



24/119

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO DEL METABOLISMO NITROGENADO DURANTE EL
CICLO DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE TEJIDOS DE
Canavalia ensiformis L."

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

MARIA DEL ROCIO SASIAN ALVARADO



México, D. F.

1987

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



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

RESUMEN	5
ANTECEDENTES	6
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	36
DISCUSION Y CONCLUSION	59
LITERATURA CITADA	64

R E S U M E N

Con el fin de determinar el mecanismo por el cual los cultivos de tejidos de Canavalia ensiformis manejan su nitrógeno, se midió la actividad enzimática de ureasa y arginasa y en algunos casos las pozas metabólicas de amonio, urea, nitratos, nitritos y clorofila en cultivos de tejidos de esta planta crecidos en medios conteniendo una mezcla de nitratos y amonio, arginina o urea como fuente de nitrógeno y en condiciones de oscuridad e iluminación. Con excepción de los cultivos crecidos en medios conteniendo arginina, en todos los casos se detectó actividad enzimática de arginasa, siendo la actividad específica máxima detectada de 142 unidades. En ninguno de los casos se detectó actividad enzimática de ureasa, observándose una acumulación en la poza metabólica de urea a lo largo del ciclo de crecimiento de estos cultivos. Se concluye que la vía arginasa-ureasa que opera en la planta para el metabolismo de la canavanina, no está presente en los cultivos de tejidos de Canavalia ensiformis.

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

I

Canavalia ensiformis : generalidades

La familia de las leguminosas está constituida por más de 550 géneros y aproximadamente 1500 especies de plantas, de éstas un número muy limitado es cultivado y empleado con fines alimenticios.

Canavalia ensiformis es una planta que pertenece a la familia de las leguminosas, subfamilia : Papilionaceae (Lo toideae, Fabaceae), género : Canavalia, especie : ensiformis.

Canavalia ensiformis es originaria de América Central, se le conoce con los nombres comunes de jack bean y alberjón, crece en forma de un pequeño arbusto y presenta comportamiento anual, si se siembra al inicio de las lluvias en mayo o junio, empieza a florear en agosto y las vainas empiezan a madurar en diciembre. La semilla que produce es grande y de color blanco (17).

Esta planta puede cultivarse en climas tropicales, bajo riego de temporal, en suelos rocosos y alcalinos (pH 7.5 - 8.0). En parcelas experimentales se han obtenido rendimientos de 2600 Kg/Ha con un promedio de 9 vainas por planta, 8 semillas por vaina y con un peso de 1.65 g por semilla. En cultivos extensivos se ha obtenido un rendimiento de 2500 Kg/Ha, durante estas pruebas se observó que el porcentaje de germinación era de 90 aproximadamente (17).

Canavalia ensiformis produce una gran cantidad de biomasa, 230 días después de la siembra la planta produce alrededor de 2500 Kg/Ha de materia seca, de la cual la mitad corresponde a las vainas y semillas (17).

La siembra de C. ensiformis no implica problemas de transferencia de tecnología, ya que las prácticas de campo para su cultivo son básicamente iguales que las del maíz. Esta leguminosa es menos sensible que el maíz a plagas y se quías, por el tamaño de sus semillas se presta para la siembra, cosecha y desgrane manual (17).

Comparando los rendimientos máximos obtenidos bajo iguales condiciones, se tienen para el maíz 1000 Kg/Ha de grano con un contenido proteínico del 10% y para canavalia 2500 Kg/Ha de grano con un contenido del 29.5% de proteína (17).

El grano de esta leguminosa representa una fuente valio-

sa de proteína y energía. Los valores promedio del análisis proximal en base seca son : extracto etéreo 19 g/Kg, proteína cruda 295 g/Kg, extracto libre de nitrógeno 571 g/Kg, fibra cruda 90 g/Kg y cenizas 25 g/Kg (22).

Este grano es también una fuente importante de minerales y cuenta con un alto contenido de fósforo (22).

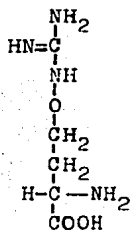
Aunque algunos autores sugieren que los carbohidratos no estructurales de los granos de las leguminosas no son bien utilizados en animales monogástricos (4), existen datos que indican que los carbohidratos de la canavalia son susceptibles de ser utilizados como fuente energética (19). y que el almidón de este grano debe ser similar en valor nutritivo al almidón de otras leguminosas (16).

El contenido de aminoácidos de la proteína de la semilla de Canavalia ensiformis es similar al de la pasta de soya, pero con un contenido un poco menor de lisina y como muchas leguminosas, es pobre en aminoácido azufrados (22).

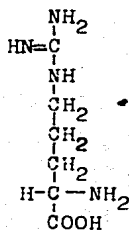
No obstante sus cualidades alimenticias, el empleo de este grano para la alimentación humana o animal se ve severamente restringido debido a la presencia de diversos factores antinutricionales. Además de una alta actividad ureásica se encuentran presentes inhibidores de tripsina y quimotripsina, factores comunes en las leguminosas. Asimismo C.

ensiformis contiene las lectinas concanavanina A y B, y los aminoácidos tóxicos canavanina y canalina (8). De estos tóxicos todos son susceptibles al calor o a la extracción acuosa, sin embargo dadas las altas temperaturas de descomposición de la L-canavanina (184°C) y de la L-canalina (204°C), sólo se ha logrado la detoxificación parcial de la semilla al someterla a tratamientos fisicoquímicos (121°C, 1 lb/plg², 60 min), sin resultados exitosos en términos de comportamiento animal (5).

La L-canavanina (ácido 2-amino 4-guanidinoxi butírico) es un aminoácido no protéico, análogo estructural de la L-arginina, en la semilla de C. ensiformis constituye aproximadamente el 5% del peso seco y el 90% del nitrógeno libre (27).



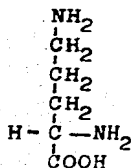
L-canavanina



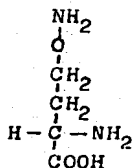
L-arginina

Este aminoácido exhibe potentes propiedades antimetabólicas sobre una gran variedad de organismos que van desde virus y procariotes hasta animales (26). Se ha observado que la L-canavanina puede interferir con las enzimas involucradas en la síntesis de arginina (19), puede competir con este aminoácido en las reacciones que lo utilizan como sustrato (9), además puede inhibir a las enzimas que utilizan sustratos que tienen relación estructural con la arginina, la canavanina puede ser tomada por la arginil- ARNtasa e incorporada a las cadenas polipeptídicas, dando lugar a proteínas con alteraciones estructurales y funcionales (12, 33).

La L- canalina (ácido 2-amino 4-aminobutírico) es un análogo estructural de la L-ornitina, es producido por la hidrólisis de la L-canavanina mediada por arginasa (11).



L-ornitina



L-canalina

Este aminoácido es un agente neurofarmacológico en ciertas especies (14) y se sabe que inhibe a las enzimas que utilizan como cofactor al fosfato de piridoxal dada su habilidad para formar con este último una base de Schiff (29).

La L-canavanina se ha detectado en aproximadamente 500 especies de leguminosas (26), la ocurrencia de este aminoácido está restringida a la subfamilia Papilionaceae (2).

Se ha propuesto que la presencia de la L-canavanina representa una ventaja adaptativa para la planta, haciéndola menos susceptible al ataque de depredadores, además de que este aminoácido funciona como un metabolito de reserva de nitrógeno (6).

Canavanina : ontogenia

En Canavalia ensiformis la síntesis de la canavanina comienza durante la germinación, con la primera hoja que emerge del embrión (27). Durante la maduración de la semilla, la canavanina es sintetizada en las hojas, vaina e incluso en el pericarpio y es transportada de las hojas y la vaina a la semilla (28).

Se ha propuesto que la síntesis de aminoácidos no proteicos se debe a una alteración en el gen responsable de dirigir la síntesis de los aminoácidos cruciales (10). Dada la analogía estructural entre la arginina y la canavanina, es posible pensar que la vía para la síntesis de la canavanina surgió de una modificación del ciclo ornitina-urea para la síntesis de la arginina (27). Se ha reportado en estudios realizados en C. ensiformis la capacidad de las enzimas del ciclo ornitina-urea para metaboli-

zar a la canavanina y a los intermediarios correspondientes (27). Así, se ha propuesto la existencia de una vía canalina-urea para la síntesis de canavanina, cuya principal diferencia con el ciclo ornitina-urea radica en los intermediarios (figura 1). Todas las enzimas involucradas en este ciclo han sido aisladas de C. ensiformis y otras plantas superiores (36).

Dada la abundancia de L-canavanina en muchas semillas, su rápido consumo durante la germinación, así como su alto contenido de nitrógeno y la elevada relación N/C, se ha considerado a este aminoácido como un metabolito de reserva (3). Estudios realizados en C. ensiformis, revelan que la movilización del nitrógeno almacenado en el grupo guanidinoxi de la canavanina se realiza por la acción hidrolítica de la arginasa (Ec. 3.5.3.1) formando canalina y urea, con la producción posterior de amonio y bióxido de carbono por la acción hidrolítica de la ureasa (Ec. 3.5.1.5) sobre la urea (27). El amonio liberado representa una importante fuente de nitrógeno reducido que es asimilado e incorporado a la biosíntesis de los aminoácidos (30).

Se ha demostrado que la L-canavanina es transportada de los cotiledones a las regiones en crecimiento de la nueva planta (30). Con base en estudios realizados en C. ensi-

formis durante los primeros días de su desarrollo, se ha propuesto un modelo para el transporte y la utilización de este aminoácido (figura 2).

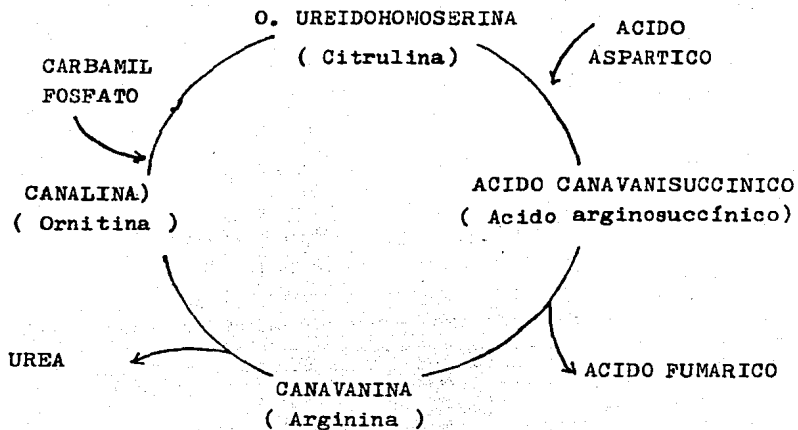


FIGURA 1. Metabolismo de la canavanina dentro del ciclo análogo de Krebs-Henseleit ornitina-urea (según Fowden, Lea y Bell 1979).

Los metabolitos indicados en paréntesis son los del ciclo convencional Krebs-Henseleit.

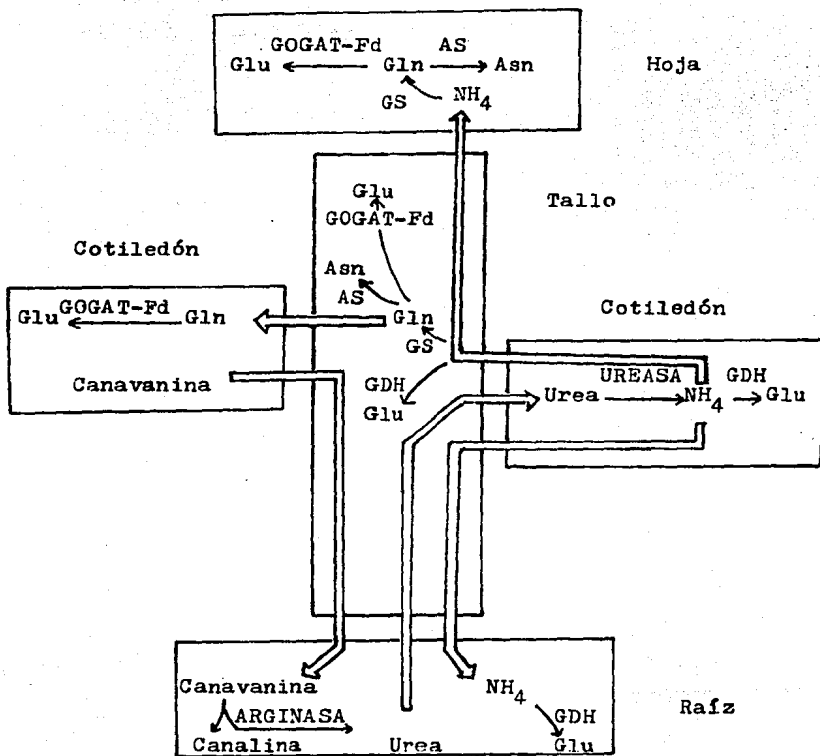


FIGURA 2. Modelo propuesto para el metabolismo nitrogenado en plantas de *C. ensiformis* de 7 días. GOGAT-Fd, glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina; AS, asparagino sintetasa; GDH, deshidrogenasa glutámica (31).

Canavalia ensiformis : cultivo de tejidos

El término "Cultivo de tejidos vegetales" se refiere de una manera muy amplia al cultivo in vitro de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un tejido u órgano, bajo condiciones asépticas. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una poderosa herramienta para estudios básicos y problemas aplicados en biología experimental, ya que presentan aspectos únicos y ventajas sobre el uso de plantas completas. Los cultivos de tejidos vegetales presentan poblaciones consistentes de un número limitado de genotipos, tienen células sin división de labores ni sistemas de transporte, se pueden mantener libres de microorganismos y asimismo pueden someterse a una gran variedad de condiciones ambientales y nutricionales. Estas ventajas representan una simplificación de los siste-

mas existentes en las plantas completas ya que eliminan muchos aspectos de la compleja organización y especialización de éstas. Los estudios con cultivos de tejidos pueden contestar un gran número de preguntas concernientes al metabolismo general de las plantas y no al de una célula específica o tipo celular localizado. La habilidad de las células de algunas especies aisladas en cultivo de tejidos de producir plantas completas, representa una evidencia circunstancial que demuestra que todo el genoma original de la planta está representado en las células en cultivo (18).

El cultivo de tejidos vegetales podría representar una valiosa herramienta para la obtención de mutantes de C. ensiformis que no sintetizen L- canavanina. Actualmente el cultivo de tejidos de esta planta se encuentra bien establecido (25), no obstante para poder ser empleado en la obtención de mutantes se requiere primeramente conocer su metabolismo nitrogenado.

Como un intento inicial para conocer el mecanismo por el cual los cultivos de tejidos de Canavalia ensiformis manejan su nitrógeno, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad enzimática de arginasa y de ureasa así como las pozas metabólicas durante el ciclo de

crecimiento de estos cultivos en diferentes fuentes nitro
genadas y en condiciones de obscuridad e iluminación.

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

Los cultivos de tejidos empleados en este trabajo fueron aportados por el Centro de Investigación Científica de Yucatán, se obtuvieron de anteras de C. ensiformis y fueron mantenidos en medio de Linsmeyer y Skoog, bajo luz continua (5000 lux) a 28°C (25).

Para los experimentos de enverdecimiento, los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad dos meses antes de su utilización (cultivos no fotosintéticos).

Los medios de cultivo empleados en las curvas de crecimiento fueron el de Linsmeyer y Skoog gelificado con 0.8% de agar y el de Linsmeyer y Skoog gelificado como se menciona y en el cual la fuente original de nitrógeno, una mezcla de nitratos y amonio, fue sustituida por arginina 1 y 5 mM o urea 5 mM, este último se utilizó además adicionado de 1 mg/l de cloruro de níquel.

Em medio de Linsmeyer Skoog se preparó partiendo de las siguientes soluciones de nutrientes :

Solución A;	NH_4NO_3 ...	150 mM	
	KNO_3	415 mM	
	KH_2PO_4	36 mM	50.0 ml/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	72 mM	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	32 mM	
Solución B;	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 mM	5.0 ml/l
	EDTA	25 mM	
Solución C;	MnSO_4	17 mM	
	ZnSO_4	5.5 mM	5.0 ml/l
	H_3BO_3 ...	14 mM	
Solución D;	KI	10 mM	
	Na_2MoO_4 .	3.4 mM	0.5 ml/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.72 mM	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.75 mM	
Solución E;	Tiamina ...	3.7 mM	1.0 ml/l
Solución F;	Piridoxina.	5.9 mM	0.5 ml/l
Solución G;	Inositol	138 mM	10.0 ml/l
Solución H;	Bencilaminopurina	4.6 mM	5.0 ml/l

Para cada litro de medio de cultivo se adicionaron, a un volumen aproximado de 500 ml de agua destilada, los volúmenes indicados de cada solución, el pH fue ajustado a 5.8 con HCl diluido, se adicionaron 25 g de sacarosa y el volumen se aforó a 1000 ml, a la solución resultante se le añadieron 8 g de agar y se calentó, con agitación, hasta que el agar se fundió completamente. Este medio de cultivo se vertió en tubos de fondo plano los cuales se taparon con papel aluminio, posteriormente se esterilizaron en autoclave manteniendo una presión de 1 Kg/cm^2 (121°C) durante 15 minutos y se guardaron en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Los medios de cultivo en los cuales se sustituyó la fuente de nitrógeno por arginina o urea se prepararon como se menciona para el medio de Linsmeyer Skoog, sustituyendo en la solución A al nitrato de amonio por arginina o urea respectivamente. El nitrato de potasio fue sustituido por la cantidad equivalente en peso de cloruro de potasio, con el fin de mantener constante el equilibrio de potasio. El medio con urea, conteniendo además níquel, se preparó de la misma manera excepto que se adicionó junto con las soluciones indicadas 1 ml de una solución de cloruro de níquel conteniendo 1 mg del reactivo. Con el fin de evitar la de-

gradación de la arginina o de la urea, los medios de cultivo que contenían estos compuestos fueron esterilizados a través de una membrana de 0.22 μ .

El manejo de los cultivos se realizó en forma aseptica en campana de flujo laminar.

Para las curvas de crecimiento se colocaron 0.2 g del cultivo en cada uno de los tubos conteniendo 8 ml del medio de cultivo estéril y se mantuvieron en un cuarto de crecimiento bajo luz continua a 28°C. Para cada curva se prepararon 80 tubos y se tomaron muestras por triplicado a partir del inicio, con intervalos de dos días, las muestras fueron pesadas y congeladas a -70°C hasta su posterior procesamiento.

Para la determinación del crecimiento acumulado de los cultivos, se procedió como para las curvas de crecimiento, excepto que se efectuaron resiembras de los cultivos cada 18 días y las muestras fueron tomadas entre cada resiembra.

Para los experimentos realizados en la oscuridad, las condiciones fueron las mismas que para las curvas de crecimiento, manteniendo los cultivos al abrigo de la luz.

Para la preparación de los extractos enzimáticos, el tejido congelado fué molido en un mortero frío con una can-

tividad de polivinilpirrolidona equivalente al 5% en peso del tejido y con 2.5 ml de solución tampón de extracción (KH_2PO_4 200 mM pH 7.5) por gramo de tejido. El extracto resultante se filtró a través de gasa, el filtrado se centrifugó a 18000 rpm durante 30 minutos a 4°C , el sobrenadante fue separado y en éste se realizaron las determinaciones de las actividades enzimáticas, de proteínas, de p_gzas metabólicas y de clorofila.

La determinación de la actividad enzimática de la urea se realizó por el método propuesto por Hogan et al (13) modificado en el presente trabajo. La actividad se midió por la cuantificación del amonio liberado, a través del método espectrofotométrico del indofenol (15).

La reacción enzimática se llevó a cabo a 28°C en un medio constituido por 1.7 ml de solución tampón KH_2PO_4 100 mM pH 7.5 y por 0.1 ml de extracto enzimático. La reacción se inició con la adición de 0.2 ml de una solución de urea 200 mM. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con la adición de 0.3 ml de ácido tricloroacético al 30%, una vez detenida la reacción, para neutralizar el medio se adicionaron 0.32 ml de solución de NaOH 2 M + KH_2PO_4 250 mM. Para cada extracto la mezcla de reacción se incubó por períodos de 5, 10 y 20 minutos.

Para la cuantificación del amonio liberado se adicionaron a la mezcla de reacción 5 ml de solución de fenol 0.106 M + nitroprusiato de sodio 0.17 mM y 5 ml de solución de NaOH 0.125 N + NaClO_4 11 mM. Después de 30 minutos para el desarrollo de color, la reacción se midió espectrofotométricamente a 570 nm. Cada muestra se comparó contra un blanco que se preparó adicionando el ácido tricloroacético antes que la urea a la mezcla de reacción.

Para la interpolación de los datos de absorbancia se empleó una curva patrón de amonio (gráfica 1) la cual se preparó sustituyendo en la mezcla de reacción al extracto enzimático por diferentes volúmenes de solución de cloruro de amonio 1 mM.

La velocidad de reacción se expresó como micromoles de amonio formados por minuto. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de amonio por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad específica se definió como unidades de enzima por microgramo de proteína total.

La actividad enzimática de la arginasa se determinó según el método propuesto por Roubelakis Kliewer (32) para Vitis vinifera L. en el cual se cuantifica la ornitina presente en la mezcla de reacción. La ornitina fue cuantifica

da a través del método colorimétrico de Chinard modificado por Roubelakis Kliewer (7).

La reacción enzimática se llevó a cabo a 38°C en un medio constituido por 1.3 ml de solución tampón de tris 100 mM pH 9.7, 0.1 ml de $MnCl_2 \cdot 5H_2O$ 10 mM y por 0.1 ml de extracto enzimático. La reacción se inició con la adición de 1 ml de solución de arginina 50 mM pH 9.7 y transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo al adicionar 2 ml de $HClO_4$ al 7%. Para cada extracto la mezcla de reacción se incubó por períodos de 5, 10 y 20 minutos.

Para la cuantificación de la L-ornitina liberada en la reacción, se tomó una alícuota de 0.2 ml de la mezcla de reacción y se llevó a 1 ml con agua desionizada, se adicionaron 2 ml de ácido acético glacial y 1 ml de solución de ninhidrina (25 g/ml en una mezcla de ácido acético, ácido fosfórico y agua en relación 3:1:1, v/v), se calentó a ebullición en baño maría por 30 minutos para el desarrollo del color, transcurrido este tiempo los tubos se enfriaron en agua y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 515 nm. Los blancos para cada una de las muestras se prepararon como se indicó, adicionando el ácido perclórico antes que la arginina a la mezcla de reacción.

Los datos de absorbancia fueron interpolados en una

curva patrón de L-ornitina (gráfica 2).

La velocidad de reacción se expresó como milimoles de L-ornitina formados por minuto. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un milimol de L-ornitina por minuto bajo las condiciones de la reacción. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína total.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Peterson (23). 0.1 ml de extracto enzimático fueron llevados a un volumen total de 1 ml con agua desionizada, se adicionó 0.1 ml de solución de desoxicolato de sodio al 1% , se mezcló y se dejó reposar en hielo durante 15 minutos, pasado este tiempo se adicionó 0.1 ml de ácido tricloroacético al 72% frío, se mezcló y se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante fue descartado y la pastilla se disolvió en 1 ml de agua y 1 ml de una solución constituida por partes iguales de agua, dodecilo sulfato de sodio al 10%, NaOH 0.8 N, y una mezcla de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% + tartrato de potasio al 2% + Na_2CO_3 al 10%. Esta mezcla se agitó y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, se agregaron después 0.5 ml del reactivo de Polin-Ciocalteau diluido 1:6 v/v con agua destilada y se dejó desarrollar color por 30 minutos, las mues -

tras fueron leídas a 750 nm contra los blancos correspondientes, los cuales contenían todos los reactivos mencionados excepto el extracto diluido. Los datos de absorbancia fueron interpolados en una curva patrón de albúmina sérica bovina (gráfica 3).

Para la cuantificación de la poza de amonio se utilizó el método del indofenol anteriormente descrito (15). 0.1 ml de extracto se llevaron a un volumen final de 2,32 ml con agua desionizada y se determinó la cantidad de amonio presente en esta dilución, de manera simultánea se preparó una curva patrón de amonio (gráfica 4) empleando diferentes volúmenes de solución de cloruro de amonio 1 mM que fueron completados a 2.32 ml con agua desionizada.

La determinación de la poza de urea se realizó a través de la cuantificación del amonio liberado por la enzima ureasa al hidrolizar la urea presente en los extractos. 0.1 ml de muestra se llevaron a un volumen de 2.22 ml con solución tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 y se agregó 0.1 ml de solución de ureasa comercial 0.2 mg/ml, esta mezcla de reacción se incubó por 20 minutos a 38°C y posteriormente se cuantificó el amonio liberado por el método del indofenol (15), para cada muestra se preparó un blanco conteniendo todos los reactivos excepto la ureasa. La pre

paración de la curva patrón de urea se realizó como se menciona para las muestras sustituyendo en la mezcla de reacción al extracto por diferentes volúmenes de solución de urea 2 mM (gráfica 5).

Para la determinación de la poza de aminoácidos totales se empleó en método de la ninhidrina (35). 0.05 ml de extracto fueron llevados a 1 ml con agua desionizada, se agregó 1 ml de reactivo constituido por 10 ml de solución de citratos 0.2 M pH 5.0 + 0.016 g de SnCl_2 y 0.4 g de ninhidrina disuelta en 10 ml de etilén-glicol-mono metil éter. La mezcla resultante se calentó a ebullición en baño maría por 20 minutos, se dejó enfriar y se agregaron 2.5 ml de propanol al 50%, se agitó y después de 15 minutos se leyó la absorbancia de las muestras a 570 nm. Los blancos fueron preparados como las muestras sustituyendo el volumen de extracto por agua desionizada, los datos de absorbancia se interpolaron en una curva patrón de ácido glutámico (gráfica 6).

La determinación de nitratos se realizó por el método de Nicholas (21). 0.1 ml de muestra se llevaron con agua desionizada a un volumen final de 1.5 ml, se les agregó 0.1 ml de ácido sulfámico al 10%, se agitó y se dejó reposar por 2 minutos, se agregaron después 0.4 ml de ácido

perclórico al 20%, se agitó y se leyó la absorbancia a 210 nm, los blancos se prepararon como las muestras sustituyendo el volumen de extracto por agua desionizada. Los datos de absorbancia fueron interpolados en una curva patrón de nitratos (gráfica 8).

La poza de nitritos se determinó por el método de Nicholas (21), a 0.1 ml de muestra se adicionaron 1 ml de sulfanilamida al 1% y 1 ml de N (1-naftil) etilén diamina al 0.02%, la mezcla se agitó y después de 20 minutos se midió el incremento de absorbancia con respecto a un blanco el cuál contenía todos los reactivos excepto el extracto. Se elaboró una gráfica patrón de nitritos (gráfica 7) empleando NaNO_2 5 mM. La absorbancia de las muestras fue determinada a 540 nm.

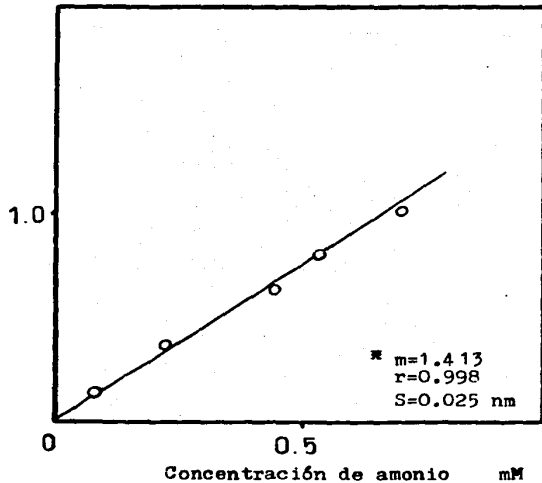
Para la determinación de la clorofila se empleó el método propuesto por Arnon (1) modificado en el presente trabajo. 0.5 g de tejido fueron molidos con 4.5 ml de una mezcla acetona-etanol en una relación 4:1 v/v, en un mortero frío y al abrigo de la luz. El extracto resultante fue filtrado a través de papel y en el filtrado se determinó la absorbancia a 665 y 649 nm. La cantidad de clorofila presente en el extracto se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación :

$$\frac{\mu\text{g Clorofila total}}{\text{ml extracto}} = 11.63 (A_{665\text{nm}}) + 17.72 (A_{649\text{nm}})$$

(1).

GRAFICA 1:

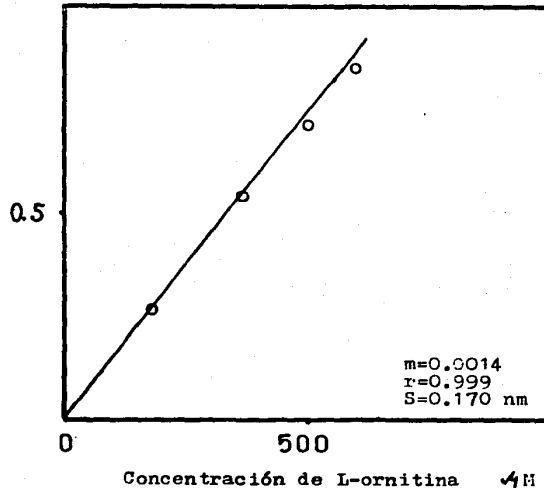
A 575 nm



CURVA PATRON DE AMONIO

GRAFICA 2:

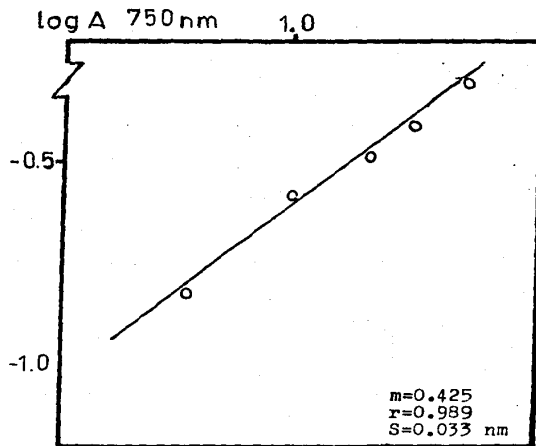
A 515 nm



CURVA PATRON DE L-ORNITINA

■ Valores de regresión; m=pendiente, r=coeficiente de correlación, S=error estándar

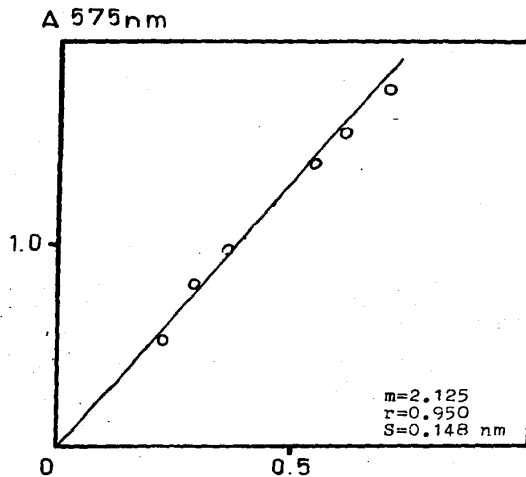
GRAFICA 3:



log concentración proteína μg

CURVA PATRON DE PROTEINA

GRAFICA 4:

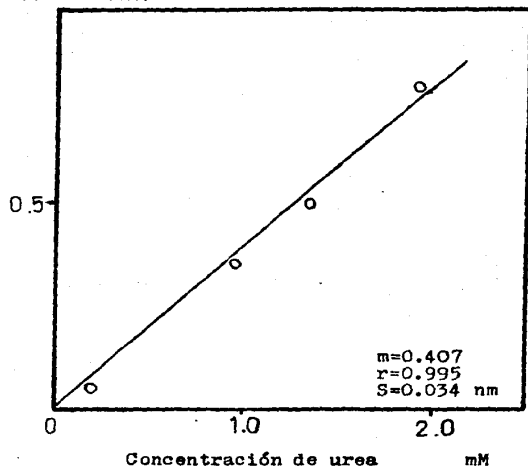


Concentración de amonio mM

CURVA PATRON DE AMONIO

GRAFICA 5:

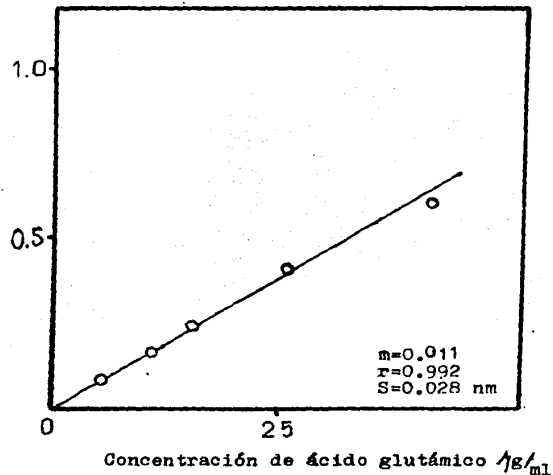
A 575nm



CURVA PATRON DE UREA

GRAFICA 6:

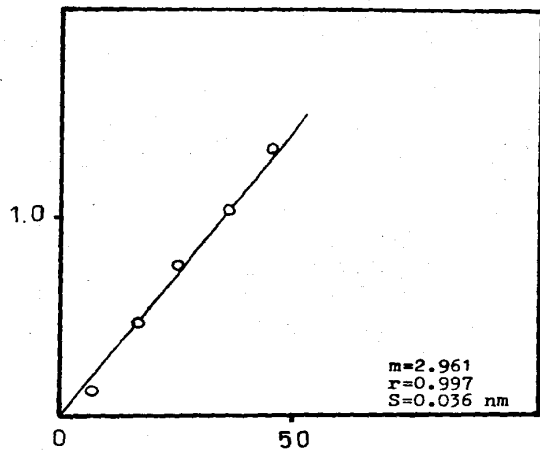
A 570 nm



CURVA PATRON DE AMINOACIDOS

GRAFICA 7:

A 540 nm

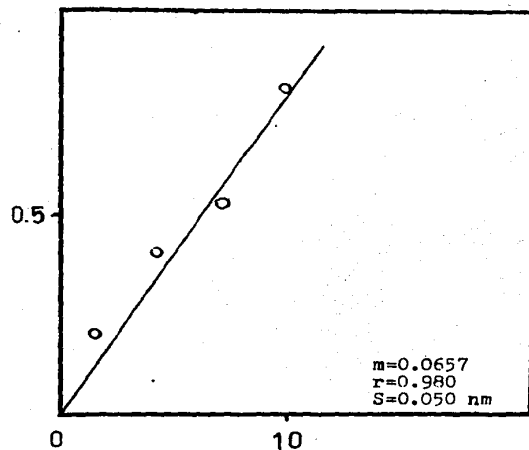


Concentración de nitritos μM

CURVA PATRON DE NITRITOS

GRAFICA 8:

A 210 nm



Concentración de nitratos $\mu\text{g/ml}$

CURVA PATRON DE NITRATOS

R E S U L T A D O S

Se determinó el crecimiento, las actividades enzimáticas de ureasa y arginasa y en algunos casos las pozas metabólicas de urea, amonio, aminoácidos totales, nitritos, nitratos y clorofila, en cultivos de tejidos de Canavalia ensiformis crecidos bajo diferentes condiciones, en el medio de Linsmeyer y Skoog conteniendo nitratos y amonio como fuente de nitrógeno, empleando cultivos fotosintéticos y en período de enverdecimiento. En medios conteniendo arginina 1 y 5 mM en condiciones de oscuridad e iluminación y en medios conteniendo urea 10 mM y urea 10 mM y urea 10 mM + Ni, empleando cultivos fotosintéticos.

Se presentan los resultados de estas determinaciones. Para todos los casos, los datos de crecimiento corresponden al promedio de tres determinaciones, los datos de actividades enzimáticas y de pozas metabólicas al promedio de dos determinaciones.

Los datos del ciclo de crecimiento de los cultivos fotosintéticos en el medio de Linsmeyer y Skoog contienen amonio y nitratos como fuente de nitrógeno, se muestran en la tabla I. El ciclo de crecimiento presentó una fase lag comprendida entre los días 0 y 2, una fase de crecimiento exponencial o log del día 2 al 12 y la fase estacionaria a partir del día 12 hasta el 18. La duración del ciclo fue de 18 días, el máximo incremento de peso fresco alcanzado por los cultivos fue de 208% a los 18 días.

Durante el ciclo de crecimiento de estos cultivos se determinaron dos máximos en la actividad enzimática de arginasa (tabla II, gráfica 9), el primero de estos máximos se determinó alrededor del día 4, coincidiendo con el inicio de la fase log. El segundo de estos picos, de menor magnitud que el primero, hacia los días 14-16, concorriendo con el final de la fase log. No se detectó actividad enzimática de ureasa.

Se determinaron también las pozas metabólicas de amonio (gráfica 10), urea (gráfica 11), aminoácidos totales (gráfica 12), nitritos (gráfica 13), nitratos (gráfica 14) y clorofila (gráfica 15). Los resultados de estas determinaciones se resumen en la tabla III.

La poza de amonio mostró un incremento notable hacia los días 2-6, coincidiendo con el inicio de la fase log y descendiendo hacia el final del ciclo. La poza metabólica de urea se incrementó hacia los días 2-8 del ciclo de crecimiento coincidiendo con el inicio de la fase log y descendiendo hacia el día 18. La poza de aminoácidos totales presentó un incremento hacia los días 2-10. La poza de nitritos aumentó en los días 8-12, disminuyendo hacia el final del ciclo. La poza de nitratos aumentó entre los días 4 y 10 coincidiendo con el inicio de la fase exponencial y disminuyendo hacia el final del ciclo. La poza de clorofila presentó comportamiento periódico, mostrando un máximo hacia el día 10 y descendiendo hacia el día 18.

TABLA I

Grecimiento como incremento de peso fresco de los cultivos fotosintéticos de C. ensiformis en medio de Linsmeyer y Skoog.

Día	% incremento peso fresco
0	0
5	25
8	43
11	144
14	168
18	208

TABLA II

Actividad específica de la arginasa en cultivos fotosintéticos de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog.

Día	$\frac{\mu\text{moles de ornitina}}{\text{min mg de proteína}}$
0	0.0
2	81.7
4	142.1
6	85.7
8	32.1
10	15.5
12	0.0
14	49.5
16	39.6
18	0.0

TABLA III

Determinaciones de las pozas metabólicas en cultivos fotosintéticos de C. ensiformis en medio de Linsmeyer y Skoog durante el ciclo de crecimiento.

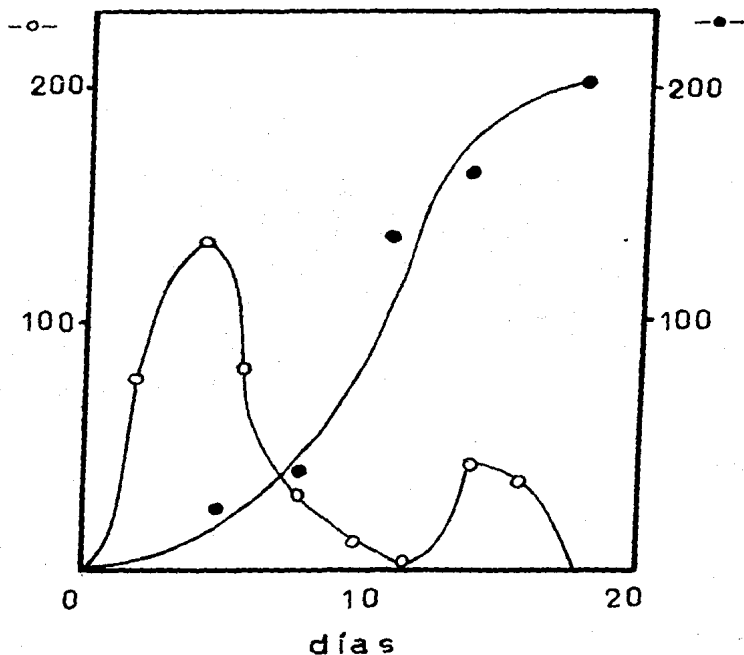
Día	Amonio mmol/g PF*	Urea mmol/gPF	Aminoácidos totales µg/g PF	NO ₂ ⁻ µmol/gPF	NO ₃ ⁻ mg/gPF	Clorofila µg/g PF
0	0.20	3.70	17.00	31.20	0.1245	52.0
2	1.70	5.80	24.60	51.95	0.1820	88.2
4	1.54	4.70	26.00	39.10	0.2640	49.2
6	1.50	4.20	25.00	75.95	0.1990	85.3
8	0.33	8.80	23.00	83.30	0.1940	36.8
10	0.61	3.55	22.40	76.95	0.1880	129.3
12	0.20	3.40	15.50	54.10	0.1500	98.1
14	0.33	3.20	16.50	59.45	0.1300	59.0
16	0.20	2.50	14.50	45.70	0.1280	68.0
18	0.37	1.17	22.20	47.85	0.1440	

* Peso fresco

GRAFICA 9:

μ moles de ornitina/min
mg de proteína

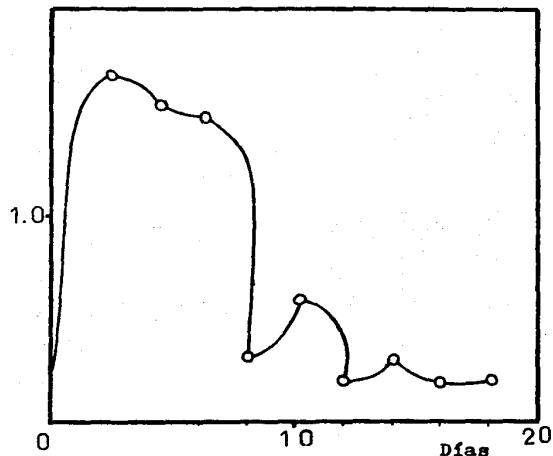
% incremento
peso fresco



Actividad específica de la arginasa en cultivos foto sintéticos de *C. ensiformis* durante el ciclo de crecimiento en el medio de Linsmeyer y Skoog.

GRAFICA 10:

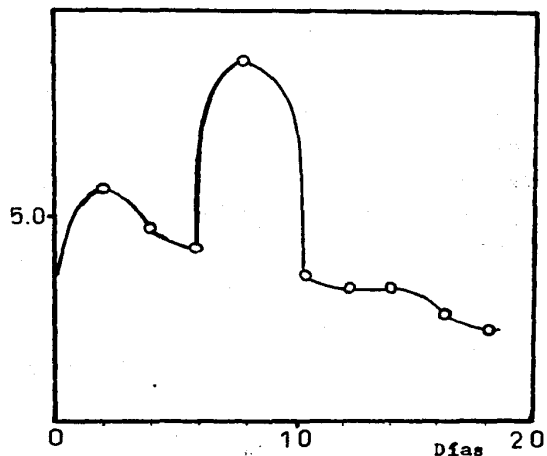
NH_4^+ mmol/g PF



Determinación de amonio en cultivos de *C. ensiformis* durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 11:

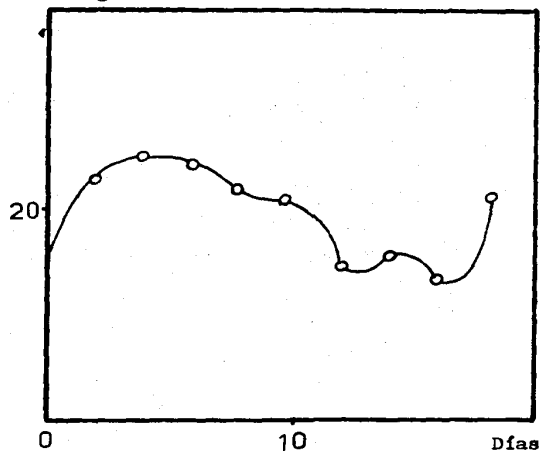
Urea mmol/g PF



Determinación de urea en cultivos de *C. ensiformis* durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 12:

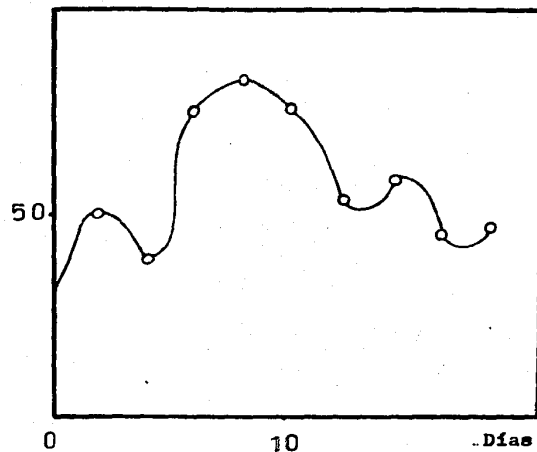
g. ácido glutámico
g PF



Determinación de aminoácidos totales en cultivos de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 13:

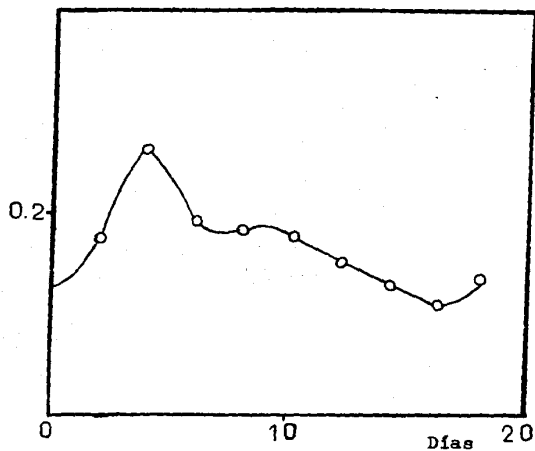
NO_2^- μ moles/g PF



Determinación de nitritos en cultivos de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 14:

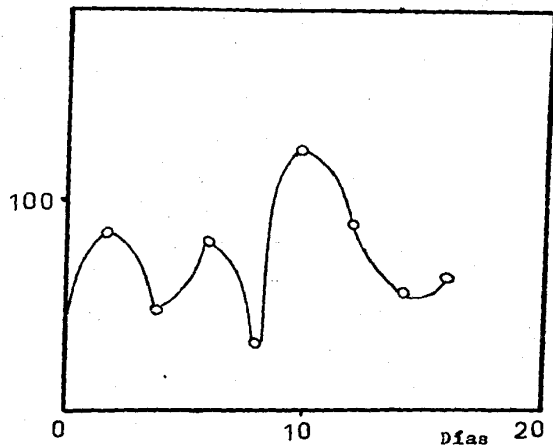
NO_3^- $\mu\text{g/g}$ PF



Determinación de nitratos en cultivos de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 15:

Clorofila $\mu\text{g/g}$ PF



Determinación de clorofila en cultivos de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

Los datos del ciclo de crecimiento de los cultivos en periodo de enverdecimiento, en el medio de Linsmeyer y Skoog, se presentan en la tabla IV. El ciclo presentó una fase lag comprendida entre los días 0 y 2, una fase de crecimiento exponencial del día 10 al 24 y una fase estacionaria a partir del día 25. La duración del ciclo fue de 25 días, el máximo incremento de peso fresco alcanzado por los cultivos fue de 2015% a los 25 días.

Durante el ciclo de crecimiento de estos cultivos se determinaron dos máximos en la actividad enzimática de arginasa (tabla V, gráfica 16), el primero de éstos en los días 0 a 4, coincidiendo con la fase lag y el inicio de la fase log, el segundo pico hacia el día 18 coincidiendo con la fase log. No se detectó actividad enzimática de ureasa.

Se determinaron también las pozas metabólicas de amonio (gráfica 17), urea (gráfica 18), aminoácidos totales (gráfica 19), nitritos (gráfica 20), nitratos (gráfica 21) y clorofila (gráfica 22). Los resultados de estas determinaciones se resumen en la tabla VI.

La poza de amonio mostró un incremento hacia el día 2, descendiendo hacia el final del ciclo. La poza de urea mostró un comportamiento periódico con valores máximos en los días 0 y 4 del ciclo de crecimiento. La poza de aminoáci-

dos totales presentó un incremento hacia los días 2 a 8, descendiendo a partir de ese día y coincidiendo con el inicio de la fase log. La poza de nitritos presentó un descenso hacia el día 10. La poza de nitratos descendió también a partir del día 4 hasta el día 12 del ciclo. La poza de clorofila presentó comportamiento sigmoidal, alcanzando su valor máximo hacia el día 16.

TABLA IV

Crecimiento como incremento de peso fresco de los cultivos de C. ensiformis en período de enverdecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog.

Día	% incremento peso fresco
0	0
3	46
5	84
7	96
11	237
13	473
18	953
25	2015

TABLA V

Actividad específica de la arginasa en cultivos de C. ensiformis en período de enverdecimiento durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog.

Día	μ moles de ornitina/min mg de proteína
0	115.2
2	127.4
4	99.1
6	60.9
8	53.4
10	3.8
12	42.9
14	71.9
16	94.1
18	129.5

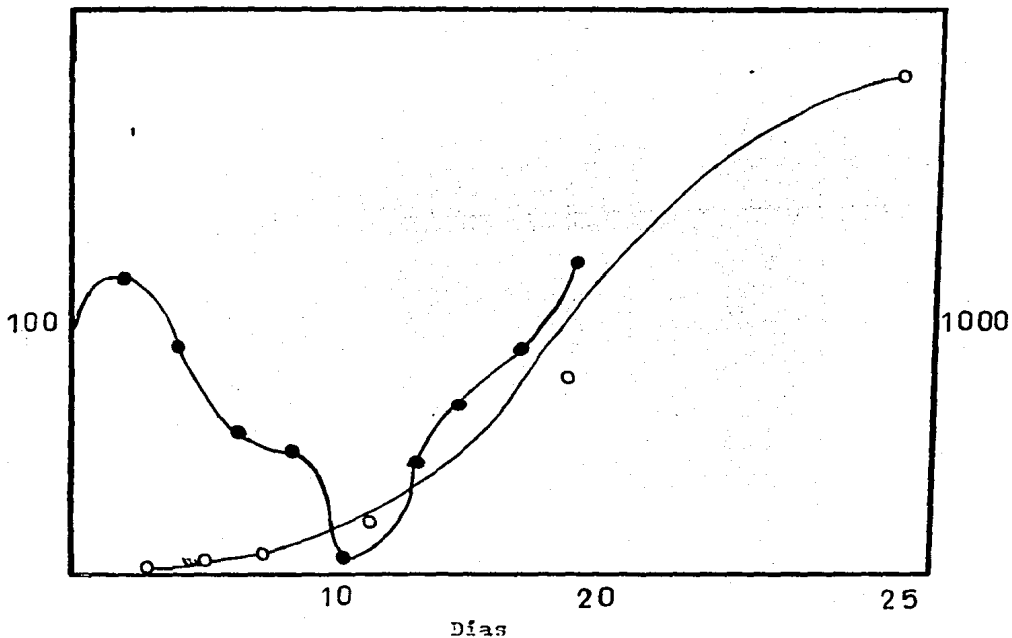
TABLA VI

Determinaciones de las pozas metabólicas en cultivos de C. ensiformis en período de enverdecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog durante el ciclo de crecimiento.

Día	Amonio mmol/gPF	Urea mmol/gPF	Aminoácidos totales μg/g PF	NO ₂ ⁻ μmol/gPF	NO ₃ ⁻ mg/gPF	Clorofila μg/g PF
0	0.47	5.45	31.30	68.7	0.139	
2	2.17	0.87	59.00	77.0	0.364	
4	0.95	5.50	43.00	62.5	0.170	10.0
6	1.53		43.6	79.1	0.206	
8	1.52		54.5	43.7	0.170	24.0
10	1.61	1.50	35.40	46.8	0.175	
12	1.33	4.00	34.00	73.4	0.154	49.0
14	1.00	0.42	37.40	81.0	0.266	62.0
16	0.37	1.85	22.90	78.7	0.210	56.0
18	0.39	3.17	22.80	89.5	0.106	

GRAFICA 16

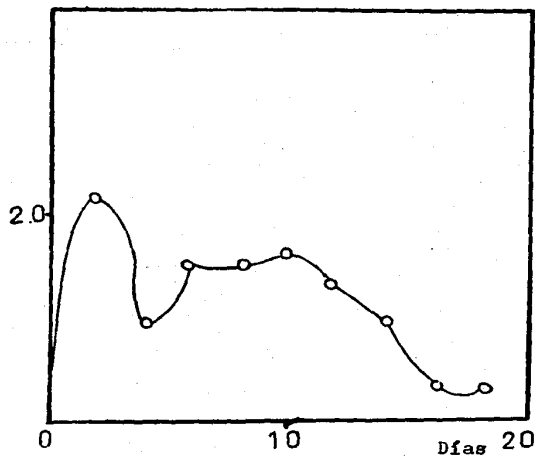
\bullet — $\frac{\mu\text{moles de ornitina}}{\text{min mg de proteina}}$
— \circ —
%o incremento peso fresco



Actividad específica de la arginasa en cultivos en periodo de enverdecimiento de *U. ensiformis* durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog.

GRAFICA 17

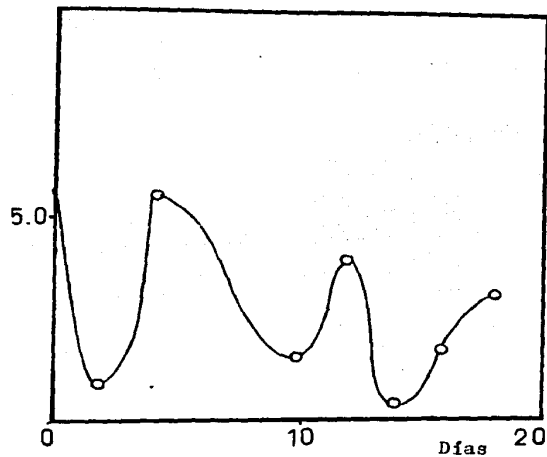
NH_4^+ mmol/g PF



Determinación de amonio en cultivos en enverdecimiento de C.ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 18

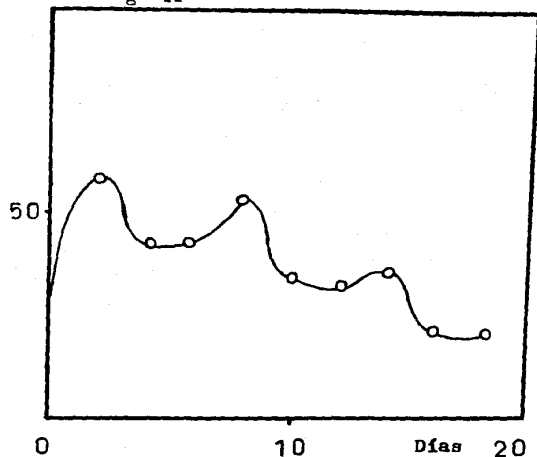
Urea mmol/g PF



Determinación de urea en cultivos en enverdecimiento de C.ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 19

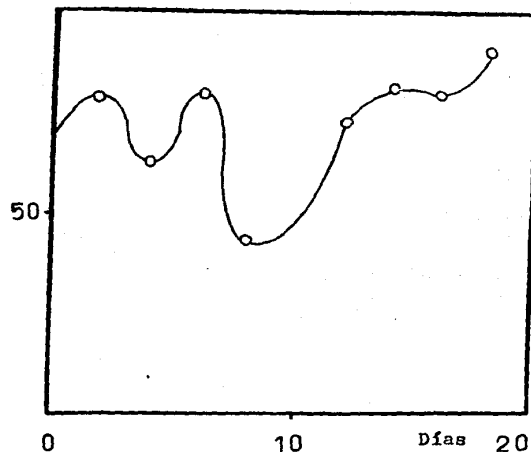
μg ácido glutámico
g PF



Determinación de aminoácidos en cultivos en enverdecimiento de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 20

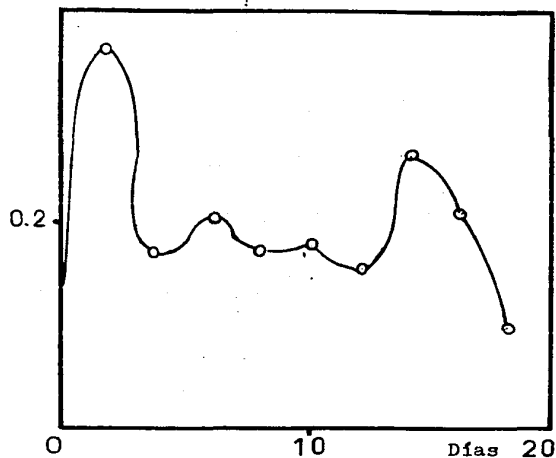
NO_2^- $\mu\text{M/g}$ PF



Determinación de nitritos en cultivos en enverdecimiento de C. ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 21

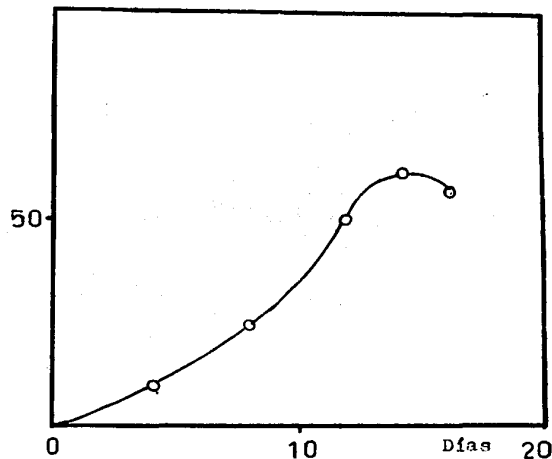
NO_3^- $\mu\text{g/g}$ PF



Determinación de nitratos en cultivos en enverdecimiento de C.ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

GRAFICA 22

Clorofila $\mu\text{g/g}$ PF



Determinación de clorofila en cultivos en enverdecimiento de C.ensiformis durante el ciclo de crecimiento en medio de Linsmeyer y Skoog

Para los cultivos crecidos en medios conteniendo arginina 1 y 5 milimolar en condiciones de iluminación y oscuridad, los datos de incremento de peso acumulado con respecto a un control en medio de Linsmeyer y Skoog conteniendo nitratos y amonio como fuente de nitrógeno, mostraron que el crecimiento fué muy limitado (tabla VII, gráfica 23).

En ninguno de los cultivos crecidos en arginina, bajo las condiciones indicadas se detectó actividad enzimática de arginasa y/o ureasa en muestras correspondientes al día 14 del ciclo de crecimiento. Se determinaron en dichas muestras las pozas metabólicas de amonio, urea, aminoácidos totales, nitritos, nitratos y clorofila (tabla VII). Las pozas metabólicas en los cultivos crecidos en condiciones de oscuridad e iluminación, para una misma concentración de arginina no presentaron grandes variaciones, con excepción de la poza de clorofila. Sin embargo, en los cultivos crecidos en diferentes concentraciones de arginina bajo condiciones de oscuridad o iluminación, con excepción de la clorofila, las pozas metabólicas fueron más elevadas en los cultivos crecidos en medios con mayor concentración de arginina.

TABLA VII

Crecimiento de los cultivos de C. ensiformis en medios conteniendo arginina 1 y 5 mM en condiciones de iluminación y oscuridad.

Día	Incremento de peso acumulado %				
	Control	Arginina mM			
	NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	1	5	1	5
	Luz	Luz		Oscuridad	
0	0	0	0	0	0
25	937	311	333	338	318
38	1424	335	356	364	360
58	2175	494	510	405	438
76	2850	562	566	553	528

TABLA VIII

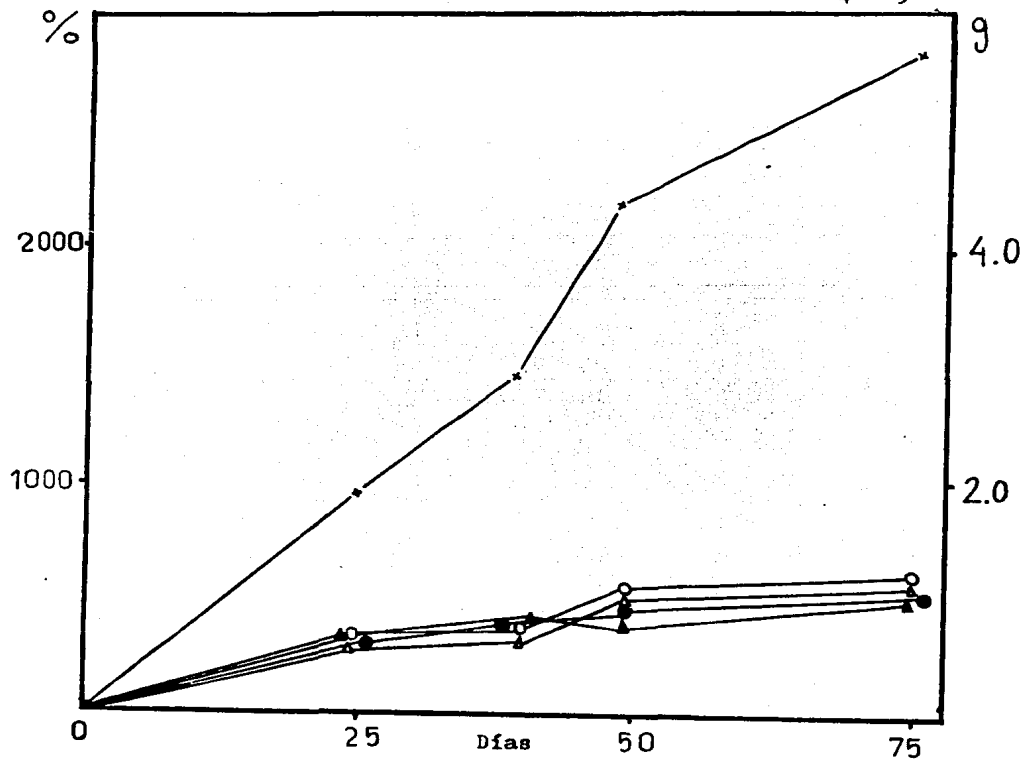
Determinación de pozas metabólicas en muestras correspondientes al día 14 del ciclo de crecimiento de cultivos de C. ensiformis en medios conteniendo arginina 1 y 5 mM, en condiciones de iluminación y oscuridad.

Cultivo	Arg 1 mM	Arg 5 mM	Arg 1 mM	Arg 5 mM
	Luz	Luz	Oscuridad	Oscuridad
Amonio mmol/g PF	0.194	0.207	0.170	0.342
Urea mmol/g	3.09	6.52	2.01	2.11
Amino ácidos totales g/g PF	5.61	5.83	3.41	11.11
NO ₂ ⁻ mmol/g PF	19.56	26.15	21.9	29.5
NO ₃ ⁻ mg/g PF	0.012	0.040	0.027	0.064
Cloro fila g/g PF	37.43	45.15	7.5	8.9

GRAFICA 23:

incremento de peso
acumulado

- Δ- Arg 1 mM Luz
- Arg 5 mM Luz
- ▲- Arg 1 mM Oscuridad
- Arg 5 mM Oscuridad
- x- Control $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ Luz



Crecimiento de cultivos de C. ensiformis en medios contienen do arginina 1 y 5 mM, en condiciones de iluminación y oscuridad.

Los datos de incremento de peso acumulado de los cultivos fotosintéticos crecidos en medio conteniendo urea como fuente de nitrógeno, mostraron que su crecimiento con respecto a un testigo en el medio de Linsmeyer y Skoog fue muy limitado (tabla IX, figura 24).

La actividad de arginasa en los cultivos crecidos en los medios conteniendo urea y urea + Ni, fue muy similar (tabla X). No se detectó actividad de ureasa.

TABLA IX

Crecimiento de los cultivos fotosintéticos de C. ensiformis en medio conteniendo urea como fuente de nitrógeno.

Día	Incremento de peso acumulado %	
	Urea 5 mM	Testigo $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$
0	0.0	0.0
15	83.6	-
25	-	937.0
30	113.0	-
38	-	1424.0
44	119.5	-
58	-	2175.0
60	132.2	-
76	-	2850.0

TABLA X

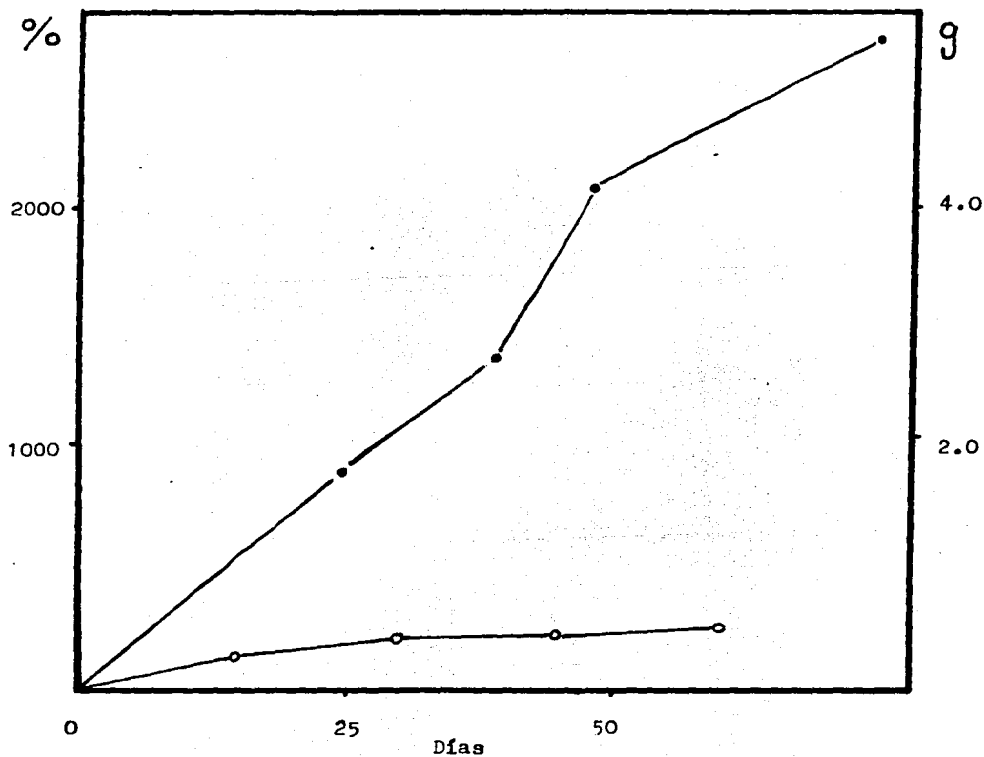
Actividad enzimática de la arginasa en cultivos fotosintéticos de C. ensiformis en medio conteniendo urea y urea + Ni.

Medio	μ moles de ornitina/min mg de proteína
Urea 5 mM	109
Urea 5mM + Ni	101

GRAFICA 24:

—○— Urea 5 mM
—●— Testigo $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$

incremento de peso
acumulado



Crecimiento de cultivos fotosintéticos de *C. ensiformis*
en medio conteniendo urea 5 mM como fuente de nitrógeno.

DISCUSION Y CONCLUSION

Los cultivos fotosintéticos y en período de enverdecimiento crecidos en el medio de Linsmeyer y Skoog conteniendo una mezcla de nitratos y amonio como fuente de nitrógeno, presentaron diferencias en la duración del ciclo de crecimiento y en el incremento máximo de peso alcanzado (gráficas 9, 16). Se ha observado que en general, los cultivos crecidos en la oscuridad presentan mayor desarrollo que en condiciones de iluminación, por otra parte, se ha sugerido que la duración del ciclo de crecimiento se ve limitada por la degradación de la clorofila en los cultivos fotosintéticos¹. Estos argumentos podrían explicar las diferencias observadas entre ambos cultivos.

Los cultivos fotosintéticos presentaron un nivel máximo de clorofila de 129 μ g/g, mientras que los cultivos en

1 Lotina, B., Loyola, V.M., Sánchez, E. : Comunicación personal.

período de enverdecimiento alcanzaron solo niveles de 62 g/g.

Para los cultivos fotosintéticos, los máximos de actividad de arginasa aparecieron hacia los días 2-6 el primero y hacia el día 14 el segundo. Para los cultivos en período de enverdecimiento, los picos de actividad de arginasa aparecieron hacia los días 0-4 el primero y 18 el segundo.

Si bien entre estos dos cultivos, los picos de actividad de arginasa digieren ligeramente en cuanto a su magnitud y aparición, estas diferencias pueden atribuirse a la variación en la duración de los ciclos, por lo tanto podría considerarse que la actividad de arginasa es independiente de las funciones fotosintéticas.

La ausencia de actividad de ureasa y la acumulación de urea durante el ciclo de crecimiento, tanto en los cultivos fotosintéticos como en los cultivos en período de enverdecimiento (gráficas 11, 18), indican que estos cultivos no son capaces de metabolizar urea y por lo tanto de obtener amonio a partir de arginina o canavanina a través de la vía arginasa-ureasa presente en la planta. Por otra parte, estos datos sugieren que la arginasa presente en los cultivos podría participar en vías catabólicas y no en la vía arginasa-ureasa.

Las determinaciones de la poza metabólica de amonio en

estos cultivos a lo largo del ciclo de crecimiento, sugieren que el amonio del medio es incorporado por los cultivos y utilizado a lo largo del ciclo, este hecho aunado al crecimiento mostrado por los cultivos, indica que estos fueron capaces de utilizar como fuente de nitrógeno al amonio presente en el medio. Por otra parte, las determinaciones de las pozas de nitratos y nitritos indican que los primeros son incorporados a las células en cultivo y que son reducidos a nitritos a lo largo del ciclo de crecimiento, por lo tanto se puede considerar que los cultivos de C. ensiformis fueron capaces también de asimilar los nitratos del medio como fuente de nitrógeno.

Los cultivos crecidos en arginina 1 y 5 mM en condiciones de oscuridad e iluminación, no presentaron actividad de arginasa ni de ureasa, este hecho aunado al crecimiento tan limitado, sugiere que bajo las condiciones ensayadas los cultivos de C. ensiformis no son capaces de utilizar a la arginina y por lo tanto a la canavanina como fuente de nitrógeno. El hecho de que en estos cultivos a diferencia de los otros casos que se reportan, no se detectara actividad de arginasa, pudo deberse a una inhibición de esta enzima por su sustrato presente en el medio de cultivo. La idea de que la arginina no fuera utilizada por no estar disponible para los cultivos puede descartarse, ya que se ha demostra

do que la arginina es incorporada por las células en cultivo². El crecimiento mostrado por estos cultivos, aunque limitado, pudo ocurrir a expensas de las células viejas. La similitud entre los datos de crecimiento de los cultivos mantenidos en la luz y en la oscuridad, sugieren que la actividad fotosintética no tuvo influencia sobre este parámetro. Los resultados de las determinaciones de las pozas metabólicas en estos cultivos, aunados al escaso crecimiento y a la ausencia de actividades enzimáticas, parecen indicar que las diferencias observadas en dichas pozas en cultivos crecidos bajo diferentes condiciones, se deben únicamente a diferencias en la incorporación de arginina causadas por las diferentes concentraciones de este aminoácido en los medios de cultivo.

Para los cultivos en medios conteniendo urea como fuente de nitrógeno, el crecimiento fue muy limitado. En estos cultivos tanto en los crecidos en medios conteniendo urea, como en los medios conteniendo además Ni, se detectó actividad enzimática de arginasa pero no se detectó actividad de ureasa.

En experimentos realizados por Polacco en cultivos de tejidos de soya (24), se observó que la actividad enzimática de ureasa sólo se presentaba cuando en el medio de cultivo en que crecían las células existía níquel.

2 Loyola, V.M. : Comunicación personal.

Los datos anteriores sugieren que la ausencia de actividad de ureasa en los cultivos de C. ensiformis no se debe a una inhibición por falta de Ni^{2+} en el medio de cultivo y que bajo las condiciones mencionadas, estos cultivos no son capaces de utilizar a la urea como fuente de nitrógeno, asimismo sugieren que la arginasa presente en los cultivos participa en vías catabólicas y no en la vía arginasa-ureasa presente en la planta. El hecho de que la urea no fuese utilizada por las células por indisponibilidad de la misma puede descartarse, ya que se ha demostrado que este sustrato es incorporado por los cultivos².

Resultados de determinaciones de la actividad de las enzimas GS, GDH y GOGAT indican que estas enzimas están presentes en los cultivos de C. ensiformis crecidos en el medio de Linsmeyer y Skoog³.

Resultados de HPLC indican que la L-canavanina no está presente en estos cultivos⁴.

De acuerdo con los resultados y los datos expuestos, se puede concluir que en los cultivos de Canavalia ensiformis bajo las condiciones ensayadas no opera la vía arginasa-ureasa presente en la planta para el metabolismo de la canavanina.

3 Vázquez, F. : Comunicación personal.

4 Scorer, K.L. : Comunicación personal.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1.- Arnon, D.I. : Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poliphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24: 1-15 (1949).
- 2.- Bell, E.A. : Canavanine in the Leguminaceae. Biochem J. 75: 619-620 (1960).
- 3.- Bell, E.A., Lackey, J.A. and Polhill, R.M. : Biochemical Systematics and Ecology. 6: 201-212 (1978).
- 4.- Bell, E.A. : Biochemical aspects of plant and animal coevolution . Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Academic Press. No.15 (1978).
- 5.- Belmar, R., Ellis, N., Laviada, E. : Utilización del grano de Canavalia ensiformis en dietas para rumiantes. 1a Reunión sobre la producción y utilización del grano de C. ensiformis en sistemas pecuarios de Yucatan. Merida Yucatan (1985). Memorias.

- 6.- Birdsong, B.A., Alston, R. and Turner, B.L. : Distribution of canavanine in the Leguminaceae as related to phyletic groupings. *Can. J. Botany*. 38 : 499-505 (1960).
- 7.- Chinard, R.F. : Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.* 199: 91-93 (1952).
- 8.- Damoradan, M. and Narayanan, K.G.A. : A comparative study of arginase and canavanase. *Biochem J.* 34: 1449-1459 (1940).
- 9.- Duke, J.A. : Handbook of legumes of world economic performance. New York and London. Plenum Press. pp 343 (1981)
- 10.- Fowden, L. : Biosynthetic Pathways in Higher Plants. Academic Press. New York. pp 73-99 (1971).
- 11.- Fowden, L., Bell, E.A. y Lea, P.J. : Advances in enzymology. 50: 141 (1979).
- 12.- Greenstein, J.P. and Winitz, M. : Chemistry of the aminoacids. John Willey and Sons. New York. Vol 3 pp 2622-2628 (1961).
- 13.- Hogan, E.M., Swift, E. and Dane, J. : urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry*. Vol. 22 No. 3 pp 663-667 (1983).

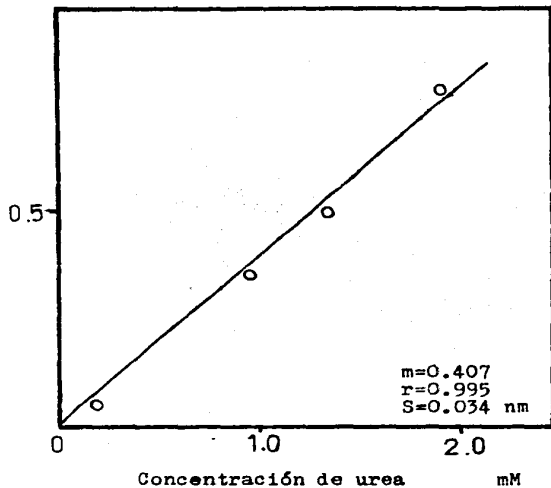
- 14.- Kammer, A., Dahlman, D.L. and Rosenthal, G.A. : J. Exp. Biol. 75 : 123-132 (1978).
- 15.- Kaplan, A. : Urea nitrogen and urinary ammonia. Stand. Methods. Clin. Chem. 5: 245-256 (1965).
- 16.- Kay, D.E. : Crop and Product Digest No.3 Food legumes. London. Tropical Development and Research Institutes. (1979).
- 17.- Kessler, D.J. : Introducción a la Canavalia y su comportamiento en yucatán. 1a Reunión sobre la producción y utilización del grano de C. ensiformis en sistemas pecuarios de Yucatan. Merida Yucatan (1985). Memorias.
- 18.- Loyola, V.M. : El uso de cultivo de tejidos en estudios metabólicos. Cuadernos de Posgrado. (V.M. Loyola. Editor) D.E.P.G., Facultad de Química. U.N.A.M. (1984).
- 19.- Maas, W.K. : Studies on repression of arginine biosynthesis in Escherichia coli. Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 26: 183-191 (1961).
- 20.- Mello. J.P., Acamovic, T. y Walker, G.A. : Tropical agriculture (1985).

- 21.- Nicholas, D.J. and Mason, A.C. : Determination of nitrite and nitrate. *Methods of enzymology*. 23: 491-503 (1971).
- 22.- Norman, E. : Composición química : Valor nutritivo del grano y sus factores tóxicos. 1a Reunión sobre la producción y utilización del grano de C. ensiformis en sistemas pecuarios de Yucatan. Mérida Yucatan (1985).Memorias.
- 23.- Peterson, G.P. : A simplification of the protein assay method of Lowry et al, which is more generally applicable. *Analytical Biochem.* 83: 346-356 (1977).
- 24.- Polacco, J.C. and Havir, E.A. : Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *J. Biol. Chem.* 254: 1707-1715 (1979).
- 25.- Quiróz, J., Godoy, G., Castro, L., Oropeza, C., Loyola, V.M., Robert, M.L. y Scorer, K.N. : Canavalia ensiformis (L.) tissue culture and embryo formation in vitro. Resumen enviado al Congreso Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales. Bogota. Colombia 1987.

- 26.- 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).
- 27.- Rosenthal, G.A. : Investigations of canavanine biochemistry in Jack bean plant. Canavalia ensiformis.(L) D.C. Plant. Phisiol. 46: 273-276 (1970).
- 28.- Rosenthal, G.A. : An ontogenic study of canavanine formation in the fruit of jack bean C. ensiformis. Plant. Phisiol. 47 : 209-211 (1971).
- 29.- Rosenthal G.A. : A mechanism of L-canavanine toxicity. Eur. J. Biochem. 114: 301-304 (1981).
- 30.- Rosenthal G.A. : L-canavanine transport and utilization in developing jack bean. Plant. Phisiol 76: 541-544 (1981).
- 31.- Román, M.E. : Funciones de las enzimas ureasa y arginasa durante los primeros estadios de desarrollo de Canavalia ensiformis L. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. (1985).

GRAFICA 5:

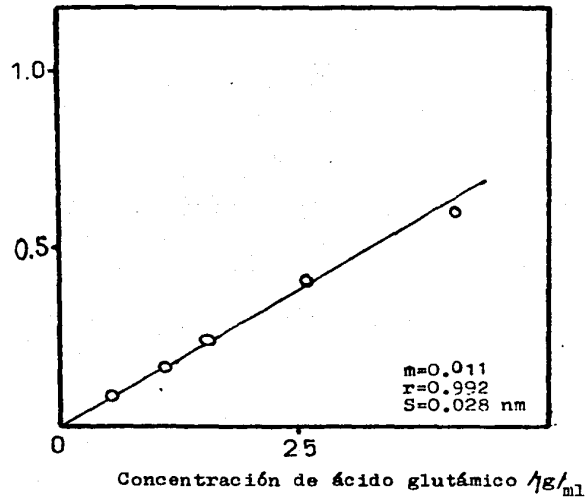
A 575nm



CURVA PATRON DE UREA

GRAFICA 6:

A 570 nm



CURVA PATRON DE AMINOACIDOS

- 32.- Roubelakis, K.A. and Kliewer, W.M. : Enzymes of Krebs-Henseleit cycle in Vitis vinifera L. III In vitro and in vivo studies of arginase. *Plant. Phisiol.* 62: 344-347 (1978).
- 33.- Schachtele, C.F. and Rogers, P. : Canavanine death in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 14: 794-799 (1968).
- 34.- Snel and Snel : Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Co. Inc. Vol.4 3a ed. (1956).
- 35.- Thompson, J.F. : The biochemistry of plants: A comprehensive tratise. Academic Press. New York Vol.5 375-402 (1980).
- 36.- Tschierch, B. : Non competitive inhibition of enzymatic reactions by canavanine. *Tetrahedron letters* 28: 3237-3241 (1966).