



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“FUNCION DE LAS ENZIMAS UREASA Y ARGINASA
DURANTE LOS PRIMEROS ESTADIOS DEL
DESARROLLO DE CANAVALLA ENSIFORMIS L”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A:

MARIA EUGENIA ROMAN GASPAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	4
I ANTECEDENTES	9
1. Generalidades	9
2. Función de la Canavanina	11
3. Toxicidad de la <u>Canavalia ensiformis L.</u>	13
4. Metabolismo de la canavanina.	22
II MATERIALES Y METODOS	26
1. Material.	26
2. Métodos.	28
III RESULTADOS Y DISCUSION	40
1. Crecimiento de la planta <u>Canavalia ensiformis L.</u>	40
2. Ontogenia de la arginasa.	43
3. Ontogenia de la ureasa.	45
4. Pozas metabólicas.	48
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	75

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

El proveerse de los alimentos indispensables para subsistir ha sido una de las necesidades básicas del hombre desde su aparición en la Tierra. En la actualidad, debido al crecimiento desmedido de la población mundial esto se ha transformado en un verdadero problema, en vista de lo cual se ha incrementado la búsqueda de nuevas opciones para resolverlo.

El presente trabajo es una muestra de esa búsqueda, y forma parte de un extenso proyecto en donde se pretende aprovechar las características de la planta llamada Canavalia ensiformis L para ser utilizada como alimento para animales de interés agropecuario (aves, ganado bovino y

porcino) principalmente, ya que esta planta se da en forma silvestre.

La Canavalia ensiformis L es originaria de las Indias Occidentales, sin embargo su cultivo se ha difundido en toda zona trópic, teniendo la clasificación siguiente (1):

FAMILIA: Leguminosa

Esta familia cuenta con más de 550 géneros y unas 1,500 especies repartidas en todo el mundo. Se caracterizan por poseer raíces provistas de nudosidades debidas a la simbiosis con bacterias del género Rhizobium. Pertenecen a esta familia plantas de cultivo como frijol, haba, lenteja, garbanzo, chícharo, etc.

SUBFAMILIA: Papilionaceae (Lotoideae, Fabaceae)

GENERO: Canavalia

ESPECIE: Ensiformis

Los nombres comunes con que se le conoce son: llaba de burro, judía de puerco, jack bean, sword bean y en ciertas regiones de México se le nombra también como alverjón.

La C.ensiformis es una leguminosa con un rendimiento proteínico del

31.15% (2) comparado con 26.10% del frijol (3). También muestra una gran producción de semillas secas en contraste con otras plantas utilizadas como alimento, ya que por ejemplo en 1981 en Yucatán se obtuvieron 1,800 Kg/ha siendo la producción de maíz y frijol de 1,000 y 400 Kg/ha respectivamente bajo condiciones similares (4).

En base a estas características la Canavalia ensiformis L es una planta digna de tomarse en cuenta como alternativa para resolver el problema alimentario actual. Sin embargo presenta la limitante de contener ciertos factores tóxicos, al igual que otras plantas leguminosas, como son inhibidores de tripsina, inhibidores de subtilisina, hemaglutinas y la presencia de una gran cantidad de canavanina, aminoácido no proteínico, similar en estructura a la arginina, uno de los aminoácidos fundamentales en la formación de las proteínas.

La canavanina es el aminoácido preponderante en la semilla de C.ensiformis, representando el 90% o más del nitrógeno determinado en aminoácidos libres y cerca del 5% del total de peso seco, sirviendo éste como metabolito de reserva de nitrógeno de la semilla (5).

La forma como la planta moviliza al nitrógeno guardado en el grupo guanidinoxil de la canavanina, aún no ha sido claramente elucidada, se han propuesto, para realizar esta movilización, una serie de reacciones hidrolíticas en las cuales la acción combinada de la arginasa y la urea

sa catabolizan a la canavanina con la formación secuencial de canalina y urea, y amonio y dióxido de carbono respectivamente (6).

En base a lo anterior el presente trabajo se realizó con el fin de:

a) Determinar las actividades enzimáticas de la arginasa y la ureasa en los siete primeros días de germinación de la planta, determinándolas en raíz, tallo, hoja y cotiledón.

b) Cuantificar las pozas metabólicas de urea, amonio, aminoácidos totales, nitritos, nitratos y proteínas totales.

Con el fin de obtener un modelo que nos permita explicar la utilización de la canavanina como aminoácido de reserva de la planta.

El objetivo general del presente trabajo es el de iniciar la investigación básica tendiente a comprender la regulación metabólica de los análogos tóxicos de los aminoácidos, específicamente de la L-canavanina, presentes en *Canavalia ensiformis* L en los cuatro tejidos principales de la planta (tallo, raíz, hoja y cotiledón) durante los primeros siete días de su desarrollo. Intentando con ello obtener mutantes-a partir del cultivo de tejidos vegetales- en los cuales se haya modificado la síntesis de los productos tóxicos y disminuir de esta manera la toxicidad de *Canavalia ensiformis* L.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

I.1. Generalidades.

La canavanina fue detectada por primera vez en semillas de Canavalia ensiformis L en 1929 por Kitagawa y Tomiyama. El objetivo de los estudios realizados por ellos era obtener información acerca de la producción de urea en hígado de mamíferos, empleando tanto procedimientos químicos como enzimáticos. En el procedimiento enzimático utilizaron a la ureasa de la semilla de Canavalia ensiformis L. El ensayo con ureasa dió resultados satisfactorios, sin embargo al intentar explicarse la fuente de la urea adi

cional obtenida descubrieron un nuevo aminoácido básico, al que nombraron canavanina ya que fue descubierto en C.ensiformis. Posteriormente realizaron tanto la separación del nuevo aminoácido de esta planta, como una serie de estudios asociados con las características químicas de él (7, 8).

La similitud estructural entre la canavanina y el aminoácido proteínico arginina fue descubierta cuando al someter a la canavanina a la acción de la enzima arginasa, la cual esta encargada de catalizar la hidrólisis de la arginina a ornitina y urea, liberó la mitad del nitrógeno total de la canavanina como urea. Posteriormente la evidencia presentada para mostrar que canavanina realmente era un nuevo aminoácido similar a la arginina, fue la reacción modificada de Sakaguchi, la cual se lleva a cabo exclusivamente con la arginina (5).

Los experimentos de Gulland-Morris (1935), Damadaran-Narayanan (1939) y Cadden (1940) proporcionaron los primeros procedimientos para separar a la canavanina de sus diferentes fuentes biológicas. También se ha tratado de producir por síntesis química la L-canavanina, produciéndose una mezcla racémica de DL-canavanina (9, 10, 11, 12, 13).

El método que ha demostrado ser marcadamente superior a otros empleados para la producción de la L-canavanina (enantiómero que existe en forma natural) es a partir de extractos de semillas, los cuales son sometidos a cromatografías de intercambio iónico (5,13).

Fearon y Bell en 1955 describieron un método para detectar y estimar canavanina en material biológico. El método se basa en la reacción del grupo guanidinoxi de la canavanina con pentaciano amonio ferrato (PCAF) a pH 7 formando un complejo color magenta, sin embargo esta reacción no sólo es positiva para el grupo guanidinoxi de la canavanina sino que también es positiva para otros grupos como son el del ácido ascórbico y el de la creatinina (15). Estudios realizados por Bell en 1958 introdujeron modificaciones en el método de Fearon-Bell, al emplear la cromatografía de partición y la ionofóresis en papel para separar a través de esas técnicas los complejos coloridos formados al reaccionar el PCAF con los compuestos que interfieren o inhiben la detección del complejo canavanina - PCAF (16).

Las modificaciones realizadas por Bell hicieron posible el análisis de un gran número de extractos de diferentes especies de plantas, pudiéndose así determinar con relativa facilidad la ausencia o presencia de canavanina. Por muchos años se consideró que la canavanina estaba presente únicamente en el género Canavalia de la familia de las Leguminosas, sin embargo a través del empleo de estos métodos se probó su presencia en otros géneros de la misma familia, pero no se pudo detectar en otras familias de plantas.

Birdsong et al., Turner-Harborne, Bell et al., a través de examinar una gran cantidad de especies vegetales con el fin de detectar la presen

cia de canavanina, establecieron que se encontraba en 70 de los 240 géneros examinados de la familia de las leguminosas. A partir de estos resultados mostraron que la canavanina no sólo estaba restringida a la familia de las leguminosas sino que era exclusiva de una sola subfamilia: La Papilionoideae. Estando distribuido el aminoácido no en todas las especies ni en todos los géneros (16, 17, 18, 19).

Birdson et al., en 1960 sugirieron que la restricción de la canavanina a esta subfamilia tenía un significado taxonómico, apoyando esta sugerencia en evidencias citológicas las cuales indican que las otras subfamilias de la familia de las Leguminosas, la Mimosoideae y la Caesalpinoideae divergieron relativamente poco en el curso de la evolución del tronco base ahora representado por la Papilionoidea. Además sugirieron que la ausencia de canavanina en ciertas especies y géneros dentro de la Papilionoidea puede ser causado por una ligera modificación genética que dió como resultado la ausencia de alguna de las enzimas requeridas para la síntesis del aminoácido (17).

I.2. Función de la Canavanina.

El encontrar la posible importancia ecológica de la canavanina en las plantas que la sintetizan ha sido de gran interés para la clasificación taxonómica de estas especies.

En muchas plantas leguminosas la cantidad de canavanina almacenada en su semilla puede representar del 5 al 10% del peso seco de la semilla (20, 21, 22). En el caso de Canavalia ensiformis L este aminoácido representa el 5% del peso seco total de la semilla (6).

Bell en 1958 sugirió que una de las funciones del aminoácido en este tipo de semillas puede ser como compuesto de reserva de nitrógeno, esta sugerencia la basó en la rápida desaparición de la canavanina en las semillas de Medicago sativa durante la germinación (23). Posteriormente, se han realizado una amplia serie de trabajos con diferentes semillas de leguminosas demostrando todos ellos que hay una baja notable en la concentración de la misma (24, 25).

Rosenthal en 1970 reportó que durante los primeros cinco días de crecimiento de la semilla de Canavalia ensiformis L cerca del 40% de la canavanina almacenada en los cotiledones hidratados es consumida, proponiendo que durante el período de crecimiento mucha de la canavanina almacenada en los cotiledones es transportada a las regiones en crecimiento de la planta (6).

En base a estos reportes los cuales han demostrado la abundancia de canavanina en muchas semillas de leguminosas, su rápido consumo durante el crecimiento de la planta, así como su alto contenido de nitrógeno y la elevada relación N/C que tiene la molécula del aminoácido, se ha aceptado la idea sugerida por Bell en 1950, donde se le considera como un

metabolito de reserva de nitrógeno de la semilla proporcionándole el nitrógeno necesario durante la germinación antes de que se establezca la asimilación del nitrógeno por la planta (19).

Estudios más recientes han establecido que la canavanina es un potente insecticida, lo cual ha sugerido a los investigadores una función aleloquímica para la canavanina en la planta.

Rosenthal en 1977 propuso que la producción de canavanina provee a la planta de una ventaja adaptativa, ya que la alta concentración del aminoácido representa una formidable barrera química contra posibles depredadores, atribuyéndole a la canavanina la función de metabolito de defensa de la planta, es decir una función aleloquímica (26).

1.3. Toxicidad de *Canavalia ensiformis* L.

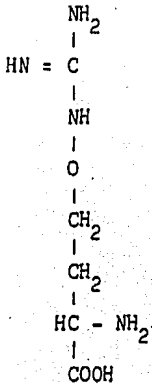
Los constituyentes tóxicos de esta planta se pueden reunir en dos grandes grupos:

- 1) análogos de aminoácidos esenciales, siendo este el grupo más relevante
- 2) constituyentes del tipo proteínico

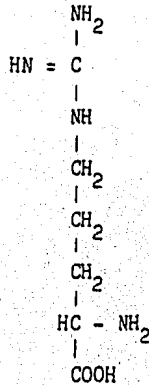
1.3.1. Análogos de aminoácidos esenciales.

A este grupo pertenece el aminoácido llamado canavanina el cual co-

mo ya se mencionó anteriormente es análogo estructuralmente al aminoácido proteínico arginina.

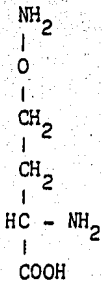


L-canavanina

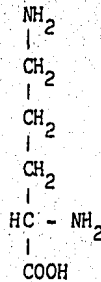


L-arginina

Así como también la canalina, el cual es análogo de la ornitina.



L-canalina



L-ornitina

I.3.1.1. Propiedades antimetabólicas de la canavanina.

Existe una considerable cantidad de literatura enfocada a investigar los efectos de canavanina en muchos grupos diferentes de organismos vivos. La mayoría de estos trabajos se han realizado en animales y microorganismos.

La capacidad de la canavanina para inhibir el crecimiento microbial ha sido conocido por más de 25 años. Horowitz y Srb en 1948 establecieron la toxicidad de la canavanina en Neurospora, en el mismo año Volcani y Snell demostraron su naturaleza bactericida, reportando la propiedad que tiene arginina para contrarrestar la inhibición del crecimiento provocado por canavanina, presentando así una de las mejores evidencias de la antagonía metabólica entre estos dos aminoácidos. También Volcani y Snell mostraron que la inhibición provocada por canavanina es parcialmente suprimida por ornitina o citrulina ya que el organismo utiliza esos aminoácidos para la formación de arginina (27, 28). En 1949 Bonner reportó la toxicidad de canavanina en Avena coleoptila así como Wrigh y Srb en 1950 la reportaron en embriones de maíz siendo suprimida la inhibición por citrulina, ornitina, ácido glutámico y lisina (29, 30). Walker en 1955 estableció en sus estudios realizados en algas la propiedad antimetabólica de canavanina para algunas de ellas, siendo completamente suprimida la inhibición por arginina, lisina o homoarginina (31).

Schwartz y Maas en 1960 publicaron la primera investigación de los efectos de la canavanina en el crecimiento bacterial. Ellos reportaron que la canavanina inhibía el crecimiento de E.coli manteniendo el medio libre de arginina, ya que canavanina compite con arginina en la formación de proteínas provocando una baja sensible en el crecimiento bacteriano (32). Schachtele y Rogers en 1965 contribuyeron al reporte de ellos al demostrar que en E.coli crecida en arginina al ser expuesta a la canavanina por un período de 30 a 40 minutos la viabilidad decrecía logarítmicamente. Esta rápida baja de viabilidad de la célula es llamada "muerte por canavanina" y las células que la presentan tienen una marcada reducción en la producción del ARN así como en la formación de proteínas. Ellos sugieren que la "muerte por canavanina" resulta de la producción de proteínas que contienen canavanina (canavanil proteína) las que bloquean tanto la iniciación de la replicación del ADN como la transcripción del genoma (33).

Experimentos adicionales realizados con células que presentan este tipo de muerte indican que son capaces de sintetizar proteínas pero tienen una limitada transcripción celular así como existen muy pocas moléculas de ARN mensajero (34).

La sustitución de canavanina en lugar del aminoácido arginina en la cadena polipeptídica provoca una diferente interacción de ésta con la proteína pudiendo ser modificada la estructura terciaria y cuater-

naría así como las propiedades biológicas de la proteína. La razón de esta modificación es por la incorporación al péptido de un aminoácido menos básico que el original, ya que el pH isoelectrico de la canavanina es de 8.2 mientras que el de la arginina es de 10.8 (35). No se tiene un perfecto conocimiento de los efectos que tiene la sustitución de canavanina por arginina en las propiedades catalíticas y regulatorias de la proteína, pero Attias et al han demostrado que la incorporación de canavanina en la cadena polipeptídica causa la acumulación de las subunidades de la enzima fosfatasa alcalina, debido a que no permite la dimerización de estas subunidades, provocando con ello el bloqueo de la actividad catalítica de la proteína (36).

Schachtele et al en 1970 sugieren que existen sitios especializados en las proteínas de la membrana bacterial que son esenciales para la replicación y la transcripción del genoma bacterial, pudiendo ser impedida esta transcripción por la capacidad de las canavanil proteínas a ocupar esos sitios específicos (37). En 1972 McMahon Y Langstroth investigaron la interacción de canavanina con la síntesis de macromoléculas en el alga Chlamydomona reinhardi, reportando la rápida inhibición causada por este aminoácido en la producción del ARN, también fue afectada la formación de las proteínas y del ADN pero en forma más lenta. Esta inhibición fue atribuida a la formación de canavanil proteínas las que inhiben el proceso de transcripción de la célula (38). La producción de canavanil proteínas también influye directa

mente en el metabolismo del ADN. La sustitución de la canavanina en lugar de arginina en las histonas causa un decremento en la basicidad de la molécula de la histona afectando marcadamente su interacción con los ácidos nucleicos y con el posible funcionamiento del genoma; las evidencias experimentales de la inhibición de la síntesis de histonas por canavanina han sido obtenidas con cultivo de células de ratón y hamster (39, 40).

Una más de las consecuencias causadas por la gran semejanza estructural de la canavanina con la arginina es la alteración en el metabolismo de esta última, ya que canavanina reprime las enzimas involucradas en la síntesis de la arginina.

Walker en 1956 separó una enzima del riñón de cerdo que cataliza la transferencia reversible del grupo amido de la arginina a ornitina o a glicina, siendo canavanina un sustrato activo de dicha enzima (41, 42). Kihara y Snell en 1957 separaron de Streptococcus faecalis la enzima arginina desimidasa probablemente, la cual cataliza la desimidación hidrolítica de la canavanina produciendo ureido-homoserina y amonio (43). En 1960 Maas mostró a través de sus estudios realizados en Escherichia coli el empleo de canavanina como sustrato de las enzimas que catalizan las reacciones en las que normalmente se utiliza arginina (44). Faanes y Rogers en 1968 reportaron la potencialidad que tiene este aminoácido para reprimir en E.coli la enzima ornitina transcarbamilasa de-

bido a que impide la acumulación de las moléculas de ARNm. La represión de esta enzima requiere elevados niveles de canavanil-ARNt lo que sugiere que la arginil-ARNt sintetasa participa en la generación de la represión señalada. Mutantes de E.coli con deficiencia de arginil-ARNt sintetasa no fueron sujetos a represión por canavanina (45, 46).

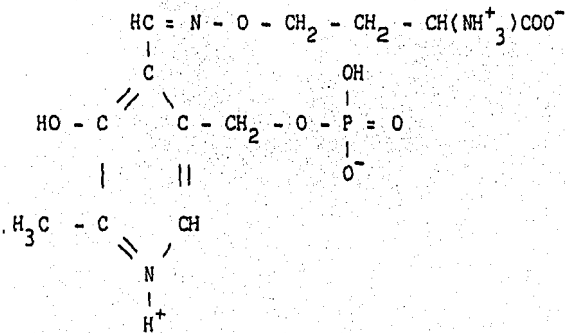
Tschiersch ha mostrado que la canavanina inhibe a la deshidrogenasa alcoholica, a la β -glucosidasa, a la oxinitrilasa y a otras enzimas. Rosenthal ha confirmado esta observación en estudios realizados con la deshidrogenasa del ácido láctico. Canavanina puede inhibir enzimas en las que sus sustratos tengan una pequeña relación estructural con la canavanina (47).

I.3.1.2. Propiedades antimetabólicas de la L-canalina.

Las propiedades biológicas de canalina han sido poco investigadas, una de esas investigaciones fue realizada por Rosenthal y Dahlman en 1975 mostrando el potente poder insecticida que tiene canalina cuando fue administrada en insectos adultos de Manduca sexta. Cuando las larvas son sometidas a una dieta del 0.1% de canalina su crecimiento se ve altamente atenuado, provocando que de ninguna de las larvas emerja un adulto (48). En el mismo año Rosenthal et al demostraron en Lemna minor la propiedad que tiene canalina para reducir el crecimiento, reduciéndose un 20% este crecimiento cuando se agrega 10^{-6} M canalina al medio y un

100% cuando se incrementa la concentración a 10^{-5} M. En 1978 Kammer et al reportaron a canalina como un potente agente neurofarmacológico en gorgojos adultos, la aplicación al animal de inyecciones de 3 mg de canalina por gramo de peso del gorgojo provoca una espontánea y continua actividad motora, disminuyendo el equilibrio y provocando finalmente una muerte prematura. Ellos sugirieron, como explicación de esta actividad, la acción de la canalina sobre la transmisión sináptica en el sistema nervioso central (49).

Una de las más importantes características que presenta la L-canalina para ser considerada como una sustancia fuertemente antimetabólica es la habilidad que tiene para formar puentes con el fosfato de piridoxal, ya que al reaccionar con éste todas las enzimas que utilizan como cofactor al fosfato de piridoxal se ven inactivadas. Hay grandes evidencias que apoyan la hipótesis de que canalina reacciona con el átomo de carbón aldehídico del fosfato de piridoxal, formando un complejo unido covalentemente (una base de Schiff) cuyo pKa es de 3.0 (50).



Las transaminasas glutamato-oxaloacetato y glutamato-piruvato son inhibidas completamente por tratamiento con canalina 10mM. En los reportes dados por Katunuma et al en 1965 se mostró la inhibición provocada al tratar la enzima ornitina-cetoacida transaminasa con canalina 5 μ M y 50 μ M provocando un 86 y 100% de inhibición respectivamente (51). En 1981 Rosenthal reportó la baja en la actividad catalítica de la enzima L-tirosina decarboxilasa, una conocida enzima que utiliza fosfato de piridoxal como cofactor (50).

I.3.2. Constituyentes proteínicos de C.ensiformis.

Estos constituyentes pueden ser de dos tipos diferentes:

1) Del tipo de las lectinas, proteínas almacenadas en los cotilédones de las leguminosas, que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos específicos. El significado funcional de esta propiedad no es conocido, sin embargo los diversos resultados reportados nos indican que las lectinas tienen afinidad por la superficie celular de la especie *Rhizobium* y pueden facilitar la unión simbiótica de los organismos fijadores de nitrógeno con la raíz de la leguminosa. A este tipo de proteínas pertenecen la Concanavalina A y la Conatoxina las cuales actúan a nivel de membrana celular y del sistema nervioso respectivamente (52). Concanavalina A es una lectina que interacciona específicamente con los polisacáridos y las glicoproteínas que poseen unidades de α -D-glucopiranosil en sus estructuras (53).

2) Del tipo de inhibidores de las enzimas digestivas (54).

I.4. Metabolismo de la Canavanina.

La serie de reacciones seguidas para degradación y la biosíntesis de canavanina aún no han sido bien aclaradas.

Se ha propuesto que el ciclo de reacciones por las que se sintetiza canavanina es similar a la vía de producción de arginina en muchas especies de plantas: el ciclo ornitina-urea (54). Fowdwn ha sugerido que las vías metabólicas que culminan en la síntesis de ciertos aminoácidos no proteínicos puede reflejar una alteración en el genoma responsable de la formación de los aminoácidos cruciales (55). Ya que la síntesis de arginina es a partir del ciclo ornitina-urea y debido a la analogía estructural de canavanina con arginina es posible pensar en la modificación de los intermediarios de este ciclo para sintetizar canavanina en lugar de arginina, pudiendo ser la vía metabólica para la sin tesis de canavanina el ciclo canalina-urea (54). Figura I.1

Rosenthal a partir de sus estudios realizados en la planta C.ensi-
formis reportó la capacidad de las enzimas del ciclo ornitina-urea para metabolizar secuencialmente los intermediarios del ciclo canalina-urea, no probando con ello que este ciclo sea el camino principal utilizado "in vivo" para la producción de canavanina (54).

Todas las enzimas involucradas en el ciclo ornitina-urea han sido aisladas de plantas superiores incluyendo Canavalia ensiformis, con excepción de la enzima arginino-ácido succínico sintetasa la cual se cree es el paso limitante en el ciclo ornitina-urea (56).

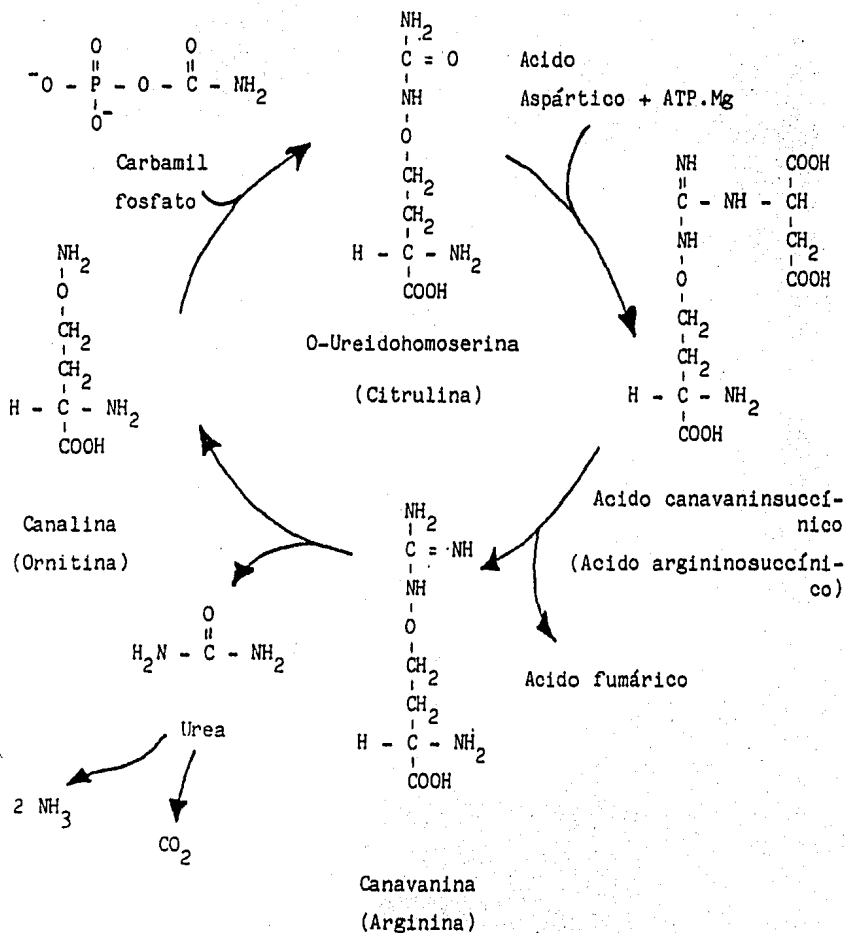


Figura I.1 .- Ciclo canalina-urea

Estudios realizados por Rosenthal en 1970 en semillas de C.ensiformis revelan que la movilización del nitrógeno almacenado en canavanina se produce por conversión de canavanina a canalina y urea, siendo este el camino predominante para el catabolismo de canavanina (6). Esta afirmación ha sido confirmada por Whiteside et al en 1971 y por Töpfer et al en 1970 al demostrar que en Caragana spinosa canalina y urea son los principales productos del catabolismo de canavanina (56, 57).

Para realizar la hidrólisis de canavanina a canalina y urea se ha propuesto, de acuerdo a los estudios realizados por Damodaran y Narayanan en 1940 así como los de Rosenthal en 1970, el empleo de la enzima arginasa (L-arginina amidinohidrolasa, EC 3.5.3.1) la cual cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea (6, 58). Estudios más recientes han mostrado la habilidad que tiene la arginasa de C.ensiformis para hidrolizar tanto a la arginina como a la canavanina, mostrando además una marcada superioridad en la actividad catalítica cuando se tiene como sustrato a canavanina en comparación a la arginasa de plantas que no contienen canavanina (59).

Baile y Boulter han recopilado información de la distribución de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) en las leguminosas, reportando que de todas las especies de plantas estudiadas que contienen canavanina todas poseen actividad de ureasa (60). Rosenthal en 1974 reportó que en general las semillas de leguminosas ricas en ureasa también contienen gran cantidad

de canavanina (61). Estudios realizados por Granick en C.ensiformis y soya empleando técnicas histológicas descubrieron que la ureasa esta presente en todas las partes de la planta (62, 63, 64).

En base a esta información se ha sugerido que en Canavalia ensiformis L. a) igual que en otras plantas superiores, la movilización del nitrógeno almacenado en el grupo guanidinoxi de canavanina se realiza mediante la acción hidrolítica de arginasa formando canalina y urea, con la producción posterior de amonio y bióxido de carbono por la acción hidrolítica de ureasa sobre urea. El amonio liberado representa una importante fuente de nitrógeno reducido, siendo asimilado e incorporado a la biosíntesis de los aminoácidos (6, 56); Rosenthal ha propuesto que el aminoácido proteínico que se forma es la asparagina, siendo este aminoácido el que transporta el nitrógeno al resto de la planta, ya que la asparagina y la glutamina son los compuestos más generalmente utilizados para transportar el nitrógeno en las plantas superiores (56).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

II.1. Material.

II.1.1. Material Biológico.

Se utilizaron semillas de Canavalia ensiformis L. aportadas por el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY). Se crecieron en agrolita en condiciones estériles y bajo regímenes de luz y temperatura controlados.

II.1.2. Material de vidrio.

El material de vidrio empleado fue el común del laboratorio bioquímico. Lavado con agua y detergente, enjuagado con agua desionizada y secado en estufa.

II.1.3. Equipo.

Espectrofotómetro PYE UNICAM SP6 - 550 UV/VIS

Polytrón PCU-2

Centrífuga Beckman JA - 21

Incubadora PRECISION Dual Program Illuminated Incubator

Balanza analítica Mettler

Balanza granataria Sartorius

Potenciómetro Beckman 3550

Baño María de Temperatura constante Colora

Placas de calentamiento y agitación

Agitador Vortex - Genie

Campana de Flujo laminar VECO

II.1.4. Reactivos.

Los reactivos empleados fueron grado reactivo provenientes de: Técnica Química, J.T. Baker, Merck, Sigma y Laitz S.A.

II.2. Métodos.

II.2.1. Germinación de la planta Canavalia ensiformis L.

Las semillas de *C.ensiformis* antes de ser sembradas fueron sometidas al siguiente proceso de esterilización:

- a) Se lavaron con agua y detergente para eliminar contaminación por hongos.
- b) Se les colocó en etanol al 70% durante 3 minutos.
- c) Se desinfectaron con solución al 33% de hipoclorito de sodio durante 5 minutos.
- d) Se enjuagaron con agua desionizada estéril dos ocasiones.

Una vez sometidas a este proceso de esterilización se procedió a sembrarlas en condiciones estériles en matraces que contenían agrolita previamente esterilizadas. Tanto en el proceso de esterilización excepto el paso "a" como la siembra se realizaron en la campana de flujo laminar.

Finalmente ya sembrada cada semilla en un matraz fueron incubadas a 28°C en la obscuridad. El período de luz abarcaba 15 horas mientras que el de obscuridad 9 horas.

II.2.2. Separación del material biológico.

Al término del período de incubación estipulado para cada semilla se procedió a extraer de los matraces las plantas obtenidas, lavando sus raíces para liberarlas de la agrolita con agua desionizada y prensándolas posteriormente entre toallas de papel. Se separaron la raíz, el tallo, las hojas y los cotiledones de la planta. Posteriormente se congeló cada tejido por separado a -70°C .

II.2.3. Preparación del extracto enzimático.

- a) Se muele el tejido congelado, del cual se va a preparar el extracto, en un mortero frío con una cantidad equivalente al 5% del tejido de polivinil pirrolidona (P.V.P.)
- b) Se agregan 2.5 ml de tampón de extracción por cada gramo de tejido (solución tampón: KH_2PO_4 200 mM pH 7.5)
- c) La mezcla se licúa por 2 minutos en el politrón a 3 de velocidad.
- d) El licuado se filtra a través de 4 capas de gasa.
- e) El filtrado se centrifugó a 18,000 rpm durante 30 minutos a 2°C en el rotor JA-20 en la centrifuga J2-21
- f) Se separa el sobrenadante y en él se realiza la determinación de la actividad enzimática, de proteínas y de pozas metabólicas.

Nota: Para la preparación del extracto enzimático del cotiledón y de-

bido a la gran cantidad de lípidos que hay presentes fue necesario después de centrifugar, tres extracciones con cloroformo utilizando volúmenes de éste iguales al volumen del sobrenadante separado. Después de realizar las extracciones se desecha el cloroformo y se vuelve a centrifugar el sobrenadante por otros 30 minutos a 18,000 rpm a 2°C en el rotor JA-20 en la centrífuga J2-21.

II.2.4. Determinación de la actividad de la ureasa.

Esta determinación se realizó por el método propuesto por Hogan et al (65) modificado en el presente trabajo. La actividad es medida por la cuantificación de la cantidad de amonio liberado a través del método espectrofotométrico del indofenol (66).

Reactivos:

Mezcla de reacción muestra: 1.7 ml de solución tampón KH_2PO_4 100 mM
pH 7.5 + 0.2 ml de urea 200 mM + 0.1 ml del extracto de tejido

Mezcla de reacción blanco: 1.9 ml de solución tampón KH_2PO_4 100 mM
pH 7.5 + 0.1 ml del extracto de tejido

Ácido tricloroacético al 30% (TCA)

Solución $\text{NaOH}/\text{KH}_2\text{PO}_4$: NaOH 2 M + KH_2PO_4 250 mM

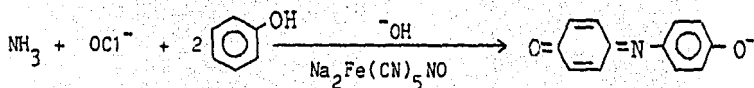
Solución A: fenol 0.106 M + nitroprusiato de sodio 0.17 mM

Solución B: hidróxido de sodio 0.125 N + hipoclorito de sodio 11 mM

Procedimiento experimental:

La mezcla de reacción de la muestra excepto la urea, se incubó a 28°C por 2 minutos. La reacción se inició con la adición de la urea. Esta mezcla se incubó por períodos determinados (dependiendo éstos del tipo de tejido) a 28°C. En cada determinación se usó un blanco, el cual contenía el tampón y el mismo volumen de extracto enzimático. La reacción se detuvo adicionando 0.3 ml de la solución del ácido tricloroacético. Ya que para cuantificar el amonio liberado por el método del indofenol es necesario tener un medio con pH neutro, se agregan 0.32 ml de la solución NaOH/KH₂PO₄.

El método del indofenol se basa en la formación del complejo de indofenol a partir del amonio liberado en la reacción utilizando como catalizador nitroprusiato de sodio.



El indofenol es un complejo que en su forma disociada es de color azul.

En forma práctica el método consiste: 1) agregar a la mezcla de reacción 5 ml de la solución A. 2) añadir 5 ml de la solución B, 3) agitar y dejar desarrollar color por 30 minutos, 4) medir el incremen-

to en la absorbancia a 575 nm respecto a cada blanco.

La velocidad de la reacción se expresó como micromoles de amonio formado por minuto, para lo cual se empleó la gráfica de calibración de amonio cuya absorbancia fue lineal para concentraciones de amonio entre 0.0 y 3.0 mM (Figura II.1).

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de amonio por minuto bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína.

II.2.5. Determinación de la actividad de la arginasa.

La actividad de arginasa se determinó según el método propuesto por Roubelakis y Kliever (67) para Vitis vinifera L, en el cual se cuantifica la cantidad de L-ornitina presente en la mezcla de reacción. La ornitina fue cuantificada a través del método colorimétrico de Chinnard modificado por Roubelakis-Kliever (68).

Reactivos:

Mezcla de reacción: 1.3 ml de solución tampón Tris-HCl 100 mM pH 9.5 + 1 ml de L-arginina-HCl 50 mM ajustada a pH 9.7 con NaOH + 0.1 ml de $MnCl_2 \cdot 5 H_2O$ 10 mM + 0.1 ml de extracto enzimático.

Acido Perclórico al 7% 2 ml

Acido Acético Glacial 3 ml

Solución de ninidrina: ninidrina en una concentración de 25 mg/ml en una mezcla de ácido acético glacial, ácido fosfórico concentrado y agua destilada en una relación 3:1:1 (v/v/v) respectivamente.

Procedimiento experimental:

La reacción se inició con la adición de la L-arginina-HCl. La mezcla de reacción se incubó a 38°C por un determinado tiempo por cada tejido. Para cada determinación se usó un blanco interno, el cual contenía todos los reactivos que forman la mezcla de reacción de la muestra excepto la L-arginina-HCl completando el volumen original de 2.5 ml con más solución tampón Tris-HCl. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 ml de ácido perclórico.

La cuantificación de la L-ornitina liberada en la reacción se realizó de la siguiente manera:

- a) La mezcla de reacción tanto de la muestra como del blanco se centrifuga a 3,000 rpm por 10 minutos.
- b) Del sobrenadante se toma una alícuota de 0.2 ml y se lleva a 1 ml con agua desionizada.
- c) A esta mezcla se le agrega 3 ml de ácido acético glacial y 1 ml de solución de ninidrina.

d) Se mezcla y se hierve por 30 minutos para desarrollar color.

e) Se enfrían los tubos por inmersión en agua fría por un período no mayor de 10 minutos al abrigo de la luz.

f) Se leen en el espectrofotómetro a 515 nm, midiendo el incremento de la absorbancia respecto a cada control.

La velocidad de reacción se expresó en micromoles de L-ornitina formada por minuto, empleándose para ello la curva estándar de L-ornitina (Figura II.2).

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de L-ornitina por minuto bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína.

Teniendo como objetivo el establecer las condiciones adecuadas para determinar la actividad enzimática tanto de la ureasa como de la arginasa empleando los métodos antes mencionados, se realizaron dos tipos de ensayos.

1) Se determinó la actividad enzimática utilizando una cantidad de enzima constante y variando el tiempo de la reacción.

2) Se determinó la actividad de las enzimas manteniendo el tiempo de la reacción constante y variando la cantidad de enzima.

A partir de estos ensayos se estableció el tiempo de reacción adecuado para cada tipo de tejido y de enzima, así como también la cantidad de extracto enzimático necesario para detectar la actividad de ureasa y arginasa cuando están a su velocidad máxima (Figuras II.3, II.4, II.5, II.6).

II.2.6. Determinación de proteína por el método de Peterson (69).

Reactivos:

- 1) Deoxicolato de sodio 0.15% (DOC)
- 2) Acido tricloroacético 72% (TCA)
- 3) Cobre - Tartrato - Carbonato (CTC)
CuSO₄.5 H₂O al 1% + tartrato de potasio al 2% +
Na₂CO₃ al 10%
- 4) Dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS)
- 5) Hidróxido de sodio 0.8 N
- 6) Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:6 (v/v) con H₂O
- 7) Albúmina sérica bovina 100 μg/ml
- 8) Solución A: mezcla a partes iguales de CTC, NaOH,
SDS, y H₂O

Procedimiento experimental:

La muestra de extracto empleado se lleva a un volumen total de

1 ml con agua desionizada. Se adiciona 0.1 ml de DOC, se mezcla y se deja por 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo se adiciona 0.1 ml de TCA frío, se mezcla y se centrifuga a 3,000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante es descartado y para eliminar el líquido remanente, el tubo de ensaye sobre el que se formó la pastilla se deja escurrir sobre papel absorbente. Posteriormente se disuelve la pastilla con 1 ml de agua desionizada y 1 ml de la solución A, se agita y se deja reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se agregan 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se deja desarrollar color por 30 minutos midiéndose posteriormente a 750 nm el incremento de la absorbancia con respecto a un blanco (este blanco contenía todos los reactivos excepto el extracto). Simultáneamente se preparó la gráfica de calibración de proteína, utilizando para ello la solución patrón de albúmina sérica bovina. La concentración de proteína de la gráfica de calibración va de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura II.7).

II.2.7. Determinación de la poza de amonio.

Para la cuantificación de la poza de amonio se utilizó el método del indofenol anteriormente descrito (66).

La cantidad de muestra para esta determinación depende del tipo de tejido por utilizar, para cotiledón se empleó 0.02 ml, para hoja 0.06 ml, para raíz 0.05 ml y para tallo 0.05 ml; completándolas con agua desionizada a un volumen final de 2.32 ml.

De manera simultánea se preparó la gráfica de calibración de amonio cuya absorbancia fue lineal para concentraciones entre 0.0 y 3.0 mM, empleando para su preparación NH_4Cl 10 mM (Figura II.1).

II.2.8. Determinación de la poza de urea.

La determinación de urea se realizó a través de cuantificar el amonio liberado por la enzima ureasa al hidrolizar la urea presente en los extractos de los tejidos.

La muestra (la cual depende del tipo de tejido) se lleva a un volumen final de 2.22 ml con solución tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 y se agrega 0.1 ml de ureasa comercial 0.2 mg/ml. En cada determinación se usó un blanco que contenía la misma cantidad de extracto pero no contenía ureasa comercial, el volumen se ajustó con más solución tampón. Las mezclas de reacción se incuban por 20 minutos a 37°C y posteriormente se cuantifica el amonio liberado por el método del indofenol (66).

Para la preparación de la gráfica de calibración de urea se empleó urea 2 mM, siendo el rango de concentración de la curva de 0.0 a 3.0 mM (Figura II.8).

II.2.9. Determinación de la poza de nitratos por el método de Nicholas (70).

Para esta determinación se utilizaron cantidades variables de extracto, para cotiledón se emplearon 0.02 ml de extracto diluido 1/40 y para hoja, raíz y tallo se utilizaron 0.02 ml de extracto diluido 1/2. Estos volúmenes son llevados con agua desionizada a un volumen final de 1.5 ml, se les agregó 0.1 ml de ácido sulfámico al 10%, se agitaron y se dejaron reposar por 2 minutos. Pasado el tiempo se agregaron 0.4 ml de ácido perclórico al 20%, se agitaron y leyeron a 210 nm.

Se elaboró una curva estándar de nitratos utilizando concentraciones de 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$ (Figura II.9).

II.2.10. Determinación de la poza de nitritos por el método de Nicholas (70).

A 2 ml de extracto se le adicionan 1 ml de sulfanilamida al 1% y 1 ml de N(1-naftil)etilen diamina. La mezcla se agita y después de 20 minutos se midió el incremento de absorbancia con respecto a un blanco elaborado con todos los reactivos excepto el extracto del tejido.

También se elaboró una gráfica de calibración de nitritos empleando para ello NaNO_2 5 mM. El rango de concentraciones de esta gráfica de calibración va de 5 a 30 nM (Figura II.10).

II.2.11. Determinación de la poza de aminoácidos totales por el método de ninidrina (71).

Reactivo "A": solución de citratos 0.2 M pH 5.0. Agregar por cada 50 ml de tampón 0.08g de SnCl_2 .

Reactivo "B": tomar 10 ml del reactivo "A" y agregar 0.4 g. de ninidrina previamente disuelta en 10 ml de metilcelosolve (etilen glicol-monometil éter).

A una determinada cantidad del extracto enzimático (0.05 ml) se le agrega agua desionizada hasta completar 1 ml, se le agrega 1 ml del reactivo "B". Mezclar y calentar en baño María a ebullición por 20 minutos. Dejar enfriar y agregar 2.5 ml de propanol al 50%. Agitar de nuevo y esperar 15 minutos para leer a 570 nm.

Se preparó una curva patrón con el aminoácido ácido glutámico en concentraciones de 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura II.11).

C A P I T U L O III

RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. Crecimiento de la planta: *Canavalia ensiformis* L.

Se determinó el crecimiento de la planta en función del tiempo por un período de 7 días. La determinación se realizó en 4 tejidos de la planta, raíz, tallo, hojas y los cotiledones.

El crecimiento de los cotiledones se reporta en porcentaje de peso fresco por dos cotiledones (Tabla I), en tanto que los tejidos restantes se reportan como peso fresco por planta (Tabla II).

Tabla I. Crecimiento de los cotiledones

Tiempo (días)	Peso fresco (%) / 2 cotiledones
1	71.77
2	104.96
3	131.51
4	138.00
5	143.50
6	149.03
7	154.07

Tabla II. Crecimiento de raíz, hoja y tallo.

Tiempo (días)	Tipo de tejido	Peso fresco (g) / planta
3	R	0.211
3	T	0.284
3	H	0.034
4	R	0.588
4	T	0.787
4	H	0.093
5	R	0.809
5	T	1.468
5	H	0.175
6	R	1.202
6	T	3.032
6	H	0.260
7	R	1.560
7	T	3.600
7	H	0.360

R=raíz

T=tallo

H=hoja

Cada valor presentado en las tablas anteriores representa el promedio obtenido de 4 determinaciones realizadas en plantas diferentes.

En base a los resultados reportados en las tablas I y II el desarrollo de los cotiledones resultó ser del tipo logarítmico, mientras que el crecimiento tanto del tallo, la hoja y la raíz tiende a ser del tipo simoidal. De estos tres últimos tejidos el que presenta el mayor y más marcado desarrollo es el tallo en tanto que en la raíz no lo es tanto, ya que desde los primeros días hay una gran cantidad del tejido. En lo que se refiere a la hoja, presenta un gran desarrollo del 4o. al 5o. día disminuyendo notablemente del 5o. al 7o. día. Gráfica 1

Estos datos nos muestran un aumento en la biomasa de los cotiledones después de la germinación de la planta, este resultado viene a ser contrario a lo que se pensaba, ya que normalmente después de la germinación los cotiledones comienzan a vaciarse de los materiales útiles para la planta transportándolos a otros tejidos en crecimiento, perdiendo biomasa para posteriormente secarse. El hecho de que los cotiledones de C. ensiformis después de la germinación cambien su metabolismo de heterotrófico a autotrófico, debido a que son cotiledones aéreos, podría ser una de las explicaciones de este aumento en biomasa ya que puede sintetizar sustancias útiles no sólo para el crecimiento de otros tejidos de la planta sino que también para su propio desarrollo.

En forma general lo que se muestra en base a estos resultados es el desarrollo acelerado presentado por la planta, ya que después de los 7 días de ser sembrada la semilla de *C. ensiformis* se tiene una planta adulta.

Otra de las características por mencionar, es la gran cantidad de raíz presentada por la planta desde los primeros días; provocada probablemente por las características secas y pobres nutritivamente de las tierras en que crece, siendo necesario gran cantidad de este tejido para encontrar los materiales nutritivos necesarios para su subsistencia.

III.2. Ontogenia de la arginasa.

La determinación de la arginasa se realizó por un período de 7 días en la raíz, el tallo, la hoja y los cotiledones de la planta.

Tabla III

La actividad reportada de arginasa se obtuvo de dos determinaciones realizadas en plantas diferentes, reportándola como actividad específica.

Tabla III. Actividad específica de la arginasa.

Día	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7
Tipo de tejido	Actividad Específica micromoles de ornitina/min. mg proteína								
Cotiledón	1.36	1.15	2.98	2.52	2.37	4.49	6.33	9.54	6.46
Tallo	--	--	--	--	37.99	80.20	73.03	43.10	31.32
Raíz	--	--	--	--	52.65	11.91	78.88	72.22	73.65
Hoja	--	--	--	--	--	11.13	8.71	16.49	20.47

Los tejidos que presentan una gran actividad de arginasa son la raíz y el tallo. En la raíz la actividad aumenta a medida que pasa el tiempo manteniéndose relativamente constante a partir del 5º día; mientras que en el tallo el incremento de actividad es muy marcado del 3º al 4º día, disminuyendo lentamente al principio y en forma drástica después.

La actividad presentada en la hoja es cuatro veces menor a la registrada en sus máximos de actividad de la raíz y el tallo. La tendencia mostrada por esta actividad es la de aumentar a partir del 5º día.

La menor actividad de arginasa se registró en los cotiledones,

permaneciendo relativamente constante durante el tiempo de crecimiento.

Gráfica 3.

La gran actividad presentada por arginasa en la raíz así como la poca mostrada en la hoja son concordantes con los resultados reportados por Rossenthal en 1972 (6) en donde reportó el ligero aumento en los niveles de canavanina en la raíz en comparación a los niveles presentes en la hoja. Lo que puede sugerir que la canavanina presente en raíz es rápidamente hidrolizada por arginasa no pudiendo ser acumulada, mientras que en la hoja al tener una menor actividad la enzima puede haber acumulación de ella.

Ya que en los cotiledones se presentó una baja actividad relativamente constante de arginasa se podría pensar que la canavanina es transportada de ellos hacia otros tejidos como el tallo y la hoja, esta idea esta basada en la gran actividad de arginasa presente en el tallo durante los primeros días; la cual se va reduciendo en los siguientes días hasta alcanzar un valor parecido al de la hoja.

III.3. Ontogenia de la ureasa.

La determinación de la actividad de ureasa se realizó en la raíz, el tallo, la hoja y los cotiledones de C.ensiformis durante los primeros 7 días de crecimiento. Tabla IV

Se reporta la actividad específica de ureasa (cuyo valor se obtuvo de dos determinaciones realizadas en plantas diferentes).

Tabla IV Actividad específica de la ureasa.

Día	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7
Tipo de tejido	Actividad Específica micromoles de amoniaco/min. mg proteína								
Cotiledón	45.41	41.50	50.86	60.95	74.71	117.09	96.79	81.05	115.83
Tallo	--	--	--	--	16.74	24.09	19.08	43.67	19.53
Raíz	--	--	--	--	9.32	5.48	2.93	3.63	1.55
Hoja	--	--	--	--	--	5.43	18.24	9.12	9.06

De acuerdo a los datos reportados en la Tabla IV podemos observar que la mayor actividad de ureasa se presentó en el cotiledón, incrementándose lentamente del día 0 al 3º y en forma drástica del 3º al 4º en donde se presenta uno de sus máximos, a partir de ese punto la actividad decrece, presentándose hasta el 7º día otro gran incremento.

Por su parte en el tallo se presenta una menor actividad de ureasa, teniendo en los primeros días muy poca variación y registrando al 6º día la mayor actividad. Posteriormente sufre un fuerte decremento del 6º al 7º día.

La actividad presentada en la hoja y la raíz es muy poca en comparación de los otros dos tejidos, siendo en la raíz en donde se registra la menor actividad. Mientras que en la hoja la actividad de ureasa tiene su máximo al 5º día y se mantiene relativamente constante, en la raíz la actividad tiende a decrecer a medida que pasa el tiempo. Gráfica 2.

La urea liberada por la arginasa en los cotiledones es rápidamente hidrolizada por la ureasa a amonio, siendo este probablemente reasimilado por la vía glutamato deshidrogenasa (GDH), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el mismo laboratorio por una colega de trabajo quién realizó sus estudios sobre la misma planta estudiando la asimilación del amonio por las vías de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la glutamino sintetasa (GS). Ella reporta un máximo de actividad de GDH del 3º al 4º día y otro al 7º día presentando la ureasa máximos de actividad en esos mismos días (72).

La actividad media presentada por ureasa en hoja y tallo es compatible con la idea mencionada anteriormente donde se sugiere que la canavanina es transportada del cotiledón a tejidos como la hoja y el tallo.

La poca actividad mostrada en raíz en comparación a los otros tejidos sugiere que la urea presente, producida por la arginasa es trans-

portada a otros tejidos para su metabolismo.

III.4. Pozas metabólicas.

III.4.1. Poza de amonio.

La determinación de la poza de amonio al igual que todas las otras pozas metabólicas se realizaron en 4 tejidos de la planta la raíz, el tallo, la hoja y los cotiledones durante los primeros 7 días de crecimiento. Tabla v.

La cantidad de amonio presente en los tejidos se reportó como milimoles de amonio por gramo de tejido fresco, realizándose la determinación por duplicado.

De acuerdo a los datos reportados en la Tabla V podemos observar tanto en los cotiledones como en el tallo la rápida disminución de la poza de amonio a medida que va pasando el tiempo. En la raíz se presenta un fuerte incremento de la cantidad de amonio presente en el 4º día decayendo notablemente esta cantidad para los siguientes días. Mientras que en los otros tejidos disminuye la cantidad de amonio presente en ellos en la hoja acontece el fenómeno contrario ya que a medida que pasa el tiempo la cantidad de amonio presente en ella aumenta. Gráfica 4.

Tabla V. Poza de amonio

Tipo de Tejido	Día	milimoles de amonio/gramo de tejido fresco
Cotiledón	0	5.40
Cotiledón	0.5	4.61
Cotiledón	1	4.05
Cotiledón	2	3.22
Cotiledón	3	4.26
Raíz	3	3.24
Tallo	3	4.00
Cotiledón	4	2.36
Raíz	4	5.31
Tallo	4	3.21
Hoja	4	0.21
Cotiledón	5	2.97
Raíz	5	3.64
Tallo	5	2.15
Hoja	5	0.87
Cotiledón	6	1.35
Tallo	6	0.38
Raíz	6	2.74
Hoja	6	1.93
Cotiledón	7	0.85
Raíz	7	3.04
Tallo	7	0.23
Hoja	7	2.60

III.4.2. Poza de urea.

La cantidad de urea presente en los tejidos del tallo, la raíz, los cotiledones y la hoja se reporta como milimoles de urea por gramo de tejido fresco. La determinación se realizó durante los 7 primeros días de crecimiento de la planta. Tabla VI

Tabla VI. Poza de urea.

Tipo de tejido	Día	milimoles de urea/gramo de tejido fresco
Tallo	3	3.82
Raíz	3	0.79
Tallo	4	2.31
Raíz	4	0.92
Hoja	4	1.44
Tallo	5	4.14
Raíz	5	1.23
Tallo	6	4.11
Raíz	6	4.69
Tallo	7	2.67
Raíz	7	2.26

La cantidad de urea presente en los cotiledones y la hoja después del 4º día no fue detectable con el ensayo empleado.

En la raíz la cantidad de urea presente aumenta drásticamente del 3º al 6º día disminuyendo en el 7º día. En el tallo la poza de urea sufre una fuerte disminución del 3º al 4º día, incrementándose en el 5º y 6º día para volver a disminuir del 6º al 7º día. Gráfica 5

La poza de urea en los cotiledones no fue detectable lo cual era de esperarse de acuerdo a la gran actividad mostrada por la ureasa en estos tejidos. Por su parte la poza de amonio disminuye rápidamente presentando fuertes decrementos al 4º y 7º día, lo cual viene a coincidir con los días en que GDH presenta sus máximos de actividad (72).

Estos resultados apoyan la idea mencionada anteriormente en donde se sugiere que el amonio liberado por la ureasa es reasimilado rápidamente por la vía de la GDH.

Los niveles de urea en la hoja no fueron detectables después del 4º día, en tanto que la poza de amonio fue aumentando con el paso de los días; esto nos sugiere que hay un aumento en la actividad de la ureasa a partir del 4º día, siendo compatible esta idea con los resultados obtenidos de la ureasa.

En el tallo el nivel de la poza de urea es alto mostrando a su vez el nivel de la poza de amonio una baja muy notoria a medida que pasan los días, el amonio liberado por la ureasa es reasimilado en

el tallo por la vía GS/GOGAT probablemente, cumpliendo una función muy importante en la asimilación del amonio durante las primeras etapas del crecimiento.

La gran cantidad de urea presente en la raíz concuerda con la poca actividad mostrada por la ureasa, sin embargo esta actividad no es compatible con el alto nivel de amonio existente; esto nos podría sugerir que además del amonio liberado por la ureasa existen otras fuentes que lo proporcionan, como sería el proveniente de la reducción del nitrato a amonio por medio de las enzimas nitrato y nitrito reductasas. Esta sugerencia se ve apoyada por el hecho de que se determinó una poza muy elevada de nitratos.

III.4.3. Poza de nitratos.

La poza metabólica de nitratos se reporta como miligramos de nitrato por gramo de tejido fresco, obteniéndose los resultados de la tabla VII.

Tabla VII: Poza de nitratos.

Día	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7
Tejido	miligramos de nitratos/gramo de tejido fresco								
Coti-									
ledón	16.10	12.08	10.64	11.45	10.90	17.18	13.36	9.78	7.05
Tallo	--	--	--	--	6.10	3.04	2.56	2.81	2.99
Raíz	--	--	--	--	1.99	2.72	2.62	2.59	2.41
Hoja	--	--	--	--	--	3.71	4.96	3.59	5.43

Estos datos nos muestran la gran acumulación existente en los cotiledones de nitratos, la cual tiende a disminuir con el paso de los días, con excepción del 4º día en donde presenta la mayor acumulación de nitratos.

El tallo presenta al 3º día una gran cantidad de nitratos siendo disminuida para los siguientes días, en tanto que la raíz mantiene un nivel constante durante todo el período de estudio.

La hoja por su parte presenta durante los tres primeros días en que fue medida la poza de nitratos un nivel constante teniendo un gran aumento para el 7º día.

Los resultados anteriores nos sugieren que existe una gran acumulación de nitratos en los diferentes tejidos de esta planta lo cual

hasta ahora no se había reportado que pasara en planta alguna. Estudios más específicos de las pozas de nitratos y nitritos así como de las enzimas nitrato y nitrito reductasa nos podrían dar una explicación a este fenómeno. Gráfica 7

III.4.4 Poza de nitritos.

La determinación de la poza de nitritos se realizó al igual que todas las otras pozas metabólicas por duplicado empleando diferentes plantas. La cantidad de nitritos presentes en los tejidos se reportó como micromoles de nitritos por gramo de tejido fresco, obteniéndose los resultados de la tabla VIII.

Tabla VIII. Poza de nitritos

Día	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7
Tejido	micromoles de nitritos/gramo de tejido fresco								
Cotiledón	74.32	28.98	73.22	76.52	49.66	20.90	67.60	38.19	38.12
Tallo	--	--	--	--	45.63	65.19	62.77	58.16	49.93
Raíz	--	--	--	--	50.42	95.53	62.92	74.40	65.34
Hoja	--	--	--	--	--	52.60	48.21	53.70	108.93

La poza de nitritos en cotiledón presenta una variación del tipo cicardiano, mostrando al 4º día el nivel más bajo de esta poza coinci-

diendo con el día en que existe la mayor cantidad de nitratos en este tejido. En lo que se refiere a la hoja presenta al igual que con la poza de nitratos un nivel constante del 4º al 6º día teniendo un gran aumento para el 7º día.

La raíz muestra una gran elevación del nivel de su poza de nitritos al 4º día para disminuir drásticamente al 5º día y mantenerse relativamente constante, el tallo por su parte presenta un ligero aumento en el nivel de su poza al 4º día disminuyendo poco a poco los siguientes días. Gráfica 6

III.4.5. Poza de aminoácidos totales.

Otra de las pozas metabólicas que fueron determinadas fue la de los aminoácidos totales, la cual se reporta como miligramos de aminoácidos totales por gramo de tejido fresco. Los resultados obtenidos se reportan en la tabla IX.

Tabla IX. Poza de a.a. totales.

Día	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7
Tejido	miligramos de a.a. totales/gramo de tejido fresco								
Coti-									
ledón	60.70	52.97	21.57	31.64	41.26	45.25	56.95	21.60	27.90
Tallo	--	--	--	--	31.66	36.33	29.54	29.54	29.53
Raíz	--	--	--	--	18.70	28.95	18.40	17.35	15.12
Hoja	--	--	--	--	--	29.77	16.18	20.86	30.94

Esta poza muestra una gran cantidad de aminoácidos en los cotiledones al día cero, este resultado era de esperarse debido a que como se ha venido mencionando la semilla de C.ensiformis almacena su nitrógeno en el aminoácido canavanina el cual se encuentra en grandes cantidades en los cotiledones de la semilla.

Mientras que el nivel de la poza de a.a. totales tiende a disminuir en la raíz, en la hoja este nivel tiende a aumentar a medida que pasa el tiempo. La cantidad de aminoácidos en el tallo se mantiene constante durante el período de estudio. Gráfica 8

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

Resumiendo los resultados expuestos anteriormente tenemos:

1.- La mayor actividad de arginasa se presentó en la raíz, así como en el tallo en los primeros días; mientras que para el cotiledón y la hoja es mucho menor. Estos datos nos sugieren que la canavanina es transportada de los cotiledones donde se encuentra almacenada a la raíz en donde es hidrolizada por la arginasa.

2.- La enzima ureasa presentó una gran actividad en los cotiledones en tanto que para hoja, tallo y raíz fue mucho menor; lo cual puede estar indicando que la hidrólisis de la urea liberada por la arginasa se realiza en los cotiledones básicamente, siendo apoyada esta sugerencia

por los datos obtenidos de las pozas metabólicas de urea y amonio.

3.- La concentración de nitratos y aminoácidos libres en el tallo, la raíz y la hoja son marcadamente menores a las encontradas en los cotiledones. Estos resultados nos sugieren que tanto los nitratos como los aminoácidos libres son transportados de los cotiledones a los demás tejidos para ser transformados a otros compuestos importantes para el metabolismo de la planta.

4.- La poza metabólica que presentó el menor nivel en los cuatro tejidos estudiados de las cuatro determinadas fue la de nitritos. Este resultado aunado con la rica poza determinada de nitratos y siendo los nitritos un metabolito intermedio en la cadena de reacciones enzimáticas nitrato reductasa-nitrito reductasa-enzimas reasimiladoras de amonio, nos indican que dichas enzimas pueden tener un papel importante en el metabolismo nitrogenado de esta planta.

5.- La poza metabólica de amonio presentó la disminución de sus niveles con respecto al tiempo en cada uno de los tejidos estudiados con excepción de las hojas en las cuales sucedió el fenómeno contrario. Esta disminución puede ser el resultado de la asimilación de este amonio por las enzimas de la ruta GS/GOGAT o por la ruta de la GDH. Así como también puede ser el resultado del transporte del amonio a otros tejidos, como sería el caso de los cotiledones los cuales muy proba-

blemente exportan el amonio liberado por la ureasa a las hojas.

6.- Los mayores niveles presentados por la poza de urea fueron en el tallo y la raíz, mientras que en el cotiledón y la hoja no fueron detectados por el método empleado (con excepción de la hoja de 4 días de germinación). La posible explicación de los altos niveles de urea en estos tejidos es debido a la gran actividad presentada por la arginasa en la raíz siendo después muy probablemente transportada esta urea al cotiledón, para ser hidrolizada a amonio, a través del tallo.

En base a los resultados obtenidos y siendo el objetivo de este trabajo el proponer un modelo de la movilización del nitrógeno guardado en el grupo guanidinoxi de la canavanina se propone el modelo presentado en la figura IV.1.

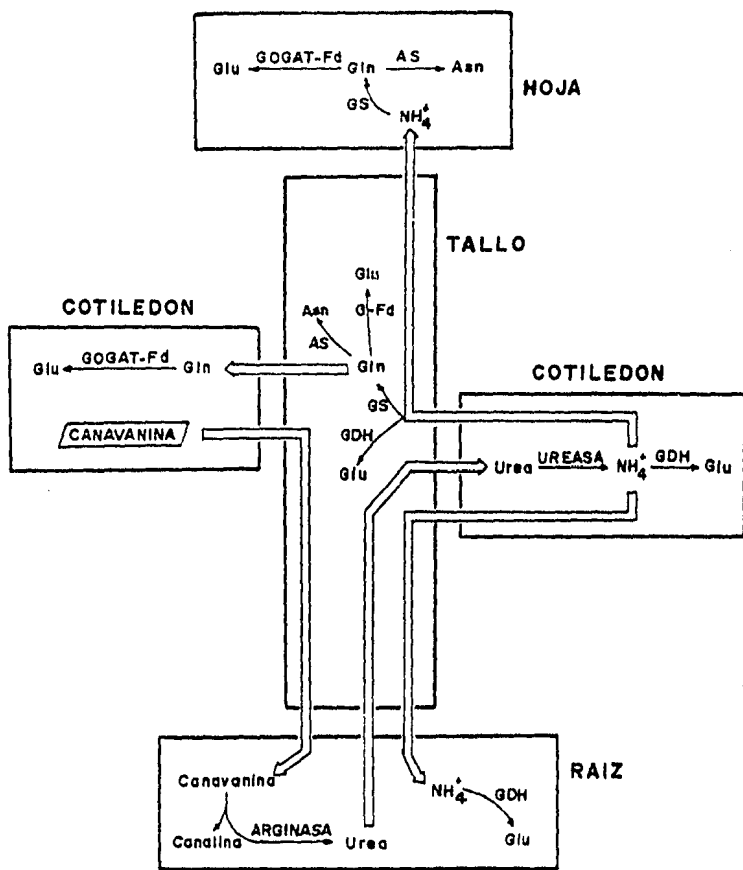
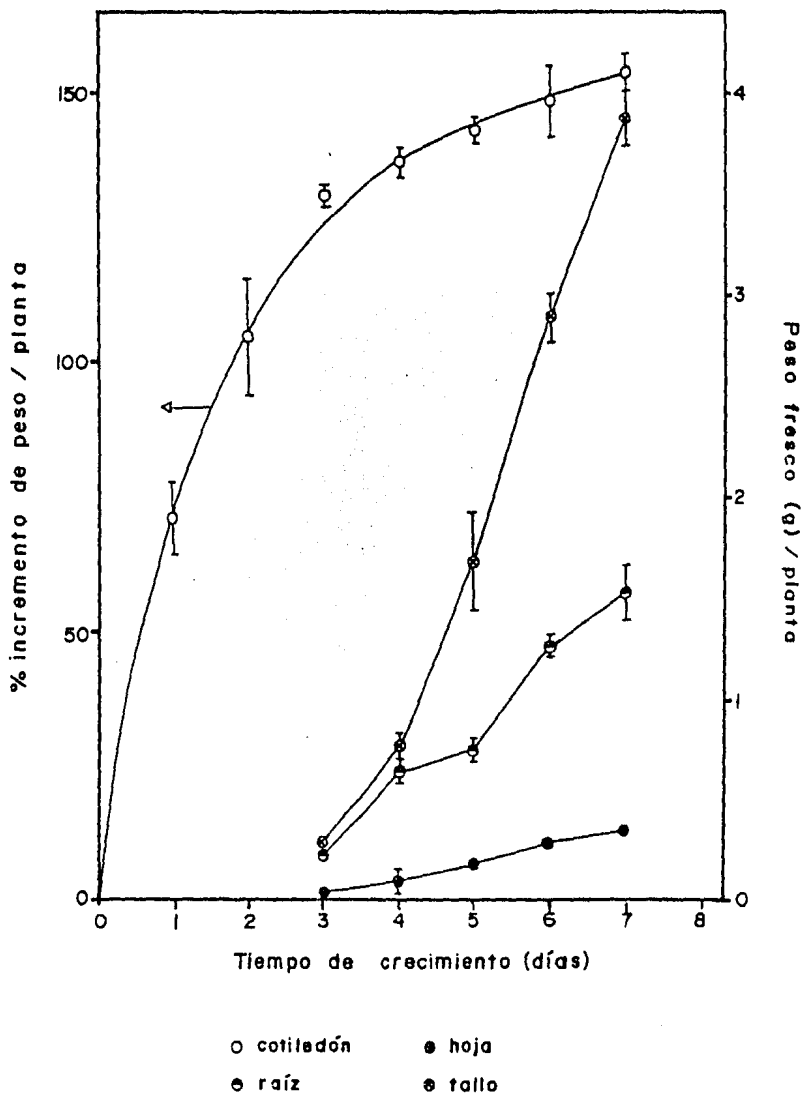
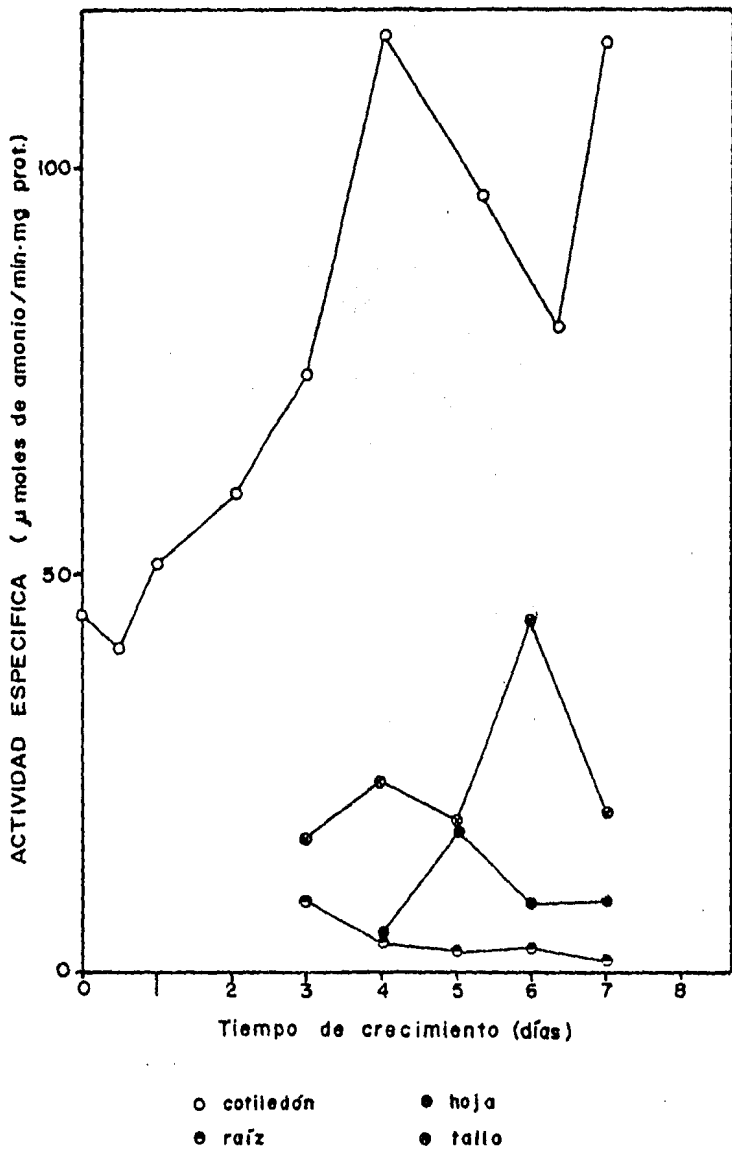


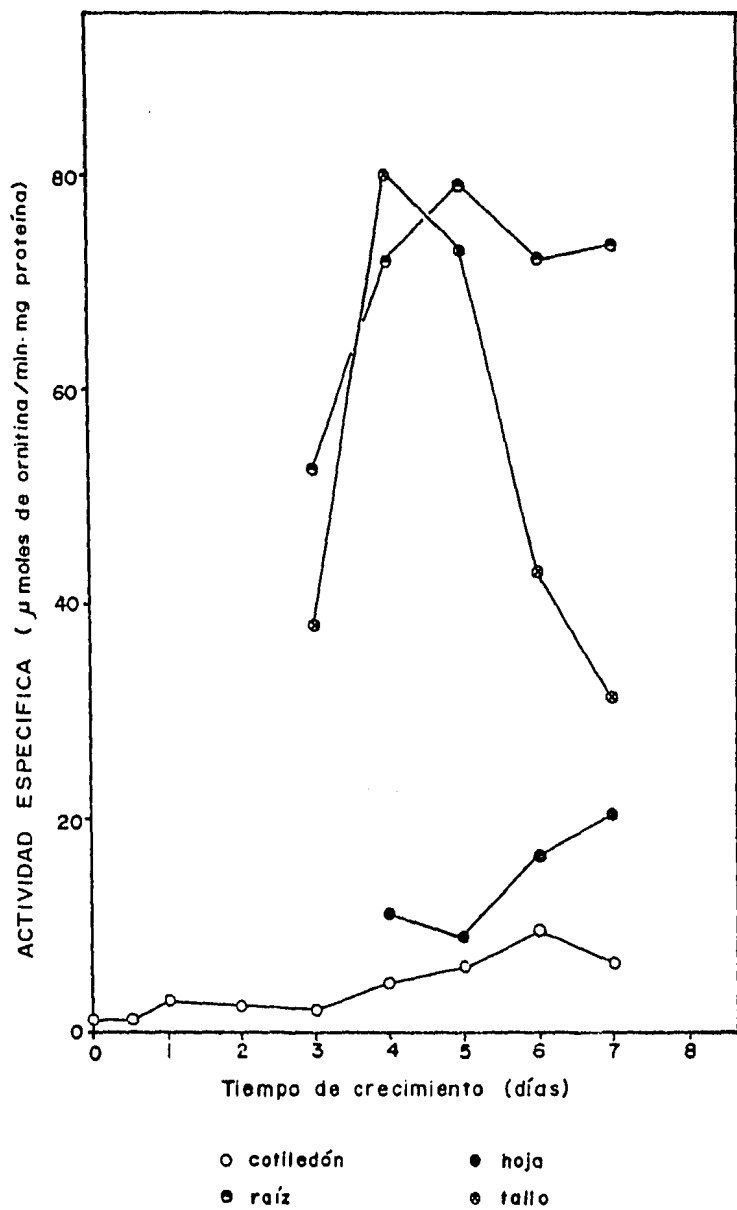
FIG. IV 1. Modelo propuesto para el metabolismo nitrogenado en plantas de *C. ensiformis* de 7 días. GOGAT-Fd, glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina; AS, aspargino sintetasa; GS, glutamino sintetasa; GDH, deshidrogenasa glutámica.



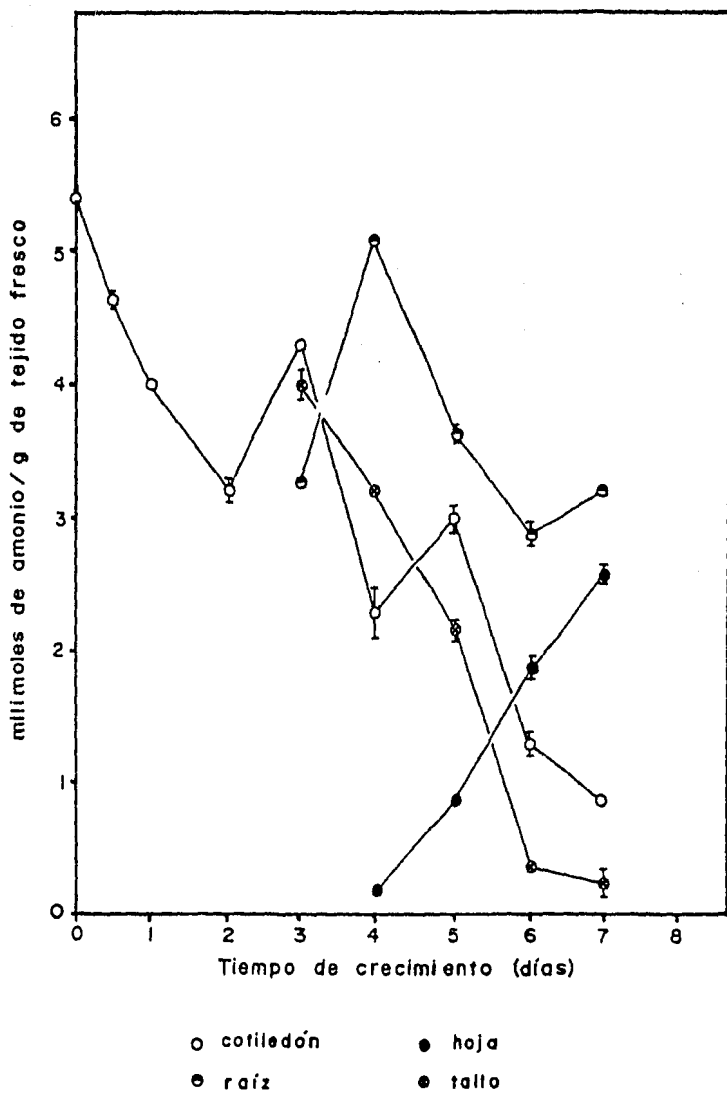
GRAFICA I.- CINETICA DE CRECIMIENTO



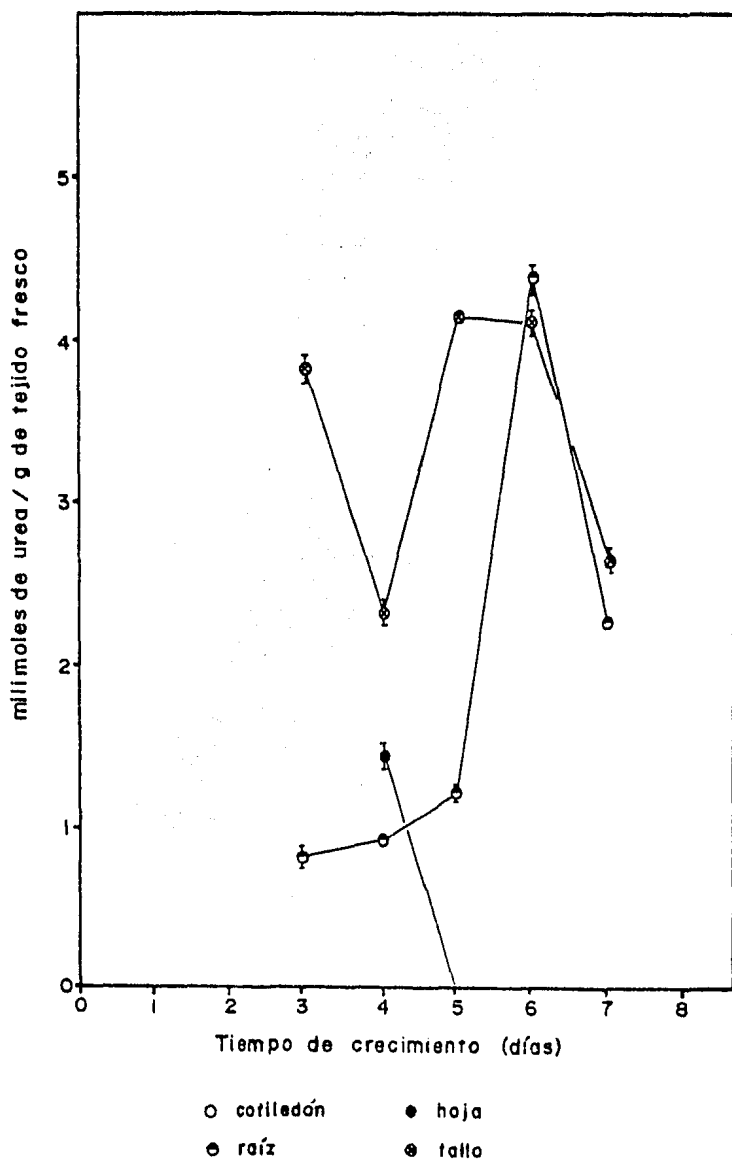
GRAFICA 2.- ONTOGENIA DE UREASA



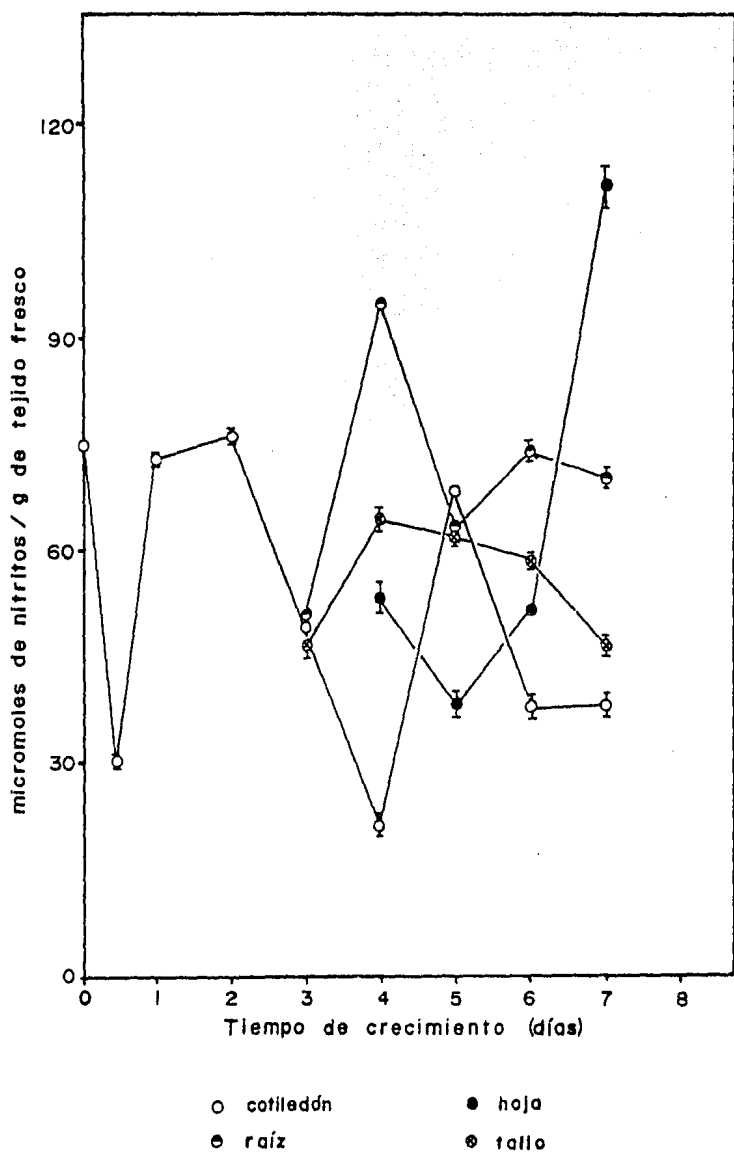
GRAFICA 3.- ONTOGENIA DE ARGINASA



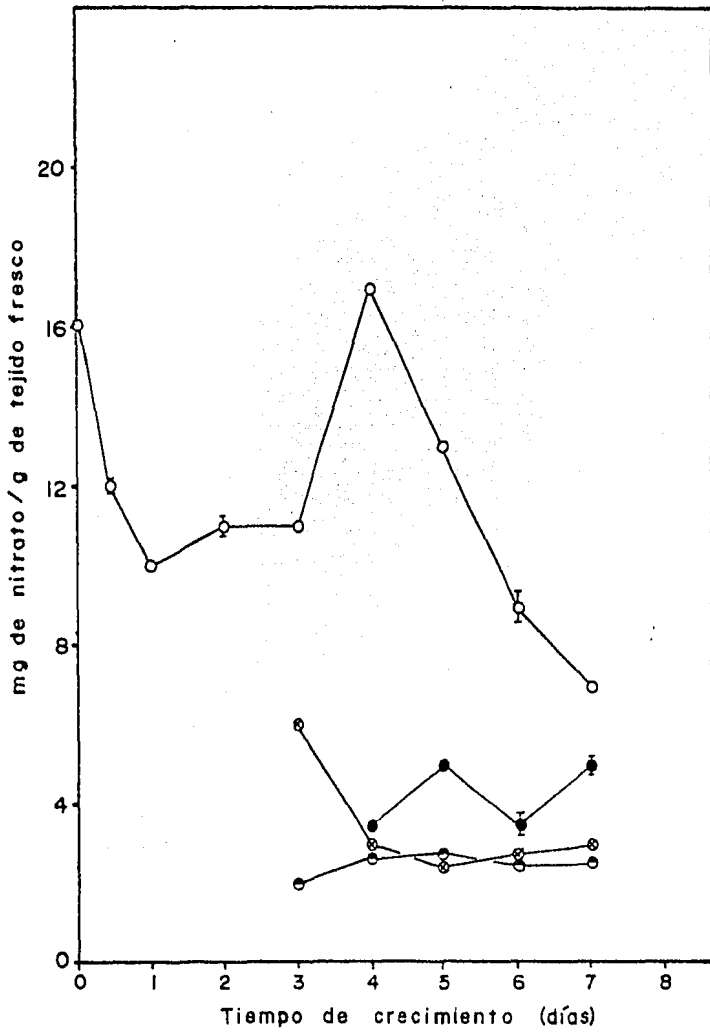
GRAFICA 4.- POZA DE AMONIO



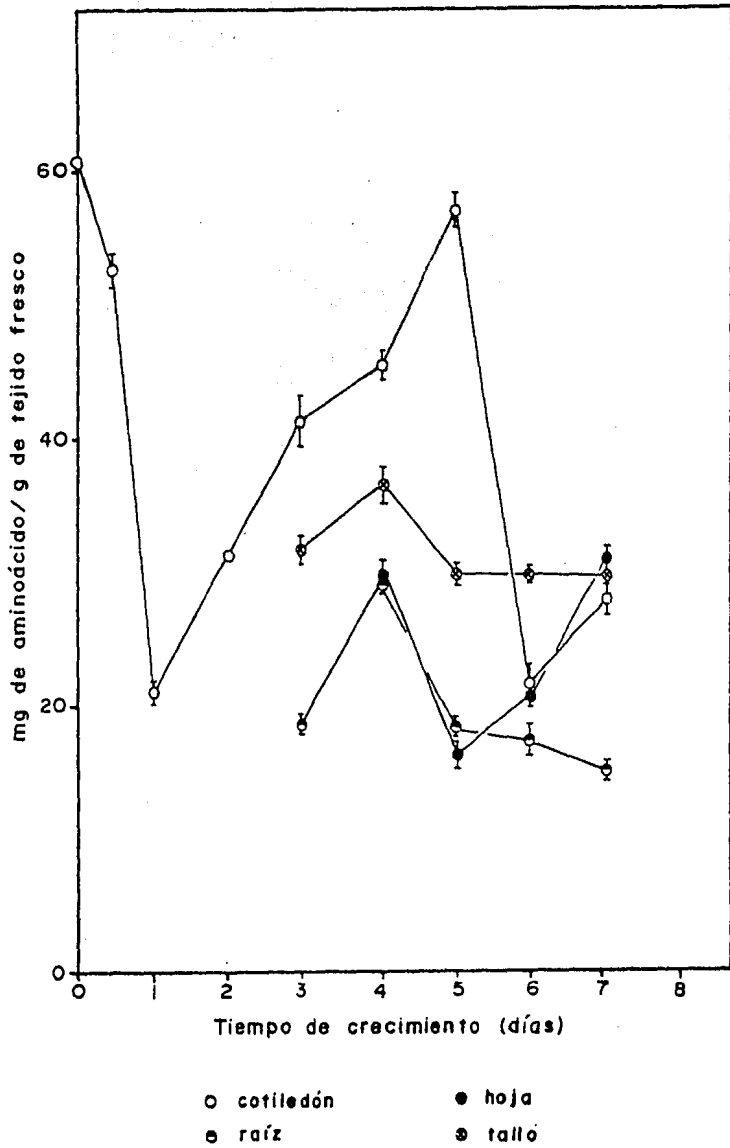
GRAFICA 5.- POZA DE UREA



GRAFICA 6.- NITRITOS



GRAFICA 7.- NITRATOS



GRAFICA 8.- AMINOACIDOS TOTALES

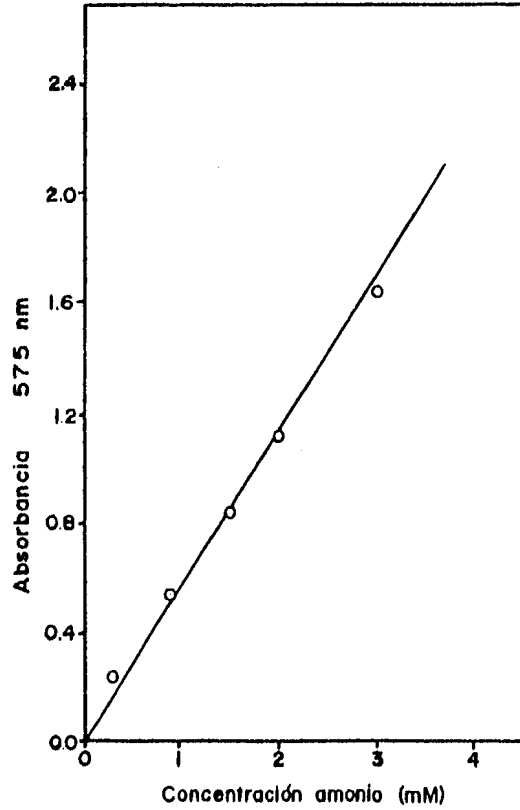


FIGURA II.1 CURVA ESTANDAR DE AMONIO

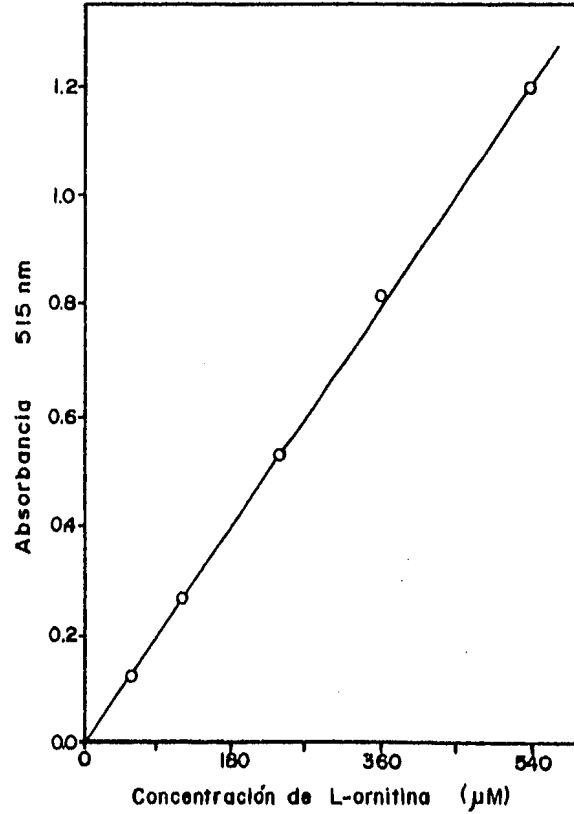


FIGURA II.2 CURVA ESTANDAR DE L-ORNITINA

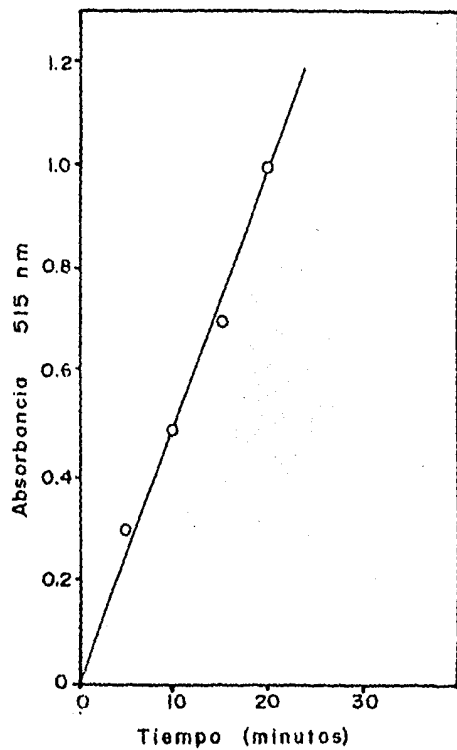


FIG. II. 3 ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA ARGINASA

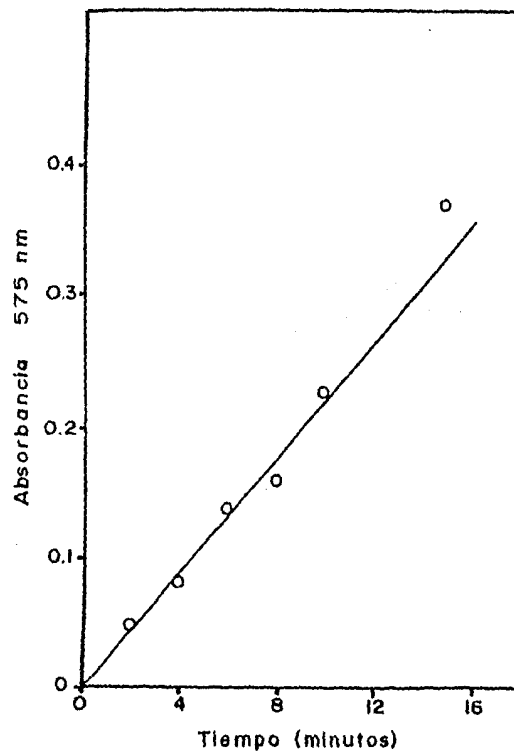


FIG. II. 4 ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA UREASA

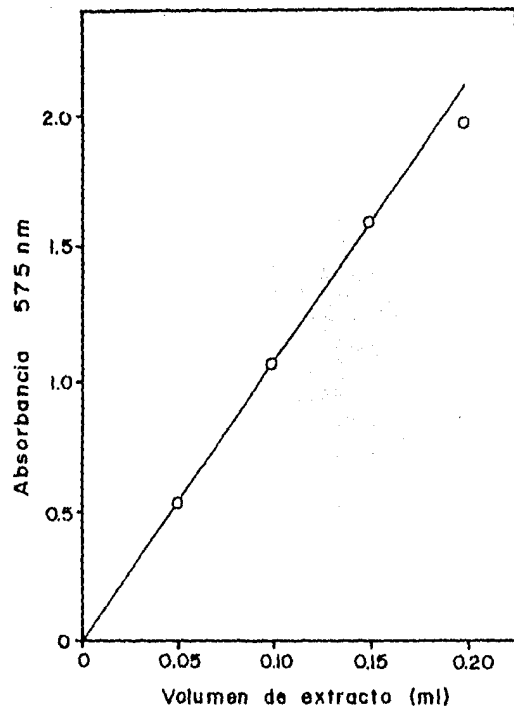


FIG. II.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA UREASA

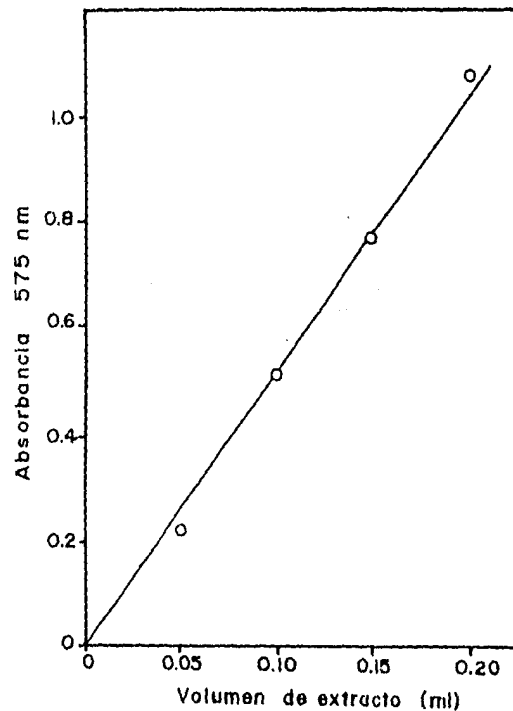


FIG. II.6 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ARGINASA

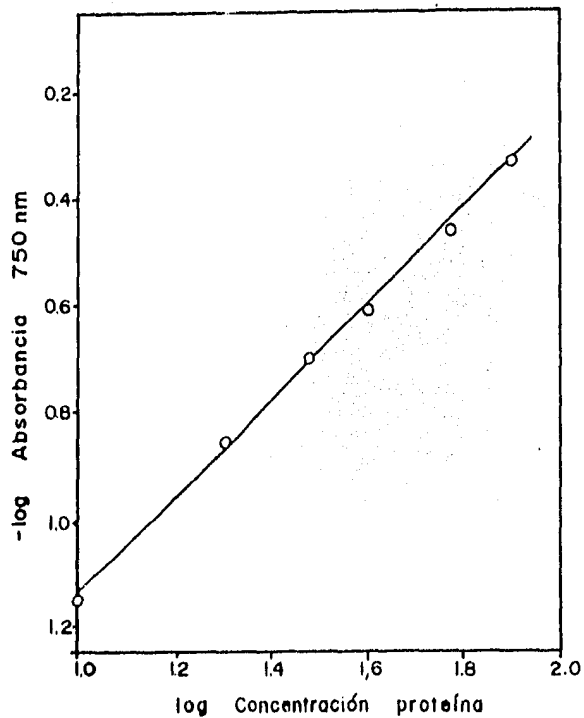


FIG.II. 7 CURVA ESTANDAR DE
PROTEINA

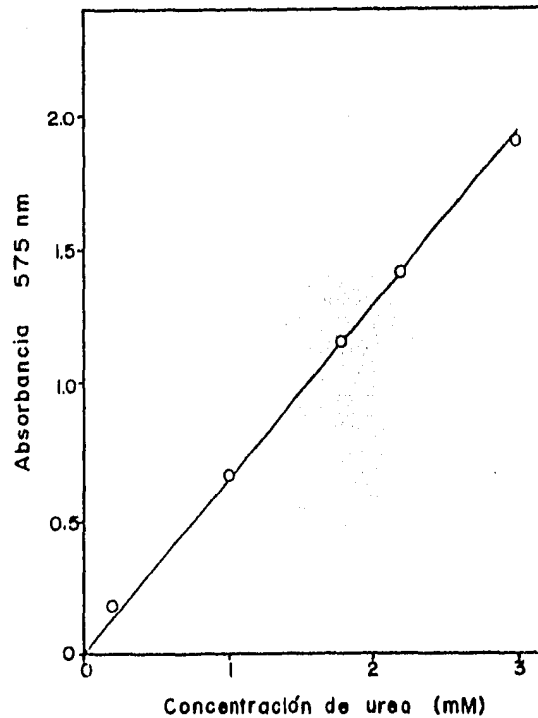


FIG.II. 8 CURVA ESTANDAR DE
UREA

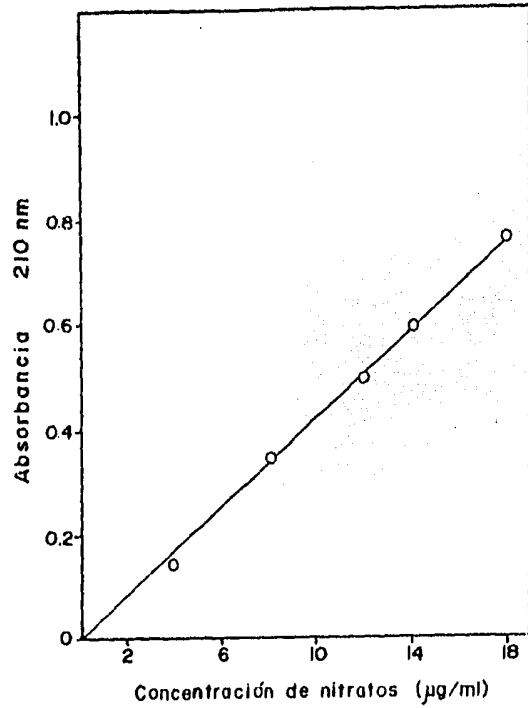


FIG. II. 9 CURVA ESTANDAR DE NITRATOS

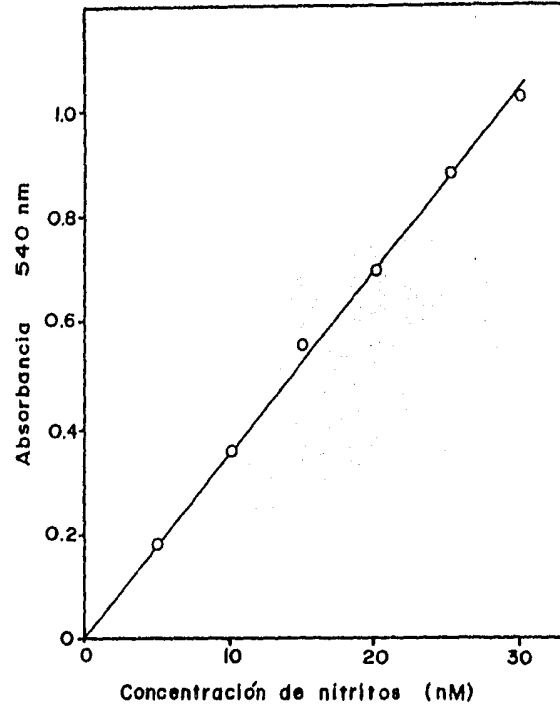
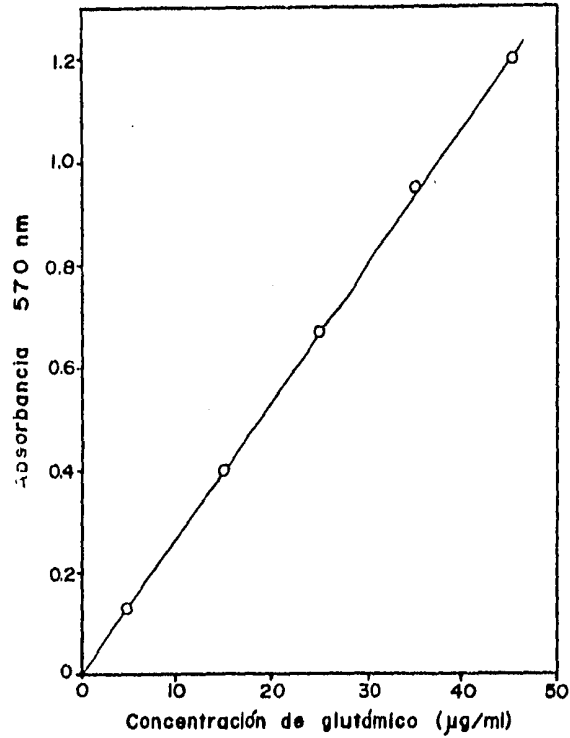


FIG. II.10 CURVA ESTANDAR DE NITRITOS



**FIG. II. II CURVA ESTANDAR DE
AMINOACIDOS TOTALES**

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

- 1.- Sánchez, S.O. (1979). La flora del Valle de México. Ed. Herreo, S.A. México, D.F. pp 197-199
- 2.- Vega, A. y Sotelo, A. (1982). Valor nutritivo de la semilla de Canavalia ensiformis L. sola y suplementada con metionina y cereales. Rev.Soc.Mex. 28: 92-96
- 3.- Summerfiel, R.J. and Buting, A.H. (1980). Avances and legumen scienc. University of Reading. England.
- 4.- Kessler, Ch. (1982/1983). Estudio agronómico realizado por la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yucatán Ap.Postal 116-D
- 5.- Rosenthal, G.A. (1977). The biological effects and mode of action of L-canavanine a structural analogue of L-arginine. The Quarterly Review of Biology. 52: 155-176
- 6.- Rosenthal, G.A. (1970). Investigations of Canavanine Biochemistry in Jack Bean plant, Canavalia ensiformis (L) DC. Plant physiol. 46: 273-276
- 7.- Kitagawa, M. and Tomiyama, T. (1929). A new amino-compound in the jack bean and a corresponding new ferment (I). J. Biochem. (Tokyo). 11: 265-271
- 8.- Kitagawa, M. and Yamada, H. (1932). Studies on a diaminoacid, canavanine (II). J. Biochem. (Tokyo). 16: 339-349

- 9.- Gulland, J.M. and Morris, D.J.O.R. (1935). Canavanine. J. Chem. Soc. 1935: 763-766
- 10.- Damadaran, M. and Narayanan, K.G.A. (1939). The preparation of canavanine from Canavalia obtusifolia. Biochem.J. 33: 1740-1741
- 11.- Cadden, J.F. (1940). Spatial configuration and preparation of canavanine. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 45: 224-226
- 12.- Greenstein, J.F. and Winitz, M. (1961). Chemistry of the amino acids. Vol. 3, pp 2622-2628, John Wiley and Sons, New York
- 13.- Frankel, M., Knobler, Y. and Zvilichovsky, G. (1963). Synthesis of DL-canavanine. J.Chem.Soc. pp 3127-3130, 68
- 14.- Hunt, G.E. and Thompson, J.F. (1971). L-canavanine sulfate from Canavalia ensiformis (jack bean). In H. E. Law (9ed) Biochemical Preparations. Vol. 13, pp 41-45 John Wiley and Sons, New York
- 15.- Fearon, W.R. and Bell, E.A. (1955). Canavanine detection and occurrence in Colutea arborescens. Biochem.J. 59: 221-224
- 16.- Bell, E.A. (1958). Canavanine and related compounds in Leguminosae. Biochem.J. 70: 617-619
- 17.- Birdsong, B.A., Alston, R. and Turner, B.L. (1960). Distribution of canavanine in the family leguminosae as related to phyletic groupings. Can.J.Botany. 38: 499-505

- 18.- Turner, B.L., and Harborne, J.B. (1967). Distribution of canavanine in the plant Kingdom. *Phytochemistry*. 6: 863-866
- 19.- Bell, E.A., Lackey, J.A. and Polhill, R.M. (1978). Biochemical Systematics and Ecology. 6: 201-212
- 20.- Tschiersch, B. (1961). Über das Vorkommen von Canavanin. *Flora*. 150: 87-94
- 21.- VanEtten, C.H., Miller, R.W., Wolff, I.A., and Jones, Q. (1961) Aminoacid composition of twenty seven selected seed meals. *J. Agr. Food chem.* 9: 79-82
- 22.- Rosenthal, G.A. (1970). The interrelation ship of canavanine and urease in seeds of the Lotoideae. *J. Exp. Bot.* 25: 609-613
- 23.- Bell, E.A. (1960). Canavanine in the Leguminosae. *Biochem. J.* 75: 618-620
- 24.- Mothes, K. (1961). The metabolism of urea and ureides. *Can. J. Bot.* 39: 1785-1807
- 25.- Nakatu, S., Haratake, S., Sakurai, Z., Zyo, N., Nishihara, Z., and Hayasido, M. (1964). The change of quantity of canavanine in leguminous plants in the process of germination growth, and fructification. *Seikagaku*. 36 : 467-471
- 26.- Rosenthal, G.A. (1977). Nitrogen allocation for L-canavanine synthesis and its relationship to chemical defense of the seed. *Biochem. System. Ecol.* 5: 219-220

- 27.- Horowitz, N.H., and Srb, A.M., Growth inhibition of neurospora by canavanine and its reversal. *J.Biol.Chem.* (1968) 174: 371-378
- 28.- Volcani, B.E., and Snell, E.E. (1948). The effect of canavanine arginine and related compounds on the growth of bacteria. *Jour. Biol.Chem.* 174: 893-902
- 29.- Bonner, J. (1949). Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the *Avena* coleoptile. *Am.J.Bot.* 36: 323-332
- 30.- Whight, J.E., and Srb, M.A. (1950). Inhibition of growth in maize embryo by canavanine and its reversal. *Bot.Gat.* 112: 52-57
- 31.- Walker, J.B. (1955). Canavanine and homoarginine as antimetabolites of arginine and lysine in yeast and algae. *J.Biol.Chem.* 212: 207-215
- 32.- Schwartz, J.A., and Maas, W.K. (1960). Analysis of the inhibition of growth produced by canavanine in *Escherichia coli*. *J. Bacterial.* 79: 794-799
- 33.- Schachtele, C.F., and Rogers, P. (1965). Canavanine death in *Escherichia coli*. *J. Mol.Biol.* 14: 474-489
- 34.- Schachtele, C.F., and Rogers, P. (1968). Mechanism of canavanine In *Escherichia coli*. I. Effect of canavanine on macromolecular syntheses. *J.Mol.Biol.* 34: 843-860
- 35.- Greentain, J.F., and Winitz, M. (1961). Chemistry of the Amino Acids. Vol. 3, p.p. 2622-2628. John Wiley and Sons, New York

- 36.- Attias, J., Schlesinger, M.J., and Schelesinger, S. (1969). The effects of aminoacid analogues on alkaline phosphatase formation in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 244: 3810-3817
- 37.- Schchtele, C.F., Anderson, D.L., and Rogers, P. (1970). Insolatation of rapidly sedimenting canavanyl-protein-DNA-membrane complex from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 49: 255-261
- 38.- McMahon, D., and Langstroth, P. (1972). The effects of canavanine and of arginine starvation on macromolecular synthesis in *Chlamydomonas reinhardi*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 239-250
- 39.- Ackermann, W.W., Cox, D.C., and Dinka, S. (1965). Control of histone and DNA synthesis with canavanine, puromycin and poliovirus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19: 745-750
- 40.- Hare, J.D. (1969). Reversible inhibition of DNA synthesis by the arginine analogue canavanine in hamster and mouse cell in vitro. *Exp. Cell. Res.* 58: 170-174
- 41.- Walker, J.B. (1956). Biosynthesis of arginine from canavanine and ornithine in kidney. *J. Biol. Chem.* 218: 549-556
- 42.- Walker, J.B. (1957). Studies on the mechanism of action of kidneez transamidinase. *J. Biol. Chem.*, 224: 57-66
- 43.- Kihara, H., and Snell, E.E. (1957). The enzymatic cleavage of canavanine to O-ureidohomoserina and ammonia. *J. Biol. Chem.* 226: 485-495
- 44.- Maas, W.K. (1960). Studies on repression of arginine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26: 183-191

- 45.- Faanes, R., and Rogers, P. (1968). Roles of arginine and canavanine in the synthesis and repression of ornithine transcarbamoylase by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 96: 409-420
- 46.- Faanes, R., and Rogers, P. (1972). Repression of enzymes of arginine biosynthesis by L-canavanine in arginyltransfer ribonucleic acid synthetase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112: 102-113
- 47.- Tschiersch, B. (1966). Non-competitive inhibition of enzymatic reactions by canavanine. *Tetrahedron Letters.* 28: 3237-3241
- 48.- Rosenthal, G.A., and Dahlman, D.L. (1975). Non-protein amino acid-insect interactions. II. Effects of canaline-urea cycle amino acids on growth and development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L) (sphinxidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 52A: 105-108
- 49.- Kammer, A., Dahlman, D.L. and Rosenthal, G.A. (1978). *J. Exp. Biol.* 75: 123-132
- 50.- Rosenthal, G.A. (1981). A mechanism of L-canaline toxicity. *Eur. J. Biochem.* 114: 301-304
- 51.- Plant non protein Amino and Inimo Acid Biological, Biochemical and Toxicological Properties. Rosenthal, G.A. (1982) Academic Press. New York pp 95-112
- 52.- Hague, D.F. Studies of Storage Proteins of Higher Plants. *Plant Physiol.* (1975) 55: 636-642

- 53.- Goldstein, I.J., Hollerman, C.E. and Merrick, J.M. (1965). Protein-carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with Concanavalin A. *Biochim.biophys. Acta* 97: 68-76
- 54.- Rosenthal, G.A. (1972). Investigations of canavanine biochemistry in the Jack Bean plant, Canavalia ensiformis (L.) DC. II. Canavanine biosynthesis in the developing plant. *Plant Physiol.* 50: 328-331
- 55.- Fowden, L. (1971). Amino acid biosynthesis. In: J. B. Pridham and T. Swain eds., *Biosynthetic Pathways in Higher Plants*. Academic Press, New York. pp. 73-99
- 56.- Whiteside, J.A. and Thurman, D.A. (1971). The degradation of canavanine by jack bean cotyledons. *Planta*, 98: 279-284
- 57.- Töpfer, V.R., Miersch, J. and Reinbothe, H. (1970). Studies on canavanine degradation in Fabaceae. *Biochem.Physiol. Pflanzen.* 161: 231-242
- 58.- Damodaran, M. and Narayanan, K.G.A. (1940). A comparative study of arginase and canavanase. *Biochem.J.* 34: 1449-1459
- 59.- Downum, K.R., Rosenthal, G.A. and William, S.C. (1983). L-arginine and L-canavanine metabolism in Jack Bean, Canavalia ensiformis (L.) DC. and Soybean, Glycine max (L.) Merr. *Plant Physiol.* 73: 965-968

- 60.- Bailey, C.J. and Boulter, D. (1971). Urease, a typical seed protein of the Leguminosae. In. J.B. Harborne, D. Boulter, and B.L. Turner (eds.), *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, pp 485-502 Academic Press, New York
- 61.- Rosenthal, G.A. (1974). The interrelationship of canavanine and urease in seeds of *Lotoideae*. *J.Exp.Bot.* 25: 609-613
- 62.- Granick, S. (1937 a). Urease distribution in plants: general methods. *Plant Physiol.* 12: 471-486
- 63.- Granick, S. (1937 b). Urease distribution in *Canavalia ensiformis*. *Plant Physiol.* 12: 601-623
- 64.- Granick, S. (1938). Urease distribution in *Soya max.* *Plant Physiol.* 13: 29-54
- 65.- Hogan, E.M., Swift, E. and Done, J. (1983). Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry*. Vol. 22, No. 3, pp 663-667
- 66.- Kaplan, A. (1965). Urea nitrogen and urinary ammonia. *Stand. Methods, Clin.Chem.* 5: 245-256
- 67.- Roubelakis, K.A. and Kliewer, W.M. Enzymes of Krebs-Henseleit Cycle in *Vitis vinifera* L. III. In vivo and in vitro studies of arginase. *Plant Physiol.* (1978) 62: 344-347
- 68.- Chinard, R.F. (1952). Photometric estimation of proline and ornithine. *J.Biol.Chem.* 199: 91-93

- 69.- Peterson, G.P. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et-al, which is more generally aplicable. Analytical Biochem. 83: 346-356
- 70.- Nicholas, D.J. and Mason, A.C. (1971). Determination of nitrate and nitrite. Methods of enzymology. 23: 491-503
- 71.- Snell and Snell. Colorimetric methods of analysis. D.Van Nostrand. Co. Inc. Vol. 4 3ª edición (1956)
- 72.- Yanez Ibarra, Alicia Ariadna. (1985). Comportamiento de las enzimas responsables en la asimilación del amonio en Canavalia ensiformis L. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Carrera Químico.