

42

23/4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPORTAMIENTO DE LAS ENZIMAS RESPONSABLES
EN LA ASIMILACION DEL AMONIO EN
CANAVALIA 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

Alicia Ariadna Yáñez Ibarra

MEXICO, D. F.

1985.

EXAMENADO Y APROBADO
EL 10 DE ABRIL DE 1985
MEXICO, D.F.



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

	Página
INTRODUCCION	1
I ANTECEDENTES	3
II MATERIALES Y METODOS	37
III RESULTADOS Y DISCUSION	65
IV CONCLUSIONES	98
V BIBLIOGRAFIA	101
Indice alfabético de autores	122

INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Gráfica de calibración del ϕ - NADH	54
" 2	Linealidad de la actividad de la GDH con respecto al tiempo	55
" 3	Linealidad de la actividad de la GDH con respecto a la concentración	56
" 4	Gráfica de calibración del γ - gluta mil hidroxamato	57
" 5A	Linealidad de la actividad de la GS con respecto al tiempo	58
" 5B	Linealidad de la actividad de la GS con respecto a la concentración	58
" 6	Curva patrón para proteínas	59
" 7	Curva patrón para aminoácidos	60
" 8	Curva patrón para nitratos	61
" 9	Curva patrón para nitritos	62
" 10	Curva patrón para amonio	63
" 11	Curva patrón para urea	64
" 12	Por ciento de incremento en peso fresco en los cotiledones	81
" 13	Por ciento de incremento en peso fresco con respecto al día anterior en raíz, tallo y hoja	82

FIGURA 14	Porciento de incremento en peso fresco con respecto al tercer día en raíz, tallo y hoja	83
" 15	Incremento en peso fresco en raíz, tallo y hoja	84
" 16A	Incremento en peso seco en los cuatro tejidos	85
" 16B	Porciento de humedad en los diferentes tejidos	86
" 17	Variación de la poza de proteína total en los cotiledones	87
" 18	Variación de la poza de proteína total en raíz, tallo y hoja	88
" 19	Poza de aminoácidos totales	89
" 20	Poza de nitratos en todos los tejidos	90
" 21	Poza de nitritos en todos los tejidos	91
" 22	Poza de urea en raíz, tallo y hoja	92
" 23	Poza de amonio en todos los tejidos	93
" 24	Actividad específica de la GS	94
" 25	Actividad específica de la GDH en raíz y tallo, A aminativa y B desaminativa	95
" 26	Actividad específica de la GDH en los cotiledones, A aminativa y B desaminativa.	96
" 27	Actividad específica de la GDH en hoja, A aminativa y B desaminativa	97

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina-5'- difosfato
AMP	Adenosina-5'- monofosfato
ARN	Acido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
AS	Aspargino sintetasa
ASB	Albúmina sérica bovina
ATP	Adenosina-5'- trifosfato
Plantas C ₃	Son las que fijan el CO ₂ en forma primaria por medio de la enzima 1,5 bofosfato carboxilasa.
Plantas C ₄	Son las que fijan el CO ₂ en forma primaria por medio de la enzima piruvato carboxilasa
Fd red	Ferredoxina reducida
GABA	Acido γ-aminobutírico
GDH	Deshidrogenasa glutámica
GDH-NAD ⁺	Deshidrogenasa glutámica NAD ⁺ -dependiente
GDH-NADH	Deshidrogenasa glutámica NADH-dependiente
Glu	Acido glutámico
Glu-Na	Glutamato de sodio
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamino sintetasa
GTP	Trifosfato de guanosina
IDP	Difosfato de inosina

α -KG	α -cetoglutarato
K_M	Constante de Michaelis-Menten
mg	Miligramos
μ g	Microgramos
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
NAD ⁺	Nicotinamida-adenin-dinucleótido forma oxidada
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido forma reducida
NADP ⁺	Fosfato de nicotimamida-adenin dinucleótido forma oxidada
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido forma reducida
NiR	Nitrito reductasa
nm	Nanómetros
NR	Nitrato reductasa
P_i	Fosfato inorgánico
p/p	Relación peso a peso
p/v	Relación peso a volumen
rpm	Revoluciones por minuto
v/v	Relación volumen a volumen

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

Canavalia ensiformis es una leguminosa que presenta grandes ventajas como cultivo, y se piensa en ella como una fuente potencial de forraje, pero su contenido en compuestos tóxicos limitan e impiden tal uso.

El proyecto global de investigación de nuestro grupo tiene como meta obtener una variedad de Canavalia que presente las mismas ventajas que C. ensiformis pero a la que se le hayan disminuido los compuestos tóxicos para su utilización plena como alimento.

Este estudio en particular trata sobre el comportamiento de las enzimas glutamato deshidrogenasa (E.C.1.4.1.2.) y glutamino sintetasa (E.C.6.3.1.2.) durante los primeros 7 días de germinación con el fin de obtener un

modelo que nos permita explicar y comprender la reasimilación del amonio llevada a cabo por esta planta.

De esta manera el objetivo que se pretende es obtener una cinética de desarrollo de la planta durante los primeros 7 días de crecimiento y determinar la ontogenia de las enzimas glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa para cada tiempo y cada tejido obtenido.

C A P I T U L O I

ANTECEDENTES

I.1. GENERALIDADES

Canavalia ensiformis L. es una planta que se cree sea originaria de México y el sur de Brasil y Perú, que ahora es cultivada a través de los trópicos como siembra de protección para ciertas cosechas o como abono verde (1).

Canavalia ensiformis muestra importantes características agronómicas como son:

1. Su desarrollo total aún en climas y suelos poco favorables como los del estado de Yucatán, con suelos altamente alcalinos con un pH mayor de 7.5 y sumamente rocosos.
2. Su gran rendimiento en follaje, que la hace una fuente potencial de forraje.
3. Es una planta que se encuentra relativamente libre de plagas y enfermedades. Tolera más que cualquier otra legu

minosa, desarreglos por sequía, hongos, insectos, pH bajo, sal, arena, sombra, siembras en declive, virus e inundaciones.

4. Suprime las malezas.

5. Las vainas son grandes y fáciles de cosechar manualmente.

En la zona henequenera y bajo condiciones de cuidado mínimo y suelo sin mecanizar, en el año de 1981, una siembra grande de canavalia produjo 1800 kg/ha de semillas secas, con el 30% de proteína cruda; en el año de 1982 la producción fue de 2500 kg/ha (2). Las producciones anteriores pueden ser comparadas con las de 1000 kg/ha y 400 kg/ha de maíz y frijol respectivamente, bajo condiciones similares de cultivo (2).

Las semillas secas contienen alrededor del 24.5% de proteína y la parte aérea de la planta contiene entre 13.8 y 16% de proteína cruda (1).

Uno de los problemas para utilizar a la canavalia como alimento es el nutritivo, ya que como todas las leguminosas, presenta deficiencia de metionina e isoleucina, sin embargo éste puede ser superado mediante un balance de la dieta que se les da a los animales, que es como se procede normalmente con todas las leguminosas.

Por otro lado, es sabido que las leguminosas contienen una gran variedad de compuestos tóxicos de grupos tan di-

versos como los alcaloides, los análogos de aminoácidos, los compuestos cianogénicos, las isoflavonas, los inhibidores de proteasas, las fitohemaglutinas, las saponinas y los compuestos derivados del selenio (3).

El principal problema de la semilla de *canavalia radica* en que presenta constituyentes tóxicos de dos tipos principales: proteínas y análogos de aminoácidos.

Entre las proteínas, la toxicidad de las fitohemaglutinas y de los inhibidores de las enzimas digestivas puede ser destruída mediante tratamientos térmicos aplicados al grano (4).

Entre los análogos de los aminoácidos encontramos principalmente a la canavanina, un análogo estructural de la arginina; y a la canalina que es un análogo estructural de la ornitina, la cual es producida por la ruptura hidrolítica de la canavanina.

I.2. CLASIFICACION TAXONOMICA DE LA PLANTA

La clasificación taxonómica de *Canavalia ensiformis* ha sido recientemente revisada y es como sigue:

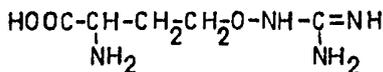
- Reino PLANTAE
- División MAGNOLIOPHYTA
- Clase MAGNOLIOPSIDA

- Subclase ROSIDAE (5)
- Orden ROSALES (6)
- Familia LEGUMINOSAE
- Subfamilia PAPILIONOIDEAE
- Tribu PHASEOLEAE
- Subtribu DIOCLEINAE
- Género CANAVALIA
- Especie CANAVALIA ENSIFORMIS (7)

1.3. INCIDENCIA DE LA CANAVANINA EN PLANTAS SUPERIORES

Como parte de una serie de estudios llevados a cabo desde 1929 hasta 1937, se aisló y caracterizó químicamente un aminoácido básico nuevo en las plantas. Se le dió el nombre de canavanina después de su aislamiento de semillas de Canavalia ensiformis (8).

La canavanina (ácido α -amino- β -guanidinoxibutírico), es el compuesto principal de reserva de muchas plantas leguminosas (9).



CANAVANINA

Entre tales leguminosas se encuentra Canavalia ensiformis, C. lineata y C. obtusifolia (8, 10, 11). También se aisló canavanina de C. arborescens (12), y se le ha encontrado en los géneros: Medicago, Ornithopus y Colutea.

Entre otras especies de leguminosa cuyas semillas contienen canavanina tenemos: Anthyllis vulneraria, Caragana arborescens, Coronilla emerus, C. valentia, Desmodium ayrens, Hedysarum coronarium, Indigofera gerardiana, Medicago echinus, M. lupulina, M. sativa, Ononis fructicosa, Trifolium dubium, T. hybridum, T. pratense y Vicia sativa (13).

Hasta el año de 1981 se conocían aproximadamente 500 leguminosas representando 240 géneros que almacenan canavanina (14).

La aparición natural de la canavanina ha dado un valor real al entendimiento y delineamiento de las relaciones filogenéticas en la subfamilia Papiloinoideae (14, 15).

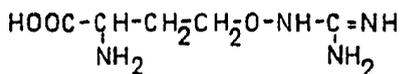
Este grupo de leguminosa continúa siendo la única fuente confirmada de este metabolito secundario.

La presencia de canavanina en semillas de C. ensiformis en concentraciones del 3 al 5% de peso seco fue el hecho que sugirió que su función es como reserva de nitrógeno y por lo tanto, la presencia de un sistema asociado con su utilización. La mayoría de las semillas contienen del 2 al 4% de este metabolito, muchas tienen cantidades

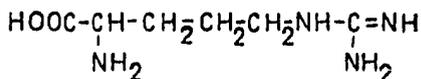
más pequeñas, en el orden del 0.1 al 0.2%, pero otras son verdaderos almacenes de canavanina, ya que concentraciones del 10 al 13% de peso seco no son descubrimientos inusuales. En ciertas leguminosas, la proporción total de nitrógeno correspondiente a canavanina puede fácilmente exceder el 90% del nitrógeno total correspondiente a aminoácidos solubles (16).

I.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y TOXICIDAD DE LA CANAVANINA

La L-canavanina es un aminoácido no protéico con un potente efecto antimetabólico, debido en gran medida a su analogía estructural con la L-arginina.



CANAVANINA



ARGININA

La marcada acción insecticida de la canavanina, su habilidad para interrumpir muchas reacciones bioquímicas esenciales en un amplio rango de organismos procariontes y eucariontes, su apreciable almacenamiento en tejidos tan importantes como la semilla, son consistentes con el papel aleloquímico que se le ha asignado para la defensa de la planta contra insectos fitófagos y otros hervívoros (17).

La canavanina inhibe a las enzimas reguladoras de la biosíntesis de la arginina y sirve como sustrato en virtualmente todas las reacciones que utilizan arginina e inhibe competitivamente la toma de ésta (17). La canavanina también puede ser aminoacilada por la arginil ARNt-sintetasa (18, 19) lo que provoca que todas las proteínas que contienen arginina estén sujetas potencialmente al reemplazo por canavanina cuando esta última se encuentra presente.

La evidencia de que la canavanina es incorporada en proteínas ha sido obtenida en adenovirus (20), E. coli (21), Chlamydomonas reinhardtii (22), células de carcinoma Walker (23) y virus del mosaico del tabaco (24). En E. coli la canavanina funciona como un represor de las enzimas que catalizan la síntesis de la arginina (25).

Puesto que el pH isoeléctrico para la canavanina es de 8.2 mientras que para la arginina es de 10.8 esto pro

duce una disminución en la basicidad, lo que altera la interacción del residuo con su entorno y finalmente cambia la estructura terciaria y/o cuaternaria de la proteína (26). Es este cambio lo que probablemente reprime el crecimiento bacterial (27), el desarrollo de algas y levaduras (28), el cultivo de tejidos humanos (29) y el de otras líneas celulares de mamíferos (30). Lo anterior da crédito al concepto de que la presencia de aminoácidos no comunes como la canavanina, además de actuar como almacén de nitrógeno, presenta la ventaja adaptativa de hacer a la planta menos susceptible al ataque de varios animales y plantas superiores (31).

Las leguminosas que producen canavanina no sintetizan canavanil-proteínas en cantidades detectables (32), lo que sugiere que tienen una aminoacil ARNt sintetasa específica para la arginina y otra para la canavanina.

En especies vegetales en las cuales la canavanina es una sustancia extraña, interfiere con el metabolismo normal de la planta e inhibe su crecimiento (33, 34, 35, 36, 37), afecta la inducción de la actividad de la nitrato reductasa en raíz de maíz (38) y el desarrollo de embriones de maíz (37), pero su efecto es revertido por la adición de arginina.

En procariontes las canavanilproteínas forman un conjugado con el genoma bacteriano e impiden ciclos poste-

riores de replicación (20, 39). Estudios realizados en rafa de soya indican que la totalidad del metabolismo del ADN es atenuado por este análogo de la arginina (40).

Algunos estudios realizados en virus (41, 42) han dado la evidencia experimental de que se lleva a cabo una reducción de la síntesis de la ARN polimerasa, mediada por la canavanina. Si la canavanina puede disminuir significativamente la producción de ARN mensajero, y puesto que las moléculas existentes previamente son degradadas, la actividad traduccional de la célula puede ser reducida marcadamente, lo que provocaría que las proteínas que se requieren para la replicación y expresión del genoma se vieran fuertemente disminuidas.

Se observó que la canavanina inhibía la síntesis del ADN, del ARN y de las proteínas en Glycine max (40), mientras que la adición de la arginina revertía parcialmente el fenómeno (40).

Además de poseer análogos de aminoácidos como la canavanina, Canavalia ensiformis tiene proteínas tóxicas entre las que se encuentran las lectinas como la concanavalina A, cuya toxicidad está determinada por su capacidad de asociación con la membrana celular. Concanavalina A interacciona específicamente con los polisacáridos y las glucoproteínas de la membrana celular que poseen unidades de α -D-glucopiranosil o de α -D-manopiranosil. Las lectinas aglutinan bacterias orales en la superficie de

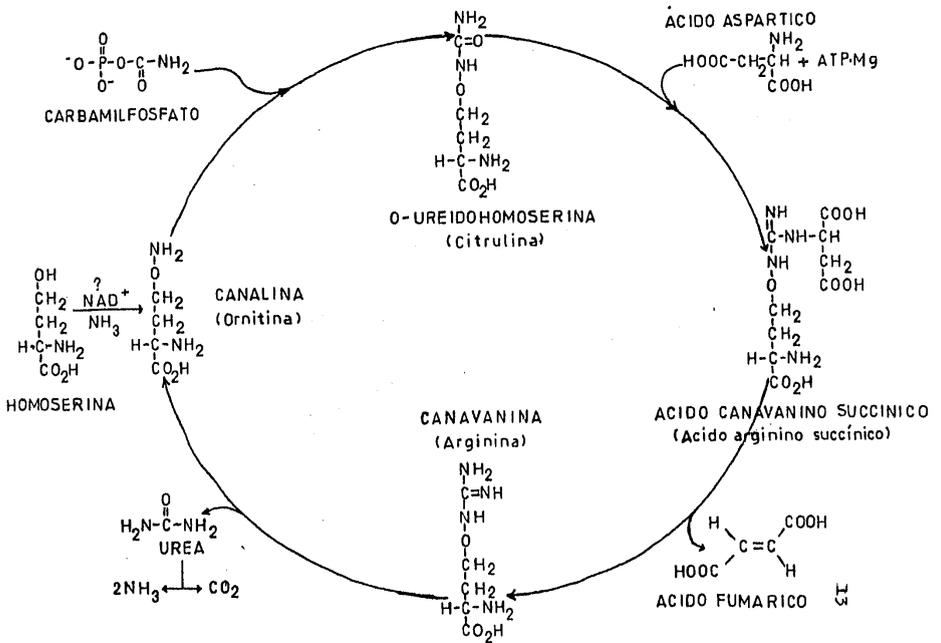
los dientes (43). La concaavalina A puede unirse reversiblemente con los factores salivales aglutinantes, precipitando o formando complejos solubles e inhibiendo competitivamente la aglutinación bacterial.

Se ha reportado que el género Canavalia contiene las siguientes toxinas: colina, ácido hidrocianico y trigonellina. La harina de C. ensiformis contiene una toxina que causa hemorragia en la mucosa estomacal de ratas (1).

Otra proteína tóxica, conatoxina, tiene un profundo efecto sobre el sistema nervioso central, provocando mediante mecanismos aún desconocidos: hipotermia, ataxia y convulsiones (45), además contiene inhibidores de enzimas digestivas tales como la tripsina y las amilasas.

I.5. BIOSINTESIS DE LA CANAVANINA.

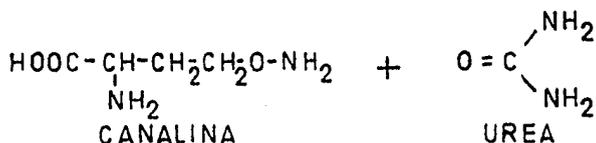
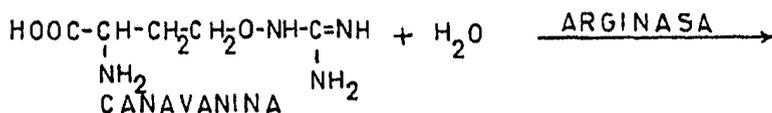
Se ha demostrado que Canavalia ensiformis sintetiza canavanina por una serie de reacciones que presentan una analogía con el ciclo de la ornitina-urea, propuesto por Krebs-Henseleit, que utilizan los mamíferos para la producción de arginina. Cada compuesto y cada enzima presenta su contrapartida del ciclo, que se distingue con el nombre de canalina-urea para la producción de canavanina (47). Todas las enzimas del ciclo de la ornitina-urea han sido aisladas de plantas superiores, incluyendo a la canavalia (48).



ESQUEMA I. Ciclo de la canalina-urea para la producción de canavanina. Entre paréntesis se encuentran los nombres de los compuestos del ciclo ornitina-urea y junto a ellos el nombre del análogo

I.6. MOVILIZACION DE LA CANAVANINA

La movilización y la utilización de la canavanina en Canavalia ensiformis se lleva a cabo mediante la hidrólisis de la canavanina mediada por la arginasa, la cual produce canalina y urea (49). La urea es hidrolizada posteriormente por la ureasa a CO_2 y amonio, este último representa una fuente importante de nitrógeno reducido.



Durante el desarrollo de la planta de canavalia se produce una caída en la cantidad de canavanina en los cotiledones, mientras que el nivel de canavanina en los demás tejidos se incrementa. Durante los primeros 5 días de germinación, se consume más del 40% de la canavanina almacenada en los cotiledones, mientras que los análisis cromatográficos de extractos de cotiledón de 7 días revelan un gran incremento en el tamaño y densidad de las

manchas de aspargina, canalina y leucina-isoleucina, que junto con la aparición de un sistema de degradación de canavanina altamente activo, sugiere que la canavanina está siendo convertida a canalina, amonio, asparagina y leucina-isoleucina para su utilización (50).

Otros estudios realizados revelaron un pico de actividad de ureasa en los cotiledones dentro de la primera semana de crecimiento de la planta (51). Como ya se mencionó, la ureasa de canavalia completa la utilización del nitrógeno almacenado en la molécula de canavanina, convirtiendo la urea a CO_2 y NH_3 , de hecho existe una correlación entre la cantidad de la canavanina en la semilla y la actividad de ureasa encontrada en estos tejidos (52).

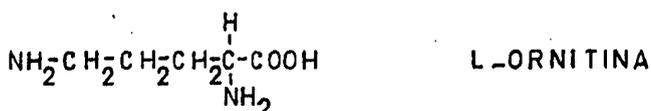
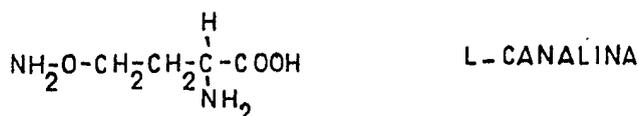
El catabolismo de la canalina ha sido poco estudiado, lo único que se ha propuesto es de que sirve como fuente de homoserina (53, 54).

I.7. PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y TOXICIDAD DE LA CANALINA

El descubrimiento de la existencia de la canalina se llevó a cabo en 1932 por Kitagawa y Yamada, que al tratar de aislar la ureasa de un extracto de semilla de canavalia, encontraron que la cantidad de urea producida por la ruptura enzimática era demasiado alta y también

determinaron que se producía canalina estequiométricamente a partir de la degradación de la canavanina (55).

La canalina es un análogo estructural de la ornitina del mismo modo que la canavanina lo es de la arginina.



Como hidroxilamina sustituida que es, la canalina se descompone completamente en los sistemas usados para aislarla, al igual que por cromatografía de intercambio iónico (56). Esta propiedad ha minimizado severamente su estudio a partir de fuentes naturales.

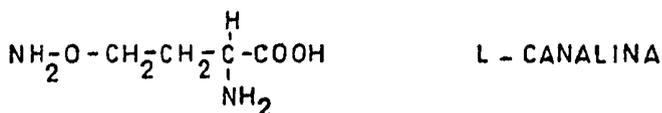
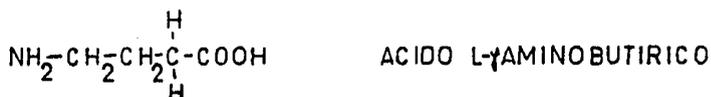
Las 500 especies conocidas que producen canavanina y presumiblemente también arginina, representan fuentes naturales de este compuesto.

Los estudios de las propiedades biológicas de la canalina muestran que posee potentes propiedades insecticidas cuando es administrado a Manduca sexta (una larva del tabaco) en la que provoca también empobrecimiento larval, aumenta las malformaciones de pupas y adultos, atenúa la

supervivencia en todos los estadios del desarrollo y disminuye significativamente la totalidad de la producción en masa de hembras preñadas (60).

Canalina es uno de los muchos aminoácidos no protéicos neurotóxicos de las plantas. Por ejemplo, se han descubierto ciertas propiedades neurofarmacológicas cuando se administra a polillas adultas (57), entre otras, produce una actividad motora continua, aunque su efecto es de naturaleza transitoria.

Como la canalina tiene una cierta similitud estructural con el ácido γ -aminobutírico (GABA), sería razonable pensar que la canalina antagoniza con las acciones biológicas mediadas por el GABA en el sistema nervioso central, que es donde se sugiere que actúa la canalina.



También posee potentes propiedades reductoras del crecimiento (58), habiendo una reversión del efecto con un exceso de ornitina, citrulina o arginina.

La canalina es también un poderoso inhibidor de las en

zimas que contienen fosfato de piridoxal. La glutamato oxalacético transaminasa y la glutamato piruvato transaminasa de rata son inhibidas casi completamente con 10 mM de canalina (59). También se reduce la producción de glutamato generado por la vía de la ornitina cetoácido transaminasa (61).

Mientras que la canalina atenúa fuertemente la actividad de las siete enzimas que contienen fosfato de piridoxal que fueron estudiadas (62), no afecta a las 3 enzimas que utilizan ornitina pero que no utilizan el cofactor B₆ a pesar de que, como ya se dijo, la canalina es un análogo estructural de la ornitina.

La reacción de la canalina con el fosfato de piridoxal es la base principal para sus propiedades antimetabólicas. Los datos de resonancia magnética nuclear obtenidos del complejo formado por la unión de la canalina con el grupo B₆, indican que se haya involucrada la formación de una base de Schiff en la producción del complejo(63), al reaccionar con el grupo aldehído de la coenzima (62, 64).

La banda de absorción que se produce por la interacción covalente entre la coenzima y la apoenzima se pierde por el tratamiento con canalina, apareciendo un nuevo pico en una longitud de onda diferente, el cual es producido por la reacción entre la canalina y el fosfato de piridoxal. Cuando la holoenzima tratada con canalina es

dializada exhaustivamente, el espectro de absorbancia retorna al de la apoenzima, y esta enzima tratada con canalina pero dializada, puede ser activada normalmente, lo que sugiere que el complejo canalina-fosfato de piridoxal se encuentra unido débilmente a la holoenzima (63).

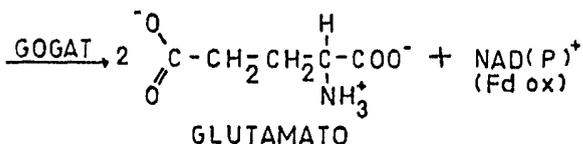
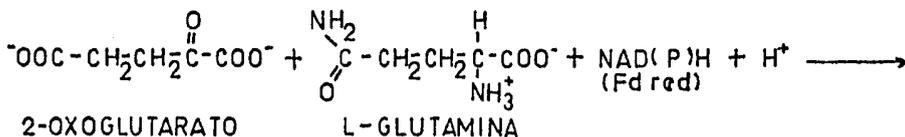
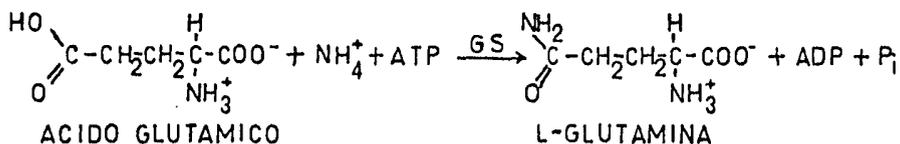
I.8. ASIMILACION Y TRASLOCACION DEL AMONIO

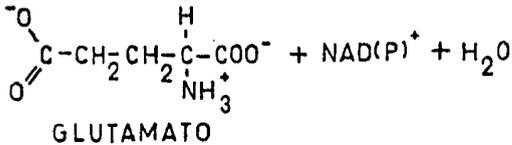
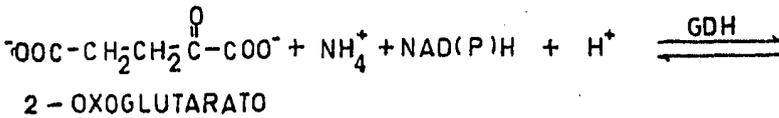
La canavanina es hidrolizada secuencialmente como ya se mencionó, por la arginasa y por la ureasa para rendir como producto final canalina, amonio y CO_2 .

El amonio puede ser asimilado por dos vías diferentes: la primera denominada vía glutamino sintetasa/glutamato sintasa GS/GOGAT se encarga de convertir el amonio primero en glutamina y después en ácido glutámico; mientras que la segunda denominada vía de la deshidrogenasa glutámica (GDH) produce ácido glutámico directamente (65). La evidencia experimental sugiere que ambas vías operan en plantas, dependiendo de factores como la luz y la oscuridad, los niveles de agua, la concentración de CO_2/O_2 en la atmósfera, la temperatura, el tejido de la planta, el estado fisiológico de la misma, las condiciones de nutrición a las que se encuentra sometida la planta (66, 67) y probablemente los reguladores del crecimiento (68).

Así el amonio puede incorporarse en dos clases diferentes de grupos químicos: en el primero de ellos, las amidas, son formadas por una condensación en presencia de ATP, el ejemplo más clásico es la formación de la glutamina catalizada por la glutamino sintetasa (GS).

El segundo tipo de grupo químico es el α -amino, que involucra la aminación reductiva de un α -oxoácido y requiere un agente reductor, generalmente NAD(P)H o ferredoxina reducida. Como ejemplo está la formación del ácido glutámico catalizada por la GDH o por la GOGAT (69).





En varias leguminosas estudiadas, la enzima predominantemente metabolizadora del amonio es la GS en el nódulo, lo cual junto con el alto nivel de la GOGAT con respecto al de la GDH en esta parte de la planta sugiere fuertemente que la mayor parte del amonio es asimilado por la vía GS/GOGAT. Antes de 1970, cuando aún no se conocía la reacción de la GOGAT y los nódulos de las leguminosas contenían poca GDH como para explicar los rangos conocidos de la biosíntesis de los aminoácidos, la asimilación del amonio en plantas era aún más difícil de explicar. La GOGAT es una enzima más adecuada para la función biosintética que la GDH, ya que la reacción es irreversible en la dirección de la asimilación del amonio (70) y la formación total del grupo amino es más probable por la baja Km de la GS para el amonio.

La glutamato deshidrogenasa ocupa una posición central en las vías metabólicas y sirve para unir el metabolismo de los aminoácidos con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En plantas, la glutamato deshidrogenasa es una de

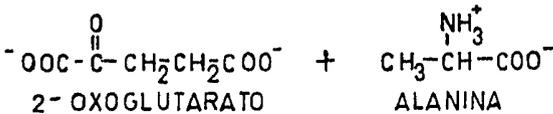
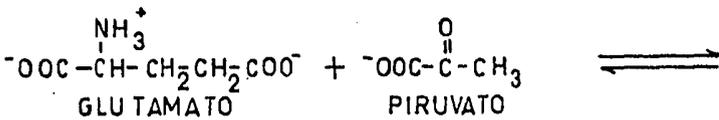
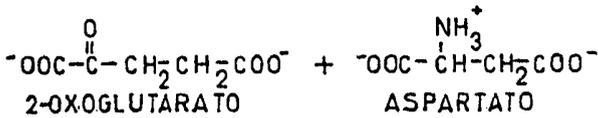
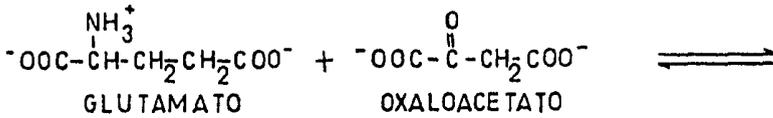
Una tercera vía posible para la asimilación del amonio parece ser la de la aspargino sintetasa (AS). En esta vía la enzima toma amonio y aspartato para producir aspargina, la cual también puede donar su grupo amido a otras moléculas (65).

Se conocen dos AS, una amonio-dependiente y otra glutamina-dependiente, aunque una concentración de amonio cuatro veces mayor a la de la glutamina, apenas produce la mitad del rango de síntesis observado con glutamina como fuente de nitrógeno (69).

La evidencia actual sugiere que la GDH podría estar involucrada en el catabolismo de los aminoácidos, para producir amonio y α -cetoácidos listos para reducirse, particularmente en las semillas en germinación (72).

En general, el amonio es asimilado por la vía GS/GOGAT. La GS está localizada tanto en el citoplasma como en el cloroplasto de las hojas, pero la GOGAT está situada solo en el cloroplasto. Cuando el amonio es asimilado en el cloroplasto, la reacción es llevada a cabo utilizando el ATP y la ferredoxina reducida generada por las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis (72).

Todos los aminoácidos protéicos pueden ser formados a partir del glutamato, el aspartato y la alanina con el 2-oxoácido correspondiente:



De este modo se regenera el 2-oxoglutarato para tomar parte en las reacciones de la GOGAT y de la GDH. Los tres mayores oxoácidos son sintetizados en la mitocondria durante la degradación aeróbica de la glucosa, pero la mayoría de los otros esqueletos carbonados son sintetizados en el cloroplasto por las reacciones fotosintéticas (72).

Durante la germinación es esencial que la plántula en crecimiento tenga una fuente de aminoácidos para la síntesis de sus proteínas. De ahí la importancia del transporte de los aminoácidos o de compuestos nitrogenados dentro de la planta.

Las plantas pueden ser divididas de acuerdo a los compuestos nitrogenados que transportan:

Los cereales y las leguminosas de clima templado, como por ejemplo Pisum y Vicia transportan su nitrógeno como las amidas asparagina y glutamina, que son transportadas en la mayoría de las plantas, y en menor extensión como arginina.

Las leguminosas tropicales como por ejemplo Glycine, Phaseolus y Vigna utilizan los ureidos alantofina y ácido alantóico (73).

Los compuestos de transporte se caracterizan por tener una elevada relación N/C. Además deben transportar al amonio en una forma no tóxica. Solo canavanina y ciertos intermediarios de su síntesis han mostrado tener propiedades tóxicas, pero solamente para organismos que no lo sintetizan.

Los compuestos de transporte deben moverse rápidamente a través del floema, el xilema y otros tejidos de las plantas. Solo asparagina y glutamina han mostrado ser transferidos rápidamente desde el xilema al floema (73).

Deben utilizar al carbono eficientemente o en su defecto requerir pequeñas cantidades de energía para su metabolismo.

La asparagina es un aminoácido transportado mayormente en plantas debido a que cumple con los requerimientos de tener una elevada relación N/C y de que es relativamente fácil de sintetizar. La arginina tiene una relación N/C mayor, pero su biosíntesis es considerablemente más complicada. También se transportan aminoácidos no proteícos como homoserina, canavanina y γ -metilglutamina por plantas específicas (73).

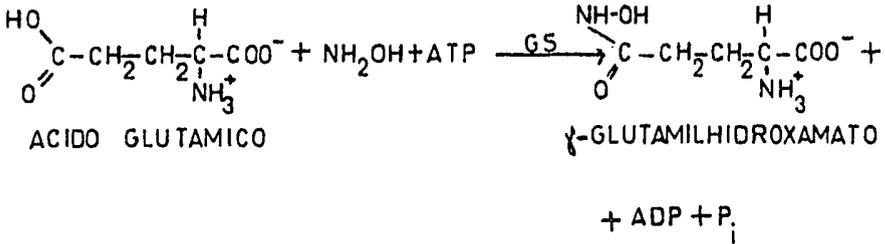
El descenso en la cantidad de canavanina en cotiledón durante los primeros días de germinación y el aumento en la poza de arginina, canalina e isoleucina (50) haría suponer que el aminoácido transportado en la planta es arginina, aunque canavanina se considera también como un compuesto de transporte (73).

La canavanina es sintetizada en las hojas y en la pared de la vaina, en el pericarpio y posiblemente en menor cantidad en las semillas maduras de C. ensiformis (74, 75). Se podría esperar que la fase sintética de canavanina dominara cuando se requiere su concomitante traslocación, es decir durante la antésis floral y durante el desarrollo de la semilla. En cambio, lo más lógico es que la fase catabólica predominara durante la germinación y

La glutamina sirve tanto en la síntesis de proteínas como en la biosíntesis de ácidos nucleicos y aminoácidos.

Cuando el NH_2 es reemplazado por la NH_2OH se forma

γ-glutamihidroxiato:



La GS de raíz de arroz muestra un pH óptimo de alrededor de 7. La enzima es completamente inactivada por calentamiento a 65°C durante 10 minutos y con un exceso de Mn^{2+} hay una marcada inhibición de la reacción, pero a bajas concentraciones logra reemplazar parcialmente al Mg^{2+} . El Co^{2+} fue tan efectivo como el Mg^{2+} , mientras que el Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} y Mo^{6+} no lo fueron e incluso la inhiben.

La K_m para el L-glutamato, ATP e NH_2OH fue de 3.75 mM, 0.44 mM y 0.4 mM respectivamente (77).

La GS de la planta de arroz fue fuertemente inhibida por Cu^{2+} , Hg^{2+} y Cd^{2+} ; una fuerte pero menor inhibición se obtuvo con Zn^{2+} , Ca^{2+} y Ni^{2+} (77). Los efectos inhibidores de los metales pesados pueden deberse a su reacción con los grupos tiol presentes en la enzima. Estos grupos sulfhidrilo son esenciales para su actividad.

En contraste con la GS de Lactobacillus arabinosus (85) y B. subtilis (86), que son inhibidas por glutamina, la GS de arroz se ve ligeramente estimulada por 20 mM de glutamina, mientras que AMP, ADP, GTP e IDP son inhibidores, en donde ADP y AMP son inhibidores competitivos con respecto al ATP (77).

Se ha establecido que la síntesis de glutamina puede ocurrir en dos compartimentos celulares de las hojas de la mayoría de las plantas superiores: el cloroplasto y el citoplasma (87, 88). También se ha demostrado la presencia de dos diferentes isoenzimas de la GS en los tejidos fotosintéticos (87, 88, 89, 90). Una enzima designada GS_1 está localizada en el citosol, mientras que la otra, designada GS_2 , se encuentra en el cloroplasto (88, 90, 91). Las isoenzimas han sido caracterizadas por sus propiedades cinéticas y regulatorias específicas. Exhiben diferencias en su pH óptimo, estabilidad térmica y K_m para glutamato (87, 89, 90).

Se pueden distinguir cuatro grupos de plantas por su contenido específico de isoenzimas de la GS. En el primero solo GS_1 está presente (por ejemplo plantas superiores parásitas, que son nutricionalmente dependientes de su huésped). El segundo grupo se caracteriza por la ausencia aparente de GS_1 (por ejemplo las plantas quenopodiáceas de varios medios ambientales, tales como la espinaca).

El tercer grupo se distingue por poseer las dos isoenzimas de la GS, pero la GS_1 como un componente menor (del 5 al 30% de la actividad enzimática total de hoja) y la GS_2 como un componente mayor (del 70 al 95% de la actividad enzimática total de la hoja). Como ejemplo tenemos a varios pastos C_3 y algunas leguminosas de clima templado. Algunas especies de plantas halófilas también pertenecen a este grupo, sugiriendo que la localización de las isoenzimas no es necesariamente dependiente de condiciones ambientales.

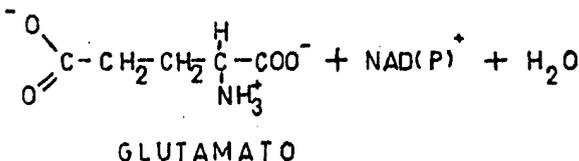
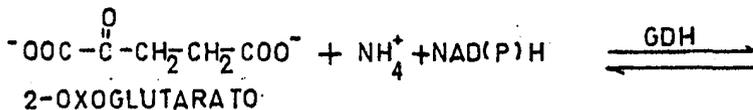
En el cuarto grupo la GS_1 y la GS_2 están también presentes, pero la contribución de la GS_1 es consistentemente más grande que la encontrada en el tercer grupo. Como ejemplos tenemos a la mayoría de las plantas C_4 y algunas leguminosas tropicales como Erythrina (92).

Se ha sugerido que la GS_1 es la responsable de la reasimilación del amonio producido durante la fotorrespiración (87, 90) y también de la síntesis de glutamina en la oscuridad (87). Por otro lado, también se ha propuesto que la GS_2 funciona principalmente en la asimilación primaria del amonio. Esta actividad es probablemente un proceso dependiente de la luz, controlado por las concentraciones de ATP, Mg^{2+} y H^+ en el estroma (87). Muy recientemente se ha demostrado que el cloroplasto tiene la capacidad de reasimilar directamente el amonio liberado du-

rante la fotorrespiración. Además, se ha demostrado que el nivel de la actividad de la GS en el cloroplasto es mucho más alta que la de la glutamato sintasa (GOGAT) (93) y podría jugar un papel en la desintoxicación del amonio en plástidos en adición a su función asimilatoria (94, 95).

1.10. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA

Como ya se mencionó, la GDH juega un papel significativo en el metabolismo nitrogenado, ya que cataliza la conversión del -cetoglutarato en ácido glutámico y por lo tanto, convierte al amonio en nitrógeno orgánico, además de que es la única enzima que conecta directamente el metabolismo del nitrógeno con el metabolismo de los carbohidratos (65).



Se han encontrado tres formas de GDH con diferente especificidad por el cofactor: la (L-glutamato: NAD⁺ oxidoreductasa (desaminante), E.C. 1.4.1.2.); la (L-glutamato: NAD(P)⁺ oxidoreductasa (desaminante), E.C. 1.4.1.3.) y la (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa (desaminante), E.C. 1.4.1.4.).

Sin embargo varias enzimas, incluyendo la de raíz de chícharo (71) presentan características interesantes como es el hecho de que usan solamente NAD⁺ en la dirección desaminativa y presentan actividad con NADPH en la dirección aminativa, siendo alrededor del 10% de la velocidad obtenida con NADH.

Varias isoenzimas de la GDH están presentes en los diferentes tejidos vegetales (96, 97, 98) y el patrón de isoenzimas varía dependiendo de la fuente nitrogenada (97, 99) sugiriendo funciones específicas para cada isoenzima.

Aunque hay varios reportes sobre la regulación de la GDH por la fuente nitrogenada (100, 101, 102) esta información se deriva principalmente de plantas C₃ (103, 104). La fuente de nitrógeno afecta el metabolismo de los carbohidratos tan marcadamente que los efectos de la regulación de la GDH podrían ser completamente diferentes para plantas C₄.

En callos de maíz, una planta C₄, las actividades de la GDH aminativa y desaminativa no mostraron la misma va-

riación en el período de tiempo estudiado. Mientras que la GDH-NADH dió un pico principal de actividad alrededor del día 17 (el estado estacionario inicial), GDH-NAD⁺ mostró dos picos de actividad: uno en el día 9 y el otro en el día 14 (fase logarítmica temprana y lineal respectivamente).

La actividad de la GDH en la vía aminativa (NADH) y desaminativa (NAD⁺) fue medida en extractos de callos crecidos en diferentes fuentes nitrogenadas (105). Amonio y nitrato 20 mM mostraron efectos opuestos: el primero fue inhibitorio y el segundo estimulador para ambas actividades. Sin embargo, se observaron diferentes comportamientos para las actividades en el medio conteniendo NH₄⁺ más citrato, glutamina o urea. La GDH-NADH no fue afectada o tan solo moderadamente afectada por estos compuestos mientras que la actividad de la GDH-NAD⁺ fue fuertemente inhibida. Las relaciones GDH-NAD⁺/NADH tienden a disminuir en cultivos con amonio (aún en presencia de citrato) así como con glutamina o urea. Por otro lado, el glutamato, el cual es sustrato para la enzima, y nitrato tienden a incrementar estas relaciones (105).

En plántulas, las raíces tuvieron alrededor de 10 a 15 veces más actividad aminativa y de 6 a 10 veces más actividad desaminativa por miligramo de proteína que las hojas (105). Esto es consistente con reportes anteriores

usando plántulas de maíz (96). En términos generales, la actividad de la GDH-NADH no varió con la fuente de nitrógeno en raíz, en cambio, las hojas fueron sensibles a la fuente nitrogenada particular. La GDH-NAD⁺ varió en ambos tejidos (105). Una mayor estimulación en hojas para ambas actividades se observó cuando fue adicionada a las plantas una fuente nitrogenada balanceada (NO₃ + NH₄).

Estos resultados muestran que los niveles de la GDH-NADH y de la GDH-NAD⁺ no tienen una respuesta similar a diferentes compuestos ni en callos ni en tejidos vegetales. Estos datos podrían ser explicados tanto por la presencia de isoenzimas con diferentes rangos de reacciones aminativa y desaminativa, como por la existencia de diferentes conformeros de la misma enzima con afinidad preferencial por el NAD⁺ o por el NADH, como se ha sugerido recientemente para semillas de soya en desarrollo (106) y para el alga verde Scenedesmus acutus (107). Aún dos explicaciones más podrían ser consistentes con estos resultados: diferentes niveles de proteína y actividad y cantidad constante de la GDH o la presencia de inhibidores o activadores específicos en los cultivos.

La gran cantidad de la GDH presente en raíz comparada con la actividad encontrada en hojas, sugiere que bajo condiciones normales, las raíces son el mejor sitio para la asimilación de amonio en plántulas de maíz (108,

109). El incremento en peso fresco de la hoja cuando es administrada glutamina a las plantas es también consistente con esta interpretación

La GDH E.C. 1.4.1.2. se ha purificado a homogeneidad a partir de raíz de chícharo (71), plántulas de cowpea (110) y de nódulos de lupinus (111).

La GDH E.C. 1.4.1.3. está presente en los cloroplastos de hoja de haba (112), en tanto que la GDH E.C.1.4.1.4. se ha encontrado en los cloroplastos de la alga marina Gaularpa simpliciuscula (113) y en los protoplastos obtenidos de cultivos de tabaco (114).

Se ha demostrado que los nucleótidos NAD^+ y NADP^+ se unen en un punto específico del sitio activo de la enzima (115), que la presencia de estas tres actividades sugiere que hay tres isoenzimas o tres conformémeros con diferente afinidad por el cofactor.

Entre las características investigadas de la GDH de plantas están la de que es una metaloenzima (68, 71) que tiene grupos sulfhidrilo indispensables para su actividad y es activada por ciertos iones divalentes (68); además hay quien sugiere que Ca^{1+} puede ser un modulador de la GDH-NADH en la mitocondria externa in vitro y se ha sugerido que la calmodulina está involucrada en este proceso (116).

La GDH tiene un peso molecular de 208,000 \pm 10,000 (71) y de 270,000 (68) y posee un pH óptimo de 8.0 tanto para la reacción aminativa como para la desaminativa (71): de 8.2 para la reacción aminativa y de 9.2 para la reacción desaminativa (68). También se encontró que el pH para la reacción desaminativa depende de la concentración del glutamato, desde 8.5 hasta 9.5 cuando la concentración de glutamato va de 0.2 a 0.22 M (117).

El patrón de isoenzimas no solo difiere de acuerdo al organelo investigado (118, 119, 120) sino que también está influenciado por la temperatura (115) y los parámetros de desarrollo (121, 122).

C A P I T U L O I I

MATERIALES Y METODOS

II.1. MATERIAL BIOLÓGICO

La semillas de Canavalia ensiformis L. proporcionadas por el Centro de Investigación Científica de Yucatán, se pusieron a germinar en matraces con agrolita estéril, en una incubadora con fotoperíodo de doce horas, a 30°C en la fase lumínica y 25°C en la fase oscura.

II.2. MATERIAL DE VIDRIO

Todo el material de vidrio utilizado se lavó con detergente, se enjuagó con agua desionizada y se secó en la estufa.

II.3. EQUIPO

Potenciómetros: Beckman digital 3550 y Conductrónico pH-20.

Placas de calentamiento y agitación

Centrífugas: Beckman modelo J2-21 con rotor JA-20

M.S.E. modelo LR-6; Clínica IECHN-SII

Espectrofotómetros: Pye Unicam SP6-550 UV/VIS;

Pye Unicam SP-1800 con control de temperatura SP 876 y programador de tiempo.

Politrón PCU-2

Baños de temperatura constante: Colora y J.M. Ortiz

Balanzas analíticas: Mettler y Sartorius

Autoclaves All American Company

Horno de vacío Presicion modelo 19

Incubadora Presicion de doble programa de iluminación

Campana de flujo laminar Clean Bench Hitachi

II.4. REACTIVOS

Los reactivos utilizados fueron todos de grado reactivo de las casas J.T. Baker, Merck y Sigma.

II.5. PARTE EXPERIMENTAL

- a) Se pesan las semillas que se pondrán a germinar en frascos y matraces con agrolita estéril, se lavan con detergente, una por una.
- b) Se desinfectan con etanol al 70% durante 3 minutos.
- c) Se desinfectan posteriormente con una solución de clo-

ralex 1:3 durante 3 minutos.

d) Se pone cada semilla en un matraz conteniendo la agrolita estéril y se tapa con un papel aluminio, desinfectado y flameado y con una liga alrededor del papel aluminio de cada matraz.

Nota: Los pasos b), c) y d) se realizan en la campana de flujo laminar.

e) Los matraces conteniendo las semillas se colocan en la incubadora con un fotoperíodo de doce horas, a 30°C en la fase lumínica y 25°C en la fase oscura.

f) Se cosechan las semillas hidratadas de doce horas y de 24 horas y las plántulas de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días, determinándose el porcentaje de incremento en el peso fresco y el peso seco para cada tejido de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%I = \frac{P \text{ final} - P \text{ inicial}}{P \text{ inicial}} \times 100$$

De donde: %I : porcentaje de incremento en peso fresco

P final : peso final expresado en gramos

P inicial : peso inicial expresado en gramos

La cantidad de humedad se obtiene por diferencia entre el peso fresco del tejido y el peso seco del mismo.

Para obtener los tejidos secos se ponen en un horno al va

cio a 60°C hasta obtener un peso constante de los mismos. El procedimiento se realiza en frascos Gerber a peso constante poniendo por separado cada tejido. El porcentaje de humedad se calcula de acuerdo a:

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

Como ya se mencionó en la introducción, se pretende obtener una cinética de crecimiento de la planta durante los primeros 7 días de crecimiento y determinar la ontogenia de las enzimas GDH y GS para cada tiempo y cada tejido obtenido. Para ello, se separan los tallos, los cotiledones, las hojas y las raíces; una parte se usa para determinar los incrementos en peso fresco y contenido de humedad, mientras que la otra se guarda a -70°C. A partir de estos últimos tejidos se preparan los extractos crudos sobre los cuales se medirán las actividades enzimáticas y las pozas de aminoácidos totales, nitratos, nitritos, urea, amonio y proteína total.

II.6. PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO

1. El tejido se congeló a -70°C por 24 horas o más
2. El tejido congelado se molió en un mortero previamente enfriado por la menos durante 24 horas. Dicho tejido se

deberá moler hasta obtener un polvo fino al cual se le agregó 5% (p/p) de polivinilpirrolidona.

3. Se transfirió el polvo a un tubo de ensaye de 30 x 175 y se le agregó el tampón de extracción Tris-HCl 50 mM con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y mercaptoetanol 5 mM pH 8.2, en una relación 1:2,5 (p/v).

4. La mezcla se homogeneizó por dos minutos en el politrón a máxima velocidad. Este paso y el anterior deben hacerse en baño de hielo. El paso 2 se realizó en un cuarto de 4°C de temperatura.

5. El extracto obtenido en el inciso 4 se pasó por cuatro capas de gasa.

6. El filtrado se centrifugó a 18,000 rpm durante 30 minutos en el rotor JA-20 de la centrifuga J2-21.

7. El sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) fue utilizado para las determinaciones enzimáticas y la cuantificación de las pozas.

II.6.1. EXTRACCION DE LIPIDOS Y DIALISIS.

El extracto de cotiledón de canavalia en todos los estadios de germinación estudiados presenta gran cantidad de lípidos que fueron extraídos con cloroformo tres veces en relación 1 : 1 (v/v). Después de la tercera extracción, el extracto enzimático se vuelve a centrifugar por

30 minutos más a 18,000 rpm para obtenerlo completamente transparente, como es requerido por los métodos espectro fotométricos empleados.

Los extractos de cotiledón (después de la extracción con cloroformo y de la segunda centrifugación) y de hoja tuvieron que ser dializados para la determinación de la glutamato deshidrogenasa, con un volumen 1,000 veces mayor de tampón de extracción durante 17 horas en el cuarto frío.

II.6.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NADH

La actividad de la GDH-NADH se determinó por el método de Joy (76) con modificaciones de Loyola (68). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM		
+CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 mM	1.7 ml	pH 8.2
←-KG	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
NH ₄ Cl	100 mM	0.5 ml	
NADH	160 μM	0.2 ml	
Extracto		<u>0.1 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NADH, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NADH. Se graficó la disminución en

la absorbancia a 340 nm. Se usó solo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de reacción se expresó como nanomoles de NADH transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de la figura 1.

11.6.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD⁺.

Para la determinación de la actividad de la GDH - NAD⁺ se usó el método de Loyola (68). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCL	100 mM	1.8 ml	pH 9.4
Glu	10 mM	0.5 ml	pH 8.0
NAD ⁺	600 mM	0.2 ml	pH 8.0
Extracto		<u>0.5 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes excepto el NAD⁺, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD⁺. Se graficó el incremento de la absorbancia a 340 nm. Se usó solo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de reacción se expresó como nanomoles de NAD⁺ transformados por

la absorbancia a 340 nm. Se usó solo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de reacción se expresó como nanomoles de NADH transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de la figura 1.

11.6.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD⁺.

Para la determinación de la actividad de la GDH - NAD⁺ se usó el método de Loyola (68). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCL	100 mM	1.8 ml	pH 9.4
Glu	10 mM	0.5 ml	pH 8.0
NAD ⁺	600 μ M	0.2 ml	pH 8.0
Extracto		<u>0.5 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes excepto el NAD⁺, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD⁺. Se graficó el incremento de la absorbancia a 340 nm. Se usó solo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de reacción se expresó como nanomoles de NAD⁺ transformados por

minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 1.

II.6.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GS

La actividad de la GS se midió por el método modificado de Kanamori y Matsumoto (77). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	50 mM	1.8 ml	pH 7.5
ATP (recién preparado)	8 mM	0.2 ml	pH 7.0
Glu-Na	33.3 mM	0.2 ml	pH 7.0
MgSO ₄	33.3 mM	0.1 ml	
NH ₂ OH (recién preparado)	10 mM	0.3 ml	pH 7.0
Cisteína	3.3 mM	0.1 ml	
Extracto		<u>0.3 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La reacción se inició con la adición del extracto crudo. La mezcla se incubó por 30 minutos a 38°C. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. En cada determinación se usó un blanco a tiempo cero, es decir contenía todos los reactivos y el mismo volumen del extracto enzimático pero la reacción se detuvo a tiempo cero adicionando un mililitro del reactivo de cloruro férrico antes de la adición del extracto

enzimático en la mezcla de reacción.

El γ -glutamil hidroxamato formado se determinó adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico (volumenes iguales de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% en HCl 0.2 N, ácido tricloroacético al 24% y ácido clorhídrico al 50%), que también sirvió para detener la reacción por el cambio de pH en la mezcla de la misma. Se centrifugó durante 30 minutos a 3,500 rpm y se midió el incremento de absorbancia a 540 nm con respecto a cada blanco preparado como fue descrito anteriormente.

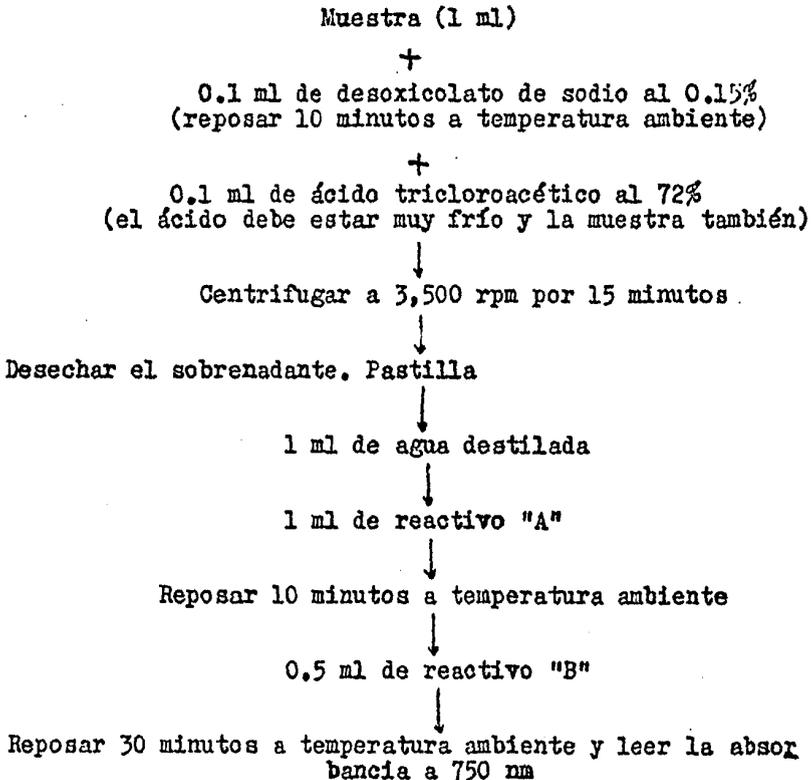
La velocidad de la reacción se expresó como micromoles de γ -glutamil hidroxamato formado por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 4. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de γ -glutamil hidroxamato por minuto bajo las condiciones del ensayo.

II.6.5. DETERMINACION DE PROTEINAS

Se siguió la técnica de Peterson (78) para la cuantificación de proteínas. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina. El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo: se parte de una solución de ASB con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, la curva patrón se prepara poniendo 0.1, 0.2 ml

etc. hasta un mililitro y en los volúmenes menores se completa a 1 ml con agua destilada.

Para la determinación de la cantidad de proteína en el extracto crudo se ponen 20 μ l de la muestra (excepto para cotiledón, en que se ponen 40 μ l del extracto diluido 1;40) y se completa a 1 ml con agua destilada.



Preparación del reactivo "A":

-Solución base de cobre-tartrato-carbonato (CTC) (0.1%

de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ con 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

-Dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS)

-Agua destilada

Se mezclan volúmenes iguales de CTC, NaOH, SDS y agua destilada

Preparación del reactivo "B":

Un volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu es mezclado con cinco volúmenes de agua destilada.

Se grafica el logaritmo de la concentración de ABS en μg contra el logaritmo de la absorbancia obtenida para cada punto de la curva patrón. Ver gráfica de calibración (figura 6).

II.6.6. DETERMINACION DE AMINOACIDOS TOTALES

Se siguió la técnica de Cocking (79). Se realizó una curva patrón con ácido glutámico. Se partió de una solución de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se pusieron volúmenes crecientes de 0.1 ml a 1 ml, completando a 1 ml si era necesario, con agua destilada. Para la determinación en el extracto enzimático, se tomaron 40 μl del extracto diluido 1:10 y se completó a 1 ml con agua destilada.

Muestra (1 ml en total)
 +
 1 ml de reactivo de ninhidrina
 ↓
 ebullición 30 minutos
 +
 2,5 ml de isopropanol al 50%
 ↓
 En reposo 15 minutos
 ↓
 Leer la absorbancia a 570 nm

Reactivo de ninhidrina:

-amortiguador citratos 0.2 M pH 5 ± 0.1 (recién preparado).

-NaOH al 4%

-Solución A: 2.1008 g de ácido cítrico monohidratado + 20 ml
 de NaOH al 4%, aforar a 50 ml → A

-Solución B: 0.08 g de SnCl_2 a los 50 ml de la solución A → B

0.4 g de ninhidrina en 10 ml de metilcelosolve

+
 10 ml de reactivo B
 ↓
 Reactivo de ninhidrina

La curva patrón se obtiene graficando la concentración de glutamato en microgramos contra la absorbancia a 570 nm (figura 7).

II.6.7. DETERMINACION DE NITRATOS

Se siguió la técnica de Nicholas y Nason (80). Se realizó una curva patrón con KNO_3 . El procedimiento a seguir para la curva patrón es el mismo para el ensayo de las muestras. Del extracto enzimático se tomaron 20 μl de una dilución 1:2 (a excepción del de cotiledón, en donde la dilución fue de 1:40 y también se tomaron 20 μl)

Muestra
 (se completa a 1.5 ml con agua destilada)
 +
 0.1 ml de ácido sulfámico
 ↓
 Dejar reposar dos minutos
 +
 0.4 ml de HClO_4 al 20%
 ↓
 Agitar y medir absorbancia a 210 nm

La curva patrón se obtiene graficando la concentración en μg de KNO_3 contra la absorbancia a 210 nm (figura 8).

II.6.8. DETERMINACION DE NITRITOS

Se siguió la técnica de Nicholas y Nason (80). Se realizó una curva patrón con NaNO_2 . El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el

nismo: se partió de una solución 50 μ M y se tomaron volúmenes de 0.1 ml a 1 ml completando a 2 ml con agua destilada. Del extracto enzimático se tomó de 1 a 2 ml

Muestra (volumen total 2 ml)
 +
 1 ml de sulfanilamida
 +
 1 ml de naftiletilendiamina (NED) 0.02%
 ↓
 leer a 540 nm después de 10 minutos de reposo

El ensayo del extracto enzimático requiere que antes de ser leído, sea centrifugado durante 20 minutos porque hay precipitación de proteínas.

- Preparar una solución de 1 g de sulfanilamida que es disuelta primero en 25 ml de H_2SO_4 y aforar a 100 ml con agua destilada.

La curva patrón se obtiene graficando la concentración de $NaNO_2$ en micromoles contra la absorbancia a 540 nm (figura 9).

II.6.9. DETERMINACION DE AMONIO

El método estectrofotométrico del indofenol (81) es empleado para la determinación de urea en sangre y tiene un rango de detección desde nanomoles hasta micromoles, pasados

los 5 micromoles, la reacción pierde su linealidad. El pH altera la intensidad del color y por lo tanto debe ser controlado.

Para la determinación de amonio a través de este método, la muestra (20 ml de extracto de cotiledón, 60 ml de extracto de hoja, 50 ml tanto para extracto de raíz como para el de tallo) se lleva a un volumen de 2.32 ml con agua destilada. Para la curva patrón de amonio se parte de una solución 1 mM de NH_4Cl y se ensaya con volúmenes de 0.3 ml a 2 ml completando a 2.32 ml con agua destilada y se procede del mismo modo que con la muestra.

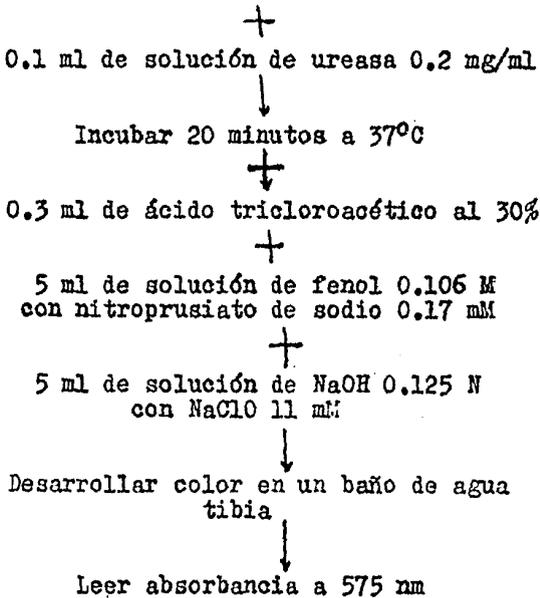
Muestra (volumen total 2.32 ml)
 +
 5 ml de solución de fenol 0.106 M
 con nitroprusiato de sodio 0.17 mM
 +
 5 ml de solución de NaOH 0.125 N
 con NaClO 11 mM
 ↓
 Incubar 30 minutos en baño de agua
 tibia
 ↓
 Leer la absorbancia a 575 nm

La curva patrón se obtiene graficando la concentración de amonio en milimoles contra la absorbancia a 575 nm (figura 10).

II.6.10. DETERMINACION DE UREA

Como se mencionó, para la determinación de urea se empleó el método espectrofotométrico del indofenol. La determinación de urea se hizo a través del cuanteo del amonio liberado por la enzima ureasa al hidrolizar la urea presente en los extractos enzimáticos. La muestra (dependiendo del tejido a ensayar) se llevó a 2.12 ml con tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5. Se preparó una curva patrón de urea partiendo de una solución 2 mM y se ensayaron con concentraciones de 0.0 a 3 mmoles de urea. Se procedió de la misma manera para la curva patrón y para las muestras.

Muestra (2.12 ml de volumen total tamponado)



La curva patrón se obtiene graficando la concentración de urea en mmoles contra la absorbancia a 575 nm (figura 11).

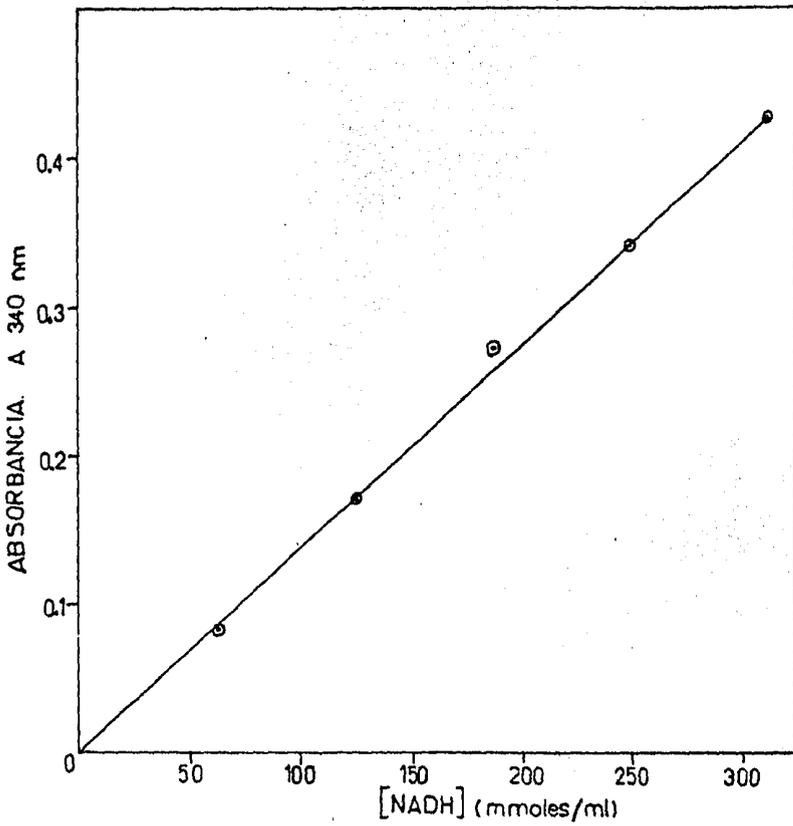
II.6.11. AJUSTE DE LOS ENSAYOS ENZIMATICOS

Para la determinación de la actividad de la GDH tanto aminativa como desaminativa y de la GS, se probaron diferentes volúmenes de extracto enzimático y diferentes tiempos de incubación. Se obtuvieron los volúmenes y los tiempos óptimos para lograr la linealidad en la reacción de cada enzima.

La figura 2 nos muestra la linealidad de la velocidad de la GDH aminativa y desaminativa con respecto al tiempo; la figura 3 muestra la linealidad de la velocidad de la GDH aminativa y desaminativa con respecto a la concentración de extracto enzimático.

Las figuras 5A y 5B nos muestran la linealidad de la velocidad de la GS con respecto al tiempo y a la concentración de extracto enzimático respectivamente.

Las concentraciones de ensayo para cada enzima desglosadas en los apartados II.6.2., II.6.3. y II.6.4. incluyen ya los tiempos de incubación y los volúmenes óptimos para cada determinación.

FIGURA 1. GRÁFICA DE CALIBRACION DE β -NADH

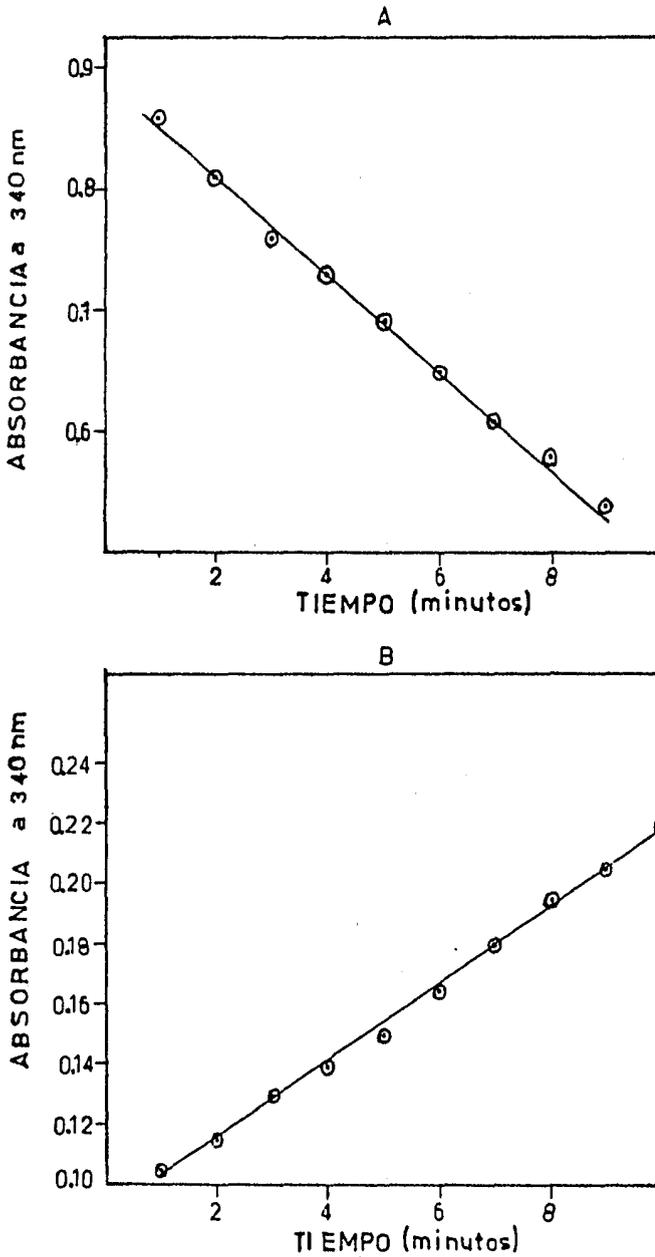


FIGURA 2 Linearidad de la GDH con respecto al tiempo en raíz de 7 días bajo las condiciones del ensayo. A:aminativa;B:desaminativa

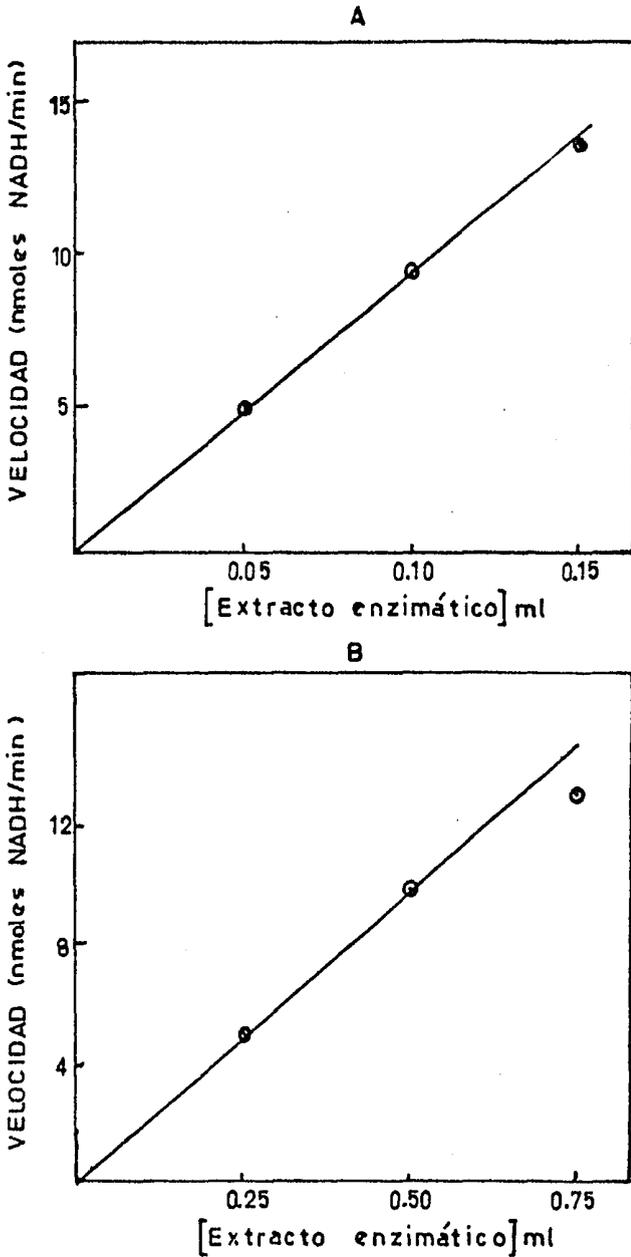


FIGURA 3. Linearidad de la velocidad de la GDH con respecto a la concentración de enzima bajo las condiciones del ensayo. A; amilativa en tallo de 5 días. B; desaminativa en cotiledón dializado de 7 días.

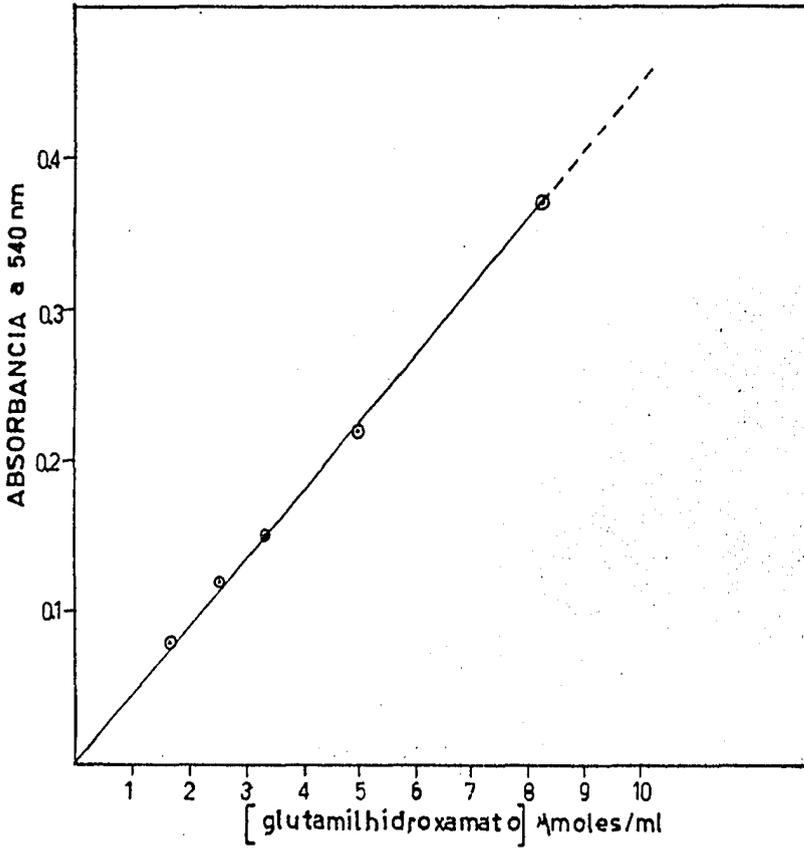


FIGURA 4. Gráfica de calibración de γ -glutamihidroxamato

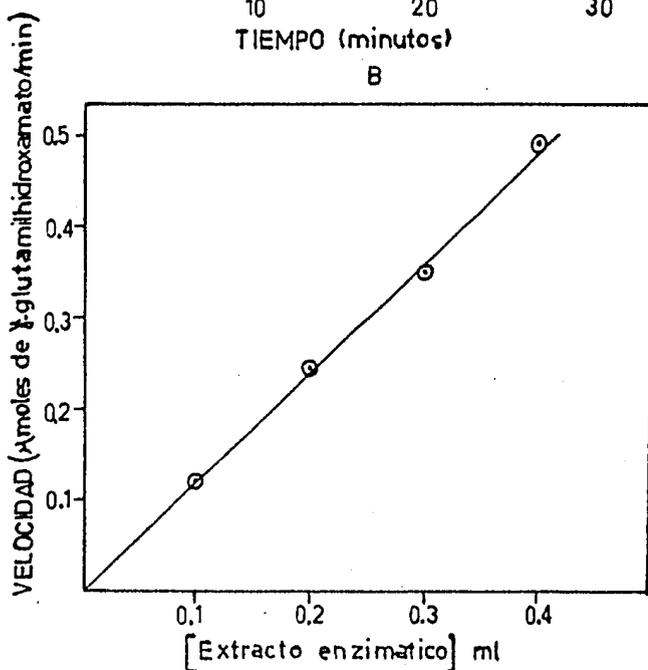
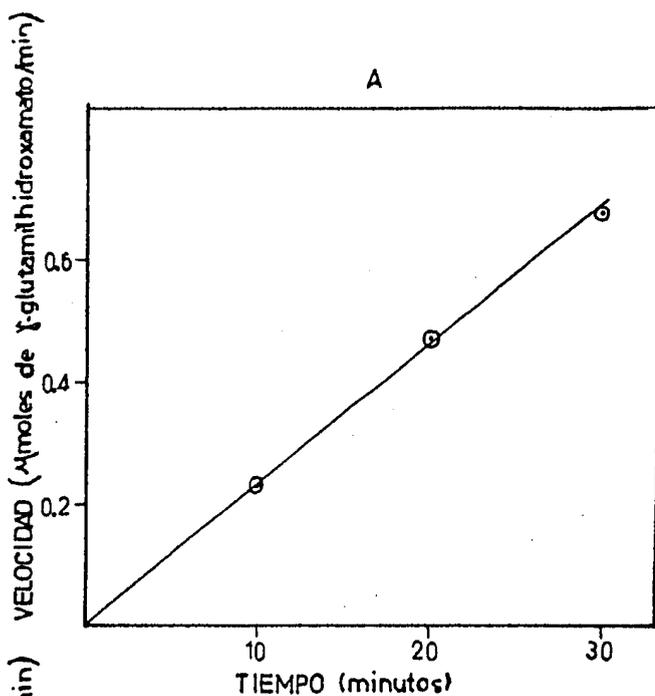


FIGURA 5A: Linearidad de la velocidad de la GS con respecto al tiempo en cotiledón de 3 días.
FIGURA 5B: Linearidad de la velocidad de la GS con respecto a la concentración en cotiledón de 2 días. Ambas bajo las condiciones de ensayo.

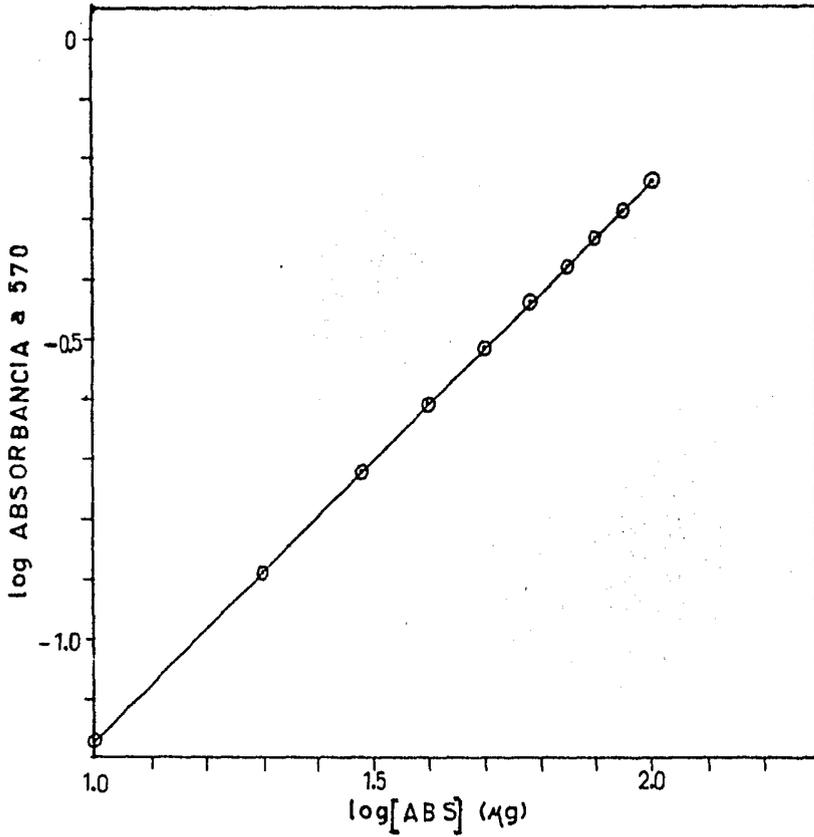


FIGURA 6 CURVA PATRON DE PROTEINAS. Albúmina sérica bovina. Datos de la curva: $y = mx + b$, $m = 0.931$. Cuando $x = 0$; $y = -2.1027$. Cuando $y = 0$; $x = 2.2583$.

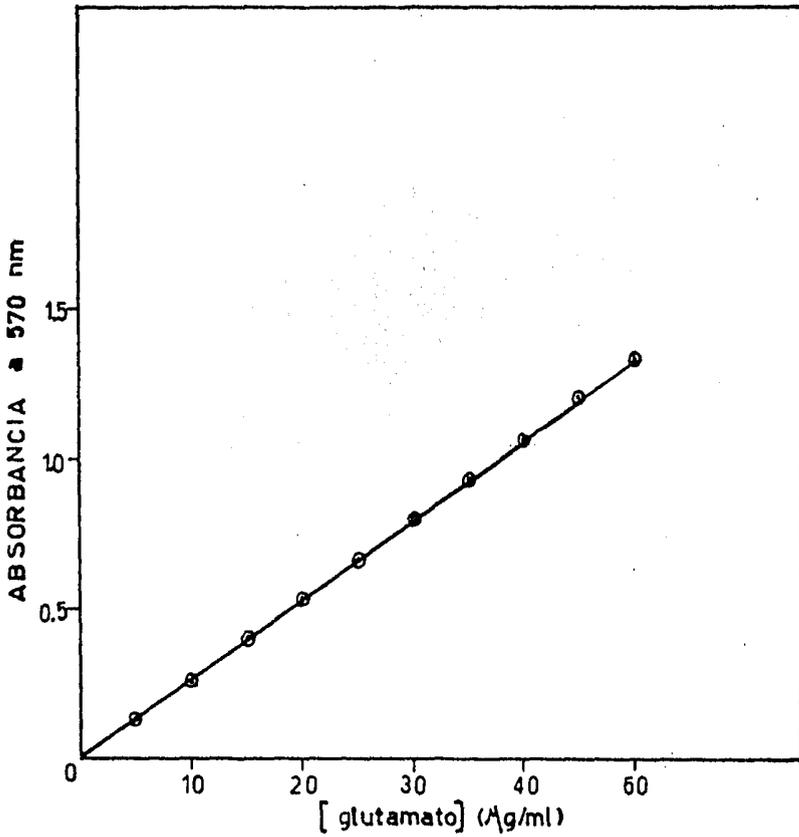


FIGURA 7. CURVA PATRON DE AMINOACIDOS. Se realizó con glutamato. Datos de la curva: $y = mx + b$; $m = 0.026675$.
Cuando $x = 0$; $y = 0$

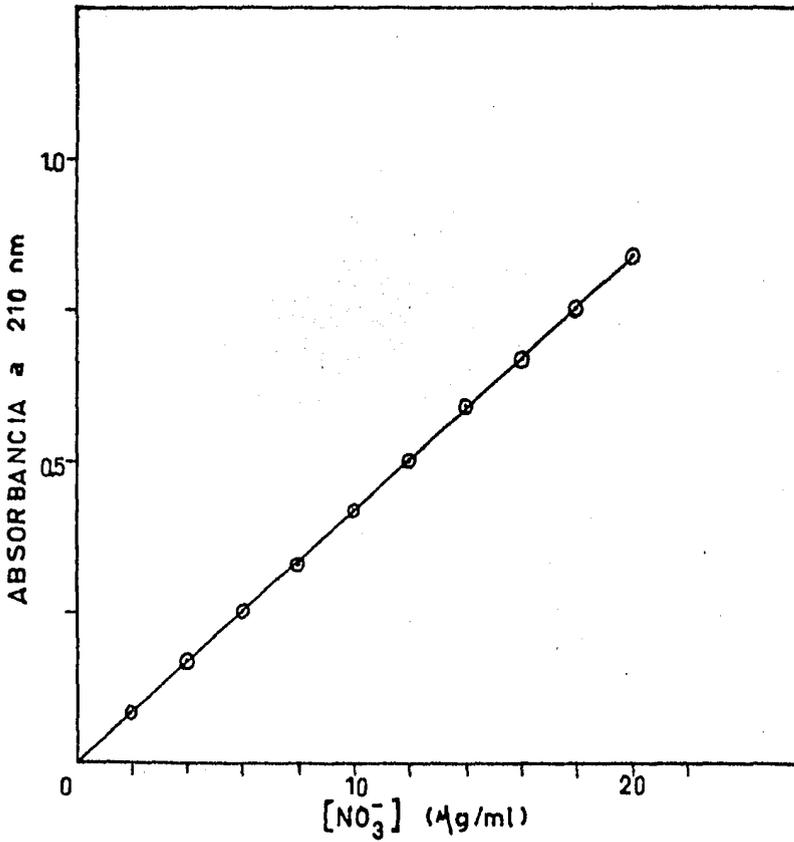


FIGURA 8. CURVA PATRON DE NITRATOS. Se utilizó KNO_3
Datos de la curva: $y=mx+b$; $m=0.0419$. Cuando $x=0$; $y=0$

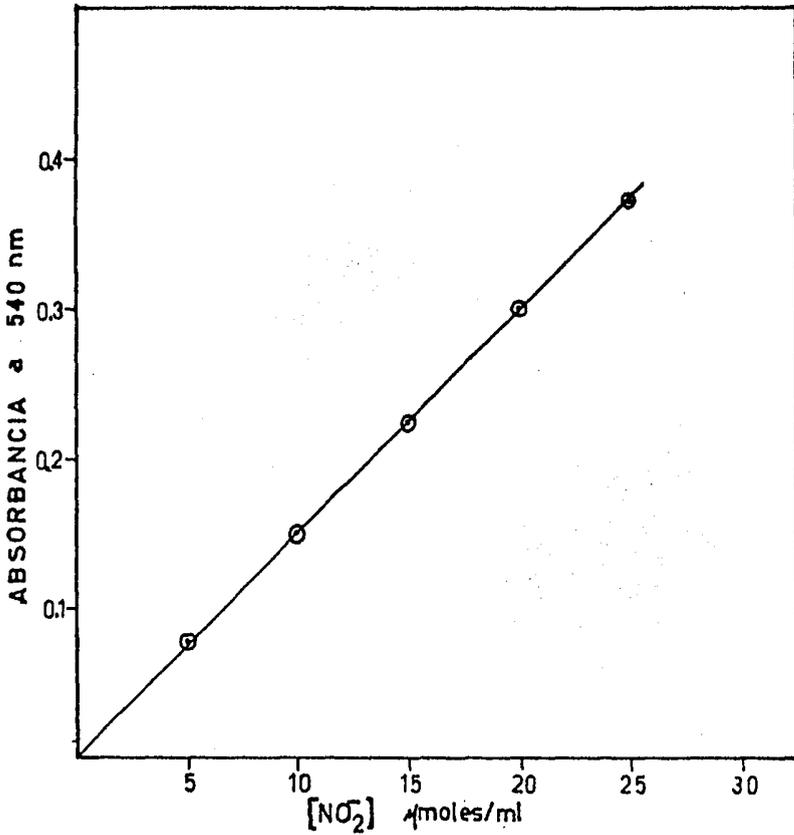


FIGURA 9 CURVA PATRON DE NITRITOS. Se utilizó NaNO_2
Datos de la curva: $y=mx+b$; $m=0.0147$. Cuando $y=0$; $x=0.2753$
Cuando $x=0$; $y=0.0040$

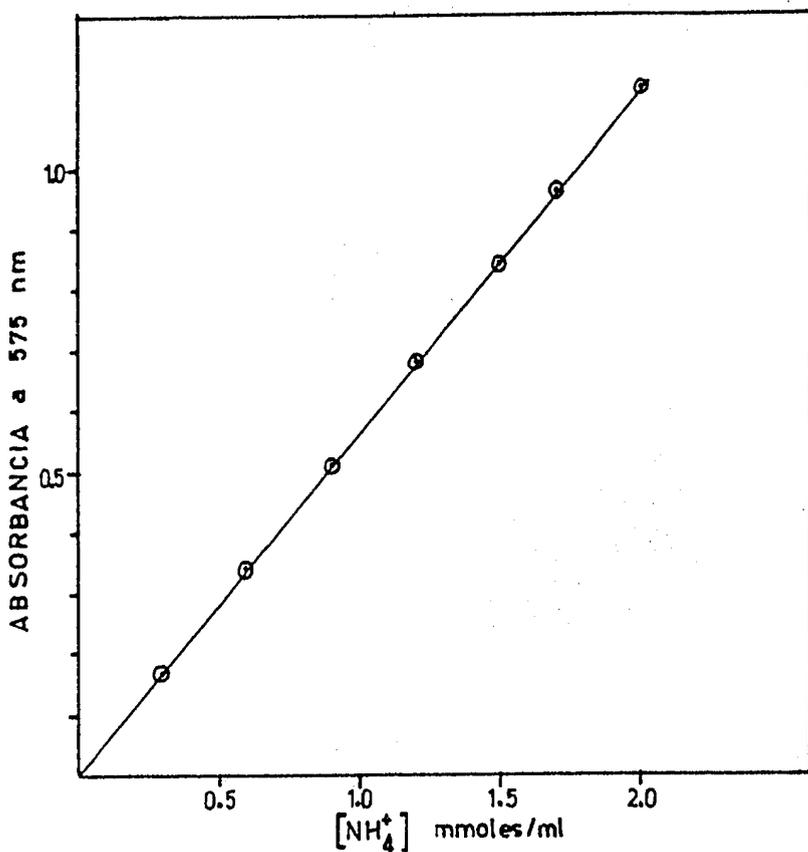


FIGURA 10 CURVA PATRON DE AMONIO. Se utilizó NH₄Cl
Datos de la curva: $y=mx+b$; $m=0.5631$. Cuando $y=0$; $x=0$

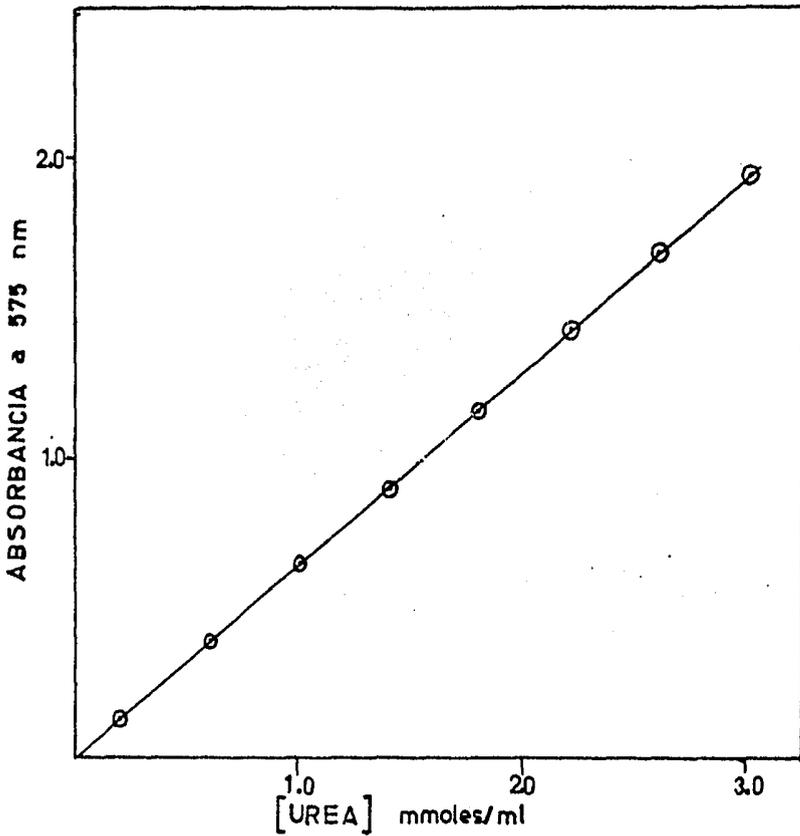


FIGURA 11. CURVA PATRON DE UREA. Datos de la curva:
 $y=mx+b$; $m=0.5467$. Cuando $y=0$; $x=0$

C A P I T U L O I I I

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se puede observar en la figura 12, los cotiledones muestran un marcado incremento en su peso fresco a medida que la planta se desarrolla. El porcentaje de incremento tiene mayor importancia del primero al tercer día de germinación, ya que a partir del cuarto día tiende a una meseta hasta el último día. Este incremento en peso de los primeros días se debe a la gran cantidad de agua que toman los cotiledones en este período (figura 16B), que es requerida para la germinación y la movilización de los metabolitos dentro de la planta, después de este tiempo, del cuarto al séptimo día, el contenido de humedad en cotiledones desciende y llega a valores aproximadamente constantes, ya que no se requiere que la cantidad de agua siga aumentando para cumplir su cometido en el desarrollo de la planta. En la figura 16A se puede observar que el

incremento en peso en los cotiledones en los tres primeros días no es solo debido a la acumulación de agua en ellos, sino que también se debe a su desarrollo con la concomitante elaboración de materias útiles a la planta.

Los cotiledones presentan un color amarillo crema hasta el tercer día y a partir del 4o se vuelven verdes, indicando su incipiente función fotosintética. Los valores aproximadamente constantes de peso seco en los cotiledones a partir del cuarto día y el ligero descenso durante el séptimo se deben a que el cotiledón actúa como almacén de nutrientes y que no puede mantenerse una tendencia en ascenso porque cada vez se acerca más al agotamiento de y separación de esta reserva vegetal.

En el resto de los tejidos el máximo porcentaje de incremento en peso fresco con respecto al día anterior se lleva a cabo el cuarto día en todos los tejidos, pero el que presenta mayores incrementos continuos es el tallo, pero éstos solo llegan hasta el sexto día, ya que el porcentaje de incremento en peso del 7o día con respecto al 6o es bajo.

La hoja presenta incrementos diarios de 173.02% el 4o día, 88.07% el 5o día, 42.77% el 6o día y 44.0% el 7o día. Este porcentaje de incremento diario es menor que en tallo pero mayor que en raíz, que en este caso es el de menor porcentaje de incremento diario (figura 13).

Al hacer una comparación del porcentaje de incremento en peso con respecto al tercer día, que es el punto de partida de este estudio en raíz, tallo y hoja, el que presenta un porcentaje mayor sigue siendo el tallo, ya que el peso del tejido en el 7o día es 12.67 veces mayor al peso en el 3er día. Igualmente la hoja tuvo un incremento 10.56 veces mayor del tejido en el 7o día con respecto al peso de la hoja en el tercer día. En raíz, entre el tercer y el último día hay un incremento total de 7.38 veces el peso inicial (figura 14).

El menor incremento en peso de la raíz podría ser explicado en base a que solamente se estudió hasta el séptimo día y tal vez la raíz tenga un mayor incremento en peso después de este tiempo, ya que se hace necesario un buen desarrollo de la raíz en las plantas para la asimilación de las fuentes nitrogenadas presentes en el suelo. También se podría deber a la ausencia de una fuente nitrogenada en el medio empleado en este estudio, tanto natural como creada artificialmente, ya que probablemente con esta fuente el incremento en peso habría sido mayor como sucede para ciertas fuentes nitrogenadas en raíz de maíz (105). Se podría esperar que la raíz de la planta que tuviera 15 días y que hubiera sido sembrada en tierra presentara un desarrollo mejor y la formación de nódulos como otras leguminosas (70).

El incremento en peso fresco es debido tanto a la humedad del tejido como a la materia seca.

En todos los tejidos en estudio el porcentaje de humedad va en descenso a medida que la plántula se desarrolla, esto quiere decir que se está elaborando una gran cantidad de materia conforme los tejidos se desarrollan y que el incremento en peso fresco en todos los tejidos no solo se debe a la absorción de agua en su interior.

El tejido que presenta porcentajes de humedad mayores es el cotiledón, ya que como se dijo, se muestra lógico que para la germinación y movilización metabólica requiera una gran cantidad de agua. El porcentaje de humedad del cotiledón varía en un rango de 60.58% a 27.07%, seguido por la hoja donde los rangos van de 19.33% a 17.69%, luego por tallo de 15.38% a 9.33% y finalmente la raíz donde el rango va de 12.82% a 7.94% (figura 16B).

El crecimiento de raíz, tallo y hoja por su aumento en peso se muestra en la figura 15, raíz y tallo tienen un peso similar en el tercer día, pero como ya se dijo, el tallo es el tejido de mayor desarrollo de la planta; la hoja parte de un peso mucho más pequeño y su desarrollo sigue una tendencia aproximadamente lineal ascendente pero con pesos muy bajos.

El desarrollo de la plántula en términos de elaboración de materia y no de absorción o contenido de humedad

se muestra en la figura 16A, en la que, a excepción del cotiledón, los tejidos presentan una tendencia de crecimiento del peso seco ascendente, con el mismo patrón de crecimiento mostrado por la planta fresca (figura 15).

El comportamiento primeramente ascendente de cotiledón, seguido por uno aproximadamente constante y con un ligero descenso final nos indica que para el 7o día el cotiledón está empezando a vaciarse a pesar de que a simple vista, el tejido en este día es bastante turgente..

POZAS

Al analizar la poza de proteína total se encuentra que el tejido con más proteína es el cotiledón, como era de esperarse por ser el tejido de reserva de la planta y el que va a actuar como soporte del desarrollo posterior (73). Además para la cuantificación de proteínas en el cotiledón fue necesario diluir el extracto enzimático para poder interpolar los datos en la curva patrón de albúmina sérica bovina, cosa que no tuvo que hacerse en ningún otro tejido.

La concentración de proteínas en cotiledón muestra un comportamiento cicardiano hasta el tercer día, después del cual comienza un ligero descenso hasta el 5o día, después del cual la concentración de proteína en

los cotiledones disminuye marcadamente. Estos descensos son probablemente debidos a que la reserva de proteína de los cotiledones se está agotando y acercándose al momento de la abscisión (figura 17).

En un rango de proteínas más bajo se encuentra el tallo, con una tendencia al descenso del tercer al quinto días y a partir de éste comienza una tendencia ascendente hasta el último día, lo que sugiere que en los primeros días transloca aminoácidos para después empezar a acumular proteínas. En raíz con una cantidad aún menor de proteína, se presenta poca variación de la cantidad de proteínas, pero la tendencia es ligeramente descendente.

La hoja es el tejido más abundante en proteínas después del cotiledón y presenta un comportamiento cicardiano con un mínimo de proteínas en el 6o día (figura 18)..

Con respecto a la poza de aminoácidos totales, nuevamente el cotiledón muestra la poza más elevada, cuyo valor desciende para 12 horas y aún más para 1 día, después un incremento que se mantiene hasta el 5o día y en el 6o día hay un fuerte descenso que se mantiene constante en el 7o día probablemente porque no hay una translocación considerable de aminoácidos o porque la incorporación de éstos en las proteínas permanece constante durante estos dos últimos días de estudio.

El descenso en las primeras 24 horas es explicado en base a una ruptura enzimática de la canavanina, que por ser el aminoácido más abundante en los cotiledones, es el que podría contribuir mayoritariamente al contenido de esta poza. El incremento posterior se podría explicar en base a la asimilación del amonio proveniente de la ruptura de la canavanina en aminoácidos como asparagina y leucina-isoleucina como fue propuesto por Rosenthal (50). El nuevo descenso en el 6o y 7o días podría también significar parcial agotamiento de los metabolitos de los cotiledones como se discutió para la poza de las proteínas, mediante el transporte de la canavanina o de algún otro aminoácidos hacia tejidos como la hoja, donde el incremento de su poza en estos dos últimos días apoya esta proposición. Un incremento máximo en la poza de aminoácidos en los cotiledones corresponde a un mínimo en la de la hoja. En el tallo, que es un tejido importante para el transporte de los aminoácidos (73), la poza de aminoácidos se muestra aproximadamente constante con un máximo en el 4o día, al igual que en la raíz, en la que después sufre un descenso de su poza probablemente por transporte a las hojas o incorporación en proteínas (figura 19).

La cantidad de nitratos en los tejidos muestra considerable importancia ya que no se esperaba que fuera tan

elevada. Nuevamente el tejido con la poza más alta fueron los cotiledones y presenta un comportamiento cicardiano que también muestra la hoja, pero con una poza menor y el tallo con otra aún menor. La raíz presenta valores aproximadamente constantes en su poza de nitratos. Se ha propuesto que los nitratos también son transportados en el interior de la planta (73), esto podría estar sucediendo en canavalia, ya que uno de los valores mínimos de la poza de cotiledón está acompañado por un máximo en la poza de tallo y en el 7o día donde la de cotiledón tiene un valor mínimo, hoja y tallo presentan tendencias ascendentes (figura 20).

La poza de nitritos muestra un comportamiento cicardiano en los cotiledones, donde se presentan máximos donde la poza de nitratos muestra mínimos y viceversa, lo que podría significar que los nitratos son reducidos in situ a nitritos donde quizá no haya gran actividad de nitrato reductasa o la poza de nitritos excede su capacidad metabolizadora. En apoyo a este último argumento, encontramos una gran poza de amonio en raíz, pero aquella no solo puede deberse a una actividad alta de nitrato y nitrato reductasa, sino a la actividad de arginasa seguida de ureasa que también producirían esta elevación en la poza de amonio. De acuerdo a los resultados obtenidos por

Román (123), hay una gran actividad de arginasa en raíz, aunque la actividad de ureasa no parece ser tan significativa en este tejido. Tal vez podría estar sucediendo una inhibición por producto, debido al tamaño de la poza de amonio. La hoja muestra una poza de nitritos ascendente y el tallo muestra una tendencia complementaria con la de nitratos, es decir cuando la poza de nitratos muestra una tendencia descendente, la de nitritos es ascendente y viceversa probablemente por las razones ya discutidas (figura 21).

Pozas de gran interés en este estudio fueron las de urea y amonio, ya que dependiendo de la actividad de arginasa y ureasa, a partir de la urea se tiene una fuente más de amonio (junto con la que producen las enzimas nitrato y nitrito reductasa al actuar sobre nitratos y nitritos respectivamente) que puede ser incorporado a las moléculas para formar los aminoácidos.

En cotiledón no se encontró urea y este dato concuerda con la gran actividad de ureasa encontrada en este tejido (123) que impidió que cualquier cantidad de urea permaneciera sin hidrolizar.

Tampoco fue detectada la urea en hojas de 5, 6 y 7 días, a pesar de que la actividad de ureasa en hoja no fue tan alta como en los cotiledones, pero fue más alta

que la de la raíz, donde sí se pudo detectar una poza de urea que muestra una tendencia ascendente hasta el 6o día con un descenso para el 7o día. La poza de urea en tallo muestra un comportamiento cicardiano durante el tiempo de estudio (figura 22).

La poza de amonio se comporta en forma ascendente en hoja durante el tiempo del estudio, mientras que en los cotiledones y en el tallo muestra una tendencia descendente conforme la planta se desarrolla (figura 23).

El sensible descenso en la poza de amonio en tallo podría ser explicado en base a la creciente actividad mostrada por la GS en este tejido (figura 24) conforme la planta se desarrolla, que podría metabolizar el amonio proveniente de nitratos y nitritos (por la acción sucesiva de la nitrato y de la nitrito reductasa), de urea (por la acción de la ureasa) y de la poza de amonio en sí, provocando este descenso. La GDH del tallo tiene un carácter cicardiano en el tiempo de este estudio y por lo tanto no es la encargada principal de la asimilación del amonio en este tejido. (figura 25). La AS no interviene en la reasimilación, ya que muestra un comportamiento descendente (124). Se podría esperar una gran cantidad de glutamina en este tejido y poca cantidad de asparagina por las actividades de las enzimas que sintetizan estos aminoácidos.

La actividad de la GS en hoja es mayor que la de tallo y muestra una tendencia ascendente conforme la planta se desarrolla y así mismo una poza ascendente de amonio, por lo que no puede aplicarse el argumento anterior a este tejido. Estos resultados podrían explicarse en base a una actividad aún mayor de las enzimas productoras de amonio: MR, MR y ureasa con carácter en ascenso que sobrepasara la capacidad de la GS para metabolizarlo, ya que la actividad de la GDH aminativa es descendente. Sin embargo, la AS de las hojas sufre incremento (124) conforme la planta se desarrolla pero no parece haber una disminución significativa de la poza ascendente de amonio por la acción de esta enzima.

La poza descendente en los cotiledones se debe a las actividades de GS y GDH, que aunque son cicardianas, muestran una tendencia ascendente y complementaria, ya que en los valles de actividad de una, hay crestas de actividad de la otra (figuras 24, 26). La AS no interviene porque nuevamente su comportamiento es descendente.

La poza de amonio en la raíz muestra un comportamiento cicardiano, pero con ligeras variaciones (figura 23), al igual que la GS que podría contribuir a la variación de esta poza a pesar de que la GDH muestra una tendencia en ascenso.

Los resultados de la variación de la actividad de las

enzimas serán explicados con más detalle a continuación.

El tejido que mostró mayor actividad de la GS fue la hoja y en el segundo lugar el tallo. Ambas tejidos mostraron patrones de actividad ascendentes durante el tiempo del estudio. En tercer lugar estuvo la raíz que presenta un comportamiento cicardiano en la actividad de la GS con un máximo en el 6o día para después descender en el 7o día. El 4o y 5o días tienen actividades bajas .

La actividad de la GS en cotiledón muestra ser la menor de los cuatro tejidos estudiados y presenta también un comportamiento cicardiano con un máximo de actividad a los 4 días y un mínimo a los 5 días con ascenso en el 6o día y posterior disminución en el 7o día (figura 24).

Por otro lado la GDH de hoja disminuye marcadamente durante el período de tiempo estudiado; mientras que la de raíz va en aumento a pesar de que muestra un ligero descenso en el 5o día para la vía aminativa y en el 6o día para la vía desaminativa. La GDH tanto de cotiledones como de tallo muestra un comportamiento cicardiano con una actividad máxima en el sexto día para la vía aminativa y en el segundo día para la vía desaminativa; en el 4o día para la vía aminativa y en el 5o día para la vía desaminativa respectivamente (figuras 25, 26, 27). Al hacer el ensayo de la GDH desaminativa en los cotiledones, el blanco, que no contenía glutamato de sodio mostró cambios de

absorbancia con respecto al tiempo, lo cual quiere decir que la poza de ácido glutámico dentro de la poza total de aminoácidos en cotiledón es muy grande. Este problema fué resuelto mediante la diálisis del extracto enzimático de este tejido.

Estos resultados y los de Caldera (124), han mostrado que el amonio liberado por la ureasa y probablemente por otras enzimas como la nitrato y la nitrito reductasa, es reasimilado en las hojas por la vía GS/GOGAT, ya que la actividad de GS en hojas es la más grande en comparación con cualquier otro tejido. Se sabe también que hay una actividad significativa de GOGAT dependiente de ferredoxina en este tejido (124).

Por otro lado en las raíces este amonio es reasimilado por la vía GDH que adquiere en este tejido la mayor importancia comparativamente con los otros tres, esto es apoyado por el hecho de que la GOGAT NADH-dependiente es muy baja comparada con la actividad de la GDH aminativa, sin embargo hay una actividad importante de GS. Hay que recordar aquí que la GOGAT ha demostrado ser una enzima muy inestable (69). La glutamina formada de esta manera no puede ser conectada directamente al metabolismo intermediario por la baja actividad de GOGAT en raíz, pero podría ser utilizada en la síntesis de purinas, de triptófano, de arginina o de histidina o podría ser también una

forma de almacenamiento de nitrógeno orgánico (69).

En el caso del tallo se propone que del tercer al cuarto día funcionen tanto la vía GS/GOGAT como la vía GDH pero a partir del 4o día la vía principal de asimilación del amonio es la vía GS/GOGAT, ya que la actividad de la GDH desciende sensiblemente a partir de este día.

En el caso de los cotiledones se obtienen actividades bajas para las enzimas involucradas en ambas vías, pudiendo sugerir que se realiza un transporte más que una metabolización de los intermediarios. Ambas vías responsables de la asimilación del amonio muestran una importancia similar en su función, si bien la ruta GS/GOGAT adquiere un papel más importante a medida que los cotiledones maduran ya que la actividad descendente de la GOGAT-NADH está acompañada con un aumento considerable de la GOGAT-ferredoxina.

La importancia de la AS en la reasimilación del amonio es mayor en los primeros días de germinación en el tallo, los cotiledones y la raíz mientras que en la hoja adquiere mayor relevancia en los últimos días (124).

A partir de la tabla I que nos da un análisis de la composición porcentual de las pozas analizadas, vemos que el componente mayoritario en cotiledón son las proteínas y después los aminoácidos en cambio en los tejidos restantes esta última poza es más abundante, con un mayor ta

maño en el tallo, después en hoja y finalmente en raíz. La poza de proteínas en estos tejidos tiene importancia secundaria. El tallo presenta una fuente inmensa de urea y con un tamaño ligeramente menor pero igual importancia se encuentra la raíz. La poza de amonio es considerablemente más grande en cotiledón que en cualquier otro tejido, seguida por la de tallo, luego la de raíz y finalmente por hoja. Las pozas de nitratos y nitritos son pequeñas y la más grande es la de nitratos en cotiledón, de cualquier modo, este porcentaje aunque pequeño, es importante por ser un hecho original.

TABLA I. Contenido de las pesas analizadas expresado

como porcentaje/ gramo de tejido

DIAS	RAIZ					TALLO					HOJA				
	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
Proteínas	0.51	0.49	0.41	0.39	0.37	0.96	0.76	0.43	0.54	0.54		1.54	1.86	1.41	2.25
Aminoácidos	1.87	2.90	1.84	1.74	1.51	3.17	3.63	2.95	2.95	2.95		2.98	1.62	2.09	3.09
Nitritos	0.23	0.44	0.29	0.34	0.30	0.21	0.3	0.29	0.27	0.23		0.24	0.22	0.25	0.5
Nitratos	0.20	0.27	0.26	0.26	0.24	0.61	0.3	0.26	0.28	0.3		0.37	0.5	0.36	0.54
Urea	4.74	5.52	7.38	28.14	13.59	22.92	13.88	24.85	24.65	16.01		-	-	-	-
Amonio	5.83	9.56	6.53	4.93	5.47	7.2	5.78	3.85	0.68	0.4		0.38	1.55	3.47	4.67
Humedad	12.82	9.79	8.39	8.8	7.94	15.38	11.52	10.56	8.77	9.33	19.33	26.54	16.6	18.74	17.69

DIAS	COTILEDON									
	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	
Proteínas	12.9	8.84	14.6	10.43	15.91	14.94	15.35	4.3	3.8	
Aminoácidos	6.07	5.3	2.16	3.16	4.13	4.53	5.7	2.86	2.8	
Nitritos	0.34	0.13	0.34	0.35	0.23	0.096	0.31	0.18	0.175	
Nitratos	1.61	1.21	1.06	1.14	1.09	1.72	1.33	0.98	0.70	
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amonio	9.72	8.28	7.29	5.78	7.65	4.23	5.33	2.41	1.53	
Humedad	-	60.58	52.68	39.23	36.53	29.75	29.5	24.15	27.07	

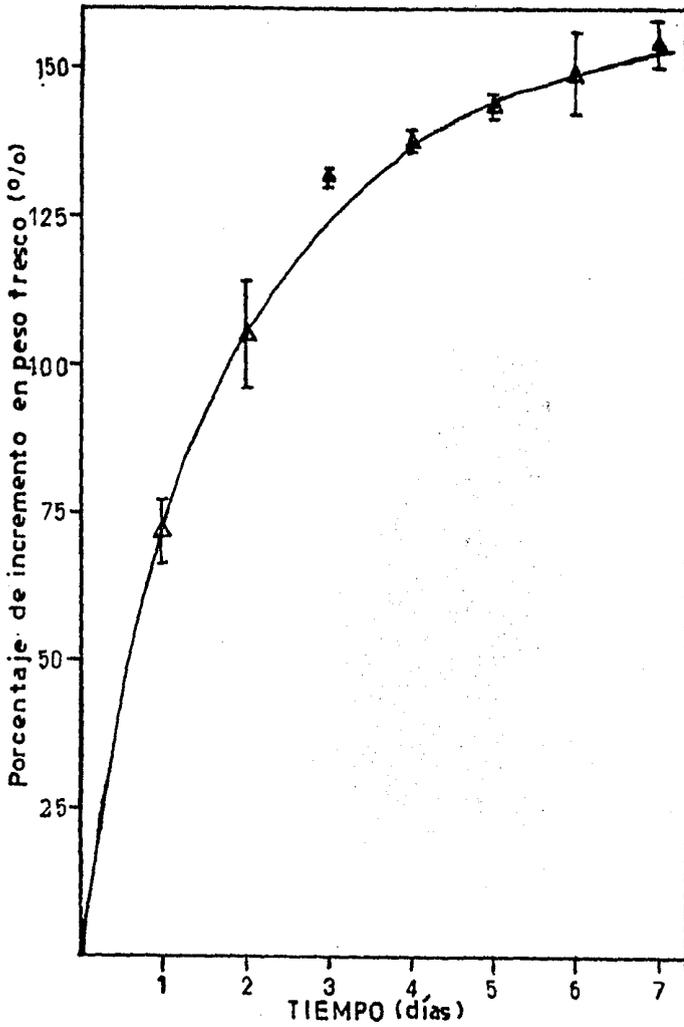


FIGURA 12. Porcentaje de incremento en peso fresco en cotiledón (por cada dos cotiledones) con respecto al peso de la semilla sin germinar

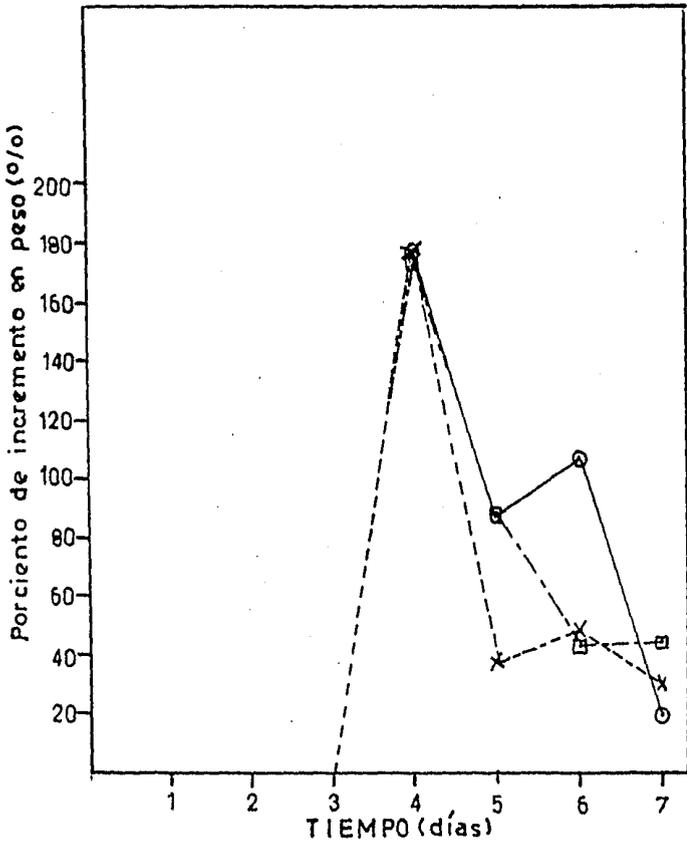


FIGURA 13 Porcentaje de incremento en peso fresco con respecto al peso del tejido del día anterior. x RAIZ, □ HOJA, o TALLO. Los errores estándar son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica.

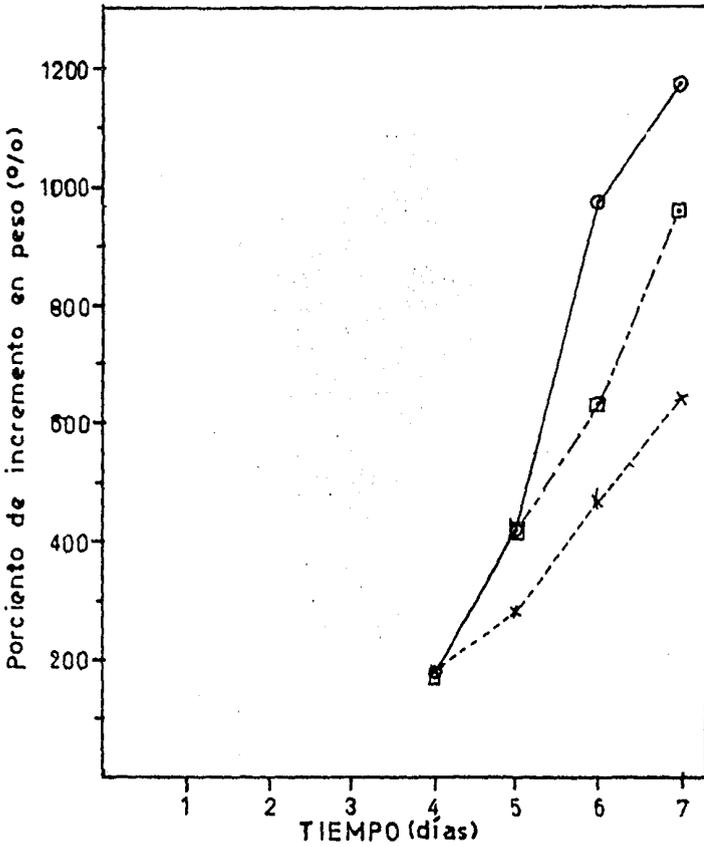


FIGURA 14. Porcentaje de incremento en peso fresco, con respecto al peso del tejido del tercer día. xRAIZ, oTALLO y □HOJA. Los errores estandar son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica

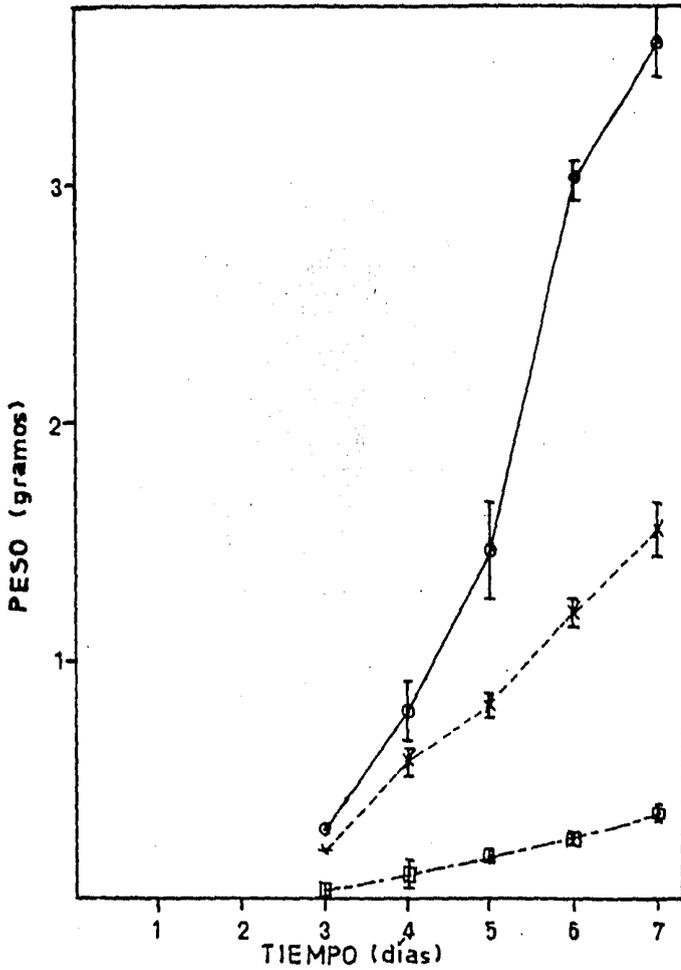


FIGURA 15 Incremento en peso de: x RAIZ, o TALLO y □ HOJA. Los errores estandar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica

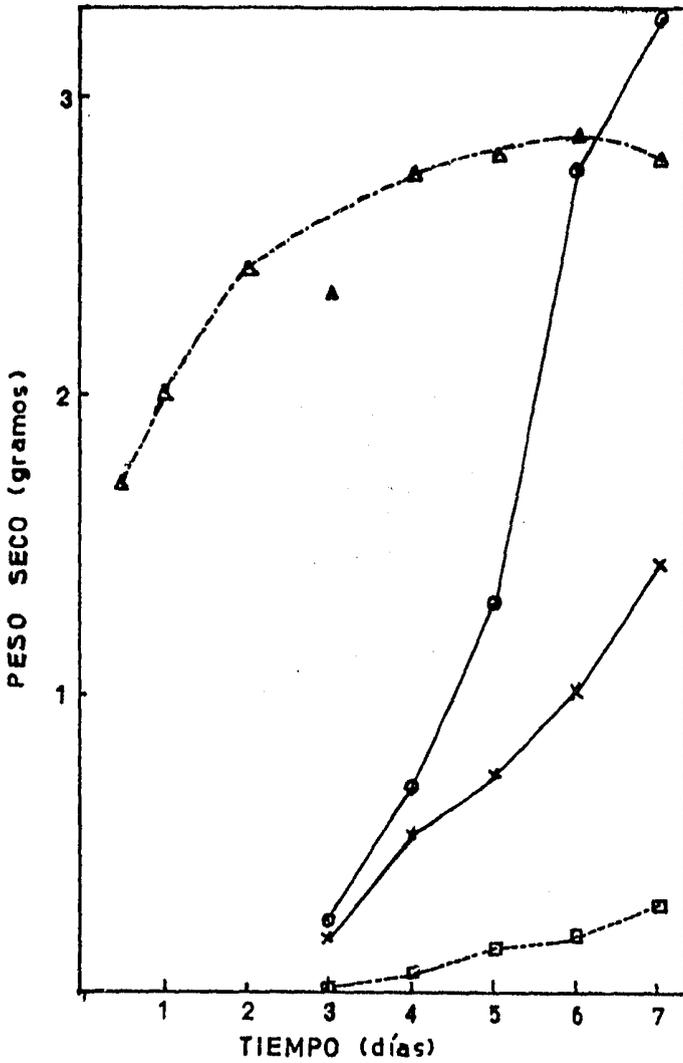


FIGURA 16A Incremento en peso seco en los tejidos. x RAIZ, o TALLO, Δ COTILEDON y □ HOJA

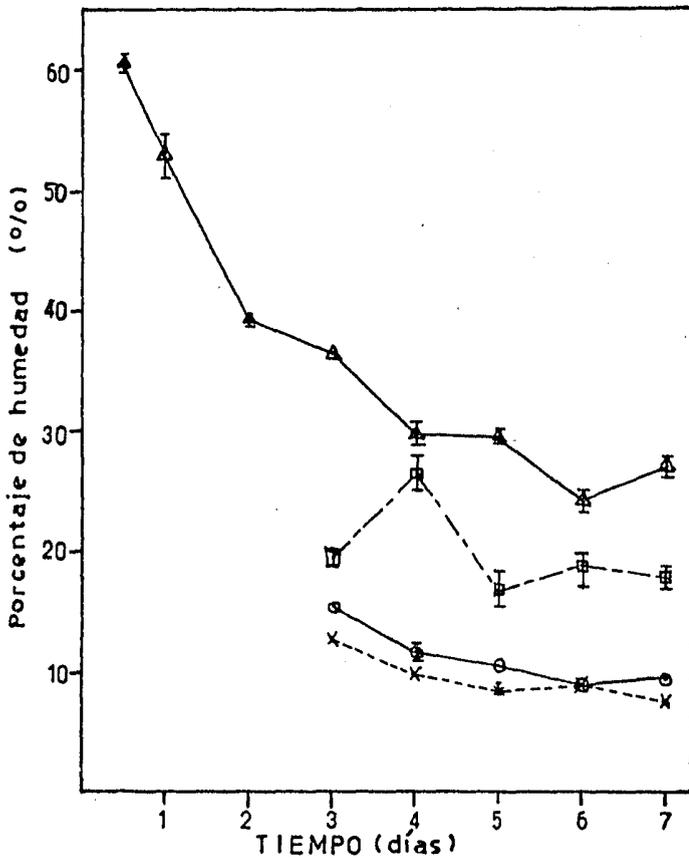


FIGURA 16B Porciento de humedad. En x RAIZ, o TALLO, □ HOJA y △ COTILEDON. Los valores de error estándar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica

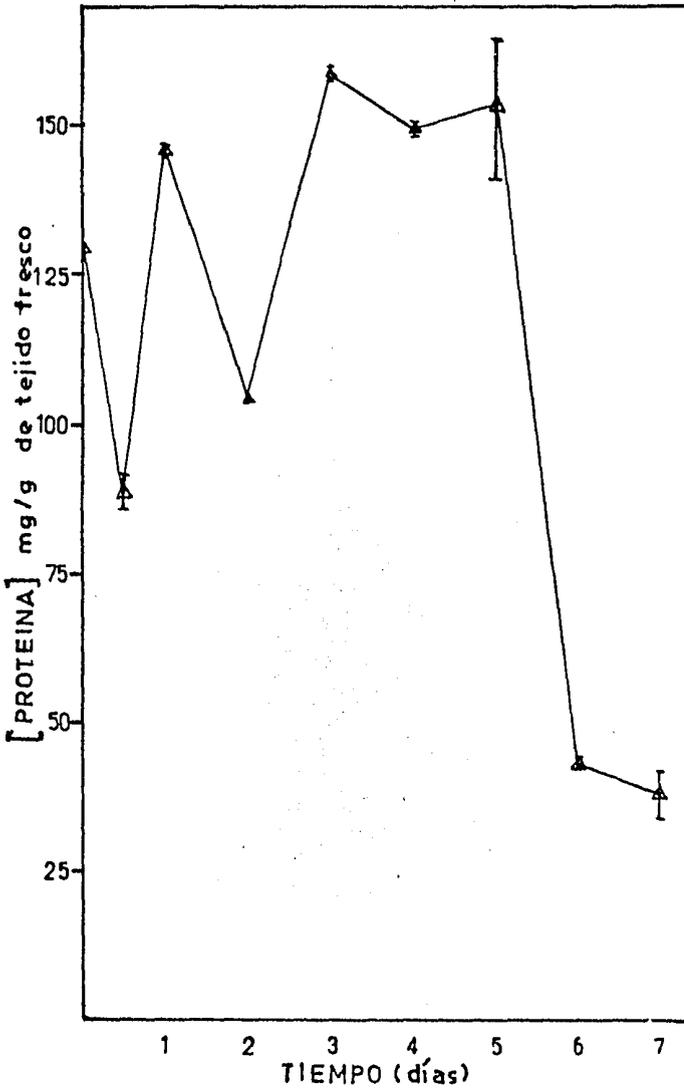


FIGURA 17 Variación de la poza de proteína total en cotiledón de Canavalia ensiformis en mg/g de tejido fresco

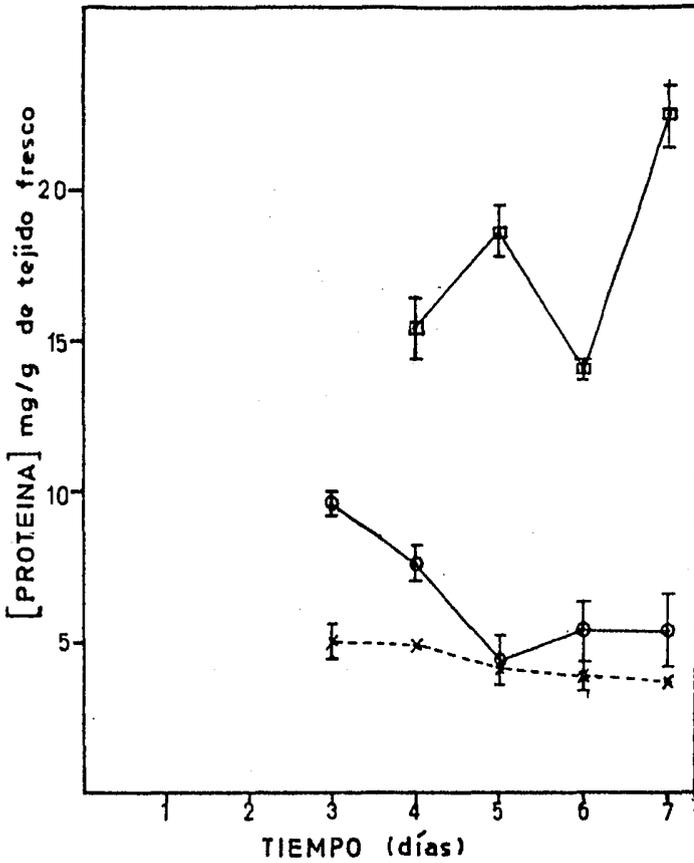


Figura 10 Variación de la poza de proteínas con el desarrollo de la planta. *RAIZ, ○TALLO, y □HOJA. Los errores estandar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica.

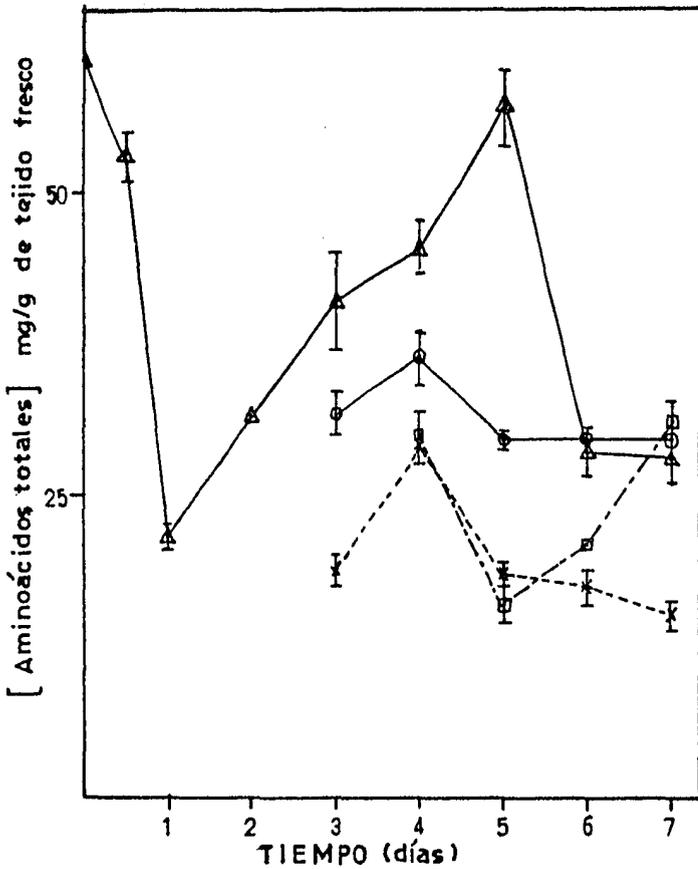


FIGURA 19 Poza de aminoácidos totales expresada como mg de glutamato/g de tejido fresco. Δ COTILEDON, \times RAIZ, \circ TALLO y \square HOJA

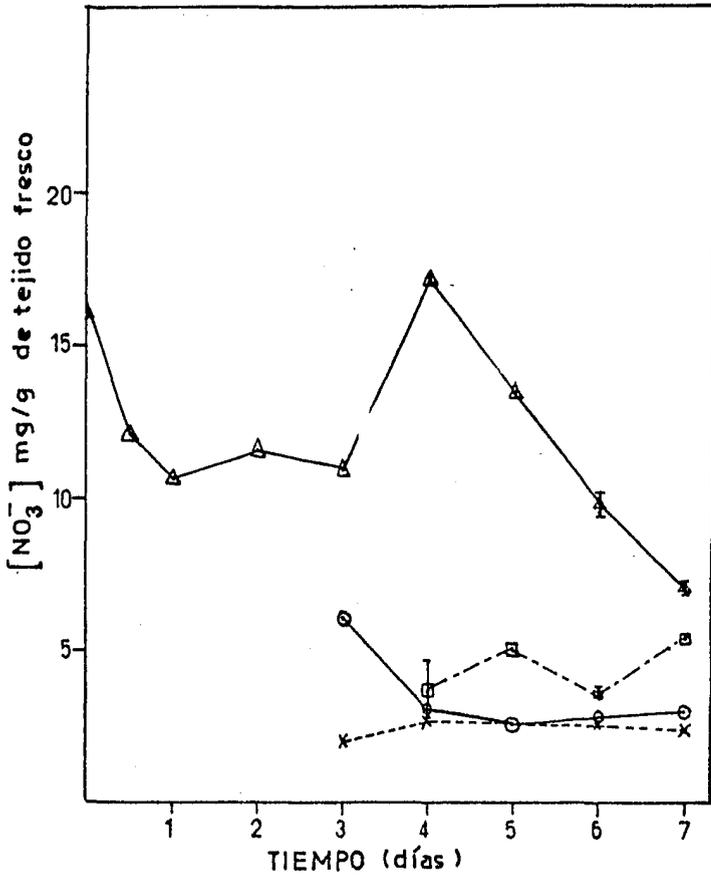


FIGURA 20 Poza de nitratos expresada en mg/g de tejido fresco. \triangle COTILEDON, \times RAIZ, \circ TALLO Y \square HOJA. Los valores de error estandar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica

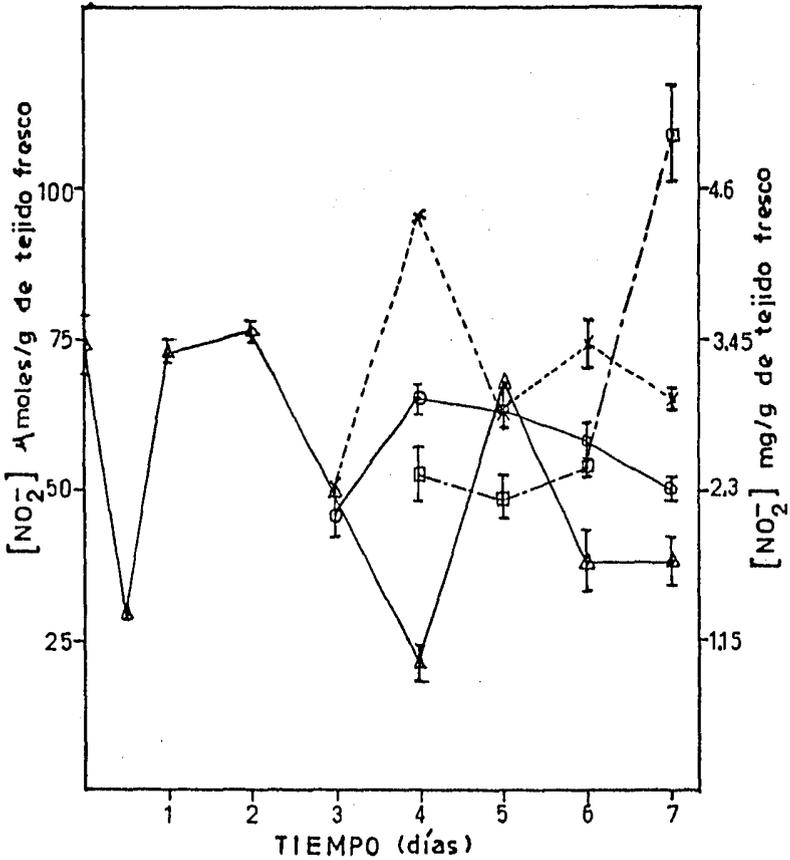


FIGURA 21 Poza de nitritos expresada en $\mu\text{moles/g}$ de tejido fresco (escala de la izquierda) y en mg/g de tejido (escala de la derecha). Δ COTILEDON, \times RAIZ, \circ TALLO y \square HOJA. Los valores de error estandar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica.

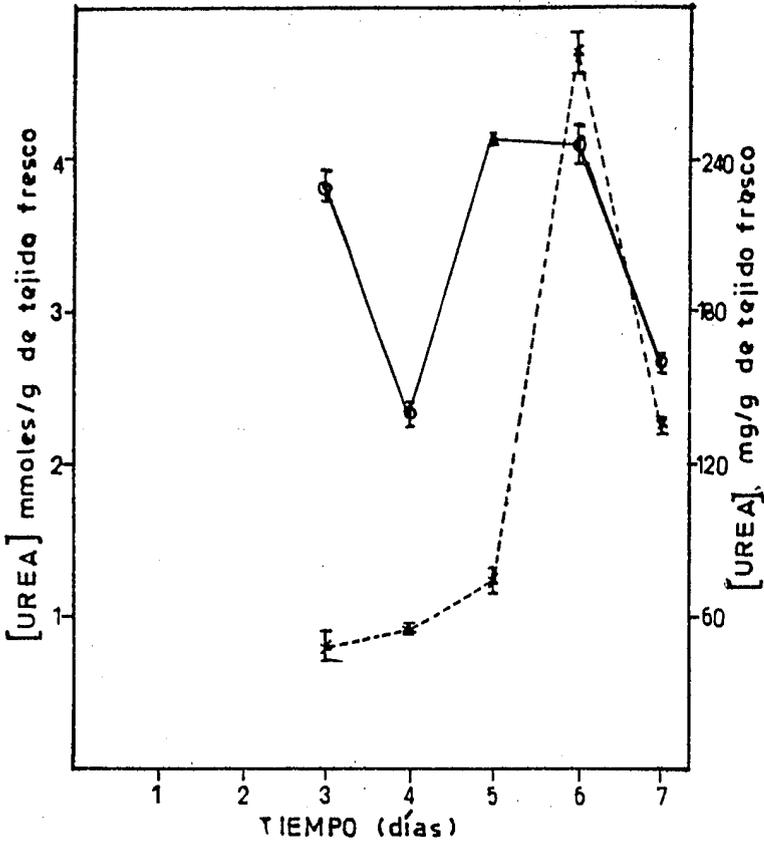


FIGURA 22 Poza de urea expresada en mmol/g de tejido fresco (escala de la izquierda) y en mg/g de tejido fresco (escala de la derecha). *RAIZ, □ TALLO y × HOJA. Los valores de error estándar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica

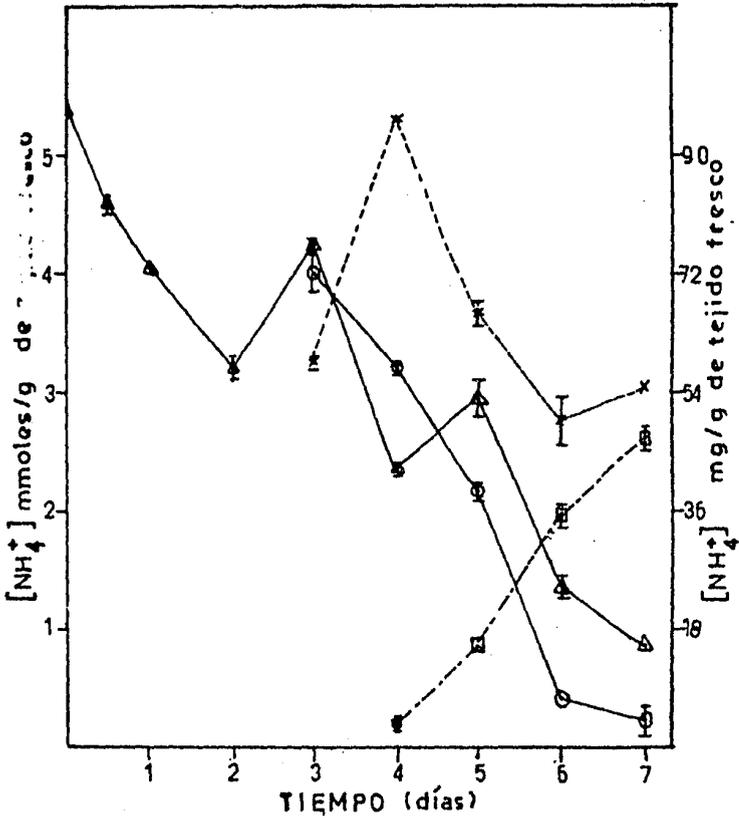


FIGURA 23 Poza de amonio expresada como mmol/g de tejido fresco (escala de la izquierda) y como mg/g de tejido fresco (escala de la derecha). Δ COTILEDON, \circ TALLO, \times RAIZ y \square HOJA. Los valores de error estandar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica.

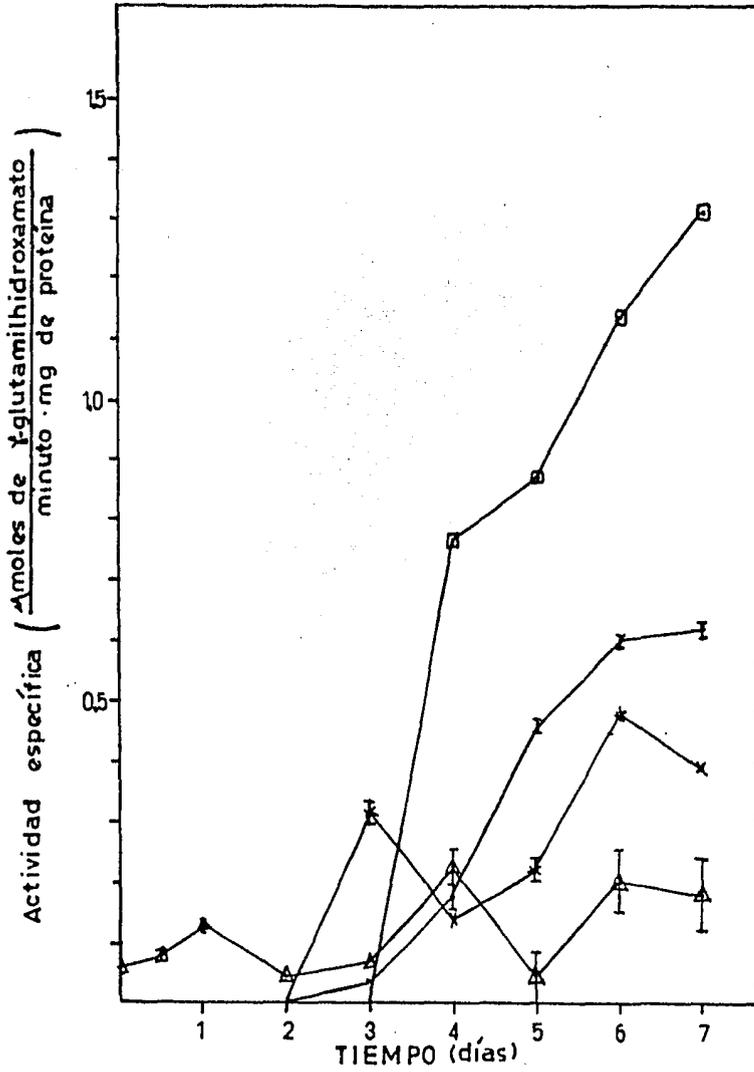


FIGURA 24 Actividad específica de glutamino sintetasa en *Canavalia ensiformis* L. x RAIZ, ○ TALLO, △ COTILEDON y □ HOJA.

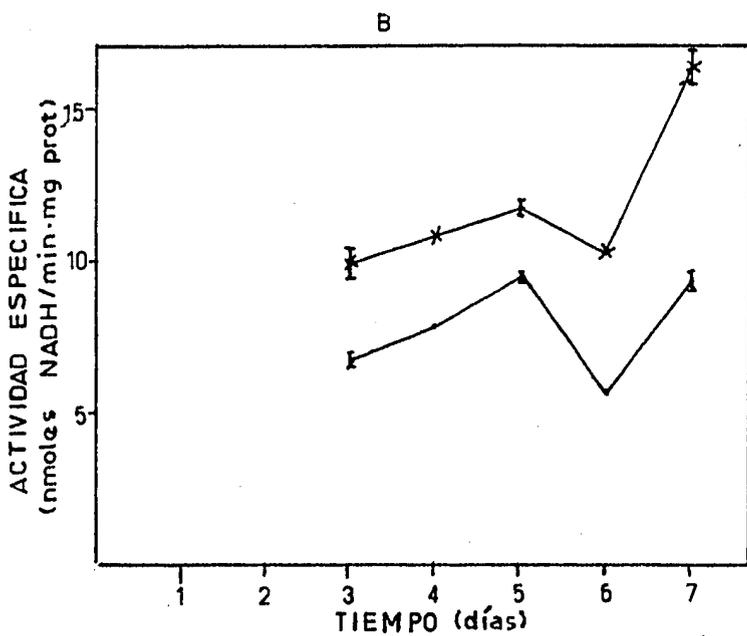
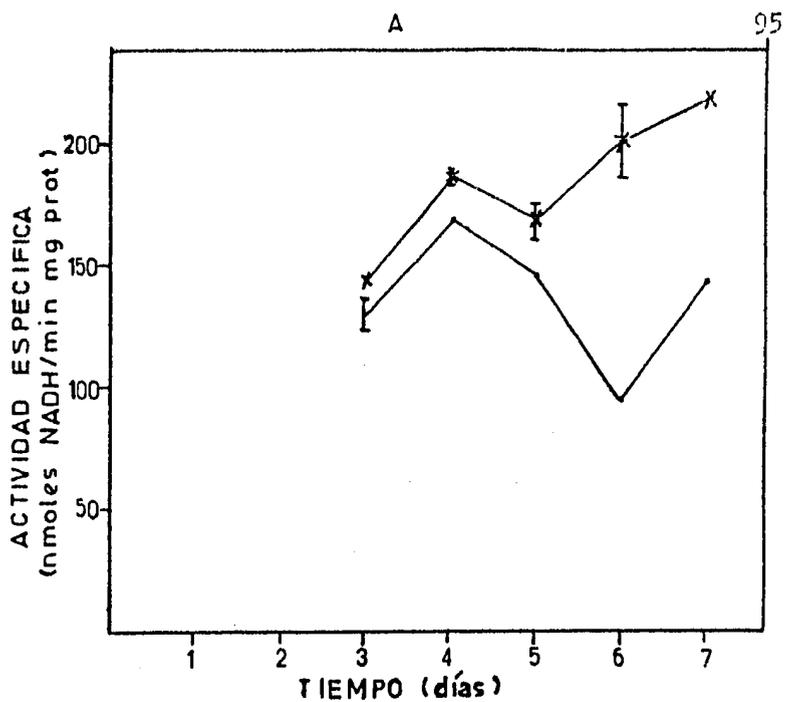
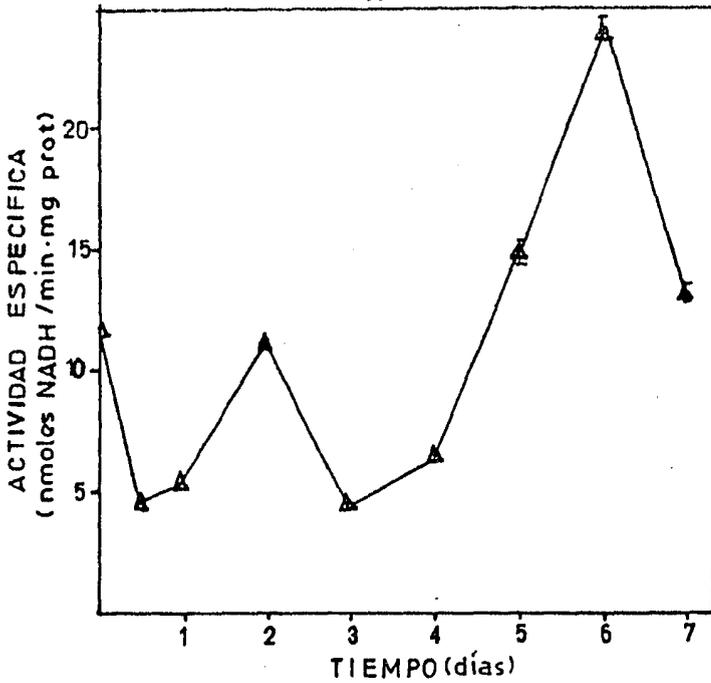


FIGURA 25 Actividad específica de glutamato deshidrogenasa (GDH) en raíz (x) y tallo (•) de *Canavalia ensiformis* L. A:aminativa y B:desaminativa

A

96



B

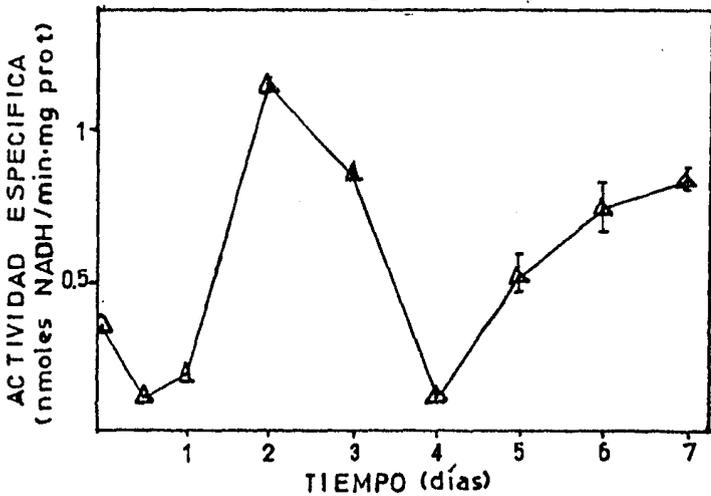


FIGURA 26 Actividad específica de glutamato deshidrogenasa en cotiledón de *Canavalia ensiformis* L. Los valores de error estándar que no aparecen son muy pequeños para ser incluidos en esta gráfica. A: aminativa, B: desaminativa.

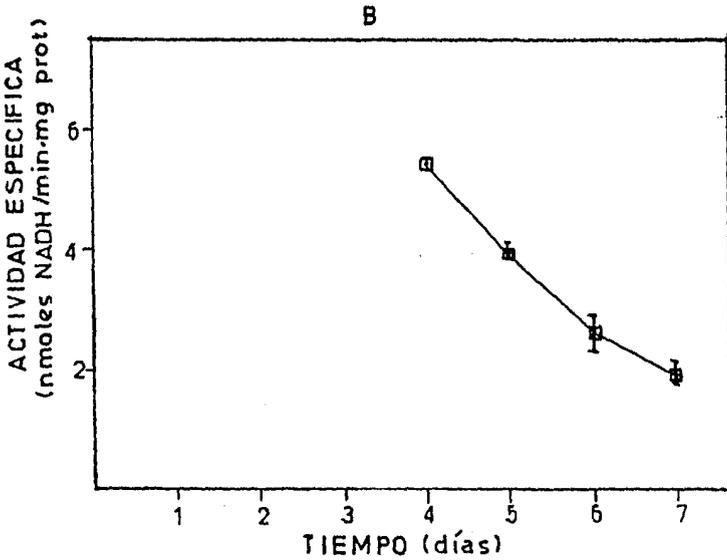
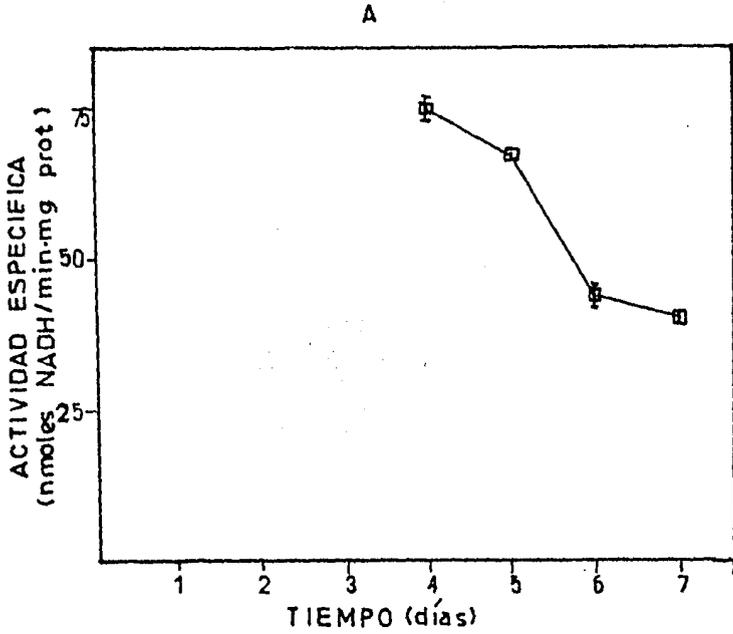


FIGURA 27 Actividad específica de glutamato deshidrogenasa (GDH) en hoja de Canavalia ensiformis L. A:aminativa B:desaminativa.

C A P I T U L O I V

CONCLUSIONES

El tallo es el tejido que muestra el mayor incremento en su tamaño y peso en el tiempo del estudio. La raíz es el tejido de menor incremento.

Los tejidos más abundantes en proteína son: los cotiledones en primer lugar y en segundo la hoja.

Como la poza de nitratos en el cotiledón es muy elevada, se podría pensar que éstos pueden ser transportados a otras partes de la planta para su posterior reducción a amonio y su incorporación en los aminoácidos. El tallo, de acuerdo a los resultados discutidos anteriormente, se propone como sitio de la reducción de los nitratos transportados desde el cotiledón.

Se considera la posibilidad de que el amonio producido por la ureasa del cotiledón sea transportado a la hoja

ya que la tendencia ascendente de esta poza conforme la planta se desarrolla, lo confirma.

El tejido que tiene mayor actividad de la GS fue la hoja y en segundo lugar el tallo. Ambos tienen patrones de actividad ascendentes durante el tiempo de estudio.

La actividad de la GS del cotiledón muestra ser la menor de los cuatro tejidos estudiados.

De los resultados discutidos anteriormente se concluye que el amonio liberado por la ureasa y por otras enzimas productoras de éste, es reasimilado en las hojas por la vía GS/GOGAT, debido a que la actividad de la GS en las hojas es la mayor de los cuatro tejidos.

En las raíces este amonio es reasimilado por la vía de la GDH, que adquiere en este tejido la mayor importancia a comparación de los restantes. Se concluye esto con mayor seguridad porque la GOGAT-NADH dependiente es muy baja comparada con la actividad de la GDH aminativa. La glutamina formada por la GS de la raíz no puede ser conectada directamente al metabolismo intermediario por la baja actividad de la GOGAT antes mencionada, pero podría ser utilizada en la síntesis de purinas, de triptófano, de arginina o de histidina o podría ser también una forma de almacenamiento de nitrógeno orgánico.

En el caso del tallo, durante los primeros días se propone que funcionan tanto la vía GS/GOGAT como la vía GDH, pero conforme la planta se desarrolla adquiere mayor importancia la vía GS/GOGAT.

Para los cotiledones se concluye que hay mayor transporte que metabolización de intermediarios debido a la baja actividad de las enzimas involucradas en la reasimilación del amonio, aunque se muestra a la vía GS/GOGAT como la más importante conforme los cotiledones maduran.

C A P I T U L O V

BIBLIOGRAFIA

- 1) Duke, J.A. Handbook of Legumes of World Economic Importance, 39-41 (1981).
- 2) Kessler, C. Reporte de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Kmatkuil, Yuc. (Julio 1983).
- 3) Stanislaus J., Kinghorn A.O. and Balandrin M.F. Toxic Constituents of Legume Forage Plants, Economy Botany 35, 321-355, (1981).
- 4) Vega A. y Sotelo A. Valor Nutritivo de la Semilla de Canavalia ensiformis sola y suplementada con metionina y cereales, Rev. 28, 92-96, (1982).
- 5) Cronquist, A. An Integrated System of Clasification of Flowering Plants, Columbia University Press. New York (1981).

- 6) Cronquist, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Houghton Mifflin, Boston (1968).
- 7) Lackey, J.A. Advances in Legume Systematics. Polhill, R.M. & P.H. Raven (eds), Royal Botanic Gardens, New England (1981).
- 8) Kitagawa, M. and Tomiyama, T. A new Amino-compound in the Jackbean and a Corresponding new Enzyme, J. Biochem. Tokio, 11, 265 (1929).
- 9) Birdsong, B.A., Alston, R. and Turner, B.L. Distribution of canavanine in the family Leguminosae as related to phyletic groupings, Can. J. Bot., 38, 499-505, (1960).
- 10) Kitagawa, M. J. Biochem. Tokio, 25, 23, (1937).
- 11) Damodaran, M. and Narayanan, K.G.A. The preparation of canavanine from Canavalia obtusifolia, Biochem. J. 33, 1740-1742, (1939).
- 12) Fearon, W.R. and Bell, E.A. Canavanine: detection and occurrence in Colutea arborescens, Biochem. J. 59, 221-224, (1955).

- 13) Bell, E.A. Canavanine and related Compounds in Leguminosae, *Biochem. J.* 70, 617-619, (1958).
- 14) Bell, E.A., Lackey, J.A. and Pohill, R.M. Sistematic significance of canavanine in the Papilionoideae (Faboideae), *Biochem. Ecol. Syst.* 6, 201-212, (1978).
- 15) Lackey, J.A. *Bot. J. Linn. Soc.* 74, 163, (1977).
- 16) Rosenthal, G.A. Plant Nonprotein amino and imino acids. Biological, biochemical and Toxicological Properties, Academic Press. New York (1982).
- 17) Rosenthal, G.A. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine, *Q. Rev. Biol.* 52, 155-158, (1977).
- 18) Allende, C.C. and Allende, J.E. Purification and substrate specificity of arginyl ribonucleic acid synthetase from rat liver, *J. Biol. Chem.* 239, 1102-1106, (1964).
- 19) Mitra, S.K. and Mehler, A.H. The arginyl transfer ribonucleic acid synthetase of Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* 242, 5490-5494, (1967).

- 20) Neurath, A.R., Wiener, F.P., Rubin, B.A. and Hartzell, R.J. Inhibition of adenovirus replication by canavanine, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1509-1517 (1970).
- 21) Schachtele, G.F. and Rogners P. Canavanine death in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 14, 474-489, (1965).
- 22) Mc Mahon, D. and Langstroth, P. The effects of canavanine and of arginine starvation on macromolecular synthesis in Chlamydomonas reinhardi, J. Gen. Microbiol. 73, 239-250, (1972).
- 23) Kruse, P.F., White, P.B., Carter, H.A. and Mc Coy, T.A. Incorporation of canavanine into protein of Walker carcinosarcoma 256 cells cultured in vitro, Cancer Res. 19, 122-125, (1959).
- 24) Dahlman, D.L. and Rosenthal, G.A. Non protein amino acid-insect interactions-I. Growth effects and symptomology of L-canavanine consumption by tobacco hornworm, Manduca sexta (L.), 51A, 33-36, (1975).
- 25) Maas, W.K. Studies on repression of arginine biosynthesis in Escherichia coli, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 185-191, (1961).

- 26) Greenstein, J.F. and Winitz, M. Chemistry of the amino acids Vol 1-3 Wiley, New York (1961).
- 27) Volcani, B.E. and Snell, E.E. The effect of arginine and related compounds on the growth of bacteria, J. Biol. Chem. 147, 803 (1948).
- 28) Walker, J.B. Canavanine and homoarginine as antimetabolites for arginine and lysine in yeast and algae, J. Biol. Chem. 212, 207-217 (1955).
- 29) Miedena, E. and Kruse, P.F. Effect of canavanine on proliferation and metabolism of human cells in vivo, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 1220-1222, (1966)
- 30) Kruse, P.F., Carter, H.A. and White, P.B. Some effects of canavanine and canaline on arginine and ornithine metabolism in mamalian tumor cell cultures Sci. Proc. Amer. Assn. Cancer Res. 3, 336, (1962).
- 31) Bell, E.A. Comparative biochemistry of non-protein amino acids. In: J.B. Harborne, B. Boulter and B.L. Turner eds. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, New York. 179-205 (1971).

- 32) Fouden, L. and Frankton, J.B. The specificity of aminoacyl-sRNA synthetases with special reference to arginine activation, *Phytochemistry* 7, 1077-1086, (1968).
- 33) Lea, P.J. and Norris, R.D. The use of amino acid analogues in studies of plant metabolism. *Phytochemistry* 15, 585-595, (1976).
- 34) Norris, R.D. and Lea, P.J. The use of amino acid analogues in biological studies, *Sci. Prog. Oxf.* 63, 65-85, (1976).
- 35) Weaks, T.E. Jr. Effects of canavanine on arginine utilization in plants with Special reference to mitotic activity. *Physiol. Plant* 31, 144-148, (1974).
- 36) Weakj, T.E. Jr. and Hunt, G.E. The effect of canavanine on the growth of isolated roots of four plant species, *Bot. Gaz.* 135, 45-49, (1974)
- 37) Wright, J.E. and Srb, A.M. Inhibition of growth in maize embryos by canavanine and its reversal, *Bot. Gaz.* 112, 52-57, (1950).
- 38) Aslam, M., Oaks, A., and Boesel, I. Effect of L-canavanine on nitrate reductase in corn roots, *Plant. Physiol.* 62, 693-695, (1978).

- 39) Schachtele, C.F., Anderson, D.L. and Rogers, P. Isolation of a rapidly-sedimenting canavanyl-protein-DNA-membrane complex from Escherichia coli, J. Mol. Biol. 49, 255-261, (1970).
- 40) Weaks, T.E. Jr. and Hunt, G.E. The effect of canavanine on protein and nucleic acid synthesis in canavanine resistant and sensitive species of higher plants Plant Physiol. 29, 421-424, (1973).
- 41) Ranki, M. and Kääräinen, L. Canavanine as an inhibitor of Semliki Forest virus growth, Ann. Med. Exp. Fenn. 47, 65-72, (1969).
- 42) Ranki, M. and Kääräinen, L. The effect of canavanine on Semliki Forest virus RNA synthesis, Ann. Med. Exp. Fenn. 48, 238-245, (1970).
- 43) Nonaka, H., Yoshii, J., Nakamura, R. and Tsunemitsu, A. The effects of human saliva and concanavalin A on the agglutination of oral streptococci, J. Gen. Microbiol. 81, 127-130, (1980).
- 44) Mirth, D.B., Miller, C.J., Kingman, A. and Bowen, W.H. Inactivation of salivary aggregating factors by concanavalin A and fucose binding protein, J. Dent. Res. 56, Special Issue B 75 Abstract 95 (1977).

- 45) Carlini, C.R. and Guimaraes, J.A. Isolation and characterization of a toxic protein from Canavalia ensiformis (Jackbean) seeds distinct from Concanavalin A, Toxicon 19, 667-676, (1981).
- 46) Sumerfield, R.J. and Bunting, A.H. Advances in legume science. University of Reading. England (1980).
- 47) Rosenthal, G.A. L-canavanine metabolism in Jackbean Canavalia ensiformis L. DC. (Leguminosae), Plant Physiol. 69, 1066-1069, (1982).
- 48) Thompson, J.F. Arginine synthesis, proline synthesis and released processes. In B.J. Milfin ed. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Academic Press, New York, Vol 5, 375-402, (1980).
- 49) Damodaran, M. and Narayanan, K.G.A. A comparative study of arginase and canavase, Biochem. J. 34, 1449-1459, (1940)
- 50) Rosenthal, G.A. Investigations of canavanine biochemistry in the Jackbean plant. Canavalia ensiformis (L.) DC. I Canavanine utilization in the developing plant Plant Physiol. 46, 273-276, (1970).

- 51) Sehgal, P.P., Naylor, A.W. Ontogenetic study of urease in Jack beans, Canavalia ensiformis (L.) DC. Bot. Gaz. 127, 27-34, (1966).
- 52) Rosenthal, G.A. J. Exp. Bot. 25, 609 (1974).
- 53) Töpfer, V.R., Miersch, J. and Reinbothe, H. Studies on canavanine degradation in Fabaceae, Biochem. Physiol. Pflanzen. 161, 231-242, (1970).
- 54) Johnstone, J.H. Nitrogen metabolism in Jack bean (Canavalia ensiformis), Biochem. J. 64, 21, (1956).
- 55) Kitagawa, M. and Yamada, H. J. Biochem. (Tokio) 16, 339, (1932).
- 56) Rosenthal, G.A. The biological and biochemical properties of L- canaline, a naturally occurring structural analogue of L-ornithine, Life Sci. 23, 93-98, (1978).
- 57) Kamer, A., Dahlman, D.L. and Rosenthal, G.A. Effects of the non-protein aminoacids L-canavanine and L-canaline on the nervous system of the moth, Manduca sexta L. J. Exp. Biol. 75, 123-132, (1978).

- 58) Rosenthal, G.A., Shyant, D.W., Gulaty, K. and Sabharwal, P.S. Studies on the growth. Effects of canaline-urea cycle aminoacids with Lemna minor L., Plant Physiol. 56, 420-424, (1975).
- 59) Kekomäki, M., Rahiala, E.-L. and Rähkä, N.C.R. Cana- line: interfering with ornithine metabolism in the isolated perfused rat liver, Ann. Med. Exp. Fenn. 47, 33-38, (1969).
- 60) Rosenthal, G.A. and Dahlman, D.L. 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. (Sphingidae), Comp. Biochem. Physiol. 52 A, 105-108, (1975).
- 61) Katunuma, H., Okada, H., Matsuzawa, T. and Otsuka, Y. Studies on ornithine ketoacid transaminase. II Role in metabolic pathway, J. Biochem. (Tokio) 57, 445-449, (1965).
- 62) Rahiala, E.-L., Kekomäki, M., Jänne, J., Raina, A. and Rähkä, N.C.R. Inhibition of pyridoxal enzymes by L-canaline, Biochim. Biophys. Acta 227, 337-343, (1971).

- 63) Rosenthal, G.A. A mechanism of L-canaline Toxicity. *Eur. J. Biochem.* **114**, 301-304, (1981).
- 64) Rahiala, E.-L. Canaline. Characterization of enzymic-pyridoxal phosphate complex, *Acta Chem. Scand.* **27**, 3861-3867, (1973).
- 65) Loyola, V.V.M., Murillo, G. y Sánchez, E. Metabolismo del nitrógeno en las plantas, *Naturaleza* **2**, 112-116, (1981).
- 66) Loyola, V.V.M. La fijación del nitrógeno, *Boletín de Educación Bioquímica* **2**, 16-23 (1983).
- 67) Gómez, N.I.G. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el metabolismo nitrogenado y el contenido de alcaloides de *Gatharantus roseus*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM (1984).
- 68) Loyola, V.V.M. Metabolismo nitrogenado en maíz. Tesis doctoral. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM (1983).
- 69) Boland, M.J., Farnden, K.J.F. and Robertson, J.G. Nitrogen fixation. Volume II. Symbiotic associations and cyanobacteria. W.E. Newton and W.H. Orm-Johnson eds. University Park Press, Baltimore (1980).

- 70) Boland, M.J. and Benny, A.G. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthetase from lupin nodules, *Eur. J. Biochem.* 79, 355-362, (1977).
- 71) Pahlich, E. and Joy, K.W. Glutamate dehydrogenase from pea roots: Purification and properties of the enzyme. *Can. J. Biochem.* 49, 127-138, (1971).
- 72) Lea, P.J. Fixation and assimilation of nitrogen from the atmosphere and combined sources. In *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. J. Coombs and D.O. Hall eds. First edition, Pergamon Press, New York (1981).
- 73) Lea, P.J. and Miflin, B.J. *The biochemistry of plants. A comprehensive Treatise Vol. 5* by B.J. Miflin. P.K. Stumpf and E.E. Conn eds. Academic Press, New York, (1980).
- 74) Warren, R.P. and Hunt, G.E. The biosynthesis of canavanine from $^{14}\text{CO}_2$ and its asymmetric labeling in isolated pericarp tissue of *Canavalia ensiformis*, *Planta* 100, 258-261, (1971).

- 75) Rosenthal, G.A. 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 (1972).
- 76) Joy, W.K. Control of glutamate dehydrogenase from Pisum sativum roots, *Phytochemistry* 12, 1031-1040, (1973).
- 77) Kanamori, T. and Matsumoto, H. Glutamine synthetase from rice plant roots, *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 404-412, (1972).
- 78) Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83, 346-356, (1977).
- 79) Cocking, E.C. and Yemm, E.W. Estimation of amino acids by ninhidrin, *Biochem. J.* 58, XII (1954).
- 80) Nicholas, D.E. and Nason, A.A. Determination of nitrate and nitrite, *Methods of Enzymology* 23, 491-503, (1971).
- 81) Kaplan, A. Determination of urea in blood, *Stand. Methods Clin. Chem.* 5254, (1965).

- 82) Robertson, J.G., Farnden, J.F., Wargurton, M.P. and Banks, J. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin, *Aust. J. Plant Physiol.* **2**, 263-272, (1975).
- 83) Mc Parland, R.H., Guevara, J.G., Becker, R.R. and Evans, H.J. The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of soy bean root nodules, *Biochem. J.* **153**, 597-606, (1976)
- 84) Mc Cormack et al. en Boland, M.J., Farnden, K.J.F. and Robertson, J.G. Nitrogen Fixation, volume II University Park Press, Baltimore (1980).
- 85) Ravel, J.M., Humphreys, J.S. and Shive, W. Control of glutamine synthesis in Lactobacillus arabinosus. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 720-726, (1965)
- 86) Deuel, T.F. and Stadtman, E.R. Some kinetic properties of Bacillus subtilis glutamine synthetase, *J. Biol. Chem.* **245**, 5206-5213, (1970).
- 87) Hirel, B. and Gadal, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzyme from roots and leaves, *Plant Physiol.* **66**, 619-623, (1980).

- 88) Hirel, B. and Gadal, P. Glutamine synthetase in a C₄ plant: Sorghum vulgare L. *Physiol. Plant* 54, 69-74, (1982).
- 89) Kretovich, W.L., Evstigneeva, Z.G., Pushkin, A.V. and Dzokharidze, T.Z. Two forms of glutamine synthetase in leaves of Cucurbita pepo, *Phytochemistry* 20, 625-629, (1981).
- 90) Mann, A.F., Fentem, P.A. and Sewart, G.R. Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (Hordeum vulgare L.), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 515-521, (1979).
- 91) Hirel, B., Perrot-Rechenmann, C., Suzuki, H., Vidal, J. Gadal, P. Glutamine synthetase in spinach leaves. Immunological studies and immuno-cytochemical localization *Plant. Physiol.* 69, 983-987, (1982).
- 92) Mc Nally, S.F. and Stewart, G.R. Modifications in the N-metabolism of Striga associated with its parasitic habit, *Plant Physiol.* 69, 105-110, (1982).
- 93) Suzuki, A. and Gadal, P. Glutamate synthetase from rice leaves, *Plant Physiol.* 69, 848-852, (1982).

- 94) Givan, C.V. Metabolic detoxification of ammonia in higher plants, *Phytochemistry* 18, 375-382, (1979).
- 95) Platt, S.G. and Anthon, G. Ammonia accumulation and inhibition of photosynthesis in methionine sulfoximine-treated spinach, *Plant Physiol.* 57, 509-513, (1981).
- 96) Gil'manov, M.K., Yakovleva, V.I. and Kretovich, V.L. Properties of corn seedling glutamate dehydrogenase, *Dokl. Akad. Nauk. SSR* 175, 947-951, (1967).
- 97) Micklisch, A. Beziehungen zwischen den muster multipler formen an der funktion der glutamatdehydrogenase beim Zea mays L. *Biochem. Physiol Pflanzen* 174, 80-84, (1979).
- 98) Yue, S.B. Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants, *Plant Physiol.* 44, 453-457, (1969).
- 99) Kretovich, V.L., Karayakina, T.I., Yasykova, V.V. and Sidel'nikova, L.I. Induction of glutamate dehydrogenase by ammonia in the roots of pumpkin seedlings, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 208, 571-573, (1973).

- 100) Alekhina, N.D. and Sokolova, S.A. Changes of glutamate dehydrogenase activity in connection with the temperature of plant cultivation, *Sov. Plant. Physiol.* 22, 79-83, (1985).
- 101) Jain, A. and Srivastava, N.S. Effect of salicylic acid on nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities in maize roots, *Physiol. Plant.* 53, 285-288, (1981).
- 102) Oaks, A., Stulen, I., Jones, K., Winspear, M.J., Migra, S. and Doesel, I.L. Enzymes of the nitrogen assimilation in maize roots, *Planta* 142, 477-484, (1980).
- 103) Bielawski, W. and Rafalski, A. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in rye seedlings supported with ammonium and nitrate, *Acta Biochem. Pol.* 26, 383-395, (1979)
- 104) Kanamori, T., Konishi, S. and Takahashi, E. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media, *Physiol. Plant.* 26, 1-6, (1972).

- 105) Loyola, V.V.M. and Sánchez de J.E. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues, *Plant Physiol.* 76, 536-540, (1984).
- 106) Mc Kenzie, E.A. and Lees, E.H. Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 290-297, (1981).
- 107) Shatilov, V.R. and Sund, H. Glutamate dehydrogenase of the unicellular green alga *Scenedesmos acutus*, *Planta* 157, 367-370, (1983).
- 108) Quetz, P.R., Tischner, R. and Lorenzen, H. Changes in the activity of enzymes involved in nitrogen metabolism in maize seedlings dependent on different nitrogen sources, *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 177, 567-576, (1982).
- 109) Singh, R.P. and Srivastava, H.S. Glutamate dehydrogenase activity and assimilation of inorganic nitrogen in maize seedlings, *Biochem. Physiol. Pflanzen* 177, 633-642, (1982).

- 110) Fawole, M.O. and Boulter, D. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from Vigna unguiculata (L.) walp. *Planta* 134, 97-102, (1977).
- 111) Stone, S.R., Copeland, L. and Kennedy, I.R. Glutamate dehydrogenase of lupin nodules: purification and properties, *Phytochemistry* 18, 1273-1278, (1979).
- 112) Leech, R.M. and Kirk, P.R. An NADP-dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of Vicia faba L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 685-690, (1969).
- 113) Gayler, K.R. and Morgan, W.R. An NADP-dependent glutamate dehydrogenase in chloroplasts from the marine green alga Caulerpa simpliciuscula, *Plant Physiol.* 58, 283-287, (1976).
- 114) Washitani, I. and Soto, S. Studies on the function of proplastids in the metabolism of in vitro cultured tobacco cells. I Localization of nitrite reductase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase, *Plant. Cell Physiol.* 18, 117-125, (1977).
- 115) Postius, Ch. Dissertation, University of Göttinger (1975).

- 116) Moore, A.L. and Akerman, K.E.O. Ca stimulation of the external NADH dehydrogenase in Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus) mitochondria, Biochem. Biophys. Res. Commun. 109(2), 513-517, (1982).
- 117) Nagel, M and Hartmann, T. Glutamate dehydrogenase from Medicago sativa L., purification and comparative kinetic studies on the organ-specific multiple forms, Z. Naturforsch 35c, 406-415, (1980).
- 118) Pahlich, E. and Hoffman, J. On the mechanism of action of glutamate dehydrogenase from pea seedlings and the regulation of the activity by adenosine phosphates, the energy charges and ions, Planta 122, 185-201, (1975).
- 119) Hartmann, T. Endogenously and exogenously caused alteration of the isoenzyme pattern of NAD-specific glutamic dehydrogenase in shoots in Pisum sativum, Planta, 111, 129-136, (1973).
- 120) Hartmann, T., Nagel, M. and Illert, H.J. Organspezifische multiple formen der glutamatdehydrogenase in Medicago sativa, Planta 111, 119-128, (1973).

- 121) Chou, Kuo-Howere and Splittstoesser, W.E. Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons, *Plant Physiol.* 49, 550-554, (1972).
- 122) Thurman, D.A., Palic, C. and Laycock, M.V. Isoenzymatic nature of L-glutamic dehydrogenase of higher plants, *Nature* 207, 193-194, (1965).
- 123) Román, G.M.E. Tesis de Licenciatura: Función de las enzimas ureasa y arginasa durante los primeros estadios del desarrollo de Canavalia ensiformis L. Facultad de Química, UNAM, en prensa (1985).
- 124) Caldera, H.J.B. Tesis de Licenciatura: Glutamate sintasa, una enzima fundamental en Canavalia ensiformis L. Facultad de Química, UNAM. En prensa (1985)

INDICE ALFABETICO DE AUTORES

A

Akerman, K.E.O.	Ver Moore, A.L.	Cita 116	1982
Alekhina, N.D.		100	1975
Allende, C.C.		18	1964
Allende, J.E.	Ver Allende, C.C.	18	1964
Alston, R.	Ver Birdsong, B.A.	9	1960
Anderson, D.L.	Ver Schachtele, C.F.	39	1970
Anthon, G.	Ver Platt, S.G.	95	1981
Aslam, M.		38	1978

B

Balandrin, M.F.	Ver Stanislaus, J	Cita 3	1981
Banks, J.	Ver Robertson, J.G.	82	1975
Becker, R.R.	Ver Mc Parland, R.H.	83	1976
Bell, E.A.		13	1958
		14	1978
		31	1971
Bell, E.A.	Ver Fearon, W.R.	12	1955
Benny, A.G.	Ver Boland, M.J.	70	1977
Bielawski, W.		103	1979
Birdsong, B.A.		9	1960
Boesel, I.	Ver Aslam, M.	38	1978
Boesel, I.L.	Ver Oaks, A.	102	1980

Boland, M.J.		Cita	69	1980
			70	1977
Boulter, D.	Ver Fawole, M.O.		110	1977
Bowen, W.H.	Ver Mirth, D.B.		44	1977
Bunting, A.H.	Ver Sumnerfield, R.J.		46	1980

C

Caldera, N.J.B.		Cita	124	1985
Carlini, C.R.			45	1981
Carter, H.A.	Ver Kruse, P.F.		23	1959
			30	1962
Chou, Kuo-Howere			121	1972
Cocking, E.C.			79	1954
Copeland, L.	Ver Stone, S.R.		111	1979
Cronquist, A.			5	1981
			6	1968

D

Dahlman, D.L.		Cita	24	1975
Dahlman, D.L.	Ver Kamer, A.		57	1978
Dahlman, D.L.	Ver Rosenthal, G.A.		60	1975
Damodaran, M.			11	1939
			49	1940
Deuel, T.F.			86	1970
Duke, J.A.			1	1981
Dzokharidze, T.Z.	Ver Kretovich, V.L.		89	1981

E

- Evans, H.J. Ver Mc Parland, R.H. Cita 83 1976
 Evstigneeva, Z.G. Ver Kretovich, V.L. 89 1981

F

- Farnden, K.J.F. Ver Boland, M.J. Cita 69 1980
 Farnden, K.J.F. Ver Robertson, J.G. 82 1975
 Fawole, M.O. 110 1977
 Fearon, W.R. 12 1955
 Fentem, P.A. Ver Mann, A.F. 90 1979
 Fouden, L. 32 1968
 Frankton, J.B. Ver Fouden, L. 32 1968

G

- Gadal, P. Ver Hirel, B. Cita 87 1980
 88 1982
 91 1982
 Gadal, P. Ver Suzuki, A. 93 1982
 Gayler, K.R. 113 1976
 Gil'manov, M.K. 96 1967
 Givan, C.V. 94 1979
 Gómez, N.I.G. 67 1984
 Greenstein, J.F. 26 1961
 Guevara, J.G. Ver Mc Parland, R.H. 83 1976
 Guimaraes, J.A. 45 1981
 Gulaty, K. Ver Rosenthal, G.A. 58 1975

H

Hartmann, T.		Cita 119	1973
		120	1973
Hartmann, T.	Ver Nagel, M.	117	1980
Hartzell, R.W.	Ver Neurath, A.R.	20	1970
Hirel, B.		87	1980
		88	1982
		91	1982
Hoffman, J.	Ver Pahlich, E.	118	1975
Humphreys, J.S.	Ver Ravel, J.M.	85	1962
Hunt, G.E.	Ver Warren, R.F.	74	1971
Hunt, G.E.	Ver Weeks, T.E. Jr.	36	1974
		40	1973

I

Illert, H.J.	Ver Hartmann, T.	Cita 120	1973
--------------	------------------	----------	------

J

Jain, A.		Cita 101	1981
Jänne, J.	Ver Rahiala, E.-L.	62	1971
Johnstone, J.H.		54	1956
Jones, K.	Ver Caks, A.	102	1980
Joy, K.W.		76	1973
Joy, K.W.	Ver Pahlich, E.	71	1971

K

Kääräinen, L.	Ver Ranki, M.	Gita 41	1969
		42	1970
Kaner, A.		57	1978
Kanamori, T.		77	1972
		104	1972
Kaplan, A.		81	1965
Karayakina, T.I.	Ver Kretovich, V.L.	99	1973
Katunmaa, N.		61	1965
Kekomäki, M.		59	1969
Kekomäki, M.	Ver Rahiala, E.-L.	62	1971
Kenedy, I.R.	Ver Stone, S.R.	111	1979
Kessler, C		2	1983
Kinghorn, A.O.	Ver Stanislaus, J.	3	1981
Kingman, A.	Ver Mirth, D.B.	40	1977
Kirk, P.R.	Ver Leech, R.M.	112	1969
Kitagawa, M.		8	1929
		10	1937
		55	1932
Konishi, S.	Ver Kanamori, T.	104	1972
Kretovich, V.L.		89	1981
		99	1973
Kretovich, V.L.	Ver Gil'manov, M.K.	96	1967
Kruse, P.F.		23	1959
		30	1962
Kruse, P.F.	Ver Miedena, E.	29	1966

L

Lackey, J.A.		Cita	7	1981
			15	1977
Lackey, J.A.	Ver Bell, E.A.		14	1978
Langsttroth, P.	Ver Mc Mahon, D.		22	1972
Laycock, E.V.	Ver Thurman, D.A.		122	1965
Lea, P.J.			33	1976
			72	1971
			73	1980
Lea, P.J.	Ver Norris, R.D.		34	1976
Leech, R.M.			112	1969
Lees, E.M.	Ver Mc Kenzie, E.A.		106	1981
Loyola, V.V.M.			65	1981
			66	1984
			68	1983
			105	1984
Lorenzen, H.	Ver Quetz, P.R.		108	1982

M

Maas, W.K.		Cita	25	1961
Mann, A.F.			90	1979
Matsumoto, H.	Ver Kanamori, T.		77	1972
Matsuzawa, T.	Ver Katunumm, N.		61	1965
Mc Cormack, et al.			84	1980
Mc Coy, T.A.	Ver Kruse, P.F.		23	1959
Mc Kenzie, E.A.			106	1981

Mc Mahon, D.		Cita	22	1972
Mc Nally, S.F.			92	1982
Mc Parland, R.H.			83	1976
Mehler, A.H.	Ver Mitra, S.K.		19	1967
Miedena, E.			29	1966
Miersch, J.	Ver Töpfer, V.R.		53	1970
Mifflin, B.J.	Ver Lea, P.J.		73	1980
Miller, C.J.	Ver Mirth, D.B.		44	1977
Mirth, D.B.			44	1977
Misra, S.	Ver Oaks, A.		102	1980
Mitra, S.K.			19	1967
Moore, A.L.			116	1982
Morgan, W.R.	Ver Gayler, K.R.		113	1976
Murillo, G.	Ver Loyola, V.V.M.		65	1981

N

Nagel, M.		Cita	117	1980
Nagel, M.	Ver Hartmann, T.		120	1973
Nakamura, R.	Ver Nonaka, H.		43	1980
Narayanan, K.G.A.	Ver Damodaran, M.		11	1939
			49	1940
Nason, A.A.	Ver Nicholas, D.E.		80	1971
Naylor, A.W.	Ver Sehgal, P.P.		51	1966
Neurath, A.R.			20	1970
Nicholas, D.E.			80	1971
Nicklisch, A.			97	1979
Nonaka, H.			43	1980

Norris, R.D.		Cita	34	1976
Norris, R.D.	Ver Lea, P.J.		33	1976

O

Oaks, A.		Cita	102	1980
Oaks, A.	Ver Aslan, M.		38	1978
Okada, H.	Ver Katunuma, M.		61	1965
Otsuka, Y.	Ver Katunuma, M.		61	1965

P

Pahlich, E.		Cita	71	1971
			118	1975
Palic, C.	Ver Thurman, D.A.		122	1965
Perrot-R.C.	Ver Hirel, B.		91	1982
Peterson, G.L.			78	1977
Flatt, S.G.			95	1981
Pohill, R.M.	Ver Bell, E.A.		14	1978
Postius, C.			115	1975

Q

Quetz, P.R.		Cita	108	1982
-------------	--	------	-----	------

R

Rafalski, A.	Ver Bielawski, W.	Cita	103	1979
Räihä, N.C.R.	Ver Kekonäki, M.		59	1969
Räihä, N.C.R.	Ver Rahiala, E.-L.		62	1971

Rahiala, E.-L.		Gita	62	1971
			64	1973
Rahiala, E.-L.	Ver Kekonäki, M.		59	1969
Raina, A.	Ver Rahiala, E.-L.		62	1971
Ranki, M			41	1969
			42	1970
Ravel, J.M.			85	1962
Reinbothe, H.	Ver Töpfer, V.R.		53	1970
Robertson, J.G.	Ver Boland, M.J.		69	1980
Rogers, P.	Ver Schachtele, C.F.		21	1965
			39	1970
Román, G.M.E.			123	1985
Rosenthal, G.A.			16	1982
			17	1977
			47	1982
			50	1970
			52	1974
			56	1978
			58	1975
			60	1975
			63	1981
			75	1972
Rosenthal, G.A.	Ver Dahlman, D.L.		24	1975
Rrivastava, H.S.	Ver Singh, R.P.		109	1982
Rubin, B.A.	Ver Neurath, A.R.		20	1970

S

Sabharwal, P.S.	Ver Rosenthal, G.A.	Cita	58	1975
Sánchez de J.E.	Ver Loyola, V.V.M.		65	1981
			66	1984
Schachtele, C.F.			21	1965
			39	1970
Sehgal, P.P.			51	1966
Shatilov, V.R.			107	1983
Shive, H.	Ver Ravel, J.M.		85	1962
Shyant, D.W.	Ver Rosenthal, G.A.		58	1975
Sidel'nikova, L.I.	Ver Kretovich, V.L.		99	1973
Singh, R.P.			109	1982
Snell, E.E.	Ver Volcani, B.E.		27	1948
Sokolova, S.A.	Ver Alekhina, N.D.		100	1975
Sotelo, A.			4	1982
Soto, S.	Ver Washitani, I.		114	1977
Splittstoesser, W.R.	Ver Chou, Kuo-Howere		121	1972
Srb, A.M.	Ver Wright, J.E.		37	1950
Srivastava, N.S.	Ver Jain, A.		101	1981
Stadtman, E.R.	Ver Deuel, T.F.		86	1970
Stanislaus, J.			3	1981
Stewart, G.R.	Ver Mann, A.F.		90	1979
Stewart, G.R.	Ver Mc Nally, S.F.		92	1982
Stone, S.R.			111	1979
Stulen, I.	Ver Oaks, A.		102	1980

Sumerfield, R.J.		Cita	46	1980
Sund, H.	Ver Shatilov, V.R.		107	1983
Suzuki, A.			93	1982
Suzuki, A.	Ver Hirel, B.		91	1982

T

Takahashi, E.	Ver Kanamori, T.	Cita	104	1972
Thompson, J.F.			48	1980
Thurman, D.A.			122	1965
Tischner, R.	Ver Quetz, P.R.		108	1982
Tomiyama, T.	Ver Kitagawa, M.		8	1929
Töpfer, V.R.			53	1970
Tsunenitsu, A.	Ver Nonaka, H.		43	1980
Turner, B.L.	Ver Birdsong, B.A.		9	1960

U

V

Vega, A.		Cita	4	1982
Vidal, J.	Ver Hirel, B.		91	1982
Volcani, B.E.			27	1948

W

Walker, J.B.		Cita	28	1955
Warburton, M.P.	Ver Robertson, J.G.		82	1975
Warren, R.F.			74	1971

Washitani, I.		Cita 114	1977
Weeks, T.E. Jr.		35	1974
		36	1974
		40	1973
White, P.B.	Ver Kruse, P.F.	23	1959
		30	1962
Wiener, F.P.	Ver Neurath, A.R.	20	1970
Winitz, M.	Ver Greenstein, J.F.	26	1961
Winspear, M.J.	Ver Caks, A.	102	1980
Wright, J.E.		37	1950

X

Y

Yakovleva, V.I.	Ver Gil'manov, M.K.	Cita 96	1967
Yamada, H.	Ver Kitagawa, M.	55	1932
Yazykova, V.V.	Ver Kretovich, V.L.	99	1973
Yenn, E.W.	Ver Cocking, E.C.	79	1954
Yoshii, J.	Ver Nonaka, H.	34	1980
Yue, S.B.		98	1969

Z