. *Biomed. Mass Spectrom* **9**, 438-442.
- Schroeder, J.I., & Hedrich, R. (1989). Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends Biochem. Sci.* **14**,

187-192.

- Schröppel-Meier, G., & Kaiser, W.M. (1988). Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. *Plant Physiol.* **87**, 822-827.
- Schueler, B., & Krueger, F.R. (1979). Spectra of quaternary ammonium salts taken by fission-fragment and laser-induced desorption. *Org. Mass Spectrom* **14**, 439-441.
- Schumaker, K.S., & Sze, H. (1987). Inositol 1,4,5-trisphosphate release Ca^{2+} from vacuolar membrane of oat roots. *J. Biol. Chem.* **262**, 3944-3946.
- Schwab, K.B., & Gaff, D.F. (1990). Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfiensis* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. *J. Plant Physiol.* **137**, 208-215.
- Schwab, K.B., & Heber, U. (1984). *Planta*. **161**, 37-45.
- Seemann, J.R., Downton, W.J.S., & Berry, J.A. (1986). Temperature and leaf osmotic potential as factors in the acclimation of photosynthesis to high temperature in desert plants. *Plant Physiol.* **80**, 926-930.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L., Rodríguez-Nester, C., & Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1553-1558.
- Selinioti, E., Nikolopoulos, D., & Manetas, Y. (1987). Organic cosolutes as stabilizers of phosphoenolpyruvate carboxylase in storage: an interpretation of their action. *J. Plant Physiol.* **14**, 203-210.
- Sen, D.N., & Chawan, D.D. (1975). Role of abscisic acid in the closure of stomata in some arid zone plant species. *Biol. Plant* **17**, 198-201.
- Sheriff, D.W. & Ludlow, M.M. (1984). Physiological reactions to an imposed drought by *Macroptilium atropurpureum* and chenchrus ciliaris in a mixed sward. *Aust. J. Plant Physiol.* **11**, 23-34.
- Sheriff, D.W., Fisher, M.J., Rusitzka, G. & Ford, C.W. (1986). Physiological reactions to an imposed drought by two twining pasture legume: *Macroptilium atropurpureum* (desiccation sensitive) and *Galactia triata* (desiccation insensitive). *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 431-445.

- Shomer-Ilan, A., Jones, G.P., & Paleg, L.G. (1991). In vitro thermal and salt stability of pyruvate kinase are increased by proline analogues and trigonelline. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**, 279-286.
- Skiba, W.E., Taylor, M.P., Wells, M.S., Mangum, J.H., & Awad, W.M. (1982). Human hepatic methionine biosynthesis. Purification and characterization of betaine homocysteine S-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **257**, 14944-14948.
- Skriver, K., & Mundy, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2**, 503-512.
- Smillie, R.M., & Nott, R. (1979). Heat injury in leaves of alpine, temperate and tropical plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **6**, 135-141.
- Smirnoff, N., & Stewart, G.R. (1985). Stress metabolites and their role in coastal plants. *Vegetatio* **62**, 273-278.
- Somero, G.N., & Low, P.S. (1976). Temperature: a 'shaping force' in protein evolution. *Biochem. Soc. Symp.* **41**. London: Biochem. Soc. 33-42.
- Steponkus, P.L. (1980). Genetic Engineering of Osmoregulation. Impact on Plant Productivity for Food, Chemicals and Energy (D.W. Rains, R.C. Valentine, and A. Hollaender, eds.), pp. 235-255. Plenum, New York.
- Steponkus, P.L. (1984). *Annu Rev. Plant Physiol.* **35**, 543-584.
- Stewart, G.R., & Lee, J.A. (1974). *Planta* **120**, 279-289.
- Stewart, G.R., Larher, F., Ahmad, I., & Lee, J.A. (1979). Ecological Processes in Coastal Environments (R.L. Jefferies and A.J. Davy, eds.), pp. 211-227. Blackwell, Oxford.
- Stewart, C.R., and Voetberg, G. (1987). Abscisic acid accumulation is not required for proline accumulation in wilted leaves. *Plant Physiol.* **83**, 747-749.
- Storey, R., Ahmad, N., & Wyn Jones, R.G. (1977). Taxonomic and ecological aspects of the distribution of glycine betaine and related compounds in plants. *Oecologia* **27**, 319-332.
- Strom, A.R., Le Rudulier, D., Jakowec, M.W., Bunnell, R.C., & Valentine, R.C. (1983). Genetic Engineering of Plants (T. Kosuge, C.P. Meredith, and A. Hollaender, eds.), pp. 39-59. Plenum, New York.
- Sung, F.J.M., & Krieg, D.R. (1979). Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and

- translocation of ^{14}C carbon to water stress. *Plant Physiol.* **64**, 852-856.
- Tagawa, T., & Ishizaka, N. (1963). Physiological studies on the tolerance of rice plants to salinity. II. Effects of salinity on the absorption of water and chloride ion. *Proc. Crop. Sci. Soc. Jap.* **31**, 337-341.
- Takhtajan, A. (1969). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA.
- Tanaka, K., Tolbert, N.E., & Gohlke, A.F. (1966). Choline kinase and phosphorylcholine phosphatase in plants. *Plant Physiol.* **41**, 307-312.
- Teeri, J.A. (1980). Adaptation of kinetic properties of enzymes to temperature variability. in *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, (Turner, N.C., Kramer, P.J.) pp. 251-260. Wiley, New York
- Teutonico, R.A., & Knorr, D. (1985). Amaranth composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technol.* **39**, 49-61.
- Treichel, S., Brinckmann, E., Scheitler, B., & von Willert, D.J. (1984). *Planta* **162**, 236-242.
- Unger, S.E., Vincze, A., Cooks, R.G., Chrisman, R., Rothman, L.D. (1981). Identification of quaternary alkaloids in mushroom by chromatography/secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem.* **53**, 976-981.
- Valdes-Rodríguez, S., Segura-Nieto, M., Chagolla-Lopez, A., Verver y Vargas-Cortina, A., Martínez Gallardo, N. & Blanco-Labra, A. (1993). Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds. *Plant Physiol.* **103**, 1407-1412.
- Valenzuela-Soto, E.M., & Muñoz-Clares, R.A. (1993). Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biochem. Chem.* **15**, 23818-23824.
- Valenzuela-Soto, E.M., & Muñoz-Clares, R.A. (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* **143**, 145-152.
- Waechter, C.J., & Lester, R.L. (1973). Differential regulation of the N-methyltransferases responsible for phosphatidylcholine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 401-410.

- Walker-Simmons, M., Kudrna, D.A., & Warner, R.L. (1989). Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol* **90**, 728-733.
- Walton, D. C. (1980). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 453-489.
- Weigel, P., Weretilnyk, E.A. & Hanson, A.D. (1986). Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **82**, 753-759.
- Weretilnyk, E.A., Bednarek, S., McCue, K.F., Rhodes, D., & Hanson, A.D. (1989). Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of the dicotyledons. *Planta* **178**, 342-352.
- Weretilnyk, E.A., & Hanson, A.D. (1988) Betaine aldehyde dehydrogenase polymorphism in spinach: genetic and biochemical characterization. *Biochem. Genet.* **26**, 143-151.
- Weretilnyk, E.A., & Hanson, A.D. (1989). Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of mRNA, and regulation by salinity. *Act. Biochem. Biophys.* **271**, 56-63.
- Weretilnyk, E.A., & Hanson, A.D. (1990). Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 2745-2749.
- Wyn Jones, R.G. (1980). In *Genetic engineering of osmoregulation: impact on plant productivity for food, chemicals and energy*. (Rains, D.W., Valentine, R.C., & Hollaender, A. eds). pp. 155-170. Plenum, New York.
- Wyn Jones, R.G., & Storey, R. (1981). *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance* (Paley, L.G., Aspinall, D. eds) Academic. Sydney.
- Wyn Jones, R.G., Storey, R., Leight, R.A., Ahmad, N., & Pollard, A. (1977), In *Regulation of Cell Membrane Activities in Plants* (Marre, E. & Ciferri, C. eds). pp. 121-136. North Holland. Amsterdam.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., & Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* **33**, 217-224.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1993). Characterization of the expression of a

dessication-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 331-340.

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

Zeevaert, J.A.D., & Creelman, R.A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 439-473.

Zhukovskaya, N.V. (1962). The Phosphorous metabolism of tomatoes on saline soil. (Notes on the 4th Sci. Conf. of Grad. Students). Rostov.Univ.Rostov-on-Don 239-241.

Ref.zh.Biol. 1963. No.17627.