

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO DE CÉLULAS
DE *Bouvardia ternifolia* CULTIVADAS *in vitro*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA

RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JESÚS FERNANDO MONTIEL
AGUIRRE

MÉXICO D. F.

JUNIO, 2004



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.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Evolución del Concepto de Estrés en Biología	5
2.2. Definición de Estrés	6
2.3. Clasificación del Estrés	6
2.4. Estrés por Choque Calórico	7
a) familia Hsp 70	8
b) familia Hsp 60	9
c) regulación de la respuesta al choque térmico	10
2.5. Estrés por Sal de Sodio	13
2.6. Estrés por Agua y Deshidratación	16
a) adaptaciones fenológicas	18
b) adaptaciones morfológicas	18
c) adaptaciones fisicoquímicas y bioquímicas	18
2.7. Resistencia al Estrés	19
2.8. Fisiología de la Regulación Osmótica	20
a) síntesis y transporte de solutos osmoprotectores	23
b) acumulación de solutos en respuesta a estrés osmótico	23
c) glicinabetaína	24
d) prolina	25

2.9. Regulación de la Respuesta a Estrés Osmótico	28
2.10. Metabolismo Nitrogenado en Plantas	33
a) glutamato deshidrogenasa (GDH)	36
b) glutamino sintetasa (GS)	37
c) glutamato sintetasa (GOGAT)	40
2.11. La Influencia del Estrés por Sal Sobre el Metabolismo Nitrogenado	42
3. HIPÓTESIS	44
4. OBJETIVOS GENERALES	45
5. OBJETIVOS PARTICULARES	46
6. MATERIAL Y MÉTODOS	47
6.1. Modelo Experimental	47
6.2. Cultivo <i>in vitro</i> de Células de <i>Bouvardia ternifolia</i>	50
Obtención de cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. ternifolia</i> en medio sólido y en suspensión.	50
6.3. Adaptación de Células de <i>B. ternifolia</i> a Concentraciones Crecientes de NaCl	51
6.4. Curvas y Parámetros de Crecimiento de Células en Suspensión de <i>B. ternifolia</i> Control y en Condiciones de Estrés Salino de Cultivos en Suspensión	55
a) determinación del volumen relativo de paquete celular (VRPC)	55
b) determinación del peso fresco	55
c) determinación del peso seco	56
d) preparación de polvos de acetona	56
e) determinación del contenido de proteína total.	56

6.5. Estudios Morfológicos de Células de <i>Bouvardia ternifolia</i> Control y Adaptadas a Diferentes Concentraciones de NaCl	57
a) tinción de células con acetorceína	58
b) determinación del volumen nuclear y nucleolar	58
c) determinación de almidón en gránulos citoplásmicos de células control y adaptadas	58
6.6. Cuantificación de Prolina en Células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl	59
6.7. Medición de la Actividad Enzimática de Glutamato Deshidrogenasa (GDH) de Células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas a NaCl	59
a) determinación de la actividad aminativa de GDH-NADH	60
b) determinación de la actividad desaminativa de GDH-NAD ⁺	61
c) cuantificación de proteína por el método de Bradford	61
6.8. Medición de la Actividad Enzimática de la Glutamino Sintetasa (GS)	62
6.9. Curvas y Parámetros de Crecimiento de Células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas en un Medio Suplementado con Glutamina	63
6.10. Electroforesis de Proteínas Totales en Geles de Poliacrilamida-SDS	63
a) preparación de geles PAGE-SDS	64
b) preparación de muestras para electroforesis en geles PAGE-SDS	65
c) tinción de geles con azul de Coomassie	66
d) tinción de geles en sales de plata	66
e) deshidratación de geles PAGE-SDS	67
6.11. Marcado Radiactivo <i>in vivo</i> de Proteínas Totales con Metionina ³⁵ S	68
a) Marcaje de células control y adaptadas de <i>B. ternifolia</i>	68

b) Marcaje de células de <i>B. ternifolia</i> chocadas con diferentes concentraciones de NaCl	69
6.12. Electroforesis de Proteínas Totales Radiactivas de Células Control, Adaptadas y Chocadas con NaCl en geles PAGE-SDS	70
6.13. Fluorografías de Proteínas Radiactivas en Geles PAGE-SDS Metionina ³⁵ S.	70
6.14. Revelado de Placas de Rayos X	71
7.0. RESULTADOS	72
7.1. Cultivo <i>in vitro</i> de Células de <i>B. ternifolia</i> en Medio Sólido y en Suspensión	72
a) Curvas de crecimiento de células de <i>Bouvardia ternifolia</i> control cultivadas en suspensión.	72
b) Curvas de crecimiento de células de <i>B. ternifolia</i> , cultivadas en suspensión y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.	73
7.2. Parámetros de Crecimiento de Células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl	74
a) análisis del Volumen Relativo del Paquete Celular (VRPC)	74
b) análisis del peso fresco	74
c) análisis del peso seco	77
d) análisis de la cantidad de proteína total	77
e) reversibilidad del fenómeno de adaptación	81
7.3. Estudios Morfológicos de Células de <i>B. ternifolia</i> Adaptadas a diferentes Concentraciones de NaCl.	84
a) observaciones en microscopía de luz	84
b) volumen nuclear y nucleolar de células adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl	91

7.4. Cuantificación de Prolina	96
7.5. Actividad de Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas a diferentes Concentraciones de NaCl	98
7.6. Actividad de Glutamina Sintetasa (GS) en Células Control y adaptadas	98
7.7. Efecto de la Adición de Glutamina Sobre el Crecimiento de las células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas a 170 mM de NaCl	103
7.8. Patrones Electroforéticos de Proteínas Totales de Células de <i>B. ternifolia</i> Control y Adaptadas a Diferentes Concentraciones de NaCl.	109
7.9. Patrones Electroforéticos de Proteínas Totales Marcadas con Metionina ³⁵ S de Células Control, Adaptadas y Chocadas con diferentes concentraciones de NaCl en geles de PAGE-SDS	112
8.0. DISCUSIÓN	116
9.0. CONCLUSIONES	122
10.0 REFERENCIAS	124

PREFACIO

La manera de explicar los fenómenos que ocurren en los seres vivos tiene un origen común con las metodologías que pretendían explicar otros fenómenos naturales, pero ha tendido a divergir con el transcurrir del tiempo. Así, mientras el mundo natural puede ser estudiado a través de causas-efectos, la discusión acerca de cuáles son los patrones de explicación válidos en la biología ha llevado a cabo la revolución biológica del siglo XX, la cual hizo ver la importancia de la explicación por mecanismos genéticos y moleculares.

El concepto de estrés se ha reticulado, a través de la historia de la ciencia, como un recurso explicativo útil y necesario para asociar las causas y los efectos en el contexto de la biología moderna.

Este trabajo aborda y trata de explicar algunos fenómenos de la respuesta al estrés salino por parte de las células vegetales cultivadas *in vitro*. En torno a este problema se han originado varias posturas, fisiológicas, morfológicas y bioquímicas para tratar de explicar la respuesta al estrés. El patrón de explicación generado implica un sinnúmero de factores involucrados que pueden llevarnos por distintos caminos hacia el resultado del fenotipo final. Hoy en día, el problema de cómo actúan los genes en la estructuración del fenotipo total persiste pese al avance de nuestro conocimiento en torno a los mecanismos moleculares implicados. El problema no es exclusivamente genético pues, como veremos a lo largo de este trabajo, importantes cuestiones, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas se encuentran involucradas en esta problemática.

Debo mi interés en la investigación al Dr. Montiel quién en una materia optativa denominada "Campos de frontera de la biología molecular" me introdujo a ella a través de lecturas clásicas y de frontera y de sus maravillosas ponencias sobre la filosofía de la ciencia, Además, fue un gran incentivo en la elección de mi área de interés.

La materialización del problema a estudiar, "respuesta al estrés salino", la encontré en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química y fui en extremo afortunada cuando, al tocar las puertas del laboratorio, fui recibida y apoyada para desarrollar el tema de mi particular interés, lo cual ha significado para mi un apoyo y un estímulo académico irrecompensables. El tiempo que he pasado en el laboratorio con el Dr. Montiel y mis compañeros de trabajo ha sido por demás formativo y estimulante. No duden que han sembrado en mí el interés y el entusiasmo para continuar mi vida como bióloga; heredé de ustedes el compromiso de la docencia y la investigación.

Durante el tiempo que tardé en escribir esta tesis fui encontrando en mi camino a personas maravillosas como: Héctor, José Luis, Nahanny, Perla, Susana, Ofelia, Silvia y Laura, que contribuyeron a que este trabajo se enriqueciera.

Debo dar un especial agradecimiento y reconocimiento al M. en C. José Luis Busto, por su paciencia, disposición y su ayuda desinteresada durante la elaboración de esta tesis. Tenerla no hubiera sido posible sin su apoyo, quien además siempre ha permanecido a mi lado, con notable entusiasmo y compromiso. Gracias también por estos tiempos en el laboratorio donde consolidé más nuestra amistad.

Por supuesto, quisiera agradecer a Fernando su paciente apoyo, cariño y amor en los eventos difíciles de estos últimos años, no los habría sobrevivido con seguridad sin tu abrazo nocturno y a mis pequeños amores Fer, Alex, Andrea y Andy quienes han llenado nuestras vidas con sus sonrisas.

Respuesta al Estrés Salino de Células en Cultivo de *Bouvardia ternifolia* cultivadas *in vitro*.

1. RESUMEN

La respuesta de las células glicofitas a estímulos estresantes es un fenómeno de tipo multifactorial que abarca niveles fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Con el objeto de estudiar algunos de los posibles mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la adaptación de células de plantas glicofitas cultivadas *in vitro* a concentraciones elevadas de sal (NaCl), hemos generado líneas celulares de *Bouvardia ternifolia* capaces de crecer en un medio nutritivo adicionado con diferentes concentraciones de NaCl (85, 170, 260 y 340 mM). Observamos que conforme avanza el proceso de adaptación a concentraciones crecientes de NaCl las células presentan cambios en su velocidad de crecimiento, además de presentar cambios característicos en su morfología, disminuyendo de tamaño, acumulando gran cantidad de gránulos citoplásmicos y aumentando el volumen nuclear y nucleolar.

Dentro de los ajustes bioquímicos conocidos, destaca la síntesis de moléculas que podrían jugar un importante papel en el mantenimiento de la osmolaridad celular. Frecuentemente, este tipo de moléculas son aminoácidos o derivados de aminoácidos, por lo que decidimos estudiar la actividad de algunas enzimas claves del metabolismo nitrogenado durante este proceso adaptativo.

El proceso adaptativo de *B. ternifolia* a concentraciones crecientes de NaCl implica, entre otras cosas, la síntesis aumentada de prolina, así como una significativa disminución en la actividad tanto aminativa como desaminativa de la glutamato deshidrogenasa y en la actividad de la glutamino sintetasa. Si bien la drástica disminución de estas actividades posiblemente permite a la célula vegetal una síntesis más eficiente de prolina, también es posible que muchos otros procesos metabólicos se vean afectados por deficiencia relativa de glutamina. Asimismo, hemos estudiado las modificaciones que se presentan en el patrón electroforético de proteínas totales durante la adaptación de las células a concentraciones crecientes de sal.

El análisis de las bandas polipeptídicas en geles de poliacrilamida muestran patrones característicos para cada línea celular. Dichos patrones son diferentes a los reportados para células adaptadas de *N. tabacum*, lo cual sugiere la posible existencia de diferentes mecanismos bioquímicos y moleculares entre las plantas en la adaptación al estrés por sal.

1. Introducción

A lo largo de muchos millones de años, la forma de vida de los organismos animales y vegetales ha variado enormemente. El primero en proponer que las especies de plantas y animales podían cambiar con el tiempo, fue Charles Erasmus Darwin a fines del siglo XVIII, quién escribió un relato sobre la evolución y, poco después, empezó a especular sobre la mutabilidad de las especies (Leakey, R. 1985). No fue sino hasta 1840 que Charles Darwin (nieto de Erasmus), propuso un mecanismo para explicar cómo las especies podrían cambiar a través del tiempo (selección natural).

Por otra parte, con los trabajos de Mendel, Morgan, Johansen, Huxley etc., se determinó que la unidad hereditaria era el gen y que éste, interactuando con el medio ambiente, determinaba las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los organismos (Ayala y Kiger, 1984).

Asimismo, con los estudios realizados por G. Beadle y E. Tatum en la década de 1940 (Castañeda, 1985) que llevaron al descubrimiento del principio "un gen, una proteína", se demostró que la variabilidad genética trae como consecuencia la variabilidad bioquímica de los organismos (Dobzhansky, 1980).

Fue a través de una serie de descubrimientos del siglo XX que se pudieron estudiar las bases químicas, físicas y biológicas de los mecanismos de la herencia. Con ello, se pudieron empezar a manejar aspectos muy importantes para tratar de entender cómo es que las células de los organismos perciben los cambios del medio ambiente y cómo se adaptan a ellos.

Fueron precisamente F. Jacob y J. Monod (1961) quienes en base a múltiples estudios propusieron el modelo del operón en procariontes para tratar de explicar la regulación génica, es decir, el mecanismo por medio del cual se inactivan y se activan genes dependiendo de las condiciones del medio (Castañeda 1985). A partir de estos estudios, los conocimientos sobre la adaptación bioquímica en procariontes fue aumentando (Lewin, 1978; Lewin, 1977).

Sin embargo, a pesar de los enormes avances de la biología molecular durante los últimos 30 años, hoy en día los conocimientos moleculares detallados e integrados sobre la respuesta a nivel celular de los organismos superiores son relativamente escasos, debido principalmente a la enorme complejidad genética y bioquímica de los eucariontes. A pesar de ello, las investigaciones sobre la adaptabilidad de los organismos continúan y se han obtenido resultados muy interesantes sobre la interacción de dichos organismos con muy diversos medios (Alberts, *et al.*, 1997; Rodríguez, 1978; Lewin, 1987, Munns, 1993).

La complejidad de los ecosistemas se debe, fundamentalmente, a la capacidad de los organismos para adaptarse a un sinúmero de habitats. Las interacciones de los organismos y su medio ambiente han variado enormemente y, como consecuencia, los organismos reaccionan de diferentes formas, ya sea alterando únicamente su fenotipo o bien, alterando su composición genética (Dobzhansky, 1980).

La reacción de los organismos frente a cambios ambientales depende de las características genéticas de los individuos, así como de la gran variabilidad genética que constantemente se genera en las diferentes poblaciones (Dobzhansky, 1980). Asimismo, la tolerancia de los organismos a los factores ambientales se modifica por la selección natural (Krebs, 1985). Por ejemplo; el pasto *Agrotis tenuis* se ha desarrollado a partir de poblaciones que vivían en los desechos de las minas de Inglaterra (Antonovis y cols., 1971). Este suelo, que contiene desechos de minas, está contaminando con elevadas concentraciones de plomo y zinc, por lo que los tipos comunes de pastos no sobreviven en el suelo (Krebs, 1985).

El conocimiento de estos tipos de cambios evolutivos estimuló la realización de estudios más profundos para tratar de entender las alteraciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares que ocurren en los organismos como resultado de las alteraciones del medio ambiente. Esto ha sido posible estudiando la adaptación evolutiva mediante la tolerancia a diferentes factores fisicoquímicos, como por ejemplo, los límites de temperatura dentro de los cuales sobreviven dos especies de peces: el pez gato y el salmón perro. En este caso, el pez gato nebuloso (*Ameiurus nebulosus*) es una especie muy tolerante a temperaturas relativamente elevadas (38°C), en comparación con el salmón perro

(*Oncorhynchus keta*) cuya temperatura para su óptimo desarrollo es de 24^o C (Krebs, 1985).

2.1. Evolución del concepto de estrés en biología.

En 1936 Hans Selye fue el primero en emplear el término estrés en biología ya que al trabajar con ratas demostró que cuando éstas eran severamente dañadas por agentes nocivos tales como exposición a frío, heridas quirúrgicas, producción de choque espinal, ejercicio muscular excesivo o intoxicaciones con diversas dosis de fármacos (adrenalina, atropina, morfina, formaldehído, etc.), se producía un "síndrome" típico. Las manifestaciones de dicho "síndrome" eran independientes de la naturaleza del agente dañino o del tipo de fármaco empleado, presentando así una respuesta rápida al daño. El "síndrome" se desarrolla en tres estados; el primer estado se manifiesta como una "reacción general de alarma del órgano", en el transcurso de las primeras 6 a 48 horas subsecuentes al daño inicial. En el segundo estado, el crecimiento en general se detiene y las gónadas se atrofian; en los animales en período de lactancia cesa la producción de leche. La apariencia y fisiología de los organismos regresa parcialmente a la normalidad al cesar la acción del agente nocivo.

El tercer estado se presenta cuando el estímulo dañino continúa y los animales pueden llegar a resistir, aún con la continuación de un tratamiento severo, por un período hasta de tres meses. El tercer estado puede denominarse como "síndrome general de adaptación", en el cual el organismo se adapta a las nuevas condiciones (Selye, 1936).

Ritossa, en 1962, realizando estudios citológicos con células de las glándulas salivales de *Drosophila buskii* pudo observar en cromosomas politénicos que durante las diferentes etapas de desarrollo, éstos van adquiriendo mayor grosor en distintas regiones; cada engrosamiento parecía ser el resultado de un cambio específico en el patrón de la expresión génica. Asimismo, Ritossa pudo observar un nuevo patrón de engrosamientos después de someter a las glándulas salivales a temperaturas ligeramente elevadas (30^oC, siendo la temperatura óptima de crecimiento de estas células 25^oC). El patrón de engrosamientos aparecía uno o dos minutos después del aumento de temperatura y se continuaba durante los siguientes 30 a 40 minutos. Los "puffs" o engrosamientos, son sitios de gran

actividad génica (amplificación de genes) que dependen de diferentes factores fisiológicos y medioambientales (Ritossa, 1962).

Posteriormente, Tissières y colaboradores demostraron que simultáneamente a los engrosamientos cromosómicos inducidos por un choque térmico de 37.5°C durante 20 minutos, se presenta una tasa elevada de síntesis de un grupo de proteínas denominadas "proteínas de choque calórico". Demostraron que dichos engrosamientos cromosómicos representaban sitios del DNA en donde se producían nuevos RNAm específicos que llevan la información genética para sintetizar dichas proteínas (Tissières *et al.*, 1974).

2.2. Definición de estrés

El estrés se define como cualquier condición del medio ambiente que pudiera reducir o modificar de manera adversa el crecimiento, desarrollo o funcionamiento de un organismo (Levitt, 1980).

Si este cambio es suficientemente severo, da lugar a un daño permanente que puede progresar hasta la muerte (Levitt, 1980).

2.3. Clasificación del Estrés.

El estrés ambiental se ha dividido en dos grandes grupos: el estrés biótico y el abiótico (fisicoquímico). En la figura 1 se muestra cómo se han clasificado los diversos tipos de agentes estresantes que se han estudiado. Dentro del estrés fisicoquímico se encuentran cuatro subgrupos principales y uno más en el cual se han conjuntado aquellos que no entran en los otros grupos (Levitt, 1980).

En años recientes, se ha estudiado la respuesta de las células procariontes y eucariontes a diversos tipos de estrés como son: el aumento de la temperatura, la ausencia de nutrientes, de oxígeno, las alteraciones metabólicas, etc., y se ha visto que éstas responden frecuentemente con el incremento de una familia de proteínas conocidas como proteínas de estrés (Young y Elliot, 1989).

Las proteínas de estrés están muy conservadas a lo largo de la evolución, desde *Bacteria*, pasando por *Archea* hasta *Eucarya* y se ha encontrado que algunas de ellas están involucradas en procesos que son vitales para la célula que crece en condiciones fisiológicas (Young y Elliott, 1989).

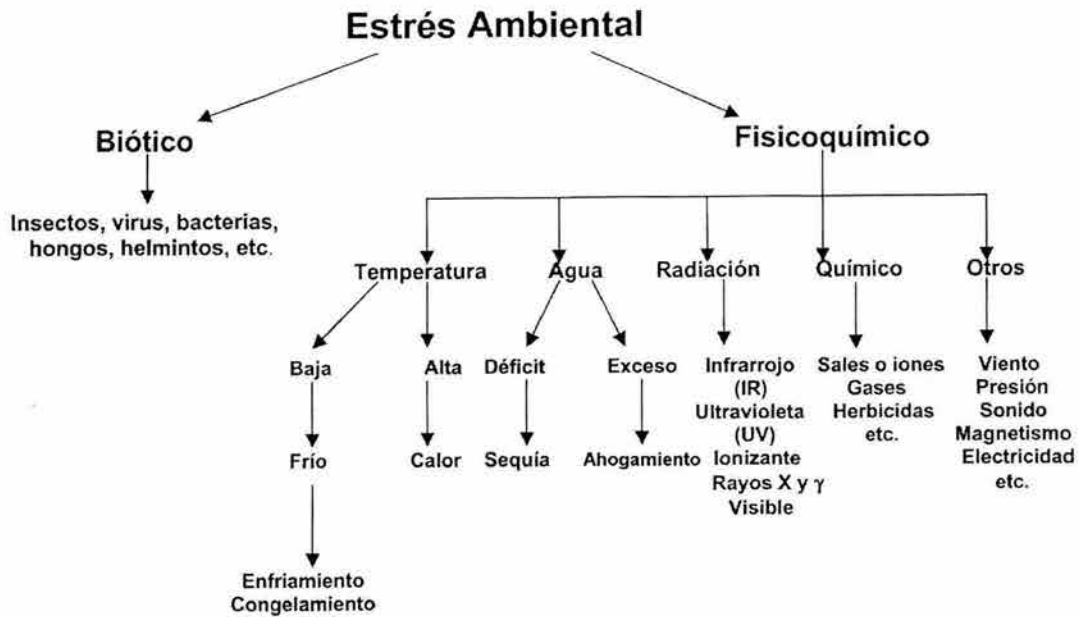


Figura No. 1 Clasificación de diversos tipos de estrés ambiental.

2.4. Estrés por Choque Calórico

El tipo de estrés inicialmente estudiado tanto a nivel bioquímico como molecular ha sido el que se produce con el incremento de temperatura en el cultivo de células de *Drosophila melanogaster*. Como se mencionó anteriormente, se observó que cuando se sometían a 37°C a células que habitualmente crecían a 25°C, éstas suprimían de manera brusca la producción de la mayor parte de las proteínas que se sintetizaban en las células control y al mismo tiempo aparecían otras proteínas que presentaban pesos moleculares de 22,000 a 82,000 daltones (Ashburner y Bonner, 1979). Además, inicialmente se demostró que estas proteínas de choque calórico (heat shock) son sintetizadas aparentemente a partir de mensajeros que fueron transcritos poco después de haber ocurrido la variación en la temperatura y no a partir de mensajeros ya pre-existentes (Ashburner y Bonner, 1979). Se ha sugerido que estas proteínas podrían estar involucradas en mecanismos de defensa de la célula a las agresiones del medio ambiente (Wisniewski *et al.*, 1996). Sin embargo, todavía no se ha podido demostrar

directamente alguna función de defensa específica en las proteínas de choque calórico de las células de *Drosophila melanogaster*.

Las células sujetas a estrés por choque calórico pueden acumular proteínas desnaturalizadas o plegadas de una manera anormal, además de formar agregados proteicos intracelulares (Vierling, E., 1991, Krishna *et al.*, 1995). Ello desencadena una respuesta en la que participan otras proteínas cuya función es la de prevenir la desnaturalización y, posiblemente, la formación de tales agregados por inhibición de interacciones incorrectas, permitiendo así el reensamble correcto (Pelham, 1989). Dichas proteínas han sido denominadas "chaperonas moleculares" en eucariontes (chaperoninas en procariontes y organelos celulares) ya que se unen a proteínas participando en su plegamiento, ensamble y transporte correcto y no son componentes de la estructura funcional final (Hemmingsen *et al.*, 1988, Hendrik y Hartl, 1993, Ellis y Van der Vies, 1991).

Actualmente se distinguen dos familias de chaperonas moleculares muy conservadas a lo largo de la evolución. La mayoría de los miembros de estas familias son expresados constitutivamente, aún en ausencia de algún tipo de estrés (Lindquist y Craig, 1988, Ellis y Vander Vies, 1991).

a) Familia Hsp 70.

En eucariontes se ha encontrado que las proteínas de "choque calórico" como hsp90, hsp70 y hsp60 parecen estar asociadas a los procesos de ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos y que algunos miembros de la familia hsp70 son importantes en la translocación de ciertas proteínas de la membrana (Vierling, 1991, Cheng *et al.*, 1989; Kreibich *et al.*, 1978; Lindquist y Craig, 1988, Beckman *et al.*, 1990). Algunos miembros de la familia hsp70 se unen al complejo de replicación del DNA (Skowyra *et al.*, 1990); otros ayudan a la estabilización de proteínas no plegadas antes de su ensamblaje en citoplasma (Beckman *et al.*, 1990, Anderson *et al.*, 1994), a la translocación de proteínas dentro de organelos incluyendo retículo endoplásmico y mitocondria (Craig *et al.*, 1987, Murakami *et al.*, 1988), al rearreglo de proteínas oligoméricas (Rothman, 1989) y a la disolución de agregados proteicos (Pelham, 1988, Vierling, 1991).

Li *et al.*, (1991), transformando fibroblastos de rata con el gen humano de la hsp70, demostraron que la sobreexpresión de este gen les confiere resistencia permanente a un incremento en la temperatura del cultivo. Las diferentes líneas celulares de rata que expresan el gene hsp70 humano en diferentes cantidades muestran resistencia proporcional al calor con lo que se sustenta más la hipótesis de que una de las funciones de las hsp70 es la de proteger a la célula del daño por calor (Skowrya *et al.*, 1990, Hernández y Vierling, 1993).

Algunas proteínas inducidas por estrés parecen estar interaccionando con otras proteínas muy diferentes a ellas. Por ejemplo, hsp90 parece estar asociada funcionalmente con actina, tubulina y cinasas, así como con receptores de hormonas esteroides tales como estrógenos y progesterona (Vierling, 1991, Krishna *et al.*, 1995).

Existe confusión en el uso del término "hsp" para describir a todos los miembros de estas familias dada la diferencia en su respuesta al choque térmico. Craig y Gros (1991), (Vierling, 1991) han sugerido los términos "estrés 70" y "estrés 90" para miembros de las familias de 70 kDa y 90 kDa, respectivamente. Los miembros de la familia de 60 kDa (groEL/hsp60) son descritos por el término de "chaperonina-60" (Hemmingsen *et al.*, 1988; Goloubinof *et al.*, 1989, Brai, *et al.*, 1993).

b) Familia Hsp60

En plantas superiores las proteínas de la familia hsp60 interaccionan con la ribulosa difosfato carboxilasa (rubisco) durante el proceso de fijación del carbono en los cloroplastos (Hemmingsen *et al.*, 1988; Vierling, 1991, De Rocher y Bohner, 1993).

En bacterias también han sido identificadas proteínas hsp 60 relacionadas con GroES o GroEL, mismas que poseen un alto grado de similitud en sus secuencias de aminoácidos (Zeilstrá *et al.*, 1991). Se ha demostrado experimentalmente que es posible expresar y ensamblar rubisco de cianobacteria en *E. coli* (Gatenby *et al.*, 1985), y que es factible la utilización de genética molecular bacteriana para probar si los productos del gen **GroEL** están involucrados en el ensamble *in vivo* de rubisco (Gatenby y Ellis, 1990, Zeilstrá *et al.*, 1991). Estos experimentos fueron

la base para sobreproducir chaperoninas y detectarlas por el incremento del ensamble de rubisco. Ambos experimentos resultaron exitosos y verificaron el papel de GroES y GroEL en el ensamble de esta enzima (Goloubinoff *et al.*, 1989).

En un intento por definir el papel de las chaperoninas en células bacterianas, se han utilizado técnicas de supresión genética, pues el plegamiento de polipéptidos puede verse afectado por la temperatura y además se sabe que algunas mutaciones sensibles al calor pueden producir plegamientos alterados (Langer *et al.*, 1992). La exposición de polipéptidos a temperaturas no permisibles, provoca la desestabilización de algunos intermediarios del plegamiento, cuya consecuencia es la agregación y proteólisis de dichos polipéptidos ocasionando cambios en la tasa de crecimiento de los microorganismos (Viitanen *et al.*, 1991, Zavaleta *et al.*, 1992).

De esta manera, al usar mutantes e incubarlas en un intervalo de temperatura que podría afectar su crecimiento, se demostró que se incrementó la expresión de las chaperoninas **GroEL** cuyo papel podría ser el de ayudar a corregir el ensamble y/o plegamiento de polipéptidos (Langer *et al.*, 1992, Braig *et al.*, 1993).

Se ha encontrado también que la sobreexpresión de los productos del gen **GroEL** da como resultado la supresión de mutaciones sensibles al calor en genes que codifican para enzimas biosintéticas, proteínas secretoras y estructurales (Van Dyk *et al.*, 1989, Zeilstrá *et al.*, 1991).

c) Regulación de la respuesta al choque calórico.

En estudios iniciales en *E. coli* se estableció que el producto del gen **DnaK** juega un papel relevante en la respuesta al choque térmico. De esta manera, mutaciones en **DnaK** dan como resultado la sobreproducción de proteínas de choque térmico aún en ausencia de estímulos de estrés (Fayet, 1987 y 1989, Bhagwat y Apte 1989, Skowyra, *et al.*, 1990). Estudios posteriores demostraron que el polipéptido sigma 32 es un factor de transcripción del choque térmico. Por otro lado, se sabe que una subunidad de la polimerasa de *E. coli* es altamente inestable (vida media, menos de un minuto), y se ha comprobado que mutaciones en **DnaK** y sus factores asociados tales como **DnaJ** o **GrpE** estabilizan notablemente esa vida media (Georgopoulos *et al.*, 1990; Craig y Gross, 1991, Skowyra *et al.*, 1990).

Experimentalmente, se ha demostrado que **DnaK** silvestre puede unirse al polipéptido sigma 32 mediante hidrólisis de ATP (Fayet, 1986 y 1989). Por lo tanto, se ha propuesto que esta autorregulación de la respuesta al choque térmico podría explicarse de la siguiente manera: bajo condiciones normales, una poza grande de proteína **DnaK** libre se acumula en la célula. La **DnaK** libre puede unirse a sigma 32 secuestrando a la RNA polimerasa o exponiéndola a las proteasas para su rápida degradación (Fayet, 1986). Sin embargo, en condiciones de estrés, por ejemplo, en el choque térmico donde aumenta la presencia de polipéptidos no plegados, mal plegados o agregados, **DnaK** se asocia con esas proteínas y permite a sigma 32 relacionarse con el núcleo de la RNA polimerasa, estimulando la transcripción de promotores de choque térmico. De esta manera, se elevan los niveles de expresión de los genes de choque térmico y, por lo tanto, el nivel de proteínas dañadas disminuye (Kimpel *et al.*, 1990, Vierling, 1991, Zeilstrá *et al.*, 1991,).

Si disminuye la intensidad del estrés, disminuye la cantidad de proteínas alteradas, por lo que el **DnaK** deja de asociarse a ellas. De esta manera, se incrementa la cantidad de **DnaK** libre, resultando en la recaptura de sigma 32 y, consecuentemente, disminuyendo la respuesta al choque térmico (Fayet, 1986).

En forma indirecta **DnaJ** y **GrpE** pueden auxiliar a la formación o estabilización del complejo **DnaK**/sigma 32; podrían también regular la respuesta al choque térmico por la aceleración de la actividad de ATPasa de **DnaK** (Zielstra *et al.*, 1991).

Fayet (1986) y Anathan *et al.* (1986) sugieren que en eucariontes un mecanismo similar de autorregulación operaría entre los factores transcripcionales de choque térmico y una o más de las proteínas de choque térmico (Kimpel *et al.*, 1990, Anderson *et al.*, 1994).

El interés principal en estudio de estas familias de proteínas fue debido a su inducción específica durante la respuesta de los organismos al choque térmico (Lindsquist y Craig, 1988). No obstante, la mayoría de los miembros de estas familias son expresados constitutivamente, en ausencia de algún tipo de estrés. Además en muchos estudios genéticos se ha demostrado que muchas de esas proteínas son esenciales para la viabilidad celular bajo condiciones de crecimiento normal (Lindsquist y Craig, 1988, Fayet *et al.*, 1989).

También se ha visto que las proteínas de estrés también son importantes en el organismo animal en la respuesta inmune a los patógenos y en fenómenos de autoinmunidad (Shinnick *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1988; Young y Elliot, 1989).

Ahora bien, en el caso particular de los vegetales superiores es evidente que éstos están sometidos constantemente a fluctuaciones ambientales que pondrían en peligro la vida de la planta si ésta careciera de mecanismos adaptativos apropiados a corto y largo plazo. Las plantas se encuentran expuestas a una multitud de cambios fisicoquímicos (luz, agua, temperatura, salinidad, sequía, pH, radiaciones ultravioleta, etc.) y biológicos (plagas de insectos, virales, bacterianas, micóticas, etc.) que han jugado un papel determinante para que estos organismos desarrollen una serie de mecanismos de resistencia que les permitan sobrevivir adaptándose a un régimen particular (Rodríguez, 1978; Dobzhansky, 1980; Pianka E. 1978). Por otro lado, se sabe muy poco acerca de la biología molecular de estos fenómenos ya que generalmente son la suma de la acción de múltiples genes (Allard, 1978; Daly, 1976).

Sin embargo, algo semejante a la respuesta de "choque calórico" parece estar ocurriendo en células vegetales ya que, por ejemplo, existen cambios rápidos y dramáticos en los patrones de síntesis de proteínas cuando se incrementa la temperatura a plántulas de soya de 28°C (normal) a 40°C. La síntesis de proteínas en general decrece mucho pero ocurre la síntesis activa de las proteínas de choque calórico ("heat shock proteins"). Cuando las plántulas son regresadas a 28°C, se observa una declinación progresiva en la síntesis de estas proteínas de choque calórico (Key *et al.*, 1981, Kimpel *et al.*, 1990). Esto indica que las plantas tienen mecanismos para detectar los cambios en la temperatura, así como la magnitud y la duración del estrés (Krishna *et al.*, 1995).

En plantas superiores el choque calórico induce un tipo de proteínas Hsps de bajo peso molecular (LMW) con un valor de entre 15,000 y 30,000 Da que acumula en el citoplasma en células de hoja, constituyendo más del 1% de la proteína total. Hasta ahora, cuatro familias de genes de Hsps LMW se han caracterizado en plantas (Vierling, 1991). Las familias I y II de proteínas se encuentran en citoplasma y las otras dos familias se localizan en endomembranas y cloroplastos. La función de las Hsps LMW aún no se conoce, pero se sugiere que juegan un papel importante en la sobrevivencia de la planta, además de que se expresan

durante el desarrollo normal de la semilla, en ausencia de estrés aparente (Hernández y Vierling, 1993).

2.5. Estrés por Sal de Sodio

Como ya se mencionó, el término estrés ha sido generalmente empleado para indicar un estado de tensión, el cual puede conducir a un desequilibrio. Biológicamente hablando, Levitt (1980), sugiere que el estrés surge por un cambio en las condiciones ambientales, las cuales pueden reducir o cambiar adversamente el crecimiento de un ser vivo o las funciones normales de su desarrollo (Brady *et al.*, 1984).

No obstante, el concepto de estrés salino ha sido difícil de definir si se considera hasta que punto es válido afirmar que un ser vivo se encuentre bajo estrés, sí aún en condiciones extremas, como por ejemplo, suelos altamente salinos o que tienen un escaso suministro de sales o agua, es capaz de realizar sus funciones vegetativas y reproductivas (Csonka y Hanson 1991).

El problema de la deficiencia o falta de iones prácticamente no ha sido abordado directamente, ya que solamente se ha estudiado el efecto secundario (figura 2) producido por el exceso de sales. Por lo tanto, el término de estrés por sal o iones solo se refiere al exceso de los mismos y es medido en unidades tales como: potencial químico, actividad o simplemente concentración o conductividad eléctrica. Si bien el efecto de una sal es debido a la presencia de estos iones, se debe de hacer una distinción entre estrés por sal y estrés por iones (Corinne *et al.*, 1993, Spickett *et al.*, 1993).

Sólo si la concentración de sales es suficientemente alta para disminuir el potencial del agua de manera importante (0.5 - 1.0 bar) entonces se le denominará estrés salino. Por el contrario, si la sal (ácida o básica) no disminuye el potencial de agua, se habla entonces de un estrés iónico (Spickett *et al.*, 1993).

La mayoría de los casos de estrés por sal en la naturaleza son producidos por las sales de sodio, particularmente NaCl. El estrés por sal se da comunmente a causa

de una alta concentración de sales. Por otro lado, el estrés por iones de sodio es debido a una baja concentración de NaCl ($10^{-3}M$), (Spickett *et al.*, 1993).

En relación a las plantas tolerantes a sal, el término halofita significa literalmente planta salada y es utilizado específicamente para referirse a aquellas plantas capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de sales de sodio. Por otra parte, las plantas que no son capaces de crecer en altas concentraciones de sales de sodio son llamadas glicófitas (plantas "dulces"), (Csonka y Hanson 1991, Bohnert *et al.*, 1995)

A causa del amplio rango de resistencia establecida entre halofitas, éstas se subdividen en halofitas y oligohalofitas (moderadas). Muchas halofitas son capaces de un crecimiento perfectamente normal bajo condiciones no salinas y son, por lo tanto, halofitas facultativas. Otras no son capaces de crecer bajo tales circunstancias por lo cual son denominadas halofitas obligadas.

Bernstein (1963), clasificó los efectos de la salinidad en osmóticos, nutricionales y tóxicos. En la terminología empleada en el estudio del estrés, los efectos osmóticos son de tipo secundario, mientras que los efectos tóxicos son una lesión primaria ocasionada por la sal.

El estrés osmótico se origina al adicionar sal al agua por lo que disminuye el potencial osmótico; por ésto se dice que el estrés salino expone a la planta a un estrés osmótico secundario o estrés fisiológico de sequía (Greenway y Munns 1980).

El estrés nutricional debido a la salinización puede explicarse con base a una disminución o supresión en la absorción de nutrientes por la toma de cloruro de sodio en competencia con otros iones nutritivos o inclusive a una inversión en el flujo del agua (Jones y Turner ,1978; Fitter y Hay, 1983).

La exposición de una planta a NaCl provoca una clara disminución en el crecimiento de las hojas. La reducción del área foliar es una respuesta a corto plazo, ya que se da en el transcurso de un día de exposición a la sal. Se ha visto también que el NaCl reduce la fotosíntesis lo que trae como consecuencia la baja velocidad de crecimiento (Munns y Termaat, 1986).

El sodio disminuye, en algunas plantas, la velocidad de respiración, lo que altera la obtención de energía y la síntesis de carbohidratos. Sin embargo, se ha observado que en muy pocas plantas se ve afectada la fotofosforilación por las sales de sodio por lo que no hay razón para pensar que existe una disminución en la síntesis de ATP (Levitt, 1980, Le Rudulier y Valentine 1982, Le Rudulier *et al.*, 1984).

Otros efectos del estrés salino se deben a que las sales pueden penetrar la membrana plasmática y llegar a los sistemas bioquímicos causando un daño directo (Levitt, 1980 b, Munns y Termaat, 1986). Estos iones interactúan con los ácidos nucleicos y los desestabilizan, aunque también inducen un aumento en la síntesis de mensajeros para aquellas proteínas que se sintetizan en respuesta al estrés (Rodees y Bressan 1986, Ramagopal 1987). 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 los metabolitos (Arad y Richmond, 1976, Levitt, 1980 b, Munns y Termaat, 1986, Singh *et al.*, 1987 a y b, Cayle *et al.*, 1992).

Sin embargo, para que la célula realice sus funciones bioquímicas requiere de la participación de iones (Boyer, 1970). Pero, como ya se mencionó anteriormente, el incremento de algunos iones en el medio intracelular puede ser tóxico al modificar o inhibir algunas de las funciones. Por ejemplo, las sales de NaCl y KCl así como sus productos iónicos Na^+ , K^+ , Cl^- pueden tener un efecto inhibitorio en la actividad enzimática ya que afectan su función catalítica y su constante de afinidad por el sustrato o K_m (Yancey *et al.*, 1982, Mendoza *et al.*, 1994).

Los efectos metabólicos generales del estrés salino en las plantas se muestra en la figura 2.



Figura No. 2 Posibles tipos de lesiones producidas por el estrés por sales de sodio.

2.6. Estrés por Agua y Deshidratación.

El agua es un componente esencial para los seres vivos. En ella se realizan innumerables reacciones químico-biológicas y sirve además como vehículo para el transporte de diversos componentes básicos para el mantenimiento de la integridad funcional de los organismos unicelulares y pluricelulares (Kramer, 1983, Simontacchi *et al.*, 2001).

En el caso de las plantas, el agua es el componente más abundante y constituye del 85 al 95 por ciento de su masa total. Cuando el nivel del agua es inferior a estos valores se alteran diversos procesos fisiológicos, siendo el principal factor limitante en la productividad de estos organismos. Se calcula que aproximadamente la mitad de las comunidades vegetales terrestres sufren regularmente extensos períodos de déficit hídrico (Kramer, 1983).

Una opción para una mayor productividad vegetal en zonas con deficiencia de agua es el desarrollo de plantas mejoradas que presenten mayor tolerancia al déficit hídrico (Bartels *et al.*, 1988). Para ello, es conveniente conocer las diferentes respuestas de la planta a los ambientes secos las cuales pueden darse en diferentes niveles de organización. Aquí solamente revisaremos algunos de los mecanismos desarrollados tanto por la célula como en la planta completa para poder entender algunos efectos por el déficit de agua.

Como ya se mencionó, el estrés por agua puede producirse por una insuficiente o excesiva actividad de agua en el medio ambiente de la planta. En condiciones naturales, el primer caso es el resultado de déficit hídrico. Cuando una planta es sometida a la pérdida de agua por evaporación inducida artificialmente, se dice que está sometida a estrés por desecación o deshidratación. Hsiao (1973), propuso que este término se use solamente cuando se haya perdido el 50% o más del agua de la planta.

Las plantas que crecen en el desierto o las que se someten a déficit hídrico presentan mecanismos que les permiten disminuir, en mayor o menor grado, los efectos provocados por la falta de agua. Así como existen gran cantidad de habitats secos, también existen gran cantidad de mecanismos adaptativos (Morgan, 1984; Bray, 1993).

Hay especies vegetales que evitan a la sequía y otras que la toleran; las del primer tipo generalmente tienen características en su crecimiento que les permite evitar las condiciones de déficit hídrico.

Las plantas tolerantes se pueden clasificar en dos tipos: a) aquellas que poseen un uso eficiente de agua (reducción de transpiración o incremento en la absorción de agua del suelo) y b) las capaces de tolerar la deshidratación (Fisher y Turner, 1978).

Las plantas sometidas a déficit hídrico han desarrollado varios mecanismos que les permiten reducir los efectos delétereos del estrés. Estos mecanismos incluyen adaptaciones fenológicas, morfológicas y respuestas fisiológicas-bioquímicas (Fisher y Turner, 1978; Briens y Larher 1982, Bohnert *et al.*, 1995, Hasegawa *et al.*, 2000).

a) Adaptaciones Fenológicas. Son acontecimientos durante el desarrollo de los seres vivos: germinación, desarrollo vegetativo, floración, formación de semillas y senescencia. A manera de ejemplo, puede mencionarse que existen diferentes mecanismos de control que previenen la germinación en épocas o en habitats desfavorables. Aparte del agua, los factores más importantes que influyen en la fenología son la temperatura y el fotoperíodo (Ludlow y Bjorkman, 1984; Fisher y Turner, 1978).

b) Adaptaciones Morfológicas. La inhibición del crecimiento de las hojas es uno de los efectos más visibles durante el déficit hídrico. La reducción del área foliar conduce a la pérdida de menor cantidad de agua, además de que puede llegarse a reducir totalmente el área foliar de la planta debido a que se acelera la senescencia y con ello se eliminan las hojas más viejas. Otros mecanismos que permiten reducir la absorción de la radiación solar son la presencia de vellocidades, glándulas excretoras de sal y de ceras en las superficie de las hojas, ayudando así a reducir la tasa de transpiración y evitando la elevación de la temperatura foliar (Kramer, 1983).

El crecimiento extensivo de raíces para una mayor captación de agua, la profundidad de enraizamiento y el empleo de raíces como órganos de almacenamiento de agua son otros ejemplos de adaptaciones morfológicas.

c) Adaptaciones Físicoquímicas. Como un ejemplo de adaptación físicoquímica puede mencionarse la adaptación en la respuesta estomatal. Los estomas responden a la humedad de la atmósfera y están capacitados para cerrarse cuando se incrementa el gradiente de presión de vapor entre la hoja y el aire. La apertura o el cierre estomatal están controlados por la turgencia de las células guardianas y subsidiarias. El cierre estomatal restringe la pérdida excesiva de agua antes de que ocurra un déficit severo (Hanson y Hitz, 1982).

El cierre de los estomas va acompañado de un aumento en la temperatura de la hoja y de una disminución tanto en la absorción de CO₂ atmosférico como de la pérdida de agua y el transporte de solutos dentro de la planta (Hanson y Hitz, 1982).

2.7. Resistencia al estrés

A la capacidad de los organismos para sobrevivir en presencia de cambios desfavorables y aún crecer, se le denomina resistencia al estrés. En las plantas, se han descrito dos tipos principales de resistencia: a) la resistencia elástica, que es la capacidad que tiene la planta para soportar cambios físico-químicos reversibles cuando está expuesta a un estrés específico y, b) la resistencia plástica que es aquella que presenta un organismo para reducir o prevenir cambios de tipo irreversible (Levitt, 1980, Morgan, 1984).

Debe tenerse en cuenta que aún cuando los cambios elásticos son reversibles, éstos pueden llegar a ser irreversibles (daño plástico) si la condición desfavorable está presente durante un tiempo prolongado.

Cuando un estrés específico actúa sobre una planta, puede dar origen a diferentes tipos de lesiones:

1. Puede producir cambios directos más allá del límite elástico de la planta y por lo tanto, un cambio plástico que induzca una lesión.
2. Puede inducirse un cambio elástico que es reversible y que no sea dañino, pero que si se mantiene por un tiempo prolongado puede dar lugar a un cambio plástico indirecto, el cual induciría a la aparición de lesiones o, en última instancia, a la muerte de la planta.
3. Puede dañar a la planta pero no por sí mismo, sino al dar origen a un segundo estrés. A este daño se le denomina lesión secundaria del estrés (Levitt, 1980).

En algunos tipos de estrés (sequía, baja y alta temperatura, sales, congelamiento, luz ultravioleta, ahogamiento) se han encontrado mecanismos específicos de resistencia, esto es, la planta posee un mecanismo que es capaz de excluir al estrés, ya sea parcial o totalmente.

Por ende, la tolerancia es la capacidad de la planta para que aún cuando se establezca el equilibrio con el estrés, no se presente ningún perjuicio para ella. Es claro, por lo tanto, que la planta posee mecanismos para prevenir, disminuir o reparar el daño inducido por el estrés. El evitar y sobrevivir al estrés permite a la planta reiniciar su metabolismo, crecimiento y desarrollo normales ocurriendo así una adaptación a dicho estrés (Mifflin *et al.*; 1981, Lener y Amazallag, 1994).

2.8. Fisiología de la Regulación Osmótica

Como ya se mencionó, el estrés osmótico puede ser causado ya sea por la pérdida de agua (estrés hídrico) o por salinidad, el cual a su vez, posee dos componentes: i) pérdida de agua ii) daño por presencia de iones (Morgan, 1984). Para poder entender el estrés osmótico en una célula, es importante comprender el potencial hídrico. Dicho potencial tiene 2 componentes: uno de signo negativo que es el potencial osmótico y otro positivo que es el potencial de turgencia. El primero representa la concentración de moléculas de soluto (es negativo porque a mayor concentración de moléculas de soluto es menor la cantidad relativa de agua); el segundo es la presión hidráulica que se ejerce sobre un sistema (Morgan, 1984).

Si el potencial osmótico interno es más negativo que el externo (ésto es, hay más moléculas de soluto) el agua entra a la célula hasta que el volumen de la célula se convierte en limitante; en este momento se crea una presión de turgencia de signo positivo que igualará el potencial de adentro y fuera de la célula, lográndose de esta manera el equilibrio (Salisbury y Cleon, 1985).

Fuera de una célula sólo puede haber cambios de potencial osmótico, mientras que dentro puede haber tanto cambios de potencial osmótico como de turgencia. Una célula metabólicamente activa siempre es turgente (Hsiao, 1973).

En el estrés hídrico, cuando una célula pierde agua, pierde primero su potencial de turgencia (se hace flácida) y si continúa la pérdida de agua, sus metabolitos se concentran y con ello su potencial osmótico se hace cada vez más negativo, produciéndose daños y la posterior muerte celular (Salisbury y Cleon, 1985; Wyn Jones *et al.*, 1982).

En el caso de estrés salino, el daño puede ser más severo, debido a que al existir un potencial osmótico más negativo en el exterior por la presencia de iones (sodio, cloro), la célula tiende primero a perder agua, disminuyendo así su potencial de turgencia y haciendo más negativo el potencial osmótico interno. Este último causa daños celulares y, a su vez, el efecto dañino se intensifica debido a que también los iones entran y salen de la célula por la tendencia a equilibrar los potenciales. Sin embargo, se puede llegar a un punto en el que la concentración de iones es tan alta que resulta tóxica para la célula (Riov *et al.*, 1991).

La mayoría de las especies, sin embargo, normalmente viven y crecen en medios de baja o mediana osmolaridad. Estas especies tienden a mantener una concentración iónica relativamente baja dentro del citoplasma, debido a que las enzimas intracelulares son frecuentemente sensibles al incremento en la concentración de iones (Higgins *et al.*, 1987, Hasegawa, *et al.*, 2000).

La regulación osmótica consiste básicamente en la acumulación de moléculas dentro de la célula, evitando de esta manera la salida de agua y posibilitando la reentrada de la misma del medio celular externo. El ajuste osmótico depende del número de moléculas que se acumulen, más no del tamaño y naturaleza de éstas, así que, teóricamente, un ion de potasio es equivalente a una molécula de sacarosa (Lodlow, 1989, Riov *et al.*, 1991).

Desde esta perspectiva, la célula vegetal tiene dos alternativas: usar iones inorgánicos, o bien moléculas orgánicas sintetizadas *de novo* a partir de la actividad fotosintética (Wyn Jones *et al.*, 1982, Rudich, 1985, Simontacchi *et al.*, 2001).

En principio, es energéticamente menos costoso el uso de iones comunes por ser los más abundantes del medio (sodio, cloro, potasio, nitrato, etc.). Sin embargo, los iones tienen la desventaja de interaccionar desfavorablemente con las membranas, proteínas y demás elementos celulares (Poljakoff-Mayber, 1982).

El sodio puede ser muy abundante en el medio externo y es utilizado con mucha frecuencia como osmolito, pero sus efectos pueden llegar a ser letales. Las plantas mesófilas utilizan al potasio como osmolito, pero aún éste puede tener efectos nocivos en los sistemas celulares (Poljakoff-Mayber, 1982). Sin embargo, las plantas en general llevan un ajuste osmótico rápido y eficiente con iones inorgánicos y aunque éstos son transportados a la vacuola para minimizar sus

efectos deletéreos, las concentraciones en el citoplasma pueden llegar a ser altas (Bardy *et al.*, 1984, Bohnert *et al.*, 1995, Kuchitsu *et al.*, 1989, Serrano y Gaxiola, 1994).

Se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos que afectan el crecimiento y supervivencia celular en plantas sometidas a estrés salino, ya que no se ha podido distinguir claramente entre el daño causado por la disminución en el potencial de agua y el exceso de iones. No se conoce tampoco con precisión cómo es que los iones ejercen su efecto adverso. Se ha sugerido, por ejemplo, que podrían afectar la permeabilidad de la membrana o la estabilidad de las enzimas (Yancey *et al.*, 1982, Spickett *et al.*, 1993, Benlloch *et al.*, 1994).

La interacción entre Na^+ y Ca^{++} ha sido extensamente investigada y uno de los puntos estudiados ha sido el papel del Ca^{++} en el transporte selectivo de cationes, especialmente K^+ , en células vegetales (Kent y Lauchi, 1985, Ben-Hayyim, 1987; Haro *et al.*, 1993, Cerdá *et al.*, 1995, Danielsson *et al.*, 1996).

El calcio, por medio de sus cargas positivas, ayuda a estabilizar a las membranas estableciendo puentes entre las cargas negativas de los fosfolípidos que se encuentran en éstas (Kent y Lauchi, 1985; Dunn *et al.*, 1994; Haro *et al.*, 1993 y Hirata *et al.*, 1995, Botella *et al.*, 1997).

En un medio salino, cuando la concentración de calcio es baja, existe un incremento en la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ y Cl^- (Greenway y Monns, 1980). Asimismo, existe evidencia directa de que uno de los problemas que se presentan en las células sometidas a estrés salino es que el sodio desplaza al calcio asociado a la membrana (Cramer *et al.*, 1986) y que afecta los niveles de Ca^{++} intracelular (Lynch y Lauchli 1988). Por lo tanto, el Ca^{++} parece participar activamente en los procesos de tolerancia a la salinidad (Dunn *et al.*, 1994; Haro *et al.*, 1993 y Hirata *et al.*, 1995).

En varios sistemas vegetales se ha demostrado que a concentraciones elevadas de NaCl se incrementa el Ca^{++} intracelular (citoplásmico). Los niveles elevados de Ca^{++} citoplásmico ayudan a que el efecto tóxico del NaCl se reduzca, al mismo tiempo que se reduce el desplazamiento del Ca^{++} asociado a la membrana hacia el citoplasma (Grant *et al.*, 1990; Hirata *et al.*, 1995). Tales estudios apoyan la idea de que el efecto protector del Ca^{++} se debe al mantenimiento de la

integridad de la membrana, lo que evita la salida de K^+ (Kurt *et al.*, 1986, Ben Hayyim, 1987; Hirata *et al.*, 1995 y Danielsson *et al.*, 1996).

Por otro lado, se sabe que la relación celular Na^+/K^+ es de gran importancia para el metabolismo. Comúnmente se acepta que a concentraciones relativamente altas de NaCl se da una competencia entre Na^+ y K^+ que conduce a niveles reducidos de K^+ intracelular. Los altos niveles de K^+ intracelular han sido correlacionados con altos niveles de tolerancia a salinidad (Botella *et al.*, 1997, Borowitzka y Brown, 1974, Croughon *et al.*, 1982, Perry *et al.*, 1979, Ben-Hayyim *et al.*, 1985;1987; Danielsson *et al.*, 1996).

a) Síntesis y Transporte de Solutos Osmoprotectores

Se sabe que en células con baja capacidad para formar vacuolas, los compuestos orgánicos y el K^+ hacen la mayor contribución a la adaptación hiperosmótica mientras que en células altamente vacuoladas el KCl y/o el NaCl son los osmolitos más importantes (a excepción de las bacterias halofílicas; Jones y Gorham 1983).

Los citosolutos orgánicos acumulados son frecuentemente llamados solutos compatibles. El término fue introducido por Borowitzka y Brown en 1972 para describir sustancias no inhibitorias y con función metabólica, que se acumulan cuando la planta está sometida a bajos potenciales de agua. Un número de posibles solutos compatibles han sido reconocidos en plantas superiores y muchos más en organismos inferiores (Nurit Bar-Nun *et al.*, 1987, Kermodé *et al.*, 1989, Hasegawa, *et al.*, 2000).

b) La Acumulación de Solutos en Respuesta al Estrés Osmótico

El crecimiento y la supervivencia de las plantas en alta salinidad dependen de su adaptación a bajos potenciales de agua y a altas concentraciones de Na^+ y Cl^- .

El efecto adverso del bajo potencial de agua externo puede ser remediado por la toma de electrolitos ya sea en la vacuola o en el citoplasma pero como ya se apuntó, esta toma puede crear daño por exceso de iones (Nakamura *et al.*, 1992). Por lo tanto, las posibles adaptaciones varían entre la exclusión de Na^+ y Cl^- o bien la rápida toma de esos iones para usarlos como solutos iónicos principales en las células (Greenway y Munns, 1980, Cerdá *et al.*, 1995, Botella *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que los mecanismos primarios que proporcionan a las células resistencia a salinidad incluyen: enzimas estables en alta salinidad, exclusión de iones y compartimentalización de los mismos (Daines y Gould, 1985, Spickett *et al.*, 1993), y una redistribución de los iones a través de las membranas lo cual corregirá el desbalance osmótico (Ahmad *et al.*, 1987, Nakamura *et al.*, 1992).

Otra forma de evitar el daño celular y mantener el crecimiento en estrés hídrico o salino, es mediante la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma para que éstos contribuyan al balance osmótico, cuando los electrolitos están en mayor concentración en el citoplasma que en la vacuola y para estabilizar a las enzimas afectadas por altas concentraciones de electrolitos en estas circunstancias. Los solutos que se incrementan por la alta salinidad en muchas especies incluyen a la glicinabetaina (Storey y Wyn Jones, 1975, Ahmad y Wyn Jones, 1979, Ahmad *et al.*, 1987, Grieve y Maas, 1984), prolina (Bogges y Stewart, 1976, Hanson, 1979, Dix y Pierce, 1981, Lone *et al.*, 1987, Ibarra-Caballero *et al.*, 1988) y sacarosa (Perry *et al.*, 1987) entre otros.

Se ha obtenido suficiente evidencia para demostrar en cada caso que la acumulación de estos osmoprotectores es de valor adaptativo más que un reflejo de daño metabólico (Wyn Jones *et al.*, 1981, Grieve y Maas, 1984, Cairney *et al.*, 1985, Grumet y Hanson, 1986, Hasegawa, *et al.*, 2000).

Estudios realizados principalmente en halófitas, sugieren que la glicinabetaina, entre otros, puede tener un importante papel en el mantenimiento del crecimiento más que en la supervivencia celular; la prolina, en cambio, parecería tener un papel directamente relacionado con la supervivencia más que con el crecimiento (Greenway y Munns, 1980, Imhuff y Valem, 1884).

c) Glicinabetaina

La glicinabetaina (N,N, N, -trimetilglicina) es un compuesto cuaternario de amonio el cual se acumula en las hojas de un amplio rango de especies vegetales en respuesta al estrés de agua y/o salinidad. Este compuesto se acumula en halófitas tales como *Spartina*, *Suaeda marítima* y *Beta marítima* (Wyn Jones *et al.*, 1977, Briens *et al.*, 1982, Stumpf, 1984) y en no halófitas tales como espinaca, cebada, trigo y sorgo (Hanson y Scott, 1980; Hanson y Hitz, 1982; Wyn Jones *et al.*, 1981; Grieve y Maas, 1984; McDonnell y Wyn Jones, 1988). La mayoría de

las especies estudiadas que acumulan glicinbetaína pertenecen ya sea a la familia de las quenopodiaceas o a la de las gramíneas. También se ha encontrado que las halobacterias y eubacterias acumulan altas concentraciones de glicinbetaína cuando son crecidas bajo condiciones salinas (Csonka, 1989; Moore *et al.*, 1987; Imhoff y Valer, 1984; Cairney *et al.*, 1985; Landfald y Strom, 1986).

Se ha propuesto que la acumulación de este compuesto le permite actuar como un osmótico no tóxico localizado preferencialmente en el citoplasma y en el cloroplasto donde puede participar como un estabilizador o protector de enzimas (Wyn *et al.*, 1981, Grumet y Huson, 1986), en la compartimentalización de iones (Ahmad *et al.*, 1987), en la estabilización de membranas (Julivet, 1982) y en la replicación del DNA a nivel bacteriano (Meury, 1988). La glicinbetaína estimula la síntesis de DNA y la división celular bajo condiciones de estrés en *E. coli* (Meury, 1988).

d) Prolina

La acumulación de prolina en respuesta a la disminución del potencial de agua ha sido bien documentada en un espectro muy amplio de organismos incluyendo bacterias, algas y plantas (Paleg, 1981, Dadekar y Uratsu, 1988). Se ha sugerido que la prolina actúa como un osmolito que juega un papel importante en la adaptación celular al estrés osmótico. Se ha demostrado que la acumulación de prolina es una consecuencia del daño producido en la célula por un estrés osmótico (Pandey y Ganapathy, 1985, Lone *et al.*, 1987).

Algunas especies vegetales y bacterianas acumulan prolina libre como respuesta a un déficit de agua o cuando se encuentran sometidas a estrés salino (Paleg, 1981; Pandey y Ganapathy, 1985). Se han realizado muchos estudios para conocer los efectos metabólicos de la acumulación de prolina durante el estrés salino proponiéndose los siguientes: 1) su posible papel como osmolito compatible, regulando y reduciendo la pérdida de agua celular; 2) como protector de enzimas, ya que la prolina afecta la solubilidad de ciertas proteínas por su interacción con los residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína (Paleg, 1984); 3) la prolina puede ser fuente de energía y de grupos amino rápidamente utilizables (Paleg, 1984; Nurit Bar-Nun y Poljakoff-Mayber, 1987; Lone *et al.* ,

1987); 4) estimulación de la biosíntesis de glutamato; 5) disminución de la oxidación de prolina; 6) una baja incorporación de prolina a proteínas (La Rosa *et al.*, 1991; Dandekar y Uratsu 1988).

Entre las especies vegetales más estudiadas que acumulan prolina libre se encuentran: cebada, frijol, maíz, trigo, soya, algodón y tabaco (Mc Michael y Elmore, 1977; Hansan *et al.*, 1979; Dix y Pierce, 1981, Mofteh y Michel, 1987; Ibarra *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1973). En las plantas superiores, la principal ruta de síntesis de prolina se localiza en cloroplasto y su precursor es el ácido glutámico. La prolina se oxida de nuevo a glutámico mediante una serie de reacciones semejantes a las que le dieron origen (Fig. 3).

¿Qué es lo que hacen en especial la glicinabetaína o la prolina para disminuir el estrés osmótico? Se han propuesto dos hipótesis alternativas de acuerdo a estas poderosas propiedades de osmoprotectantes. La primera hipótesis, como se apuntó anteriormente, es que la prolina y glicinabetaína tienen una especial interacción con las proteínas, la cual protege a las mismas de la desnaturalización en presencia de alta concentración de sales. Riov y cols, (1991) demostraron que cuando se mantiene a células de *Azospirillum brasilense* bajo estrés salino por NaCl (0.3 M) se promueve la captación de glicinabetaína. Esto se comprobó mediante el uso exógeno de glicinabetaína radiactiva y se pudo observar por autoradiografía que ésta se une a proteínas (GBBP) en el periplasma de la célula.

Además, el análisis por electroforesis mostró la presencia de una proteína con un peso molecular de 32 kDa la cual se induce por una alta osmolaridad, ayudando aparentemente a reducir los efectos tóxicos del estrés.

Se ha sugerido que la acumulación de este citosoluto podría ayudar al ajuste osmótico y que por lo tanto, contribuye a la adaptación celular de muchas especies de plantas sometidas a estrés salino, sequía y otros tipos de estrés (Storey y Wyn Jones, 1975, Lone *et al.*, 1987, Wei *et al.*, 1990).

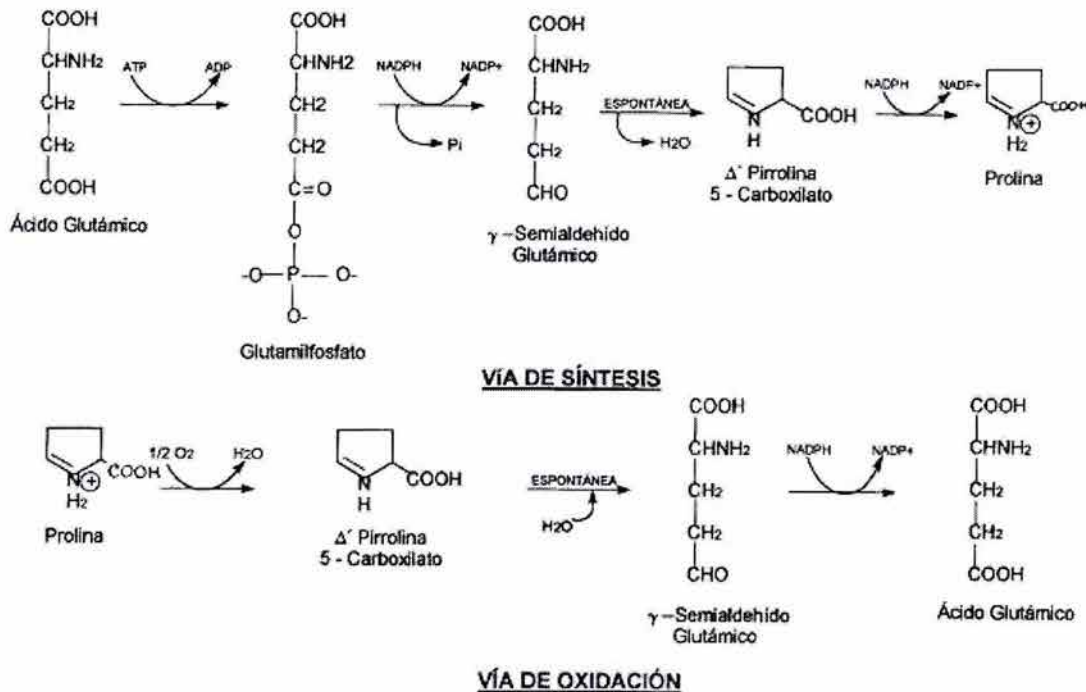


Figura No. 3 Biosíntesis y degradación de la l-prolina.

Por otro lado, se ha propuesto que la interacción de la prolina con proteínas podría ser a través de su porción ahidrofílica, la cual se podría unir a la proteína, rodeando a los residuos no polares a través de interacciones hidrofóbicas. El carboxilo de la proteína, de estar cargado, puede estar interactuando directamente con el agua. Con esta interacción se podría dar un revestimiento a la proteína y como consecuencia se podría incrementar la solubilidad de la misma. Estas suposiciones se basan en que Schubert y Tschesche observaron en 1978 que cuando utilizaban una concentración de prolina exógena 5 ó 6 M se incrementaba la solubilidad de la insulina, β lactoalbúmina y albúmina de bovino. Presumiblemente, la capacidad de la prolina de incrementar la solubilidad de las proteínas es una característica que podría ayudar a éstas cuando se encontraran en medios ambientes desfavorables que pudieran dañar o conducir a la desnaturalización de las mismas y a su precipitación (Le Rudulier *et al.*, 1984, Landfald y Strom, 1986, Hasegawa *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha visto que al agregar prolina a embriones de cebada en germinación bajo condiciones de estrés por sal, ésta ayuda a aumentar la tolerancia a la sal y promueve la elongación de tallos y raíces (McMichel y Elmore 1977, Schubert y Tschesche, 1978, Dix y Pierce, 1981; Lone *et al.*, 1987, Laner *et al.*, 1993).

La actividad de muchas enzimas se podría ver afectada por la estabilidad o desestabilidad del medio por cambios osmóticos; ésto hace reflexionar en la importancia del papel que juegan los omoprotectores en la estructura y función de las proteínas (Le Rudulier y Valentine, 1982; Le Rudulier *et al.*, 1984, Wei *et al.*, 1990, Simontacchi *et al.*, 2001).

Asimismo, el incremento de la osmolaridad extracelular comunmente ocasiona la salida de agua y cambios en la concentración intracelular de solutos compatibles. Como resultado de una respuesta adaptativa, las células tienen que mantener su volumen habitual incluso bajo grados extremos de osmolaridad (Csonka y Hanson, 1991, Cayley *et al.*, 1992).

Se sugiere que la tolerancia a la sal en plantas completas es conferida por la prolina pero también podría atribuirse a un efecto directo en raíz y tallo ya que ésta ayuda a la salida de Na^+ y Cl^- y por lo tanto a que no se acumulen (Dix y Pierce, 1981, Ben-Hayyim *et al.*, 1985, Cayley *et al.*, 1992).

2.9. Regulación de la Respuesta a Estrés Osmótico.

El estrés por pérdida de agua provoca una serie de respuestas, las cuales se manifiestan como cambios celulares fisiológicos y de diferentes niveles de intensidad. Este conjunto de respuestas se han observado dependiendo de la severidad de la duración del estrés y del estado de desarrollo y genotipo de la planta (Bray, 1993, Davies y Jones, 1992).

Los cambios en el potencial de agua han sido relacionados con los cambios en la concentración intracelular de ácido abscísico (ABA) (Davies y Jones, 1992).

El ABA es un fitoregulador caracterizado como un sesquiterpeno derivado del mevalonato, el cual fue descubierto en la década de 1950. Originalmente este fitoregulador fue únicamente asociado con la abscisión y la latencia de los brotes; posteriormente ha sido implicado en muchos procesos fisiológicos de la planta, en el control de muchos eventos durante la embriogénesis y formación de la semilla incluyendo morfogénesis embrionaria (Walton, 1980; Fitter y Hay 1983; Kermore *et al.*, 1989), síntesis de proteínas, además de mantener la latencia de las semillas. El ABA está ligado a la función de los estomas (Hartung, 1983); éste actúa en el exterior de las células guardia provocando la pérdida de K^+ y Cl^- con la consecuente reducción de la turgencia por pérdida de agua ocasionando así el cierre de los estomas (Hartung, 1983).

El estrés por agua incrementa los niveles de ABA en los diferentes tejidos de las plantas y al parecer induce la respuesta de muchos genes a estrés osmótico y salino (Espelund *et al.*, 1992, Serrano y Gaxiola, 1994).

Se ha observado que el ABA acelera la adaptación de células de tabaco en cultivo (Binzel *et al.*, 1985, La Rosa *et al.*, 1985). Esto sugiere un importante papel de esta hormona en la tolerancia a la sal a nivel celular. Además, se ha demostrado que el ABA acelera el crecimiento de células de tabaco en cultivo en presencia de sal (Binzel *et al.*, 1985, Singh *et al.*, 1987b).

El ABA normalmente se produce durante el desarrollo normal de la semilla y prepara al embrión para la desecación (Mundy y Chua, 1988, Hetherington y Quatrano, 1991).

Se ha discutido si el parámetro crítico en relación con el agua que determina el incremento en los niveles de ABA es la pérdida de turgencia (De Rocher y Bohnert 1993). Sin embargo, en otros eventos bioquímicos no se ha podido establecer si el potencial de agua o uno de sus componentes puede ser un parámetro crítico que limite algunas funciones fisiológicas (Bradford y Hisiao 1982, Davies y Jones 1992). Así mismo, la medición del potencial de agua presenta dificultades de tipo metodológico que impide establecer una correlación entre la fisiología de la respuesta y el valor del potencial durante la pérdida de agua (Fitter y Hay, 1983, Finkelstein *et al.*, 1985a).

Con la pérdida de agua desde el interior de la célula, inicialmente ocurren procesos regulatorios en el metabolismo para las nuevas condiciones celulares; al mismo tiempo, se produce inhibición en el crecimiento y alteraciones de vías metabólicas lo que podría ser resultado del cambio en la expresión de genes (Davies y Jones, 1992, Simontacchi *et al.*, 2000).

Los diferentes estudios de la respuesta molecular a la pérdida de agua han mostrado múltiples cambios en la expresión de genes. Muchos de éstos se expresan preferencialmente durante el estrés y promueven la tolerancia celular a la deshidratación y a las alteraciones en el potencial de agua (Bray, 1983, Finkelstein *et al.*, 1985b).

Las numerosas respuestas durante la pérdida de agua están controladas por una batería de genes con muy diversas funciones, los cuales parecerían ayudar a proteger a las estructuras celulares de los efectos nocivos de la reducción en la cantidad de agua en las células. Algunos de estos genes son los llamados **Lea** (late embryogenesis abundant) y fueron encontrados inicialmente como genes que se expresan durante las fases de maduración y desecación de la semilla (Robertson y Chandler 1992, Espelund *et al.*, 1992, Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993).

Estudios de desarrollo en plantas han mostrado que ABA induce la acumulación de RNA mensajeros específicos y proteínas durante la embriogénesis tardía de semillas de diversas especies (Galau *et al.*, 1993). En semillas de cereales, algunos de los RNA mensajeros del desarrollo tardío presentan una larga vida estando presentes en la madurez y en el período de desecación pero son rápidamente degradados en la germinación de la semilla (Hughes y Galau, 1991).

Trabajos recientes muestran una correlación entre la expresión de ciertos genes **Lea** y el desarrollo de la tolerancia a la desecación en embriones (Hughes y Galau, 1991, Espelund *et al.*, 1992). Se ha encontrado que algunos de los genes

que se sintetizan durante la embriogénesis tardía (*Lea*) también están presentes en tejidos vegetativos de la planta sujetas a estrés hídrico y salino (Espelund *et al.*, 1992).

Los productos de estos genes son predominantemente hidrofílicos y se localizan principalmente en el citoplasma. Entre sus funciones está la de secuestrar iones, la protección de otras proteínas o de las membranas y la renaturalización de proteínas. A las proteínas de estos genes se les conoce como LEA, las cuales representan un grupo diverso de proteínas que son codificadas muchas veces por pequeñas familias de multigenes (Bray, 1993, Baker *et al.*, 1988, Esaka *et al.*, 1992, Galau *et al.*, 1993).

Basado en su regulación y su peculiar secuencia de aminoácidos (alto contenido de aminoácidos neutros e hidroxilados) se ha sugerido que estas proteínas juegan un papel importante en la tolerancia a la desecación como osmoprotectores (Skriver y Mundi, 1990). La cantidad de estas proteínas y sus RNA mensajeros son más abundantes justo antes de la desecación terminal del embrión. Se ha sugerido que las proteínas celulares son estabilizadas durante su desecación via interacción con proteínas que responden a ABA (Hertherington y Quatrano, 1991, Bradford y Chandler, 1992).

Existen otros tipos de estrés a los cuales se puede enfrentar la planta y que son semejantes a la desecación que sufre la semilla; entre ellos encontramos el estrés de sequía, salino, calórico y el de baja temperatura. En todos ellos el efecto común es la pérdida de agua que en mayor o menor grado sufren los tejidos (Espelund *et al.*, 1992). Entre las semejanzas que se pueden encontrar tenemos la aparición de ciertos polipéptidos casi siempre inducidos por ABA. Tales polipéptidos reciben diferentes nombres dependiendo del tipo de estrés que estimula su aparición (Hughes y Galau 1991, Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994, Hasegawa *et al.*, 2000) (ver Cuadro I).

Cuadro I. Algunas de las proteínas que son inducidas por estrés osmótico en plantas.

Proteínas	Referencia
Osmotina	Singh <i>et al.</i> , 1987 a, b, 1989.
Lea	Dure <i>et al.</i> , 1989.
Proteínas que responden a ABA (RAB)	Yamaguchi-Shnozaki y Shinzaki, 1994.
Dehidrinas	Roberton y Challer, 1992.
Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina	Esaka <i>et al.</i> , 1992.
Proteínas parecidas a taumatina	Cornelissen <i>et al.</i> , 1986.

Muchos de los genes inducidos por pérdida de agua codifican para productos como proteínas de canal, chaperonas, ubiquitinas, proteasas, enzimas biosintéticas de glicinabetaína, prolina, etc., y se ha sugerido que éstos podrían participar en la protección de la célula (Mundy, 1990, Robertson Chandler, 1992).

La expresión de estos genes durante el estrés no necesariamente garantiza que los productos de ellos induzcan la capacidad de las plantas para sobrevivir al estrés. La expresión de algunos de estos genes podría resultar por algún daño que ocurriría durante el estrés. Además, otros genes podrían inducirse pero la expresión de éstos últimos no necesariamente alteraría la tolerancia al estrés. Asimismo, es probable que otros genes todavía no descubiertos sean requeridos para la tolerancia al estrés y para la acumulación de productos como una respuesta adaptativa (Skriver y Mundy, 1990, Esaka *et al.*, 1993, Yamaguchi-Shnozaki y Shnozaki, 1993, Winniewski *et al.*, 1996).

2.10. Metabolismo Nitrogenado en Plantas.

Las plantas dependen de una reserva limitada de nitrógeno para su desarrollo y crecimiento. Es por ésto que las vías de asimilación primaria y secundaria de este elemento deben de trabajar de manera eficiente bajo las diferentes condiciones medio ambientales a las que éstas se ven sometidas (Becana *et al.*, 1984).

Tanto el nitrato como el nitrógeno atmosférico, dos de las principales fuentes de nitrógeno inorgánico disponible para las plantas, deben de reducirse hasta amonio antes de que este elemento se incorpore a la materia orgánica (Botaccin *et al.*, 1985). Puesto que los aminoácidos, ya sea libres o formando parte de proteínas, son la forma predominante de nitrógeno orgánico, se considera que el producto primordial de la asimilación de nitrógeno es el grupo α -amino. El α -cetoglutarato es el principal aceptor de grupos amino en las reacciones de transaminación; por lo tanto, en la mayoría de las reacciones de transaminación se va a formar glutamato. De aquí que esta molécula sea tan abundante en la célula. Después del α -cetoglutarato, el piruvato es otro importante aceptor de grupos amino produciéndose alanina (Lea y Miflin, 1974, Miflin y Lea 1980, Croughon, 1982, Lea *et al.*, 1990, Oaks, 1994) (ver figura 4).

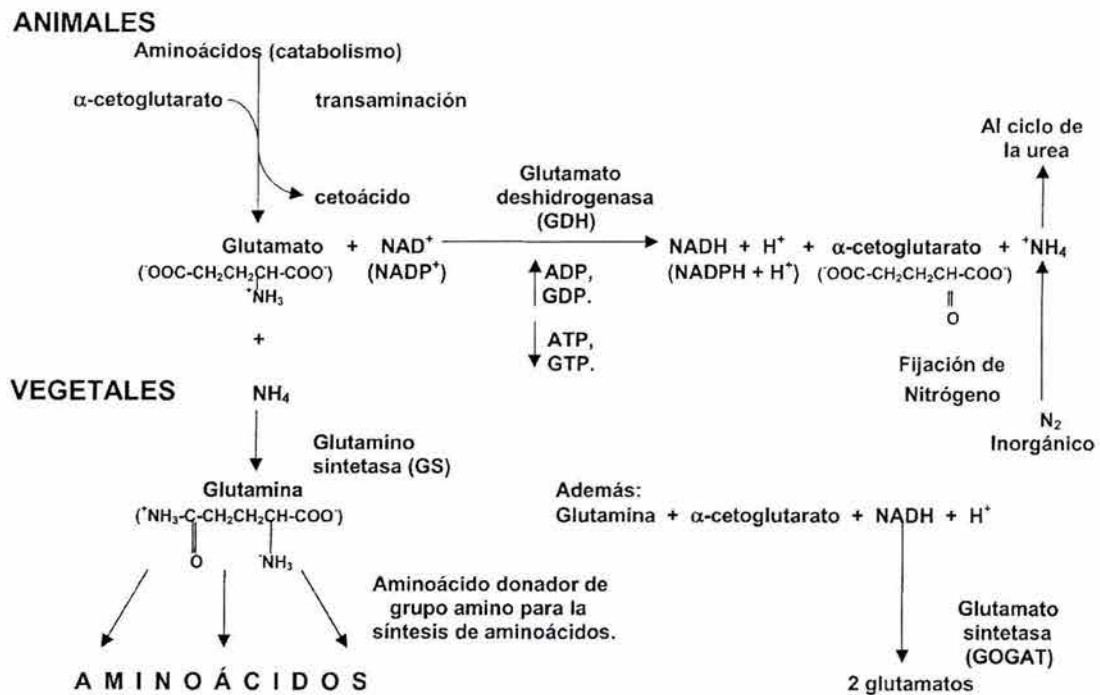


Figura No. 4 Metabolismo nitrogenado en plantas y células animales; enzimas claves del metabolismo nitrogenado: glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa.

Todo el nitrógeno celular es incorporado en macromoléculas por la vía de los grupo amino del glutamato y del grupo amida de la glutamina. El glutamato provee aproximadamente el 85 % del nitrógeno, el cual es usado fundamentalmente para la síntesis de aminoácidos. La glutamina provee el 15 % restante, el cual es usado para la síntesis de purinas, pirimidinas, aminoazúcares, histidina, triptofano, asparagina, NAD, y p-aminobenzoato (Singh *et al.*, 1973, Miller y Magasanik, 1990, Martilla *et al.*, 1993) (ver figura 5).

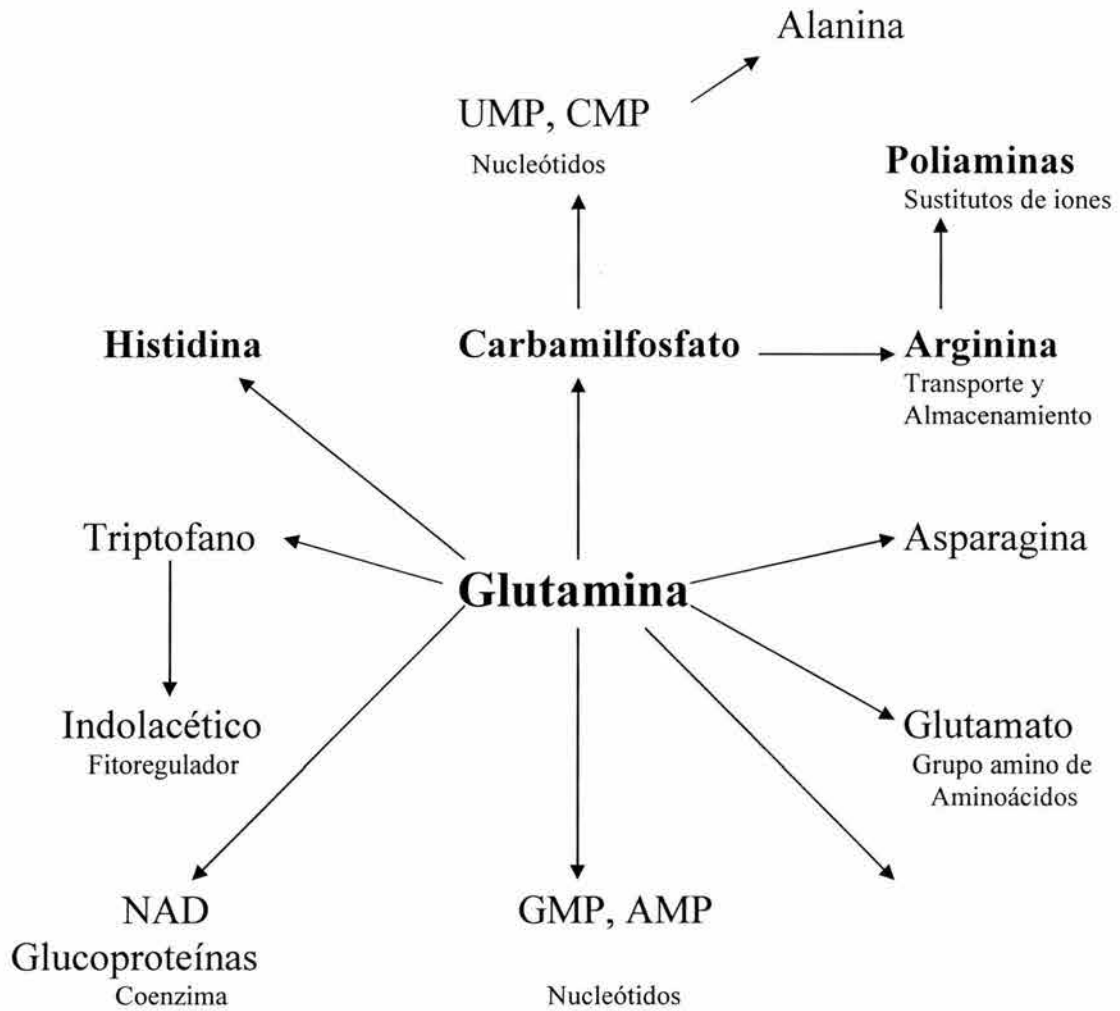


Figura No. 5 Transferencia en las plantas del nitrógeno de la glutamina a una gama de compuestos.

Hay varias enzimas que, potencialmente, son capaces de incorporar el amonio a formas orgánicas como son aminoácidos y amidas: la alanina deshidrogenasa, aspartato deshidrogenasa, asparagino sintetasa, glutamato deshidrogenasa, glutamino sintetasa y glutamato sintetasa. De ellas solamente las tres últimas han

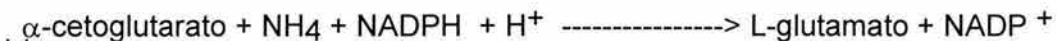
sido descritas en plantas superiores (Miflin y Lea, 1980, Lea *et al.*, 1990, Martilla *et al.*, 1993).

Se considera que la ruta principal de entrada del amonio en células vegetales es vía glutamato deshidrogenasa (EC.1.4.1.2) (GDH) (Lea *et al.*, 1990, Miflin y Lea 1980, Robinson 1992, Lea y Robinson, 1992). La glutamato deshidrogenasa es una enzima hexamérica con un peso molecular entre 310-330 kDa, integrada por dos subunidades, cada subunidad con un peso aproximado de 53 kDa (Robinson, 1992).

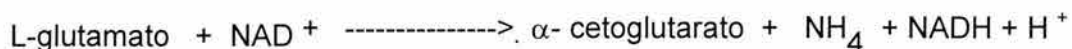
Esta enzima se encuentra ampliamente distribuída en todos los organismos y en las plantas se encuentra distribuída en los diferentes tejidos. En las células de hoja se encuentra tanto en mitocondria como en el cloroplasto (Lea y 1974). Esta vía es un mecanismo muy activo para la asimilación de amonio (Pahlich y Koy, 1971). La glutamato deshidrogenasa presenta dos isoenzimas; una utiliza NADP⁺ como cofactor y la otra utiliza NAD⁺. La enzima biosintética es la glutamato deshidrogenasa NADP⁺-dependiente, mientras que la glutamato deshidrogenasa NAD⁺-dependiente es la enzima catabólica (Pahlich y Koy, 1971, Magasanik, 1992, Oaks, 1994). Ambas reacciones son reversibles y relacionan la biosíntesis y degradación de compuestos nitrogenados.

a) La glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza las siguientes reacciones:

(1) La enzima biosintética dependiente de NADP⁺ cataliza la aminación reductiva de un cetoácido dando lugar al aminoácido:



(2) La enzima catabólica dependiente de NAD⁺ que cataliza la oxidación deaminativa:



b) La glutamino sintetasa (GS)

Otra enzima capaz de realizar la asimilación de amonio es la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) (GS) la cual consta de 12 subunidades de 50 kDa cada una (Lea y Robinson, 1992, Oaks, 1994). La amida de la glutamina sirve para la síntesis del triptofano, histidina, carbamil fosfato, glucosamina 6 fosfato, CTP y AMP y cada uno de estos compuestos, así como la alanina y glicina, inhiben acumulativamente a la enzima por mecanismos alostéricos a través de sitios específicos (inhibición por retroalimentación acumulativa). Además de ser regulada alostéricamente, la glutamino sintetasa se ve regulada por modificación covalente por adenilación (inhibición) y desadenilación (activación). Cuando la enzima esta adenilada, es mucho más sensible a la regulación alostérica. La enzima adeniltransferasa simultáneamente adenila y desadenila a la enzima dependiendo del estado de su proteína regulatoria (Sakakibara *et al.*, 1992). En *E. coli* es la enzima más complejamente regulada de todas las conocidas (Pesole *et al.*, 1995). Se encarga de la incorporación del amonio a la posición amida de la glutamina y su posterior transferencia a la posición de un α -cetoácido (Miflin *et al.*, 1981) (ver figura 4). En plantas, se encuentra en el citoplasma (GS1) y en cloroplasto (GS2); ambas están codificadas por genes nucleares (Hirel *et al.*, 1987, McNally *et al.*, 1983, Martilla *et al.*, 1993).

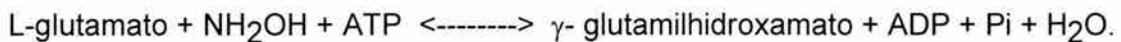
O'Neal y Joy en 1973 purificaron y caracterizaron a la glutamino sintetasa (GS) de un gran número de tejidos vegetales, incluyendo hojas de chícharo, tallos, raíces, etc. La enzima cataliza dos tipo de reacciones, una de biosíntesis y otra de transferencia (Kanamori y Matsumoto 1972, Lea *et al.*, 1990). En la reacción de síntesis convierte glutamato en glutamina al incorporar un grupo amonio, utilizando ATP (Magasanik, 1992, Pesole *et al.*, 1995).

(1) Enzima biosintética:



En la reacción de transferencia cataliza la síntesis de γ -glutamil hidroxamato a partir de la glutamina hidroxilamina. La hidroxilamina como sustrato en lugar del amonio produce γ -glutamil hidroxamato.

(2) Enzima de transferencia:



Por otro lado, para realizar la cuantificación de la actividad de la glutamino sintetasa se puede emplear la reacción en que participa el γ -glutamil hidroxamato (O'Neal y Joy, 1974, Lea *et al.*, 1990).

El γ -glutamil hidroxamato puede ser rápidamente cuantificado por una reacción simple con cloruro férrico en medio ácido para dar un color café que puede ser determinado espectrofotométricamente a 540 nm. Esta reacción mide la actividad de la enzima en sentido biosintético (O'Neal y Joy 1974). Una característica distintiva de las GS en las plantas superiores es la existencia de diversas isoenzimas localizada en diferentes compartimientos subcelulares, tanto en citoplasma (GS₁) como en el cloroplasto (GS₂) (McNally *et al.*, 1983, Martilla, 1993, Oaks, 1994).

La GS parece estar distribuída a lo largo de toda la planta, aún cuando sus niveles difieren de manera importante entre un tejido y otro. En la mayoría de los casos, la actividad encontrada en hojas es mucho mayor que en raíz (McNally *et al.*, 1983, Oaks, 1994).

Se considera que más del 95% de la asimilación de amonio en plantas la realiza la GS. Después de la incorporación del amonio en la glutamina por la enzima, el nitrógeno puede ser transferido a una amplia gama de compuestos (McNally *et al.*, 1983, Lea *et al.*, 1990, Martilla, 1993) (ver figura 5).

Se ha reportado la actividad total de glutamino sintetasa en diferentes especies de plantas y se han distinguido cuatro grupos de plantas por el contenido de específico de isoformas de GS (MacNally *et al.*, 1983).

El grupo A se encuentra representado por algunas gramíneas, leguminosas y halofitas, las cuales solamente presentan actividad de GS1 (Martilla *et al.*, 1993). Esto sugiere que en estas especies de plantas la actividad de GS ocurre principalmente en citoplasma o citosol (GS1). Se ha sugerido que la GS1 es responsable de la reasimilación de amonio producido durante la fotorespiración (McNally *et al.*, 1983, Oaks, 1994).

En el grupo B se encuentran algunas especies de gramíneas, leguminosas halofitas, las cuales solo presentan actividad de GS2. Se ha sugerido que la principal función de GS2 es la asimilación de amonio en el cloroplasto y que probablemente esta actividad dependa de luz y que está controlada por concentraciones de ATP, Mg^{2+} y H^+ en el estroma (Hirel *et al.*, 1982, McNally *et al.*, 1983, Oaks, 1994).

El grupo C se distingue por presentar las dos isoformas, la GS1; presente en 5 a 30% de actividad total de la enzima en hoja y la GS2 representando del 70 al 95% de actividad total de la enzima en el mismo tejido. En consecuencia, en estas plantas, las cuales tienen altas tasas de fotorespiración, se ha visto que probablemente la GS2 podría participar en la reasimilación de amonio desprendido durante la descarboxilación de glicina y serina (McNally *et al.*, 1983).

El grupo D, representado por plantas C_4 y CAM, presentan una gran actividad de GS1. Esto sugiere que las plantas C_4 pueden reasimilar el amonio de la fotorespiración vía GS citosólica (McNally *et al.*, 1983, Martilla *et al.*, 1993, Oaks, 1994) (ver cuadro II).

Cuadro II

**TIPOS DE ACTIVIDAD DE GLUTAMINA SINTETASA PRESENTES EN
DIFERENTES TIPOS DE PLANTAS**

GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D	
SOLAMENTE PRESENTAN ACTIVIDAD DE GSI	SOLAMENTE PRESENTAN ACTIVIDAD DE GS2	PRESENTAN ACTIVIDAD DE GSI Y GS2	GSI %	GS2 %	PRESENTAN ACTIVIDAD DE GSI Y GS2	GSI %	GS2 %
<i>Ammophila arenaria</i>	<i>Cuscuta australis</i>	<i>Avena sativa</i>	10	90	<i>Zea mays</i>	45	55
<i>Eriophorum augustifolium</i>	<i>Lathraea clandestina</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	17	83	<i>Sorghum vulgare</i>	70	30
<i>Lupinus sp</i>	<i>Lathraea squamosa</i>	<i>Oryza sativa</i>	18	82	<i>Digitaria sanguinalis</i>	80	20
<i>Crithom maritimon</i>	<i>Orobache cernua</i>	<i>Triticum aestivum</i>	18	82	<i>Echinochloa crusgalli</i>	71	29
<i>Limonium vulgare</i>	<i>Orobache minor</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	5	95	<i>Kalanchoë daigremontiana</i>	36	64
<i>Petunia grandiflora</i>	<i>Orobache ramosa</i>	<i>Pisum sativum</i>	15	85	<i>K. blossfeldiana</i>	65	35
<i>Nicotiana tabacom</i>		<i>Phaseolus aureus</i>	25	75			
<i>Spinacia oleacea</i>		<i>Dendrobium nobile</i>	22	78			
<i>Lycopersicon escolentum</i>							

c) La glutamato sintetasa (GOGAT)

Por otro lado, Dougall (1974), Lea *et al.*, (1990) y Robinson *et al.*, (1992) encontraron una glutamato sintetasa (GOGAT) en tejidos no fotosintéticos dependiente de NAD(P)H, (enzima glutamino α -cetoglutarato aminotransferasa o ferredoxina reducida) que interviene en la reacción de asimilación del amonio (Mifflin *et al.*, 1981).

glutamina + α -cetoglutarato + ferredoxina o NADPH + H \rightarrow glutamato + ferredoxina oxidada o NADP

Lea y Mifflin, en el mismo año, describieron otra actividad dependiente de ferredoxina en hojas verdes. Una característica clave de esta vía de asimilación es su naturaleza cíclica en la que el glutamato actúa como aceptor y como producto de la asimilación de amonio (Mifflin y Lea, 1980, Oaks, 1994) (ver figura 6).

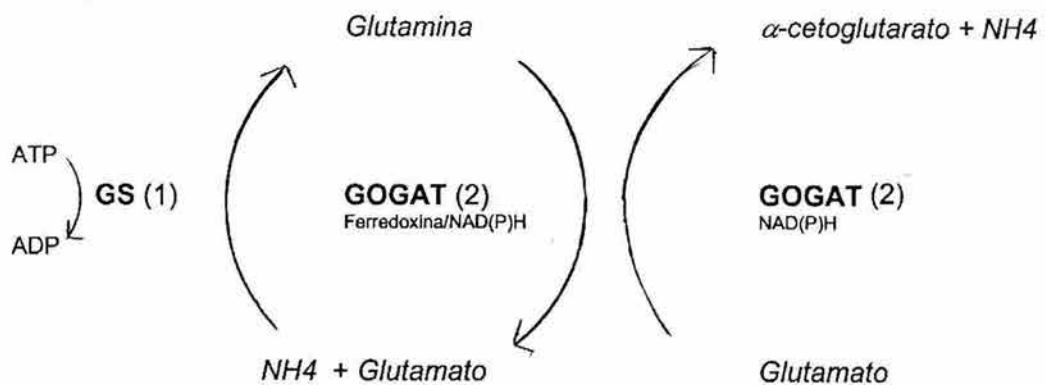


Figura No. 6. Ciclo en el que participan la glutamino sintetasa (1) y la glutamato sintetasa dependiente de NAD(P)H o ferredoxina (2) en el cual el glutamato actúa como aceptor y como producto de la asimilación de amonio. (Tomado de Mifflin y Lea, 1980, Oaks 1994).

2.11. La Influencia del Estrés por Sal Sobre el Metabolismo Nitrogenado.

Se sabe que durante el estrés salino existe pérdida de agua y disminución en el potencial de agua, además de una serie de cambios metabólicos.

Puesto que muchas plantas utilizan compuestos nitrogenados como solutos compatibles bajo estas condiciones de estrés, se considera que los cambios en el metabolismo del nitrógeno son de importancia especial (Bhagwat y Apte, 1989, Lea *et al.*, 1990, Botella *et al.*, 1997, Simontacchi *et al.*, 2001).

La pérdida de agua provoca una acumulación de amonio, de aminoácidos totales (Levitt, 1980) y cambios en la actividad de las enzimas asimiladoras de amonio (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1987). Esto sugiere que el metabolismo de los aminoácidos y los mecanismos de asimilación de amonio se encuentran integralmente involucrados en las respuestas de las plantas al estrés salino por la pérdida de agua.

Con base a lo anterior se ha considerado que la acumulación de amonio y de aminoácidos podría ser el resultado de un desarreglo en la síntesis proteica (Levitt, 1980). Se sabe, por ejemplo, que la síntesis de proteínas se inhibe inmediatamente por estrés salino y el proceso de proteólisis puede estar aumentado (Ramagopal, 1987, Bottacini *et al.*, 1995).

Puesto que la velocidad de generación de amonio puede exceder a la velocidad de asimilación basal, la planta debe activar mecanismos de reasimilación de amonio de manera rápida y eficiente. Las enzimas que participan en la asimilación **de novo** es la glutamato deshidrogenasa y el ciclo en el que participan la glutamino sintetasa y la glutamato sintetasa dependiente de NAD(P)H o ferredoxina reducida; ver figura 6 (Mifflin y Lea, 1980).

Se han reportado cambios en las actividades de estas enzimas provocados por la pérdida de agua. La actividad de la enzima GDH, por ejemplo, se ve incrementada

en *Pennisetum americanum*, *Phaseolus vulgaris* (Bottacin *et al.*, 1985, Jager y Meyer 1977) en respuesta al estrés por agua, mientras que para *Pisum sativum* y *Zea mays*, la GS presenta incrementos en su actividad (Rakova *et al.*, 1978, Boucaud y Billard, 1981).

3. HIPOTESIS

La adaptación de células de *Bouvardia ternifolia* cultivadas *in vitro* a concentraciones crecientes de NaCl provoca cambios bioquímicos (actividad de algunas enzimas, acumulación de metabolitos, incremento de proteínas, etc.) y moleculares (expresión o inhibición de genes) que podrían estar involucrados en la resistencia de las células al estrés por NaCl.

4. OBJETIVOS GENERALES

1. Implementar las técnicas del cultivo *in vitro* de células de ***Bouvardia ternifolia*** tanto en cultivos en suspensión como en cultivos sólidos.
2. Someter a células de ***B. ternifolia*** cultivadas en medios sólido y en suspensión a diferentes grados de estrés salino.
3. Obtener líneas celulares de ***B. ternifolia*** capaces de crecer en medios nutritivos adicionados con concentraciones crecientes de NaCl (0.085 M, 0.170 M, 0.260 M y 0.340 M).
4. Determinar algunos parámetros tales como: velocidad de crecimiento celular, tiempo de generación, tolerancia de las células sometidas a diferentes grados de estrés.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si en células de *B. ternifolia* adaptadas progresivamente a altas concentraciones de NaCl se provocan alteraciones morfológicas.
2. Determinar mediante la actividad de las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa, si el metabolismo nitrogenado de células de *B. ternifolia* se ve afectado cuando son sometidas a un estrés gradual con NaCl.
3. Determinar si la prolina actúa como un osmolito protector en las células de *Bouvardia ternifolia* sometidas a estrés por sal.
4. Evaluar posibles cambios en la expresión génica de células de *B. ternifolia* como respuesta a una condición de estrés por sal, mediante la comparación de patrones electroforéticos de proteínas totales de células control con aquellos de células que son crecidas en presencia de NaCl (85, 170, 260 y 360 mM).

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Modelo Experimental

Desde hace varios años, la técnica de cultivo de tejidos vegetales es una herramienta muy importante como sistema o modelo experimental con mayores posibilidades de control. Tales sistemas son de gran ayuda para realizar estudios, por ejemplo, de fisiología, genética, bioquímica y biología molecular.

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

Conociendo las ventajas que en general presenta el cultivo de tejidos y las características particulares de *B. ternifolia* que hacen del cultivo de sus tejidos un material experimental adecuado por su extraordinaria facilidad de crecer *in vitro*, su mantenimiento bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas (evitando así las variaciones del clima y del suelo) además de que se cultiva asépticamente, eliminándose así los problemas asociados por contaminación, decidimos emplearla como modelo experimental. Además, proporciona material abundante y homogéneo durante todo el año sin depender de ciclos ecológicos y su manipulación es relativamente fácil en el laboratorio lo que la hace un modelo ideal para el estudio de estrés por sal. ver figura 7.



Figura No. 7. Ejemplar de *Bouvardia ternifolia*.

Ubicación taxonómica:

Bouvardia ternifolia (cav.) Schlecht (Rzedowski y Rzedowski, 1985)

Clase: Angiospermae

Orden: Dicotyledoneae

Familia: Rubiaceae

Género: *Bouvardia*

Especie: *ternifolia*

Sinonimias: *Bouvardia angustifolia* HBK
Bouvardia hirtella HBK
Bouvardia jacquinii HBK
Bouvardia linearis HBK
Bouvardia quaternifolia HBK
Bouvardia tolicana Hook et Arh.
Bouvardia triphylla Salisb.
Houstonia coccinea Andrews

Características generales de la especie:

Arbusto, o planta herbácea perenne, de 0.3 a 1.5 m de altura; ramas papiloso-hispídulas en la juventud con pelos blancos cortos; hojas por lo común verticiladas 3 a 4 por nodo, estípulas pequeñas, pecíolos de 0.5 a 11 mm de largo, láminas extremadamente variables (lineares, lanceoladas, elípticas, ovadas) con mayor frecuencia elíptico-lanceoladas, de 1 a 10 cm de largo y 0.2 a 2.5 cm de ancho, ápice agudo, base cuneiforme, nervación pinada, densamente papiloso-hispídulas o vilosulas; inflorescencia generalmente en forma de cima terminal de 3 a 40 flores, pedicelos de 2 a 14 mm de largo, hipantio poco o densamente papiloso, lóbulos del cáliz lanceolados a lineares de 2 a 10 mm de largo; corola tubular, de color salmón, rojo, naranja o escarlata, excepcionalmente blanco, externamente pubescente, el tubo de 5 a 30 mm de largo con un anillo velloso interno hacia la base, lóbulos ovados a oblongos, de 1.5 a 3.5 mm de largo; anteras de 2 a 4 mm de largo cápsulas de 4.5 a 9 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, glabras algo papilosas; semillas de 2 a 3.5 mm de ancho (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

Nombre vulgar: "Trompetilla"

Ampliamente distribuída en el Valle de México.

Altura: 2250-3000 m snm.

Se encuentra en bosques, matorrales y pastizales, pero preferentemente en lugares perturbados. Fuera del Valle de México, se conoce de Sonora y Texas a Oaxaca.

Se le atribuyen popularmente propiedades curativas contra la disentería y la rabia.

6.2. Cultivo *in vitro* de células de *Bouvardia ternifolia*

Obtención de cultivos *in vitro* de *Bouvardia ternifolia* en medio sólido y en suspensión.

Se colocaron semillas de *B. ternifolia* en una caja de petri estéril y se procedió a su desinfección. Para ello, se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 30 segundos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se eliminó el cloro con 4 ó 5 enjuagues de 125 ml de agua destilada estéril cada uno hasta que no hubiera olor perceptible a cloro. La desinfección se realizó dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en frascos de cultivo que contenían 10 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) estéril sin fitorreguladores y se incubaron a 26°C en luz.

Una vez que las semillas germinaron y se obtuvieron plántulas, se procedió a tomar fragmentos de hojas y tallos (6-9 mm) seccionados con bisturí y manipulados con pinzas estériles. Se colocaron de 5 a 7 explantes en frascos de cultivo con medio MS con fitorreguladores (1 mg/litro 2,4,diclorofenoxi acetato y 0.005 mg/litro de cinetina). Se incubaron con fotoperíodo luz-obscuridad de 16/18 horas a una temperatura de 26°C \pm 5°C; la iluminación se hizo con lámparas fluorescentes de 39 watts (luz de día) colocadas a 30 cm de distancia del frasco de cultivo.

A los 18 días de cultivo, los peciolo y porciones de tallo con su respectiva formación de callo, se transfirieron en condiciones asépticas a medio MS con fitorreguladores en frascos Gerber, incubándose a 26°C con luz continua y se resembraron cada 15 días.

Los medios mencionados fueron esterilizados en autoclave a 15-17 lbs/pulg² de presión y 121°C de temperatura durante 15 minutos y después de gelificar a temperatura ambiente se mantuvieron en refrigeración por un período máximo de 2 meses.

El manejo del material vegetativo fue realizado bajo condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar marca VECO y se trabajó con material quirúrgico esterilizado por autoclave a 15-17 lbs/pulg² durante 20 min. Este material se mantuvo sumergido en tubo de ensaye con etanol al 96% y se flameó en un mechero bunsen cada vez que era sacado del tubo.

Cuando se obtuvieron callos friables y en cantidad suficiente se procedió a establecer el cultivo en suspensión. Para ello se tomaron de 0.5 a 1.0 gr de callo friable colocándolo en una caja de petri estéril y disgregándolo perfectamente con una espátula bajo condiciones estériles. El material disgregado se colocó en un matraz de 250 ml de capacidad que contenía 50 ml de medio MS líquido con fitorreguladores y se mantuvo en un incubador (Lab-Line Orbit) en agitación constante (125 rpm) a 26°C. Transcurridos entre 15 y 20 días se obtuvo la población máxima de células y se resembraron.

Una vez establecido el cultivo en suspensión se procedió a propagarlo en diferentes matraces. Se inocularon 50 ml de medio MS con fitorregulador con 2.5 ml de células (aproximadamente 20 mg/ml de células en fase logarítmica) y se incubaron a 26°C con agitación continua de 125 rpm. Posteriormente se resembraron cada 15 días (Fig. 8)

6.3. Adaptación de células de *B. ternifolia* a concentraciones crecientes de NaCl.

Una vez establecido el cultivo en suspensión se procedió a adaptar a células de *B. ternifolia* a estrés salino gradual. Para ello, se cosecharon células cultivadas en suspensión por filtración a través de un embudo Buchner con papel Whatman No. 1 con la ayuda de vacío bajo condiciones estériles y dentro de una campana de flujo laminar. Las células cosechadas se tomaron con una espátula estéril y se colocaron dentro de una caja de petri estéril; se pesaron 50 mg de células y se inocularon 50 ml de medio MS con fitorregulador adicionado con 0.085 M NaCl y se incubaron a 26°C con agitación continua, resembrándolas cada 15 a 20 días (Singh *et al.*, 1985).

Cultivo de tejidos de *Bouvardia ternifolia*

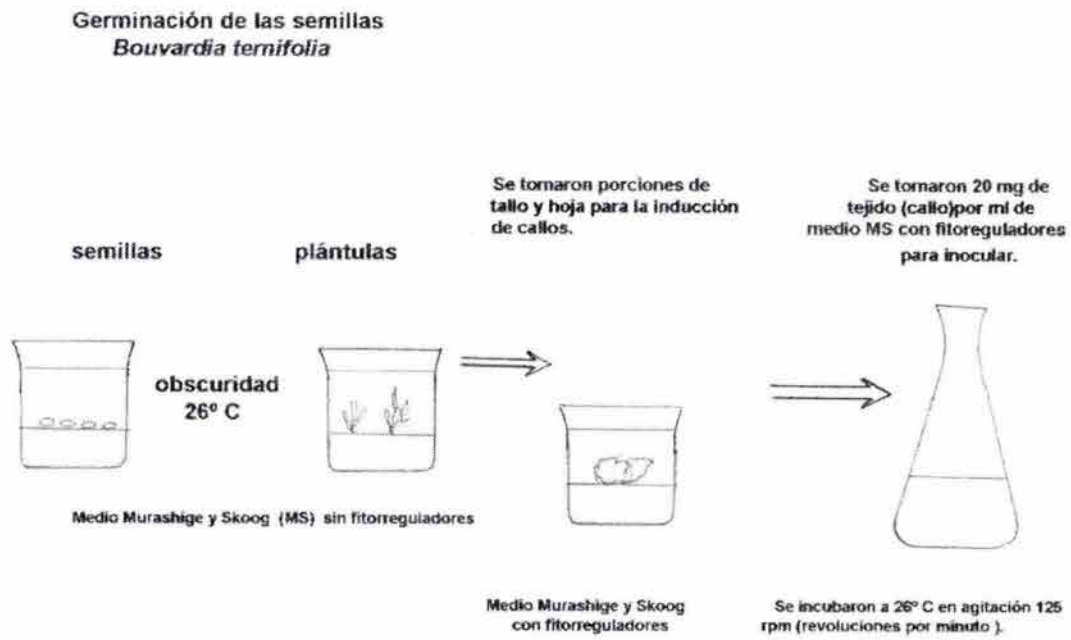
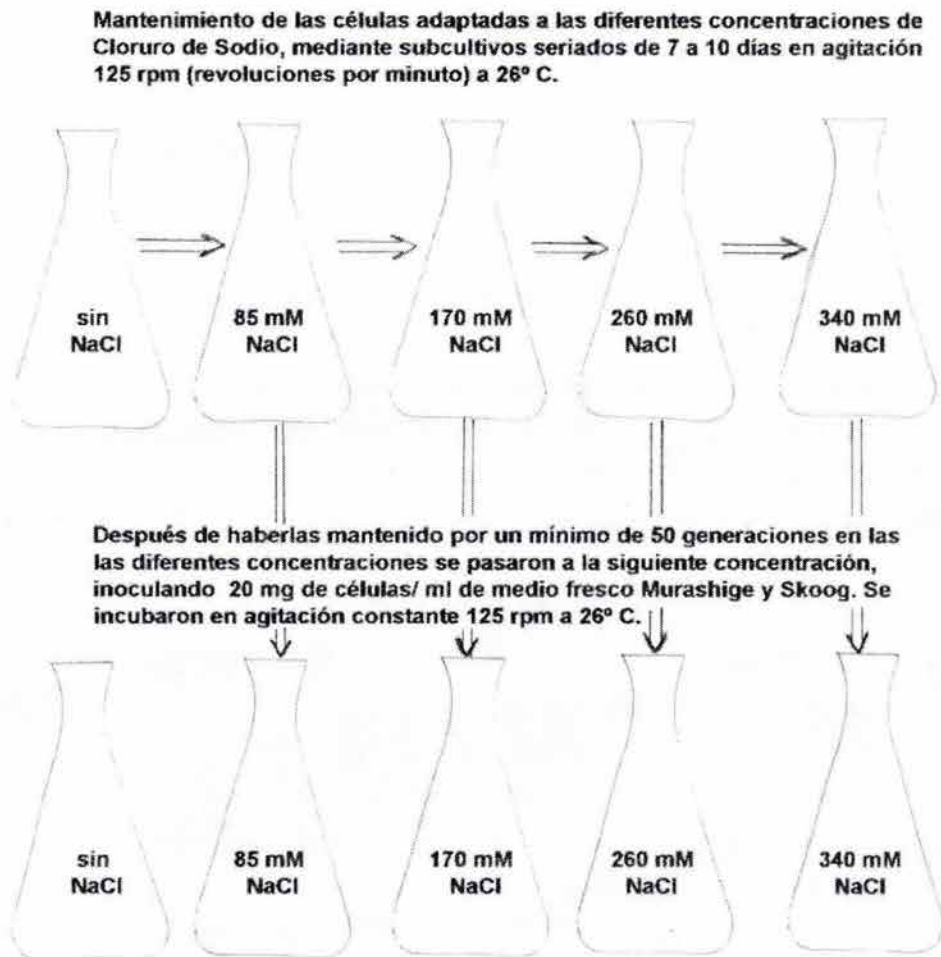


Figura. 8. Cultivo *in vitro* y propagación de células de *Bouvardia ternifolia*.

Para obtener células adaptadas a mayores concentraciones de NaCl se partió de células en suspensión crecidas en 85 mM de NaCl. Según Binzel *et al.*, (1985), se considera que las células ya se encuentran adaptadas a una determinada concentración de NaCl después de 50 generaciones, por lo que una vez transcurrido este tiempo las células adaptadas a 85 mM de NaCl se subcultivaron en un medio adicionado con 170 mM de NaCl para su adaptación a esta nueva concentración de sal.

Después de haberlas mantenido por un mínimo de 50 generaciones se tomaron 2.5 ml de células (20 mg/ml de células) en fase logarítmica y se inocularon en medios MS con fitorregulador adicionados con 0.170 M NaCl incubándose a 26°C con agitación constante (Fig. 9).



Células adaptadas a las diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio.

Figura. 9. Cultivo *in vitro* de *Bouvardia ternifolia* sometida a estrés salino gradual.

Otra forma de obtener líneas celulares capaces de crecer en concentraciones crecientes de NaCl fue tomar porciones de callos crecidos en MS sin sal; éstos se transfirieron a medio MS adicionado con 0.085 M de NaCl y se incubaron a 23° C. Posteriormente se resebraron a esa misma concentración durante unas 50 generaciones, por lo que una vez transcurrido el tiempo, las células ya adaptadas a 0.085 M de NaCl se transfirieron a medio MS adicionado con 0.170 M de NaCl para permitir su adaptación a esta concentración y una vez alcanzada la adaptación de éstas se procedió de igual forma con la siguiente concentración de NaCl (0.260 M) hasta alcanzar 0.340 M de NaCl.

Una vez obtenidas las diferentes líneas celulares capaces de crecer a concentraciones crecientes de NaCl (85, 170, 260 y 340 mM) se procedió de igual manera para obtener cultivos en suspensión de las diferentes líneas adaptadas.

Una vez que las células se adaptaron a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio se procedió a realizar los siguientes estudios:

- a) Tiempo de generación
- b) Estudios microscópicos
- c) Extracción y estudio de proteínas mediante electroforesis
- d) Estudios bioquímicos: cuantificación de prolina, medición de la actividad de glutamato deshidrogenasa y de glutamino sintetasa.

De la misma manera, después de haber mantenido a estas células por un mínimo de unas 50 generaciones a 0.170 M de NaCl, se tomaron 2.5 ml de células (20 mg/ml) y se trasladaron a un medio de cultivo con 0.260 M de NaCl en donde permanecieron durante 50 generaciones más, con resiembras continuas. Una vez alcanzadas las 50 generaciones se pasaron a medio con 0.340 M de NaCl y se mantuvieron por un mínimo de 50 generaciones adicionales. Posteriormente, cada línea adaptada se resebró cada quince días y se mantuvo con agitación constante (125 rpm) a 26°C.

6.4. Curvas y parámetros de crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* control y células en condiciones de estrés salino de cultivos en suspensión.

Al inocular inicialmente los medios con células para el cultivo en suspensión y determinar las curvas de crecimiento, se midió el volumen relativo de paquete celular. Para determinar las curvas de crecimiento de células de *B. ternifolia* (control y tratadas), se prepararon 7 matraces de 125 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio los cuales fueron inoculados con 1.25 ml de células (a una concentración de 20 mg de células / ml), midiendo al inicio (tiempo cero) el tamaño del inóculo. Se hicieron mediciones de los diferentes parámetros de crecimiento los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 con repeticiones para cada muestra.

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

a) Determinación del volumen relativo de paquete celular (VRPC).

Este se determinó colocando una alícuota de 10 ml de células en suspensión tanto control como adaptadas al estrés salino dentro de un tubo de centrifuga y sedimentando a las células a 2500 rpm en una centrifuga clínica durante 15 minutos. El volumen de células sedimentadas (paquete de células) se reportó porcentualmente con respecto al volumen total (10 ml). Este paquete también fue utilizado para la determinación del peso seco.

b) Determinación del peso seco.

Se tomaron 10 ml de células en suspensión; las células se recuperaron mediante filtración al vacío sobre un papel filtro Whatman No. 1 previamente pesado (peso inicial), las células se lavaron rápidamente con agua destilada y se pusieron a secar en una estufa a 60°C durante 12 horas hasta obtener un peso constante (peso final). El peso final menos el peso inicial corresponde al peso seco total de las células.

c) Determinación del peso fresco.

Se tomaron 10 ml de células en suspensión; las células se recuperaron mediante filtración en un papel filtro Wathman # 1 humedecido y previamente pesado (peso inicial), las células se lavaron rápidamente con medio MS estéril. Una vez quitado el exceso de agua se procedió a pesarlas (peso relativo), a éste peso se le restó el inicial obteniéndose así el valor de peso fresco.

d) Preparación de polvos de acetona.

Las células en suspensión se recuperaron por filtración en un embudo Buchner a través del papel filtro Whatman No. 1 con la ayuda de vacío. Una vez cosechadas, se les adicionaron 20 ml de acetona pura previamente enfriada a -20°C ; se mezcló perfectamente y se dejó reposar durante 15 minutos. En seguida se filtró la acetona y después se adicionó nuevamente acetona fría, dejando en reposo de 15 a 20 minutos. Posteriormente, la mezcla se secó por filtración y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca se transfirió a tubos etiquetados y se guardó a -20°C hasta su utilización. Cuando se partió de células de callo, éste fue previamente disgregado en un mortero con la ayuda de acetona fría (-20°C) y se procedió de la manera anteriormente mencionada.

e) Determinación del contenido de proteína total por el método de Lowry modificado por Oyama y Eagle, (1956).

De los polvos de acetona se tomaron 20 mg de cada una de las muestras y se les adicionó 1 ml de amortiguador de extracción de Laemmli (Tris-HCl pH 6.8 65 mM; SDS 2.0 %; glicerol 5.0 %; β mercaptoetanol 5.0 %; EDTA 5mM; PMSF1mM); se resuspendieron las muestras y luego se colocaron en baño maría en ebullición durante 15 minutos. Se colocaron inmediatamente después en hielo y se incubaron durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron en una microfuga durante 10 minutos; en seguida, el sobrenadante se decantó en un tubo Ependorff y se colocó en hielo.

La determinación se realizó por triplicado. A los tubos blanco se les colocó 1.0 ml de agua destilada.

A los tubos con estándares se les agregó 1.0 ml de agua destilada conteniendo 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 μg de albúmina bovina.

A cada uno de los tubos problema se les agregó 1 ml de agua y 100 μl de muestra. A cada tubo se les agregó 5.0 ml de la solución C que contiene: 50 volúmenes de solución A y 1 volumen de solución B.

Solución A		Solución B	
NaOH	4.0 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.0g
Tartrato doble de Na y K	0.2 g	Aforar con agua destilada a 1000 ml	
Aforar con agua destilada a 1000 ml			

Posteriormente a cada tubo se les adicionaron rápidamente con micropipeta 0.5 ml de reactivo de Folín-Ciocalteu, mezclando en vortex.

La lectura colorimétrica se efectuó entre 30 y 120 minutos más tarde ajustando el espectrofotómetro a 660nm de longitud. La cantidad de proteínas se calculó a partir de la curva estándar.

6.5. Estudios morfológicos de células de *B. ternifolia* control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl (0.085 M, 0.170M, 0.260 M y 0.340 M) (Curtis, J. 1986).

De cultivos en suspensión de células de *B. ternifolia* control y adaptadas se tomaron 2ml (20mg de células /ml), los cuales se colocaron en tubos y se centrifugaron a 3500 rpm en una centrífuga clínica durante 15 minutos. Después se descartó el sobrenadante y a las pastillas se les agregó 5.0 ml de FAA (etanol 48%, ácido acético glacial 5%, formaldehído 3.7%). Para fijar a las células, éstas

se mantuvieron por un mínimo de 12 horas a temperatura ambiente y, en el caso de no ser utilizadas inmediatamente, se dejaron en FAA a 4°C.

a) Tinción de células con acetorceína

Una vez fijadas, las células fueron lavadas con etanol al 70%. Posteriormente, se les adicionó acetorceína (orceína 1.25 g/100ml, ácido acético glacial 45%) y se incubaron durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se tomaron 100µl de células y se mezclaron con gelatina de alto índice de refracción (gretina 10%, glicerina 45%, fenol 1%), sobre un portaobjetos y se les colocó un cubreobjetos. Las preparaciones se dejaron por un lapso de 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron observadas al microscopio.

b) Determinación del volumen nuclear y nucleolar (Vázquez-Nin et al., 1983).

Los volúmenes nuclear y nucleolar fueron calculados con la ayuda de un microscopio óptico *Olympus* y con un ocular micrométrico con un Vernier 1.600; se determinó el diámetro en núcleos y nucleolos y posteriormente se calculó el volumen.

c) Determinación de almidón en granulos de células control y adaptadas (Curtis, J. 1986).

Se tomaron 2ml de células de *B. ternifolia* con una densidad de 20mg de células/ml. Se fijaron con FAA durante 24 hrs. Al concluir el tiempo las células se lavaron con etanol al 70%, en seguida se les adicionó una solución de yodo en yoduro de potasio (yodo 5%, yoduro de potasio 10%) y se dejaron teñir de uno a dos días. Posteriormente se realizaron preparaciones frescas de cada una de las muestras y se observaron al microscopio Carl Zeiss en campo claro.

6.6. Cuantificación de prolina en células de *B. ternifolia* (Spies, J.R., 1957; Moore, S. y Stein, W.H., 1948; Moore, S. y Stein, W.H., 1951).

Se pesaron 70 mg de células de *B. ternifolia* control y de células adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl previamente liofilizadas y pulverizadas. Se colocaron en un tubo de ensaye y se les agregó 10 ml de ácido 5-sulfosalisílico ($C_7H_2O_6S \cdot 2H_2O$) al 3% (p/v) y se mezclaron en vortex durante 10 segundos, se dejaron reposar durante 5 minutos. Posteriormente se filtraron en papel Whatman No. 2 y el filtrado se conservó en refrigeración.

Análisis:

Se tomaron 2 ml de cada uno de los extractos y se colocaron en tubos de ensaye a los cuales se les adicionaron 2.0 ml de ácido acético glacial, 2.0 ml de ninhidrina y se mezclaron en vortex. Se taparon los tubos con papel aluminio y se incubaron en baño maría en ebullición (90-95°C) durante una hora. Al término de este tiempo se colocaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se sacaron del hielo, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se les adicionaron 4.0 ml de tolueno mezclándolo rápidamente en vortex. Se dejó reposar hasta obtener dos fases. Una coloreada rosa-rojo y la otra ligeramente amarillenta. Una vez formadas ambas fases se recuperó la fase coloreada con una pipeta de manera de no tomar nada de la fase amarillenta.

La absorbencia de la fase coloreada se determinó leyendo en el espectrofotómetro a 520 nm de longitud; el contenido de prolina se determinó extrapolando en la curva patrón de prolina (mg prolina por litro). La solución patrón de prolina tiene una concentración de 500 mg de prolina en ácido 5-sulfosalisílico.

6.7. Medición de la actividad enzimática de glutamato deshidrogenasa (GDH) de células *B. ternifolia* control y células adaptadas (0.085, 0.170, 0.260 y 0340 M NaCl) (Joy, 1973 modificadas por Loyola-Vargas, 1984).

Preparación del extracto de células de *Bouvardia ternifolia* crecidas en medio líquido. Se eliminó el medio de cultivo filtrando a la suspensión celular con vacío en un embudo Buchner y papel Whatman No. 1. Una vez eliminado el medio se

prepararon alícuotas de 0.2 g de células y se congelaron a -70°C por tres horas ó más.

Las células congeladas se molieron en un mortero previamente enfriado hasta obtener un polvo fino y se dejaron descongelar en un baño de hielo. Al tejido pulverizado se le adicionó el amortiguador de extracción (Tris-HCl 50mM pH 8.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1mM. β -mercaptoetanol 5mM) en una relación 1:10 ó 1:20 p/v. La mezcla se homogeneizó en un politron a mediana velocidad. El homogeneizado se centrifugó a 14,000 g's durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 14000 g's durante 20 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) el cuál se utilizó para las determinaciones enzimáticas.

a) Determinación de la actividad aminativa (GDH-NADH)

		Blanco	Muestra
Tris-HCl pH 8.2	100mM	0.566 ml	0.466 ml
α -cetoglutarato	10mM	0.166 ml	0.166 ml
NH_4Cl	100mM	0.166 ml	0.166 ml
NADH	160 μM	0.066 ml	0.066 ml
Extracto	total	----	0.100 ml
Volumen final		0.964 ml	0.964 ml

La mezcla se incubó en cubetas sin NADH a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo NADH. Se graficó la disminución en la absorbencia a 340 nm, durante 5 minutos con lecturas cada 20 segundos. Se utilizó solo la parte lineal de la gráfica. Al mismo tiempo se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976), para poder expresar los resultados en actividad específica (μmoles de NADH oxidados, por minuto por microgramos de proteína).

b) Determinación de la actividad desaminativa (GDH-NADH⁺) (Loyola-Vargas *et al.*, 1984).

La mezcla de reacción contenía:

		Blanco	Muestra
Tris-HCl	100 mM pH 9.4	700µl	600µl
L-glutamato	60 mM	166µl	166µl
NAD ⁺	600 µM	66µl	66µl
Extracto		- -	100µl
Volumen final (µl)		932 µl	932µl

La mezcla se incubó en cubetas espectrofométricas sin NAD⁺ a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo NAD⁺. Se graficó el incremento en la absorbencia a 340 nm, durante 5 minutos con lecturas cada 20 segundos. Se utilizó sólo la parte lineal de la gráfica. La velocidad de reacción se expresó en micromoles de NAD⁺ reducidos por minuto por microgramo de proteína.

c) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976).

Se realizó una curva estándar de proteína (albúmina bovina) de 2 a 20 µg, por triplicado.

Reactivos: Blanco M u e s t r a s

Solución estandar albúmina (μl)	0	2	4	6	8	10	15
Tris-HCl 50 mM pH 7.8 (μl)	800	798	796	794	792	790	785
Reactivo de Bradford (μl)	200	200	200	200	200	200	200
Volumen final (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

La lectura colorimétrica se realizó entre 10 y 15 minutos más tarde a una longitud de onda de 595 nm. La cantidad de proteína se calculó a partir de la curva estandar.

6.8. Medición de la actividad de la enzima Glutamino Sintetasa (GS) (Kanamori y Matsumoto, 1972).

La extracción de la glutamino sintetasa (GS) se llevó a cabo en una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 50mM pH 7.8, EDTA 1mM, DTT (ditiotreitól) 1mM, MgSO_4 10mM y glutamato de sodio 5mM (Lea, 1990).

La actividad se determinó modificando el método de O'Neal (1973), incubando $43\mu\text{l}$ de extracto total en $57\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción durante 30 minutos a 37°C . Al término del tiempo se adicionaron $30\mu\text{l}$ de una solución de FeCl_3 para determinar la cantidad de γ -glutamilhidroxamato formado; se mezcló rápidamente por inversión de la cubeta y, posteriormente, se leyó a 540 nm.

La cantidad de producto formado se comparó contra una curva patrón usando γ -glutamihidroxamato comercial en presencia de todos los componentes de la mezcla de reacción excepto ATP.

Para determinar la actividad específica se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976), en un volumen final de 200 μ l.

6.9. Curvas y parámetros de crecimiento de células de *B. ternifolia* control y adaptadas (170 mM de NaCl) adicionadas con glutamina.

Se prepararon 14 matraces de 50 ml de capacidad en 10 ml de medio MS con fitorreguladores y sin sal; estos matraces fueron inoculados con 3 ml de células (aproximadamente 20 mg/ml de células en fase logarítmica) y se incubaron a 26° C con agitación continua, 125 rpm.

De la misma manera se prepararon 14 matraces de 50ml de capacidad con 10ml de medio MS con fitorreguladores, NaCl (175 mM) y adicionado con glutamina (5 mM concentración final) y se les agregó a cada matraz 3ml de inóculo (20 mg de células en fase logarítmica).

Se realizaron mediciones de los diferentes parámetros de crecimiento a los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 31 días.

Los parámetros de crecimiento utilizados tanto para el control como para las células adaptadas (170 mM de NaCl) se realizaron como se describió previamente.

6.10. Electroforesis de proteínas totales en geles de poliacrilamida SDS.

Para estudiar a las proteínas totales presentes en células cultivadas *in vitro* de *B. ternifolia* (control y adaptadas a NaCl), se realizaron experimentos de electroforesis unidimensional en geles desnaturizantes (SDS) de poliacrilamida al 12.5% empleando el sistema de amortiguadores de Laemmli (1970). Para los minigeles se utilizó una cámara de electroforesis vertical de 82 mm x 73 mm marca *Bio-Rad* y para los geles grandes, una cámara de electroforesis vertical de *Hofer Instruments*, de 14 cm x 16 cm.

a) Preparación de Geles PAGE-SDS.

	Pequeño	Grande
Gel separador.		
Acrilamida-Bis acrilamida (30:0.8)	4.2 ml	20.8 ml
Tris-HCl 3 M pH 8.8	3.1 ml	3.12 ml
SDS al 10%	126 μ l	500 μ l
Agua destilada	5.0 ml	21.9 ml
	-----	-----
	12.5 ml	50.0 ml
Persulfato de amonio (PSA) al 10%	150 μ l	300 μ l
TEMED concentrado	10 μ l	20 μ l

La solución se colocó en un matraz kitazato y se desgasificó con ayuda de vacío de 3 a 5 minutos agitando suavemente; posteriormente se colocó entre los dos vidrios, enseguida se agregó agua sobre éste y se esperó a que se gelificara.

	Pequeño	Grande
Gel concentrador	3.0 %	6.0 %
Acrilamida-Bis Acrilamida	1.0 ml	4.0 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml	5.0 ml
SDS al 10% (p/v)	100 μ l	200 μ l
Agua destilada	6.45 μ l	10.8 ml
	-----	-----
	10 ml	20 ml

Se colocó la solución en un matraz kitasato, se cerró y se aplicó vacío de 3 a 5 minutos, agitando suavemente.

Posteriormente, se le añadió persulfato de amonio (PSA aL 10 %)

	100 μ l	150 μ l y
TEMED concentrado	10 μ l	10 μ l

Una vez concluido el tiempo, se vació, entre los dos vidrios, colocando el peine y se esperó a que gelificara.

b) Preparación de muestras para electroforesis en geles desnaturalizantes.

Se colocaron los volúmenes requeridos para tener 30 μ g de proteína por carril, de cada una de las muestras (control y adaptadas) en un volumen de 10 μ l de amortiguador de muestra de Laemmli (2x) (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4.0%, glicerol 20%, β mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 2 mg/ml, se almacenó en alícuotas de 2 ml a -20°C). Posteriormente, se mezclaron y se pusieron en baño maría en ebullición durante 5 minutos. De esta manera, las muestras quedaron listas para ser cargadas en el gel.

Condiciones de electroforesis:

Se utilizó solución amortiguadora de corrida 5x con un pH de 8.3 (Tris-base 15 g/ml, glicina 72 g/l y SDS 5g/l) diluída a 1x. La electroforesis fue a 200 volts constantes durante 1 hora para geles pequeños y 5 horas en el caso de geles grandes.

c) Tinción de geles desnaturizantes con azul de Coomassie.

La tinción se realizó dejando los geles cubiertos de una solución de azul de Coomassie 0.125%, metanol 50% y ácido acético glacial 10%, en un recipiente cerrado durante toda la noche, con agitación suave.

Posteriormente, se destiñeron con una solución de metanol al 40% y ácido acético glacial al 70% con agitación suave.

d) Tinción de geles PAGE-SDS en sales de plata. (Sammons *et al.*, 1981; citado en Sambrook, 1990).

i) Se fijaron las proteínas por incubación del gel durante 4-14 horas a temperatura ambiente con agitación suave y continua en 5 volúmenes (del gel) de una solución de etanol: ácido acético glacial:agua (30:10:60).

ii) Al término del tiempo la solución fijadora se retiró y se agregaron 5 volúmenes de etanol al 30%; se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua; se repitió este lavado.

iii) Se descartó el etanol y se lavó 3 veces con 10 volúmenes de agua desionizada cada lavado, con agitación suave y continua de 10 minutos cada uno.

iv) Posteriormente se descartó el agua y se adicionaron 5 volúmenes de una solución de nitrato de plata AgNO_3 al 1.0% recién preparada y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y continua.

v) Una vez concluido el tiempo se descartó la solución de AgNO_3 y se lavó rápidamente con agua desionizada.

vi) Para revelar a las bandas, se adicionaron 5 volúmenes de una solución fresca de carbonato de sodio al 2.5%, formaldehído 0.02% y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave y continua.

vii) Las bandas de proteínas en el gel aparecieron aproximadamente a los 3 minutos y se continuó la incubación hasta obtener un mejor contraste.

viii) Una vez logrado esto se procedió rápidamente a fijarlo con ácido acético al 1% por 5 minutos.

ix) El gel se preservó en metanol al 20% a 4°C antes de ser desecado.

e) Deshidratación de geles PAGE-SDS (Sambrook, 1990).

Se fijó el gel en 5 a 10 volúmenes de ácido acético glacial: metanol: agua (10:20:70) durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se colocó sobre papel Whatman 3MM procurando que quedaran bordes que rebasaban al gel por 1-2 cm. Encima del gel se colocó papel "Egapac" procurando que no quedaran atrapadas burbujas de aire. Una vez armado el "sandwich" se colocó en un deshidratador de geles. (Hoefler Scientific Instrument. Drygel. Mod. SE 1160) a 65°C con la ayuda de vacío durante una hora para geles pequeños y 2.0 hrs. para geles grandes de 0.75 mm de espesor. Al término del tiempo el gel deshidratado se dejó durante toda la noche a 35°C (calor seco), para asegurarse de que quedara perfectamente seco.

6.11. Marcado Radiactivo *in vivo* de proteínas totales con metionina ³⁵S. (Bhagwat y Kumar 1989).

a) Marcaje de células de *B. ternifolia* control y adaptadas a NaCl.

A matraces Erlenmeyer de 50 ml de capacidad, con tapa de rosca, conteniendo 2 ml de células obtenidas de cultivos en fase logarítmica (17 días posteriores al inóculo), se les adicionaron 3 ml de medio MS con fitorregulador sin sal (en el caso del control), 3 ml de medio MS con fitorregulador adicionado con NaCl para las células adaptadas y marca radiactiva, bajo condiciones de esterilidad. Se incubaron a 26°C con agitación constante (125 rpm) durante 2 y 8 horas.

Líneas celulares Adaptadas a NaCl	Medio MS con fitorregulador adicionado con (NaCl)	Inóculo de células de <i>B. ternifolia</i> control y adaptadas	Marca radioactiva metionina ³⁵ S 10 μ Ci/ml;
Control	3.0 ml (sin sal)	2.0 ml	5 μ l
0.085 M	3.0 ml	2.0 ml	5 μ l
0.170 M	3.0 ml	2.0 ml	5 μ l
0.260 M	3.0 ml	2.0 ml	5 μ l
0.340 M	3.0 ml	2.0 ml	5 μ l

b) Marcaje de células de *B. ternifolia* Control y Chocadas con Diferentes Concentraciones de NaCl a los 17 días de la curva de crecimiento.

Concentración NaCl	Inóculo de células de <i>B. ternifolia</i>	μ l de NaCl 1M	Marca Radiactiva Metionina ³⁵ S 10Ci/ml
Control	5.0 ml	-----	5 μ l
0.085 M	5.0 ml	141 μ l	5 μ l
0.170 M	5.0 ml	283 μ l	5 μ l
0.260 M	5.0 ml	434 μ l	5 μ l
0.340 M	5.0 ml	567 μ l	5 μ l

A los matraces que contenían a las células en el día 17 de la curva de crecimiento se les adicionó NaCl a diferentes concentraciones (ver cuadro anterior) y se incubaron a 26°C con agitación constante durante 15 minutos.

Al término del tiempo se les adicionó la marca radiactiva (50 μ Ci por matraz; actividad específica: 10 μ Ci/ml) y se incubaron a 26°C con agitación (125 rpm) durante 2 y 8 hs. respectivamente. Al concluir el intervalo correspondiente, se lavaron las células tres veces con medio MS sin fitorregulador a través de un sistema de filtrado con ayuda de vacío para eliminar la marca que no se incorporó. Las células cosechadas se colocaron en tubos Eppendorf (20 mg de células). A cada tubo se le adicionó 1.0 ml de solución amortiguador de muestra (1x) y se colocaron en baño maría en ebullición por 5 minutos.

Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para ser utilizado posteriormente. En el caso de que las muestras no fueran procesadas para la extracción de proteínas se procedió a la preparación de polvos de acetona y se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

6.12. Electroforésis de proteínas totales radiactivas (metionina ^{35}S) de células adaptadas y chocadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Se prepararon geles de poliacrilamida SDS al 12.5% de 15 cm x 16 cm como se mencionó anteriormente. La electroforésis se hizo a 200 volts constantes durante 5.0 horas. Al termino del corrimiento de los geles se lavaron varias veces con agua destilada y se dejaron tiñendo durante toda la noche con azul Coomassie. Posteriormente fueron desteñidos.

6.13. Fluorografías de Proteínas Radiactivas en Geles PAGE-SDS Metionina ^{35}S (Sambrook, 1990).

Una vez separadas las proteínas radiactivas en geles de poliacrilamida (12.5%), éstos se tiñeron con azul de Coomassie durante toda la noche y posteriormente se destiñeron. Cuando se pudieron apreciar con claridad las bandas, se retiró la solución desteñidora y se enjuagó el gel con agua desionizada durante 3 minutos. En seguida el gel se sumergió en 10 volúmenes de una solución de salicilato de sodio 1M y se incubó con agitación suave y constante durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la solución de salicilato de sodio y el gel se enjuagó abundantemente con agua desionizada. Finalmente se procedió a deshidratar el gel como previamente se describió.

Una vez que los geles se encontraron perfectamente deshidratados se procedió a colocar una placa de rayos X Kodak X-0 MAT AR de 20.3 X 25.4 en un cassette Kodak en condiciones de oscuridad. La placa se dejó en exposición durante 3 semanas a -70°C .

6.14. Revelado de la Placa de Rayos X.

La placa de rayos X se reveló con un revelador Kodak GBX No. cat. 1901859 (180 ml en un litro), durante 5 minutos. Una vez concluido este tiempo se enjuagó en agua durante 1 minuto. En seguida la placa fotográfica se colocó en una solución fijadora Kodak GBX No. cat. 19059 (180 ml en un litro), durante 5 minutos. Todo esto bajo condiciones de oscuridad. Concluido el tiempo se enjuagó la placa abundantemente con agua corriente.

7. 0. RESULTADOS

7.1. Cultivo *in vitro* de células de *Bouvardia ternifolia* en medio sólido y en suspensión.

a) Curvas de crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* control cultivadas en suspensión.

A partir de las secciones de tallo y hoja, se generaron callos friables, los cuales fueron resembrados en medio MS con fitoreguladores. Después de varias resiembras los callos mas friables se transfirieron en medio MS adicionado con NaCl (0.085 M). Se puede apreciar que el crecimiento de éstos se hace más lento, al mismo tiempo en que los callos se vuelven menos friables, es decir se hacen más compactos (Fig. 10).



Figura 10.- Cultivo *in vitro* de células de *B. ternifolia* (callos) capaces de crecer en diferentes concentraciones de NaCl (0.085, 0.170, 0.260 y 0.340 M).

Conforme se aumenta la concentración de NaCl (0.170 M) el crecimiento se hace más lento y el tejido se compacta cada vez más cambiando de color blanquecino transparente a amarillento. Una vez adaptado a esa concentración se transfirió a un medio con mayor concentración de NaCl (0.260 M); después de varias resiembras se ve claramente que los callos se hacen más compactos por lo que el volumen del tejido disminuye y el color se torna a amarillo intenso como se aprecia en la figura 10.

Esto nos muestra que el estrés implantado a los diferentes tejidos es severo ya que cambia la apariencia y el crecimiento se hace más lento.

Por otro lado, callos friables de células de *B. ternifolia*, fueron transferidos a medio líquido para el establecimiento del cultivo en suspensión. Se determinó la velocidad de crecimiento en cultivos generados a partir de un inóculo inicial de 0.6 ml de volumen relativo de paquete celular (VRPC/10 ml (20 mg de células/ ml)) de células en suspensión alcanzándose la fase estacionaria a los 21 días después de la inoculación. Se tomaron como parámetros de crecimiento el volumen relativo del paquete celular (VRPC), peso fresco y peso seco.

b) Curvas de crecimiento de células de *B. ternifolia*, cultivadas en suspensión y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.

Una vez establecida la curva de crecimiento bajo condiciones normales, se procedió a determinar el crecimiento en condiciones de estrés salino (NaCl). Como se desconocía la concentración de NaCl a la cual se inhibe el crecimiento sin que fuera tan drástico como para dañar irreversiblemente a las células, se probó sucesivamente el efecto de cuatro diferentes concentraciones de NaCl; 0.085 M, 0.170 M, 0.260 M y 0.340 M.

7.2. Parámetros de crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* control y adaptadas.

a) Análisis del Volumen Relativo del Paquete Celular (VRPC).

El análisis del VRPC (volumen relativo del paquete celular) obtenido en estos experimentos nos muestra claramente que células que nunca han crecido en presencia de NaCl (células control), incrementan su población (VRPC) celular conforme transcurre el tiempo hasta alcanzar un máximo de 80% de VRPC total. Al mismo tiempo, el crecimiento de células adaptadas a 0.085 M de NaCl fue un poco más lento que el del control pero manteniendo una tendencia similar a éste.

En células adaptadas a 0.170 M de NaCl se distingue un retraso en el crecimiento ya que a los 21 días alcanzó un máximo de 40% de VRPC, aunque continúa presentando un comportamiento similar al control. Con base a esto, es claro que el cultivo está constituido por una población celular viva ya que el VRPC no disminuye, aún cuando no aumenta considerablemente. Por el contrario, células adaptadas a 0.260 M y 0.340 M de NaCl sufren un decremento muy notable en su velocidad de crecimiento y sólo son capaces de alcanzar el 10.0 % de VRPC hasta los 20 días, pero este permanece constante a lo largo del tiempo lo cual indica que dichas células permanecen vivas aunque no se dividan (fig. 11).

b) Análisis del Peso Fresco

Ahora bien, si el crecimiento del cultivo es seguido a través del peso fresco (mg/ml) del paquete celular, se ve con claridad que las diferentes células adaptadas presentan un patrón de comportamiento similar a la curva de crecimiento de la figura 10, ya que células adaptadas tanto a 0.085 M de NaCl como las de 0.170 M NaCl aumentan su peso fresco presentando una tendencia similar a la del control. En las células adaptadas a 0.260 M y 0.340 M de NaCl podemos apreciar que sí existe un ligero aumento en el peso fresco pero nunca alcanzando los valores del control (figura 12). Con este ligero aumento podemos decir que las células están creciendo pero muy lentamente debido a la severidad del estrés a las que están sometidas.

Curva de crecimiento de *B. ternifolia*

volumen relativo de paquete celular (VRPC)

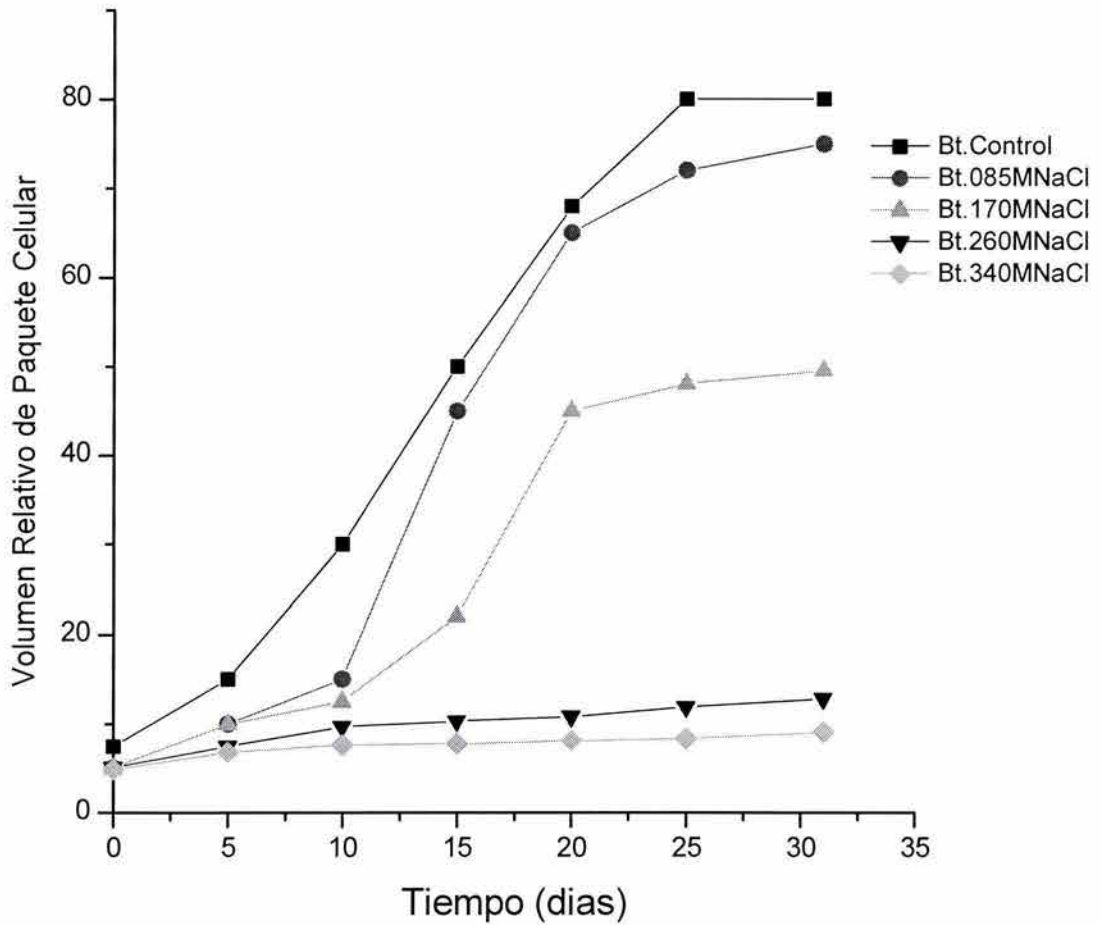


Figura No. 11. Curva de crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* cultivadas *in vitro*. Cultivos en suspensión de células control y adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl. Crecimiento reportado en función de valores relativos de paquete celular (VRPC).

Curva de crecimiento de *B. ternifolia*

Peso Fresco (mg/ml medio)

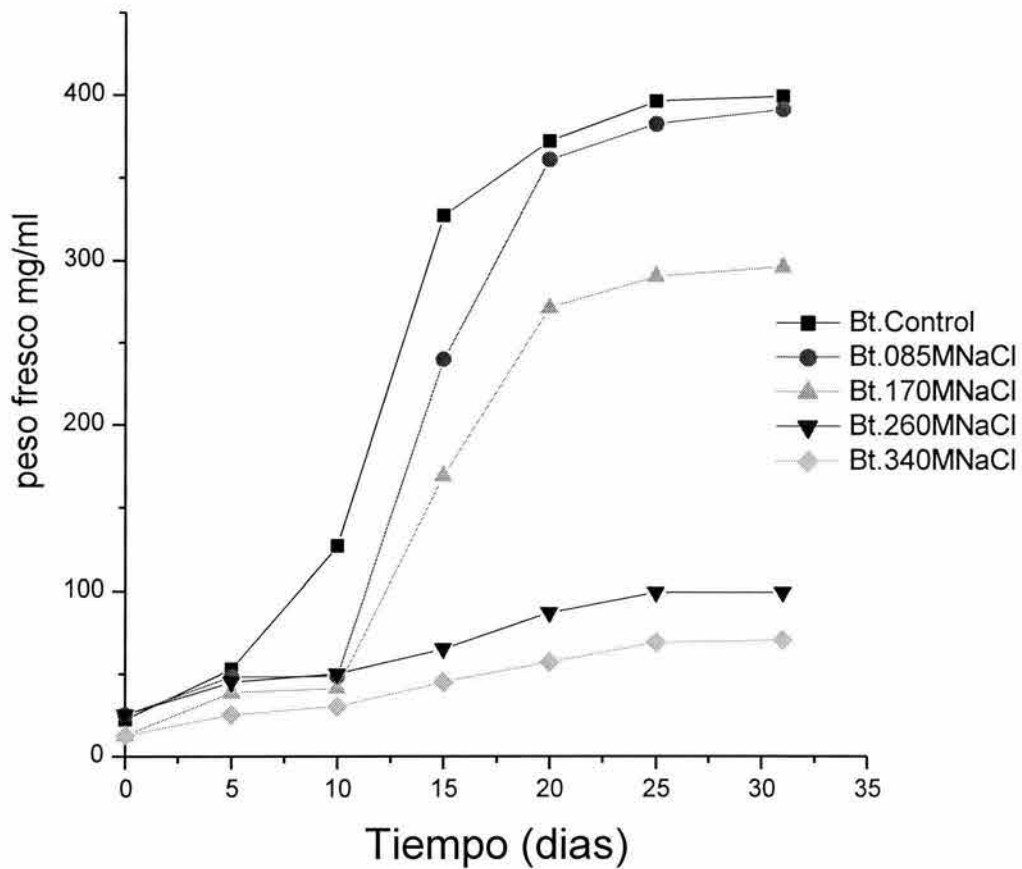


Figura No. 12. Curva de Crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* cultivadas *in vitro*. Cultivos en suspensión de células control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl. Crecimiento reportado en función del incremento en el peso fresco.

c) Análisis del Peso Seco.

Los datos del crecimiento expresado en cambios en el peso seco (mg/ml), muestran que éste sí se incrementa a lo largo del tiempo, tanto en células control como en células adaptadas a 0.085 M y 0.170 M de NaCl, lo que nos permitió interpretar que el cultivo, aún en estas condiciones, continuaba metabólicamente activo, aunque esto no se reflejara claramente en las células adaptadas a 0.260 M y 0.340 M de NaCl (figura 13). En estos casos, la condición de estrés salino que se había impuesto parecía muy severo, ya que permite solamente un crecimiento y un aumento del peso seco muy ligero.

d) Análisis de la Cantidad de Proteína Total.

El estudio de la cantidad de proteína presente durante el crecimiento del cultivo muestra que existe un claro incremento en la cantidad de la misma en células adaptadas a 0.085 M y 0.170 M de NaCl (fig. 14). Por otra parte, en células adaptadas a 0.260 y 0.340 M de NaCl el peso seco fue incrementando lentamente. Sin embargo a estas concentraciones de NaCl, las células son capaces de soportar todavía los efectos de la deshidratación y toxicidad por exceso de iones ya que el cultivo no muere aunque su crecimiento con respecto a las células control es considerablemente inferior, dado que las poblaciones de células adaptadas a 0.260 y 0.340 M de NaCl solamente mantienen 10.0% del total de la población control.

Para demostrar la viabilidad de las poblaciones celulares (0.260 y 0.340 M de NaCl), se realizaron observaciones con microscopía de luz, tiñendo a las células de las diferentes poblaciones adaptadas a NaCl (0.260 y 0.340 M) con azul de tripan (5%). Se pudo observar con claridad que las células permanecen vivas ya que no incorporan el colorante al citoplasma (figuras 15), solamente las células que están muertas lo captan. Ello permite afirmar que las células cultivadas con 0.260 M y 0.340 M están vivas y adaptadas, aunque crecen a una velocidad mucho menor que el control.

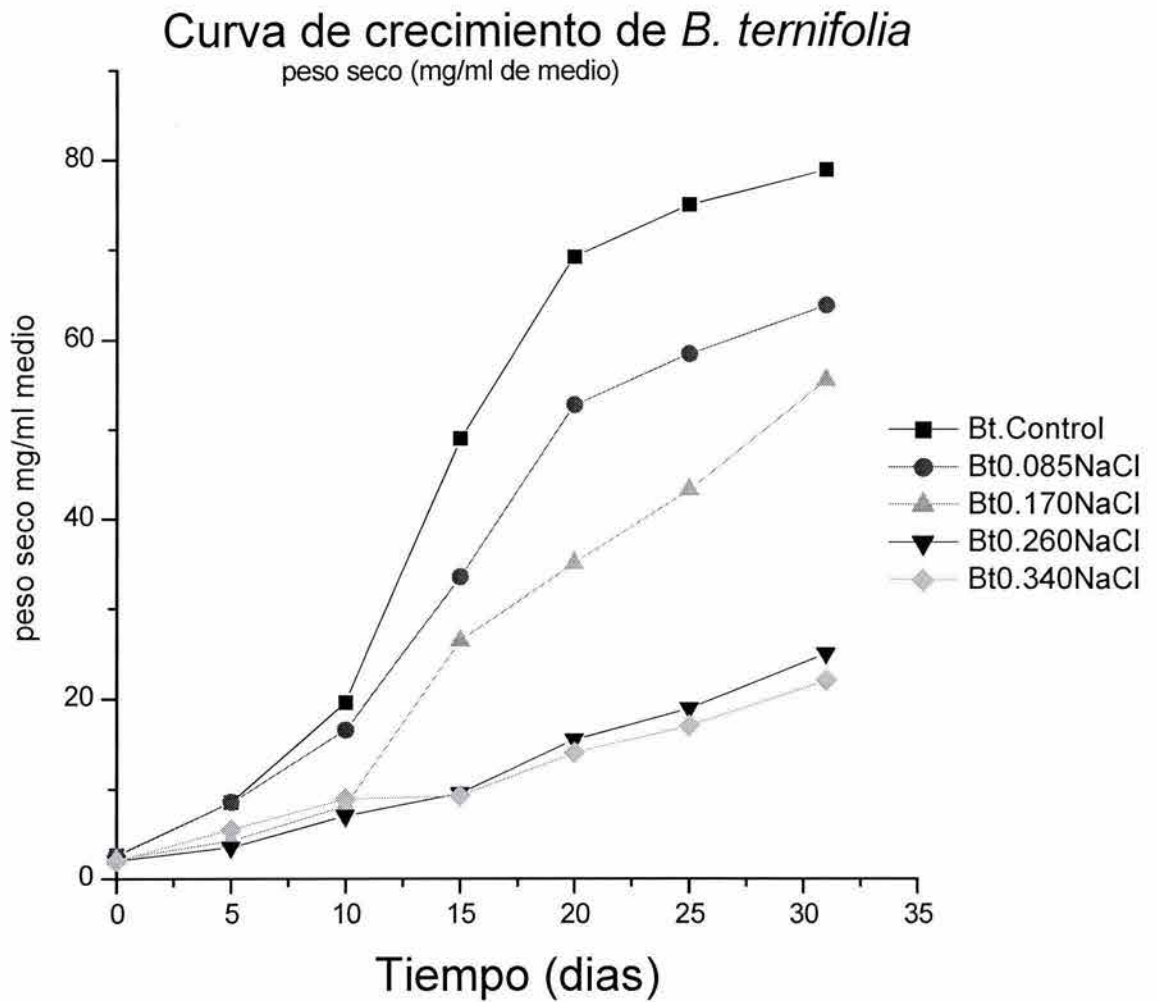


Figura No. 13. Curva de Crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* cultivadas *in vitro*. Cultivos en suspensión de células control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl. Crecimiento reportado en función del incremento en el peso seco.

Curva de crecimiento de *B. ternifolia* Cantidad de Proteína (mg/ ml medio)

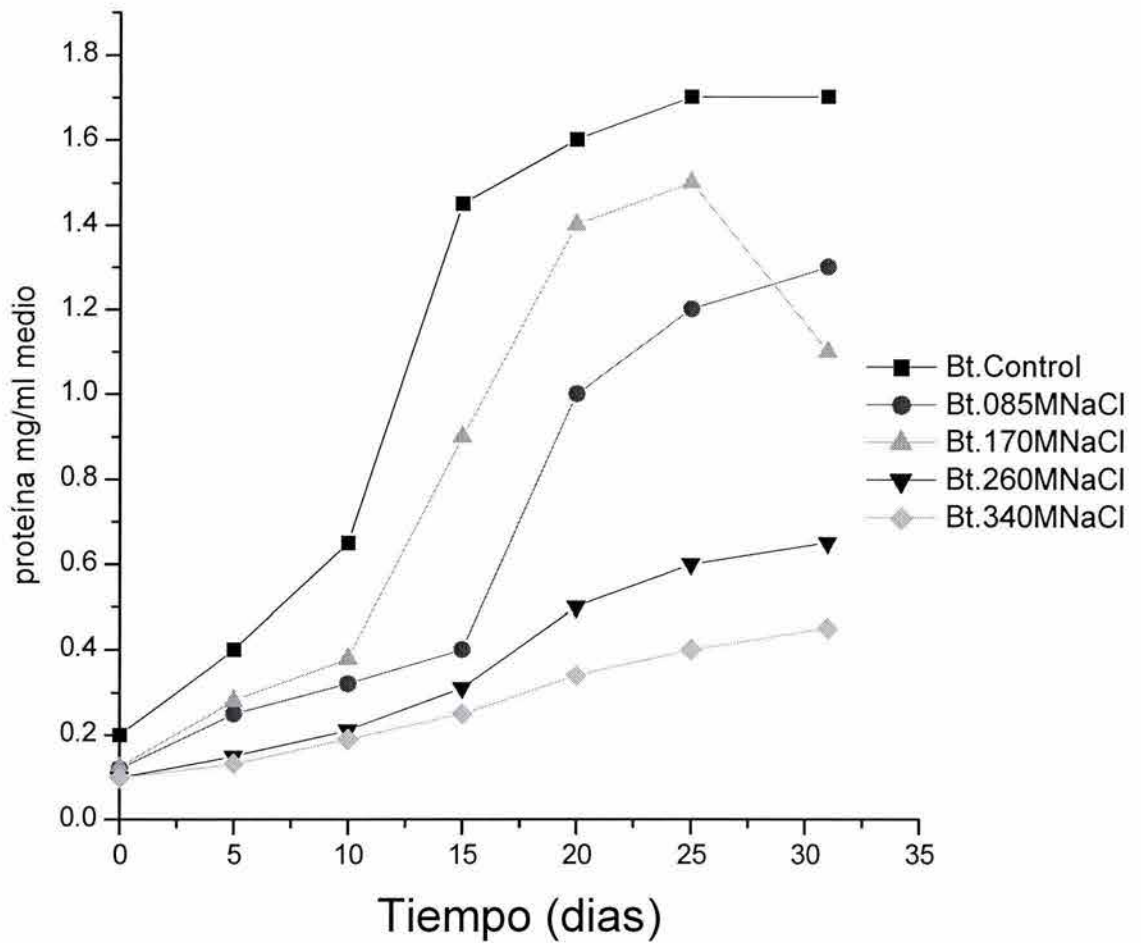


Figura No. 14. Curva de Crecimiento de las células de *Bouvardia ternifolia* cultivadas *in vitro*. Cultivos en suspensión de células control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl. Crecimiento reportado en función del incremento de la proteína total.

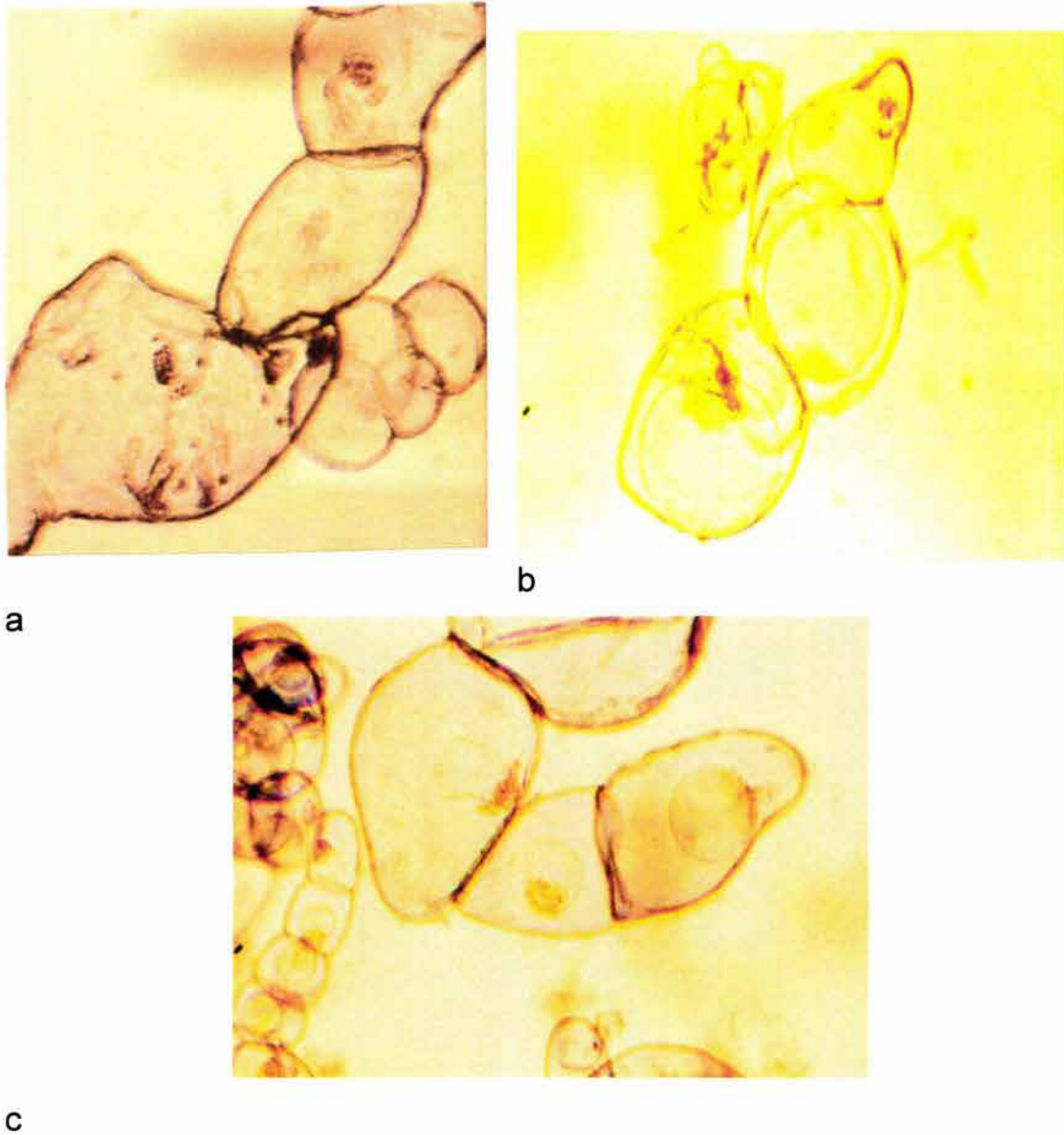


Figura No. 15. Células de *Bouvardia ternifolia* adaptadas a 260 mM y 340 mM de NaCl. Observaciones en microscopía de luz (40 x) en presencia de azul de tripan (5 %) de células en suspensión adaptadas. a) Células control (sin NaCl) ; b) Células adaptadas a 260 mM NaCl ; c) células adaptadas a 340 mM de NaCl.

Para poder apreciar con más claridad que dichas poblaciones se habían adaptado, se tomaron células de *B. ternifolia* que nunca fueron crecidas previamente bajo condiciones de estrés salino. A dichas células se les sometió directamente a choque salino bajo diferentes concentraciones (0.170, 0.260 y 0.340 M) de NaCl durante 30 min a 6 horas. Posteriormente se tiñeron con azul de tripan (5%) y se realizaron observaciones en microscopía de luz. Claramente se pudo apreciar (figuras 16 y 17) que células chocadas a bajas concentraciones (0.170 M) de NaCl no mueren inmediatamente pero comienza a presentarse plasmólisis celular conforme va transcurriendo el tiempo y, finalmente, algunas mueren (figura 16 a, b y c); sin embargo, la mayoría sobrevive. Por otro lado, las células chocadas con mayores concentraciones de sal (0.260 y 0.340 M de NaCl), inicialmente permanecen vivas, ya que se observan células intactas pero se presenta una pérdida de agua, puesto que se observa claramente que ocurre plasmólisis parcial. Conforme aumenta el tiempo de exposición el número de células muertas se va incrementando. Al teñirlas con azul de tripan dichas células incorporan el colorante y solamente se aprecian las paredes celulares (figura 17 , b, c y d).

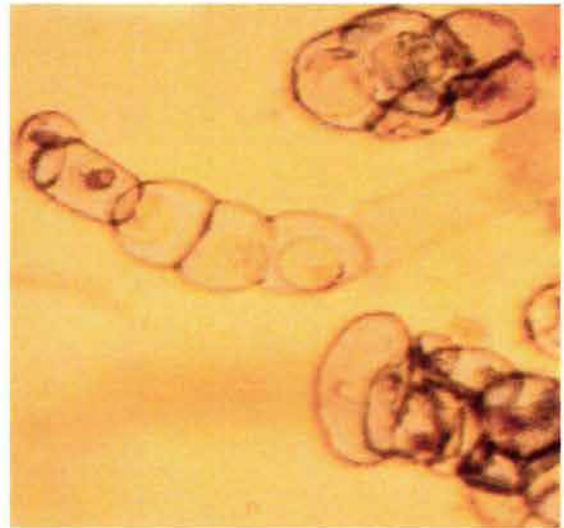
De esta manera se demuestra que las células que sobreviven al choque inicial y que posteriormente se mantienen en un medio estresante logran sobrevivir y sobre todo reproducirse de tal manera que dichas células permanecen vivas por lo que la aclimatación gradual a concentraciones elevadas de NaCl a largo plazo realmente les permite adaptarse.

e) Reversibilidad del fenómeno de adaptación.

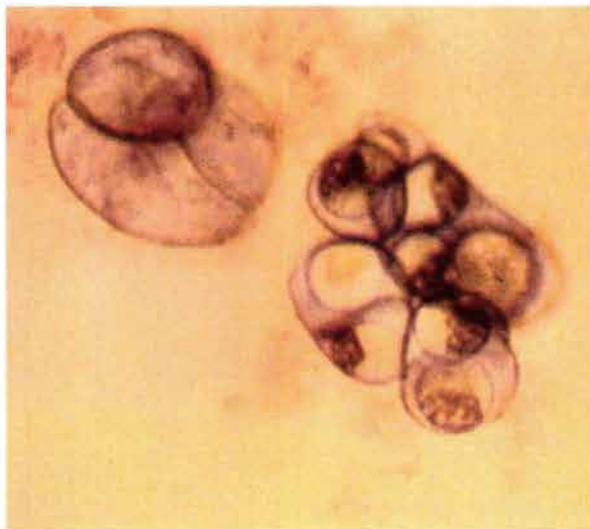
Una vez obtenidas las líneas celulares adaptadas a diferentes concentraciones, se decidió estudiar si dicha adaptabilidad era un fenómeno reversible o permanente; es decir, si una vez adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl continuaban siendo capaces de crecer en medio sin NaCl y, de ser así, si su paso por un medio no selectivo (sin sal) ocasionaba o no la pérdida de la adaptación. Se observó que células adaptadas a concentraciones de 260 y 340 mM de NaCl presentaron capacidad de crecer en medios sin sal aunque su crecimiento fue por debajo del control, tanto cuando la eliminación del estrés fue de manera gradual



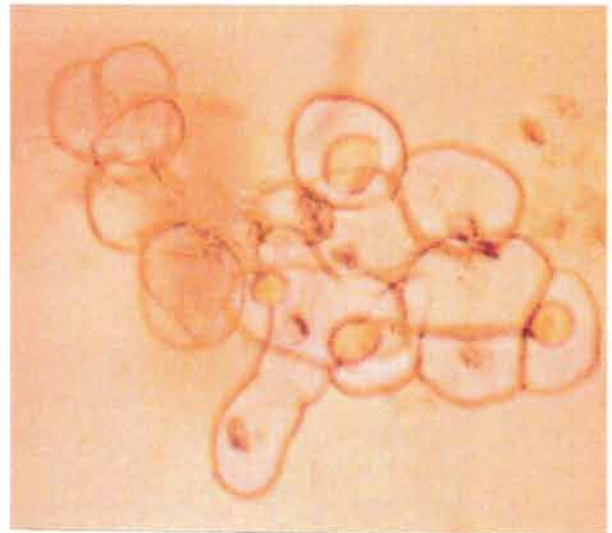
a



b



c



d

Figura No. 16. Observaciones en microscopía de luz (40 x) de células de *Bouvardia ternifolia* no adaptadas y expuestas a 170, 260 y 340 mM de NaCl, 60 minutos después del choque salino.

a) Células control (sin sal); b) Células chocadas con 170 mM de NaCl c) Células chocadas con 260 mM de NaCl d) Células chocadas con 340 mM de NaCl.

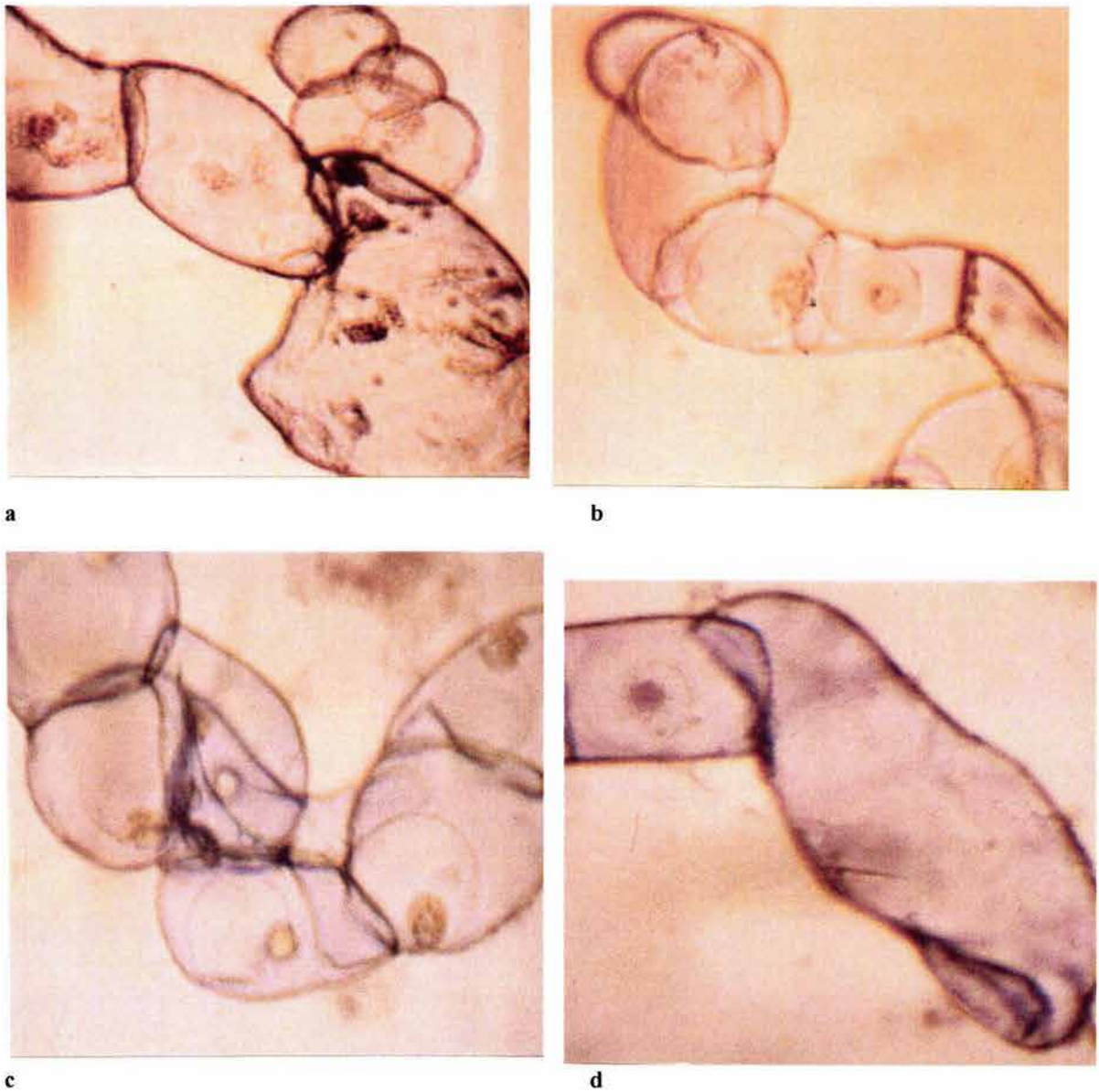


Figura No. 17. Observaciones en microscopía de luz (40 x) de células de *Bouvardia ternifolia* no Adaptadas y expuestas a 170, 260 y 340 mM de NaCl, 5 horas después de la exposición a la sal. a)células control b)células chocadas con 170 mM NaCl c)células chocadas con 260 mM de NaCl d)células chocadas con 340 mM de NaCl.

(0.340, 0.260, 0.170, 0.085 y 0.00 mM de NaCl) como cuando se transfirieron directamente de un medio con sal a otro sin sal.

Las figuras 18 a y b claramente muestran que células que se someten a un medio no selectivo son capaces de crecer en éste a una velocidad menor comparadas con el control, pero cuando son sembradas continuamente en dicho medio durante 80 generaciones éstas llegan a alcanzar los valores del control (datos no mostrados).

Ahora bien, cuando dichas células que han alcanzado los valores del control son regresadas a la sal no presentan la capacidad de adaptarse rápidamente, ya que se observa que existe una disminución en su crecimiento y se presenta la misma tendencia del inicio de la aclimatación (figura 19 a y b). Al hacer observaciones con microscopía de luz notamos que las células empiezan a plasmolizarse. Con esto podemos decir que tales células perdieron la capacidad de crecer en sal y que dicho fenómeno es reversible.

7.3. Estudios morfológicos de células de *Bouvardia ternifolia* adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.

a) Observaciones en microscopía de luz.

Observaciones en microscopía de luz de células de *B. ternifolia* sin teñir mostraron que las células que fueron sometidas a estrés gradual presentan gránulos en el citoplasma, los cuales aumentan en número cuando las células se adaptan a un mayor estrés salino. Aparentemente, dichos gránulos se van acumulando alrededor del núcleo (figura 20).

Curva de crecimiento de células de *B. ternifolia* Volumen Relativo de Paquete Celular (VRPC)

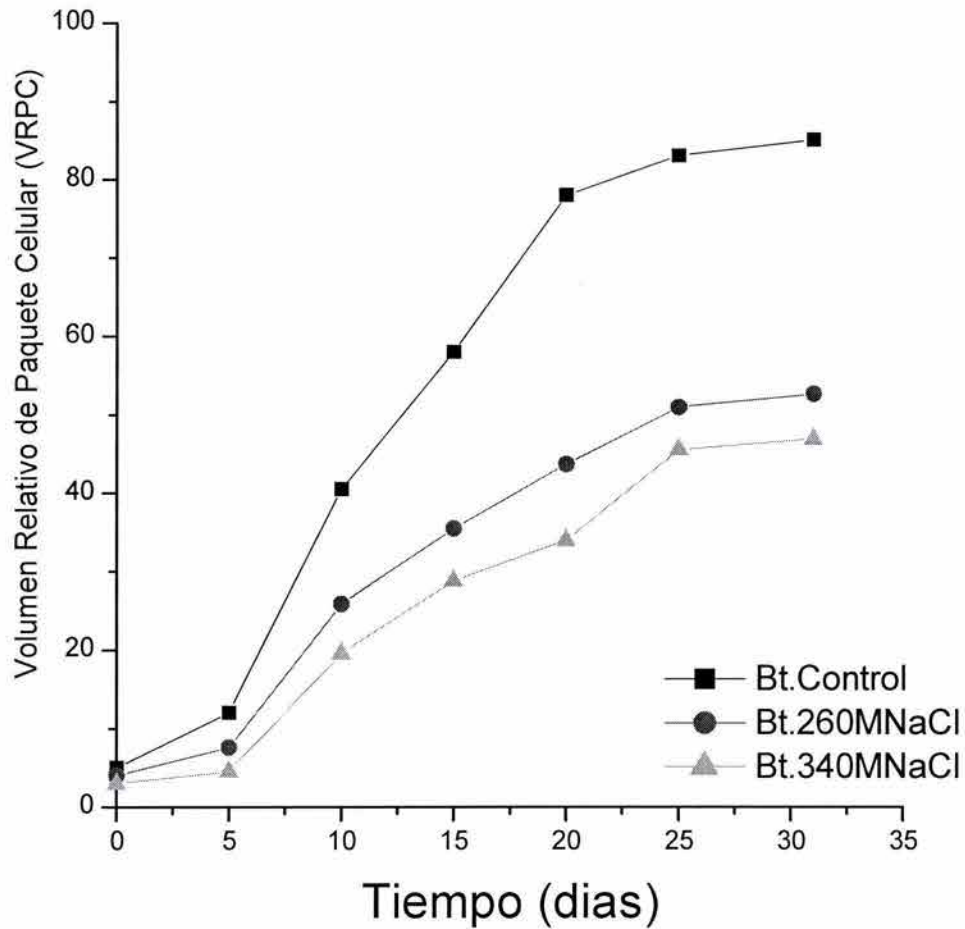


Figura 18 A.- Curva de crecimiento de células de *B. ternifolia* cultivadas *in vitro*. Células adaptadas a 260 y 340 mM de NaCl crecidas en un medio sin sal. Crecimiento reportado en función del incremento en el volumen relativo del paquete celular (VRPC).

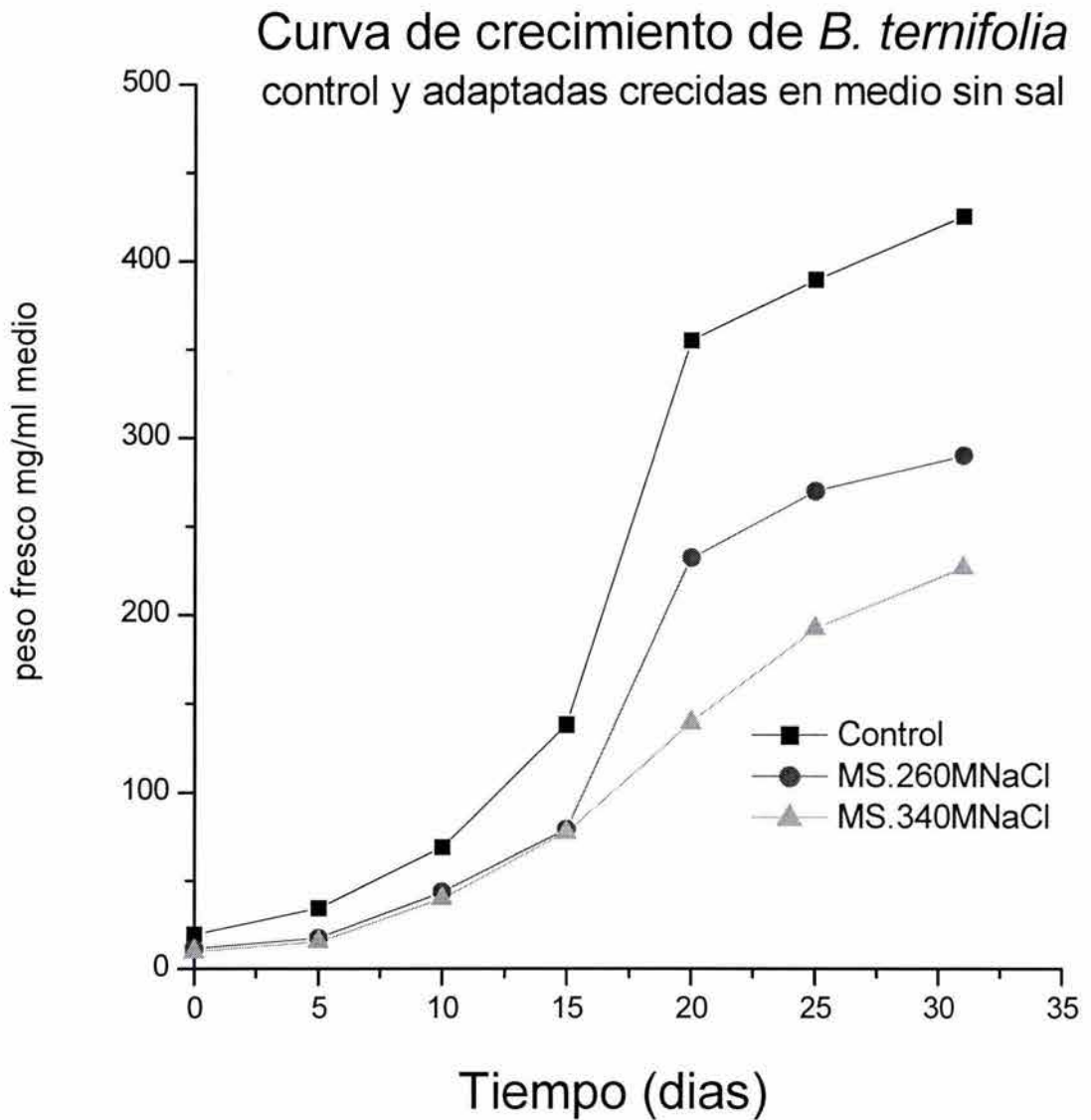


Figura 18 B.- Curva de crecimiento de células de *B. ternifolia* cultivadas *in vitro*. Células adaptadas a 260 y 340 mM de NaCl en un medio sin sal. Crecimiento reportado en función del incremento en el peso fresco.

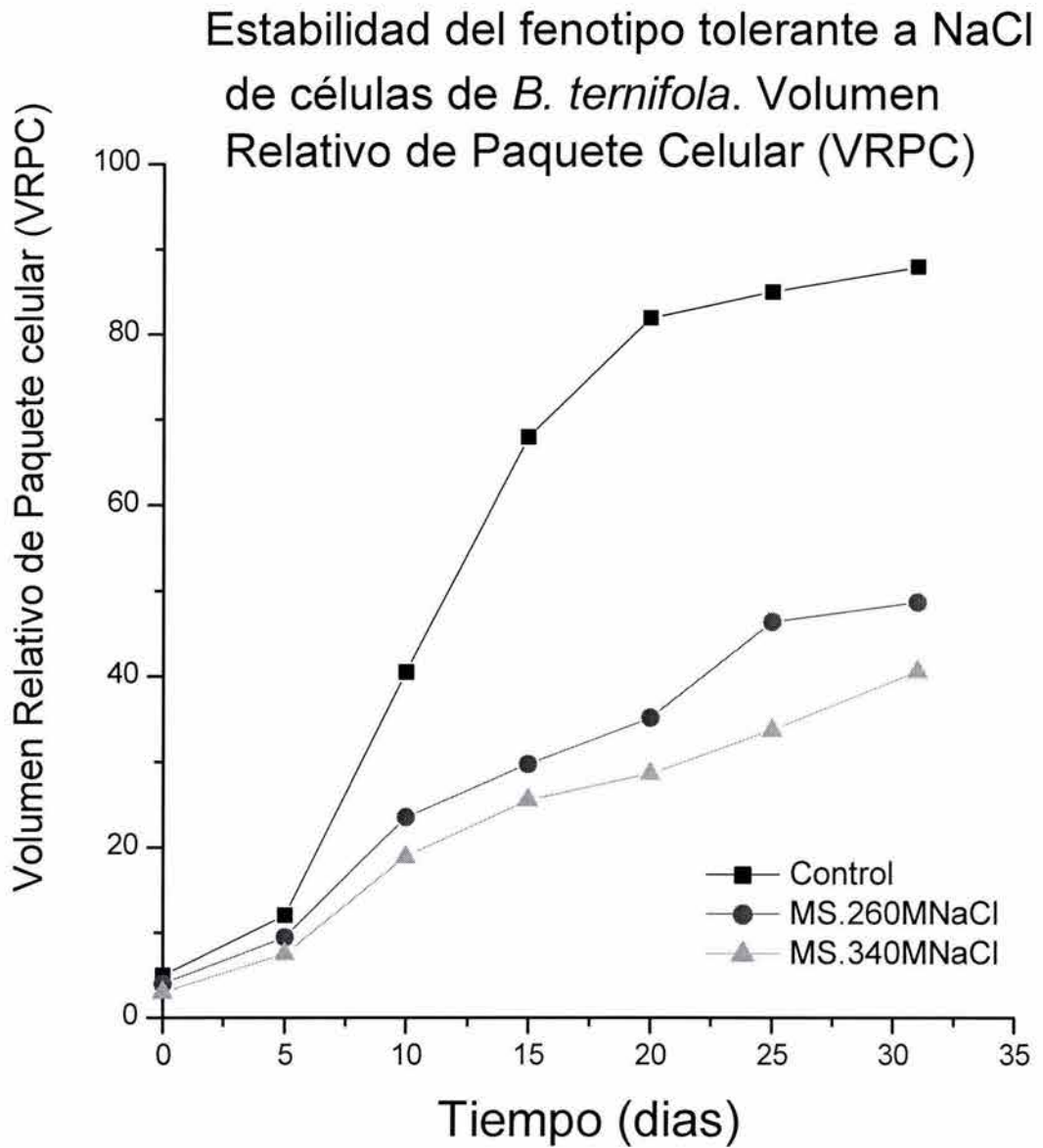


Figura 19 A.- Células de *B. ternifolia* inicialmente adaptadas a 0.260 y 0.340 M de NaCl y reintegradas a un medio sin sal y luego nuevamente en un medio con sal. Células de *B. ternifolia* adaptadas a 0.260 M y 340 M de NaCl y crecidas en medio con sal. Volumen Relativo de Paquete Celular (VRPC).

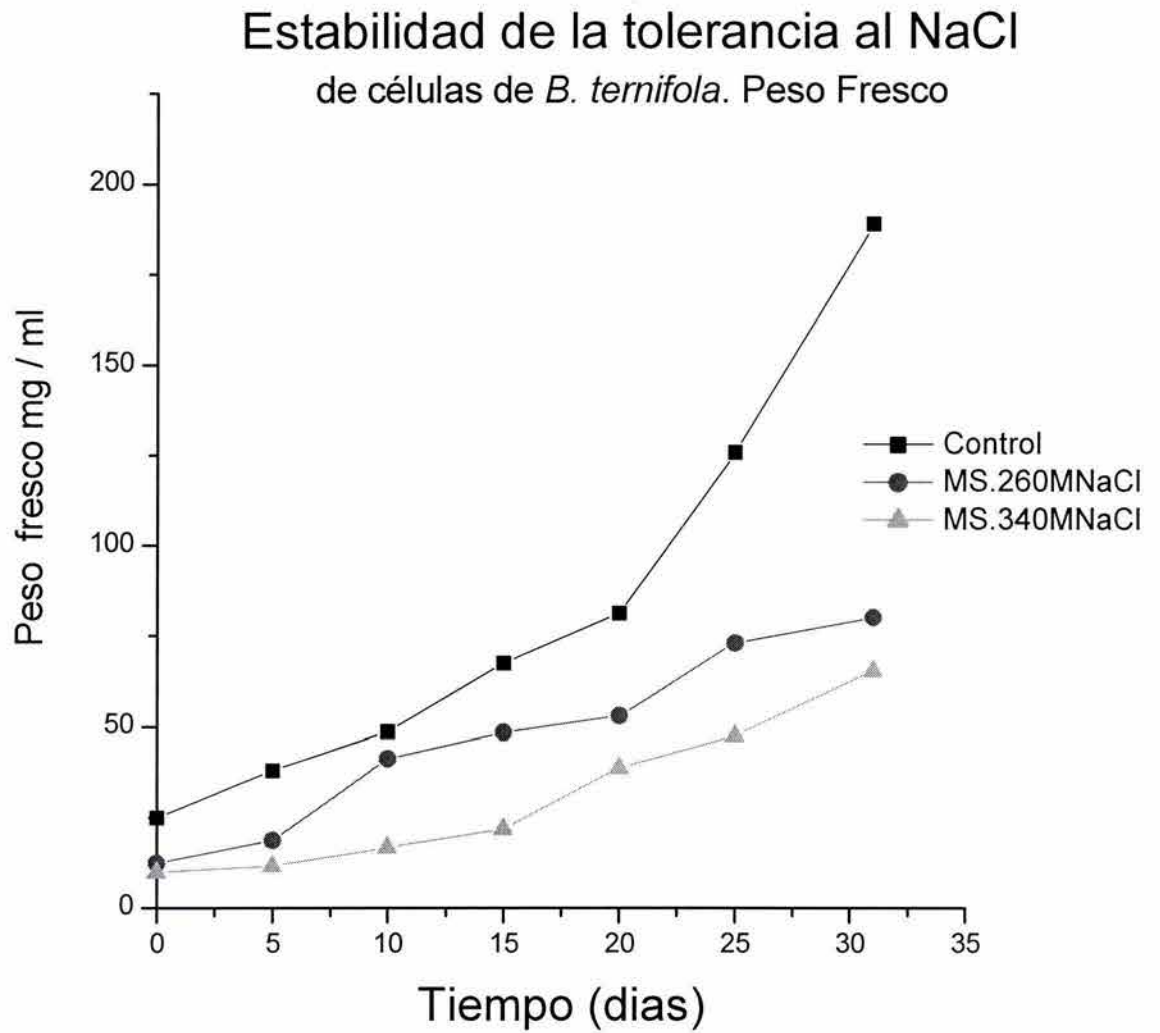


Figura 19 B.- Células de *B. ternifolia* adaptadas a 0.260 M y 340 M de NaCl y crecidas en medio con sal. Peso fresco.

Estabilidad de la tolerancia al NaCl

de células de *B. ternifolia*. Peso Seco

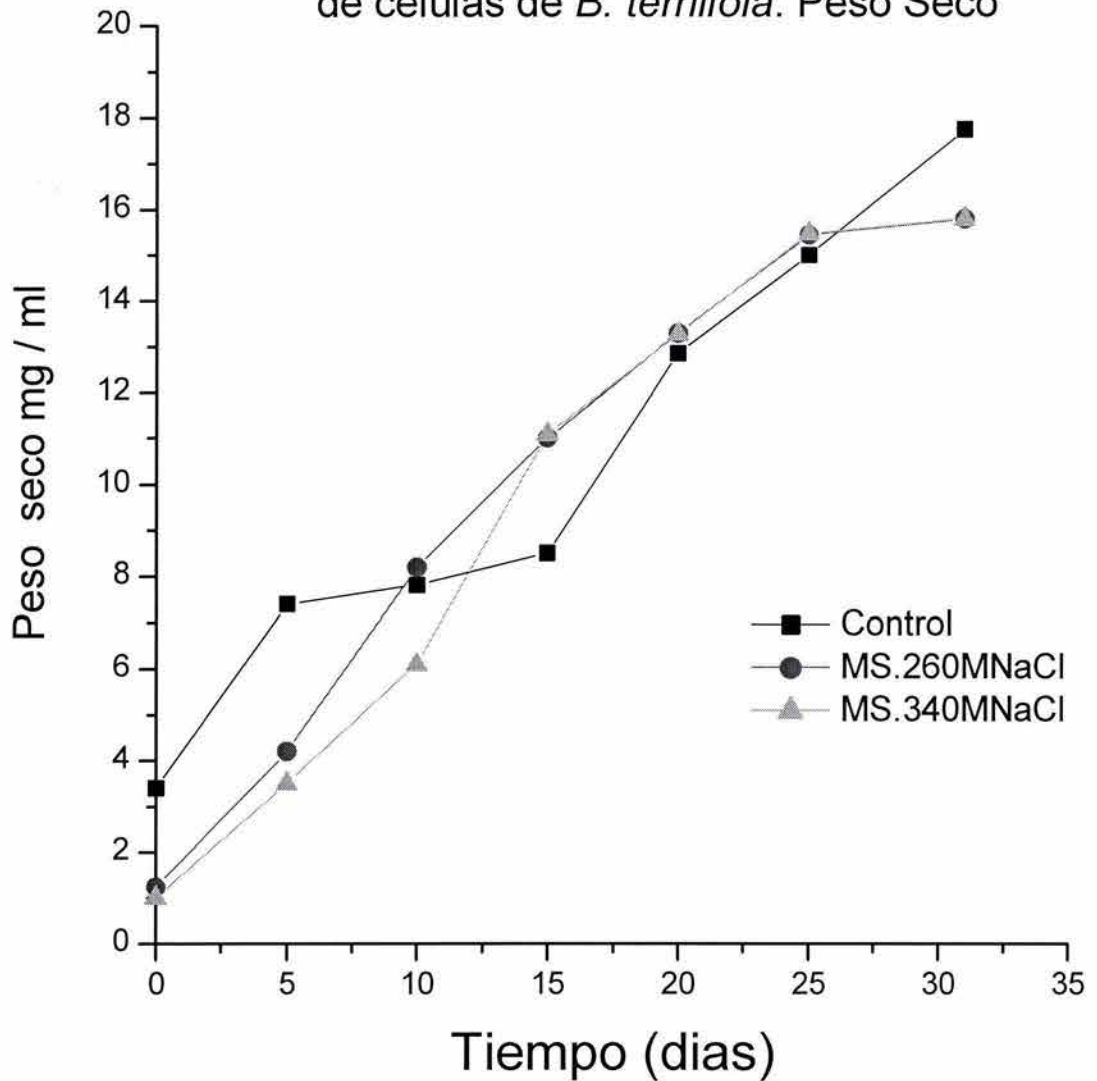
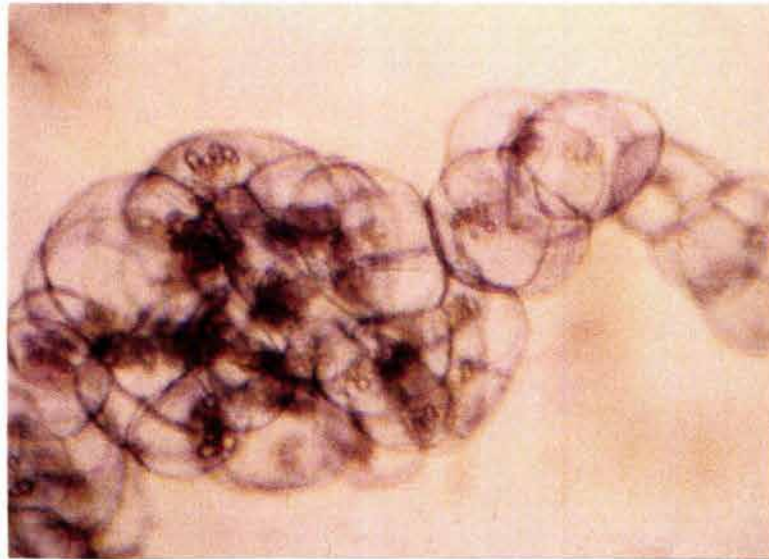


Figura 19 C.- Células de *B. ternifolia* adaptadas a 0.260 M y 340 M de NaCl y crecidas en medio con sal. Peso seco.



A



B

Figura 20.- Observaciones en microscopía de luz (40 x) de células de *B. ternifolia* control y adaptadas a 0.170 y 0.260 M de NaCl sin teñir, que muestran acumulación de gránulos citoplásmicos.

A. Células adaptadas a 170 mM de NaCl. **B.-** Células adaptadas a 260 mM de NaCl.

A concentraciones mayores de NaCl (0.260 M y 0.340 M) estos gránulos rodean y cubren al núcleo de manera que éste queda oculto (fig. 20 a y b). Dado que estos gránulos parecían incrementarse conforme el estímulo estresante se iba haciendo cada vez más severo, podría suponerse que la presencia de dichos gránulos está relacionada con una respuesta adaptativa al NaCl. Con base a esto se decidió investigar la naturaleza química de dichos gránulos. Por ello se realizó una tinción de Schiff con la que dichos gránulos se tiñeron intensamente. Esto sugiere que probablemente se trata de carbohidratos (fig. 21 a, b y c). Puesto que mediante este tipo de tinción no es posible identificar algún carbohidrato de manera específica, se decidió realizar una prueba que indicará con más claridad de que tipo de carbohidrato se trataba. Para ello se empleó la prueba de yodo, yoduro de potasio, la cual tiñe específicamente al almidón. Los resultados de dicha prueba mostraron que dichos gránulos están constituidos por almidón ya que se tiñeron de color azul claro (fig. 22 a y b) cuando se trata de células adaptadas a bajas concentraciones de NaCl (0.085 M), la intensidad en el color se va tornando más oscuro conforme se aplica dicha prueba a células adaptadas a 0.170 M y 0.260 M de NaCl (fig. 22 c, d y e), lo cual nos indica que existe una gran cantidad de carbohidratos ya que alcanza un color morado intenso en células adaptadas a 0.340 M de NaCl (Fig. 22 e). Con estos resultados puede concluirse que muy probablemente los gránulos están constituidos por moléculas de almidón, lo cual indicaría que el metabolismo de carbohidratos se está viendo modificado cuando se somete a las células vegetales a estrés salino.

b) Volumen nuclear y nucleolar de células adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.

Por lo que respecta a las células adaptadas, las siguientes observaciones microscópicas llaman la atención. Por un lado, conforme se incrementa la presión selectiva (concentración de cloruro de sodio) se producen cambios significativos en los volúmenes nuclear y nucleolar de las líneas celulares adaptadas. Como se aprecia en la figura 23, ocurre un importante incremento en los volúmenes nuclear y nucleolar de células adaptadas a 170 mM de NaCl, para luego disminuir ligeramente a mayores concentraciones de NaCl (23 a y b).

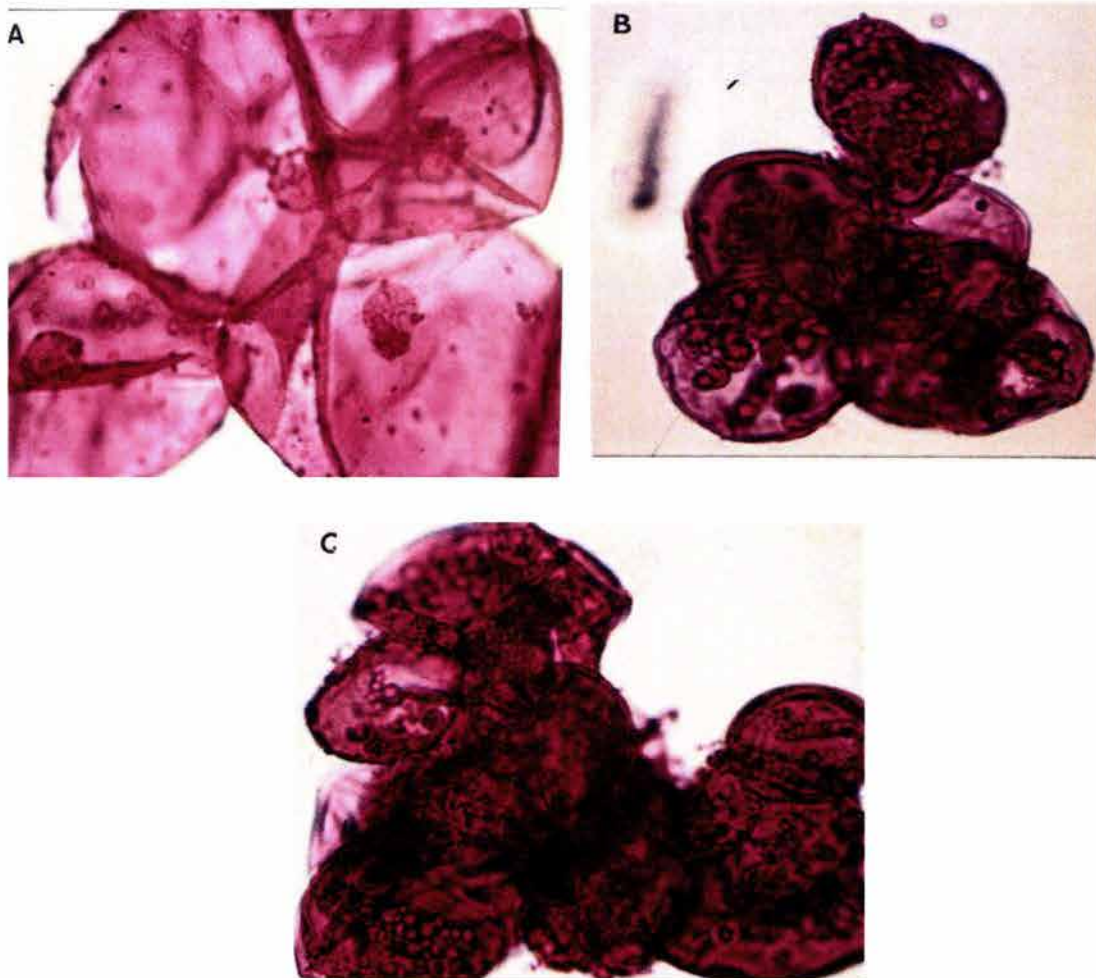


Figura 21.- Observaciones en microscopía de luz (40 x) de células de *B. ternifolia teñidas* con reactivo de Schiff.

A.- Células control. **B.-** Células adaptadas a 170 mM de NaCl. **C.-** Células adaptadas a 340 mM de NaCl. Obsérvese como los granúlos se acumulan alrededor del núcleo.

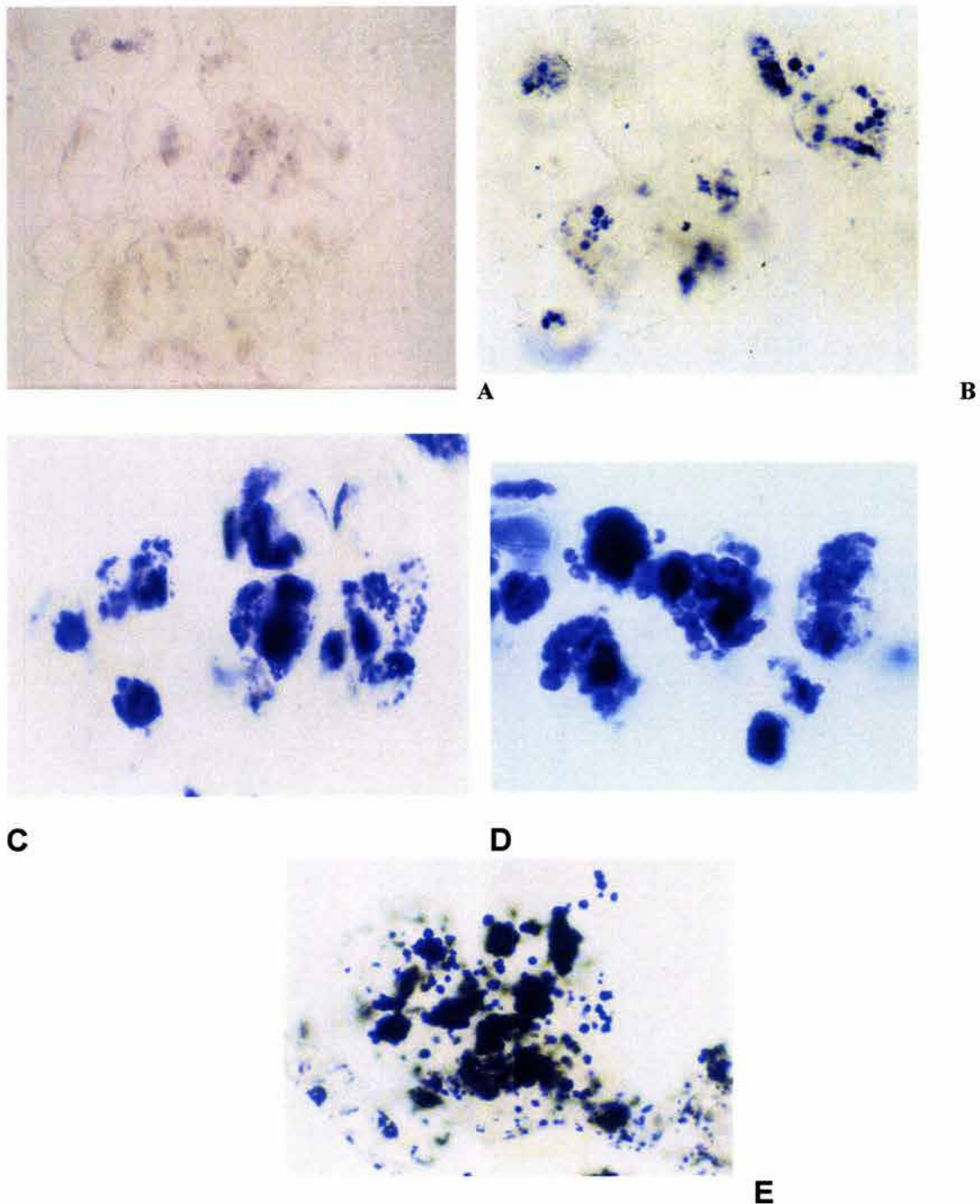


Figura 22.- Observaciones en microscopía de luz (40 x) de células de *B. ternifolia* adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl y teñidas con yodo, yoduro de potasio como se indicó en materiales y métodos. Microscopía de campo claro.

A.- Control (sin sal). **B.-** Adaptadas a 85mM. **C.-** Adaptadas a 170 mM. **D.-** Adaptadas a 260 mM. **E.-** Adaptadas a 340 mM.

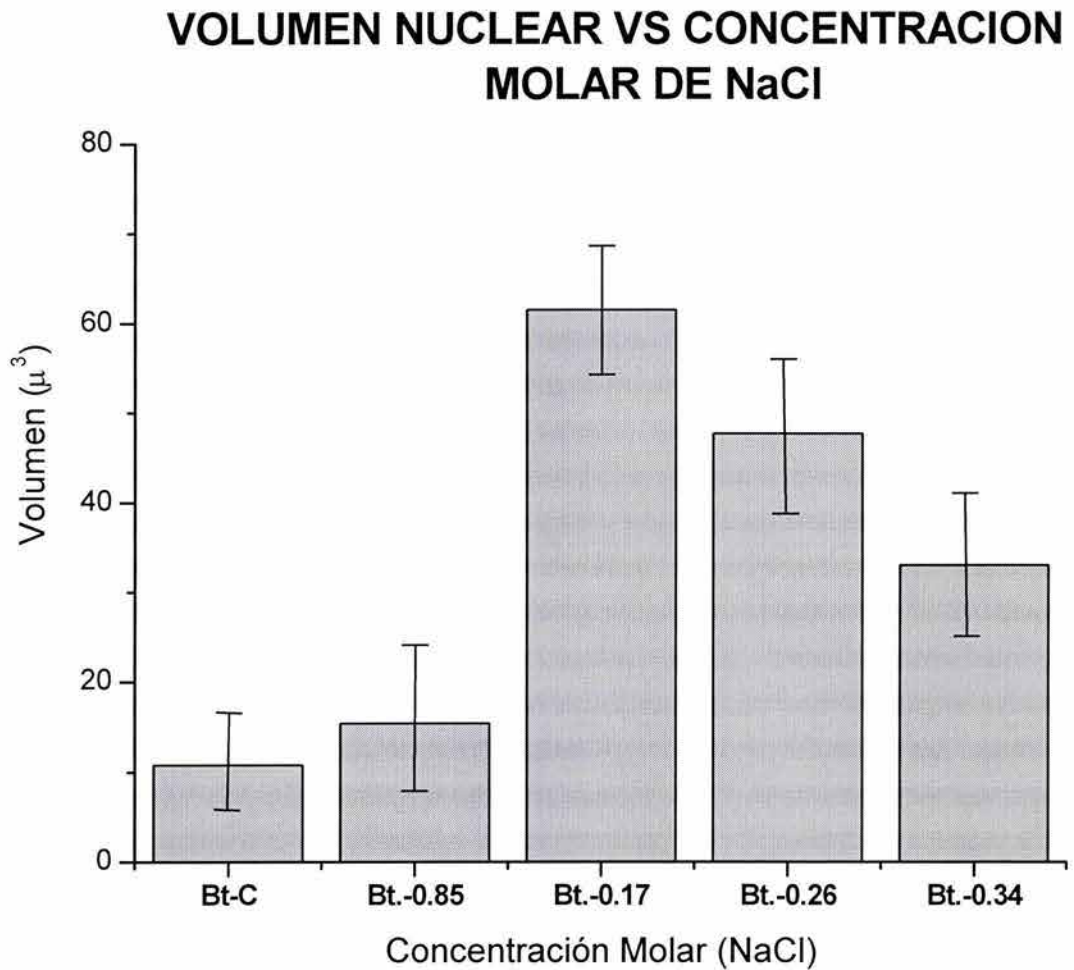


Figura No 23 A Volumen nuclear de células de *B. ternifolia* control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.

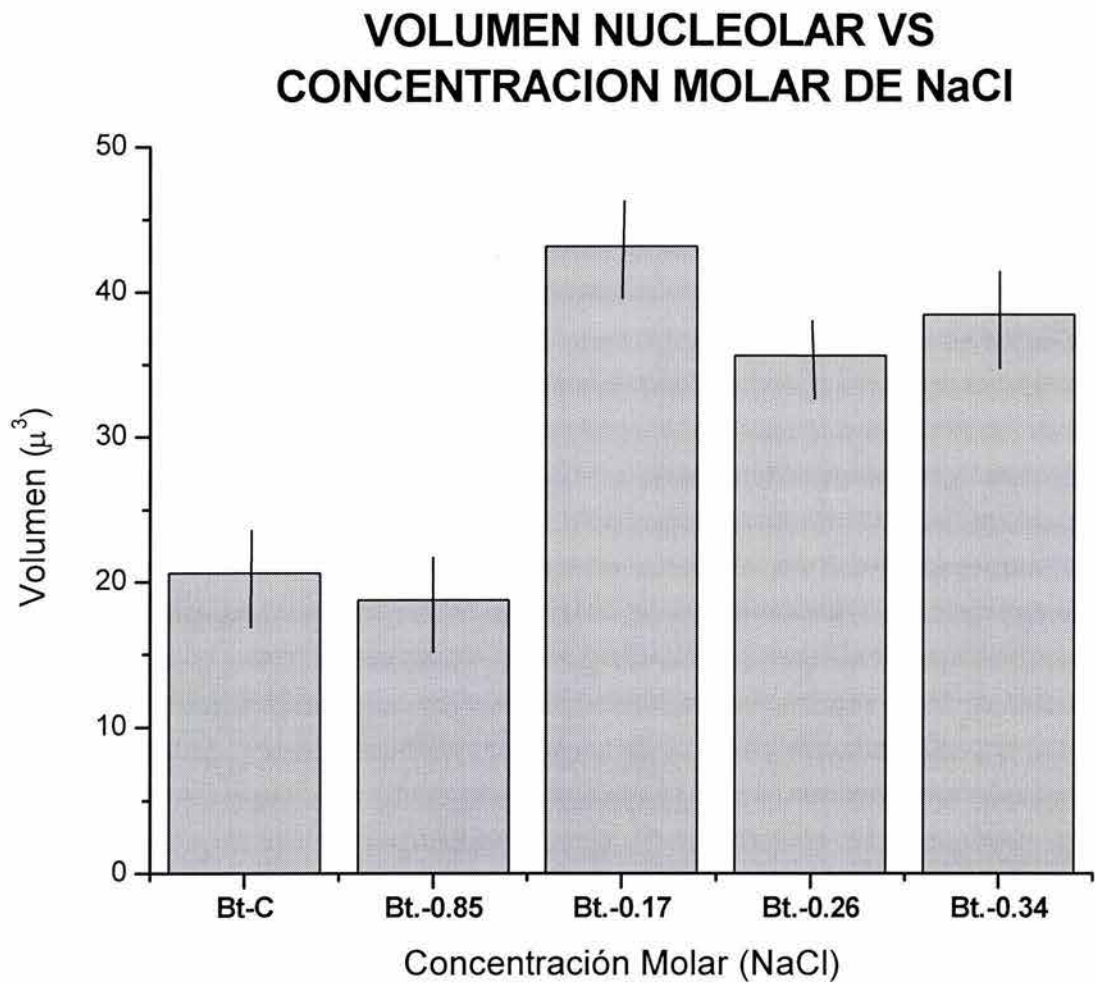


Figura No 23 B Volumen nucleolar de células de *B. ternifolia* control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.

7.4. Cuantificación de Prolina

Ya que la síntesis de osmolitos parece ser uno de los principales mecanismos adaptativos empleados por las células contra el estrés salino, se cuantificó el contenido de prolina de las diferentes líneas celulares adaptadas a NaCl. Los resultados de la figura 24 muestran cómo el estrés salino induce un incremento notable en el contenido de prolina aún a concentraciones relativamente bajas de NaCl (85 mM). Dicho contenido disminuye en las líneas adaptadas a concentraciones más elevadas de NaCl.

Una alteración tan dramática en la síntesis de un aminoácido (prolina) podría significar que el metabolismo nitrogenado de la célula en general estuviera también alterado. Para investigar esta posibilidad, se decidió estudiar la actividad de 2 enzimas claves del metabolismo nitrogenado: glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa.

Cambios en los niveles de prolina en *B. ternifolia* control y adaptadas

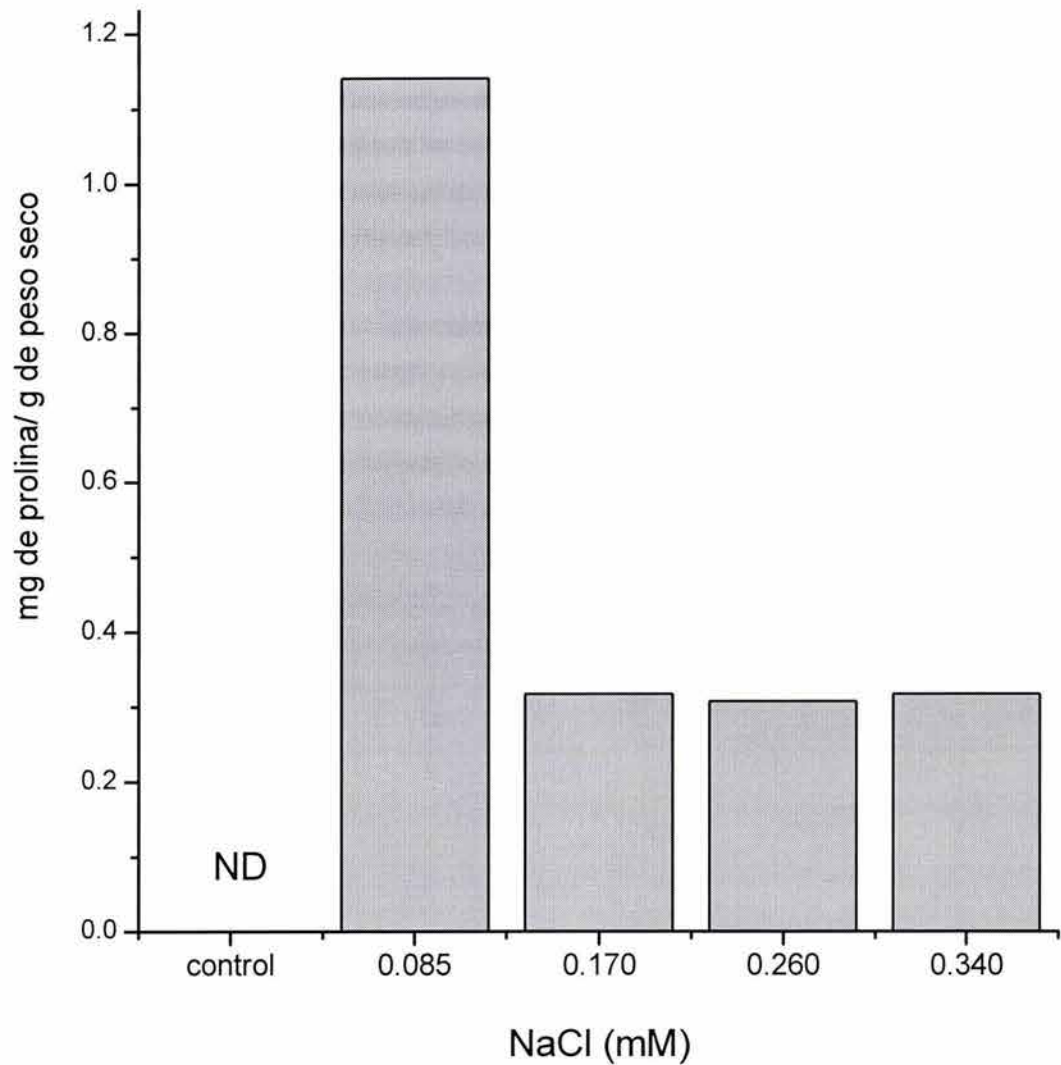


Figura 24.- Contenido de prolina en células de *B. ternifolia* adaptadas a estrés salino. Se determinó el contenido de prolina en células control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl. ND, no detectado.

7.5. Actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH) (EC 1.4.1.2.) de células de *Bouvardia ternifolia* adaptadas a diferente concentración de NaCl.

Los datos de la figura 25 a, muestran que la actividad aminativa de la GDH se ve disminuida gradualmente conforme aumenta la cantidad de NaCl. Sin embargo, existe una aparente recuperación de la actividad a una concentración elevada de NaCl (340 mM).

Por otro lado, el análisis de la actividad desaminativa (Figura 25 b), indica que esta reacción se ve afectada drásticamente aún a concentraciones relativamente bajas de NaCl (85 mM).

Estas observaciones sugieren que las células bajo estrés salino han realizado ajustes metabólicos a nivel de la actividad de glutamato deshidrogenasa, lo que podría facilitar la canalización del nitrógeno hacia la síntesis de prolina.

7.6. Actividad de la glutamino sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2.) en células de *Bouvardia ternifolia* control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.

El análisis de la actividad de la glutamino sintetasa en las células adaptadas muestra que aún a bajas concentraciones de NaCl la actividad de la GS disminuye drásticamente, aunque aparentemente se presenta una ligera recuperación a concentraciones de 170 mM (Figura 26). Es interesante hacer notar que la actividad de la enzima no parece ser afectada directamente por el NaCl ya que al medir la actividad de GS en extractos de células no adaptadas y adicionados con diferentes concentraciones de NaCl esta actividad no presenta diferencias significativas (Figura 27). Para descartar la posibilidad de que la sal esté influyendo sobre la actividad de la enzima *in vivo*, se decidió medir la actividad de GS en células chocadas hasta por 6 horas a diferentes concentraciones de NaCl.

Glutamato Deshidrogenasa reacción aminativa (biosintética)

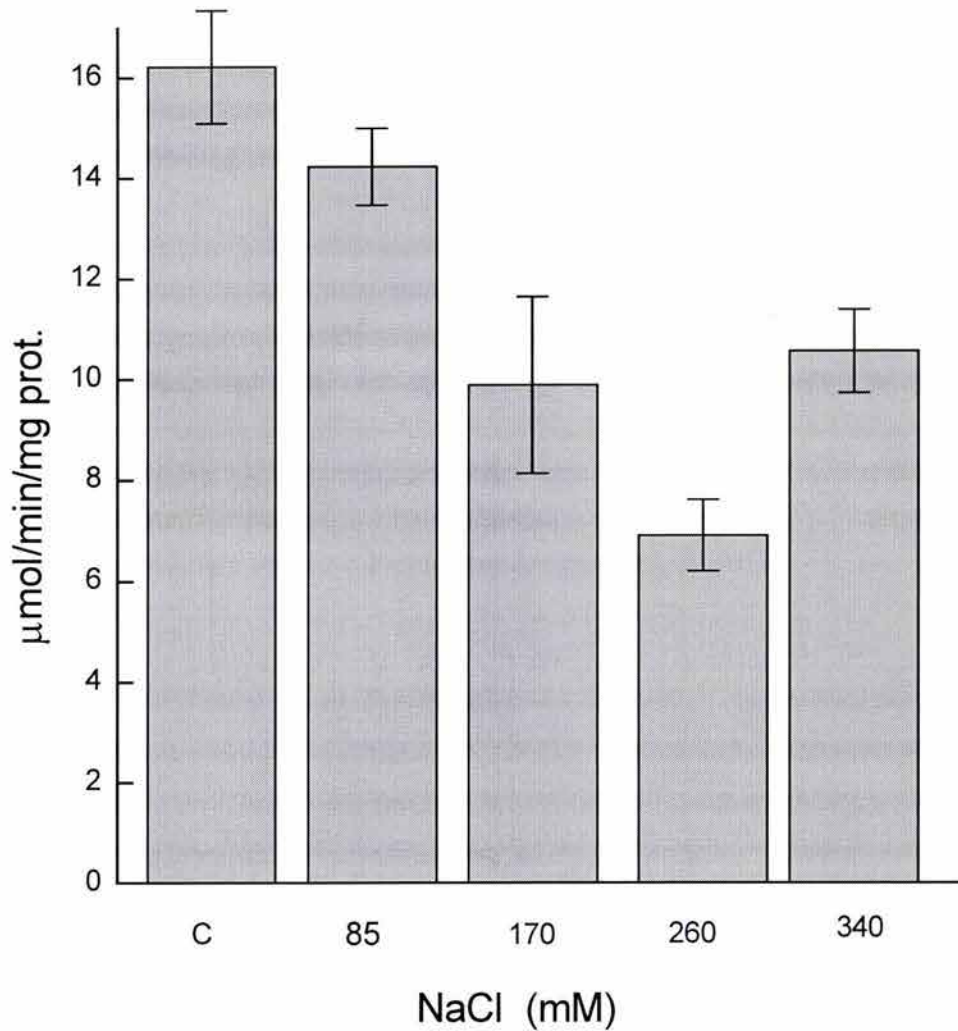


Figura 25.-Actividad de la glutamato deshidrogenasa en células cultivadas in vitro de *B. ternifolia* control y adaptadas.

A.- Reaccion Aminativa. La actividad fue determinada espectrofotometricamente en extractos crudos de células adaptadas y control como se indicó en métodos.

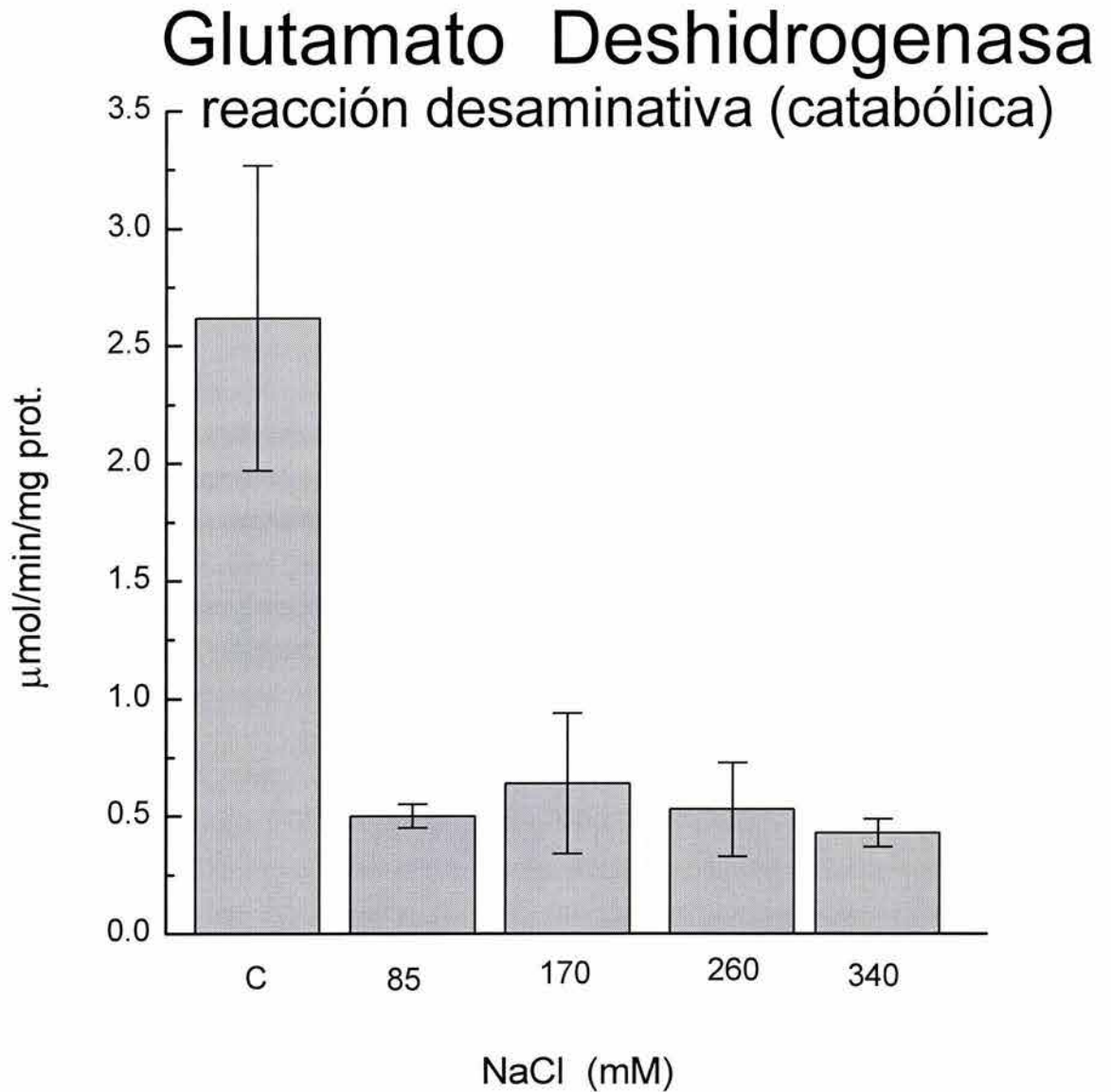


Figura 25.-Actividad de la glutamato deshidrogenasa en células cultivadas *in vitro* de *B. ternifolia* control y adaptadas.

B.- Reacción desaminativa. La transformación del glutamato a α cetoglutarato fue seguida como se mencionó en métodos. Cada valor es el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes.

Actividad de glutamino sintetasa en células de *Bouvardia ternifolia*

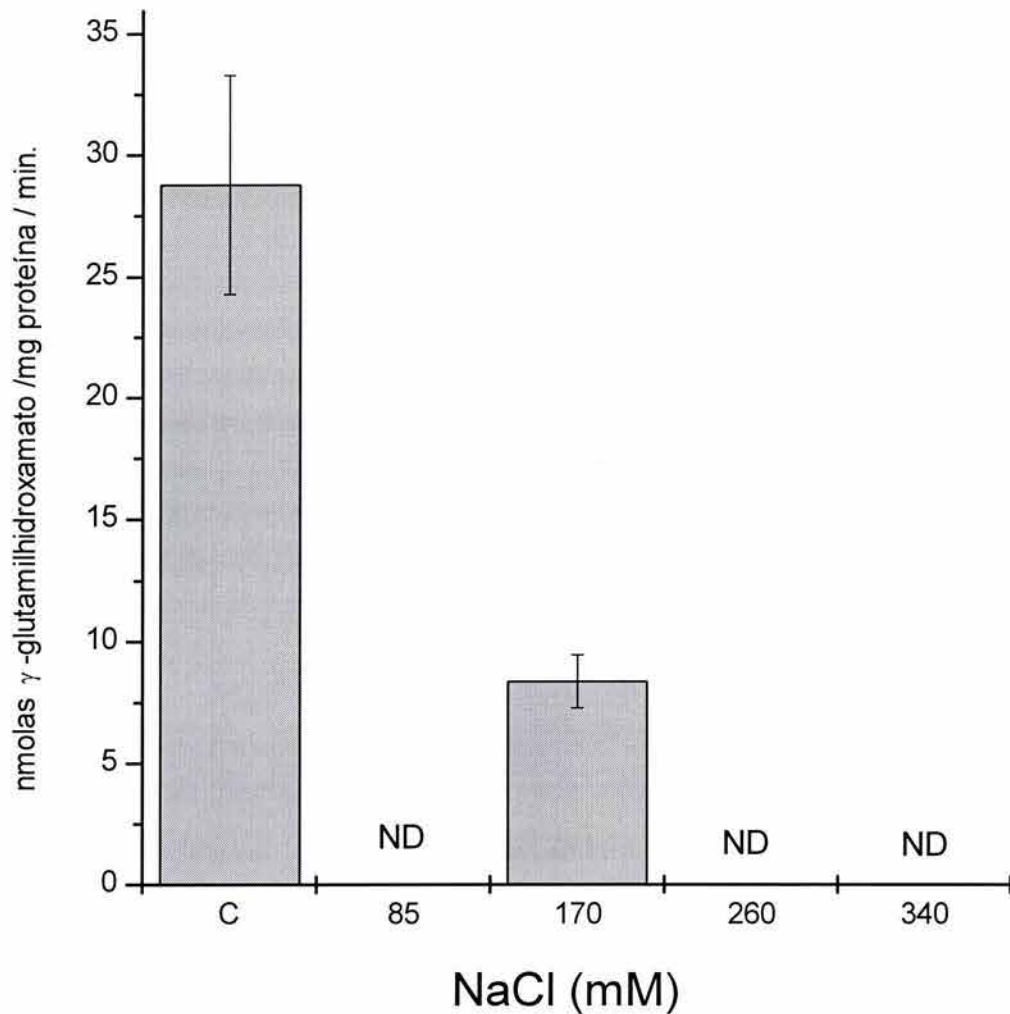


Figura 26.- Actividad de Glutamino Sintetasa en células de *Bouvardia ternifolia* control y adaptadas a diferentes concentraciones de sal. La actividad fue determinada en extractos totales de células control y adaptadas como se mencionó en métodos. Cada valor es el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes. ND= no detectado.

La actividad es expresada como nanomolas de γ glutamilhidroxamato producido por mg de proteína por minuto.

Efecto de NaCl sobre la actividad de la glutamino sintetasa de extractos de células de *B. ternifolia*.

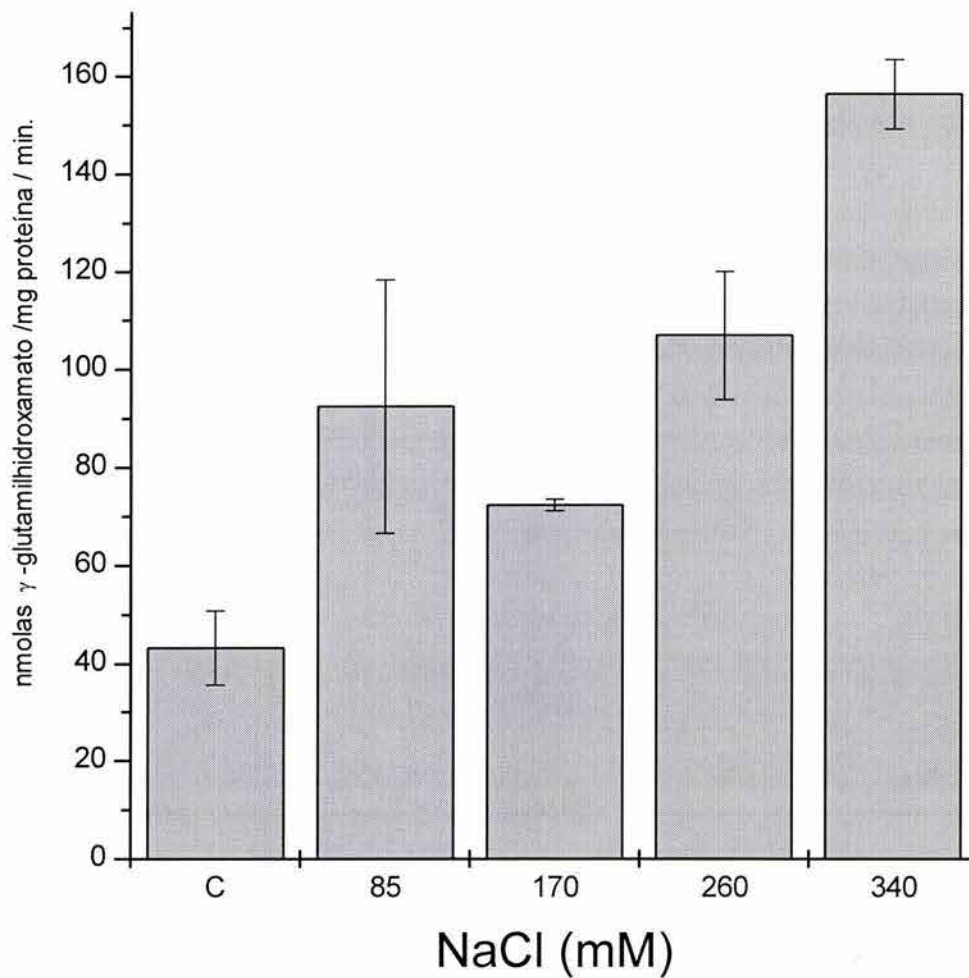


Figura 27.- Actividad de la Glutamino Sintetasa en extractos de células control, adicionados con sal.

Extractos totales de células control fueron adicionados con concentraciones indicadas de NaCl y la actividad de GS fue determinada después de 30 minutos de incubación.

Los resultados sugieren que los cambios observados en la actividad de GS de células adaptadas podrían ser un mecanismo adaptativo a mediano y largo plazo, ya que incluso al incubar células no adaptadas con 170mM de NaCl, esta actividad no se ve significativamente afectada incluso después de 6 horas de administrado el choque salino (figura 28).

Es claro que cuando se estudió la actividad de la glutamino sintetasa en las diferentes líneas adaptadas a NaCl, ésta se encuentra dramáticamente inhibida. Nuevamente, ello podría significar que existe un mecanismo adaptativo el cual estaría dirigido a la biosíntesis activa de compuestos orgánicos nitrógenados como prolina, vía glutamato.

7.7. Efecto de la adición de glutamina sobre el crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* control y adaptadas a 170 mM de NaCl.

Debido a que la actividad de la glutamino sintetasa se ve considerablemente disminuída en células adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl, podría suponerse que, consecuentemente, la síntesis de glutamina también se va a ver disminuída. Por ello se decidió adicionar glutamina al medio de cultivo de células control y adaptadas a 170 mM NaCl, para ver el efecto que ésta pudiera tener sobre el crecimiento de las células bajo condiciones de estrés.

Bajo condiciones de estrés por sal, el glutamato podría ser utilizado preferencialmente para la síntesis de prolina, con la cual la célula podría hacer frente al estrés por sal. Sin embargo, el déficit relativo de glutamina podría también resultar perjudicial para la célula al comprometer la síntesis de proteínas y la biosíntesis de otros compuestos de los cuales la glutamina es el precursor.

Por ello, se decidió el manejo de una sola población de células adaptadas (170 mM NaCl) y células que nunca han sido sometidas a estrés por NaCl (control) para establecer el efecto de la glutamina sobre estas células.

Actividad de GS de células de *Bouvardia ternifolia* chocadas *in vitro* con NaCl 170 mM.

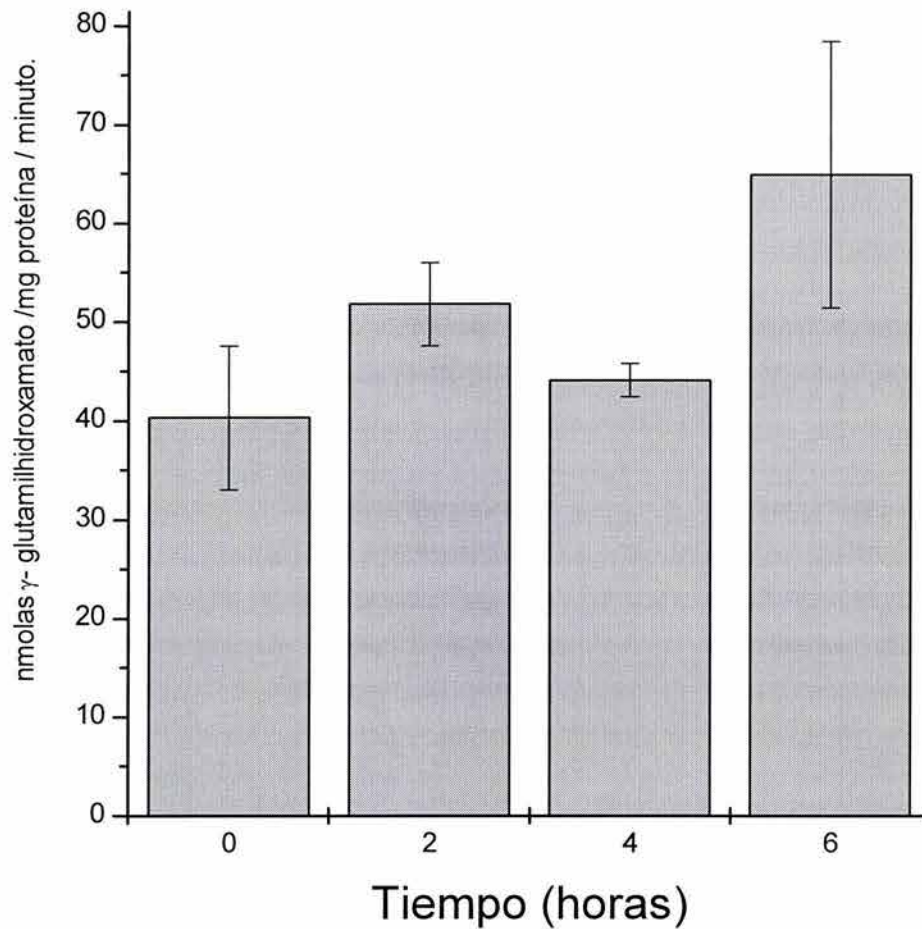


Figura 28.- Actividad de Glutamino sintetasa de células tratadas con choque salino. Células no adaptadas fueron incubadas con 170 mM de NaCl durante el tiempo indicado en métodos. Al término de la incubación las células fueron lisadas y la actividad de la GS fue determinada en el extracto crudo.

Nuevamente, tomando como parámetros de crecimiento el volumen relativo del paquete celular (VRPC), se observó que células adaptadas a 170 mM de NaCl y crecidas en presencia de glutamina (5 mM) presentaban un incremento en su velocidad de crecimiento comparadas con células adaptadas a 170 mM sin glutamina; es decir, las células tratadas con glutamina presentan una ligera recuperación. Curiosamente, células control crecidas con glutamina sufrían una considerable disminución en su velocidad de crecimiento, acentuándose más conforme transcurre el tiempo, como se puede apreciar en la figura (29 a).

Algo similar se apreciaba también en función al peso fresco, (Figura 29 b) y al peso seco (figura 29 c). Por lo tanto, el comportamiento de las curvas de crecimiento indica que las células adaptadas a 170mM de NaCl y crecidas en presencia de glutamina recuperan parcialmente su velocidad de crecimiento aunque sin llegar alcanzar los valores del control.

Este experimento sugiere que en condiciones de estrés salino la adición de glutamina podría estar ayudando a enfrentar o a hacer menos severo el estrés por sal, ya que favorece el crecimiento de las células sometidas a estrés salino (170 mM NaCl) cuando se emplea una concentración baja (5 mM) de glutamina.

Curva de Crecimiento de células de *B. ternifolia* control y adaptadas crecidas con y sin glutamina (VRPC)

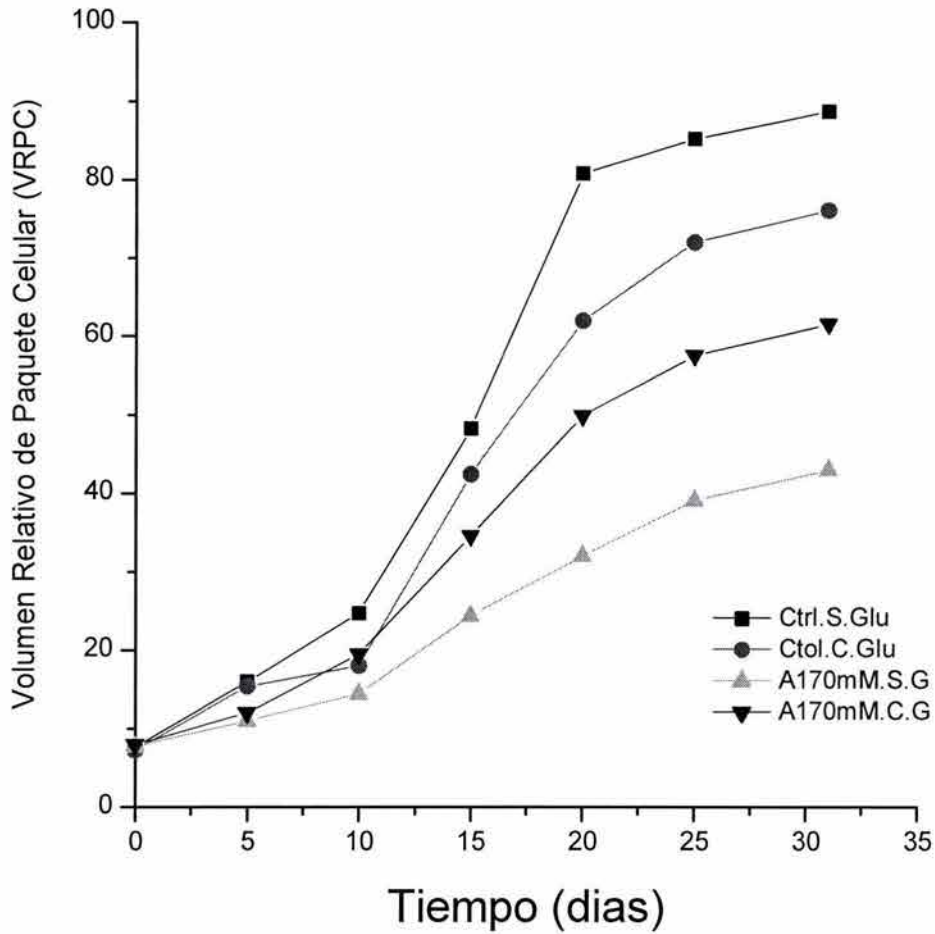


Figura 29 A.- Curvas de crecimiento de células de *B. ternifolia* cultivadas *in vitro* control y adaptadas a 170 mM de NaCl, crecidas en un medio adicionado con glutamina (como se indicó en métodos) y sin glutamina.

Crecimiento reportado en función del incremento del volumen relativo del paquete celular (VRPC).

Curva de crecimiento de células de *B. ternifolia* control y adaptadas con y sin glutamina. Peso Fresco

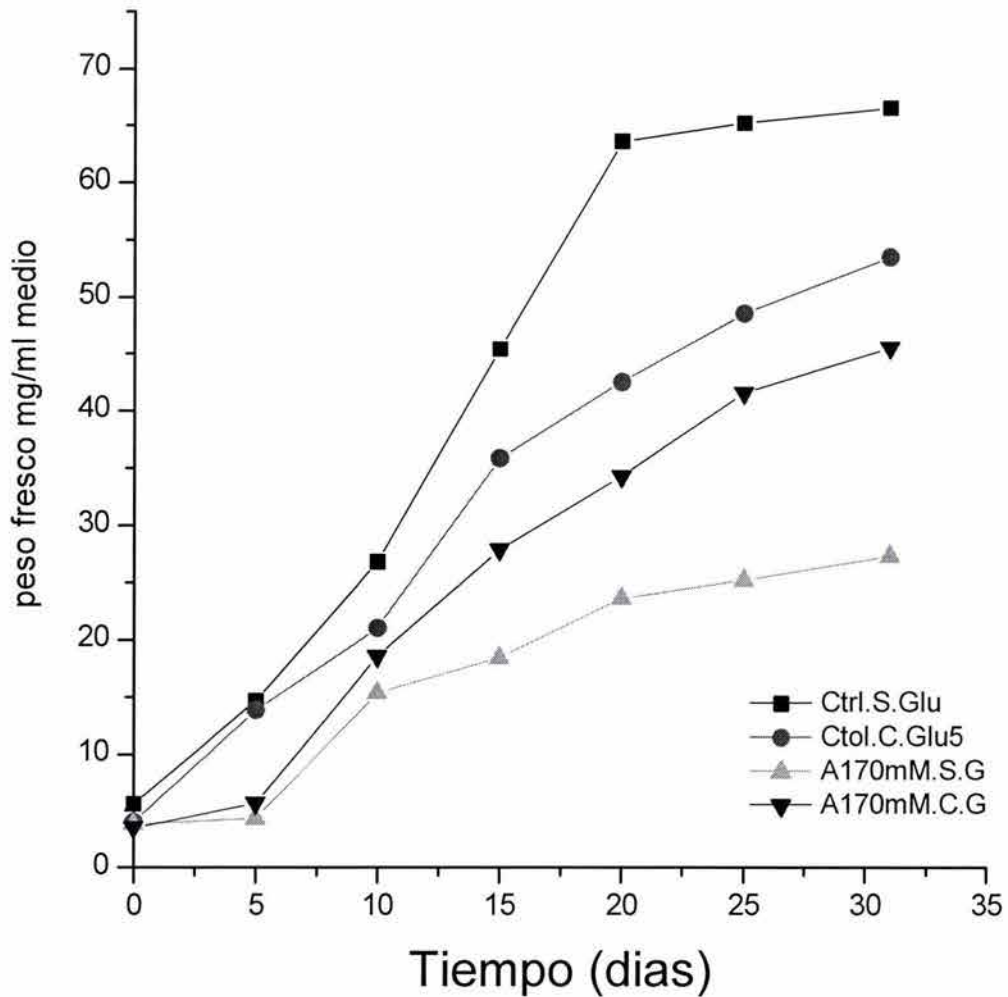


Figura 29 B.- Curvas de crecimiento de células de *B. ternifolia* cultivadas *in vitro* control y adaptadas a 170 mM de NaCl, crecidas en un medio adicionado con glutamina (como se indicó en métodos) y sin glutamina. Crecimiento reportado en función del incremento del peso fresco.

Curva de crecimiento de células de *B. ternifolia* control y adaptadas con y sin glutamina. Peso Seco

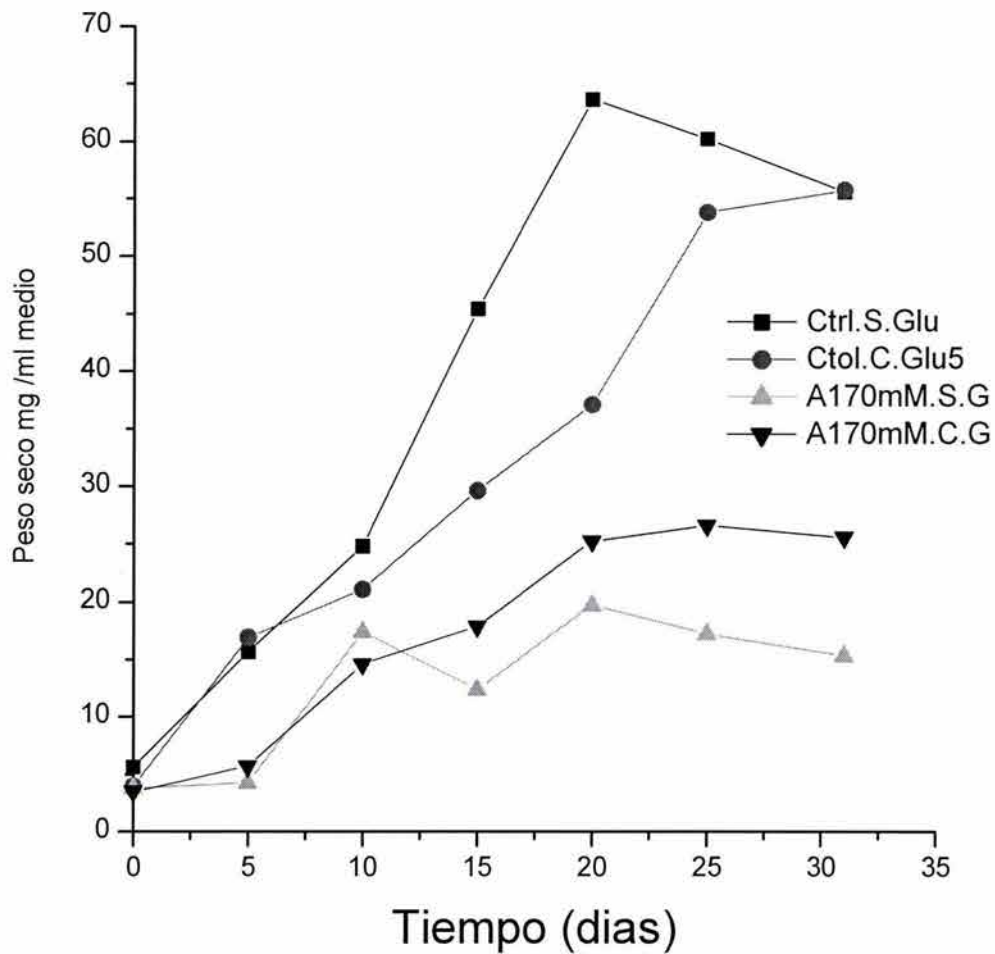


Figura 29 C.- Curvas de crecimiento de células de *B. ternifolia* cultivadas *in vitro* control y adaptadas a 170 mM de NaCl, crecidas en un medio adicionado con glutamina (como se indicó en métodos) y sin glutamina.

Crecimiento reportado en función del incremento del peso seco.

7.8. Patrones electroforéticos de proteínas totales de células de *B. ternifolia* control y adaptadas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

Los resultados obtenidos de la separación electroforética de proteínas totales de células control y de las líneas adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl se muestra en la figura 30. Se observa claramente que el estrés salino inhibió la síntesis de algunas proteínas y, simultáneamente, promovió la síntesis de otras.

Al observar a las células adaptadas a 0.085 M de NaCl es evidente que han disminuido muy importantemente la síntesis de proteínas de alto peso molecular (por arriba de 66 kDa); aparentemente, moléculas de unos 51 y 42 kDa que no son evidentes en el carril de las células control, aparecen a este nivel de adaptación. Asimismo, una banda correspondiente a 32 kDa muestra un incremento muy evidente con respecto a las células control.

Al aumentar la concentración salina a 0.170 M, es posible apreciar nuevamente algunas de las bandas proteicas, particularmente aquella que corresponde a 79 kDa aún cuando se aprecian otras, más débilmente, de 81, 74 y 66 kDa. A esta concentración de sal se aprecia un aumento en la intensidad de las bandas de 42, 40, 38 y 28 kDa en relación con el control.

Cuando la adaptación alcanza los valores de 0.260 M, la banda de 79 kDa muestra una disminución evidente al igual que las bandas de 48 y 42 kDa. La banda de 40 kDa presenta un pequeño incremento en su intensidad junto con las de 32 y 28 kDa. En esta situación, se aprecia la aparición de una especie molecular de 15 kDa que no se había presentado a concentraciones menores de NaCl.

Finalmente, a una concentración de 0.340 M de NaCl prácticamente desaparecen todas las bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular siendo la de 48 kDa la de más alto peso que puede observarse. Aquella correspondiente a 42

kDa continúa haciéndose menos intensa mientras que, las de 40, 38 y 35 kDa muestran un incremento en su intensidad. La banda de 21 kDa no parece alterarse pero la de 15 kDa, presente a concentraciones de 0.260 M de NaCl, desaparece.

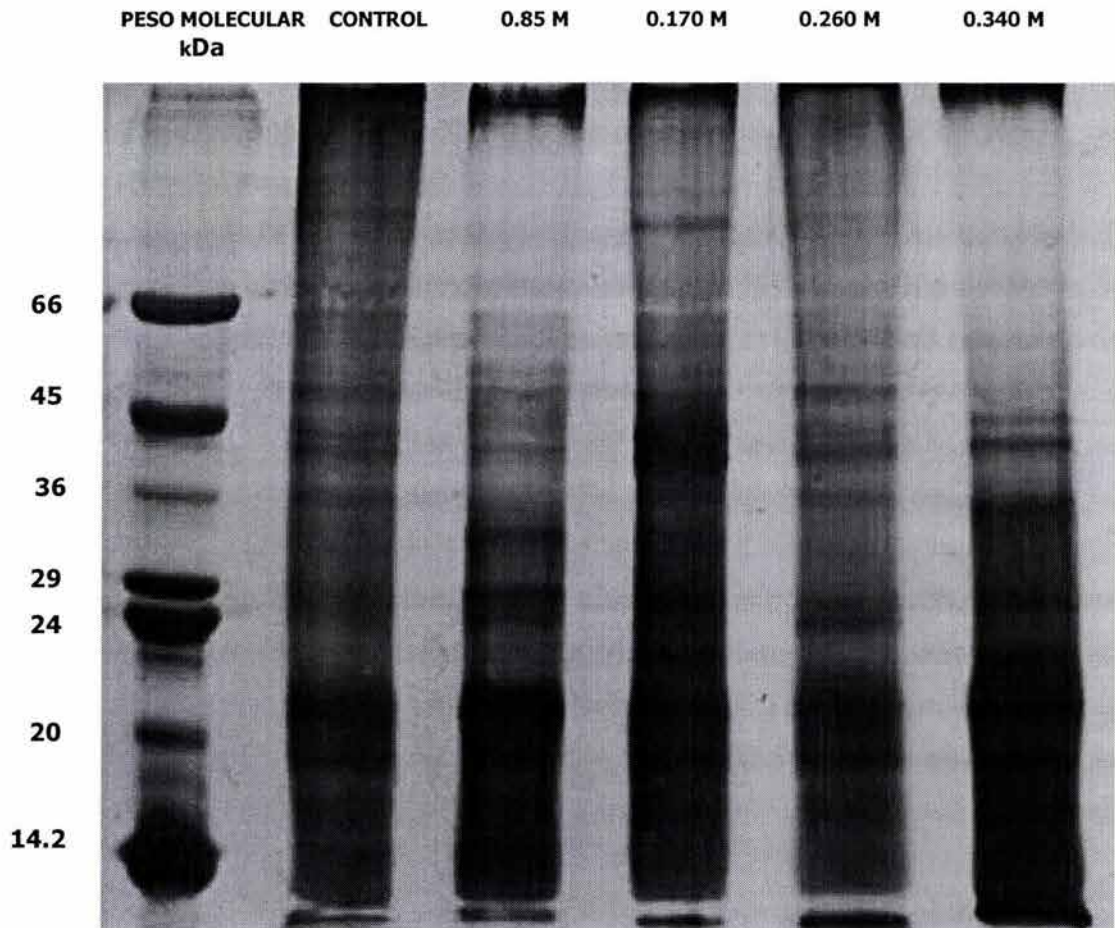


Figura No. 30. Patrones electroforéticos de proteínas totales de células de *B. ternifolia* (en fase logarítmica) control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2. Control; carril 3. 0.085 M; carril 4. 0.170. M; carril 5. 0.260 M y carril 6 0.340 M de NaCl.

Peso (kDa) Molecular	Control	0.085 M NaCl	0.170 M NaCl	0.260 NaCl	0.340 M NaCl
			81		
	79	----	79	79 ↓	-----
			74		
66	66	66	66	66	-----
	59	59	59		
		51	54	51	
			48	48 ↓	48
45	45	45	45		
		42	42 ↑	42 ↓	42 ↓
	40	40	40 ↑	40	40 ↑
	38	38	38 ↑		38 ↑
36					
	35			35	35 ↑
		33			
	32	32 ↑	32 ↑	32 ↑	
29					
		28	28 ↑	28 ↑	
24					
	21	21	21	21	21
20.1					
				15	
14.2					

Cuadro III. Patrones electroforéticos de proteínas totales de células de *B. ternifolia* (en fase logarítmica) control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2. Control; carril 3. 0.085 M; carril 4. 0.170. M; carril 5. 0.260 M y carril 6 0.340 M de NaCl.

Es evidente la síntesis de un polipéptido con una masa aproximada de 21 kDa el cual parecería estar presente en todas las concentraciones de NaCl estudiadas y que inclusive podría estar mostrando un ligero incremento en su concentración conforme el estrés se hace más severo.

Por su peso molecular aparente, esta proteína podría ser la osmotina, una molécula de 24 kDa que aparece en tabaco durante el estrés salino (Singh *et al.*, 1987).

7.9. Patrones electroforéticos de proteínas totales marcadas con metionina ^{35}S de células control, adaptadas y chocadas con diferentes concentraciones de NaCl en geles de PAGE-SDS.

Con el objeto de estudiar la síntesis *de novo* de las proteínas de *B. ternifolia* se le administró metionina ^{35}S a células que se encontraban en fase logarítmica y se estresaron con diferentes concentraciones de NaCl (0.085, 0.170, 0.260 y 0.340 mM) durante 8 horas. Se hizo la extracción total de proteínas y se separaron en función de su peso molecular en geles de PAGE-SDS colocando en cada carril 20,000 cpm (cuentas por minuto). La figura 31 muestra la autorradiografía del gel después de una semana de exposición y dentro de los detalles que destacan pueden observarse que las células control y estresadas con 85 mM de NaCl sintetizan una gran cantidad de proteínas de alto peso molecular y conforme aumenta el estrés por sal va disminuyendo la síntesis de éstas por lo que se observan con mayor claridad bandas discretas.

Curiosamente las células estresadas a 260 mM de NaCl parecen ser las más afectadas en su síntesis de proteínas ya que al compararlas con las células estresadas con 340 mM de NaCl daría la impresión de que la síntesis de proteínas vuelve a aumentar.

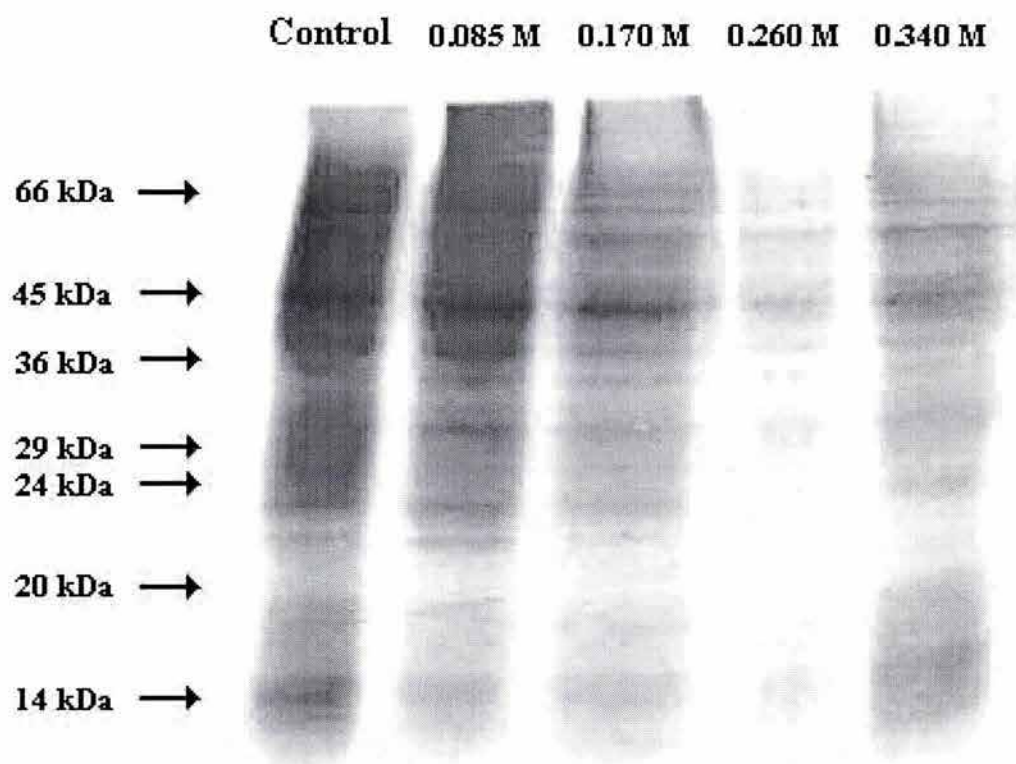


Figura No. 31. Fluorografías de proteínas totales marcadas con metionina ^{35}S de células de *B. ternifolia* (en fase logarítmica) control y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl control; 0.085 M; 0.170. M; 0.260 M y 0.340 M..

La síntesis *de novo* de proteínas por parte de las células tanto adaptadas como no adaptadas a estrés por sal fue también explorada. Para ello, fueron marcadas por dos horas (como se mencionó en materiales y métodos mediante la adición de metionina ^{35}S a células en fase exponencial de crecimiento), y el gel se cargó con 40,000 cpm . Los resultados de las autorradiografías se muestran en la figura 32 en donde pueden observarse que, en términos generales, las células adaptadas s muestran una muy baja síntesis de proteínas. Puede notarse la escasa presencia de proteínas sintetizada durante el lapso de 2 hrs. que duró el marcado de las células adaptadas, mientras que en las células no adaptadas y chocadas con sal se observa una mayor síntesis de proteínas si bien ésta va disminuyendo conforme aumenta la intensidad del estrés (ver figuras 32 a, b y c).

Llama la atención que en las células adaptadas control, 85 y 170 mM de NaCl aparentemente hubo muy poca incorporación de marca radiactiva (ver figura 32 a, b y c).

La tendencia observada en la autorradiografía es una clara disminución en la síntesis de proteínas de alto peso molecular conforme aumenta el estrés así como la aparición de unas bandas de 26 kD y otra de 16 kD aproximadamente que son más notorias en células estresadas (chocadas) a 260 y 360 mM de NaCl. En las células adaptadas prácticamente no hay incorporación de marca radiactiva (ver figura 32 a, b y c).

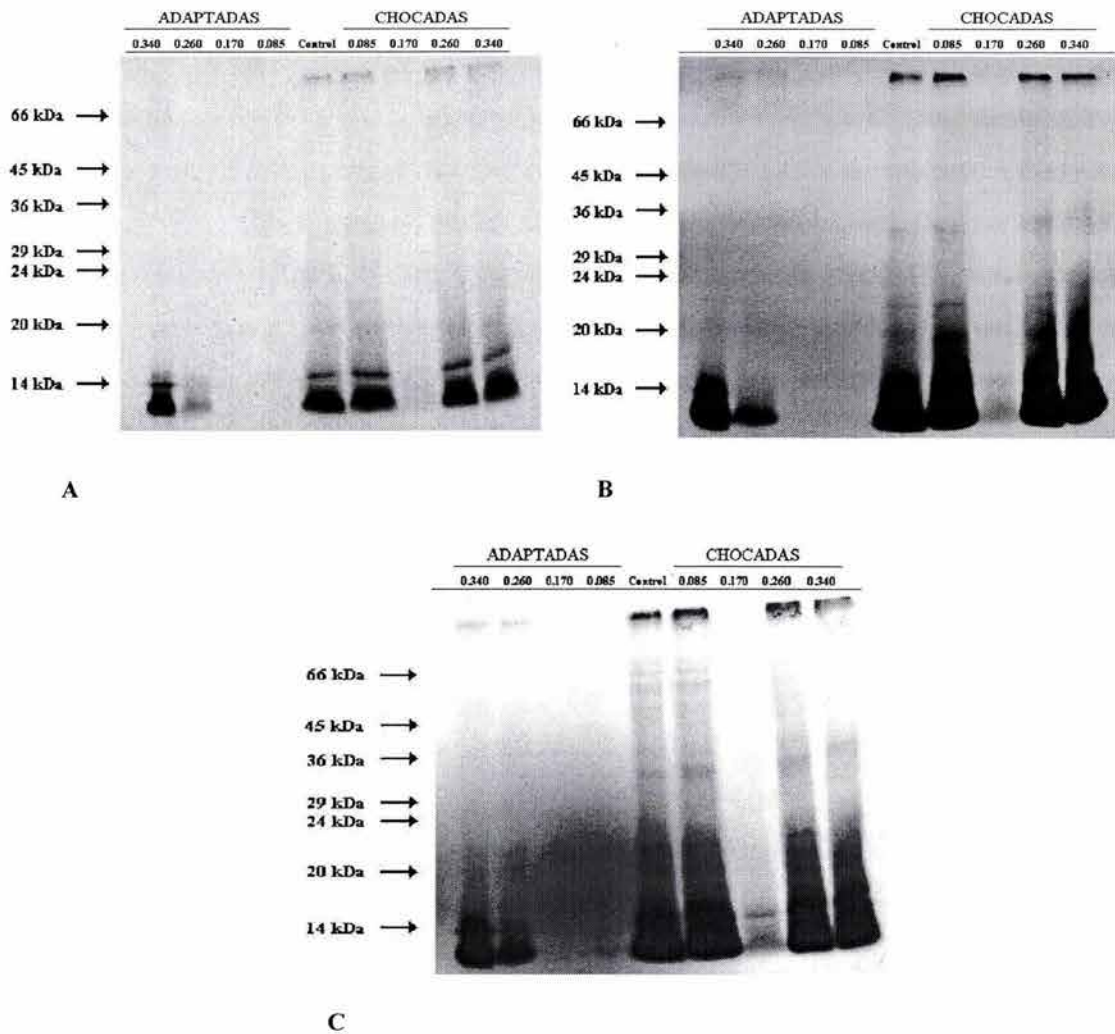


Figura No. 32. Fluorogramas de proteínas totales marcadas con metionina ^{35}S de células de *B. ternifolia* (en fase logarítmica) control, adaptadas y chocadas a diferentes concentraciones 0.085 M, 0.170.M, 0.260 M y 0.340 M de NaCl. **A.** Una semana de exposición **B.** dos semanas de exposición. **C.** Seis semanas de exposición.

8.0. DISCUSION

Las curvas de crecimiento de células de *Bouvardia ternifolia* bajo condiciones de estrés salino muestran que concentraciones de 260 y 340 mM de NaCl en el medio afectan el crecimiento del cultivo ya que al analizar el VRPC, peso fresco y peso seco, éstos están muy por debajo de los valores del control. Ahora bien, en células de *B. ternifolia* sometidas a un bajo estrés salino (85 y 170 mM de NaCl) se aprecia que existe un moderado efecto ya que ocurre un ligero decremento del peso fresco y del VRPC con respecto a las células control.

Con lo analizado anteriormente podemos decir que al producirse un efecto intenso de estrés salino (260 y 340 mM de NaCl) se presenta una disminución considerable tanto del volumen celular como del peso seco ya que las células pierden la capacidad o tienen pocas posibilidades de incorporar eficientemente solutos del medio de cultivo y poder así incorporarlos a su metabolismo y utilizarlos para aumentar su peso seco. Debido a esto no podemos observar un incremento significativo en su peso seco.

Se realizaron pruebas para determinar la viabilidad de las poblaciones adaptadas a las diferentes concentraciones de sal y éstas mostraron claramente que dichas células permanecen vivas. Mas aún, células crecidas en medios de cultivo con 260 y 340 mM de NaCl permanecen vivas y están adaptadas, aunque su velocidad de crecimiento sea mucho menor que el control.

Una vez que dichas líneas celulares se adaptaron se procedió a estudiar si la adaptación era un fenómeno reversible o permanente. Las líneas celulares adaptadas a 260 mM y 340 mM de NaCl fueron crecidas en medios no selectivos sin sal para ver si ello ocasionaba la pérdida de la adaptación. Dichas células presentaron la capacidad de poder crecer en medio sin sal, aunque sin alcanzar los valores del control.

Cuando se realizaron subcultivos constantes de dichas líneas celulares adaptadas a las diferentes concentraciones de NaCl, en medio sin sal, se observó que eventualmente alcanzaron la velocidad de crecimiento de las células control. Una vez logrado ésto se sometió a las mismas líneas celulares a crecimiento en un medio selectivo (con sal) para ver si la adaptación permanecía; se encontró que dichas células presentaban retraso en su crecimiento e inclusive algunas llegaron a lisarse.

Esto no es del todo sorprendente ya que desde 1975 Dobzhansky, trabajando en la selección para fototactismo positivo con *Drosophila pseudoobscura* obtuvo poblaciones genéticamente fotopositivas y fotonegativas. Tras 20 generaciones de selección, muy pocas moscas hicieron elecciones de luz y oscuridad en igual número (Dobzhansky, 1975).

A partir de la vigésima generación se atenuó el rigor de la selección y se pudo apreciar que la respuesta fototáctica que se había logrado mediante la selección había casi desaparecido hacia la generación número cuarenta.

Se ha comprobado que al hacer menos rígida la selección, ésto es motivo a menudo, aunque no invariablemente, de una pérdida gradual de lo que previamente se había ganado por selección artificial. Lerner, en 1954, denominó a éste fenómeno homeostásis genética. Lerner hizo un análisis de esta situación y dijo que dicha homeostásis puede resultar por diversos mecanismos. Por ejemplo, el tamaño y peso promedio de un individuo, su ritmo de crecimiento y el promedio del número de descendientes corresponden a los valores que dan una mejor capacidad de adaptación en el medio ambiente en el que vive la población. La selección artificial que se impone a una población causa un desplazamiento de las características apartando a sus miembros de sus valores óptimos y haciendo una selección natural divergente.

Con lo anterior podemos decir que la adaptación de las células de *B. ternifolia* a las diferentes concentraciones de NaCl es un proceso reversible ya que al hacer menos severa la selección dichas células pierden gradualmente la capacidad de crecer en un medio selectivo (con sal).

Los estudios morfológicos de las diferentes líneas celulares adaptadas a las diferentes concentraciones de NaCl mostraron que al someter dichas células a un estrés gradual presentaron una acumulación de gránulos en el citoplasma, los cuales aumentaron en densidad conforme el estrés se iba haciendo más severo. Además, se pudo apreciar que la naturaleza química de dichos gránulos corresponde muy probablemente al almidón ya que se tiñeron de azul-morado intenso cuando se les aplicó la prueba de yodo en yoduro de potasio que es específica para el almidón (Valla, J. 1995).

Por otro lado, también se pudo observar que cuando la presión de selección aumenta, las células de las diferentes líneas celulares adaptadas presentan alteraciones en el volumen nuclear y nucleolar.

Los resultados obtenidos al comparar los volúmenes nuclear y nucleolar mostraron una diferencia significativa, siendo mayor el volumen nuclear en células crecidas bajo condiciones de estrés más severo (260 y 340 mM NaCl).

Diversos reportes en la literatura de microscopía óptica y electrónica de diferentes tipos de células animales y vegetales indican que conforme las células se van diferenciando, va aumentando su actividad transcripcional. Paralelo a esto se observa un aumento en el volumen nuclear que podría indicar que éste incremento se debe a la actividad transcripcional elevada. Por otra parte se ha visto también que en células donde hay una gran síntesis de proteínas también se ve un aumento en el volumen nucleolar o aumento en el número de nucleolos.

Los cambios observados en los volúmenes nuclear y nucleolar podrían indicar que el proceso de adaptación a concentraciones elevadas de NaCl por parte de la célula de plantas glicofitas implica un aumento en la actividad transcripcional con respecto a las células control, el cual alcanzaría un máximo en las células adaptadas a concentraciones de 170 mM de NaCl, para luego disminuir pero sin llegar a alcanzar nunca los valores de las células control.

Las diferencias encontradas en la determinación del volumen nuclear y nucleolar en células adaptadas a las diferentes concentraciones de sal se han interpretado como una diferencia en su actividad metabólica (Vázquez-Nin *et al.*, 1983 y 1986). Este aumento muy probablemente se deba a un incremento en su actividad

transcripcional como consecuencia de la presencia del agente estresante (en este caso, sal).

Las numerosas respuestas durante la pérdida de agua están controladas por una batería de genes con muy diversas funciones. Con la pérdida de agua desde el interior de la célula, inicialmente ocurren procesos regulatorios en el metabolismo para las nuevas condiciones celulares; al mismo tiempo, se produce inhibición en el crecimiento y alteraciones de vías metabólicas lo que podría ser resultado del cambio en la expresión de genes (Davies y Jones, 1992).

La tolerancia al estrés por agua involucra cambios bioquímicos intracelulares. Estos aparecen como acumulación de solutos compatibles y de proteínas específicas que han sido inducidos rápidamente por el estrés osmótico (Rhodes, 1987). Los cambios en la célula favorecen algunas funciones protectoras que promueven la entrada de agua y ayudan al control de la acumulación de iones (Bray, 1993).

Los diferentes estudios de la respuesta molecular a la pérdida de agua han mostrado múltiples cambios en la expresión de genes. Muchos de éstos se expresan más durante el estrés promoviendo la tolerancia celular a la deshidratación y a las alteraciones en el potencial de agua (Bray, 1983, Mundy y Chua, 1988).

Muchos de los genes inducidos por pérdida de agua codifican para productos como proteínas de conductos membranales, chaperonas, ubiquitinas, proteasas, enzimas biosintéticas de glicinabetaína, prolina, etc., y como ya se mencionó, se ha sugerido que éstos podrían participar en la protección de la célula, interaccionando con macromoléculas modificando su estructura y su función ayudando así a la sobrevivencia de la célula (Mundy, 1990, Simontacchi *et al.*, 2001).

La expresión de estos genes durante el estrés no necesariamente garantiza que los productos de ellos induzcan la capacidad de las plantas para sobrevivir al estrés. La expresión de algunos de estos genes podría resultar por algún daño que ocurriría durante el estrés. Además, otros genes podrían inducirse pero la expresión de éstos no necesariamente alteraría la tolerancia al estrés. Asimismo, es posible que otros genes todavía no descubiertos sean requeridos para la

tolerancia al estrés y para la acumulación de productos como una respuesta adaptativa (De Rocher y Bohnert., 1993, Bohnert *et al.*, 1995).

Para que las células puedan desarrollar sus funciones correctamente debe de ocurrir un flujo de metabolitos a través de la vías anabólicas y catabólicas y estas a su vez tienen que ser finamente reguladas. Todos los eventos bioquímicos requeridos deben de llevarse a cabo de acuerdo con los requerimientos del organismo en relación con su medio.

Por otro lado, la síntesis de macromoléculas así como el transporte y la secreción de metabolitos deben de responder a cambios sutiles del medio celular. Hemos observado que cuando se somete a las células de *B. ternifolia* a concentraciones relativamente bajas de NaCl se induce un incremento dramático en el contenido de prolina. Pero el contenido de prolina disminuye cuando el estrés es más severo.

Se ha reportado que el metabolismo nitrogenado se ve alterado cuando células de plantas son crecidas en presencia de diferentes tipos de estrés (Le Rudulier *et al.*, 1984). La adaptación de las células de *B. ternifolia* es un proceso muy complejo en el cual se ven involucrados muchos procesos bioquímicos, entre los que destacan, como ya se dijo anteriormente, la acumulación de prolina. Este aminoácido es sintetizado a partir de glutamato, una molécula clave del metabolismo nitrogenado. Nuestros resultados muestran que la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamino sintetasa (GS) se ven modificadas por el estrés por NaCl. Los datos de la figura 25a indican que la actividad de la GDH (reacción aminativa) se ve afectada conforme se va incrementando la concentración de NaCl y aparentemente existe una recuperación moderada de la actividad a concentraciones altas (340 mM).

Sin embargo, cuando se analiza la reacción desaminativa (fig 25b) se observa que la reacción está mucho más afectada a concentraciones bajas de NaCl (85 mM). Estos resultados sugieren que las células bajo estrés salino han realizado ajustes en la actividad de GDH y del metabolismo nitrogenado directamente relacionados con la síntesis de prolina.

Asimismo, la actividad de la glutamino sintetasa (GS) en las diferentes líneas adaptadas a NaCl se ve inhibida aunque existe una aparente ligera recuperación en las células adaptadas a 170 mM.

La disminución dramática de la actividad de GS probablemente permita a las células vegetales una síntesis más eficiente de prolina, con lo cual también es posible que otros procesos metabólicos se vean afectados por una deficiencia relativa de glutamina.

En estas circunstancias, el déficit relativo de glutamina podría ser perjudicial para la célula bajo condiciones de estrés, ya que se podría comprometer la síntesis de algunas proteínas y la biosíntesis de otros compuestos de los cuales la glutamina es el precursor como se muestra en la figura 6.

Si existe una pérdida en la actividad de GS en células adaptadas a diferentes concentraciones y, por lo tanto, una disminución relativa de glutamina, entonces la adición en el medio de cultivo de glutamina podría ayudar a mejorar el crecimiento de dichas células.

Se observa que al adicionar glutamina en el medio de cultivo de células adaptadas a 170mM de NaCl, ésta parece ayudar a las células haciendo menos severo el estrés, ya que al comparar los diferentes parámetros de crecimiento de células control y adaptadas adicionadas con glutamina existe un aumento en el crecimiento de éstas últimas, pero nunca alcanzando los valores del control.

9.0. CONCLUSIONES

El cultivo serial *in vitro* de las células de ***Bouvardia ternifolia*** en medio Murashige-Skoog suplementado con concentraciones crecientes de NaCl generó cuatro diferentes líneas celulares adaptadas a 85, 170, 260 y 340 mM de NaCl tanto en células en suspensión como en callos (ver fig 10, 11, 12, 13). Es claro que la presencia de concentraciones elevadas de cloruro de sodio afecta notoriamente a las células, ocasionando así un crecimiento lento. Esta disminución en la velocidad de crecimiento podría deberse a que al ser la sal un agente estresante y obligar a las células a canalizar su metabolismo hacia el manejo de una situación estresante y evitar que se produzcan daños, probablemente compromete los recursos bioquímicos y energéticos destinados para su crecimiento (Simontacchi *et al.*, 2001, Alberts *et al.*, 1997).

Es importante hacer notar que aunque la velocidad de crecimiento de las células adaptadas a concentraciones elevadas de sal (260 y 340 mM de NaCl) es muy baja, estas células realmente se han adaptado a esas condiciones y no solo son capaces de sobrevivir sino también de dividirse, aunque muy lentamente.

Las observaciones en microscopía de luz muestran que células de ***B. ternifolia*** que fueron sometidas a estrés gradual por NaCl presentaban una acumulación muy evidente de granulaciones citoplasmáticas que al dar reacción positiva con la prueba de yodo en yoduro de potasio, podría suponerse que están constituidas por almidón (ver fig 22).

Pero, por otra parte, resulta muy interesante notar que se producen cambios significativos en los volúmenes nuclear y nucleolar de las diferentes poblaciones adaptadas. Los cambios en los niveles nuclear y nucleolar podrían indicar que el proceso de adaptación a concentraciones crecientes de NaCl implica un aumento en la actividad transcripcional.

Ahora bien, dicho aumento en la actividad transcripcional estaría correlacionado con la aparición, disminución y desaparición de bandas protéicas que se muestran en los patrones electroforéticos obtenidos de las diferentes líneas adaptadas a cloruro de sodio.

El proceso adaptativo de *B. ternifolia* a concentraciones crecientes de NaCl implica la síntesis de osmolitos (prolina) siendo éste un mecanismo adaptativo frecuentemente usado por las células vegetales al estrés por sal. Este aminoácido es sintetizado a partir de glutamato, una molécula clave en el metabolismo nitrogenado. La síntesis de glutamato a través de la reacción aminativa se ve afectada durante el proceso de adaptación al estrés.

La disminución drámatica en la actividad de la glutamino sintetasa probablemente permita a las células vegetales una síntesis más eficiente de prolina, con lo cual también es posible que otros eventos metabólicos se vean afectados por la deficiencia de glutamina. Con esto, puede decirse que la adición de glutamina en el medio de células adaptadas a 170 mM de NaCl ayuda a enfrentar o hacer menos severo el estrés por sal, ya que favorece el crecimiento de dichas células cuando están sometidas a estrés por NaCl.

Es evidente que las plantas están sometidas a diferentes tipos de estrés ya que tienen que soportar cambios ambientales que se ven favorecidos como consecuencia de los fenómenos naturales o acciones del ser humano. Para evitar que éstos alcancen niveles incompatibles con el desarrollo normal de las células, la presión selectiva ha determinado que en el curso de la evolución, hayan ido surgiendo numerosos mecanismos que protegen a las células vegetales contra el daño provocado por los diferentes tipos de estrés. Estos en muchas ocasiones muestran importantes analogías con los mecanismos presentes en animales (Larson R. 1998, Simontacchi *et al*, 2001).

10.0 REFERENCIAS

- Ahmad, N. y Wyn Jones, N. (1979). Glycinebetaine, proline and inorganic ion levels in barley seedlings following transient stress. *Plant. Sci. Letters*. 15: 231-37
- Ahmad, N., Wyn Jones, N. y Jeschke. (1987). Effect of exogenous glycinebetaine on Na⁺ transport in barley roots. *J. Exp. Botany* 191: 913-21
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, F., Roberts, K. Y Watson, J. (1997). *Molecular Biology of the Cell*, pp. 1144-1148. Garland Publishing Inc. New York.
- Allard, R. (1978). *Principios de Mejora genética de plantas* Ed. Omega. Barcelona
- Anathan, J., Goldberg, A. y Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins serve as Eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232: 522-524
- Anderson, J., Li, Q., Haskell, d. Y Guy, C. (1994). Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.* 104: 1359-1370
- Antonovis y cols. Citado por Krebs, 1985.
- Arad, S y Richmond A.E. (1976). Leaf cell water and enzyme activity. *Plant Physiology* 57: 656-658.
- Ashbuner, M. y Bonner, J. (1979). The Induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, 17: 241-254
- Ayala, Francisco, J. Kiger, John (1994) *Génética moderna*. Omega. España.
- Bartels D, Singh, M. y Salamini F. (1988). Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* 175: 485-92
- Becana, M., AparicioTrejo P. y Sánchez-Díaz M. (1984). Effects of water stress on enzymes of ammonia assimilation in root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol. Plant.* 61: 653-657
- Beckmann, R., Mizzen, L., Welch, W. (1990). Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 248:850-854

- Ben-Hayyim, G., P. Spiegel-Roy, P. y Neumann, H. (1985). Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. *Plant Physiol* 78: 144-48.
- Ben-Hayyim, G., P. (1987). Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured citrus cells. *Plant Physiol*. 85: 430-433
- Bernsteirn, L. (1963). citado por Levitt, J. 1980
- Bhagwat, A., y Apte, S. (1989). Comparative analysis of protein induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain L-31. *Journal of Bacteriology* 171 (9) 5187-5189.
- Binzel, M., Hasegawa, P., Handa, A. y Bressan R. (1985). Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol*. 79:118-125
- Bogges, o S., y Stewart, C. (1976). Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol* 58: 398-401
- Bohnert, H., Nelson, D. y Jensen, R. (1995). Adapataions to environmental stresses. *Plant. Cell* 7: 1099-1111
- Borowitzka, L. y Brown, A. (1974). The salt relations of marine and holophylic species of the unicellular green alga *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. *Arch. Microbiol*. 96: 137-152
- Bottacin, A., Cacco, G. y Saccoman, A. (1985). Nitrogen absortion and assimilation in NaCl-resistant and NaCl-susceptible millet genotypes (*Pennisetum americanum*). *Can J. Bot*. 63: 517-520
- Botella, M., Martínez, V., Pardines, J. Y Cerdá, A. (1997). Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *J. Plant Physiol*. 150: 200-205
- Boucaud, J. y Billard., J. (1981). La glutamine synthetase du *Suaeda maritima*. action *in vivo et in vitro* du NaCl. *Physiol. Plant*. 53: 558-64
- Boyer, P. (1970). *The Enzymes*. Vol. I, Academic Press. New York. Pp 559
- Braig, K., Simon, M., Furuyu, F., Hainfeld, J. y Horwich, A. (1993) A polypeptide bound by the chaperonin groEL is Localized within a central cavity. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90: 3978-3982

- Bradford, K. y Chandler, P. (1992). Expression of "dehydrins-like" proteins embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. *Plant Physiol.* 99: 488-494
- Brady, C.J, Gibson, T.S., Barlow E. Spiers, J. y Wyn Jones. R. (1984). Salt - tolerance in plants. I. ions, compatible organic solutes and the stability of plant ribosomes. *Plant Cell Environ.* 7: 571-578
- Bray, E. (1993). Molecular responses to water Deficit. *Plant Physiol* 103:1035-40
- Briens, M. y Larher, F. (1982) Osmoregulation in halophytic higher plants; a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant. Cell. Environ.* 5: 287-297
- Cairney, J., Booth, L. y Higgins, C. (1985). Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium* proU encodes an osmotically induced betaine transport system. *J. Bacteriol* 164: 1224-1232.
- Castañeda, M. (1985). Antología de Biología Molecular. UNAM. México.
- Cayley, S., Lewis, B. y Thomas Record, M. (1992). Origins of the psmoprotective properties of betaine and Proline in *E. coli*. K-12. *J. Bacteriology.* 174: 1586-1595
- Cerdá, A., Pardines, J., Botella, M., y Martínez, V. (1995). Effect of potassium on growth, water relations, and the inorganic and organic solute contents for two maize cultivars grown under saline conditions. *J.Plant Nutr.* 18 (4), 839-851
- Cheng, M, Hartl, F., Martin, J., Pollock, R. (1989). Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature.* 337: 620-25
- Craig, E., Kramer, J., Kosc-Smithers, J. (1987). SSC1, a member of the 70-KDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4156-4160
- Craig, E. y Gros, C. (1991). Is hsp70 the cellular thermometer?. *Trends Biochem. Sci.* 16:135-140
- Cornelissen, B., Hooft Van Huisduijren, R. y Bol, J. (1986). A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature* 321:531-532
- Cramer, G., Lauchli, A. y Epstein, E. (1986). Effects of NaCl y CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiol.* 81: 797-97

- Croughon, T. G. (1982). Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* en: The Molecular Biology of the yeast ***Saccharomyces***. Strathern, J., Jones, E y Broach, J. Editores. Cold Spring Harbor Laboratory. USA., pp 39-99
- Cramer, G., Lauchli, A., Polito, V. (1985). Displacement of Ca^{++} by Na^{++} from the plasmalemma of root. A primary response to sal stress. *Plant Physiol.* 79: 207-211
- Csonka, L. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* 53: 1: 121-47
- Csonka, L. y Hanson, A. (1991). Procaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annv. Rev. Microbial* 45: 569-606
- Dandekar, A. y Uratsu, S. (1988). A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J. Bacteriology* 170: 12:5943-5945
- Danielsson, A., Larsson, C., Larsson, K., Gustafsson, L. y Adler, L. (1996) A genetic analysis of the role of calcineurin and calmodium in Ca^{++} -dependent improvement of NaCl tolerance of ***Saccharomyces cerevisiae***. *Curr Genet* 30: 476-484
- Davies, W.J. y Jones, H.G. (1992). Abscisic acid physiology and biochemistry. Bios Scientific Publishers Limited. Pp 63-108
- De Rocher, J., y Bohnert, H. (1993). Development and environmental stress employ different mechanisms in the expression of a plant. Gene family. *The Plant. Cell* 5: 1611-25
- Dix, P. y Pierce, R. (1981). Proline accumulation in NaCl resistant and sensitive cell lines of ***Nicotiana***. *Zeitschrift for Pflanzenphysiologie* 102: 243-248
- Dobzhansky, T. (1980). Evolución. Ed. Omega. Barcelona.
- Dobzhansky, T. (1975). Genética del proceso evolutivo Ed. Textos Extempóranos. México.
- Dougall, D. (1974). Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Resc. Commun.* 58: 639-646
- Dunn, T., Gable, K. Y Beeler, T. (1994). Regulation of cellular Ca^{++} by yeast vacuoles. *J. Bio. Chem.* 269: 7273-7278.

Dure L. III, Crouch M., Haranda J., Hot Mondry J., Quatrano R., Thomas T. y Song Z. (1989). Common aminoacid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-86.

Ellis, R. y Van der Vies, S. (1991). Molecular Chaperones. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 321-347.

Esaka, M., Hayakawa, H., Hishimoto, M. y Matsubara, N. (1992). Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from sal-adapted winged bean cells. *Plant Physiol.* 100:1339-1345.

Espelund M., Saeboe-Larssen, S., Hugher, D. Galaw, G. Larsen, F. y Jakobsen, K. (1992). Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophylic repeats are regulated differentially by ABA and osmotic stress. *The Plant Journal* 2: 241-252.

Fayet, O., Louarn, J. y Georgopoulos, C. (1987). Supression of the *E. coli* dna A46 mutation by amplification of the groES and GroEL genes. *Mol. Gen. Genet.* 202:345-445

Fayet, O., Ziegelhoffer, T. y Georgopoulos (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *E. coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* 171:1379-1385.

Fisher, R.A. y Turner., N.C. (1978). Plant productivity in acid and semiarid zones. *Ann. Rev. Plant Physiol* 29: 277-317

Finkelstein, R., Tenbarger, K, Shumway, J. y Crouch M. (1985). Role of ABA in maturation of repressed embryos. *Plant Physiol* 78: 630-636

Finkelstein R. y Crouch, M. (1986). Repressed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seed. *Plant Physiol* 81: 907-912.

Fitter, A. y Hay, R. (1983). Environmental physiology of plants. Academic press London. pp 118-167

Galau, G.A., Wang, H., Hughes, D. (1993). Cotton Lea 5 and Lea 14 encode atypical late embryogenesis – abundant proteins.. *Plant Physiol.* 101: 695-696

Gatenby, A., Vandervies, S. y Bradley, D. (1985). Assembly in *E. coli* of a functional multi-subunit ribulose biphosphate carboxylase from a blue-green alga. *Nature* 314:617-620.

- Gatenby, A. y Ellis, R. (1990). Chaperon function: the assembly of ribulose biphosphate carboxilase-oxigenase. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6:125-149
- Greenway, H. Rana Munns (1980). Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol* 31: 149-190
- Grieve, C. y Maas, E. (1984). Betaine accumutation in salt stressed sorghum. *Physiol. Plant.* 61: 167-71
- Grumet, R. y Hanson, A. (1986). Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumutation in barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:353-364
- Guerrero F., y Mullet J. (1986). Increaesed abscisic acid biosyntheses during plant dehydration requires transcription. *Plant Physiol.* 80: 588-591.
- Guday, A. Sánchez-Martínez, D. Gómez, J. Puigdomenech, P. y Pages M. (1988). Gene expression in developing *Zea mays* embryos, regulation by abscisic acid of highly phosphorylted 23 to 25 KD group of proteins. *Plant Physiol.* 88: 564-69.
- Hanson, A., y Hitz, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol* 33: 163-203.
- Hanson, A. y Scott, N. (1980). Betaine synthesis from radioactive precursors in attached water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* 66: 342-48.
- Hanson, A.D., Nelsen, C.E., Pedersen, A.R. y Everson, E.H. (1979). Capacity for proline accumulation during water Stress in barley and its implications of breeding for droughth resistance. *Crop. Sc1.* 19: 489-493.
- Hartung, W. (1983). The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalema of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Environ* 6: 427-428
- Haro, R., Bañuelos, M., Quintero, F., Rubio F. y Rodríguez Navarro, A. (1993). Genetic basis of sodiom exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plant* 89: 868-874
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J-K. y Bohnert, H.J.(2000). Plant cellular and molecular reponses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol.* 51:463-499.
- Hemmingsen, S., Woolford, C., VanderVies, S., Tilly, K. Denis, D. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-34
- Hendrick, J. y Hartl, U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochem* 62: 349-384

- Hernández, L., y Vierling, E. (1993). Expression of low molecular weight heat-shock proteins under field conditions. *Plant Physiol.* 101: 1209-1216
- Hetherington, A. y Quatrano, R. (1991). Mechanism of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phitol.* 119:9-32.
- Higgins, C. F., Carney J., Stirling, D., Sutherland, L. y Booth, R. (1987). Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal?. *Trends Biochem. Sci.* 12: 339-334
- Hirel, B., Vidal, J. y Gadal, P., (1987) Evidence for a cytosolic dependent light induction of chloroplastic GS in etiolated rice leaves. *Planta* 155:17-23
- Hirata, D., Harada, S., Namba, H. y Miyakawa, T. (1995). Adaptation to high salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* in regulated by Ca⁺⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet* 249: 257-264.
- Hsiao, T. (1973) Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:519-560
- Hughes, D. y Galau, G. (1991)Development and Enviroment induction of Lea and Lea A mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell.* 3: 605-618
- Ibarra-Caballero J., Villanueva-Verduzco C., Molina-Galán J. y Sánchez-de-Jiménez E. (1988). Proline accumulation as a sympton of drought stress in maize: A tissue differentiation requeriment. *J. Exp. Botany* 39(204): 889-897
- Imhuff, J. y Valem F. (1984). Betaine is the main compatible solute of halophylic Eubacteria. *J. Bacteriol* 160: 478-79
- Jager, H.J. y Meyer, H.R. (1977). Effects of water stress on growth and protein metabolism of *Phaseolus vulgaris*. *L. Oecología (Berl)* 30:83-96
- Jones, M. y Turner, N. (1978) Osmotic adjustment in leaves of sorghum in response to water deficits. *Plant Physiol* 61:122-26
- Joy, K.W. (1973). Control of glutamate deshydrogenase from *Pisum sativum* roots. *Phytochemistry.* 12:1031-1040.
- Kanamori, T. y Matsumoto, H. (1972). Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:404-412
- Kent L. y Lauchi A. (1985). Germination and seedling growth of cotton salinity - calcium interactions- *Plant Cell Environ.* 8: 155-59

- Kermode A, Oishi, y Bewley, J. (1989). Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: A comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In Stanwood P.C., McDonald M. Ed.: Seed Moisture. Crop Science Society of America No. 14 pp 23-50.
- Key, J., Lin, c. y Chen, Y. (1981). Heat shock proteins of higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: No. 6 3526-3530
- Kimpel, J., Nagao, R., Goekjian, V. y Key, J. (1990). Regulation of the heat shock response in soybean seedlings. Plant Physiol 94: 988-995
- Kramer., P.J. (1983). Drought tolerance and water use efficiency in water relations of plants. Academic Press, New York, pp 390-415
- Krebs, C. (1985). Ecología. Estudio de la Distribución y la abundancia. Ed. Harper Row. Latinoamérica. México.
- Krishna, P., Saco, M., Cherutti, j. y Hill, S. (1995). Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. Plant. Physiol. 107: 915-923
- Kurt, E., Cramer, G., Lauchi, A. y Epstein, E. (1986). Effects of NaCl and CaCl₂ on cell enlargement and cell production in cotton roots. Plant Physiol. 82:1102-06
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685
- Landfald, B. y Strom, A. (1986). Choline glicenebetaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 165: 849-55
- Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. y Hurl, F. (1992). Chaperon mediated protein folding: GroES bind to one end of the GroEL cylinder, which accomodates the protein substrate within its central cavity. EMBO. 11:4757-4765
- Larher, F., Leport, L., Petrivalsky, M. y Chappart, M. (1993). Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. Plant Physiol. Biochem. 31: 911-922
- La Rosa, P., Singh, N., Hasegawa, P. y Bressan, R. (1989). Stable NaCl tolerance is associated with enhanced accumulation of osmotin. Plant Physiol 91:855-861
- Larson R. A. (1998). The antioxidants of higher plants. Photochemistry. 27:969-978.
- Le Rudulier, D., Strom, A., Dandekar, A., Smith, L., y Valentine R. (1984). Molecular Biology of osmoregulation. Science 224:1064-1068

Le Rudulier, D. y Valentine, R. (1982). Genetic engineering in agriculture: Osmoregulation. TIBS. 431-433

Lea, P.J. y Mifflin, B. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614-616

Lea, P.J. (1990). Methods in Plant Biochemistry. Vol 3: Academic Press. London, Microbiol. 5:2417-2426.

Lea, P., Robinson, S. y Steward, R. (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In Intermediary nitrogen metabolism. Edited. B.J. Mifflin y P. Lea. Biochem. Plants. 16: 121-159

Leakey, R.E. (1985). El origen de las especies de Charles Darwin. Martin Casillas Editores, S.A. México.

Lehle, R., Chen, F. y Wendt, K. (1992). Enhancement of NaCl tolerance in *Aribidopsis th.* by exogenous L-asparagine and D-Asparagine. Physiologia Plantarum. 84:223-28

Lerner (1954) citado por Dobzhansky, T. (1975).

Lerner, H. R. y Amazallag, G. N. (1994). The responses of plants to salinity: A working hypothesis. En: Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. J. H. Cherry Editor, Springer-Verlag, Berlin. pp 463-476

Levitt., J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol. II water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, N.Y. pp 1-20-25-95 365-395

Lewin, B. (1977). Gene expression Vol. III plasmids and phages John Wiley and Sons. Inc. New York.

Lewin, B. (1978). Gene expression Vol. I Bacterial genomes. John Wiley and Sons. Inc. New York.

Li, G., Li, L., Liu, Y., Mark, J., Chen, L., y Lee, W. (1991). Thermal response of rat fibroblast stably transfected with the human 70-KDa heat shock protein-encoding gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 1681-1685

Lindquist, S. y Craig, E. (1988). The Heat-Shock Proteins. Ann. Rev. Genet. 22:631-677.

Lone, M., Kueh, J., Wyn Jones, R. y Bright, S. (1987). Influence of Proline and glicinebetaine on salt tolerance of cultured Barley Embryos. J. Exp. Botany. 38: No. 188 479-490

- Loyola-Vargas, V. y Sánchez de Jiménez, E. (1984). Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol*, 76:536-540.
- Ludlow, M.M. y Björkman, O. (1984). Paraheliotropic leaf movement in citrus as protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: damage by excessive light and heat. *Planta*, 161: 505-518
- Ludlow, M. (1989). Strategies of response to water stress structural and functional responses to environmental stresses. Acad. Publ. The Netherlands. Pp 269-281.
- Magasanik, B. (1992). Regulation of Nitrogen utilization En: The Molecular and Cellular Biology of the yeast ***Saccharomyces***. Vol. II. Broach, R., Jones, E. y Pringle, J. Editores., Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 283-317.
- Martilla, S., Suarelainen, R., Porali, I. y Mikkonen A. (1993). Glutamine Synthetase Isoenzymes in Germinating Barley seeds. *Physiologia Plantarum*, 88: 612-18
- Mary-Jane Gething y Sanbrook Joseph (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355: 33-45
- McDonnell, E., y Wyh Jones, R. (1988). Glycine-betaine biosynthesis and accumulation in unstressed and salt-stressed wheat. *J. Exp. Botany*, 201: 421-430
- McMichel, B. y Elmore, C. (1977). Proline accumulation in water stressed cotton leaves. *Crop. Sci.* 17: 905-908
- McNally, S., Hirel, B., Gadal, P., Mann, F. y Stewart, G. (1983). Glutamine synthetases of higher plants. *Plant. Physiol.* 72: 22-25
- Mendoza, I., Pubio, F., Rodríguez-Navarro, A. y Pardo, J. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance in ***Saccharomyces cerevisiae***. *J. Biol. Chem.* 271:8792-8796
- Merus, C., Badra, A., Karssen, C. y Van Loon, L. (1992). Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of ***A. Thaliana***. *Plant Physiol* 98: 1484-1493.
- Meury, J. (1988). Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication y cellular division in ***Escherichia coli***. *Arch. Microbiol.* 149: 232-39
- Mifflin, B. y Lea, P. (1980). Ammonia assimilation en: The Biochemistry of Plants. Vol. 5. Stompf, P.K. y Conn, E. Editores. Academic Press., New York. pp. 169-202.

- Mifflin, B.J., Wallsgrove, R. y Lea, P. 1981. In Current Topics in Cellular Regulation. Vol. 20. Academic Press, New York p.p. 1-43
- Miller, S., Magasanik, B. (1990). Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 172:4927-4935.
- Miranda-Ham, M.L. y Loyola-Vargas, V.M. (1987). **In vitro** effects of PEG and proline on ammonium assimilation enzymes of maize. J. Plant. Physiol. 45: 239-245.
- Morgan, J.M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 35: 299-319.
- Mundy, J. y Chua, N. (1988). ABA and water-stress induce the expression of novel rice gene. EMBO. J. 7: 2279-2286
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses .Plant Cell Environ. 16: 15-24
- Munns, R. y Termaat, A. (1986). Whole plant responses to salinity. Aust. J. Plant. Physiol, 13:143-160
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays whith tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murakami, H., Pain, D., y Blobel G. (1988). 70 KD Heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria J. Cell. Biol. 107: 2051-57
- Oaks A. (1994). Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. Can. J. Bot. 72:739-750.
- O'Neal, D y Joy, K. (1973). Glutamine Synthetase of Pea Leaves. I. Purification, Stabilization and pH optima. Arch. of Biochem and Biophysics 159: 113-122
- Pahlich, E y Koy, K. (1971). Glutamate deshydrogenase from pea roots: purification and properties of the enzyme. Canadian Journal of Biochem Vol. 49: 127-138
- Paleg, L., Stewart, G., Bradbeer, J. (1984). Proline and glicinebetaine influence protein solvation. Plant Physiol, 75: 974-978
- Pandey, R. y Ganapathy, P. (1985). The proline enigma: NaCl-tolerant and NaCl-sensitive callus line of *Cicer arietinom*

- Pelham, H.R. (1989) a. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins. *Cell*. 46:959-961.
- Pelham, H.R. (1989)b. Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *EMBO J.* 8: 3171-3176.
- Pesole, G., Gissi, C., Lanave, C. y Saccone, C. (1995). Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 12(2): 189-197.
- Perry, C., Leigh, R., Tomas, A., Wyse, R. y Itall, J. (1989). The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet. *Planta*. 170:353-61
- Pianka, E.R. (1978). *Evolutionary Ecology*. Ed. Harper Row. New York.
- Poljakoff-Mayber A., Symon, D. Jones, G., Naidu, B. y Paleg, L. (1987). Nitrogenous compatible solutes in native south Australian plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 14:341-350
- Ramagopal, S.(1987). Salinity stress induced tissue specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol*, 84: 324-331
- Rakova, N.M., Klysher, L.K. y Kasymbekov, B.K.(1978). Effects of sodium sulphate and sodium chloride on activity of assimilation in plant roots. *Fiziologia Rosten*. 25: 39-43.
- Rhodes, D., Handa, S. y Bressan, R. (1986). Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant. Physiol.* 82: 890-903
- Riov, N., Poggi, M. y Le Rudolier, D. (1991). Characterization of an osmoregulated periplasmic glycinebetaine-binding protein in *Azospirillum brasilense* sp7. *Biochem.* 73: 1187-1193
- Ritossa, F.M. (1962). A New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. No. 15 XII: 571-573
- Robinson, S., Steward, G. y Phillips, R. (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant. Physiol.* 98: 1190-1195.
- Robertson, M. Y Chandler, P. (1992). Pea dehydrins: identification, characterization and expression. *Plant Mol. Biol.* 19:1031-1044.
- Rodríguez, M. (1978). Manejo y control de plagas de insectos. Control de plagas de animales y plantas. Vol. III. Limusa. México

Rothman, J. (1989). Polypeptide chain binding proteins: catalysis of protein folding and related processes in cells. *Cell* 59: 591-601

Rzedowski y Rzedowski. (1985). La Flora del Valle de México. Vol. II.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Schubert, B. y Tschesche, H. (1978). Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 541: 270-77

Selye, Hans (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*: 138:32.

Serrano, R. y Gaxiola, R. (1994). Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 13 (2): 121-138.

Shinnick, T., Plikatis, B., Hyche, A., Van Landinham, R. y Walkes, L. (1989). The *Mycobacterium tuberculosis* BCG-a protein has homology with the *Escherichia coli* GroES protein. *Nucleic. Acids. Res* 17: 1254-1260.

Simontacchi M., Galatro A. y Puntarulo S. (2001). El estrés oxidativo en las plantas. *Ciencia Hoy.* 10(60):217-27

Singh, T., Paleg, L. y Aspinall, D. (1973). Stress metabolism I. Nitrogen metabolism and growth in barley plant during water stress. *Aus. J. Biol. Sci.* 26:45-56

Singh, N., Bracker, C., Hasegawa, P., Handa, A., Buckel, S., Hermodson, M., Pfankoch, E., Regnier, F. y Bressan, R. (1987a). Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol.* 85:529-536.

Singh, N., LaRosa, P., Handa, A., Hasegawa, P. y Bressan, R. (1987b) Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:739-743.

Skowyra, D., Georgopoulos, C., y Zylicz, M. (1990). The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hidrolisis-dependent manner. *Cell* 62: 939-94

Skriver K, Mundy, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell* 2: 503-512.

Spickett, C., Smirnov, N. y Ratcliffe, G. (1993). An *in vivo* nuclear magnetic resonance investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and *Spartina anglica* roots during exposure to high salt concentrations. *Plant Physiol.* 102: 629-638

Storey, R. y Wyn Jones, R. (1975). Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. *Plant. Sci. Letters* 4: 161-68

Stumpf, D.K. (1984). Quantitation and purification of quaternary ammonium compounds from halophyte tissue. *Plant. Physiol.* 75: 273-274

Tissières, A., Mitchell, H. y Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84 : 389-398

Van Dyk, T., Gatenby, A., y La Rosa, R. (1989). Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature.* 343:451-453.

Varner, J. y Cassab, G. (1986). A new protein in petunia. *Nature* 323:110.

Vázquez-Nin, G., Echevarría, O., Zavala, G., Jiménez-García, L., González, M. y Parra, R., (1986). Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells. *Acta Anatomica.* 126: 141-146

Vázquez-Nin, G., Ortega-Rangel, J., Echevarría, O., Parra, M. y Jiménez-García, L. (1983). Changes in Nuclear Ribonucleoprotein Constituents and Chromatin Disposition During Neuronal Differentiation and Maturation. *Biol. Cell.* 48: 17-24.

Vierling, E. (1991). The roles of the heat-shock protein in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Biol.* 42: 579-620

Viitanen, P.V., Donaldson, G., Lorimer, H. y Gratenby, L. (1991). Complex interactions between the chaperonin 60 molecular chaperone and dihydrofolate reductase. *Biochemistry.* 30: 9716-9723

Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki. (1993). Characterization of the expression of a drought-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 236: 331-340.

Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, D., y Somero, G. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science.* 217: 1214-22

- Young, D., Lathigra, R. Hendrix, R., Sweetser, D. y Young, R., (1988). Stress protein are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4267-4270.
- Young, R., y Elliot, T. (1989). Stress Proteins, Infection, and Immune surveillance. Cell. 59: 5-8.
- Valla, J. (1995). Botánica. Morfología de las Plantas Superiores. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp 58-61.
- Walton, D. (1980). Biochemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 453-489.
- Wei W., Lin Ch., Everson E. y Thomashow M. (1990). Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* and wheat. Plant Physiol. 94: 1078-1083.
- Winniewski, M., Close, T., Artlip, T. y Arora R. (1996). Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. Physiol Plant. 96: 496-505
- Wyn Jones, R.G., Storey, R.A., Leigh, N., Ahmad, y Pollard, A. (1981). Betaines. En: Physiology and Biochemistry of drought resistance in plants. L.G. Paleg and D. Aspinall (Eds). Academic Press. Sydney. p.p. 171-208.
- Zavaleta, E., Oropeza, A. Jiménez, B., Salermo, G., Creopi, M. y Herrera-Estrella. (1992). Isolation and characterization of genes encoding cheperonin 66 β from *Arabidopsis thaliana*. Gene. 111: 175-81
- Zeilstra-Ryalls. J., Faget, O., y Gergopoulos, C. (1991). The universally conserved GroEL (Hsp60) Chaperonins. Ann. Rev. Microbiol. 45: 301-325
- Zimmermann, W. (1976). Evolución Vegetal. Ed. Omega. Barcelona.