

11
2 Gen



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE GRADUACION
FACULTAD DE QUIMICA

GLUTAMATO SINTASA, UNA ENZIMA
FUNDAMENTAL EN
CANAVALIA ENSIFORMIS L.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Juan Bautista Caldera Noriega



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGS.
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
I ANTECEDENTES	7
II MATERIALES Y METODOS	30
III RESULTADOS Y DISCUSION	58
IV CONCLUSIONES	86
V BIBLIOGRAFIA	89

ABREVIATURAS

α -A. ACIDOS	α -aminoácidos.
α -K- ACIDOS	α -cetoácidos.
α -KG	α -cetoglutarato.
ADP	Difosfato de adenosina.
AMP	Monofosfato de adenosina.
AOA	Acido oxalacético.
ASN	Asparagina.
ASP	Acido aspártico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
C	Cotiledón.
Fd	Ferredoxina.
GLN	Glutamina.
GLU	Acido glutámico.
H	Hoja.
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado.
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido.
NADP ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado.
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido.
PPi	Pirofosfato inorgánico.
R	Raíz.
rp	recièn preparado.
T	Tallo.
TA	Transaminasa.

I N T R O D U C C I O N

Canavalia ensiformis L. también conocida como "Jack Bean", "Gotani Bean" o "Horse Bean", es una planta relativamente resistente a la sequía y más resistente a las malezas y a la salinidad que muchas otras leguminosas. Se desarrolla bien con una precipitación pluvial de 9-12 dm por año y a una temperatura de 15-30°C. Una vez establecida, resiste altas condiciones de sequedad debido a su profundo sistema radicular. El tipo de suelo óptimo para su crecimiento debe tener un pH entre 5 y 6 aunque también puede crecer en una amplia variedad de suelos.

La cosecha es atacada por pocas plagas, entre ellas: el gusano Spodoptera frugiperda y el gorgojo de las vainas, Sternechus tuberculatus. Las semillas son más bien resistentes a la infestación durante el almacenamiento. La enfermedad fungal más seria es causada por Colletotrichum lindemuthianum (23).

Canavalia ensiformis se cultiva ampliamente en algunas regiones tropicales, principalmente como abono verde y como cubierta protectora para suelos. Con estos fines se cultiva entre hileras de caña de azúcar, café, tabaco, caucho, sisal, cacao, palma de coco, cítricos y piña.

En Indonesia, las hojas y las flores jóvenes son estimadas como condimento, mientras que las semillas pueden consumirse después de un largo tratamiento: se hierven dos veces en agua, se descascaran y se dejan reposar dos días en agua, se fermentan durante tres o cuatro días más y finalmente se cuecen antes de consumirlas (23).

La taxonomía aceptada actualmente para esta leguminosa es la siguiente:

Reino:	Plantae	}	Según Cronquis, 1981 (16).
División:	Magnoliophyta		
Clase:	Magnoliópsida		
Subclase:	Rosidae		
Orden:	Rosales		Según Cronquis, 1968 (17).
Familia:	Leguminosae	}	Según Lackey, 1981 (35).
Subfamilia:	Papilionoideae		
Tribu:	Phaseoleae		
Subtribu:	Diocleinae		
Género:	Canavalia		
Especie:	Canavalia ensiformis		

En nuestro país, Canavalia ensiformis probablemente no es una planta nueva: en el estado de Yucatán fueron encontrados restos de semillas con una antigüedad de 2 200 años, en Dzibidzaltun, a 10 Km al norte de Mérida. Hay evidencias que sugieren que estos restos de semillas son de Canavalia ensifor

mis (80).

El alto rendimiento proteico que se obtiene con C. ensiformis (31.5 g proteína/100 g Vs 26.1 g proteína/100 g en Phaseo-seolus vulgaris) así como la facilidad con que se desarrolla en terrenos pobres (33) convierten a esta planta en una importante fuente potencial de alimento para animales de interés económico, particularmente en la zona norte de la península de Yucatán, adonde se observa un buen incremento en la producción ganadera, avícola y porcina. El tamaño grande de las semillas de C. ensiformis, así como su buena germinación, la hacen apropiada para las siembras manuales en los suelos rocosos de la zona. Las vainas son grandes y fáciles de cosechar manualmente.

El interés actual se centra en la perspectiva de utilizar la semilla de C. ensiformis en raciones para aves y cerdos. También podría ser utilizada para la alimentación de rumiantes ya que produce cantidades impresionantes de forraje.

Las plantas obtenidas de las semillas llevadas de Venezuela a Yucatán en 1980 tuvieron un crecimiento muy vigoroso. En el año de 1981, una siembra grande produjo 1 800 Kg/ha de semillas secas. Esta producción puede compararse con las producciones de 1000 y 400 Kg/ha de maíz y frijol respectivamente, bajo condiciones similares (33).

Este trabajo forma parte de un esfuerzo multidisciplinario entre el Departamento de Bioquímica Vegetal de la Fac. de Química de la UNAM y el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) cuyos objetivos son evaluar las perspectivas agronómicas y de utilización del grano en nuestro país, concretamente en Yucatán, eliminar los componentes tóxicos que como toda leguminosa contiene y algunos que son

inherentes al metabolismo nitrogenado particular de esta planta.

El objetivo general de este trabajo es iniciar y complementar investigación básica tendiente a comprender la regulación del metabolismo de los análogos tóxicos de aminoácidos, particularmente de la L-canavanina, presentes en C. ensiformis en los cuatro tejidos principales de la planta (cotiledones, hojas, tallo y raíz) durante los siete primeros días de su desarrollo.

El objetivo particular se detalla a continuación:

A. Metabolismo del nitrógeno en *Canavalia ensiformis* L.:

A.1. Catabolismo.

A.1.1. Obtener las curvas de crecimiento de la planta durante sus primeros siete días de germinación y determinar la ontogenia de las siguientes enzimas:

-Asparagino Sintetas, AS

-Glutamato Sintasa, GOGAT

para cada tiempo y cada tejido, así como la importancia que cada una presenta dentro de las vías respectivas de asimilación del amonio.

A.2. Cuantificar las pozas metabólicas, en el mismo período y en los cuatro tejidos mencionados, de:

-Amonio

-Urea

-Nitratos

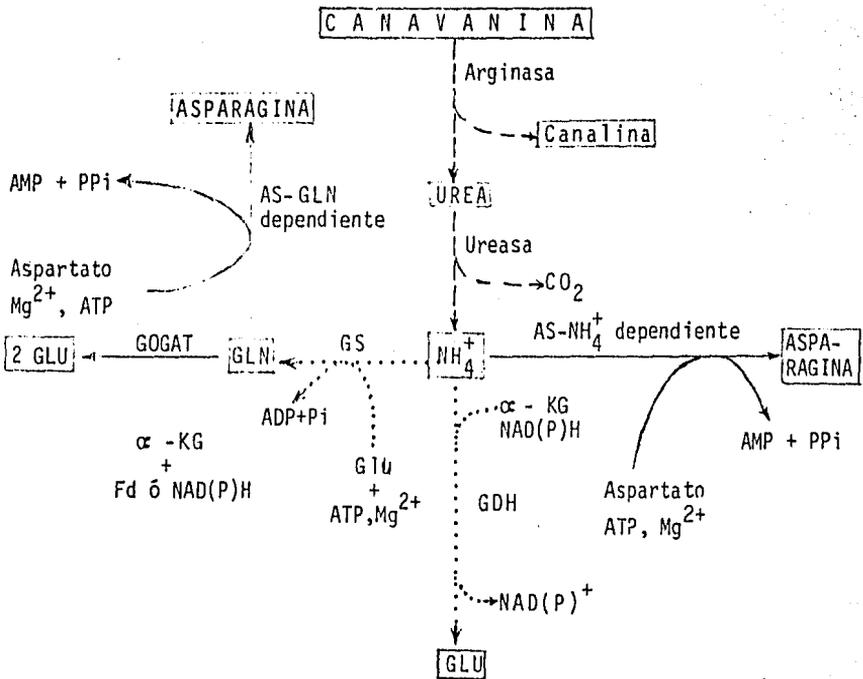
-Nitritos

-Aminoácidos

-Proteína total.

MODELO PROPUESTO POR YAÑEZ, A. (101)[®], ROMAN, M.E. (72)[®]
Y CALDERA, J.B.*

- ® Línea punteada
- ® Línea segmentada
- * Línea continua



C A P I T U L O I

A N T E C E D E N T E S

1.1. ASPECTOS GENERALES

La productividad de una planta es un conjunto de características interconectadas. Una de éstas es la capacidad asimilatoria del nitrógeno, lo cual no significa solamente la toma del nitrógeno del suelo, sino también su transporte y transformación siendo esta última el conjunto de reacciones bioquímicas moleculares que llevan a la conversión del nitrógeno inorgánico en nitrógeno orgánico.

El nitrógeno es uno de los elementos más inertes y para poder reaccionar con otros elementos o compuestos requiere temperaturas y presiones muy elevadas. Sin embargo, algunos microorganismos llevan a cabo estas transformaciones a temperaturas y presiones atmosféricas en las que existen los seres vivos,

usando energía proveniente de las plantas, o la generada por sí mismos. El nitrógeno atmosférico es convertido de esta manera en nitrógeno inorgánico reducido (amonio), el cual puede ser oxidado por la flora del suelo hasta nitrato (43). Esta es la forma de nitrógeno más favorable para ser asimilado por las plantas. Sin embargo, los nitratos no pueden ser directamente incorporados a las moléculas orgánicas de las plantas, deben ser convertidos nuevamente a amonio.

La incorporación del ión amonio en los compuestos orgánicos constituye una de las etapas cruciales del metabolismo vegetal porque ella condiciona la biosíntesis ulterior de las sustancias nitrogenadas indispensables para el funcionamiento celular. A consecuencia de los resultados de Sim y Folkes (81) obtenidos después de suministrar amonio a Candida utilis, el papel central de la asimilación del amonio se atribuyó durante largo tiempo a la glutamato deshidrogenasa (L-glutamato : NAD^+ oxidoreductasa, EC 1.4.1.2, GDH). Sin embargo, después de los trabajos de Elliot (24), se dijo igualmente que la glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio ligasa (ADP), EC 6.3.1.2, GS) podía utilizar muy eficazmente al ión amonio.

La evidencia aportada en 1970 por Tempest (93) acerca de la existencia de la glutamato sintasa (GOGAT), enzima que cataliza la formación del ácido glutámico a partir de la glutamina y del 2-oxoglutarato, permite conectar directamente a la glutami

na al metabolismo intermediario. Además, el par enzimático GS-GOGAT constituye un sistema muy eficaz para la incorporación del amonio en los compuestos orgánicos y a la fecha se le atribuye un papel superior al de la GDH en la formación del ácido glutámico en los vegetales (56).

1.2. GLUTAMATO SINTASA. IMPORTANCIA EN EL METABOLISMO NITROGENADO Y CARACTERISTICAS ENZIMATICAS.

En 1970, Tempest et al. (93) reportaron una nueva enzima en preparaciones de A. aerogenes. Dicha bacteria, en condiciones de concentración de amonio limitadas sintetiza glutamato en un proceso de dos etapas que involucra primero la síntesis de glutamina y luego la transferencia reductiva del grupo amido a la posición C-2 del 2-oxoglutarato formando así dos moléculas de glutamato. Es en este último paso donde interviene la enzima descubierta. El nombre original dado a esta enzima fue L-glutamina (amida): 2-oxoglutarato aminotransferasa (NADP⁺ oxidoreductasa) y del cual se deriva el acrónimo GOGAT.

La enzima ha recibido también el nombre trivial de glutamato sintasa. La reacción catalizada por dicha enzima es:



La enzima de A. aerogenes mostró una especificidad absoluta por NADPH como donador de los electrones. Poco después su presencia fue demostrada en levaduras (11) y en bacterias fijadoras de nitrógeno así como en los bacteroides de las plantas

superiores noduladas (58, 82).

Desde entonces, la ruta de asimilación del amonio y su regulación han sido reconsideradas en todos los organismos vivos y particularmente en las plantas.

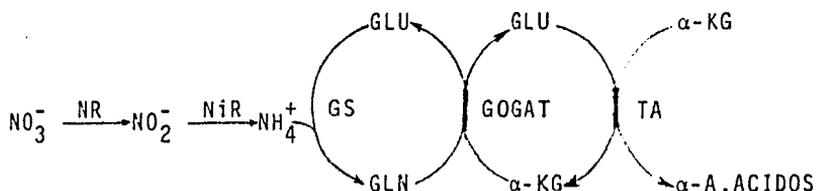
En 1974, Lea y Mifflin sugirieron que la GDH no era la principal enzima responsable de la incorporación del nitrógeno en el grupo α - amino de los aminoácidos (37). En el caso de las hojas de las plantas superiores ya se había acumulado evidencia considerable de que los cloroplastos son el sitio principal de la producción de nitrógeno α - amino (4, 27, 53) pero aunque los cloroplastos contienen GDH, el nivel de actividad encontrado era bajo, así como una alta K_m de la enzima para amonio, mayor de hecho que la concentración de amonio requerida para desacoplar la fotofosforilación. Los cloroplastos contienen también GS, la cual posee una K_m menor para amonio y una actividad mucho mayor (29, 54, 62).

Si la glutamina producida de esta manera era una forma intermedia de almacenar nitrógeno, debía entonces existir alguna forma de transferir el grupo amido de la glutamina al grupo amino del glutamato. La enzima capaz de hacer esto es la glutamato sintasa (L-glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferasa (NADPH oxidante) EC 1.4.1.14).

La evidencia presentada por Lea y Mifflin en 1974 (37), demuestra que, efectivamente, los cloroplastos pueden desarrollar una síntesis de glutamato dependiente de la luz y que los extractos de cloroplastos contienen una glutamato sintasa - - (EC 1.4.7.1) que utiliza ferredoxina en lugar de piridín nucleótidos (NADPH ó NADH) como donador de los electrones.

La demostración de la presencia de una glutamato sintasa dependiente de ferredoxina en los cloroplastos completa una cade-

na de reacciones para la incorporación del nitrato en nitrógeno α - amino:



La hoja normalmente recibe su nitrógeno inorgánico en la forma de nitrato. Este nitrato es metabolizado a través de la nitrato reductasa (NADH: nitrato oxirreductasa, EC 1.6.6.1, NR) y la nitrato reductasa (NAD(P)H: oxidoreductasa, EC 1.6.6.4, NiR) a amonio. Ambas reacciones son fuertemente estimuladas por la luz. La nitrito reductasa está localizada en los cloroplastos y la presencia de la glutamino sintetasa, con una Km baja para amonio asegura que el amoníaco formado pueda incorporarse sin rebasar los niveles en que desacoplaría la función fotosintética de los cloroplastos.

Rhodes y Rendon (68) en 1976 encontraron en Lemma minor una glutamato sintasa dependiente de Fd. Esta enzima es específica para la glutamina como donador del nitrógeno y para 2 - oxoglutarato como el aceptor del nitrógeno. Sus estudios con esta planta acuática muestran que cuando aumenta la disponibilidad del amonio ocurre un incremento en la relación actividad de GDH/ actividad de GS, lo cual sugiere fuertemente que hay un cambio de la asimilación via la ruta de síntesis de glutamina seguida de la síntesis de glutamato a la asimilación por entrada directa a glutamato.

Mifflin y Lea (55) reportaron que los sistemas de glutamato sintasa en hoja y raíz de chícharo pueden utilizar tanto Fd como metil viológeno reducidos como donadores de electrones. Adicionalmente, la enzima de raíz podía utilizar nucleótidos de nicotinamida reducidos obteniendo además una mayor actividad con NADH que con NADPH. También encontraron que las enzimas de hoja de raíz son específicas para glutamina y 2-oxo-glutarato.

Beevers y Storey, (5) demostraron en cotiledones de chícharo en desarrollo (Pisum sativum) la presencia de una glutamato sintasa que es específica para glutamina como donador amido. La actividad de esta enzima es mayor con NADH que con NADPH como donador de electrones.

Fowler et al. (26) y Dougal (22) sugirieron que la actividad con NADH y NADPH representa una falta de especificidad. La otra posibilidad es que la actividad de una fosfatasa de piridín nucleótido pueda estar convirtiendo NADPH a NADH (25, -100) el cual puede ser el donador de electrones preferido. En cotiledones de chícharo en desarrollo la menor eficiencia del NADPH en apoyar la actividad de la glutamato sintasa está en favor de la última alternativa (5). Por otra parte, en 1978, Storey y Reporter (88) obtuvieron evidencia que indicaba que la actividad enzimática con NADPH era un artefacto del ensayo in vitro, debiéndose a la presencia de una actividad de fosfatasa de piridín nucleótido.

Resultados más recientes con preparaciones altamente purificadas indican que el NADH es el único donador de electrones fisiológico en nódulos de Lupinus luteus (9) y posiblemente en células de soya cultivadas (19).

La glutamato sintasa purificada de coleoptilos etiolados de chícharo puede aceptar electrones de NADH y MV reducido para

la reacción enzimática pero no puede usar NADPH ó Fd reducida (46). Por el contrario, Meers et al. (51) indicaron que la actividad de la glutamato sintasa en varias especies bacterianas es NADPH-específica.

El papel asignado a la glutamato sintasa va más allá de la simple asimilación del nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico. Sodek y Da Silva (83) sugirieron que la glutamato sintasa juega un papel clave en la asimilación de nitrógeno en el endospermo de maíz ya que provee de un medio a través del cual el nitrógeno transportado en forma de glutamina se vuelve disponible para la síntesis de otros aminoácidos que se utilizan en la síntesis posterior de la proteína de reserva de la semilla o cotiledones. El origen de los aminoácidos utilizados en la síntesis de dichas proteínas de reserva (globulinas) se ha vuelto objeto de interés creciente en años recientes. El balance de aminoácidos en la corriente translocatoria que abastece a la semilla en formación es muy diferente de la composición de aminoácidos de las proteínas de reserva, siendo asparagina y glutamina los principales compuestos de nitrógeno que entran en las semillas (2, 40, 63). Estudios con ^{15}N (2, 41) han demostrado que el nitrógeno amido de estos aminoácidos es rápidamente transferido al grupo amino de otros aminoácidos. Esto sugiere un papel importante para la biosíntesis de aminoácidos en las semillas en desarrollo. Trabajos con ^{14}N han establecido que las rutas de biosíntesis de los aminoácidos proteicos están operando en semillas en desarrollo (7, 64, 84).

Surge la pregunta de cómo el nitrógeno amido se vuelve disponible para la biosíntesis de los aminoácidos. En el caso de la glutamina, Lewis (40) ha sugerido que la ruta de la glutamato sintasa es clave para este esquema pues al transferir al 2-oxoglutarato el grupo amido de la glutamina se forma glutamato el cual a su vez puede proveer los grupos amino pa-

ra la biosíntesis de otros aminoácidos vía las reacciones de las transaminasas. En el caso de cotiledones de chícharo en desarrollo, Storey y Beevers encontraron actividad de una GOGAT dependiente de piridín nucleótido con mayor actividad con NADH que con NADPH y que dicha actividad era suficiente para explicar el metabolismo de todo el nitrógeno acumulado en las proteínas de la semilla (87).

En 1978, Storey y Reporter (88), al estudiar la glutamato sintasa de cotiledones de soya en desarrollo encontraron que la formación de glutamato a partir de glutamina podía utilizar tanto piridín nucleótido como Fd como donador de electrones. También sugirieron que la GOGAT de los cotiledones de las leguminosas debe ser reconocida por su importancia para sostener la biosíntesis in situ de los aminoácidos requeridos para la asimilación del nitrógeno y la acumulación de proteínas de reserva en la semilla en formación.

Wallsgrave, (97) aisló y purificó 170 veces la GOGAT de Vicia faba y encontró que era dependiente de Fd, con un peso molecular de 145,000, con especificidad respecto de sus sustratos y la reacción era inhibida fuertemente por la azaserina, un análogo de la glutamina.

Arima (1), estudió la GOGAT en extractos de raíz de arroz. Esta enzima resultó ser dependiente de Fd y no podía utilizar al NAD(P)H como donador de electrones. Estos datos concuerdan con lo observado en los cloroplastos de las plantas superiores (37,97) y en las algas verdes (38,68) pero es diferente de la GOGAT de la raíz de chícharo (55) y de la de cultivos de células de zanahoria (22).

Hasta 1979 se había acumulado una gran cantidad de información acerca de las funciones de la enzima. Sin embargo, la labilidad de la enzima ha sido una característica que hace su pu

rificación más bien difícil (9,88) por lo que a excepción de la GOGAT de Vicia faba no se había obtenido una preparación altamente purificada que proporcionara datos acerca de las propiedades de la enzima.

En 1979, (48) Matoh purificó la enzima de cotiledones de chícharo en desarrollo para determinar si la enzima podía utilizar NADH y/o Fd ó si dos enzimas estaban presentes, una que utilizara NADH y la otra Fd. Matoh sometió una porción del extracto enzimático a filtración en gel usando una columna de Sephadex G-200. En cada fracción se realizó el ensayo con NADH y con Fd. Las actividades dependientes de NADH (GOGAT I) y la dependiente de Fd (GOGAT II) aparecieron como dos picos distintos. Los pesos moleculares estimados fueron 220,000 para la GOGAT I y 155,000 para la GOGAT II. Se observaron diferentes conductas con diversos inhibidores tanto para la GOGAT I como para la GOGAT II. Los derivados de acridina que inhiben a las flavoenzimas (98) inhibieron a una concentración de 1 mM únicamente a la actividad de la GOGAT I de un 10 a un 30%. Ambas enzimas fueron inhibidas en mayor proporción por la azaserina (90% de inhibición).

El peso molecular de 155,000 estimado para la GOGAT II de cotiledones de chícharo en desarrollo es comparable a los encontrados para las enzimas de hojas de Vicia faba (145,000), (97) y hojas de maíz (160,000) (47). El peso molecular de la GOGAT-NADH de las plantas superiores no ha sido reportado por otros autores. Sin embargo, el peso molecular de 220,000 estimado para la GOGAT I determinada por Matoh es cercano al de la glutamato sintasa-NADH de A. aerogenes (95).

Ann Oaks et al. (60) estudiaron una glutamato sintasa dependiente de NAD(P)H en endospermo y raíz de maíz y encontra-

ron que con el KCl se obtenía la máxima actividad en cada tejido. También encontraron que los cationes divalentes tales como el Mg^{+2} o el Mn^{+2} activan a la enzima. Matoh et al., en 1980, encontraron que el ión amonio y el ión fosfato estimulan significativamente la reacción.

La glutamato sintasa bacteriana es afectada por varias sales e inhibida considerablemente por $CoCl_2$, $CdCl_2$ y $NiCl_2$ (57). Efectos similares se han encontrado para la GOGAT-Fd de cloroplastos de plantas superiores estudiada por Wallgrove et al. (97) siendo el $NiCl_2$ el inhibidor más efectivo.

Matoh et al. al estudiar en 1980 la GOGAT-NADH de coleoptilos etiolados de chícharo (Pisum sativum), purificada 1400 veces, encontraron evidencia que sugiere que la GOGAT-NADH de plantas superiores es una flavoproteína como es el caso de la enzima bacteriana (95) y que el mayor peso molecular respecto a la GOGAT-Fd refleja la presencia de un(os) componente(s) adicional(es) que media(n) el flujo de electrones entre el piridín nucleótido y la proteína catalítica, (46).

Hasta ahora, el significado de la presencia de una GOGAT específica para Fd en tejidos no verdes tales como células cultivadas, raíces y cotiledones no se encuentra clara por la ausencia de ferredoxina en estos tejidos.

Matoh y Takahashi (45) han hecho investigaciones recientes al respecto y sus datos, obtenidos con cotiledones de chícharo en desarrollo, indican que la glutamato sintasa-NADH predomina en hojas inmaduras.

Durante la maduración, su actividad decrece y la actividad dependiente de Fd se incrementa. Sus experimentos indican que los cloroplastos inmaduros favorecen una conversión indepen-

diente de la luz de glutamina a glutamato mediante la GOGAT-NADH. Por otro lado, tanto en raíces, como en coleoptilos etiolados de chícharo la GOGAT-NADH es la más importante en el metabolismo del nitrógeno durante las primeras etapas del crecimiento, mientras que la enzima dependiente de Fd es la que predomina durante la maduración.

1.3. ASPARAGINO SINTETASA. IMPORTANCIA Y CARACTERISTICAS.

A la fecha, se tiene bien establecido que en leguminosas en germinación hay formación de amonio mediante la desaminación oxidativa de los aminoácidos liberados por proteólisis (18), sin embargo, el método preciso de formación del amonio permanece en duda. La arginina (o canavanina en el caso de Jack Bean) puede ser hidrolizada por la acción de la arginasa y de la ureasa en la mitocondria de los cotiledones de Vicia faba para dar amonio (34).

Una revisión de la literatura (36) sugiere que la síntesis de asparagina tiene lugar cuando la planta se enfrenta a un exceso de amonio más que de nitrato. El amonio puede provenir de a) fertilizantes aplicados externamente, b) del nitrógeno fijado por los nódulos de las raíces, c) desaminación de aminoácidos provenientes de una proteólisis directa e, g., en semillas en germinación u hojas senescentes d) desaminación de aminoácidos acumulados bajo condiciones de síntesis

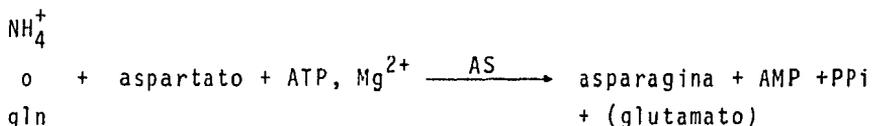
de proteínas reducida. El amonio puede ser extremadamente tóxico ya que desacopla la fotofosforilación en cloroplastos (3) y reduce la síntesis de proteínas (65) y de almidones (49).

En el caso de que glutamato esté disponible, el amonio puede ser incorporado en glutamina mediante la acción de la GS.

Las amidas glutamina y asparagina son los principales componentes presentes en el exudado del xilema de muchas leguminosas (39) y se piensa que son el medio preferente por el cual el nitrógeno es transportado desde las raíces hasta las hojas. La síntesis de glutamina ya ha sido bien caracterizada en plantas (86). El mecanismo de formación de la asparagina por la acción de la asparagina sintetasa (L-aspartato: L-glutamina amido ligasa (formadora de AMP), EC 6.3.5.4., AS) es menos claro hasta ahora.

Por otra parte, la glutamina es un metabolito extremadamente activo, que dona su nitrógeno amido a un gran número de sustratos (12). La presencia de altas concentraciones de glutamina puede por tanto alterar el metabolismo celular y por esto se requiere de un compuesto relativamente inerte, capaz de almacenar nitrógeno económicamente. La asparagina llena estas características y se forma en una reacción que

utiliza aspartato como aceptor de nitrógeno y amonio o el grupo amido de glutamina como el donador de nitrógeno.



Webster y Varner (99), empleando un sistema de ensayo basado en altas concentraciones de aspartato e hidroxilamina, sugirieron que la asparagina era sintetizada a partir de aspartato y amonio mediante una reacción dependiente de ATP en plantas superiores.

Lea y Fowden (36) encontraron en Lupinus albus una AS dependiente de glutamina, cuya actividad se incrementa rápidamente después del primer día de germinación, pero aparentemente dicha actividad no llega a ser superior al 20% de la actividad de la GS presente y que se encuentra en todas las etapas de la germinación a niveles suficientes para asimilar el amonio disponible.

Rognes (69) y Streeter (89), estudiando la AS de Lupinus luteus y de soya respectivamente, determinaron que utilizaban preferentemente a la glutamina como el donador del nitrógeno y encontraron que son inestables y que sólo es posible una purificación parcial si se efectúa en presencia de glicerol y mercaptoetanol. Si se continúa la purificación usando

fraccionamiento con acetona o cromatografía en DEAE-celulosa la actividad se pierde por completo.

O'Neal y Joy, en 1974 (61) encontraron que la reacción de la AS no es similar a la de la GS como sugeriría McKee (50), ya que la GS tiene una afinidad muy alta por amonio y libera ADP y Pi a partir de ATP mientras que la AS rompe la molécula de ATP a AMP y PPi y tiene una Km para amonio bastante mayor.

Rognes (69), Streeter (89) y Lea y Fowden (36) reportaron la localización de la enzima en el citosol. La acumulación de altas concentraciones de asparagina sugiere que es almacenada en un sitio diferente de aquel en donde se sintetiza ya que el producto de la reacción, asparagina, inhibe su propia formación (36). Probablemente se almacena en vacuola y la síntesis ocurre afuera del tonoplasto o membrana vacuolar, y la asparagina formada es rápidamente transportada a vacuola.

Rognes en 1975 encontró en la AS purificada de Lupinus luteus (71) una actividad de glutaminasa (EC 3.4.1.2) que permaneció sin alteración después de todos los pasos de purificación. Streeter (89) en semillas en desarrollo de soya y Horowitz y Meister (30) en células tumorales de ratón habían reportado también una actividad de glutaminasa asociada a la AS. Por analogía con varias otras N-transferasas ligadas a

la glutamina es muy probable que la actividad de glutaminasa represente una reacción parcial del proceso total, posiblemente localizada en una subunidad especial de la estructura enzimática.

Las enzimas estudiadas por Streeter (89) y Rognes (71) - presentaron varias propiedades generales en común: estabilidad, requerimientos de tiol, mayores K_m para amonio (3.1 y 2.56 mM respectivamente) que para glutamina (0.12 y 0.16 mM respectivamente) y como puede verse no hubo gran diferencia entre los valores de dichas K_m .

La azaserina y la albizina son fuertes inhibidores de la AS lo cual es evidencia de que la reacción en una transferencia clásica del nitrógeno amido de la glutamina a una molécula aceptora (12).

Lea y Fowden reportaron en 1975 (36) que la AS de Lupinus albus no requiere de iones Cl^- . Rognes en 1980 (70) encontró que los iones F^- y I^- son activadores de la AS de Lupinus luteus así como los iones NO_3^- y CN^- . Horowitz y Meis-ter (30) reportaron un 10% de incremento en la actividad de la AS de células de ratón al añadir Cl^- .

Rognes (71) purificó la AS de cotiledón de Lupinus luteus 500 veces. La enzima era lábil y requería protección con al-

tos niveles de tioles y glicerol y encontró que los sustratos también la estabilizan. Esta enzima puede utilizar tanto NH_4Cl como glutamina. Una concentración de NH_4Cl de 10 a 20 veces más alta que las usadas para glutamina podía reemplazar a la glutamina en la formación de iguales concentraciones de asparagina. La $V_{\text{máx}}$ con NH_4Cl como donador de nitrógeno fue de un 30% la $V_{\text{máx}}$ obtenida con glutamina a pH de 7.8. La relación de las actividades dependientes de amonio y de glutamina no cambió apreciablemente durante la purificación. Cuando la NH_2OH reemplazaba a la glutamina el producto identificado era el β -aspartil hidroxamato. La formación del hidroxamato requería de aspartato, ATP y Mg^{2+} .

En los sistemas de mamíferos (30) se ha encontrado que la glutamina puede ser reemplazada por amonio como donador del nitrógeno. En bacterias, el amonio es la fuente primaria de nitrógeno para la reacción (14).

En 1979, Stulen y Oaks aislaron y estudiaron la AS de raíz de maíz (Zea mays), (91). Sus resultados indican que las actividades de la AS dependiente de glutamina y dependiente de amonio se encuentran en la misma proteína y que a diferencia de la enzima de cotiledones de leguminosas, la enzima de raíz es sólo un poco más eficiente con glutamina que con amonio.

Excepto para la enzima de semillas en desarrollo de Lupi-

nus (36,69,70,71), la AS ha sido caracterizado pobremente para sistemas de plantas. Esto es parcialmente atribuible a la inestabilidad de la enzima (67,69) y a la falta de un ensayo rápido adecuado.

A la fecha hay suficiente evidencia presentada en favor de un intermediario, el aspartil adenilato, en la reacción catalizada por la AS dependiente de amonio obtenida de E. coli. Esta enzima cataliza una reacción aspartato-dependiente en la cual hay un intercambio $ATP \longrightarrow PPi$ y un intercambio de ^{18}O de aspartato a AMP (14,52,67).

Los compuestos que actúan como inhibidores de la AS se han dividido en dos grupos (67): los análogos de glutamina y los análogos del aspartil adenilato o aspartil β -fosfato.

De los análogos de glutamina, la inhibición más fuerte es producida por la albizina. El mecanismo de inhibición no ha sido determinado aún pero se sabe que es competitivo con respecto a la glutamina. Por otra parte, la K_i que se obtiene para albizina es sólo ligeramente más alta que la determinada para la glutamina (32,69,89).

De los análogos del aspartil β -fosfato y del aspartil adenilato el inhibidor más potente es el ácido L-2-amino-4-oxo-5(5'-adenosil) fosfonopentanoico el cual tiene las siguientes características que pueden contribuir a la afinidad por la en

zima: a) un componente α -aminoácido, b) un componente fosfato monoaniónico y c) una porción de adenosina.

Pike y Beevers han reportado (67) datos que apoyan los resultados de Rognes (71) obtenidos en Lupinus luteus y que indican que la cinética de la AS dependiente de glutamina es de tipo ping-pong. Sin embargo, Pike y Beevers sugieren que debe efectuarse una investigación adicional al respecto.

1.4. LA PLANTA, CARACTERISTICAS GENERALES Y SU TOXICIDAD

Se ha observado que la harina de C. ensiformis causa hemorragia de la mucosa del estómago en ratas pero cuando se mezcla con harina de trigo hasta un 30 % se vuelve aparentemente inocua (23). Como sabemos, en general las leguminosas contienen compuestos tóxicos diversos: alcaloides, análogos de aminoácidos, compuestos cianogénicos, isoflavonas, inhibidores de proteasas, fitohemaglutininas, saponinas, taninos y compuestos derivados del selenio

La semilla de Canavalia ensiformis posee dos grupos principales de toxinas: proteínas y análogos de aminoácidos. Entre las proteínas se encuentran a) las lectinas v.gr. la conavalina A, cuya capacidad para asociarse con la membrana celular es lo que determina su toxicidad, b) conatoxina, la

cual mediante un mecanismo hasta la fecha no elucidado, actúa preferencialmente sobre el sistema nervioso central provocando hipotermia, ataxia y convulsiones (13), y c) inhibidores de las enzimas digestivas v.gr. inhibidores de la tripsina y de la quimotripsina (92).

Con respecto a los aminoácidos no proteicos, en C. ensiformis se encuentran la canavanina y la canalina. La L-canavanina se encuentra en un gran número de leguminosas (6,8). Actúa como un potente metabolito, debido a su analogía estructural con la L-arginina.

Los mecanismos mediante los cuales la L-canavanina puede alterar o modificar el metabolismo de la L-arginina son:

a) La canavanina es activada por la arginil ARN_t sintetasa e incorporada a las proteínas en lugar de la arginina; debido a su diferente punto isoeléctrico, la canavanina cambia las propiedades estructurales y funcionales de las enzimas a las que es incorporada (77).

b) Reprime a las enzimas involucradas en la biosíntesis de la arginina y por tanto disminuye la disponibilidad de ésta.

c) Compite por receptores específicos de arginina e inhibe su incorporación y transporte.

d) Compite con la arginina en las reacciones en que ésta actúa como sustrato.

La ruptura enzimática de la canavanina da origen a la L-canalina y a la urea. La L-canalina es un análogo de la ornitina que inhibe fuertemente a las enzimas dependientes de fosfato de piridoxal (vit. B₆) como las transaminasas.

La canavanina es sintetizada por un ciclo de reacciones análogo al ciclo de Krebs-Henseleit para la producción de urea (75,94). En Canavalia ensiformis se han encontrado todas las enzimas del ciclo de reacciones mencionado: la canalina carbamil transferasa (EC 2.1.3.3.) (21,74); la argininosuccinato sintetasa (EC 6.3.4.5.) (74) y la ácido argininosuccinato liasa (EC 4.3.2.1) (78,96); la enzima que reutilizaría a la canalina para sintetizar canavanina no ha podido ser determinada (75), si bien la reacción se lleva a cabo in vivo. Ver figura 1.1.

En la semilla de C. ensiformis, la canavanina constituye un 95% o más del nitrógeno encontrado en los aminoácidos libres (76). Por otra parte, la concentración de la canavanina disminuye rápidamente durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo. Lo anterior apoya fuertemente la hipótesis de que este aminoácido es una fuente, tal vez metabólicamente más eficiente, de reserva de nitrógeno en la semilla. Su movilización y utilización ocurre vía arginasa (EC 3.5.3.1) la cual hidroliza a la canavanina a L-canalina y urea (20). La urea es hidrolizada por la ureasa (EC 3.5.1.5)

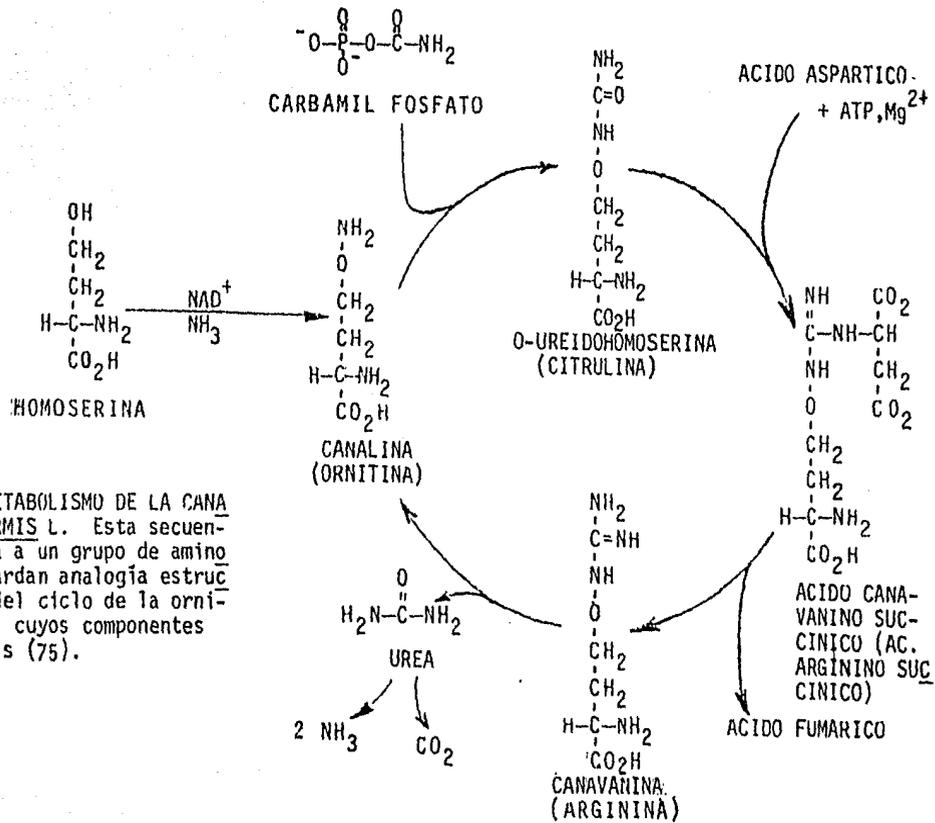


FIG. 1.1 REACCIONES DEL METABOLISMO DE LA CANAVANINA EN CANAVALLIA ENSIFORMIS L. Esta secuencia de reacciones involucra a un grupo de aminoácidos no proteicos que guardan analogía estructural con los componentes del ciclo de la ornitina-urea (Krebs-Henseleit) cuyos componentes se muestran entre parentesis (75).

a CO_2 y amonio. El amonio resultante es una fuente importante de nitrógeno reducido pero que además es tóxico para la planta por lo que debe ser asimilado rápidamente, para lo cual se conocen tres vías enzimáticas diferentes: (véase la fig. 1.2);

a) La vía de la deshidrogenasa glutámica, GDH, (EC 1.4.1.2).

b) La vía glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2)/glutamato sintasa -Fd ó glutamato sintasa-NAD(P)H, (EC 1.4.7.1) ó (EC 1.4.1.14) respectivamente denominada vía GS/GOGAT; y

c) La vía de la asparagino sintetasa (EC 6.3.5.4), AS, la cual puede utilizar amonio o glutamina como donador del nitrógeno para la síntesis de asparagina.

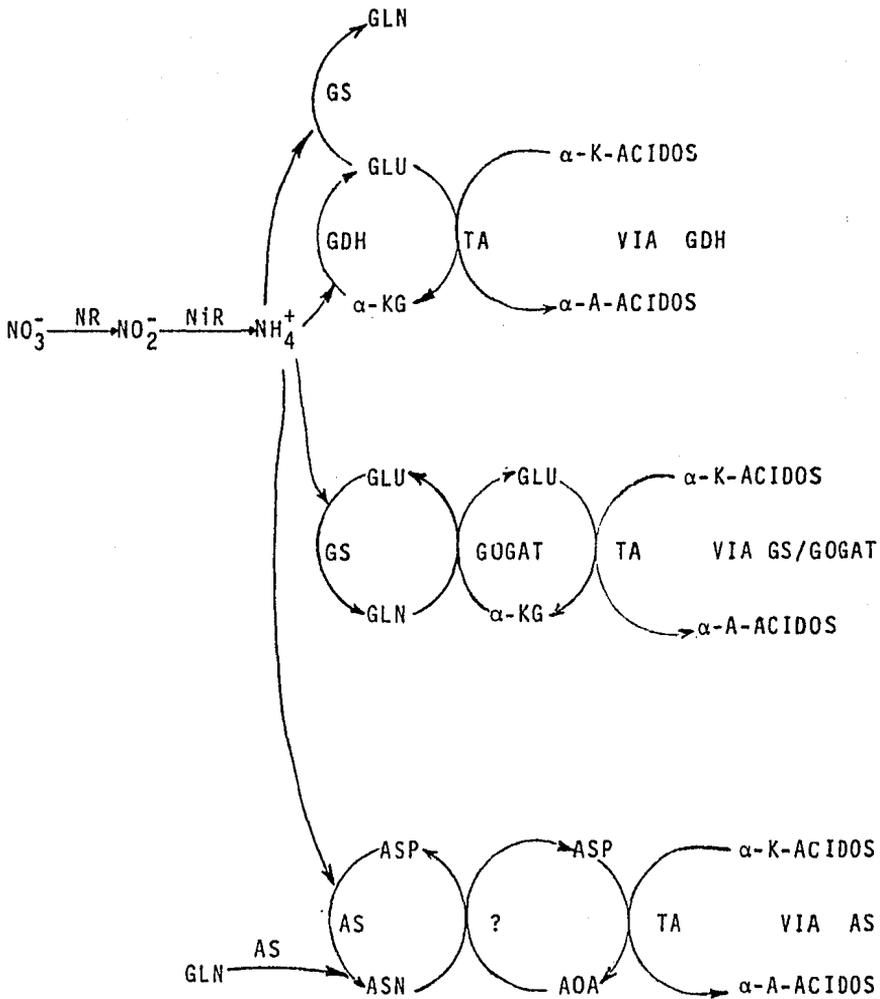


FIG. 1.2 ESQUEMA DE ASIMILACION DEL NITROGENO

C A P I T U L O II

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

II.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las plantas utilizadas en los experimentos provenían de la germinación de semillas de Canavalia ensiformis donadas por la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Yucatán. El tratamiento que se les dió fue el siguiente:

- a) Las semillas se pesaron y se lavaron con detergente.
- b) Se desinfectaron introduciéndolas en una solución de etanol al 70% durante 3 minutos y posteriormente en una solución de cloralex 1:3 durante otros 3 minutos.
- c) Se sembraron en matraces con agrolita estéril y en condiciones estériles.
- d) Se incubaron con un fotoperíodo de 12 h, con temperaturas de 30°C en la fase iluminada y de 25°C en la fase oscura.
- e) Se procedió a cosechar las semillas hidratadas de 12 h y de 24 h así como las plántulas de 2,3,4,5,6 y 7 días. Se

separaron las raíces, los tallos, los cotiledones y las hojas. Una parte se utilizó para la determinación de las curvas de crecimiento y la otra parte se congeló a -70°C . A partir de estos últimos tejidos se prepararon los extractos con los cuales se midieron las actividades enzimáticas y las pozas de aminoácidos, nitratos, nitritos, urea, amonio y proteína total.

II.2. MATERIAL DE VIDRIO

El material de vidrio utilizado se lavó con detergente, se enjuagó con agua destilada y se secó en estufa.

II.3. EQUIPO

Agitador Vortex Genie.

Autoclave, Electric Steroclave No. 25 X.

Balanza analítica, Mettler.

Balanza analítica eléctrica, OHAUS, BRAINWEIGH B 300 D.

Baño de temperatura constante, Colora.

Centrífugas, BECKMAN J2-21 y MSE.

Espectrofotómetro, UNICAM SP 1805 con control de temperatura y programador de tiempo.

Incubadora, GCA/Precision Scientific con fotoperíodo programable.

Micropipetas, Finnipipette, de 0-5, 5-20 y de 200-1500 ul.

Placas de calentamiento y agitación, Thermolyne.

Polytrón, PCU-2.

Potenciómetro, Conductronic.

Refrigerador de -70°C , Kelvinator No. 100.

II.4. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron grado reactivo, de

las casas: J.T. Baker, Merck y Sigma.

II.5. METODO EXPERIMENTAL

II.5.1. DETERMINACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

La determinación del porcentaje de incremento en el peso fresco se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%IPF = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Las unidades de peso son gramos. El incremento en el peso fresco puede también graficarse directamente como peso fresco (peso final) Vs tiempo.

El porcentaje de humedad se obtiene dividiendo la diferencia del peso fresco del tejido menos el peso seco del mismo entre el peso fresco y multiplicando por cien:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

Las unidades de peso son gramos. El peso seco se obtuvo en estufa a 60°C.

Graficando estos datos contra el tiempo se obtienen las curvas de crecimiento de la planta durante los primeros siete días de germinación.

II.5.2. PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO

El extracto enzimático de los tejidos empleados (hoja, co tiledón, tallo ó raíz) se obtuvo mediante el siguiente proce dimiento:

- 1.- El tejido se congeló a -70°C por 3 horas o más.
- 2.- El tejido congelado se molió en un mortero previamente enfriado a -70°C hasta convertirlo en un polvo fino.
- 3.- Al tejido pulverizado se le adicionó el buffer de extracción* en una relación 1:2.5 (p/v) y 5% (p/p) de polivinil pirrolidona (PVP).
- 4.- La mezcla se homogenizó por dos minutos en un politrón a máxima velocidad.
- 5.- El extracto obtenido en el paso anterior se pasó a tra vés de 4 capas de gasa.
- 6.- El filtrado se centrifugó a 18,000 rpm durante 30 minutos en el rotor JA-20 y a 2°C en la centrífuga J2-21. En el caso de los cotiledones de 0-5 días, se requirió efectuar una extracción con cloroformo 1:1 (v/v), se agitó en un embudo de separación, se dejó reposar para que se separaran las fases y se efectuó una segunda centrifugación con las mismas condicio nes que en la primera ocasión. De esta manera se eliminó la interferencia por exceso de lípidos en los cotiledones.
- 7.- El sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) fue utilizado para las determinaciones enzimáticas.

* a) Se usó tampón de fosfatos 50 mM, EDTA 1 mM, mercaptoe tanol 5 mM, pH 7.5 (para medir GOGAT-Fd y GOGAT-NAD(P)H.

b) Se usó tampón Tris-HCl 50 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, mercap

toetanol 5 mM, pH 8.2 (para medir AS).

Todas las operaciones se efectuaron a 0-4°C.

II.5.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ASPARAGINO SINTETASA

La actividad enzimática de la AS se midió por el método de Stulen y Oaks (90) con modificaciones introducidas en el presente trabajo. La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	50 mM	pH 7.6	2.0, 1.9, 1.8, 1.7 ml
ATP	8.00 mM	pH 7.0 rp	0.2 ml
Asp-Na	33.33 mM		0.2 ml
MgSO ₄	33.33 mM		0.1 ml
NH ₂ OH	10.00 mM	pH 7.0 rp	0.3 ml
Cisteína	3.33 mM		0.1 ml
Extracto			<u>0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ml</u>
Volumen Total			3.0 ml

(rp = recién preparado)

La reacción se inició con la adición del aspartato. La mezcla de reacción se incubó por 30 minutos a 37°C. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris-HCl. En cada determinación se usó un blanco a tiempo cero, es decir, contenía todos los reactivos y el mismo volumen de extracto enzimático pero la reacción se detenía en el tiempo cero adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico.

El β -aspartil hidroxamato formado se determinó adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico (volúmenes iguales de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% en HCl 0.2 N, TCA al 24% y HCl al 50%).

Se centrifugó 30 minutos a 3,000 rpm y se midió el incremento en la absorbancia a 540 nm respecto a cada blanco.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de β -aspartil hidroxamato formados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.1.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de β -aspartil hidroxamato por minuto bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína. Véanse las gráficas de actividad enzimática variando el tiempo de incubación y la concentración del extracto enzimático, figs. 2.2 y 2.3.

II.5.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GOGAT - NAD(P)H

La actividad enzimática de la GOGAT-NAD(P)H se determinó por el método de Beevers y Storey (5), con las modificaciones introducidas por Loyola (42). La mezcla de reacción contenía:

Fosfatos	100 mM, pH 7.5	1.65, 1.5, 1.35, 1.20 ml
α - KG	10 mM, pH 7.0	0.5 ml
Glutamina	30 mM	1.5 ml
NAD(P)H	160 μ M	0.2 ml
Extracto		<u>0.15, 0.3, 0.45, 0.60 ml</u>
Volumen Total		3.0 ml

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD(P)H, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD(P)H. Se graficó la disminución en la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el tampón de fosfatos. Cada determinación fue acompañada de su respectivo blanco, el cual contenía todos los reactivos (incluyendo al extracto) a excepción del α -KG y de la glutamina cuyos volúmenes fueron sustituidos con tampón.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD(P)H transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la fig. 2.4.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce la disminución de un nmo1 de NAD(P)H por minuto. Véanse las gráficas de actividades enzimáticas variando el tiempo de incubación y la concentración del extracto, figuras 2.5 y 2.6.

II.5.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GOGAT-FERREDOXINA (METILVIOLOGENO)

La actividad de la GOGAT dependiente de ferredoxina se determinó por el método de Match (44), con modificaciones introduci

das por Gómez N. (28). La mezcla de reacción contenía:

Fosfatos	10 mM pH 7.5	0.59, 0.57, 0.55, 0.50 ml (a)
		0.50, 0.40, 0.30, 0.20 ml (b)
α - KG	10 mM pH 7.0	0.6 ml
Glutamina	10 mM pH 7.0	0.6 ml
metilviológeno	19 mM rp	0.6 ml
Extracto		0.01, 0.03, 0.05, 0.10 ml (a)
		0.10, 0.20, 0.30, 0.40 ml (b).
Mezcla $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	92 mM rp	<u>0.6 ml</u>
Volumen Total		3.0 ml

(a) En el caso de tejido de cotiledón se trabajó con volúmenes de extracto de 0.01-0.1 ml y con volúmenes de tampón de fosfatos de 0.59-0.50 ml en el orden indicado.

(b) En el caso de los tejidos de tallo y hoja los volúmenes de extracto utilizados fueron de 0.1-0.4 ml y de tampón de fosfatos de 0.5-0.2 ml en el orden indicado.

La reacción se inició al agregar a la mezcla de los componentes la mezcla del ditionito de sodio y se incubó a 30°C por 20 minutos. Al término de este tiempo, la reacción se dejó hirviendo durante 2 minutos.

A continuación, la mezcla de reacción se pasó por una co-

lumna de resina Dowex (2 cm), se lavó con 10 ml de agua destilada y desionizada y se eluyó el ácido glutámico formado con 4 ml de ácido acético 2 M. El ácido glutámico producido y aislado de la mezcla de reacción de esta manera fue medido mediante el método de la ninhidrina. Se midió el incremento en la absorbancia a 570 nm respecto al blanco correspondiente, el cual contenía todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción del α - KG y de la glutamina, cuyos volúmenes fueron sustituidos por tampón.

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el tampón de fosfatos.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de glutamato formados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.9. Véanse las gráficas de actividad enzimática variando el tiempo de incubación y la concentración del extracto enzimático, figuras 2.7 y 2.8.

II.5.6. DETERMINACION DE LAS PROTEINAS

Se siguió la técnica de Peterson (66). El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

Muestra (a) + H₂O destilada hasta completar 1 ml

↓
AGITAR

+

0.1 ml de desoxicolato de sodio al 0.15% (agitar y dejar reposar por 10 min. a temperatura ambiente)

+

0.1 ml de ácido tricloroacético al 72 %, frío.

↓
AGITAR

Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos

↓
SOBRENADANTE
(Se descarta)

↓
PASTILLA + 1 ml
de agua destilada

↓
AGITE

+

1 ml de reactivo A

↓
AGITE

Reposar 10 min. a temp. ambiente.

+

0.5 ml de reactivo B. Esperar 30 minutos a que se desarrolle color y leer a 750 nm.

Reactivo A: mezcla de volúmenes iguales de:

–Solución base de cobre-tartrato-carbonato (CTC), (0.1 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10% de Na_2CO_3 , 0.2% de $\text{KC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

–NaOH 0.8 N.

–Dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS).

–Agua destilada.

Reactivo B: un volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu es mezclado con 5 volúmenes de agua destilada.

La curva patrón se obtiene graficando la concentración de albúmina sérica bovina (10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Vs la absorbancia a 750 nm. Ver gráfica de calibración, fig. 2.9.

(a) Se utilizó 0.02 ml de muestra si el extracto era de hoja, tallo o raíz.

Se utilizó 0.05 ml de muestra diluida 1:40 para el caso del extracto de cotiledón.

II.5.7. DETERMINACION DE GLUTAMATO (AMINOACIDOS)

Se siguió el método de Cocking (15). Se realizó una curva patrón con ácido glutámico de 5-50 μg de glu. El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras

es el mismo:

Muestra: 0.04 ml + 0.96 ml de agua destilada
(una muestra del extracto se diluyó 1:10 y
de ahí se tomó el volumen de 0.04 ml)

+

1ml de reactivo de ninhidrina ("B")



Se pone a ebullición 30 minutos

+

2.5 ml de isopropanol al 50%



Reposar 15 min. a temperatura
ambiente y leer a 570 nm

Reactivo de ninhidrina:

-Reactivo "A": buffer de citratos 0.2 M, pH 5.0±0.1 (re-
cién preparado). Agregar por cada 50 ml de buffer 0.08 g
de SnCl₂.

-Reactivo "B": tomar 10 ml del reactivo "A" y agregarle
0.4 g de ninhidrina previamente disuelta en 10 ml de me-
tilselsolve (etilenglicol-monometil éter).

Ver gráfica de calibración, fig. 2.10.

II.5.8. DETERMINACION DE NITRATOS

Se siguió el método de Nicholas y Nason (59). Se realizó
una curva patrón con KNO₃. El procedimiento a seguir para la

curva patrón es el mismo para el ensayo de las muestras:

Muestra (a): 0.02 ml + 1.48 ml H₂O destilada

+

0.1 ml de ácido sulfámico al 10% (p/v)

↓
Dejar reposar dos minutos

+

0.4 ml de HClO₄ al 20% (v/v)

↓
Agitar y medir absorbancia a 210 nm

La curva de calibración se obtiene graficando concentración en ug de KNO₃ (2 ug -20 ug) Vs absorbancia a 210 nm, figura 2.11.

(a) En todos los casos hubo necesidad de diluir al extracto; en el caso de cotiledón la dilución efectuada fue de 1:4 y en el caso de hoja, raíz y tallo la dilución fue de 1:2.

II.5.9. DETERMINACION DE NITRITOS

Se siguió la técnica de Nicholas y Mason (59). Se elaboró una curva patrón con NaNO₂. El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

Muestra: 2.0 ml de extracto (a)

+

1 ml de sulfanilamida al 1% (b)

+

1 ml de naftilendiamina (NED) al 0.02 %

↓
Leer a 540 nm después de 10 minutos

(a) En el caso de la curva patrón, se agrega la cantidad necesaria de solución patrón para cada punto y se completa a 2 ml con H₂O destilada.

(b) Se disuelve 1 g de sulfanilamida en 25 ml de H₂SO₄ y

se afora a 100 ml con agua destilada.

La curva patrón se obtiene graficando absorbancia a 540 nm Vs concentración de NaNO_2 en nmoles. Ver gráfica de calibración, fig. 2.12.

II.5.10. DETERMINACION DE UREA Y AMONIO

Se siguió el método de Kaplan, conocido también como método del indofenol (31).

La primera parte de la técnica para la determinación de urea se basa en la acción de la enzima ureasa que hidroliza la urea presente en el tejido a amonio:

Muestra: 0.1 ml de extracto diluido 1:1 (cotiledón)
ó 0.1 ml de extracto no diluido (hoja, tallo, raíz)

+

2.12 ml de tampón de fosfatos pH 7.5, 100 mM
(ó 2.22 ml de H_2O en el caso
de la determinación de NH_4^+)

+

0.1 ml de ureasa 0.002 g/ml (disuelta en el tampón anterior para el caso de la determinación de urea)

↓

Incubar la mezcla de reacción durante 20 minutos a 37°C
(la reacción se detiene agregando 0.3 ml de TCA al 30%)

Posteriormente se efectúa la cuantificación del amonio liberado (o presente en forma natural en el tejido) mediante el método del indofenol:

Añadir 5 ml de solución "A"

↓

Añadir 5 ml de solución "B"

Reposar 30 minutos para que se desarrolle color (el indofenol es un complejo que en su forma disociada es colorido).

-Solución "A": solución de fenol 0.106 mM con nitroprusiato de sodio en una concentración de 0.25 g/500 ml de solución "A".

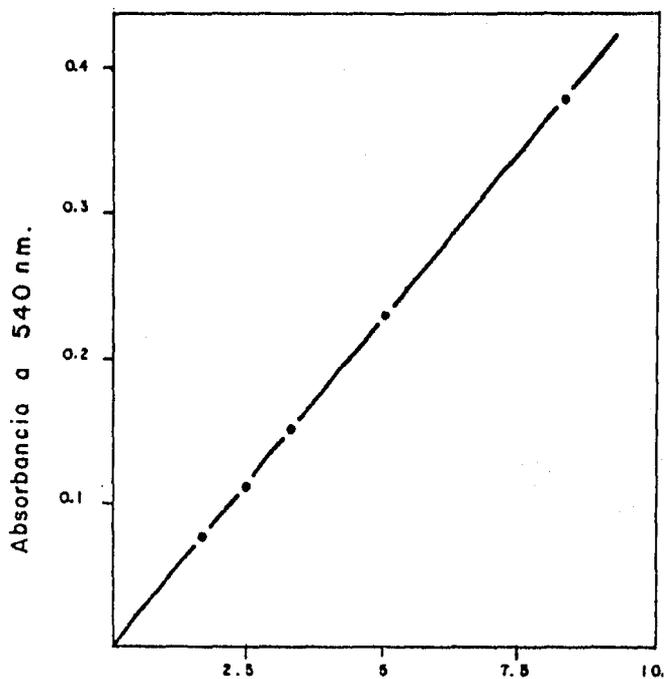
-Solución "B": 40 ml de NaClO + 25 g de NaOH se aforan a 1 l con agua destilada.

Se elaboraron las curvas patrón respectivas:

Urea: de 0 a 3 mM de urea.

Amonio: de 0 a 3 mM de amonio.

Véanse las figuras 2.13 y 2.14.



[β-aspartil hidroxamato.]
(μ moles / ml.)

FIG. 2.1 GRAFICA DE CALIBRACION DE
β-ASPARTIL HIDROXAMATO. Datos de la recta:
 $Y=0.04499(X)-0.00478,$
 $r=0.9989.$

Asparagino Sintetasa

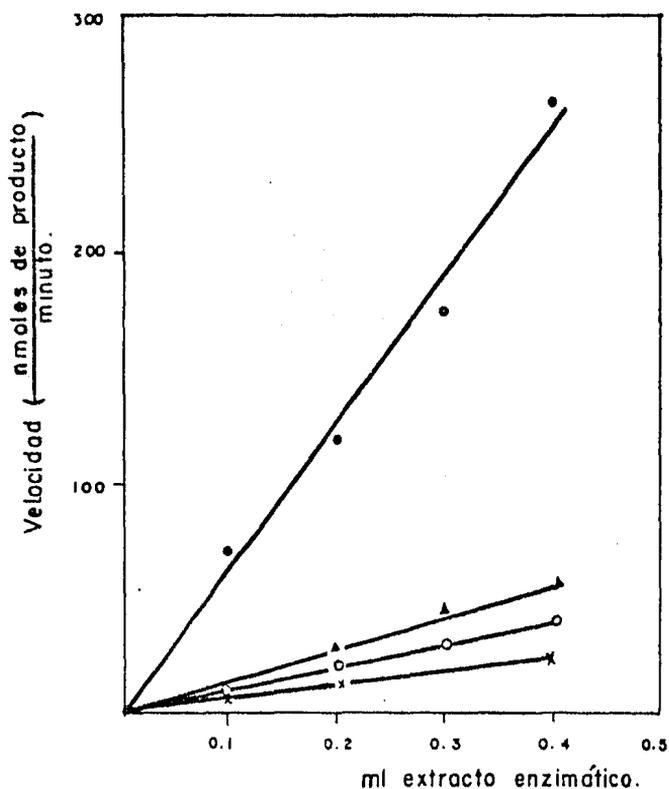


FIG. 22. Determinación de la linealidad de la reacción con respecto a la concentración, del extracto enzimático. El tiempo de incubación se mantuvo constante (30')

(●) cotiledón (5 días). (▲) raíz (4 días).
 ○ hoja. (x) tallo (3 días).

Asparagino Sintetasa

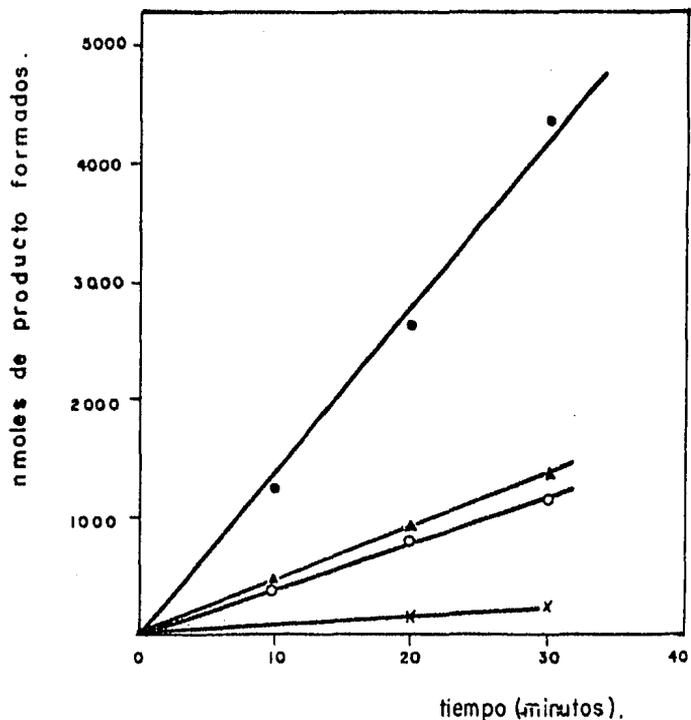


FIG. 2.3, Determinación de la linealidad de la reacción con respecto al tiempo. El volumen del extracto enzimático en la mezcla de reacción fue constante.

(●) cotiledón (5 días). (▲) raíz (4 días).
 ○ hoja (6 días). (x) tallo (7 días).

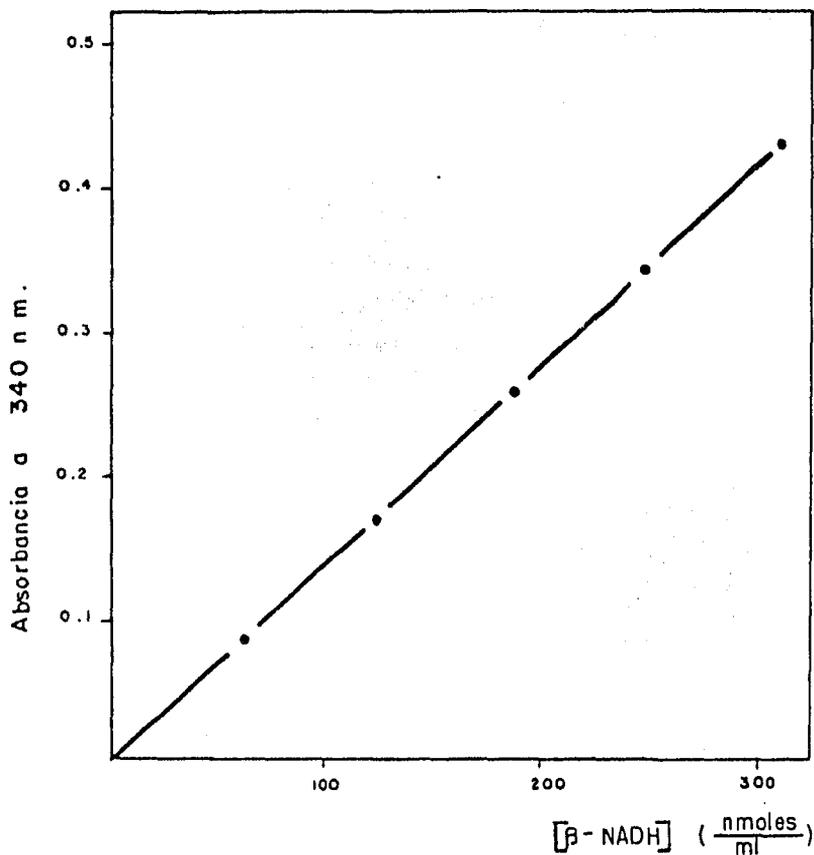


FIG. 2.4 GRAFICA DE CALIBRACION DE β -NADH.
Datos de la recta: $Y=0.001383(x)-0.00057$,
 $r=0.9987$.

G O G A T- N A D H

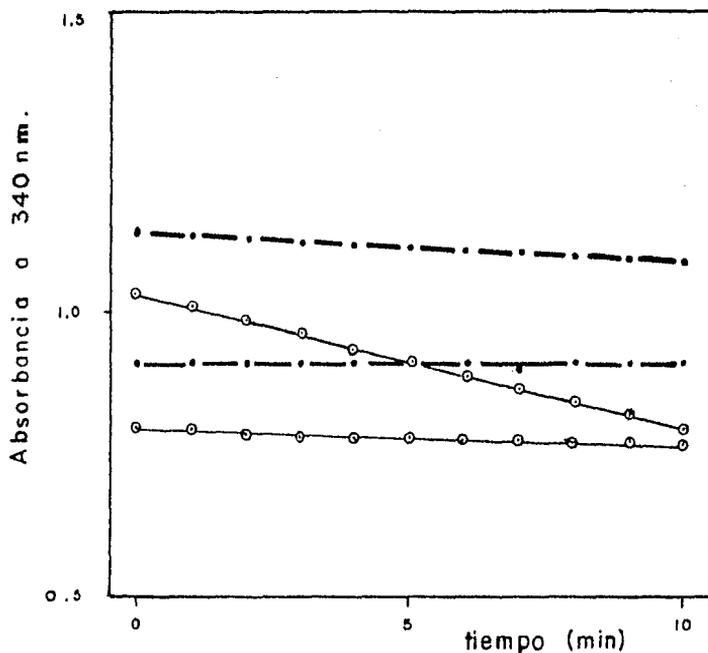


FIG. 2.5 Linearidad de la reacción con respecto al tiempo. Los datos de cotiledón (●) y raíz (○) que se ilustran corresponden a 12 h y 5 días respectivamente. El volumen de extracto enzimático en la mezcla de reacción fue en ambos casos de 0.15 ml. La recta con mayor absorbancia para cada tejido corresponde al ensayo enzimático y la que tiene menores valores de absorbancia es el blanco.

GOGAT - NADH.

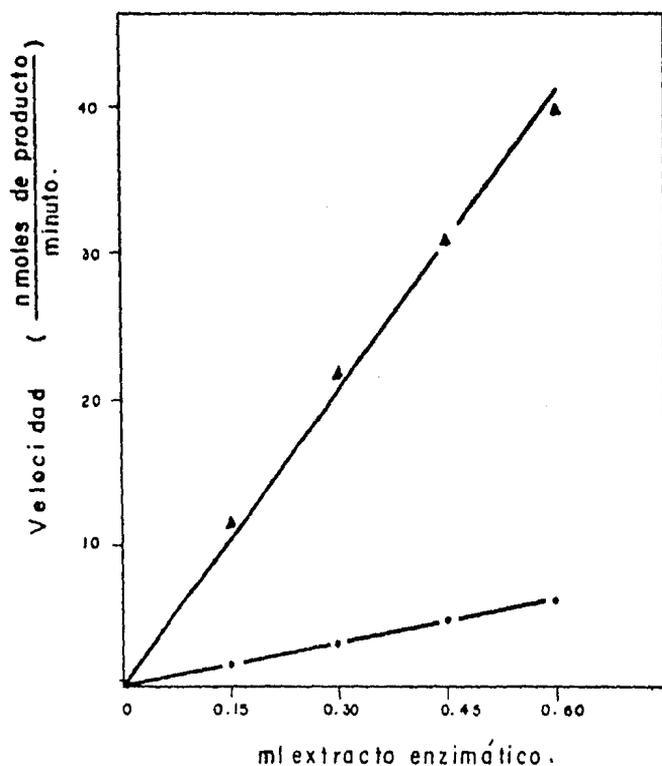


FIG. 2.6 Linearidad de la reacción con respecto a la concentración del extracto enzimático. El tiempo de incubación se mantuvo constante (10 minutos).
(▲) Raíz (5 días), (●) Cotiledón (12 h).

GOGAT- FERREDOXINA

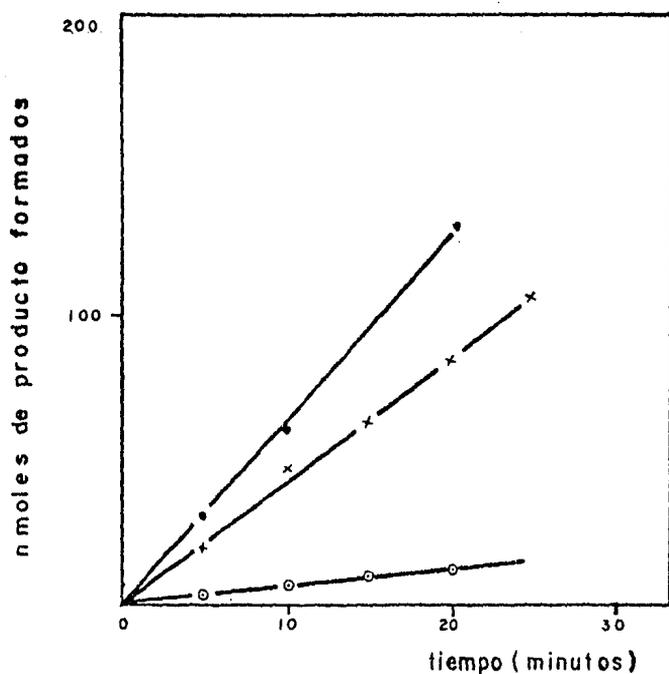


FIG. 2.7 Determinación de la linealidad de la reacción con respecto al tiempo. El volumen del extracto enzimático en la mezcla de reacción fue constante (0.1ml)
 (x) Tallo (5 días) (○) Hoja (6 días)
 (•) Cotiledón (4 días)

GOGAT - FERREDOXINA.

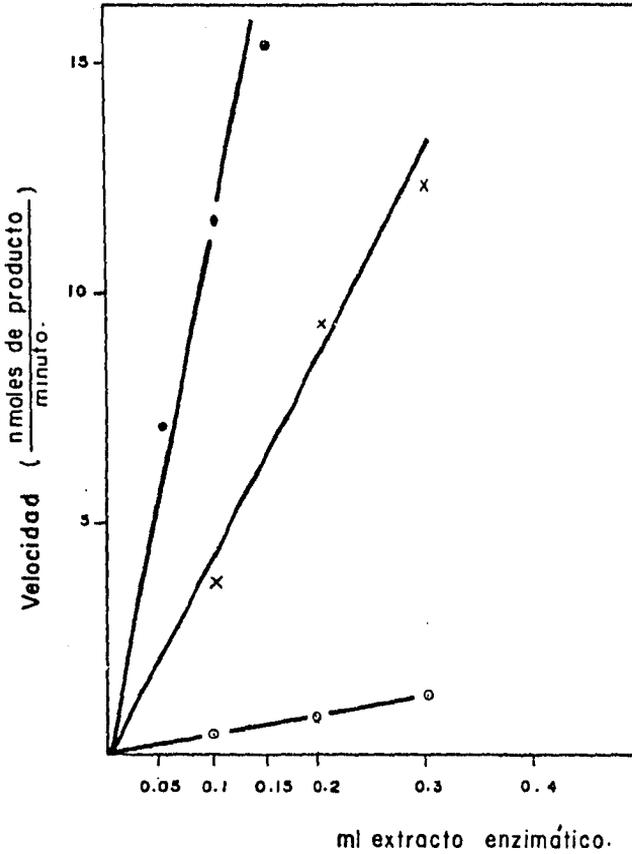
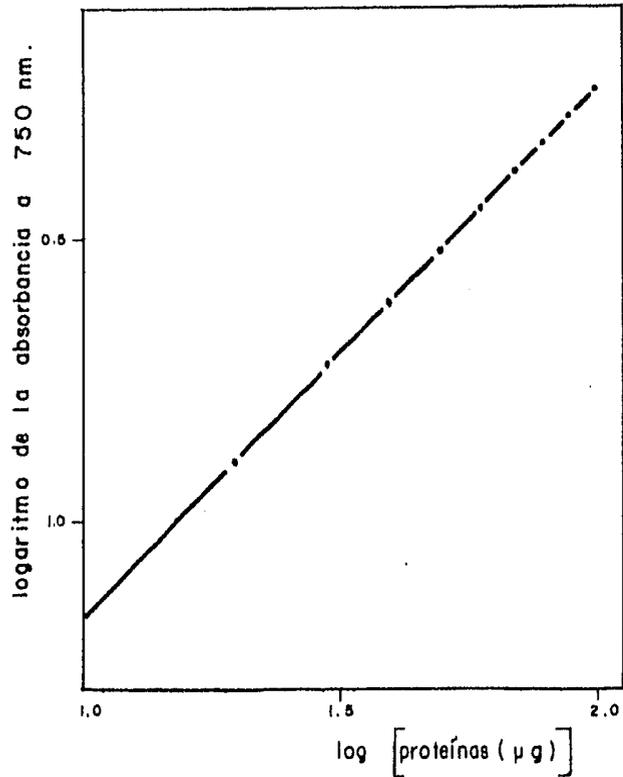
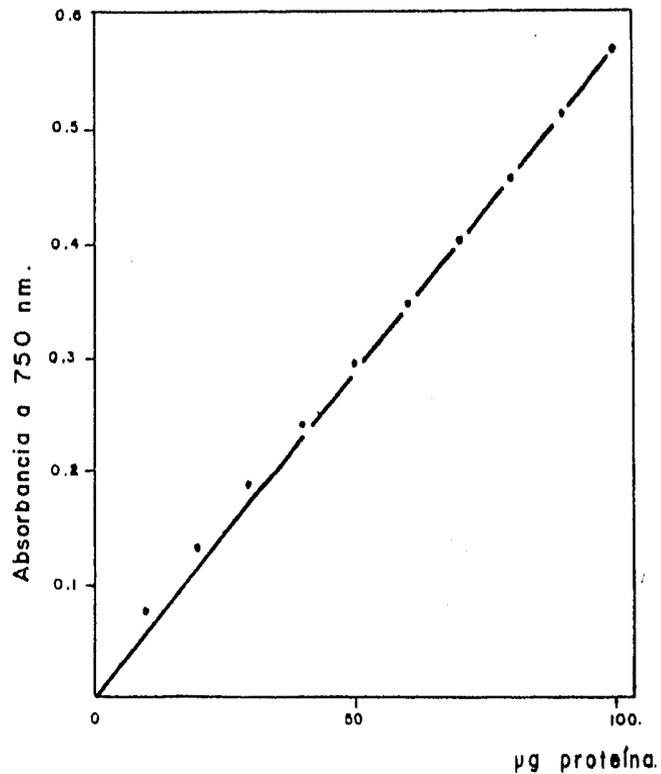


FIG. 2.8 Determinación de la linealidad de la reacción con respecto a la concentración del extracto enzimático en la mezcla de reacción. El tiempo de incubación se mantuvo constante, (20 minutos).
 (x) Tallo (7 días). (•) Cotiledón (4 días)
 (o) Hoja (6 días).



$$Y = 0.928(x) - 2.098, r = 0.9957.$$



$$Y = 0.00543(x) + 0.02314, r = 0.9932897.$$

FIG. 2.9 CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS.

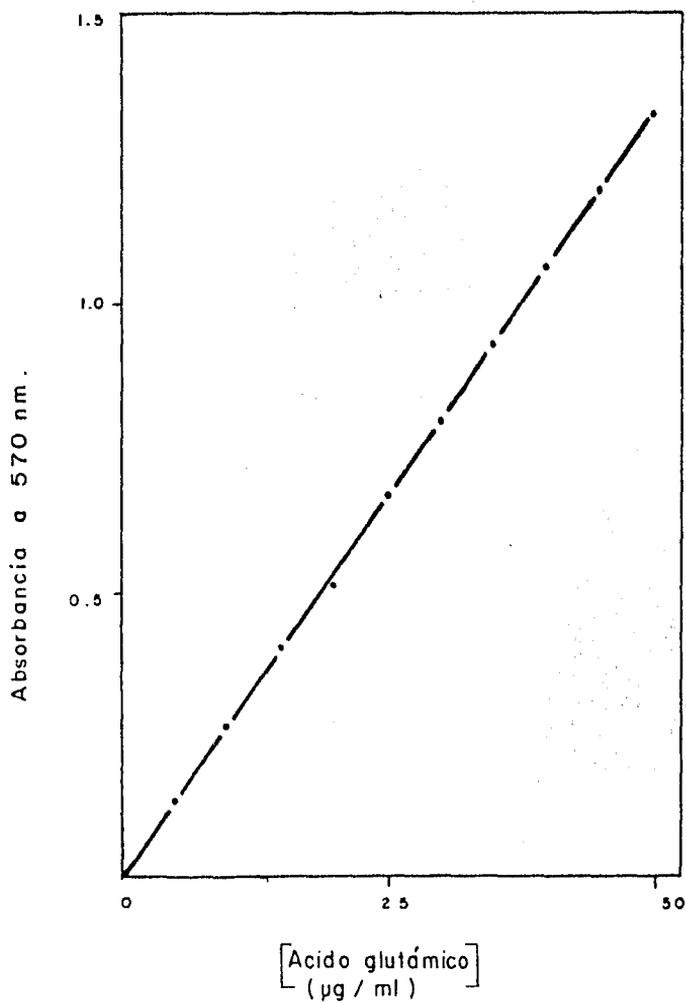


FIG. 2.10 CURVA DE CALIBRACION DE ACIDO GLUTAMICO (AMINOACIDOS). Datos de la recta. $Y=0.02661(x)+0.00195$, $r=0.999266$.

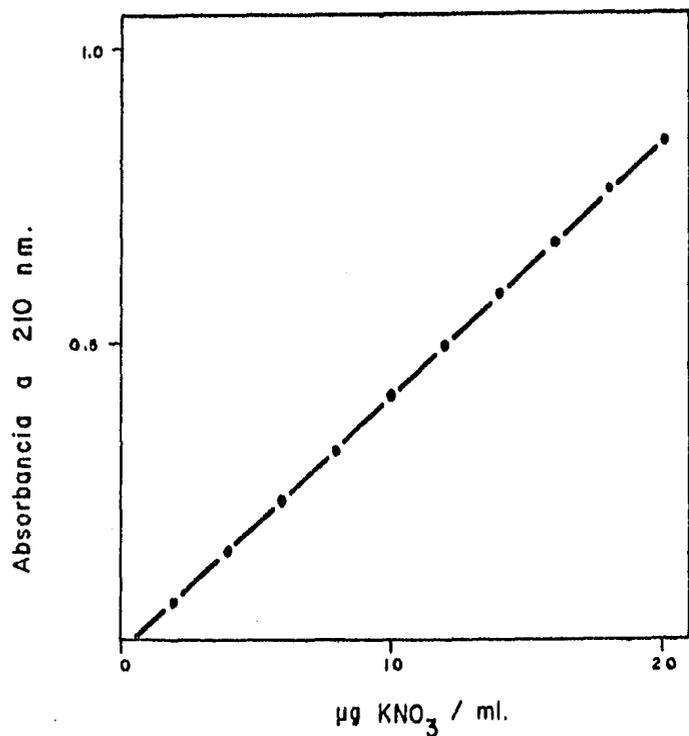


FIG. 2.11 CURVA DE CALIBRACION DE NITRATOS. Datos de la recta: $Y = 0.0438(x) - 0.0271$, $r = 0.9974$.

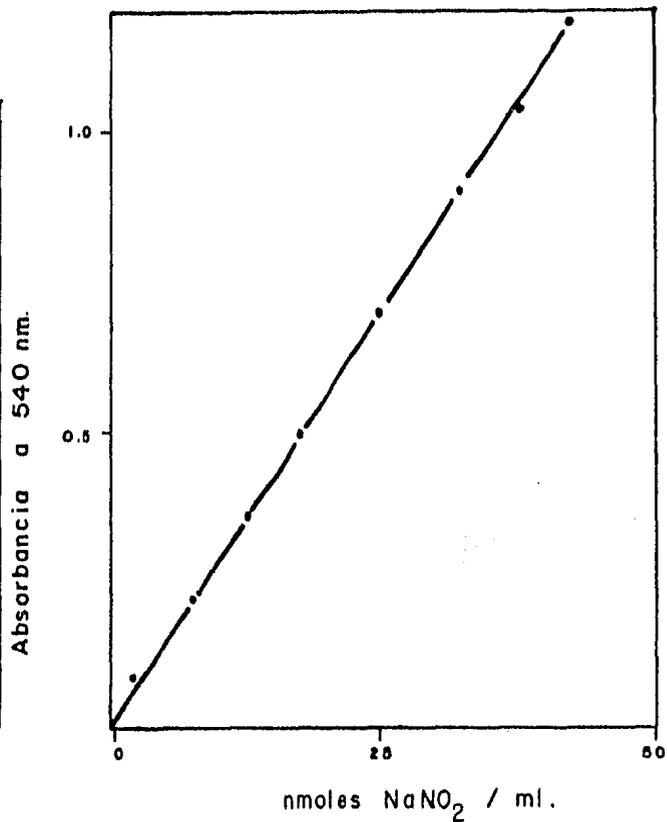


FIG. 2.12 CURVA DE CALIBRACION DE NITRITOS. Datos de la recta: $Y = 0.01357(x) + 0.02113$, $r = 0.999475$.

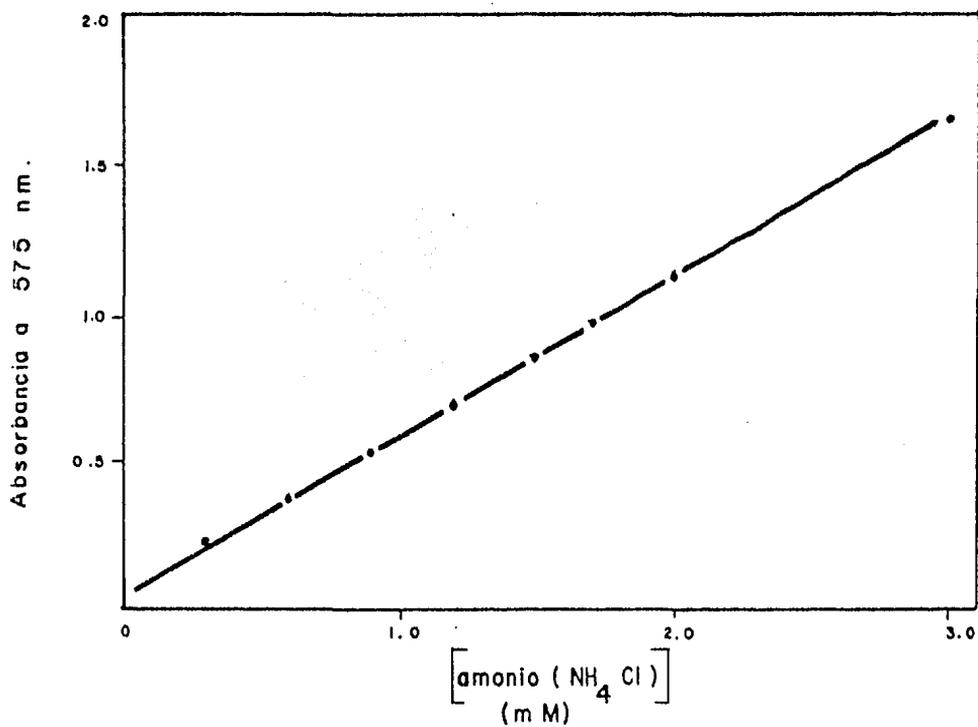


FIG. 2.13 CURVA DE CALIBRACION DE AMONIO
Datos de la recta: $Y = 0.527(x) + 0.066$, $r = 0.99597$.

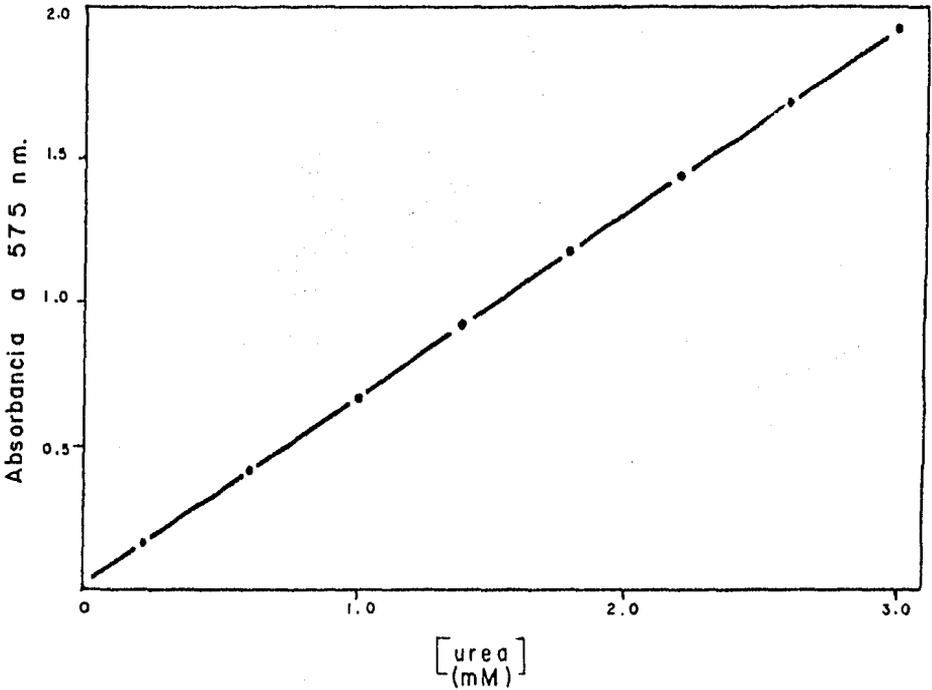


FIG. 2.14 CURVA DE CALIBRACION DE UREA. Datos de la recta: $Y = 0.6255(x) + 0.04519$, $r = 0.995693$.

C A P I T U L O I I I

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

I I I . 1 . C U R V A S D E C R E C I M I E N T O

Tanto las curvas de peso fresco como las de peso seco obtenidas con las raíces, el tallo, las hojas y los cotiledones de Canavalia ensiformis L. presentaron pendientes logarítmicas durante el período de estudio (fig. 3.1), a excepción de la curva de peso seco de raíz en donde dicha tendencia se manifestó a partir del cuarto día.

El tejido del tallo presentó una variación en el incremento de peso seco mayor que la variación observada en el peso fresco con respecto al tiempo. Esto significa que la formación de biomasa constituye un aspecto importante en el metabolismo del tallo durante los primeros siete días de crecimiento.

En el caso de la raíz, las variaciones en el incremento del peso fres-

co y del peso seco con respecto al tiempo fueron muy similares mientras que en el caso de las hojas se observó un incremento en el peso fresco ligeramente mayor que el de peso seco con respecto al tiempo (figs. 3.3 y 3.5).

El tejido que presentó el mayor incremento en el peso fresco fue el de tallo, seguido del de raíz y del de las hojas (figs. 3.3 y 3.5). En el caso del tallo, el mayor aumento en el peso fresco puede explicarse por su mayor capacidad para sintetizar biomasa. En el caso de las hojas, la acumulación de agua en el tejido es el factor que contribuye preferencialmente al aumento del peso fresco si bien la formación de biomasa en este tejido contribuye también de manera importante. En las raíces, tanto la síntesis de biomasa como la capacidad de este tejido para acumular agua tienen un papel relativamente igual en el incremento del peso fresco.

Con respecto a los cotiledones, la variación en el incremento del peso fresco con respecto al tiempo fue menor que la observada para los demás tejidos. Al comparar estos datos con los de incremento en el peso seco con respecto al tiempo vemos que a pesar de ser los cotiledones el tejido con el menor aumento en el peso fresco es también el que presenta la mayor formación de biomasa con respecto al tiempo de crecimiento (figs. 3.2 y 3.4). El mayor aumento en el peso fresco de los demás tejidos es explicable porque son tejidos que requieren de mayor concentración de agua para su funcionamiento mientras que los cotiledones constituyen principalmente un tejido de reserva.

III.2. COMPORTAMIENTO DE LAS ENZIMAS ASPARAGINO SINTETASA Y GLUTAMATO SINTASA DENTRO DEL METABOLISMO NITROGENADO DE CANAVALLIA ENSIFORMIS L.

Para cada una de las enzimas estudiadas se determinaron las condiciones óptimas de ensayo, es decir, las concentraciones y los tiempos de incubación en donde las reacciones enzimáticas presentaron una cinética lineal. Esto se hizo para cada uno de los tejidos estudiados.

La ontogenia de estas enzimas (en donde cada punto de las gráficas es el promedio de dos experimentos) se expone a continuación:

Las actividades enzimáticas (actividades específicas) de las asparagino sintetetasas de raíz, tallo y cotiledón fueron descendentes hasta el sexto día, siendo mayor la actividad en raíz que en tallo y la actividad en este último mayor que en los cotiledones. Tanto en raíz como en tallo se observó un ligero incremento del sexto al séptimo día mientras que en los cotiledones la actividad enzimática se mantuvo en un nivel menor y en general con una leve tendencia a disminuir.

El único tejido en donde la AS presentó una actividad siempre ascendente fue el de hoja. Dicha actividad fue menor que las actividades encontradas en el tallo y en la raíz en los primeros días. En los días 6 y 7, las asparagino sintetetasas de raíz, tallo y hojas tuvieron actividades específicas similares.

Por otra parte, a partir del sexto día la actividad de la AS en las hojas fue mayor que la de la AS de los cotiledones (figura 3.6).

Con respecto a la glutamato sintasa (GOGAT), en Canavalia ensiformis se detectó la presencia de dos isoenzimas, al igual que en el caso de chícharo (Pisum sativum), (48). La GOGAT que se detectó en los tejidos no fotosintéticos de la planta (raíz y los cotiledones en los primeros días de crecimiento) fue la que utiliza NADH como coenzima, siendo la GOGAT-NADH de raíz mucho más activa que la GOGAT-NADH de los cotiledones. En el caso de la primera, la actividad específica disminuyó hasta el quinto día para después incrementarse en el sexto sin sobrepasar el nivel de actividad de los días 3 y 4, y volver a disminuir en el séptimo día. La actividad específica de la GOGAT-NADH de los cotiledones disminuyó durante las primeras 12 horas para después aumentar ligeramente a las 24 horas. A partir de este punto se observó un descenso constante en la actividad de esta isoenzima (figs. 3.7 y 3.8).

En las primeras 24 horas de germinación no se observó actividad enzimática para la GOGAT dependiente de ferredoxina de los cotiledones y es hasta el segundo día cuando se registró una actividad muy leve para esta otra isoenzima seguida de otro ligero incremento en su actividad en el tercer día y que es comparable a la actividad de la GOGAT-NADH en los días 5 y

6 en los cuales se detectó la actividad más baja para la isoenzima dependiente de piridín nucleótido en este mismo tejido. En el cuarto día de germinación, esta GOGAT-Fd manifestó un ascenso considerable en su actividad, 50.8 veces la actividad del día anterior y 13.4 veces la actividad enzimática más alta registrada para la GOGAT-NADH de cotiledón (cero días). Del cuarto al quinto día, se observó un ligero ascenso en su actividad para nuevamente manifestar al sexto día un aumento notable; 3.8 veces la actividad del día anterior. En el séptimo día su actividad disminuyó manteniéndose sin embargo en un nivel elevado con respecto a los días anteriores al sexto (figura 3.7).

Las actividades enzimáticas de la GOGAT-Fd de las hojas y del tallo de Canavalia ensiformis mostraron en general una tendencia ascendente con respecto al tiempo de germinación, con la característica de que, a excepción del tercer día, las actividades específicas de la GOGAT-Fd del tallo fueron siempre mayores que las actividades encontradas en las hojas (fig. 3.9).

Tanto en las hojas como en el tallo la actividad fue ascendente hasta el quinto día. En el sexto, se observó un máximo para la GOGAT-Fd del tallo, que corresponde a un mínimo en la actividad de la GOGAT-Fd de las hojas. En el séptimo día la enzima de las hojas presentó un máximo mientras que la actividad enzimática en el tallo descendió a un nivel en el que siguió siendo mayor que en los dos primeros días. La máxima actividad registrada

para el tallo (sexto día) fue 7.4 veces la máxima actividad observada para las hojas (séptimo día).

Las actividades específicas de la AS en todos los tejidos fueron, a excepción de las hojas en el cuarto día, mayores que las actividades específicas de la GOGAT-NADH de los cotiledones y de la GOGAT-Fd de las hojas.

Las actividades específicas de la GOGAT-Fd del tallo y de las hojas y de la GOGAT-NADH de raíz fueron similares a las de la AS de cotiledón, tallo y hojas (exceptuando el cuarto día) y raíz en los días quinto al séptimo (figs. 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9).

Para poder interpretar satisfactoriamente estos datos experimentales es necesario recurrir a estudios realizados paralelamente a éste con otras enzimas del metabolismo nitrogenado de la planta. En el caso de la GOGAT, su papel no puede ser explicado completamente considerándola como una enzima aislada. Es necesario relacionar el comportamiento de esta enzima con el de su antecesora en la ruta de asimilación del amonio; la glutamino sintetasa. La actividad de la GS es, tanto en las hojas como en el tallo y la raíz, ascendente a partir del cuarto día de crecimiento y siempre fue mayor que la actividad de la GOGAT en los tejidos mencionados. Por otra parte, la actividad de la GS de las hojas siempre fue mayor que la del tallo y ésta que la de la raíz a partir del cuarto día (101).

Como ya se vió anteriormente, la GOGAT del tallo presentó

una actividad mayor que la de la raíz y ésta mayor que la de las hojas, siendo el tallo el tejido en donde se encontró la mayor actividad para la glutamato sintasa. En estos tres tejidos, la actividad de la GOGAT siguió una tendencia ascendente con respecto al tiempo de crecimiento.

Estos datos nos indican que la glutamina formada en el tallo, en las hojas y en la raíz puede ser conectada directamente al metabolismo intermediario por la acción de la GOGAT en dichos tejidos. Siendo en estos tres tejidos la GOGAT la enzima limitante dentro de la vía GS/GOGAT, podemos decir que la importancia de dicha ruta en los días 4 al 7 es mayor en el tallo, seguido de raíz y después por las hojas.

La glutamina remanente producida por la GS puede ser utilizada en la síntesis de las purinas, del triptofano, de la arginina o de la histidina o podría ser también una forma orgánica de almacenamiento o bien una forma de transporte del nitrógeno en la planta.

En el tercer día de crecimiento, la actividad de la GOGAT de raíz es la más alta para este tejido y la actividad de la GS es lo suficientemente elevada (101) como para hacer funcional la ruta GS/GOGAT en la raíz.

Las AS de raíz y del tallo tienen en los días 3 y 4 mayor actividad que las GOGAT de dichos tejidos por lo que podrían actuar en estos días como una vía alterna a la ruta GS/GOGAT

para la asimilación del amonio. En los días siguientes, las AS de las hojas, de la raíz y del tallo muestran una actividad similar a las enzimas de la ruta GS/GOGAT. Cabe mencionar aquí que se considera que la síntesis de asparagina ocurre cuando la planta se enfrenta a un exceso de amonio (36), lo cual concuerda con los altos niveles de amonio en estos tejidos en los días 3 y 4 (fig. 3.14) y que la asparagina, a diferencia de la glutamina y del glutamato, es una forma de almacenamiento del nitrógeno ya que es relativamente inerte.

Investigaciones recientes efectuadas por Yañez (101) indican que la actividad de la GS de los cotiledones de Jack Bean se mantiene en niveles bajos, sobre todo en los primeros días. Esto, aunado a una actividad de la GOGAT muy baja en los días 0-3 de dicho tejido (de hecho la actividad más baja encontrada para la glutamato sintasa) nos indica que la ruta GS/GOGAT no es funcional en los días mencionados o lo es en una escala muy pequeña. Puesto que es precisamente en estos días cuando los cotiledones presentan las mayores concentraciones de amonio (fig. 3.14) debe existir una vía alterna o vías alternas para la asimilación de este metabolito.

Observando el comportamiento de la AS de los cotiledones vemos que sus mayores actividades aparecen entre los días 0 y 3 del crecimiento lo cual la convierte en una vía importante de asimilación del amonio en los cotiledones en dichos días.

A medida que los cotiledones maduran (del cuarto día en adelante), la ruta GS/GOGAT adquiere un papel preponderante ya que la actividad descendente de la GOGAT-NADH está acoplada con un incremento considerable de la GOGAT-Fd compatible con un aumento en la actividad de la GS.

III.3. POZAS METABOLICAS

Con respecto a las pozas metabólicas, se estudió la presencia de nitratos, nitritos, aminoácidos totales, urea y amonio en cada uno de los cuatro tejidos de C. ensiformis durante los siete primeros días de crecimiento. Cada punto de las gráficas es el promedio de dos experimentos. Los resultados se presentan a continuación:

A lo largo de todos los días de estudio se encontró en los cotiledones una concentración sorprendentemente elevada de nitratos, mientras que en los demás tejidos fue siempre menor. Tanto en tallo como en raíz y del cuarto día en adelante, la concentración de nitratos fue muy similar y menor que en las hojas, manteniéndose más bien constante en estos tres tejidos la concentración de este metabolito. En el tercer día de germinación la concentración de nitratos en el tallo fue notablemente mayor que en las raíces. Ver fig. 3.10.

En cuanto a la poza metabólica de nitritos, se encontró a este metabolito en los cuatro tejidos y siempre con una menor concentración a la de los nitratos. La relación de la menor concentración de nitratos encontrada en la planta (raíz) con respecto a la mayor concentración de nitritos (hojas) fue de 16.7 : 1.

En general, las concentraciones de nitritos en los cotiledones, raíz y tallo presentaron un comportamiento circadiano siendo los cotiledones el tejido que presentó las mayores variaciones, seguido del de la raíz y después por el del tallo. La concentración de los nitritos en las hojas fue casi constante entre el cuarto y el sexto día presentando en el séptimo un aumento considerable siendo ésta la mayor concentración de nitritos observada en los cuatro tejidos (fig. 3.11).

Con respecto a la poza metabólica de aminoácidos en la planta, ésta fue siempre mayor que las dos anteriores. Tanto en la raíz como en los cotiledones se observó un comportamiento circadiano en la concentración de aminoácidos con respecto al tiempo de crecimiento, siendo los cotiledones el tejido en donde se encontró la mayor concentración de aminoácidos libres.

La concentración de aminoácidos en el tallo fue siempre mayor que en la raíz y que en las hojas (a excepción del séptimo día).

La concentración de aminoácidos en las hojas y en la raíz fue muy parecida los días 4 y 5 presentando las hojas un aumento a partir del quinto día para tener en el séptimo una concentración de aminoácidos similar a las de los cotiledones y del tallo (fig. 3.12).

La poza metabólica de urea presentó particularidades que no se encontraron en las demás. En los cotiledones no se encontró en ningún día presencia de urea mientras que en las hojas se encontró a este metabolito sólo en el cuarto día. Por otra parte, en el tallo la concentración de urea fue siempre mayor que las concentraciones de nitratos, nitritos, aminoácidos y amonio. Lo mismo se encontró para raíz en los días 6 y 7, mientras que en los días anteriores la concentración de urea en

este tejido fue menor que la encontrada en el tallo (figura 3.13).

Las concentraciones de amonio tanto en los cotiledones como en la raíz y en el tallo mostraron una notable disminución a medida que transcurría el tiempo de germinación. Para cada uno de estos tejidos se encontró en los primeros días concentraciones de amonio mayores a las de nitratos, nitritos y aminoácidos libres siendo en los últimos días similares las concentraciones de amonio a las de los otros tres metabolitos.

El único tejido que mostró un ascenso constante en la concentración de amonio fue el de hoja, si bien la mayor concentración encontrada para este tejido (séptimo día) no es de la misma magnitud que las encontradas en los primeros días en el tallo, en los cotiledones y en la raíz de esta planta. Véase fig. 3.14.

Las concentraciones de nitritos encontradas experimentalmente en los cuatro tejidos de la planta fueron apreciablemente menores que las de los otros metabolitos estudiados, no habiendo además una variación importante entre los diferentes tejidos.

Puesto que la planta cuenta con una poza metabólica de nitratos muy importante, sobre todo en los cotiledones, y siendo los nitritos un metabolito intermediario en la cadena de reacciones enzimáticas: nitrato reductasa \longrightarrow nitrito reductasa \longrightarrow enzimas reasimiladoras del amonio, esto nos está indicando que las enzimas involucradas en dicha cadena de reacciones tienen un papel sobresaliente en el metabolismo nitrogenado de esta leguminosa.

Los datos experimentales indican también que los cotiledones constituyen un tejido con una alta capacidad para almace-

cenar nitratos y aminoácidos libres.

Los nitratos son la fuente principal de nitrógeno para las plantas de cosecha y en el caso de las leguminosas la fijación nodular del nitrógeno atmosférico constituye una vía muy importante de abastecimiento de nitrógeno para la planta (79). Actualmente hay mucha preocupación acerca del impacto ecológico y nutritivo de los fertilizantes de nitratos y a pesar de su importancia agrícola y biológica son todavía muy recientes los estudios detallados acerca del proceso de asimilación de los nitratos y de su regulación.

El proceso del consumo de nitratos por las plantas superiores difiere del de otros nutrientes inorgánicos. El destino de los nitratos en la planta puede ser acumulación o bien conversión (10).

En el caso de Canavalia ensiformis, las concentraciones de nitratos y aminoácidos libres en el tallo, raíz y hojas son sensiblemente menores a las encontradas en los cotiledones. Esto puede estar indicando que estos metabolitos son transportados de los cotiledones a los demás tejidos para ahí ser transformados en otros compuestos importantes para el metabolismo de la planta. Con respecto a los aminoácidos libres, Rosenthal encontró que la reserva de canavanina en los cotiledones de C. ensiformis llega a constituir hasta un 5% del peso seco total de este tejido y que a medida que los cotiledones maduran dicha reserva va disminuyendo mientras que en los otros tejidos el nivel de canavanina se incrementa (73).

La disminución de la poza metabólica de amonio con respecto al tiempo de crecimiento en todos los tejidos (a excepción de las hojas) puede obedecer a varias causas:

-Puede explicarse como el resultado de una alta asimilación

del amonio por las enzimas de cualquiera de las tres rutas conocidas, como en el caso del tallo y de la raíz cuyas enzimas de la ruta GS/GOGAT presentan una actividad elevada.

-Puede ser el resultado de exportar amonio a otros tejidos como en el caso de los cotiledones, exportando amonio a las hojas de manera que a medida que este metabolito disminuye en los cotiledones, aumenta en las hojas.

Cualquiera que sea el destino del amonio en cada uno de los tejidos la planta debe evitar que su concentración exceda las necesidades inmediatas pues de lo contrario se convierte en un agente tóxico.

Las plantas superiores no sintetizan urea como una forma de excreción del nitrógeno de desecho y la urea que se forma generalmente está sujeta a una hidrólisis rápida por la ureasa a CO_2 y amonio. La ureasa es una enzima ampliamente distribuída en las plantas superiores (75).

En Canavalia ensiformis L. se ha encontrado recientemente (72) una actividad muy elevada de ureasa en los cotiledones. Lo anterior concuerda con los datos presentados en este estudio en donde se observa una ausencia total de urea en los cotiledones debido a la elevada actividad de ureasa de este tejido.

En el caso del tallo, una concentración importante de urea explica la presencia de una actividad importante de ureasa (72) y de las enzimas de la ruta GS/GOGAT en este tejido.

III.4. DESTINO DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA L-CANAVANINA EN CANAVALIA ENSIFORMIS L.

Estudios recientes efectuados por Román (72) en Canavalia ensiformis indican que el tallo es un tejido donde hay una gran actividad de arginasa. La gran cantidad de urea producida por la arginasa del tallo puede ser transportada a los cotiledones y ser degradada ahí a amonio. El tallo presenta además una actividad importante de ureasa y puesto que en este estudio este tejido presenta las actividades más importantes para las enzimas de la ruta GS/GOGAT, estos datos sugieren que el tallo es el tejido en donde preferencialmente la reserva de canavanina de los cotiledones es catabolizada para ser aprovechada por la planta. Mientras que la raíz no tiene participación alguna durante este proceso, las hojas sí la tienen, aunque en una pequeña proporción.

Un metabolismo nitrogenado de esta índole en Canavalia ensiformis le permite regular de una manera estricta la utilización de sus reservas de canavanina y de urea ya que se encuentran en tejidos diferentes.

CANAVALIA ENSIFORMIS

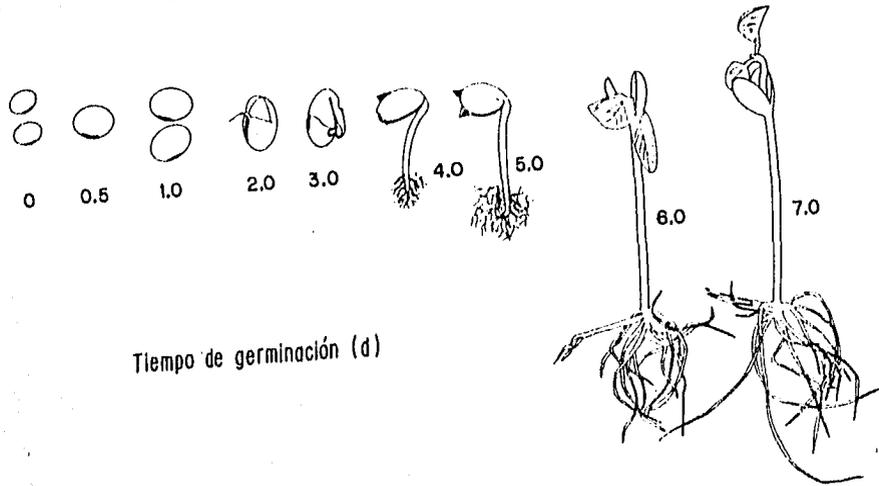


FIGURA 3.1

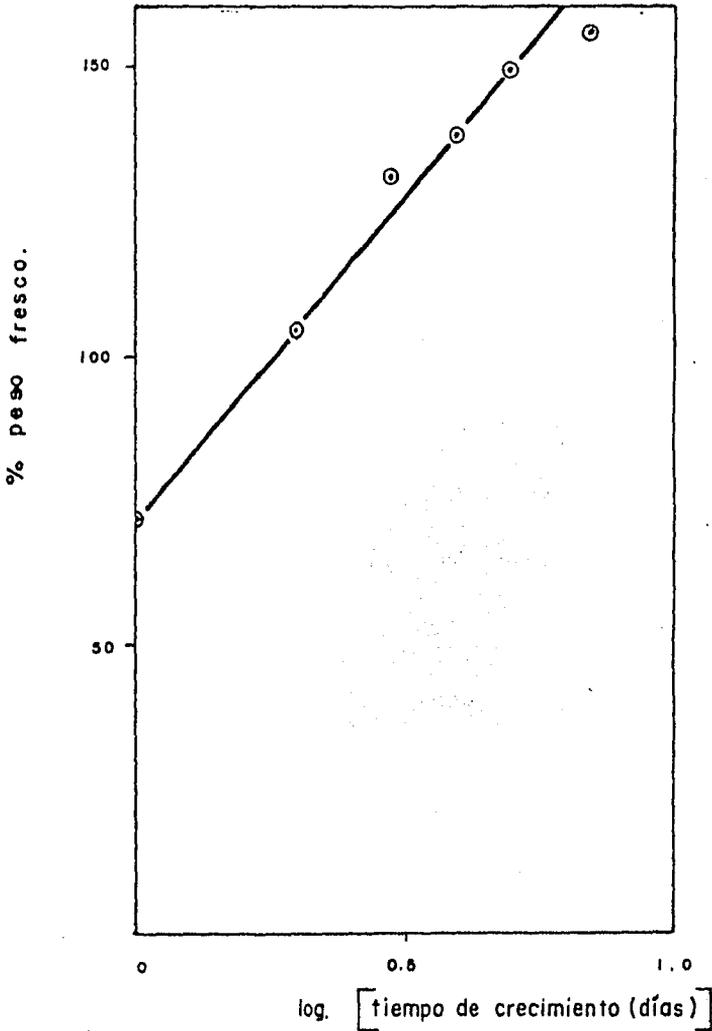


FIG. 3.2 Variación en el porcentaje del peso fresco con respecto al logaritmo del tiempo de crecimiento.

(COTILEDON).

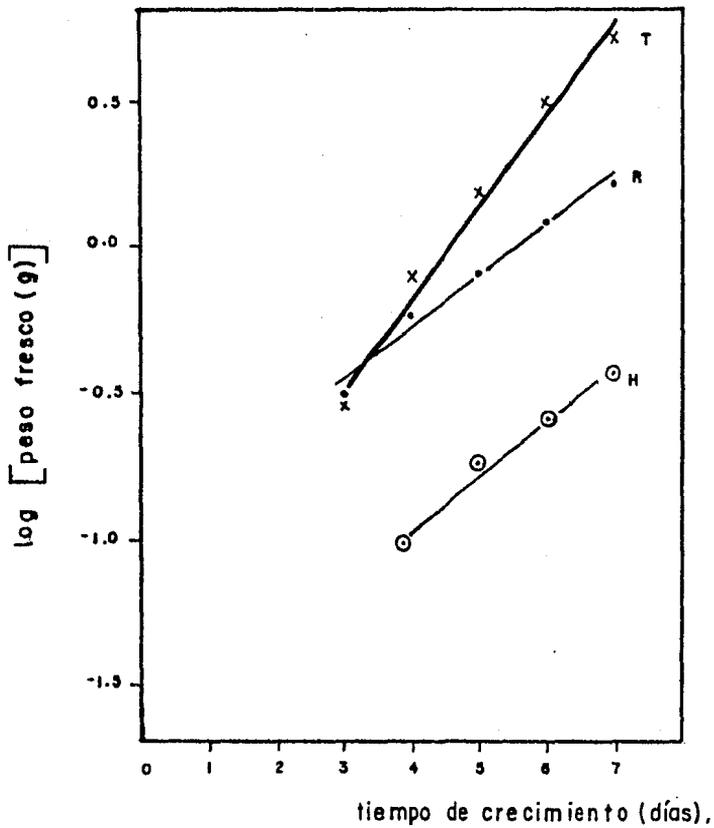


FIG. 3.3 Variación del logaritmo del peso fresco con respecto al tiempo de crecimiento. (T= Tallo, R= Raíz, H=Hoja.)

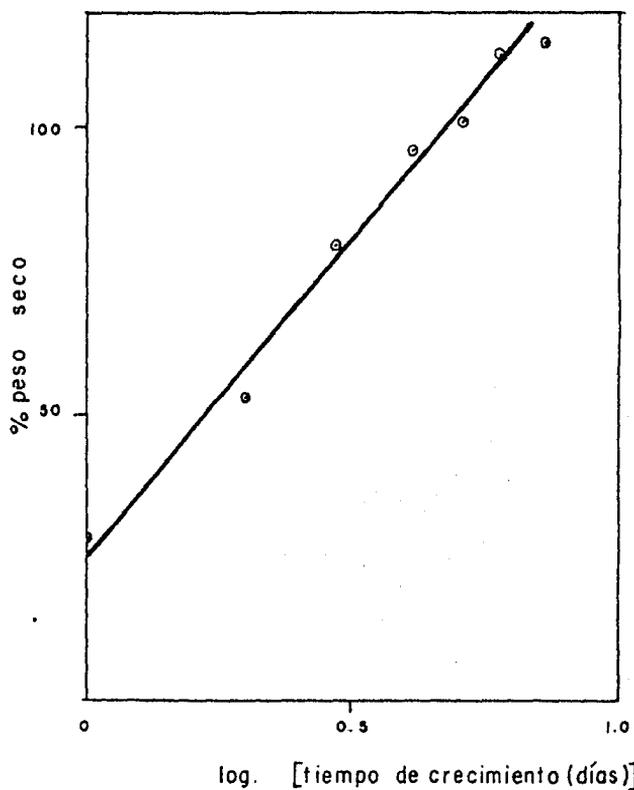


FIG. 3.4 Variación en el porcentaje del peso seco con respecto al logaritmo del tiempo de crecimiento (Cotiledón).

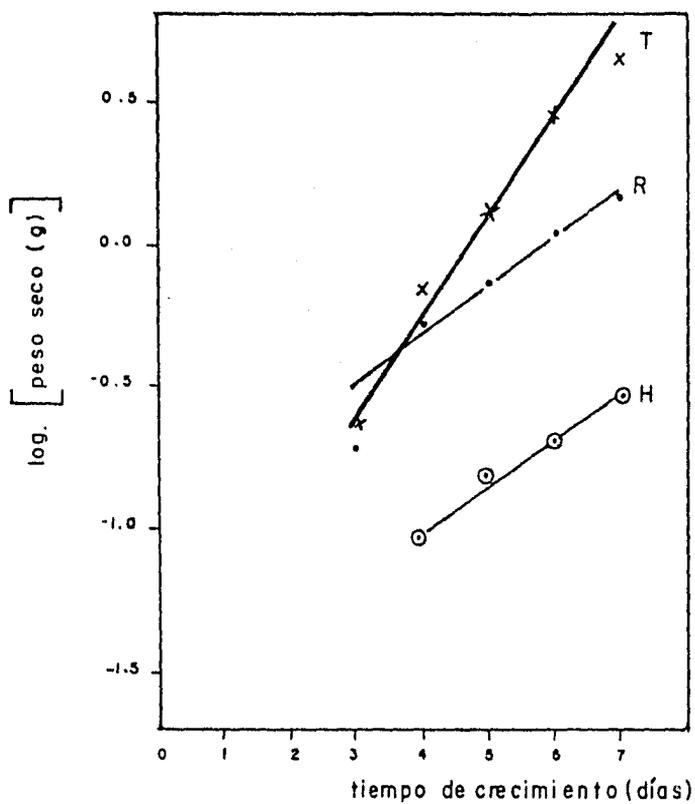


FIG. 3.5 Variación del logaritmo del peso seco con respecto al tiempo de crecimiento. (T = Tallo, R = Raíz, H = Hoja).

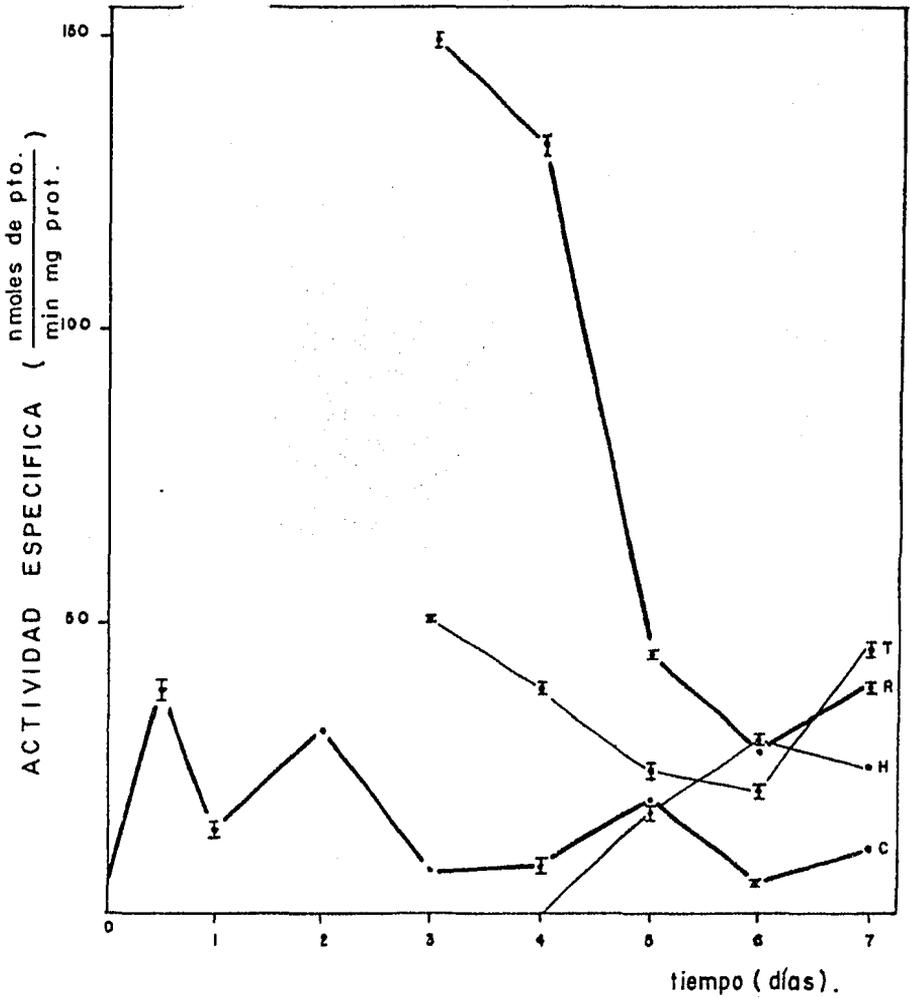


FIG. 3.6 Actividades enzimáticas de asparagino sintetasa en los 7 primeros días de germinación de Canavalia ensiformis L. (C=Cotiledón, R=Raíz, T=Tallo, H=Hoja.)

ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\frac{\text{nmoles de NADH}}{\text{min mg prot.}}$)

GOGAT-NADH

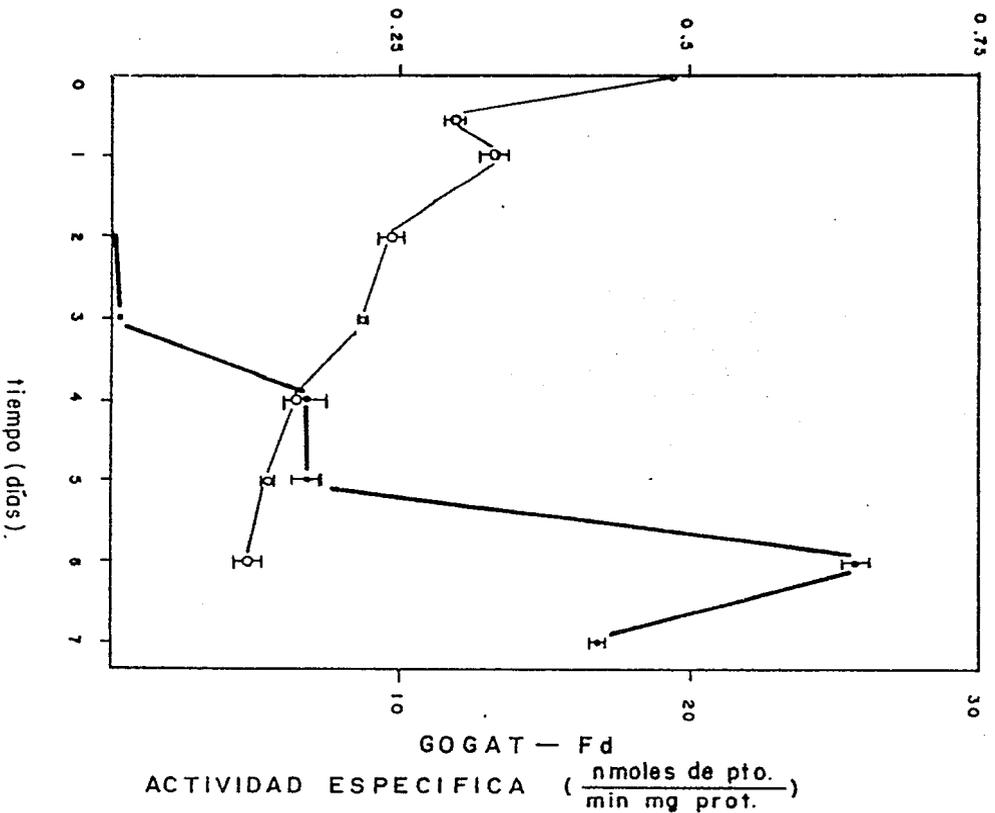


FIG. 3.7 Actividades enzimáticas de glutama-
to sintasa dependiente de ferredoxina y NADH
en el colledón de Canavalia ensiformis L.
(o) GOGAT-NADH, (●) GOGAT-Fd.

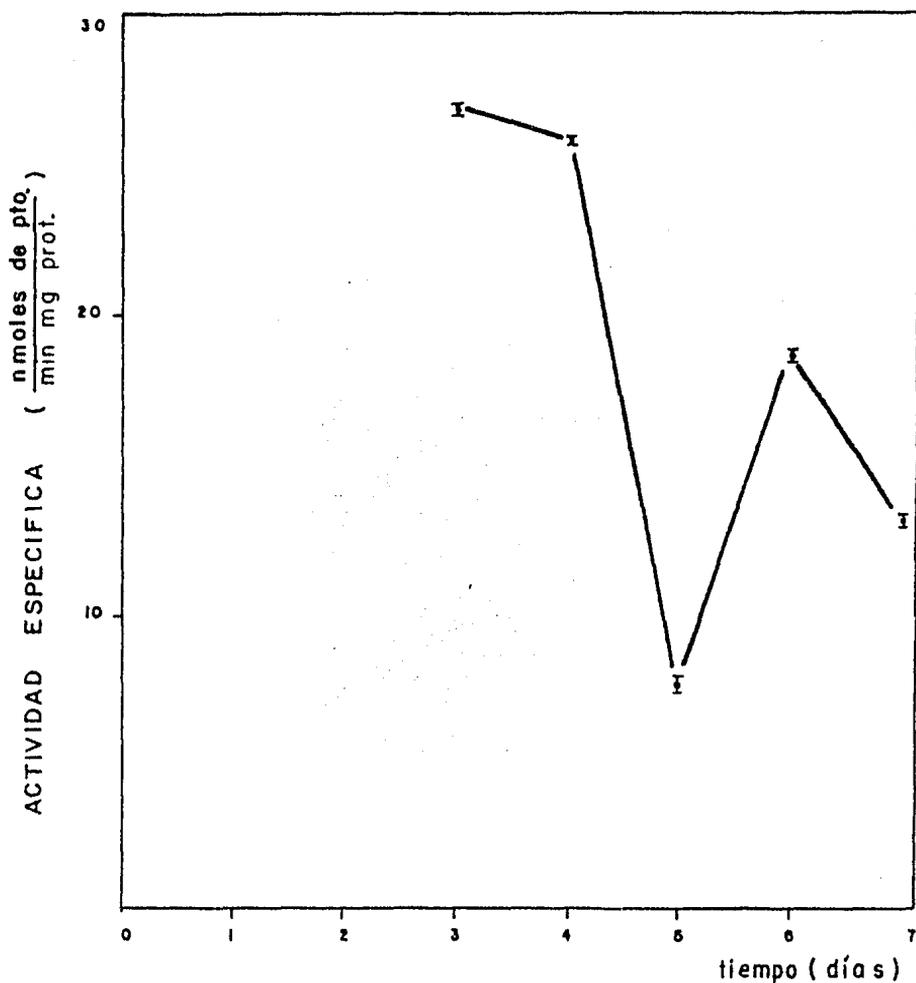


FIG. 3.8 Actividad enzimática de glutamato sintasa dependiente de NADH en raíz de Canavalia ensiformis L.

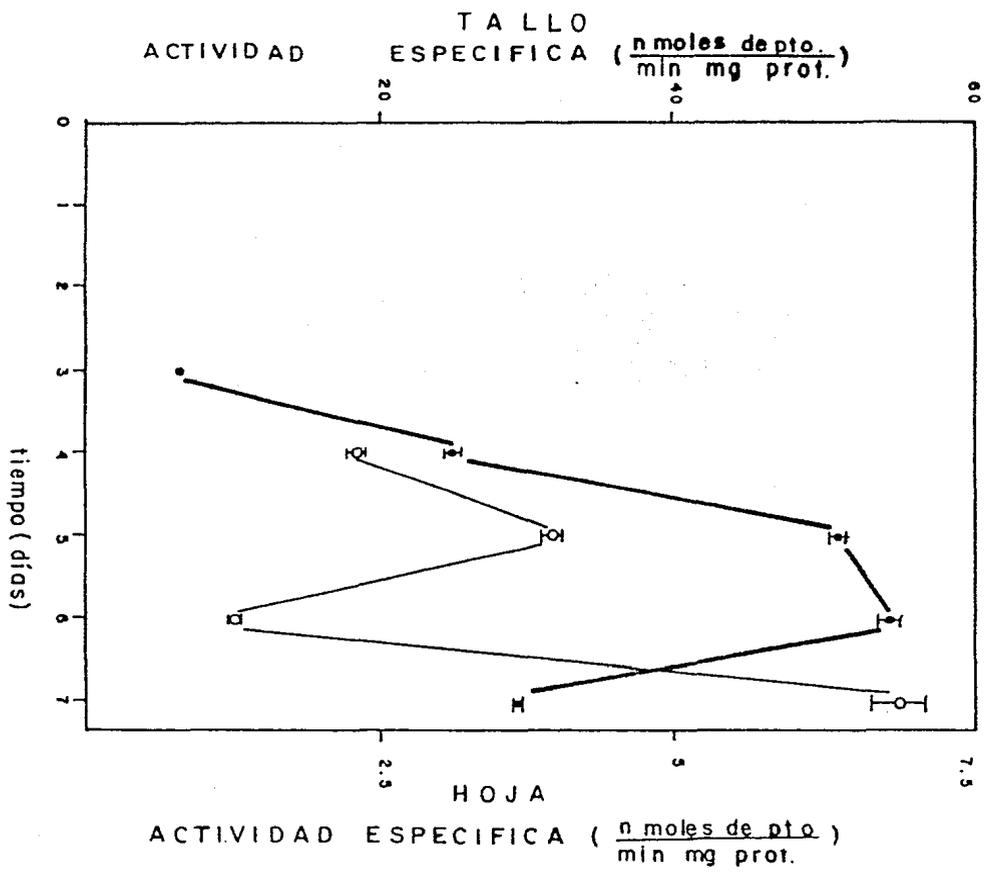


FIG. 3.9 Actividades enzimáticas de glu- xilna dependiente de ferredoxina en tallo (●) y en hoja (○).

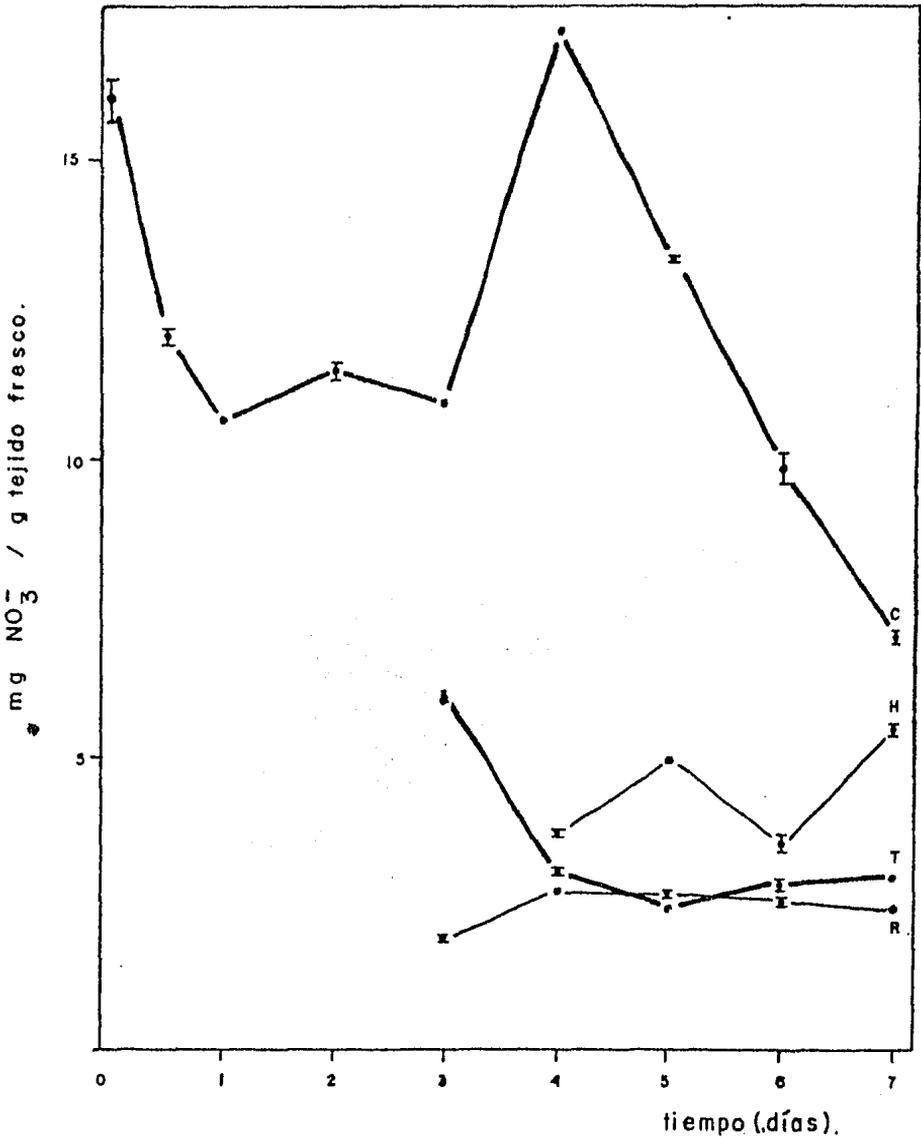


FIG. 3.10 Variación de la poza metabólica de nitratos en los 7 primeros días de germinación en *C. ensiformis* L. (C= cotiledón ; T= tallo ; H= hoja ; R= raíz).

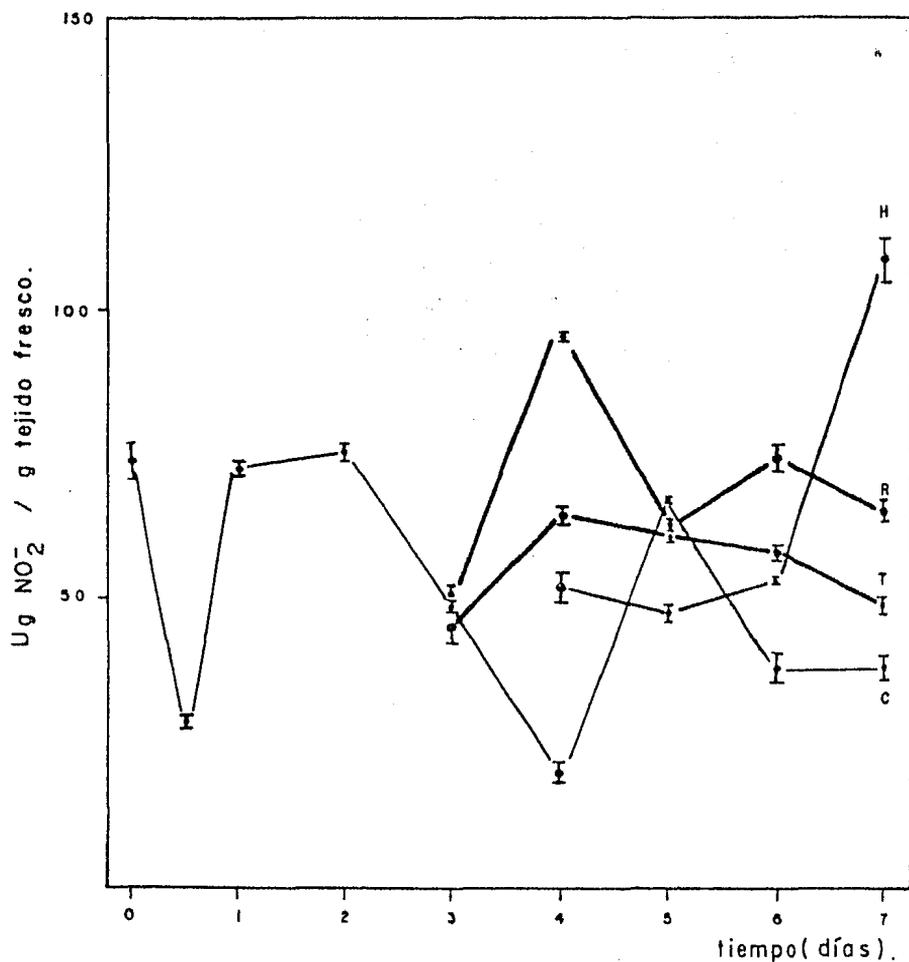


FIG. 3.11 Variación de la poza metabólica de nitritos en los 7 primeros días de germinación en *C. ensiformis* L. (C = cotiledón; R = raíz; H = hoja; T = tallo).

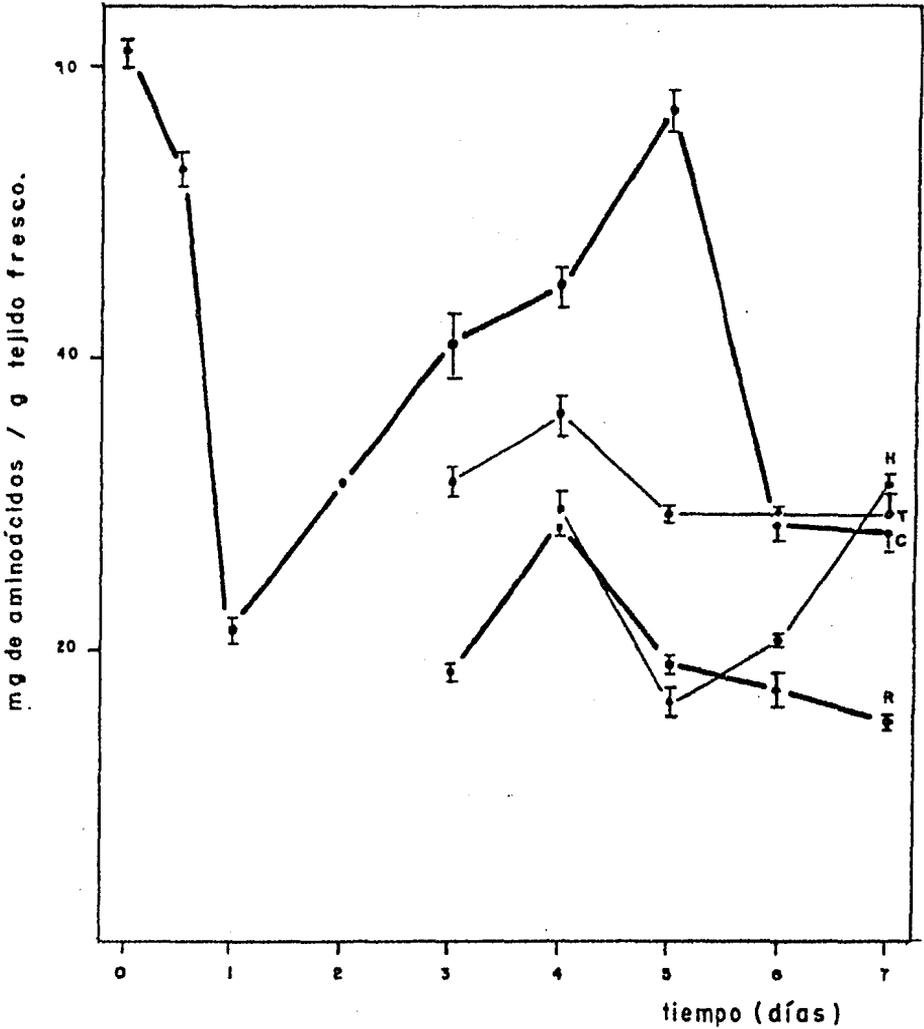


FIG. 3.12 Variación de la poza metabólica de aminoácidos en los 7 primeros días de germinación en C. ensiformis L. (C= cotiledón; R= raíz; H= hoja; T= tallo.)

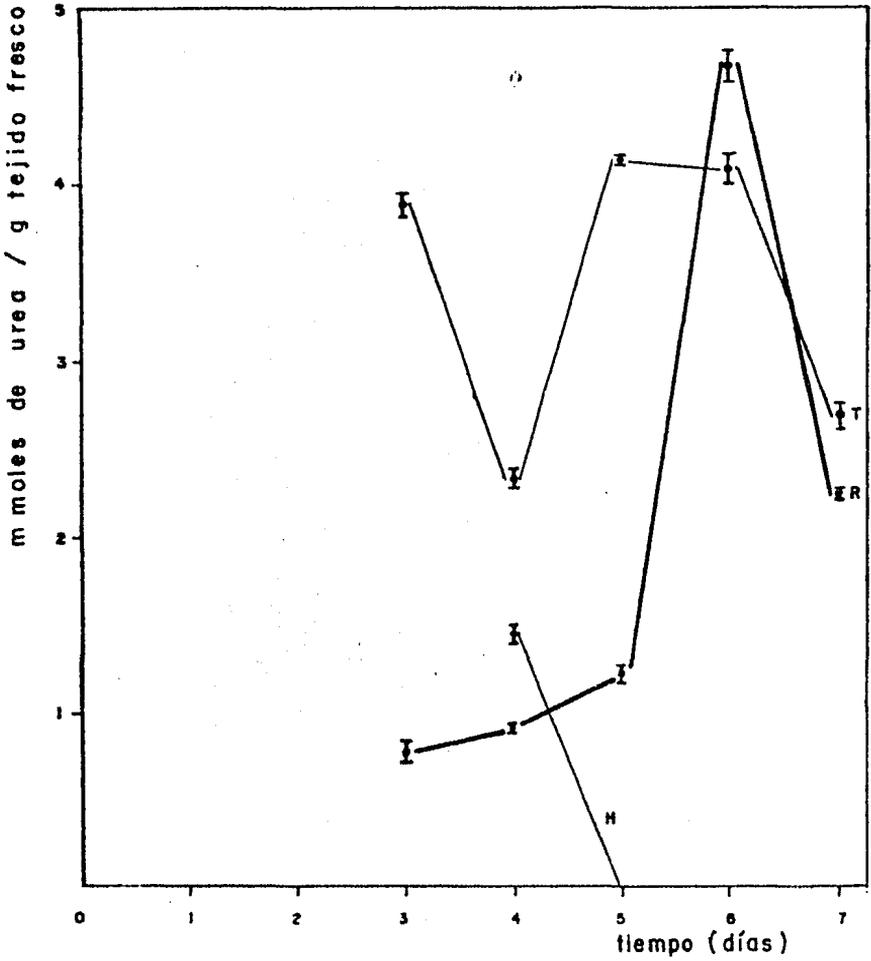


FIG. 3.13. Variación de la poza metabólica de urea en los 7 primeros días de germinación en *C. ensiformis* L.

(R = raíz; H = hoja; T = tallo)

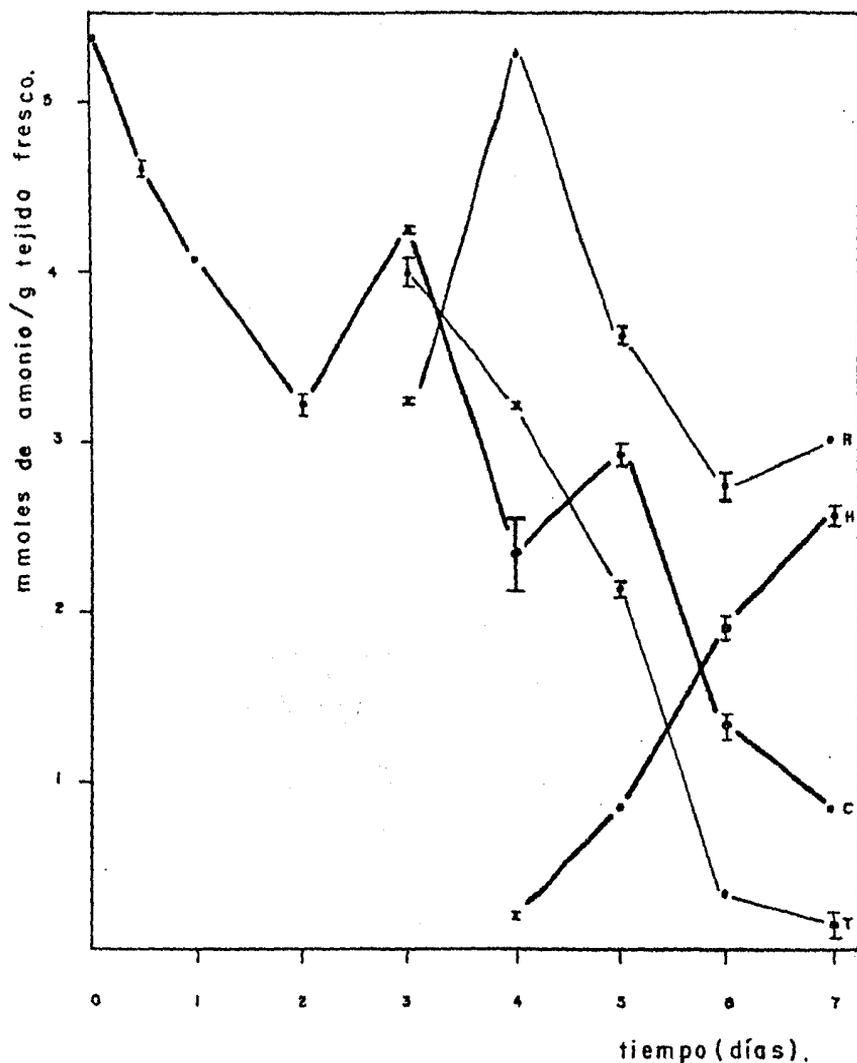


FIG. 3.14 Variación de la poza metabólica de amonio en los 7 primeros días de germinación de C. ensiformis L.

(C = cotyledón; R = raíz; H = hoja; T = tallo).

C A P I T U L O I V

C O N C L U S I O N E S

- 1) La ruta GS/GOGAT es una vía muy importante de asimilación del amonio en el tejido del tallo, seguido del de la raíz y después por el de las hojas, en Canavalia ensiformis L.
- 2) Cuando las raíces y el tallo se enfrentan a un exceso de amonio (días 3 y 4 de crecimiento), las vías de asimilación del nitrógeno AS y GS/GOGAT son funcionales a la vez.
- 3) En el caso de las hojas, la importancia de la AS como ruta de incorporación del amonio aumenta a partir del cuarto día como respuesta a un incremento de la concentración del amonio en este tejido.

- 4) En el caso de los cotiledones, cuando este tejido presenta la mayor concentración del amonio (días 0-3 de crecimiento), la planta lo transforma en asparagina, una forma no tóxica de almacenamiento del nitrógeno que por ser menos activa que la glutamina no altera al metabolismo celular.
- 5) Cuando en el tejido de los cotiledones no hay exceso de amonio (cotiledones maduros), la ruta GS/GOGAT tiene un papel muy importante en la reasimilación del amonio.
- 6) Las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa deberán tener un papel importante en el metabolismo nitrogenado de los cuatro tejidos de Canavalia ensiformis L., principalmente en los cotiledones y en las hojas.
- 7) Los nitratos y los aminoácidos libres constituyen formas de almacenamiento del nitrógeno en los cotiledones de la planta, de donde son transportados al tallo, a las raíces y a las hojas para ahí ser catabolizados.
- 8) La canavanina almacenada en los cotiledones de C. ensifor
mis L. es transportada principalmente al tallo en donde es hidrolizada por la arginasa. Parte de la urea producida de esta manera es transportada a los cotiledones en donde es hidrolizada por la ureasa presente a amonio y

la urea remanente es hidrolizada por la ureasa del tallo.

- 9) La disminución del exceso de amonio en los tejidos del tallo y de la raíz ocurre mediante la acción de las enzimas de la ruta GS/GOGAT.

- 10) La disminución del exceso del amonio en los cotiledones se efectúa mediante la exportación de este metabolito a las hojas (principalmente) en donde tanto la vía AS como la GS/GOGAT lo incorporan al metabolismo intermedio.

C A P I T U L O V

B I B L I O G R A F I A

- 1) Arima, Y., Glutamate synthase in rice root extracts and the relationship among electron donors, nitrogen donors and its activity. *Plant & Cell Physiol.*, 6 : 955-961 (1978).
- 2) Atkins, C.A., Pate, J.S. And Sharkey, P.J., Asparagine metabolism -key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.*, 56 : 807-812 (1975).
- 3) Avron, M., Photophosphorylation by Swisschard chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 : 257-273 (1960).
- 4) Beevers, L. and Hageman, R.H., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20: 495-522 (1969). Citado en: Lea, P.J. and Miflin, B.J., Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants, *Nature (London)*, 251 : 614-616 (1974).
- 5) Beevers, L. and Storey, R., Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*, *Plant Physiol.*, 57 : 861-866 (1976).

- 6) Bill, J., Lackey, A.J.A. and Polhill, P.M., Systematic significance of canavanine in the papilionoideae (Faboideae), *Biochem. Lyst. Ecol.* 6 : 201-212 (1978).
- 7) Bilisski, E. and Mc Connell, W.B., The utilization of acetate for aminoacid biosynthesis, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 : 357-364 (1957).
- 8) Birdsong, B.A., Alston, B. and Turner, B.L., Distribution of canavanine in the family Leguminosae as related to phyletic grouping, *Can. J. Bot.*, 38 : 499-505 (1960).
- 9) Boland, M. and Benny, A.G., Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules, *Eur. J. Biochem.* 79 : 355-362 (1977).
- 10) Breteler, H. and Siegerist, M., Effect of ammonium on nitrate utilization by roots of Dwarf Bean, *Plant Physiol.*, 75 : 1099-1103 (1984).
- 11) Brown, C.M., Burn, V.J. and Johnson, B., *Nature New Biol.*, 246 : 115-116 (1973). Citado en: Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants, *Nature (London)*, 251 : 614-616 (1974).
- 12) Buchanan, J.M., Formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase. In: *The enzymes of glutamine metabolism*, Academic Press, New York (1972).
- 13) Carlini, C.R. and Guimarães, J.A., Isolation and characterization of a toxic protein from Canavalia ensiformis (Jack Bean) seeds, distinct from concanavaline A, *Toxicon.*, 19 : 667-676 (1981).

- 14) Cedar, H. and Scharz L.H., The asparagine synthetase of E. coli. I. Biosynthetic role of the enzyme, purification and characterization of the reaction products, J. Biol. Chem., 244 : 4112-4121 (1969).
- 15) Cocking, E.C. and Yemm, E.W., Estimation of aminoacids by ninhydrin, Bioch. J., 58 : XII (1954).
- 16) Cronquis, A., An integrated system of classification of flowering plants, Columbia University Press, New York (1981).
- 17) Cronquis, A., The evolution and classification of flowering plants, edited by Houghton & Mifflin, Boston (1968).
- 18) Chibnal, A.C., Protein metabolism in the plant, New Haven : Yale University Press (1939).
- 19) Chiu, J.Y. and Shargool, P.D., Importance of glutamate synthase in glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures, Plant Physiol. 63 : 409-415 (1979).
- 20) Damodaran, M. and Narayanan, K.G.A., A comparative study of arginase and canavanase, Biochem. J., 34 : 1449-1459 (1940).
- 21) Denny, O.T., In vitro synthesis of ureidohomoserine by an enzyme from Jack Bean (Canavalia ensiformis) leaves, Plant Physiol. 55 : 975-977 (1975).
- 22) Dougall, D.K., Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures, Biochem. Biophys. Res. Comm., 58 : 639-646 (1974).
- 23) Duke, J.A., Handbook of legumes of world economic importance, Plenum Press, New York (1981).

- 24) Elliot, W.H., Isolation of glutamine synthetase and glutamo transferase from green peas, *J. Biol. Chem.*, 201 : 661-672 (1953).
- 25) Forti, C., Tognori, C. and Parisi, B., Purification from pea leaves of a phosphatase that attacks nucleotides, *Biochim. Biophys. Acta*, 62 : 251-260 (1962).
- 26) Fowler, M.W., Jessup, W. and Sarkissian, G.S., Glutamate synh thetase type activity in higher plants, *FEBS Letters*, 46 : 340-342 (1974).
- 27) Givan, C.V. and Leech, R.M., Biochemical autonomy of higher plant chloroplasts and their synthesis of small molecules, *Biol. Rev.*, 46 : 409-428 (1971).
- 28) Gómez Noriega, I.G., Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el metabolismo nitrogenado y el contenido de alcaloides de Catharantus roseus, Tesis de licenciatura, Fac. de Química, UNAM (1984).
- 29) Haystead, A., *Planta*, 111 : 271-274 (1973). Citado en: Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants, *Nature (London)*, 251 : 614-616 (1974).
- 30) Horowitz, B. and Meister, A., Glutamine-dependent asparagine synthetase from leukaemia cells, *J. Biol. Chem.*, 247 6708-6719 (1972).
- 31) Kaplan, A., Urea nitrogen and urinary amonnia, *Stand. Methods Clin. Chem.*, V : 245-255 (1965).
- 32) Kern, R. and Chrispeels, M.J., Influence of the axis on the

- enzymes of protein and amide metabolism in the cotyledons of Mung Bean seedlings, *Plant Physiol.*, 62 : 815-819 (1978).
- 33) Kessler, C., Canavalia ensiformis en Yucatán: antecedentes y resultados de la campaña 1982/83, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Yucatán (1983).
- 34) Kolloffel, L.C. and Van Dijke, H.D., Mitochondrial arginase activity from cotyledons of developing and germinating seeds of Vicia faba, *Plant Physiol.*, 55 : 507-511 (1975).
- 35) Lackey, J.A., *Advances in legume systematics*, edited by Polhill & Raven, Royal Botanic Gardens, New England (1981).
- 36) Lea, P.J. and Fowden, L., The purification and properties of glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from Lupinus albus, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 192 : 13-26 (1975).
- 37) Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants, *Nature (London)*, 251 : 614-616 (1974).
- 38) Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Glutamate synthase in blue-green algae, *Biochem. J.*, 149 : 403-409 (1975).
- 39) Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Transport and metabolism of asparagine within the plant, In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. V, (B.J. Mifflin ed.), Academic Press, New York (1980).
- 40) Lewis, O.A.M., An ^{15}N - ^{14}C study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of Datura stramonium L., *J. Exp. Bot.*, 26 : 361-366 (1975).
- 41) Lewis, O.A.M. and Pate, J.S., The significance of transpi

- rationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.), J. Exp. Bot., 24 : 596-606 (1973).
- 42) Loyola, V.V.M., Metabolismo nitrogenado en maíz, Tesis de doctorado, División de Estudios de Posgrado, Fac. de Química, UNAM (1983).
- 43) Loyola, V.V.M., Sánchez, E. y Murillo, G.E., El metabolismo del nitrógeno en las plantas. *Naturaleza*, 2:112 (1981).
- 44) Match, T. and Takahashi, E., A rapid and sensitive assay for ferredoxin-glutamate synthase, Bull. Res. Int. Food Sci., 43 : 1-6 (1980).
- 45) Match, T. and Takahashi E., Changes in the activities of ferredoxin and NADH-glutamate synthase during seedling development of peas, *Planta*, 154 : 289-294 (1982).
- 46) Match, T., Ida, S. and Takahashi, E., Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.), *Plant & Cell Physiol.*, 21(8) : 1461-1474 (1980).
- 47) Match, T., Susuki, F. and Ida, S., Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme, *Plant & Cell Physiol.*, 20 : 1329-1340 (1979).
- 48) Match, T., Takahashi, E. and Ida, S., Glutamate synthase in developing pea cotyledons: occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes, *Plant & Cell Physiol.*, 20(7) : 1455-1459 (1979).
- 49) Matsumoto, H., Wakiuchi, N. and Takahashi, E., Changes of starch synthetase activity of cucumber leaves during ammonium toxicity, *Physiologia Pl.*, 24 : 102-107 (1971).

- 50) McKee, H.S., Nitrogen metabolism in plants, Clarendon Press, Oxford (1962).
- 51) Meers, J.L., Tempest, P.W. and Brown, C.M., Glutamine (amide) : 2-oxoglutarate aminotransferase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria, J. Gen. Microbiol., 64 : 187-194 (1970).
- 52) Meister, A., The enzymes, Vol. X, Academic Press, New York (1974).
- 53) Mifflin, B.J., Planta, 116 : 207-224 (1974). Citado en: Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants, Nature (London), 251 : 614-616 (1974).
- 54) Mifflin, B.J., The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves, Plant Physiol., 54 : 550-555 (1974).
- 55) Mifflin, B.J. and Lea, P.J., Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots, Biochem. J., 149 : 403-409 (1975).
- 56) Mifflin, B.J. and Lea, P.J., The pathway of nitrogen assimilation in plants, Phytochemistry, 15 : 873 (1976).
- 57) Miller, R.E. and Stadtman, E.R., Glutamate synthase from Escherichia coli, an iron-sulfide flavoprotein, Phytochemistry, 15 : 873 (1976).
- 58) Nagatani, H., Shimizu, M. and Valentine, R.C., The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria, Arch. Mikrobiol., 79 : 164-175 (1971).

- 59) Nicholas, D.J. and Nason, A.C., Determination of nitrate and nitrite, *Methods of Enzymology*, 23 : 491-503 (1971).
- 60) Oaks, A., Jones, K. and Misra, S., A comparison of glutamate synthase obtained from maize endosperms and roots, *Plant Physiol.*, 63 : 793-795 (1979).
- 61) O'Neal, D. and Joy, K.W., Glutamine synthetase of pea leaves, *Plant Physiol.*, 54 : 773-779 (1974).
- 62) O'Neal, D. and Joy, K.W., Localization of glutamine synthetase in chloroplasts, *Nature New Biol.*, 246 : 61-62 (1973).
- 63) Pate, J.S., Sharkey, P.J. and Lewis, O.A.M., Phloem bleeding from legume fruits -a technique for study of fruit nutrition, *Planta*, 120 : 229-243 (1974).
- 64) Pate, J.S., Sharkey, P.J. and Lewis, O.A.M., Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studies by a phloem bleeding technique, *Planta*, 122 : 11-26 (1975).
- 65) Patnaik, R., Barker, A.V. and Maynard, D.N., effects of ammonium and potassium ion on some physiological and biochemical processes of excised cucumber cotyledons, *Physiologia Pl.*, 27 : 32-36 (1972).
- 66) Peterson, G.L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Analytical Biochem.*, 83 : 346-356 (1977).
- 67) Pike, D.C. and Beevers, L., Kinetic studies on asparagine synthetase from Mung Beans (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) with a phosphonate analogue of a proposed reaction inter-

- mediate, *Biochimica et Biophysica Acta*, 708 : 203-209 (1982).
- 68) Rhodes, D., Rendon, G.A. and Stewart, G.R., The regulation of ammonia assimilating enzymes in Lemma minor, *Planta*, 129 : 203-210 (1976).
- 69) Rognes, S.E., A glutamine-dependent asparagine synthetase from yellow lupin seedlings, *FEBS Letters*, 10 : 62-66 (1970).
- 70) Rognes, S.E., Anion regulation of Lupin asparagine synthetase : chloride activation of the glutamine-utilizing reactions, *Phytochemistry*, 19 : 2287-2293 (1980).
- 71) Rognes, S.E., Glutamine-dependent asparagine synthetase from Lupinus luteus, *Phytochemistry*, 14 : 1975-1982 (1975).
- 72) Román Gaspar, M.E., Función de las enzimas ureasa y arginasa durante los primeros estadios del desarrollo de Canavalia ensiformis L., Tesis de licenciatura, Fac. de Química, UNAM (en prensa).
- 73) Rosenthal, G.A., Investigations of canavanine biochemistry in the Jack Bean plant, Canavalia ensiformis (L.). I. Canavanine utilization in the developing plant, *Plant Physiology*, 46 : 273-276 (1970).
- 74) Rosenthal, G.A., Investigations of canavanine biochemistry in the Jack Bean plant, Canavalia ensiformis (L.)DC. II. Canavanine biosynthesis in the developing plant, *Plant Physiology*, 50 : 328-331 (1972).
- 75) Rosenthal, G.A., L-canavanine metabolism in Jack Bean, Canavalia ensiformis (L.) DC. (leguminosae), *Plant Physiology*, 69 : 1066-1069 (1982).

- 76) Rosenthal, G.A., Nitrogen allocation for L-canavanine synthesis and its relationships to chemical defense of the seed, *Biochem. Syst. Ecol.*, 5 : 219-220 (1977).
- 77) Rosenthal, G.A., The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine, *Quat. Rev. Biol.*, 52 : 155-178 (1977).
- 78) Rosenthal, G.A. and Naylor, A.W., Purification and general properties of argininesuccinate lyase from Jack Bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC., *Biochem. J.*, 112 : 415-419 (1969).
- 79) Ryle, G., Powell, J.A. and Gordon, A.J., Effect of the source of nitrogen on the growth of fiskeby soya bean, the carbon economy of whole plants, *Ann. Bot.*, 42 : 637-648 (1978).
- 80) Sauer, J., Kaplan L., *Canavalia* beans in American prehistory, *American Antiquity*, 34 : 417 (1969).
- 81) Sims, A.P. and Folkes, B.F., A kinetic study of the assimilation of ¹⁵N-ammonia and the synthesis of amino acids in an exponentially growing culture of *Candida utilis*, *Proc. Roy. Soc. B.*, 159 : 479 (1964).
- 82) Sloger, C., Assimilation of ammonia by glutamine synthetase and glutamate synthase in N₂-fixing bacteroids from soy bean nodules, *Plant Physiol.*, 51 : s34 (1973).
- 83) Sodek, L. and Da Silva, W.J., Glutamate synthase: a possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm, *Plant Physiol.*, 60 : 602-605 (1977).
- 84) Sodek, L., Biosynthesis of lysine and other aminoacids in developing maize endosperm, *Phytochemistry*, 15 : 1903-1906

(1976).

- 85) Stanislaus, J., Kinghorn, A.O. and Balandrin, M.F., Toxic constituents of legume forage plants, *Economic Botany*, 35: 321-355 (1981).
- 86) Stewart, G.R., Mann, A.F. and Fentem, P.A., Enzymes of glutamate formation, In: the Biochemistry of Plants, Vol. V, (B.J. Mifflin ed.), Academic Press, New York (1980).
- 87) Storey, R. and Beevers, L., Enzymology of glutamine metabolism related to senescence and seed development in the pea (*Pisum sativum* L.), *Plant Physiol.*, 61 : 494-500 (1978).
- 88) Storey, R. and Reporter, M., Aminoacid metabolism in developing soybeans (*Glycine max*): glutamate synthase in the cotyledons, *Can. J. Bot.*, 56 : 1349-1356 (1978).
- 89) Streeter, J.G., In vivo and in vitro studies on asparagine biosynthesis in soybean seedlings, *Arch. Biochem. Biophys.*, 157 : 613-624 (1973).
- 90) Stulen, I. and Oaks, A., Asparagine synthetase in corn roots, *Plant Physiol.*, 60 : 680-683 (1977).
- 91) Stulen, I., Israelstam, G.F. and Oaks, A., Enzymes of asparagine synthesis in maize roots, *Planta*, 146 : 237-241 (1979).
- 92) Summerfield, R.J. and Bunting, A.H., advances in legume science, University of Reading, England (1980).
- 93) Tempest, B.W., Meers, J.L. and Brown, C.M., Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route, *Biochem. J.*, 117 : 405-407 (1970).

- 94) Thompson, J.F., Arginine synthesis, proline synthesis and related processes, In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. V (B.J. Mifflin ed.), Academic Press, New York (1980).
- 95) Trotta, P.P., Platzer, K.E.B., Haschemeyer, T.H. and Meister, A., Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this amidotransferase, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 : 4607-4611 (1974).
- 96) Walker, J.B., An enzymatic reaction between canavanine and fumarate, *J. Biochem.*, 204 : 139-146 (1953).
- 97) Wallsgrave, R.M., Harel, E., Lea, P.J. and Mifflin, B.J., Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants, *J. Exp. Bot.*, 104 : 588-592 (1977).
- 98) Webb, J.L., Analogs of riboflavin and FAD, In: *Enzyme and metabolic inhibitors II*, Academic Press, New York (1966).
- 99) Webster, G.C. and Varner, J.E., Aspartate metabolism and asparagine synthesis in plant systems, *J. Biol. Chem.* 215 : 91-99 (1955).
- 100) Wells, G.N. and Hageman, R.H., Specificity for nicotinamide adenine dinucleotide by nitrate reductase from leaves, *Plant Physiol.*, 54 : 136-141 (1974).
- 101) Yañez Ibarra, A.A., Estudio de las enzimas responsables de la asimilación del amonio en Canavalia ensiformis L., Tesis de licenciatura, Fac. de Química, UNAM (en prensa).