

00562

4

24

ASPECTOS BIOQUIMICOS DEL ESTRES EN  
CATHARANTHUS ROSEUS

PATRICIA RIOS CHAVEZ

TESIS

Presentada a la División de Estudios de  
Posgrado de la

FACULTAD DE QUIMICA

de la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

como requisito para obtener  
el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS  
(Bioquímica)

CIUDAD UNIVERSITARIA 1987

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## INDICE

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	2
INTRODUCCION .....	4
ANTECEDENTES .....	6
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	26
MATERIALES Y METODOS .....	28
RESULTADOS Y DISCUSION .....	41
BIBLIOGRAFIA .....	77

## ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
g	Gramos
mM	Milimolar
min	Minutos
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion nitrato
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ion nitrito
NADH	Nicotin-adenin-dinucleótido reducido
NAD <sup>+</sup>	Nicotin-adenin-dinucleótido oxidado
r.p	Recién preparada
ml	Mililitros
NH <sub>4</sub>	Amonio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
NH <sub>2</sub> OH	Hidroxilamina
glu	Glutamato
gln	Glutamina
Fd	Ferredoxina
NR	Nitrato reductasa
NiR	Nitrito reductasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GS	Glutamino sintetasa
GOGAT	Glutamato sintasa

RESUMEN

Las plantas continuamente se ven sometidas a distintos tipos de estrés durante su desarrollo, por lo que su metabolismo debe ajustarse rápidamente a las nuevas condiciones para que la planta pueda sobrevivir. En general, la mayoría de las plantas responden a los diferentes tipos de estrés mediante la síntesis de compuestos nitrogenados y si bien es cierto que existe una degradación de proteínas, a partir de la cual se sintetizan algunos de estos compuestos, no es suficiente, por lo que debe existir una asimilación de novo de nitrógeno. De tal manera que es fundamental conocer como afecta el estrés a las enzimas de la asimilación del amonio (GDH y GS) durante el estrés de sequía o salinidad.

En las plantas de 2.5 años de Catharanthus roseus que estuvieron sometidas a un estrés de sequía se vió que la actividad enzimática de la GDH no se ve afectada, a diferencia de la actividad de la GS en donde la actividad se encontró disminuida, este hecho nos sugiere que las plantas bajo una condición de estrés de sequía a esta edad, asimilan el amonio por la vía GDH. Sin embargo las plantas de C. roseus ahora sometidas a un estrés de salinidad, se encontró que todas las enzimas que asimilan amonio están disminuidas, por lo que se ve que esta planta responde

distinto dependiendo del tipo de estrés al cual se le somete.

En relación a plantas de la misma especie pero de seis meses se ve que responden igual a los dos tipos de estrés en donde la actividad de la GDH no se ve afectado tanto en raíz como en hoja, no siendo así para la GS de hoja la cual no se modifica en condiciones de estrés y en raíz se encontró un aumento considerable de dicha actividad, sugiriendo que las plantas jóvenes sometidas a estrés asimilan amonio por medio de las vías GDH y GS.

Un hecho de llamar la atención fué que esta planta a parte de acumular prolina, cuando se encontraba sometida a estrés, también se encontró aumentados sus niveles de alcaloides.

RESUM:

Trough out their life, plants are under different types of stress so their metabolism must adjust rapidly in -- order to survive.

A general response is sythesis of nitrogenous compounds and though there is protein degradation, released nitro gen is not sufficient for this synthesis so de novo --- assimilation must occur.

We are interested in how nitrogen azsimilating enzyme mainly GDH and GS, are affected by water or salt stress in order to understand how plants can accumulate nitro- gen metabolites.

In the plants of 2.5 years old that were under water -- stress show that the GDH activity doesn't affect, inste ad the GS activity decreased. This fact show us that -- plants of 2.5 years old under water stress their nitro- gen assimilation is via GDH. However in plants under -- salt stress show that all their activities of nitrogen assimilation decreased.

According to this work plant's responses are different depending on the stress they are under.

Plants of the same species 6 months old have equal res- ponses to the same kind of the stress. GDH activity --- doesn't seem affected in roots and leaves.

However in leaves the GS activity is modified by stress condition and we found an increased in roots.

The former suggest that young plants under stress tend to assimilate ammonium via GDH and GS.

One fact to be pointed out is that this plants besides accumulated proline, increased, it's alkaloids levels under stress.

In conclusion, the pathway utilized for nitrogen assi milation under stress depends on both the physiological stage of the plant and the type of stress.



## INTRODUCCION

Catharanthus roseus es una planta angiosperma dicotiledónea que presenta tres variedades: roseus, albus y acellatus, además de utilizarse como planta ornamental tiene un gran interés comercial, ya que produce aproximadamente 200 alcaloides de los tipos: iboga, corinate, aspidosperma y estrichos. Dentro de los alcaloides del tipo aspidosperma se encuentran la vincoleucoblastina (VLB) y la vincristina (VCR), los cuales son utilizados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas humanas (Romero, 1984).

Sin embargo, el rendimiento en la extracción de estos alcaloides es muy pobre, 1 g y 0.02 g por 1000 kg de peso fresco, para la VLB y la VCR respectivamente, por lo cual se están buscando nuevas estrategias con las cuales se pueda aumentar el rendimiento en la obtención de estos alcaloides.

Una alternativa es a través del conocimiento de las vías de síntesis y degradación de estos metabolitos y de los factores que los modifican dentro de estos factores tenemos; la nutrición de la planta y las condiciones ambientales en las cuales crecen como son temperatura, luz, humedad, salinidad, sequío, etc. (Brachet y Cosson, 1986; Frischknecht y Baumann, 1985).

Si esto es cierto, entonces podría aplicarse un determinado tipo de estrés, para obtener mayores rendimientos en la producción de alcaloides o posiblemente alcaloides específicos en respuesta a un estrés determinado.

Como durante el estrés se produce una gran movilización de nitrógeno, principalmente el que proviene de la degradación de proteínas que se produce durante el estrés, es fundamental entender como este nitrógeno es reutilizado para la síntesis de nuevos compuestos, por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar el mecanismo de reasimilación del nitrógeno durante los estrés de sequía o salinidad en plantas de Catharanthus roseus.

## ANTECEDENTES

### I.- METABOLISMO NITROGENADO.

La mayoría de las plantas son capaces de utilizar tanto al amonio como al nitrato como fuente de nitrógeno. Estos compuestos son tomados por medio de las raíces donde son asimilados y/o transportados a las hojas.

Normalmente el amonio no es transportado como tal en la planta, sin embargo este se genera dentro de la hoja como producto de la reducción del nitrato, por la degradación de la asparagina tanto a través de una transaminasa (Lloyd y Joy, 1978) o una asparaginasa (Lea y Miflin, 1980) y durante la fotorrespiración (Keys, 1980).

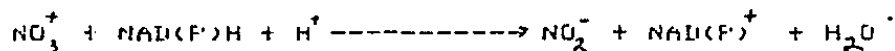
En años recientes se han reportado una gran cantidad de estudios sobre la asimilación del nitrógeno. Calvin y Atkins (1974) reportaron la incorporación de  $^{15}\text{N}$  en la fracción de aminoácidos en hojas de cebada. Lewis y Fate (1973) establecieron que la incorporación relativa del nitrógeno del nitrato, del ácido glutámico y de la glutamina, a un extenso rango de compuestos amino es muy similar. Yoneyama y Numazawa (1975) determinaron que el nitrato se reduce rápidamente a amonio en la raíz donde es incorporado a la glutamina y al glutamato. De igual manera el patrón de incorporación del nitrógeno a proteína es similar cuando se administra amonio o nitrato. Cuando se administra  $^{15}\text{NO}_3^-$  a

orotes de Satura stramonium, la mayor parte de la marca se encuentra en la glutamina presente en la hoja (Probyn y Lewis, 1979).

El proceso de asimilación del nitrato es fuertemente estimulado por la luz (Cavin y Atkins, 1974), por lo que se empiezan a hacer estudios con cloroplastos aislados, algunos usando nitrato o amonio como fuente de nitrógeno inorgánico.

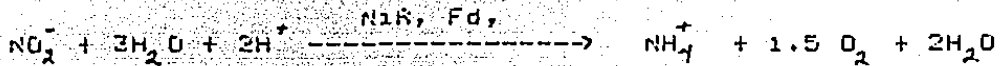
Desde 1965, Ingle determinó que las enzimas involucradas en la asimilación del nitrato, la NR y la NiR, se incrementan siete veces en respuesta a sus respectivos sustratos.

La reducción del nitrato ocurre en dos distintas reacciones catalizadas por diferentes enzimas. La primera reacción es catalizada por la nitrato reductasa (E.C.1.6.6.1 NADH: Nitrato oxidoreductasa), una enzima que transfiere dos electrones desde el NAD(P)H, siendo los productos de la reacción el nitrito, el NAD(P)<sup>+</sup> y el H<sub>2</sub>O

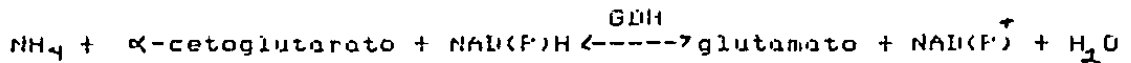


La segunda reacción del proceso de reducción del nitrato involucra la conversión del nitrito a amonio. El nitrito obtenido en el citosol por la acción de la NR es bombeado dentro del cloroplasto de las hojas o de los plástidos en la raíz. Dentro de este organelo se lleva a cabo la reduc-

cion del nitrito a amonio por acción de la nitrito reductasa (E.C.1.6.6.4 NAD(P)H: Nitrito oxidoreductasa).



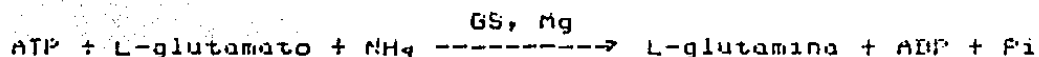
Hasta antes de 1974 se consideraba que el nitrógeno era asimilado a través de la vía de la glutamato deshidrogenasa (E.C.1.4.1.2 L-Glutamato: NAD oxidoreductasa), entre otras cosas porque esta enzima se encuentra distribuida universalmente y posee una alta especificidad por sus sustratos: el  $\alpha$ -cetoglutarato y el amonio.



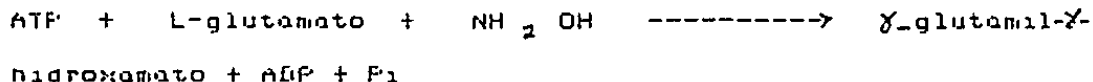
La GDH es una metaloenzima, ya que la adición de agentes quelantes, como el EDTA o la 8 hidroxiquinolina, provocan una disminución de su actividad. Esta pérdida de la actividad es restaurada mediante la adición de calcio (Ehmke y Hartmann, 1978; Loyola, 1983; Oaks et al, 1980). Existen varias isoenzimas de la GDH (Barash et al, 1973, 1975; Loyola, 1983) cuya función aún se desconoce, si bien recientemente se ha propuesto que algunas de estas isoenzimas pueden tener una función durante la diferenciación celular (Loyola-Vargas y Sanchez de Jiménez, 1986).

Cuando en Lemma minor hay concentraciones elevadas de amonio, la actividad de la GDH se incrementa. (Rhodes,

1976). Esta enzima además es inhibida por ATP, el cual es un sustrato para la GS, en tanto que el ADP y el 5'-AMP inhiben la actividad de la GS, mientras que solo tienen un pequeño efecto sobre la actividad de la GDH. La otra enzima que podría asimilar amonio es la glutamino sintetasa (E.C.6.3.1.2 L-Glutamato: amonio ligasa), la cual es una enzima que también se encuentra distribuida universalmente, la reacción que cataliza es la siguiente:

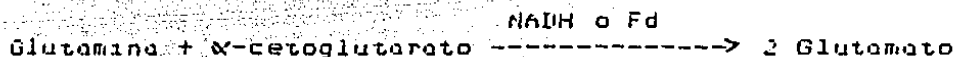


Esta enzima también es capaz de utilizar  $\text{NH}_2\text{OH}$  como sustrato:



Existen dos isoenzimas de la GS, (Nishimura et al, 1982; Hirel et al, 1982; Guiz et al, 1979), una en el citoplasma GS (I) y otra en el cloroplasto GS (II). Rhodes (1975) determinó que la Km de esta enzima para el amonio (siendo similar para ambas isoenzimas) es muy baja y además que la actividad de la GS disminuye en presencia de 5 mM de amonio.

En 1970 Tempest encontró que cuando crecía un cultivo de Aerobacter aerogenes en condiciones limitantes de amonio, la síntesis del glutamato provenía de una vía distinta a la de la GDH. De esta forma descubrió a la glutamato sintasa (E.C.1.4.1.14 L-Glutamato: NAD-oxidoreductasa), enzima que cataliza la siguiente reacción:



Cuatro años más tarde esta enzima fue descubierta en plantas (Fowler et al, 1974, Miflin y Lea 1974). Actualmente se sabe que en plantas existen dos GOGAT, una dependiente de NADH y la otra de ferredoxina (Matah et al, 1979). Oaks et al (1979) encontraron una marcada estimulación en la actividad de la GOGAT cuando añadía  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a sus preparaciones (extractos de endospermo y raíces de maíz). También encontró que la GOGAT es activada por KCl. Se ha encontrado que la actividad de la GOGAT-Fd se incrementa paralelamente conforme el proceso de enverdecimiento avanza, a diferencia de la GOGAT-NADH que no se ve afectada (Murillo y Sánchez de Jiménez, 1985).

Los experimentos de marca con  $^{15}\text{N}$  y la medida de las actividades enzimáticas han permitido determinar que la vía GS/GOGAT es la ruta principal de asimilación de amonio (Lea y Miflin, 1974), en tanto que la función de la vía de la

GDH, si bien se le ha dado un papel detoxificante (Givan, 1979), su función aún se encuentra en discusión.

- Distribución de las enzimas del metabolismo nitrogenado.

En espinaca, una planta C-3, la NR se encuentra localizada en el citoplasma, en tanto que la NiR y la glutamato deshidrogenasa (GDH-NADPH) están en el cloroplasto mientras que la GDH-NADH se encuentra en la mitocondria (Magalhães et al, 1974). En las plantas C-4 la reducción del nitrato a nitrito parece ocurrir primariamente en las células del mesófilo, en tanto que la incorporación del amonio a compuestos orgánicos por la GDH se lleva a cabo en las células de la vaina vascular (Mellor y Tregunna, 1971; Rathnam y Gerald, 1976). Mientras que la incorporación del amonio a los compuestos orgánicos mediante el ciclo glutamino sintetasa, glutamato sintasa (GS/GOGAT) se lleva a cabo en las células del mesófilo (Rathnam y Gerald, 1976).

## II. ESTRES

En años recientes los biólogos han adaptado el término estres para cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable a los organismos vivos (Levitt 1980); por otro lado, los fisiólogos vegetales lo han definido como aquello



condición bajo la cual una planta no produce biomasa; en tanto que, para los fitoquímicos es aquella condición bajo la cual no se sintetizan productos secundarios.

Puesto que las plantas no pueden moverse, se ven sometidas a lo largo del día a una serie de estres como los mostrados en el diagrama 1:

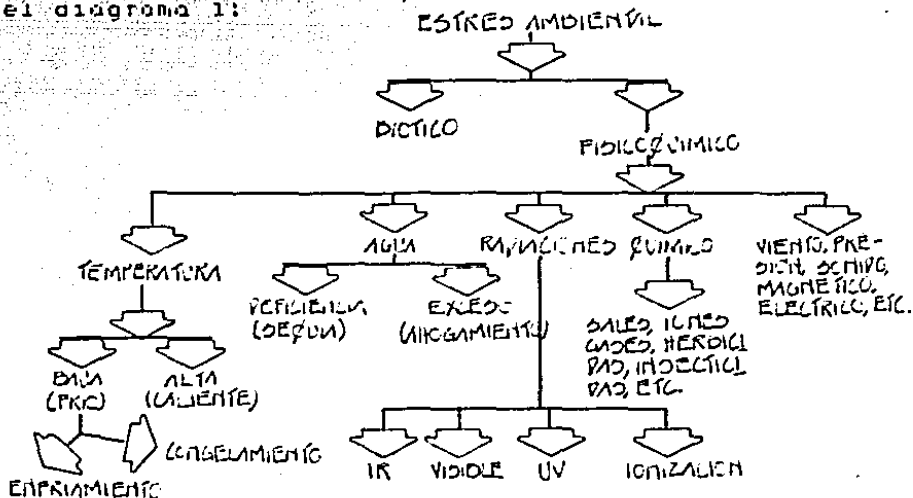


Diagrama 1. Diferentes tipos de estres a los que se ve sometida una planta (Levitt 1980)

## II.A. ESTRÉS DE AGUA.

En general los terminos de estres de agua y de sequia son utilizados indistintamente, mientras que cuando se trata de un estres de agua por exceso se le denomina ahogamiento.

La disminución del crecimiento celular por alargamiento es una de las respuestas más sensibles de la planta al estrés de agua, ya que el crecimiento celular está cuantitativamente relacionado al turgor de la célula, y el turgor de la célula disminuye al bajar el potencial de agua. En algunas plantas la inhibición del crecimiento puede deberse a potenciales de agua del orden de  $-1$  a  $-3$  bars (Levitt, 1980). Sin embargo, en otras plantas el crecimiento puede disminuir hasta que se tiene un potencial de agua de  $-50$  bars (Hsiao 1973).

La apertura de los estomas también se ve afectada por el estrés de agua. Como se sabe es a través de los estomas que el  $CO_2$  entra en las hojas de las plantas pero al mismo tiempo se evapora agua a través de ellos. Los movimientos de los estomas están regulados por la luz y la cantidad de agua en la planta (Ilgin, 1957; Hsiao, 1973). Otro parámetro que se altera por la sequía es la fotosíntesis, ya sea porque al disminuir el tamaño de los estomas se limita la absorción del  $CO_2$  o porque se reducen las actividades fotosintéticas del tejido verde y el contenido de clorofila (Numar y Monanty, 1983; Vyas et al, 1985). Durante un estrés de agua las actividades de las dos enzimas involucradas en la fijación del  $CO_2$ , la fosfoenol piruvato carboxilasa, PEPCase (E.C.4.1.1.31 Ortofosfato: oxaloacetato carboxi-lasa) y la ribulosa 1,5 bifosfato

carboxilasa oxigenasa, RUBPCasa (E.C.4.1.1.39 3-Fosfo-D-glicerato carboxi-liasa), disminuyen drásticamente (Levitt, 1980; Luna et al, 1985).

Otra enzima cuya actividad disminuye es la fenilalanina amonio liasa, PAL (E.C.4.3.1.5 L-Fenilalanina amonio liasa), (Bardzik et al, 1971; Hsiao, 1973). Sin embargo, otras enzimas incrementan su actividad durante el estrés de sequía, como es el caso de la glutatión reductasa (E.C.1.6.4.2 NAD(P)H: glutatión-disulfido oxidoreductasa) (Gamble y Burke, 1984), y la  $\alpha$ -amilasa (E.C.3.2.1.1 1,4-D-Glucan glucanohidrolasa). También hay indicios de que el estrés de agua puede aumentar la expresión genética de la  $\alpha$ -amilasa (Jacobsen et al, 1986). Otra enzima que muestra un aumento en su actividad bajo condiciones de estrés es la ribonucleasa (RNAsa) (E.C.3.1.26.1 Ribonucleato 5-oligonucleotidohidrolasa).

La modificación en la actividad de la ribonucleasa se produce en dos etapas: en la primera etapa hay un rápido incremento durante los primeros días del estrés seguido por una disminución, en tanto que en la segunda etapa se produce un incremento que se mantiene a lo largo del estrés, lo cual probablemente contribuya a su muerte (Levitt, 1980).

A los niveles de estrés en los que se producen cambios observables en las actividades enzimáticas, la división celular se encuentra inhibida. Cuando los tejidos llegan a este estadio fisiológico la concentración del ácido abscísico (ABA) comienza a incrementarse, principalmente en los tejidos de las hojas y en una menor proporción en otros tejidos y en las raíces (Sakurai et al, 1985). También, se ha observado que otros reguladores del crecimiento, como las citocininas, las cuales disminuyen a medida que aumenta el estrés de agua (Hsiao, 1973).

La germinación, al igual que el metabolismo de los carbohidratos, sufre modificaciones en presencia de un estrés de agua (Hegarty y Ross, 1980; Kotha y Small, 1985). También se ha observado una inhibición en la síntesis de las proteínas solubles durante el estrés de agua (Singh et al, 1973); mientras que otros grupos de investigadores han determinado que se produce un incremento (Handpal y Rao, 1985). Otros grupos de investigadores han reportado cambios en los patrones electroforéticos de las proteínas (Thakur y Rai, 1982). Desde el punto de vista anatómico hay cambios a nivel ultraestructural de las células corticales bajo condiciones de estrés de agua (Ciamporova, 1980). A nivel fisiológico se observa una acumulación de solutos (Osonubi y Davies, 1978; Sharp y Davies, 1979), tales como aminoácidos libres (Brossopoulos et al, 1985; Hsiao, 1973)

y prolina (Jagger y Meyer, 1977; Fukutoku y Yamada, 1984; Shevyakova, 1983).

Hasta la fecha no se sabe cual es la finalidad de que la planta acumule dichos compuestos. Sin embargo, Singh et al (1973 b) han propuesto que el contenido de prolina esta relacionado con la resistencia a la sequia de especies de cebada, permitiendo a la planta sobrevivir bajo dicho estrés, mientras que Stewart y Lee (1974) han sugerido que la prolina podria funcionar temporalmente como un compuesto de reserva de C, N y energia. Otra posibilidad es que estos compuestos funcionen como osmorreguladores, como en el alga unicelular Chlorella malhamensis. Este organismo sintetiza un compuesto poco usual, el  $\alpha$ -galactosil-glicerol, el cual aparentemente le sirve como un osmorregulador (Hsiao, 1976).

Como se puede apreciar de lo dicho anteriormente el estrés de agua causa una variedad de cambios bioquimicos y fisiologicos en las plantas, algunos de los cuales pueden ser los responsables de la adaptacion de algunas plantas al estrés.

## II.E. ESTRÉS DE SALINIDAD.

La mayor parte del estrés de salinidad producido en la naturaleza se debe a sales de sodio, particularmente el NaCl (Levitt, 1980). Si bien existe una relación directa e inseparable entre el estrés de salinidad y el de agua, el estrés de sal además expone a la planta a un segundo estrés osmótico o, como también se le ha llamado, un estrés de sequía fisiológico. Sin embargo, el estrés de salinidad por sí mismo produce efectos en la planta y por lo general se produce una inhibición, tanto del crecimiento como del desarrollo (Garg et al, 1982; Gomez et al, 1983), disminuye la germinación (Hasson y Poljakoff-Mayber, 1980), la fotosíntesis y la respiración (Shone y Gale, 1983). También se inhibe la velocidad de fijación del  $\text{CO}_2$ , debido a que las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y de la ribulosa 1,5 bifosfato<sup>-</sup> carboxilasa-oxigenasa disminuyen, pero hay un incremento en la actividad de la dehidrogenasa málica (Levitt, 1980).

El metabolismo de los ácidos nucleicos también se ve afectado por el estrés de salinidad (Isenov y Kabanov, 1983), al igual que el metabolismo de las proteínas. En general, se produce una disminución de su síntesis y un incremento en su hidrólisis, tanto en plantas cultivadas como silvestres (Levitt, 1980), independientemente de que en algunos casos hay una adecuada absorción y reducción del nitrato (Lanaola et al, 1973). En algunos casos, se ha

reportado una estimulación de la síntesis de proteínas como en el caso de plantas de cebada resistentes a la salinidad (Helaí et al, 1975).

Algunas enzimas presentan un incremento en su actividad bajo condiciones de salinidad, como es el caso de las peroxidasas (Kadir et al, 1984) y las ribonucleasas (Gómez et al, 1983) en tanto que otras enzimas presentan una disminución en su actividad, como la catalasa (Kadir et al, 1984). En algunos casos el aumento en la actividad se produce a bajas concentraciones de sal y la disminución a altas concentraciones, como es el caso de la malato dehidrogenasa (Kadir et al, 1984), es decir este fenómeno es una función de la concentración del NaCl que se encuentra produciendo el estrés.

Otro efecto producido por el estrés de salinidad son los cambios a nivel ultraestructural en las raíces (Harvey et al, 1985).

Al igual que en el estrés de agua, en el estrés de salinidad también se produce una acumulación de productos metabólicos (diagrama 3.), siendo los más frecuentes la prolina (Stewart y Lee, 1974, ShevyaKova 1984, Imanul y Larner, 1985) y la glicina-betaína (Grieve y maas 1984).

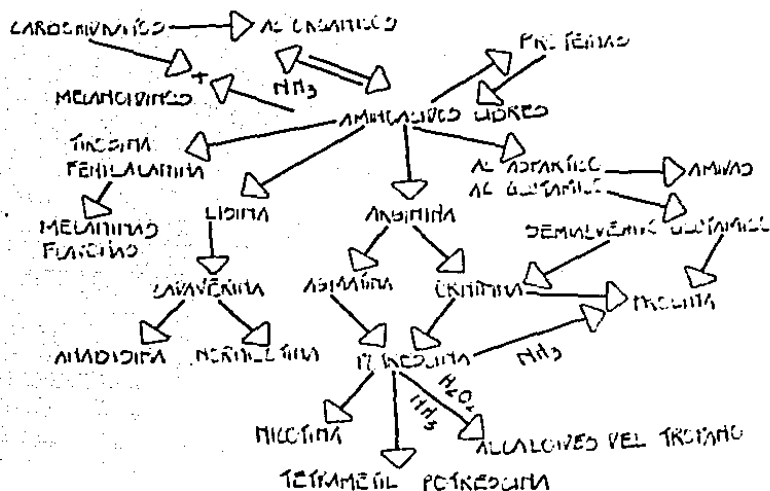


Diagrama 2.

El ácido abscísico (ABA) se incrementa en las hojas en respuesta a varios tipos de estrés: deficiencia de nutrientes, toxicidad por salinidad, enfriamiento, sequía y anegamiento, y puesto que la reducción del turgor y del potencial de agua no están involucrados en todos los diversos tipos de estrés, podría ser que el ABA fuera el fitohormonal universal del estrés. En todos los casos hay una reducción en el crecimiento y del metabolismo, conservándose así los recursos para cuando desaparezca la condición de estrés. (Hsiao, 1973, 1976; Sakurai et al, 1985).

### III. EL ESTRÉS Y EL METABOLISMO NITROGENADO

Hay muy poca información acerca del efecto del estrés de agua sobre el metabolismo nitrogenado. Se sabe que hay una



disminución en la fijación del nitrógeno (Aparicio et al, 1980), y además se presenta una disminución en la toma de nitrato, conforme el potencial de agua disminuye (Tallak y muller, 1981; Yamada y foole, 1984), así como del flujo de nitrato a las hojas (Fukutoku y Yamada, 1984). La actividad de la nitrato reductasa en las plantas esta influenciada por factores ambientales. Esta es una enzima inducible por su propio sustrato, el nitrato; y como ésta tiene una vida media muy corta *in vivo* e *in vitro* es por eso que cualquier factor que afecte la disponibilidad del nitrato o de la síntesis de proteínas, afectaran su actividad. Durante el estrés de agua la actividad de la NR se pierde rápidamente, (Uyas et al, 1985; Smirnoff et al, 1985; Piout, 1974) a diferencia de otras enzimas, como la glutamino Sintetasa que no se ve afectada (Taylor et al, 1982), o se encuentra solamente disminuida (Kaur et al, 1985).

Otra enzima que siempre presenta una disminución durante el estrés de sequia en su actividad es la nitrogenasa (Kaur et al, 1985). La única enzima de la asimilación del amonio que se encuentra aumentada durante el estrés de agua es la glutamato dehidrogenasa (Jager y meyer, 1977; Kaur et al, 1985). Solo existe un reporte, en nodulos de alfafa, en el que se demuestra que la actividad de la glutamato dehidrogenasa se encuentra inhibida, en tanto que los

enzimas de la ruta glutamino sintetasa/glutamato sintasa se encuentran activas (Rezana et al, 1984).

Por otro lado tambien existe poca informacion acerca del efecto del estres de salinidad sobre el metabolismo nitrogenado.

Helal et al (1975) han observado que, en cebada tipo primavera, bajo un estres de salinidad se mejora la toma de nitrogeno, ademas de haber una mayor incorporacion de nitrogeno en la fraccion proteica, en contraste con la cebada tipo invierno, en la que el estres de salinidad no afectaba la toma de nitrogeno (Helal y Mengel, 1979). Los reportes del efecto de la salinidad en la asimilacion del nitrogeno son contradictorios, por que no hay estudios en los que se hayan medido todos los procesos de asimilacion del nitrogeno simultaneamente. Por ejemplo Aslam et al (1984), demostraron que mientras que la toma de nitrato es inhibida, la reduccion del nitrato y del nitrito fueron poco afectadas, lo que sugiere que el estres por salinidad afecta la actividad del transporte del nitrato y como consecuencia la actividad de la NR.

Tambien se han hecho estudios con respecto a la toma de amonio (Pessarakli y Tucker, 1985), y esta se encuentra disminuida bajo un estres de salinidad.

La actividad de la NR también se ve inhibida por el estrés de salinidad (Heimer, 1973; Safaraliev et al, 1985), sin embargo existen reportes en los que miden la actividad de la NR in vivo y encuentran un incremento en su actividad (Sankla y Huber, 1975; Pottacin et al, 1984).

Al igual que en el estrés de agua, la nitrogenasa disminuye durante el estrés de salinidad (Abdel y zahran, 1981).

Estudios hechos en plantas no resistentes a la salinidad demuestran que las actividades de la GDH y de la GS se encuentran inhibidas bajo condiciones de estrés de salinidad (Rakova et al, 1978). Por otro lado, cuando se estudio el comportamiento de dos genotipos diferentes de mijo (Pottacin et al, 1984) se encontró aumentada la actividad de la GDH-NADH en ambos genotipos, a diferencia de las enzimas GS/GOGAT, cuyas actividades fueron altas en el genotipo resistente y bajas en el genotipo no resistente, lo que sugiere que la resistencia a la salinidad podría estar dada en parte por la presencia de la ruta GS/GOGAT. Datos similares han sido obtenidos en las plantas halofitas en las que se produce un estrés de salinidad (Billard y Boucaud, 1980).

## HIPOTESIS

Las plantas responden a los diferentes tipos de estrés mediante la síntesis de compuestos nitrogenados, parte de los cuales son sintetizados a partir de aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas. Sin embargo, la cantidad de compuestos nitrogenados sintetizados sobrepasa la de los provenientes de la degradación de proteínas, por lo que debe existir una asimilación de nitrógeno. Esto sugiere que además de la regulación normal de las enzimas que asimilan el nitrógeno debe existir un control proveniente de la situación de estrés por lo que para la planta. Cada tipo de estrés provoca la acumulación de diferentes compuestos nitrogenados, por lo tanto es probable que dependiendo del tipo de estrés se manifieste específicamente alguna de las vías de asimilación del amonio.

En este trabajo se plantearon las siguientes preguntas:

- 1.- ¿Cuál de las dos vías de asimilación de amonio conocidas está funcionando bajo condición de estrés ?
- 2.- ¿es la edad fisiológica de la planta un factor a considerar en la respuesta al estrés ?

3.- Si los nuevos compuestos son sintetizados a expensas de los aminoácidos, entonces se encuentra disminuida su poza?

4.- Esto lo poza de prolina y los alcaloides aumentados ?

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

Determinar como se afecta la asimilación de amonio durante los estres de sequia o de salinidad en plantas de E. roseus y si existe alguna relacion entre estres y acumulacion de alcaloides.

### Objetivos Especificos:

1.- Determinar el efecto del estres de sequia o de salinidad en el metabolismo nitrogenado, especificamente en las actividades de las siguientes enzimas:

GDH (Gluclorogenasa glutamica)

GS (Glutamino sintetasa)

en plantas de E. roseus de 0.5 y 2.5 años de edad.

2.- Determinar el contenido de proteínas totales, así como las porces de aminoácidos totales, prolina y alcaloides totales.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron plantas de dos edades fisiológicas: 2.5 años y 8 meses, ya que por datos previos de nuestro laboratorio (Lopez, 1984), sabemos que la asimilación del nitrógeno cambia conforme cambia la edad de las plantas. De tal manera que la vida de las plantas de C. roseus pueden dividirse en tres etapas de acuerdo a su patrón de asimilación del nitrógeno. Una primer etapa que comprende hasta los 8 meses, una intermedia desde los 8 meses hasta los 2 años y la última de los 2 años en adelante. Por lo que la respuesta de estrés también podría estar variando de acuerdo a este comportamiento.

Las plantas cultivadas en tierra bajo condiciones de invernadero, se dividieron en 3 lotes. Uno se utilizó como testigo, los otros dos fueron utilizados para los tratamientos de sequía o salinidad. Cada lote estuvo formado por 13 plantas.

El lote control consistió en regar todos los días a las plantas con agua.

El tratamiento de sequía consistió en no regar las plantas durante el periodo de estudio, por lo que este estrés va aumentando conforme transcurre el tiempo. En tanto que el

tratamiento de salinidad consistió en administrar 400 ml de una solución 100 mM de NaCl al inicio del estudio, y después se volvió a regar con agua hasta que terminó el estudio, este hecho hace que el estrés se vaya disminuyendo al pasar el tiempo.

A los 0, 4, 8 y 14 días, se recolectaron las hojas y las raíces de cada uno de los lotes de las plantas de 2.5 años. Para las plantas de 6 meses los días del muestreo fueron 0, 3 y 11.

Todos los experimentos fueron hechos por triplicado. Para ello se hicieron sublotos de 4, 4, y 5 plantas, se formaron hojas de la misma edad fisiológica de cada sublote para cada una de las réplicas. Es decir cada réplica se llevó a cabo con el material de 3 plantas diferentes.

Todas las muestras fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y tanto de las hojas, como con las raíces, se hicieron polvos de acetona con el objeto de conservar mejor las muestras, así como de eliminar las interferencias debidas a fenoles y ácidos grasos que pudieran tener los tejidos. Las muestras se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



## MATERIALES Y METODOS

### A. MATERIAL

#### 1. Material biológico.

Se sembraron semillas de Catharanthus roseus de la compañía Lone Star Seed Co., en condiciones de invernadero (38 C en la luz, 20-22°C en la oscuridad y fotoperiodo natural). Para todos los experimentos se utilizaron hojas de C. roseus del mismo tamaño y edad fisiológica.

#### 2. Material de vidrio.

Todo el material de vidrio utilizado se lavo con detergente, se enjuago con agua destilada dos veces. Se seco en estufa (100°C).

#### 3. Reactivos.

Los reactivos empleados fueron de grado reactivo de las casas: Tecnica Quimica, J.T. Baker, Merck, Sigma, Pharmacia y Whatman.

### B. METODOS EXPERIMENTALES.

a) Preparación del material biológico para las determinaciones enzimáticas.

Se tomaron hojas (5 g) del mismo tamaño y a la misma hora (las 9 a.m.). Se lavaron las hojas con agua corriente y después dos veces con agua destilada. Se secaron entre toallas de papel, se cortaron en cuadros de aproximadamente 0.5 cm y se congelaron con nitrógeno líquido.

b) Preparación del extracto enzimático.

Se siguió el procedimiento mencionado a continuación:

- 1) El tejido se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 3 horas o más.
- 2) El tejido congelado se molió en un mortero hasta convertirlo en un polvo fino.
- 3) Al tejido pulverizado se le adicionó el amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.2 +  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5mM + mercaptoetanol 5 mM) en una relación 1:2.5 p/v y 5% (p/p) de polivinilpirrolidona.
- 4) La mezcla se homogenizó por dos minutos en una licuadora o en un politron.
- 5) El extracto obtenido en el paso anterior se pasó por 4 capas de gaza.

6) El filtrado se centrifugó a 14,000 g durante 30 min en el rotor JA-20 de la centrifuga Jn-21.

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

c) Polvos de acetona. (García et al, 1972)

1. Al tejido pulverizado se le añadió acetona y mercaptoetanol 14 mM en una relación 1:10 p/v.

2. La mezcla se homogenizó por 1 min en una licuadora a alta velocidad.

3. El homogenizado se filtró a través de 2 capas de papel Whatman No. 2.

4. Los pasos 2 y 3, se repitieron con la excepción de que se licuó a velocidad media, hasta que el licuado fue lo más transparente posible.

5. El precipitado se lavó con acetona, hasta que el filtrado fue totalmente transparente.

6. El polvo obtenido se dispersó sobre un papel y se dejó secar por varias horas a temperatura ambiente.

7. Los polvos se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

8. Estos polvos se trataron de la misma forma que el tejido normal para hacer la extracción de las enzimas.

a) Determinación de la actividad de la GS

La actividad de la GS se midió por el método de Kanamori y Matsumoto (1972). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	50 mM	1.5 ml	pH 7.5
ATP	6.6 mM	0.2 ml	pH 7.0 r.p
Glu-Na	192 mM	0.5 ml	
MgSO <sub>4</sub>	333 mM	0.1 ml	
NH <sub>2</sub> OH	20 mM	0.3 ml	pH 7.0 r.p
Cisteína	3.3 mM	0.1 ml	
Extracto		0.3 ml	
Volumen total		3.0 ml	

La reacción se inició con la adición del glutamato. La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C en lugar de los 15 min y los 30 °C respectivamente del método original. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final en el volumen total, excepto para el Tris. En cada determinación se usó un blanco a tiempo cero, es decir, contenía todos los reactivos y el mismo volumen de extracto enzimático pero la reacción se detenía a tiempo cero adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico.

El  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -hidroxamato formado se determinó adicionando 1 ml del reactivo de cloruro ferrico (volumenes iguales de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  al 10% en  $HCl$  0.2 N, AIC al 24% y  $HCl$  al 50%). Se centrifugó 15 min a 3000 rpm y se midió el incremento en la absorbancia a 540 nm respecto a cada blanco.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -hidroxamato formado por min. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -hidroxamato por minuto bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína.

#### e) Determinación de la actividad de la GDH-NADH

La actividad de la GDH-NADH se determinó por el método de Joy (1973) con ciertas modificaciones. La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.7 ml	pH 8.2
$\alpha$ -KG	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
$NH_4Cl$	100 mM	0.5 ml	
NADH	100 $\mu$ M	0.2 ml	
Extracto		0.1 ml	

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 en el volumen total, excepto para el Tris. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NADH transformados por minuto.

f) Determinación de la actividad de la GDH-NAD<sup>+</sup>

Para la determinación de la GDH-NAD<sup>+</sup> se usó el método de Loyola-Vargas (1983). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	2.1 ml	pH 9.4
Glu	60 mM	0.5 ml	
NAD <sup>+</sup>	600 μM	0.2 ml	pH 8.0
Extracto		0.2 ml	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD<sup>+</sup>, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD<sup>+</sup>. Se graficó el incremento en la

absorbancia a 340 nm. Se uso solo la parte lineal de la grafica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final en el volumen total, excepto para el Tris. La velocidad de la reaccion se expreso como nmoles de  $\text{NMU}^+$  transformados por minuto.

g) determinacion de proteinas. (Peterson, 1977).

Procedimiento:

extracto (0.1 ml) + 0.9 ml de agua destilada



agitar + 0.1 ml de DUC (deoxicolato de sodio al 0.15%)



agitar y dejar reposar por 10 min a temperatura ambiente

(T.A) + 0.1 ml de TCA (acido tricloroacético) al 70% frio.



agitar



centrifugar a 3,000 g por 15 min



descartar el sobrenadante y añadir a la pastilla 1.0 ml de agua destilada agitar + 1.0 ml de react. A (r.p): mezcla de volúmenes iguales de agua destilada, SFS al 10 % (dodecil-sulfonato de sodio) y CTC ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% + tartrato de potasio al 0.2% +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10%).



agitar y dejar reposar 10 min a temperatura ambiente. A continuacion agregar

0.5 ml del reactivo B: reactivo de Folin-Ciocalteu 1:3

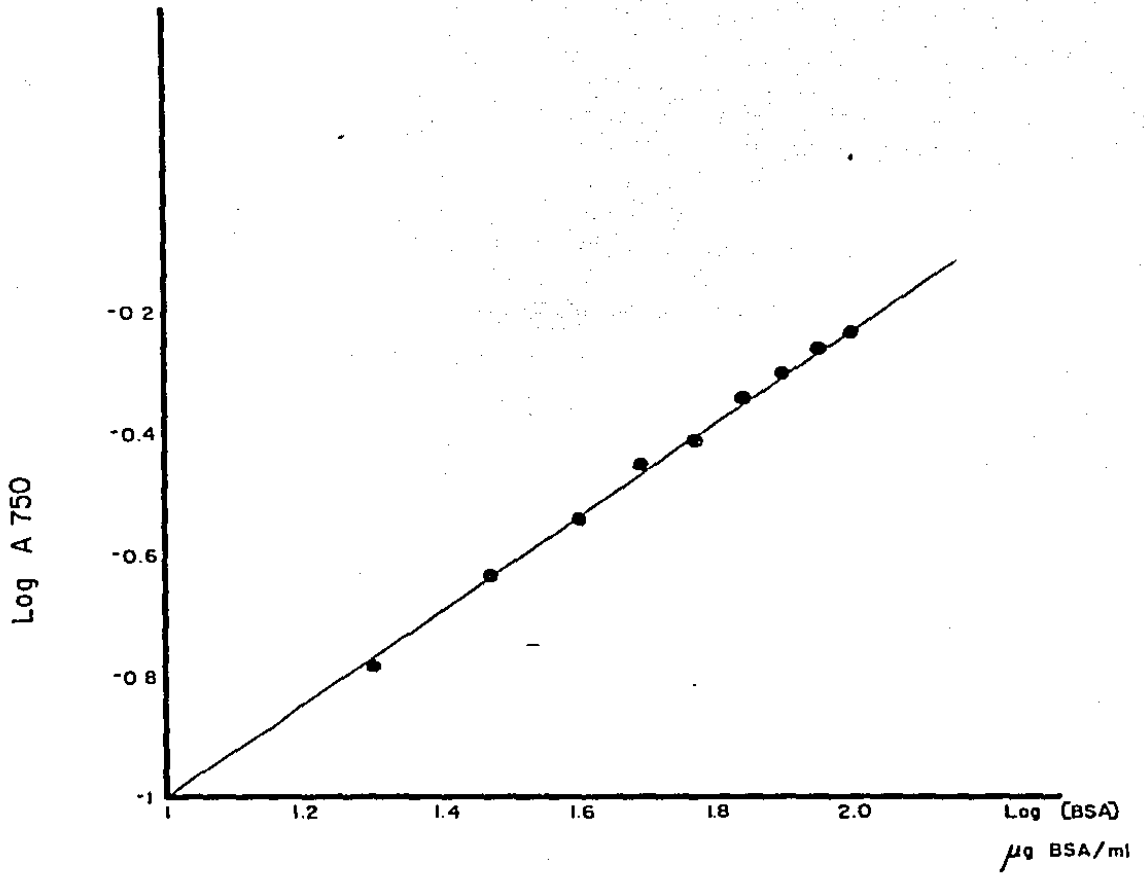
Reposar por 30 min para que se desarrolle el color y leer a 750 nm. Elaborar una curva patrón con albúmina sérica bovina en concentraciones de 10-100 mg/ml. (Fig 1).

n) Determinación de aminoácidos totales. (Metodo de Cocking, 1954).

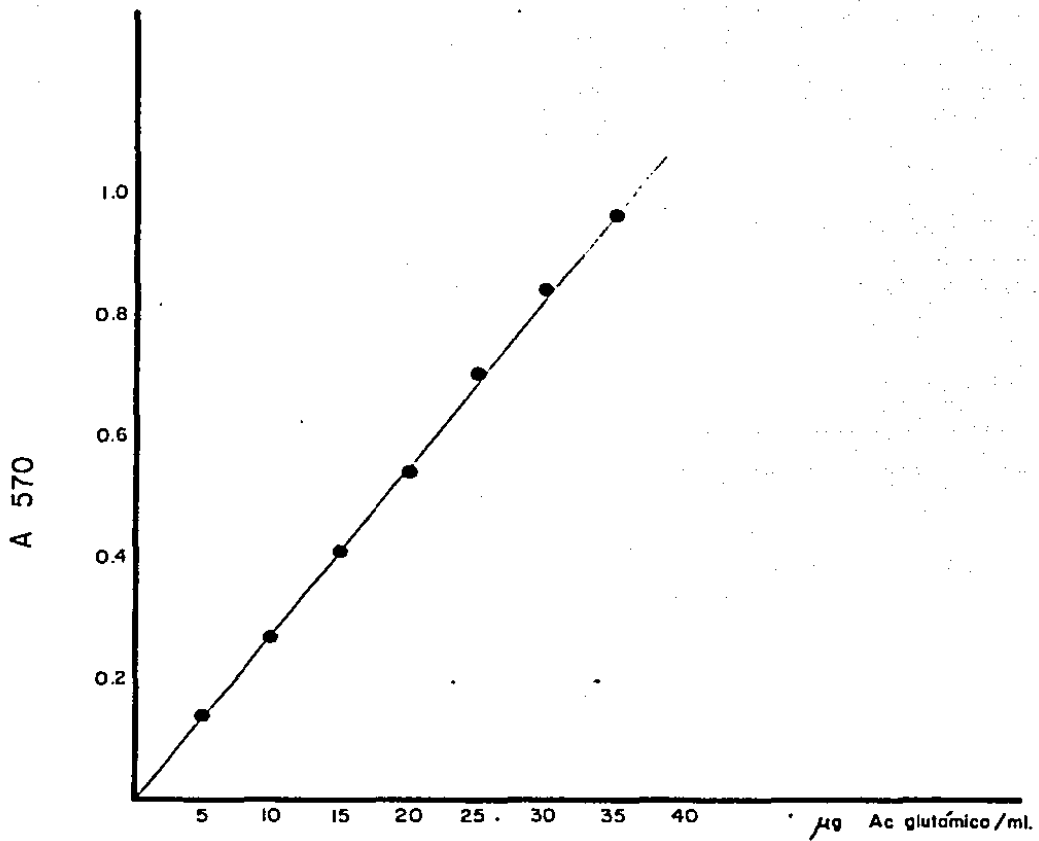
Reactivo A: amortiguador de citratos 0.2 M, pH 5.0. Agregar por cada 50 ml de amortiguador 0.08 g de  $\text{SnCl}_2$ . Reactivo B: tomar 10 ml de reactivo A y agregarle 0.4 g de ninhidrina previamente disuelta en 10 ml de metilcelosolve (etilenglicol-monometil éter).

metodo: extracto (0.05 ml) + 0.95 ml de agua destilada + 1.0 ml de reactivo B. Agitar y calentar en baño María a ebullición por 20 min. Dejar enfriar y agregar 2.5 ml de isopropanol al 50%. Agitar de nuevo y esperar 15 min antes de leer a 570 nm. Elaborar una curva patrón de 5-50 mg con ácido glutámico. (Fig 2).





**Curva Patrón de Proteínas**



**Curva Patrón de Aminoácidos Totales**

1) Determinación de prolina. (Bates, 1973).

El reactivo de ninhidrina se prepara calentando 1.25 g de ninhidrina en 30 ml de ácido acético glacial y 20 ml de ácido fosfórico 5 M, con agitación hasta disolver. Mantener en frío (4°C); este reactivo es estable 24 por horas.

↓  
Se homogenizan 0.5 g de tejido.

↓  
10 ml de 3% de ácido sulfosalicílico

↓  
Se filtra en un filtro Whatman # 2

↓  
Se toman 2 ml del filtrado

↓  
Se añaden 2 ml del reactivo de ninhidrina

↓  
2 ml de ácido acético glacial

↓  
Dejar por 1 hora a 100°C

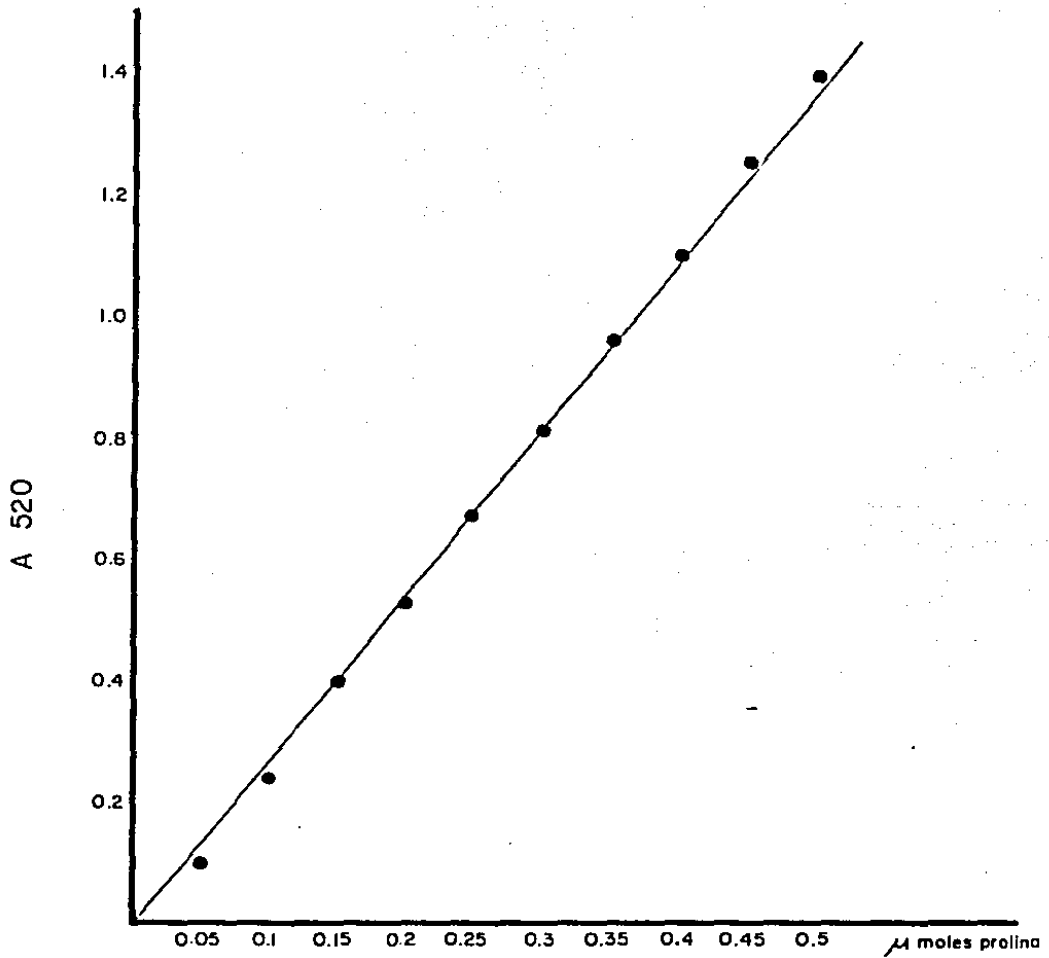
↓  
La reacción se para en un baño de hielo

↓  
La mezcla de la reacción se extrae con tolueno (4 ml)

↓  
Se toma el cromóforo que está en la fase acuosa

↓  
Se lee a 520 nm.

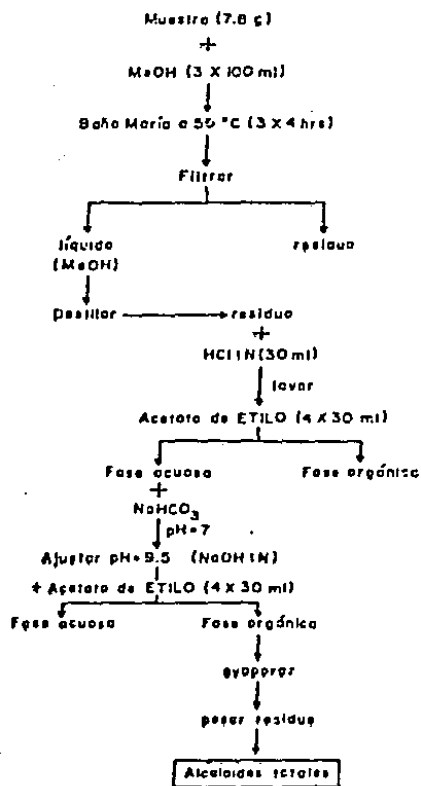
↓  
Se usa tolueno como blanco. La curva patrón se hace de 0 a 0.5 nmoles de prolina. (Fig 3)



**Curva Patrón de Prolina**

J) Extracción de alcaloides totales para plantas.

EXTRACCION DE ALCALOIDES



Kutney, P. J. and Lewis, S. L. (1980) *Phytochem.* 19; 2589-2595.

## RESULTADOS

Actualmente se sabe que la mayoría de las plantas, cuando se ven sometidas a estrés, como pueden ser los de sequia, salinidad, choque osmótico, etc., presentan un incremento en la proteólisis, una disminución en la síntesis de proteínas y una reducción de incorporación de aminoácidos a proteínas. (Helal et al, 1975; Drossopoulos et al, 1985). Todo estos fenómenos tienden a incrementar el nitrógeno total soluble en el tejido sometido a estrés. (Drossopoulos et al, 1985) sin dejar de mencionar que se sintetizan 3 o 4 proteínas específicas, dependiendo del estrés (Liang y Tuan-Huan, 1987).

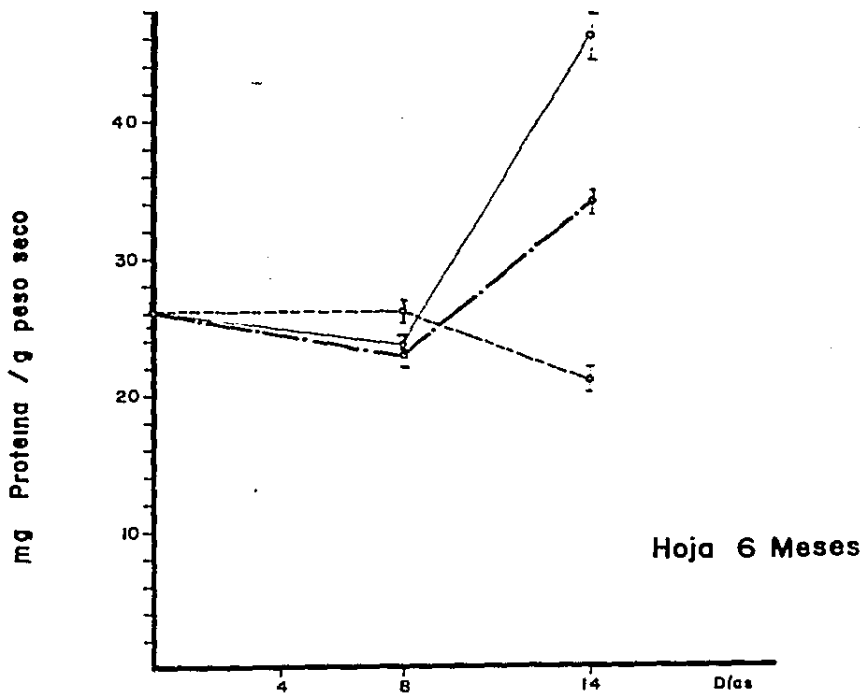
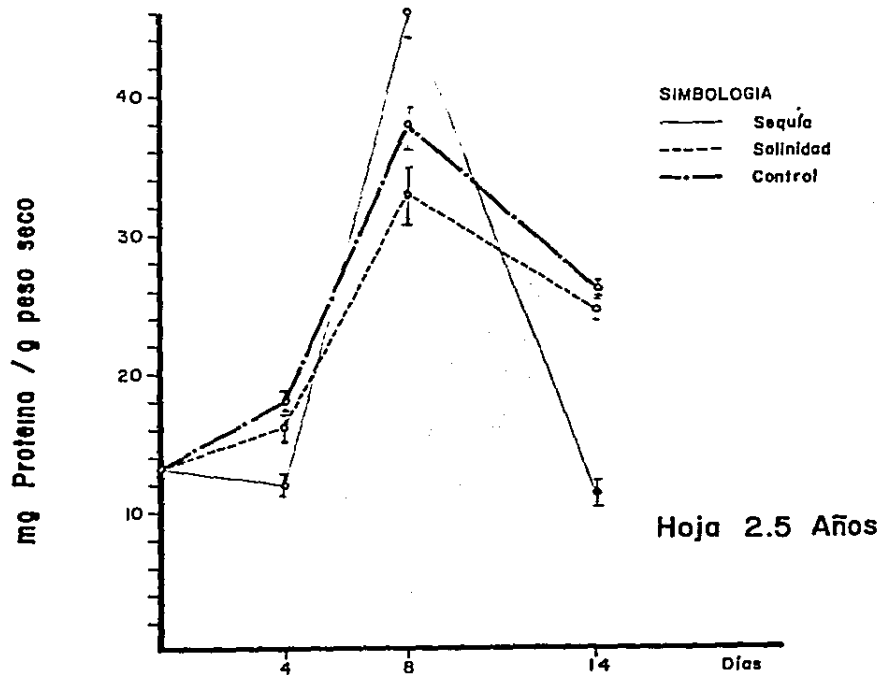
Sin embargo, cuando se hace una sumatoria del nitrógeno que aportan los procesos antes mencionados se vé que hay más nitrógeno, por lo que se ha asumido que aun bajo condiciones de estrés la planta asimila nitrógeno. Para corroborar esto, la medición de las enzimas que asimilan nitrógeno es un parametro fundamental para analizar como la planta esta asimilando nitrógeno cuando se encuentra sometida a algun tipo de estrés. El presente trabajo se encamina al estudio de dichos parametros.

Puesto que la disminución en la cantidad de la proteína es una respuesta temprana al estrés, este fue el primer parámetro que se midió.

En las hojas de plantas de 2.5 años (fig. 4) el contenido de proteína soluble fue similar tanto para el control como para las hojas sometidas a estrés de salinidad o lo largo de todo el periodo de estudio. En tanto que para el caso de estrés por sequía el comportamiento es similar al del control hasta el día 8, mientras que para el día 14 muestra una disminución significativa. Sin embargo este valor es solo similar al inicial. En cuanto a las hojas de plantas de 6 meses (fig. 4) solo hasta después del día 8 se presentan cambios en el contenido de proteína soluble. Durante la sequía hay un aumento en la cantidad de proteína soluble más pronunciado que el del control. En tanto que durante el estrés de salinidad se produce una disminución muy pequeña a los 14 días de iniciado el estrés.

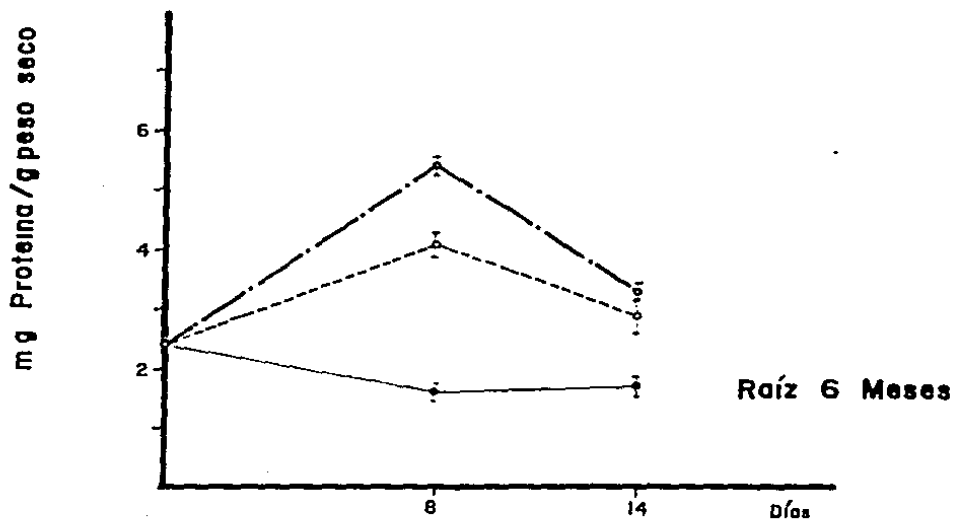
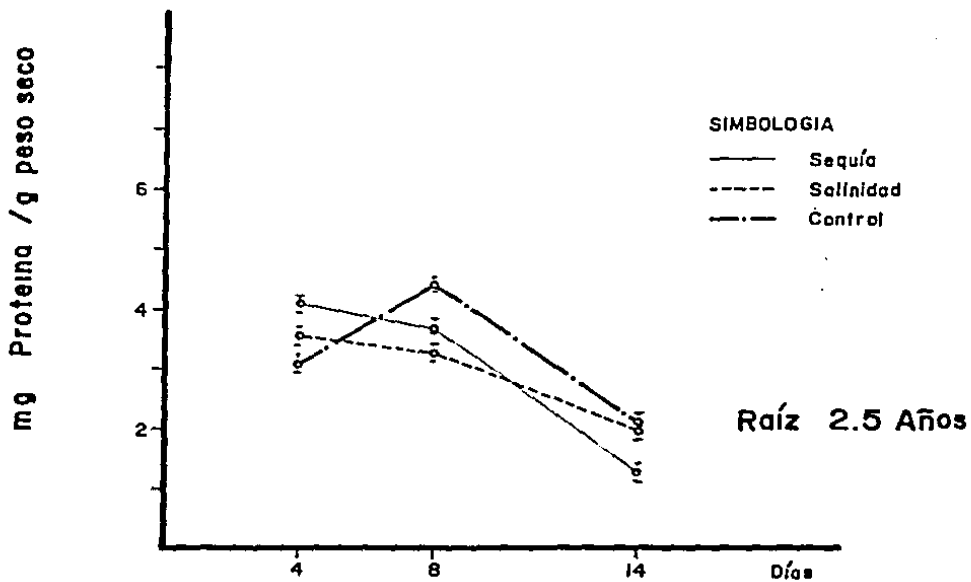
El contenido de proteína soluble en raíces de plantas de 2.5 años fue similar tanto en el control como en las plantas sometidas a estrés (fig. 5). Sin embargo, las raíces de 6 meses (fig. 5) sometidas a un estrés de salinidad o de agua presentan una disminución en el contenido de proteína soluble respecto al control, siendo más pronunciado el que produce el estrés de sequía.

# Proteínas totales





# Proteínas totales



La comparación de los 2 tipos de estrés en los 2 diferentes tejidos utilizados muestra que el estrés y las condiciones de crecimiento de las plantas, afectan en forma diferente a las hojas y a las raíces de las plantas tanto de 2.5 como de 0.5 años. En primer lugar, el contenido de proteína soluble por mg de peso seco es menor en las raíces y en segundo mientras que el contenido de proteína soluble aumenta en las hojas de plantas de 2.5 años, disminuye en las raíces de las mismas plantas. Algo similar se observa en las plantas de 0.5 años, ya que en tanto que la proteína soluble aumenta en las hojas del control a los 14 días, en las raíces este aumento se produce a los 8 días para luego disminuir al final del periodo de estudio.

Puesto que la poza de proteína soluble varía a lo largo de los tratamientos o del periodo de estudio, esto puede estar provocando un cambio en la poza de aminoácidos o bien el estrés puede estar produciendo la acumulación de algún aminoácido diferente de prolina o de glicina-betaina, como la alanina o mas aun puede estarse sintetizando algún osmorregulador cuya síntesis provenga de algún aminoácido y por ende modificando sustancialmente la poza de aminoácidos. De tal manera que este fue el siguiente parametro evaluado.

A partir del día 4 hay un aumento en la poza de aminoácidos totales ( la cual no incluye a la prolina) en las hojas de

plantas de 2.5 años (fig. 6) en los dos tratamientos, a diferencia del control, el cual se mantiene estable a lo largo de todo el periodo de estudio (fig. 5). Sin embargo, después de 8 días del tratamiento de sequía hay una marcada disminución en la poza de aminoácidos, provocada probablemente por su utilización en la síntesis de prolina o de alcaloides. Por el contrario en las hojas de 6 meses el tratamiento de sequía provoca un aumento en el contenido de aminoácidos totales en tanto que el de salinidad una disminución.

El contenido de aminoácidos totales en la raíz es menor que el de las hojas en los 2 tipos de plantas (fig. 7). Por otro lado el patrón de comportamiento es similar para los 2 tratamientos en las raíces de las plantas de 2.5 años, siendo el de sequía el tratamiento que provoca una mayor disminución. Sin embargo, al final del periodo de estudio los valores en la poza de aminoácidos totales es muy similar en ambos tratamientos y significativamente menor que el control.

En las raíces de 0.5 años el tratamiento de sequía provoca una disminución de aproximadamente el 50% en la poza de aminoácidos totales respecto al control en tanto que las variaciones producidas por el tratamiento de salinidad no son significativas si bien también hay una disminución al final del tratamiento.

# ( Aminoácidos totales - Prolina )

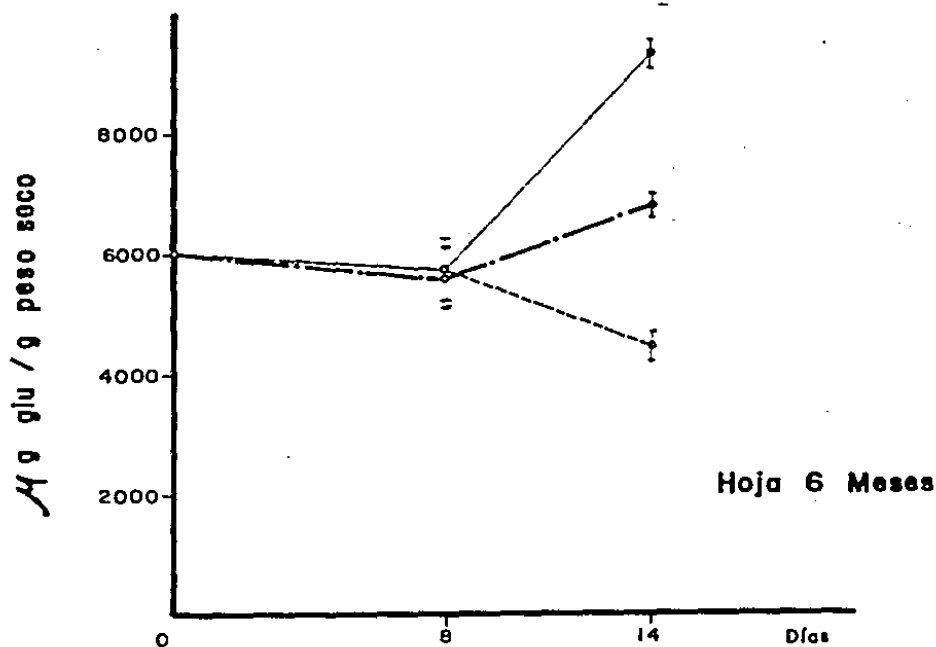
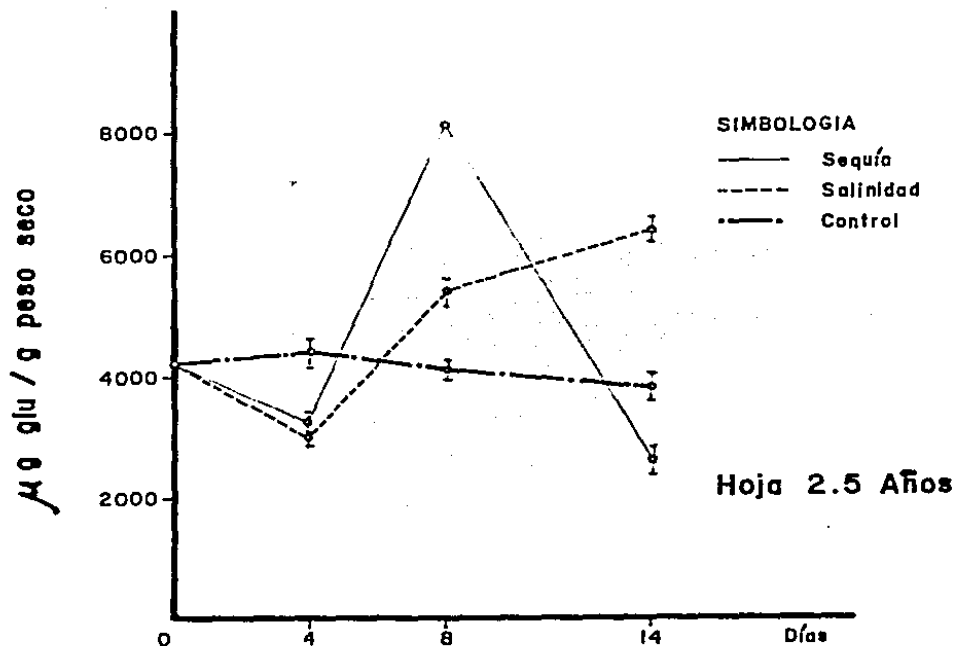
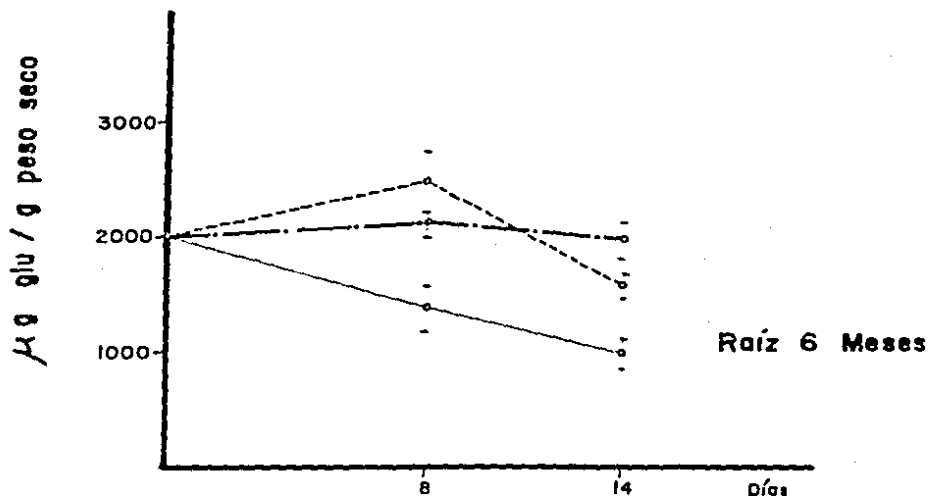
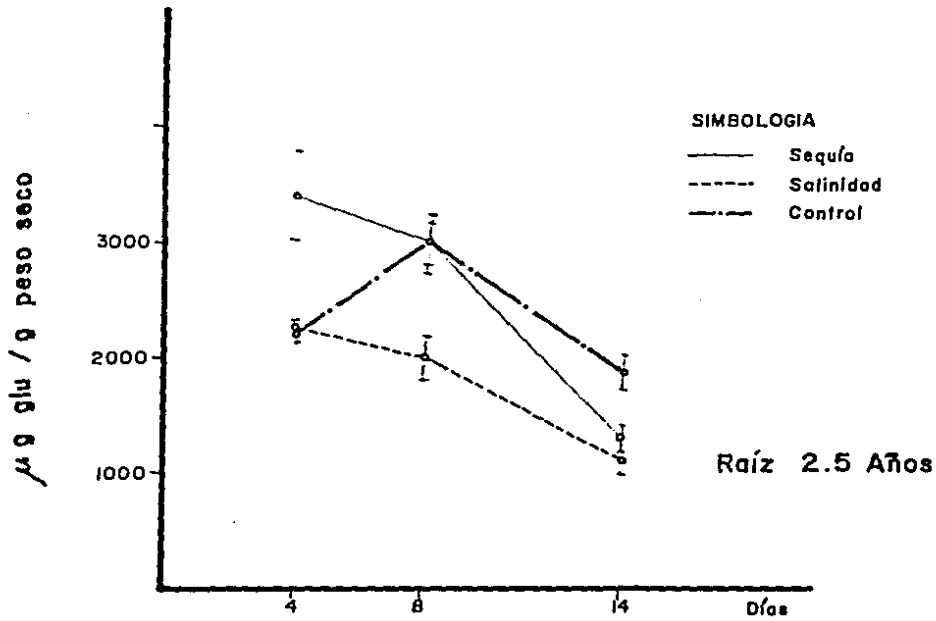


Fig 6

# ( Aminoácidos totales - Prolina )

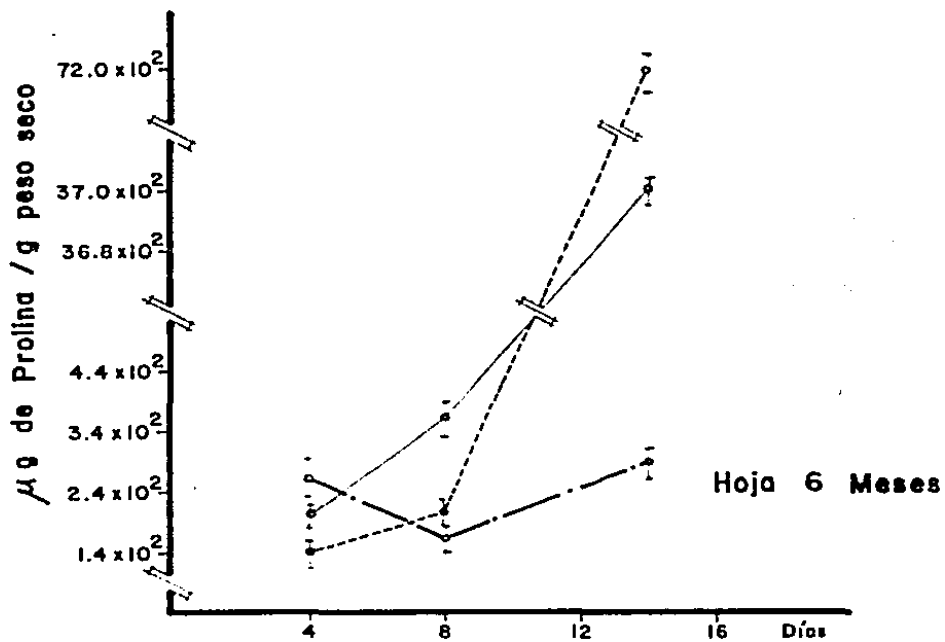
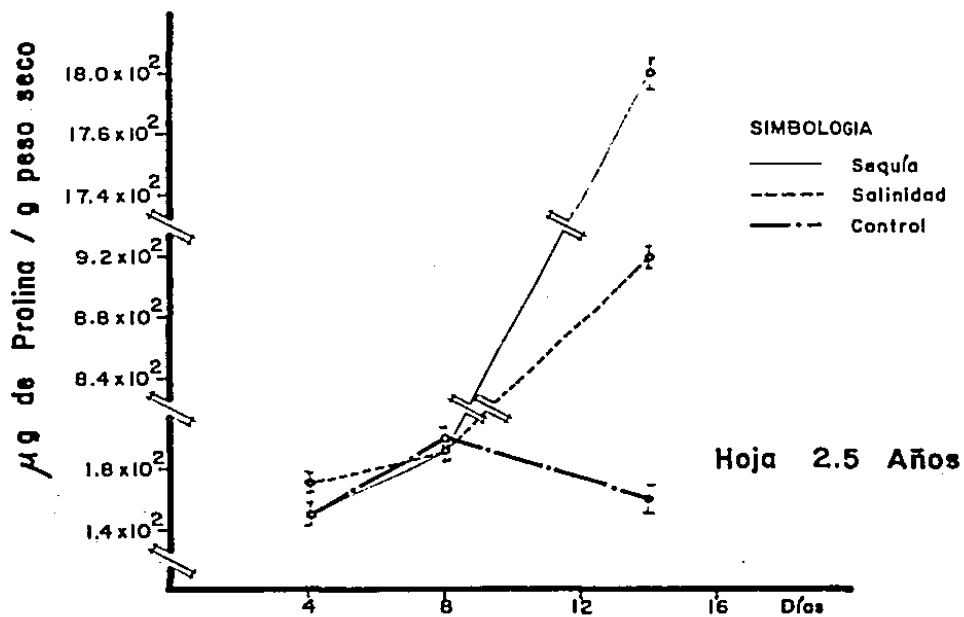


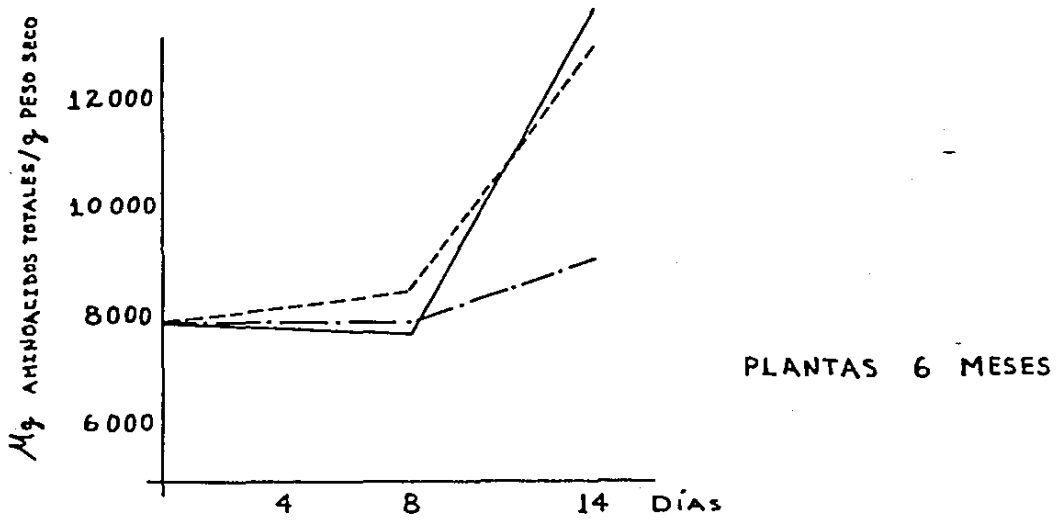
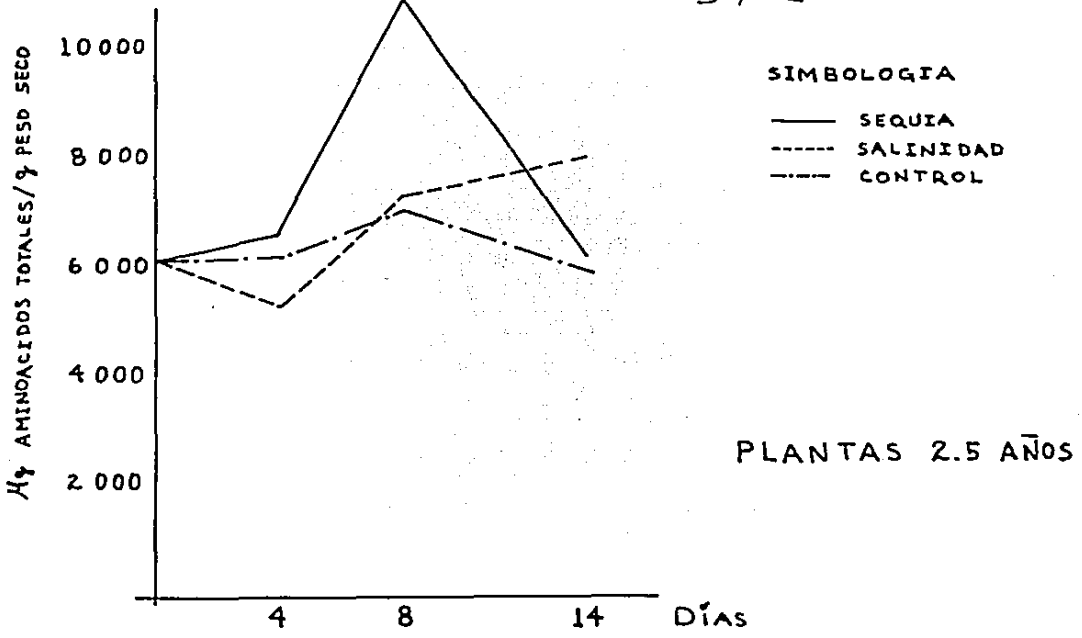
Una respuesta al estrés muy generalizado entre las plantas es la síntesis de bases cuaternarias de amonio, entre las cuales prolina y glicina-betaína son las más comunes. La prolina se sintetiza a partir de ácido glutámico (Paleg y Aspinall, 1981). Por lo que la disminución en la poza de aminoácidos totales podría deberse a un aumento en la poza de prolina.

En la figura 8 se muestra que efectivamente la poza de prolina se encuentra aumentada considerablemente tanto en las hojas de las plantas de 2.5 años como de 6 meses en ambos tipos de estrés. En tanto que al igual que en las raíces de Glycine\_max (Fukutoku y Yamada, 1984) y de maíz (Ibarra, comunicación personal) casi no hay prolina en las raíces de la planta C. roseus en ninguna de las 2 edades fisiológicas sometidas a estrés.

Cuando se hace la suma total de la poza de aminoácidos totales, es decir la suma de los aminoácidos tanto de hoja como de raíz más prolina (fig. 9) se observa que el valor del control permanece constante a lo largo del estudio tanto para las plantas de 2.5 años como de 0.5 años. Sin embargo, para el caso del estrés de salinidad en las plantas de 2.5 años este valor aumenta alrededor de 30% a los 14 días de tratamiento. En tanto que el tratamiento de

# Poza de Prolina





AMINOACIDOS TOTALES POR PLANTA



sequia provoca un aumento muy pronunciado a los 3 días, para luego volver a los niveles del control.

En las plantas de 0.5 años de edad el comportamiento es diferente ya que ambos tratamientos producen un incremento, muy similar, a lo largo del periodo de estudio y mucho mayor a la acumulación de aminoácidos totales en las plantas de 2.5 años.

Recientemente se ha reportado que otros compuestos, tales como los alcaloides, podrían ser la respuesta al estrés (Brachet y Cosson, 1986; Frischknecht y Baumann, 1985) de tal manera que una explicación a la disminución del contenido total de aminoácidos totales para plantas sometidas al estrés de sequia y al no aumento progresivo de los aminoácidos totales para el caso las plantas sometidas al estrés de salinidad. Sería que los aminoácidos además de utilizarse para la síntesis de prolina estuvieran siendo convertidos en otros compuestos, tales como poliaminas, glicina-betaina o alcaloides.

En este estudio, si bien no se cuantificaron los pozos de todos los compuestos que pueden producirse a partir de los aminoácidos, si se cuantificó el contenido total de alcaloides (Tabla 1).

	% de alcaloides totales / g peso seco		
	0 días	8 días	14 días
Control	6.10	6.22	6.20
Sequia	8.30	8.02	10.05
Salinidad	6.18	7.09	17.30

Los resultados de la tabla 1 muestran que mientras, en el control no hay ningún cambio en el contenido de alcaloides, ambos tipos de estrés sí provocan un aumento y considerable en la cantidad de alcaloides totales y que además a mayor tiempo de imposición del estrés, mayor contenido de alcaloides.

Datos preliminares en plantas de 6 meses sugieren que también hay un aumento de los alcaloides en ambos tipos de estrés.

Puesto que efectivamente hay un cambio muy pronunciado en la poza de aminoácidos totales, los cuales pueden provenir o de la degradación de proteínas o de la asimilación de nitrógeno desde el suelo, se requiere de la participación de los mecanismos de (re)asimilación del amonio, ya que en cualquiera de los 2 casos se produce amonio que tiene que ser rápidamente asimilado. Si esto es así alguna de las 2

vias. de metabolización del amonio, o las 2, deberán encontrarse funcionales durante el estrés. Para determinar como es metabolizado el amonio proveniente tanto de la asimilación como de la degradación de proteínas se midió la actividad de la GDH y de la GS, que son las enzimas responsables de la asimilación del amonio.

El estrés de sequía no afecta la actividad de la GDH-NADH en hojas de plantas de 2.5 años (fig. 10) mientras que el estrés de salinidad ocasiona, después de los 8 días, una disminución de dicha actividad; estos datos son consistentes con lo reportado por Rakova et al. (1978) para chicharo y maíz.

En las hojas de las plantas de 6 meses de edad, la actividad de la GDH-NADH (fig. 10) aumento a los 8 días en el control para luego disminuir. El tratamiento de sequía provocó un comportamiento muy similar al del control, mientras que el de salinidad no causó ningún cambio a lo largo del periodo de estudio. Estos datos son similares a los obtenidos por Kaur et al. (1985) en nodulos de *Vigna radiata*.

En las raíces de plantas de 2.5 años (fig. 11) que han sido sometidas al estrés de salinidad se presenta una disminución de un 20% 14 días después de haberse iniciado el estrés. Sin embargo en las raíces sometidas a un estrés

# GDH - NADH

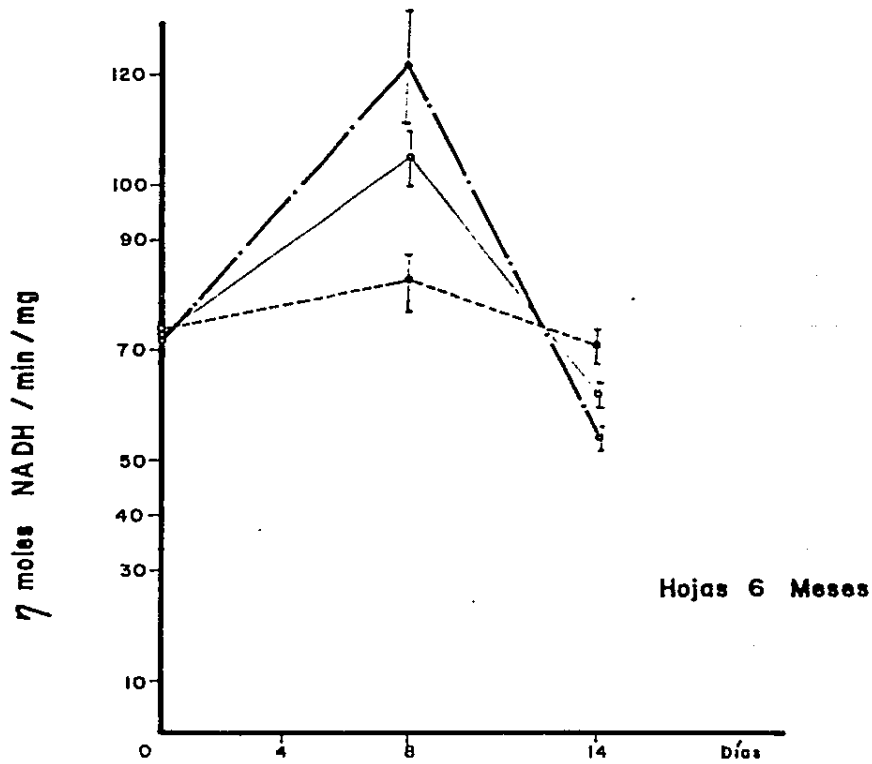
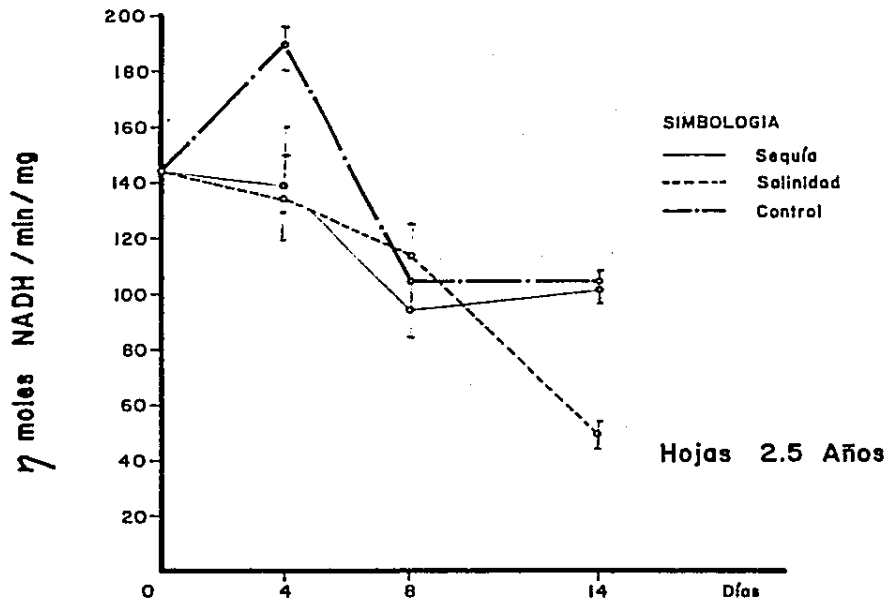
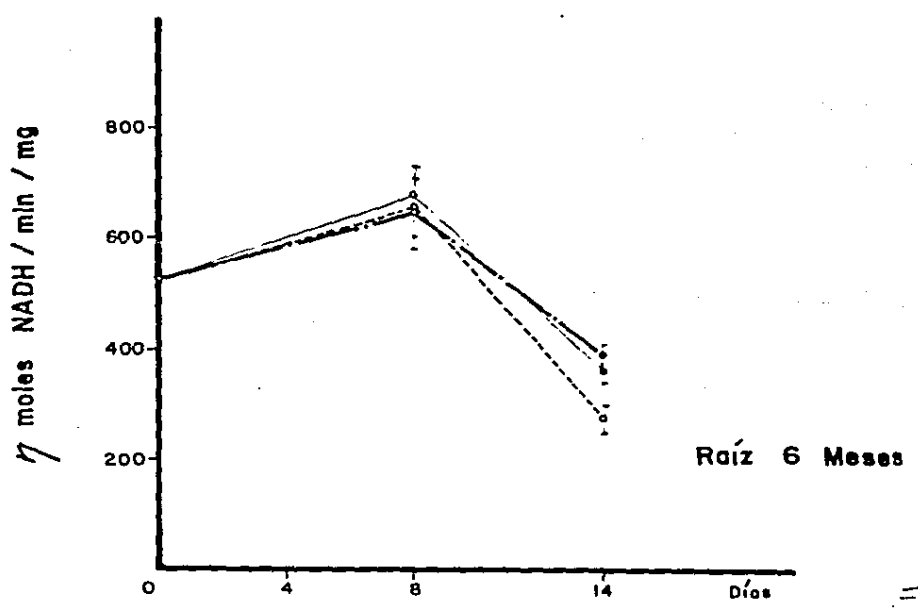
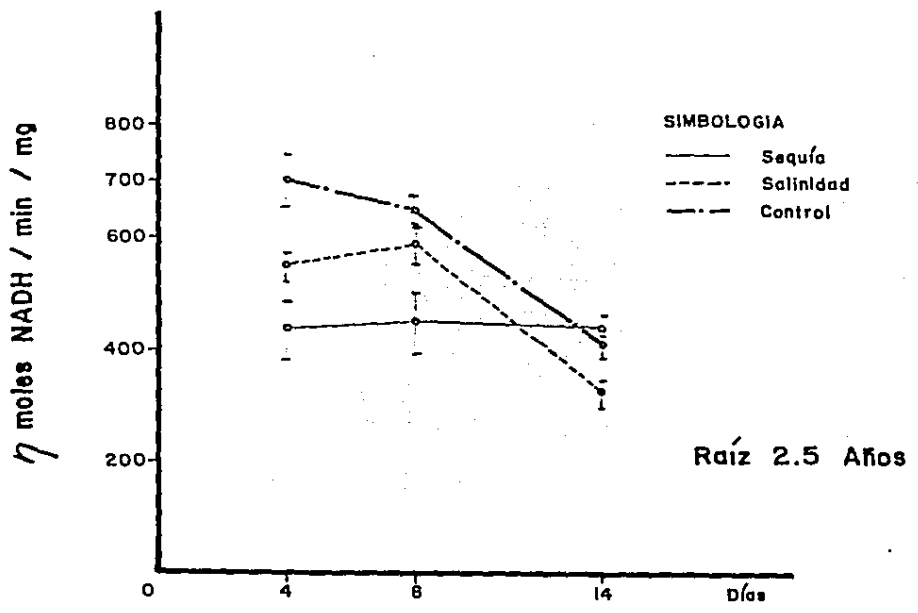


Fig. 15

# GDH - NADH



de sequia la actividad de la GDH-NADH no se ve afectada. Este comportamiento es semejante al que presentan las raices de maiz y Cannavalia ensiformis sometidas a un estres de sequia (Miranda, 1967).

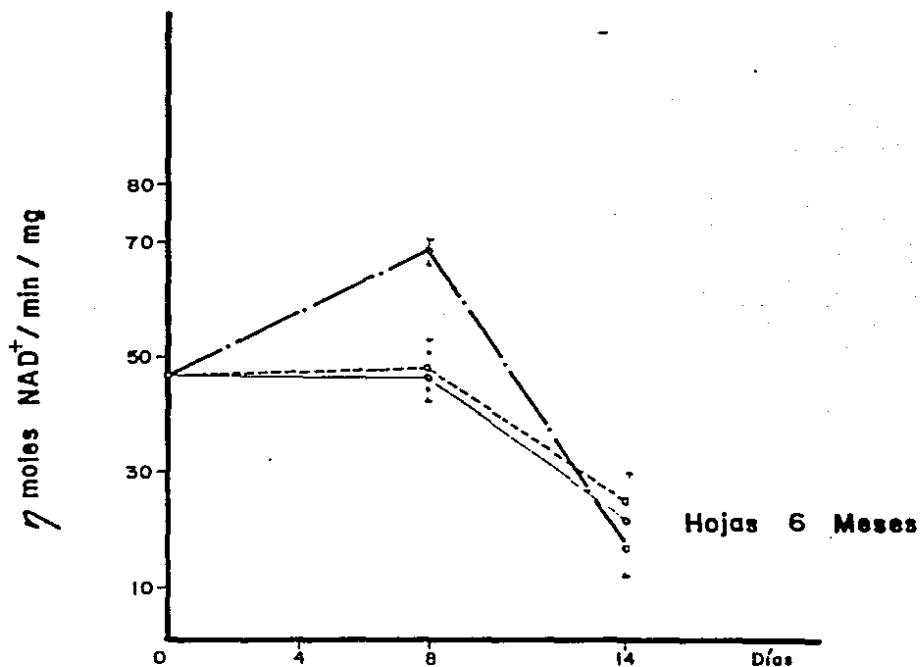
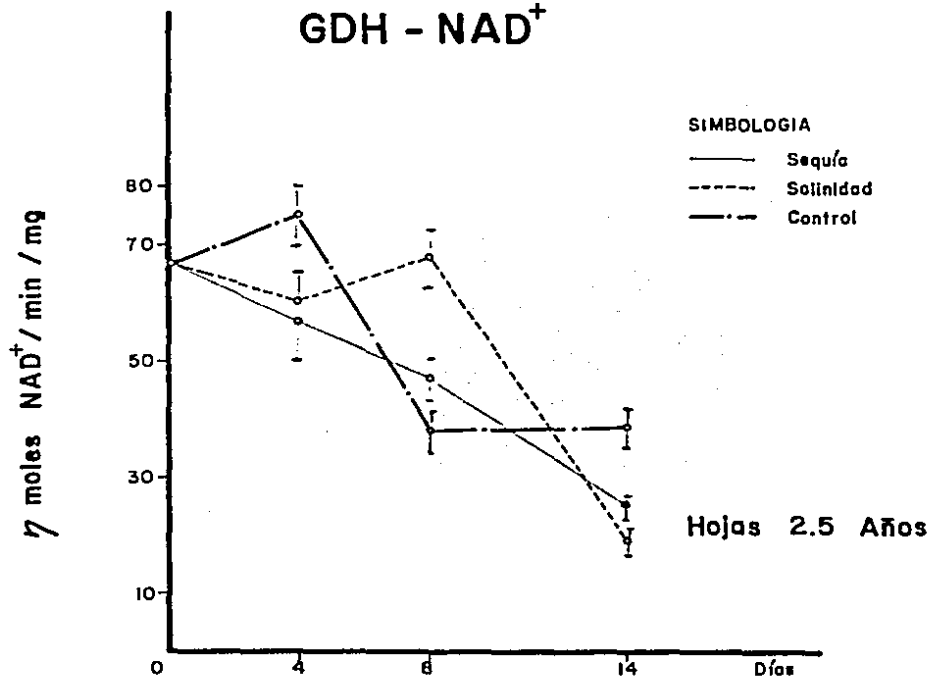
Por lo que respecta a las plantas de 6 meses (fig. 11) ambos tipos de estres producen el mismo patron de comportamiento que para el control, para la actividad de la GDH-NADH.

Puesto que la poza de aminoácidos no solo es el equilibrio entre lo que se sintetiza y lo que se utiliza para la sintesis de otros compuestos, sino que también lo que se degrada y ya que la GDH es capaz de catalizar también la degradación del acido glutamico, se midió su actividad en este sentido.

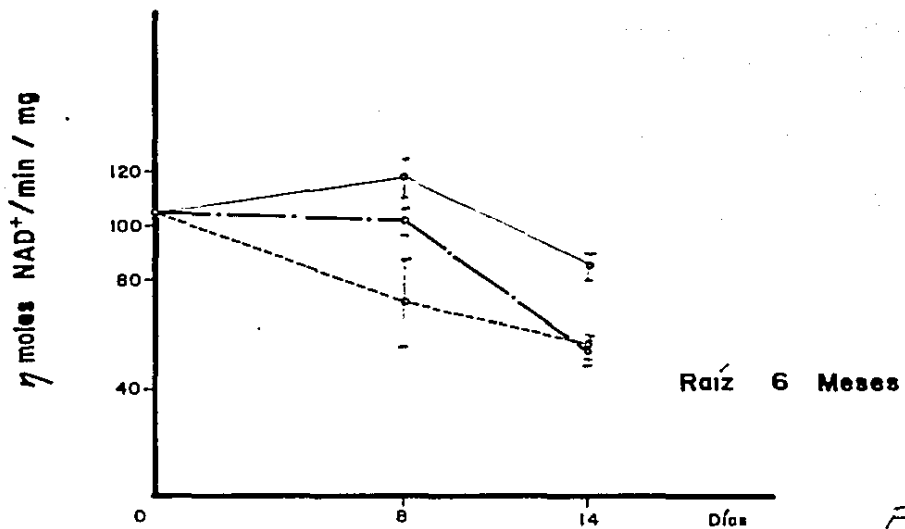
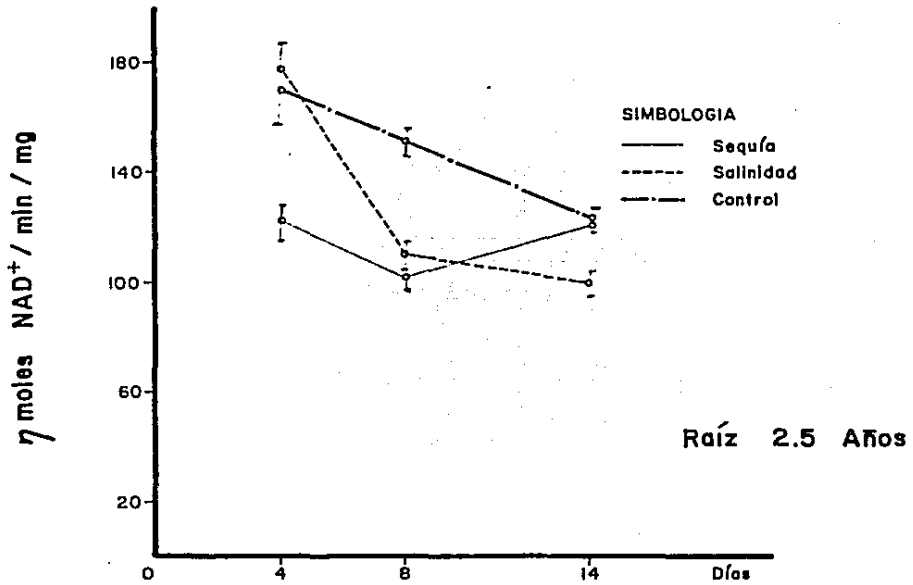
En las hojas de plantas de 2.5 años esta actividad solo se ve disminuida despues de 8 dias en ambos tipos de estres (fig. 12). En las hojas de 6 meses (fig. 12), la actividad de la GDH-NADH en el dia 8 presenta una disminucion comparada con el control sin embargo en el dia 14 la actividad se iguala a la del control.

En tanto que en las raices de plantas de 2.5 años (fig. 13) presenta una disminucion en el dia 8 en ambos tratamientos, sin embargo solo las raices de plantas sometidas a salinidad muestran una disminucion en el dia 14 comparadas

# GDH - NAD<sup>+</sup>



### GDH - NAD<sup>+</sup>





con el control. En el caso de las raíces de plantas de 6 meses, sometidas a salinidad (fig. 13), la actividad de la GDH-NAD en el día 8 es menor al control, si bien al final del periodo de estudio llegan al mismo valor. En tanto que las raíces de plantas sometidas al estrés de sequía presentaron una disminución menos marcada que el control.

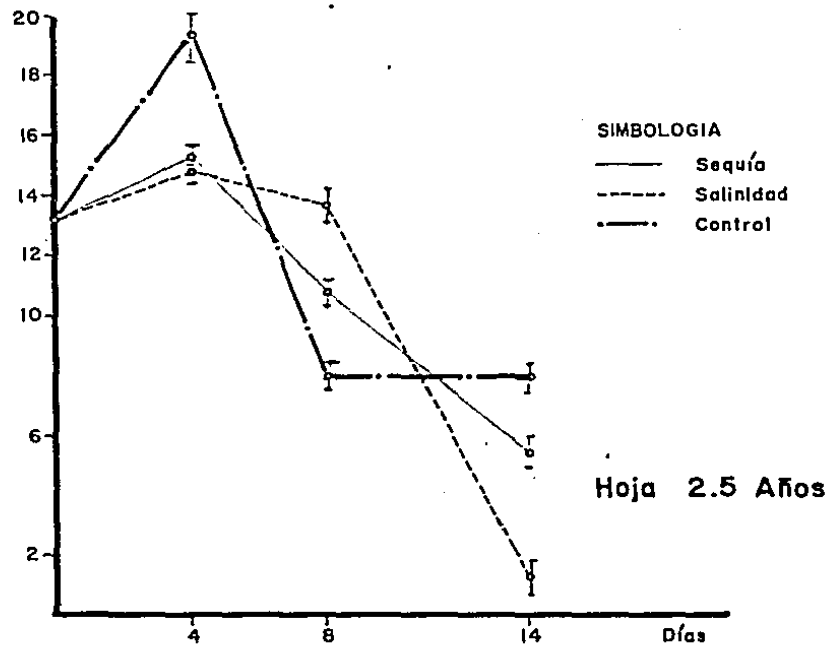
Es importante recalcar el hecho de que los patrones de comportamiento de la GDH-NADH y de la GDH-NAD son iguales tanto en cada uno de los 2 tratamientos como en las 2 edades de plantas utilizadas.

La actividad de la GS que es la otra enzima que asimila amonio, proveniente de las hojas de plantas de 2.5 años que fueron sometidas a los estrés de sequía o salinidad se mantuvo estable hasta el día 8. Después de este día (fig. 14) se produce una considerable disminución de esta actividad, siendo mucho más marcada en el estrés de salinidad. Este mismo comportamiento se presenta en las raíces de plantas de *C. roseus* de 2.5 años sometidas a estos 2 tipos de estrés (fig. 15) y con la muy importante excepción de que hasta el octavo día del tratamiento la actividad de la GS aumenta entre 80% y 100% en ambos tratamientos, lo cual hace una diferencia fundamental con la GS de las hojas (fig. 14).

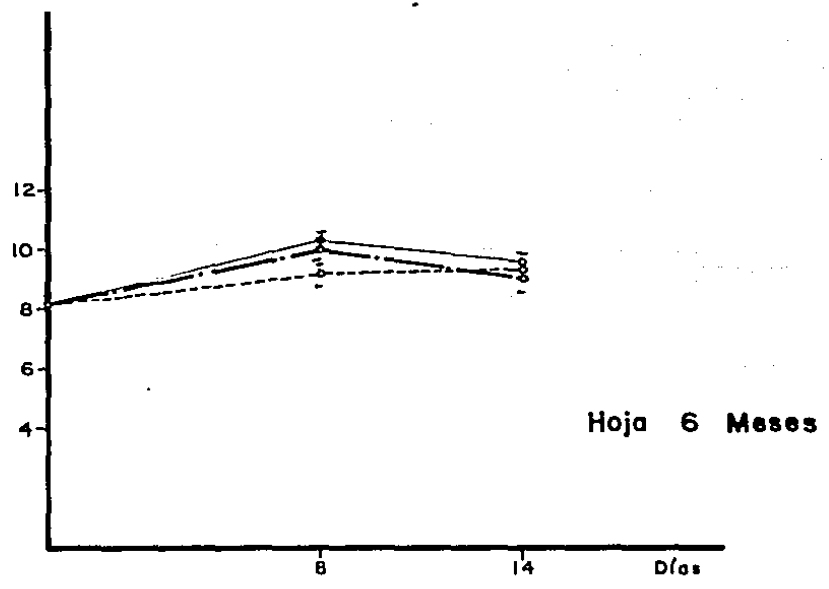
Por lo que respecta a la actividad de la GS presente en las hojas de las plantas de 6 meses, a diferencia de la de las plantas de 2.5 años, esta no se ve afectada por ninguno de los 2 tratamientos (fig. 14). La GS de raíz (fig. 15) de plantas de 6 meses sometidas a cualquiera de los 2 tipos de estrés, al igual que los de la hoja también es diferente al de las raíces de las plantas de 2.5 años. Ambos tratamientos producen una mayor actividad medible de la enzima a lo largo del periodo de estudio, siendo el estrés de sequía el que provoca los mayores aumentos. Ahora bien en este caso la actividad de la GS en las raíces de las plantas control disminuyó durante el periodo de estudio probablemente como respuesta a las condiciones de crecimiento en el invernadero. Este fenómeno resalta aún más el hecho de que durante el estrés la actividad de la enzima se mantenga, o aun más se aumente.

# GS

$\mu$  moles  $\gamma$  glutamyl  $\gamma$  hidromato / min / mg

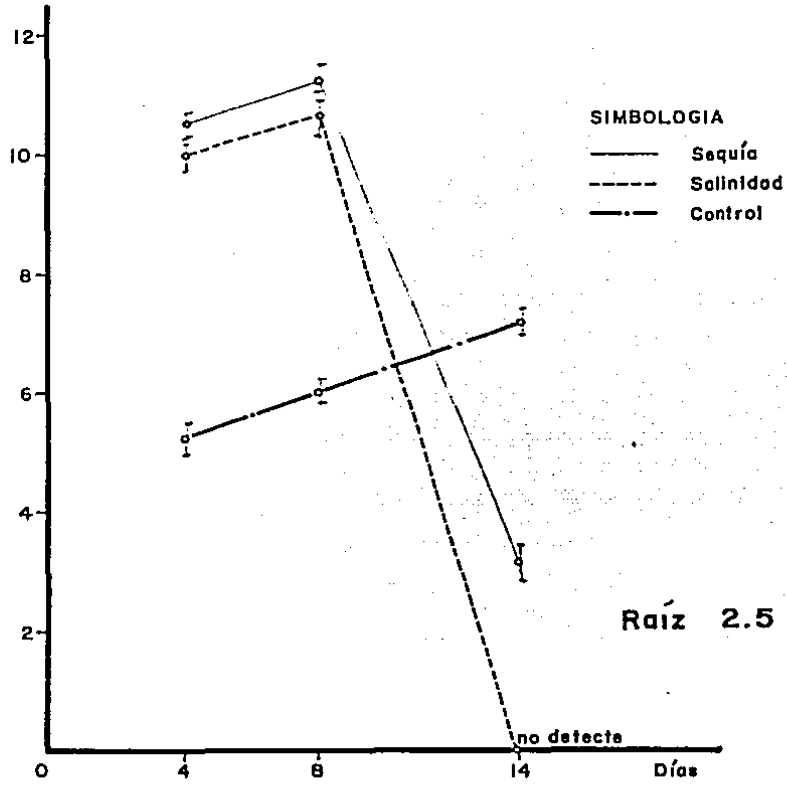


$\mu$  moles  $\gamma$  glutamyl  $\gamma$  hidromato / min / mg

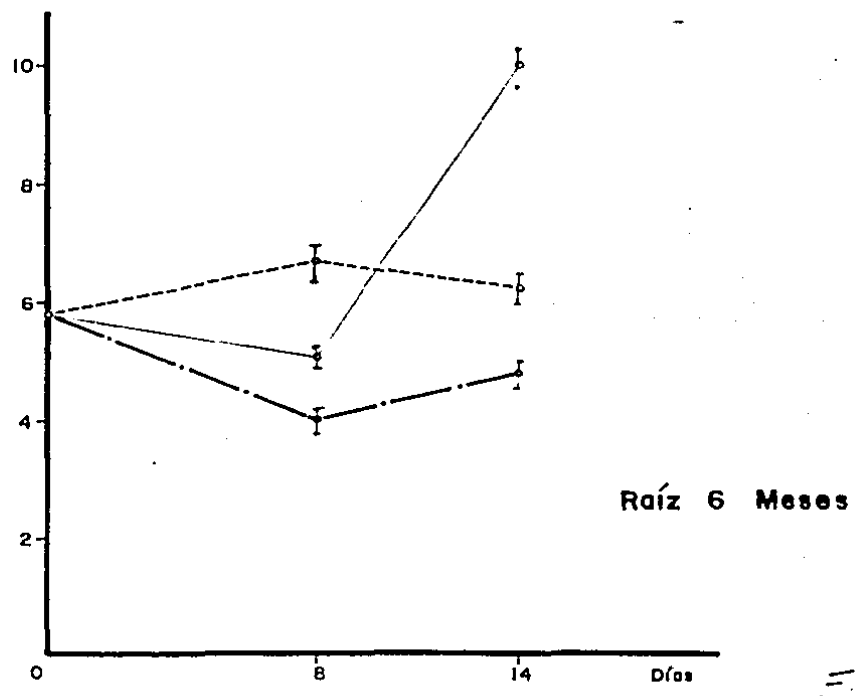


GS

$\mu$  moles  $\gamma$  glutamil  $\gamma$  hidromato / min / mg



$\mu$  moles  $\gamma$  glutamil  $\gamma$  hidromato / min / mg



## DISCUSION

*Catharanthus roseus*, una planta de la familia de las Apocynaceae, muestra una respuesta al estrés, en términos globales, similares al de plantas de familias como Leguminosae, Graminae, etc., (Aslam et al, 1984; Billard y Boucaud, 1980; Rakova et al, 1978; Drossopoulos et al, 1985; Miranda, 1987). Sin embargo, ya en forma particular se presentan respuestas que son características de la planta o probablemente del género y de la familia.

Otro aspecto importante que debe tomarse en cuenta en los estudios de estrés son la gran variabilidad que hay en los diseños experimentales. Por ejemplo, en el presente trabajo se utilizaron plantas crecidas en tierra de dos edades diferentes, 0.5 y 2.5 años de edad, bajo condiciones de invernadero. En este caso la longitud del periodo de luz, así como la cantidad de luz fueron las naturales. Por lo que respecta a la temperatura, esta osciló entre 18 y 38 °C entre la noche / el día.

Una forma muy generalizada de imponer o provocar el estrés de sequía en una planta es simplemente dejarla de regar, este fue el diseño seguido en el presente trabajo. Sin embargo, se han utilizado otras formas de provocar una

disminución en el potencial osmótico de los tejidos vegetales tales como el uso de PEG.

Otra manera de provocar una disminución en el potencial osmótico de una planta es no quitarle agua a los tejidos vegetales, sino aumentar la concentración de solutos en el interior de las células. este es el mecanismo del estrés de salinidad. En nuestro trabajo se hizo un riego inicial con una solución salina al inicio del estudio y después las plantas se regaron con agua hasta el final, teniendo la precaución de que el agua no fuera excesiva como para drenar fuera de la maceta al NaCl añadido al inicio. De tal manera de garantizar, en la medida de lo posible, que se provocara el estrés salino. Si bien en un sentido estricto cabe decirse que la magnitud del estrés salino no fue constante a lo largo del estudio, sino que fue disminuyendo.

C. roseus no es una planta que, por lo menos en la actualidad, se pueda crecer hidropónicamente, o en un soporte inerte, por lo que fue necesario crecerla de la manera mencionada en materiales y métodos y discutida en los párrafos anteriores. Por ello, para poder hacer comparaciones, se monitorearon los mismos parámetros a lo largo del estudio en un grupo de plantas control, de tal manera que, los resultados mostrados en el presente trabajo

con la comparación entre las plantas testigo y las plantas tratadas en cada uno de los días estudiados.

Hay ciertas respuestas de las plantas al estrés que se han visto que son bastante generales, como la degradación de proteínas (Singh et al, 1973; Kandpal y Rao, 1985; Takur y Rai, 1982; Levitt, 1980), la acumulación de bases cuaternarias de amonio, tales como prolina (Jagger y Meyer, 1977; Fukutoku y Yamada, 1984; Stewart y Lee, 1974; Shevryakova, 1984) y glicina-betaina (Grieve y Mass, 1984) y otras que son más particulares, que dependen tanto de la planta como del tipo de estrés, como la acumulación de poliaminas en Cannavalia ensiformis como respuesta al estrés ácido (Ecorer, comunicación personal) o como respuesta al choque osmótico en Avena sativa (Flores y Galston, 1984).

Por ello, al inicio de un estudio de esta naturaleza el primer paso debe ser la caracterización del fenómeno, tanto fisiológica como bioquímicamente, de tal manera que los datos obtenidos permitan la elaboración de un modelo, de preguntas más específicas que permitan profundizar y entender los aspectos moleculares de la respuesta al estrés de las plantas tal ha sido la finalidad del presente trabajo.

Si bien *Callitriche* responde al estrés en algunos parámetros de manera similar a otras plantas, en otros responde de una manera muy particular, dependiendo del tejido, el tipo de estrés y la edad de la planta. Por ejemplo en las raíces de las plantas de las 2 edades estudiadas la proteína soluble por gramo de peso seco disminuye como consecuencia o como respuesta al estrés (fig. 5) en tanto que en las hojas de plantas de 2.5 años aumenta en las etapas tempranas del estrés, al igual que el control, y después, dependiendo del tipo de estrés no varía (salinidad) o disminuye dramáticamente (fig. 4). Este comportamiento puede deberse desde luego a las condiciones de crecimiento de las plantas, es decir a la respuesta de la planta a un cambio en el medio ambiente bajo condiciones de estrés.

En otras palabras la marcada disminución en las proteínas total de la planta sometida a estrés de sequía puede ser el efecto combinado de dicho estrés como un día muy soleado o de alta temperatura. Sin embargo, existe realmente una diferencia de más del 100% en el contenido de proteína en las hojas de plantas sometidas a estrés de sequía, y el de las hojas de las plantas control o el de las plantas sometidas al estrés de salinidad muestreadas el mismo día (fig. 4).



A este respecto también debe decirse que la forma de expresar el parámetro es importante o la proteína soluble está expresada por gramo de peso seco, de tal manera que los cambios que se miden pudieran ser también el reflejo de los diferentes contenidos de agua de los tejidos. Por lo que probablemente una mejor manera de expresar los datos fuere por el número de individuos analizados o por planta.

El contenido de aminoácidos totales en las hojas de las plantas control, de las 2 edades, no varió a lo largo del periodo de estudio (fig. 5), en tanto que el estrés produjo en las plantas de 2.5 años un considerable aumento en su poza, si bien con el estrés de sequía en las etapas tardías hubo una muy marcada disminución (fig. 6). Esta diferencia entre los 2 tipos de estrés, así como la determinada en las hojas de las plantas de 6 meses, al igual que la diferencia en el contenido de aminoácidos de las plantas de 6 meses, sometidas a estrés respecto a las de 2.5 años (fig. 6) puede efectivamente ser un efecto característico de cada estrés o bien que a los 14 días ambos estrés hayan provocado un diferente contenido relativo de agua en el interior de la célula y por lo tanto se encuentren en diferentes estadios fisiológicos, por ejemplo diferentes volúmenes celulares; por lo tanto los cambios en el contenido de aminoácidos solo sean un reflejo o una consecuencia de estos diferentes estadios fisiológicos. Si esta

fuera la causa entonces, provocando contenidos relativos de agua de la misma magnitud mediante diferentes caminos (sequia, salinidad, choque osmótico) deberíamos esperar respuestas similares, tal y como ha sido propuesto por el Dr. E. Murillo.

Por otro lado es evidente, al igual que con el parametro de las proteínas solubles, que las hojas y las raíces responden de manera diferente a los diferentes tipos de estrés. Desde luego no puede descartarse la posibilidad de que la magnitud del estrés sea diferente en ambos tejidos, sin embargo los 2 tejidos son funcionalmente diferentes de ahí que efectivamente pueda esperarse que respondan diferente al estrés o a cualquier condición medio-ambiente.

La respuesta al estrés, ampliamente extendida entre las plantas (Jagger y Meyer, 1977; Fukutoku y Yamada, 1981; Shevyakova, 1983; Stewart y Lee, 1974; Singh et al, 1973b) de acumular prolina en las hojas también se encuentra en *Crocus* (fig. 8). En este parametro, al igual que en el de la proteína soluble (fig. 7), aminoácidos totales (fig. 6), GDM-NADH (fig. 10) y GS (fig. 14), la respuesta varía dependiendo del tipo de estrés, cuali y cuantitativamente, / de la edad de la planta. mientras que el estrés por sequia produce una gran acumulación de prolina en las plantas de 2.5 años, 10 veces mayor que el contenido de

prolina en los controles, la magnitud del efecto del estrés de salinidad en la acumulación de prolina solo fue de la mitad. En las plantas jóvenes, no solo se invirtió el efecto, es decir quien produce un mayor efecto es el estrés de salinidad, 30 veces más que el control, comparado con el incremento de 15 veces provocado por el estrés de sequía, sino que en términos absolutos las plantas jóvenes produjeron 4 veces más prolina que las plantas de 2.5 años.

Debe señalarse que la acumulación de prolina, con la excepción del estrés de sequía en plantas jóvenes, es un efecto que aparece en etapas más tardías, después de que ha sido expuesta la condición de estrés. En otras plantas (Singh et al, 1973b) esta es una respuesta más rápida. Aquí es importante mencionar que probablemente, plantas como maíz, sorgo o jitomate alcanzan mucho más rápido los estadios fisiológicos que generan las señales que inician la síntesis de compuestos como la prolina. Sería importante determinar si, independientemente del tiempo a que se ve sometida la planta al estrés, cuando alcanza un determinado contenido relativo de agua, un potencial osmótico dado o un volumen celular fijo es cuando se inicia la síntesis de prolina.

Los miembros de la familia de la Apocynaceas y de algunas otras familias son plantas que se distinguen por su

capacidad de sintetizar alcaloides. *C. roseus* como miembro de esta familia no es la excepción y actualmente se sabe que produce alrededor de 200 alcaloides. Desde luego hace algún tiempo se había hecho la observación de que el medio ambiente podía influir en la cantidad y calidad de los alcaloides sintetizados por *Nicotiana tabacum* (Gershenzon, 1983). Se sabe que algunas plantas son más venenosas, debido al incremento en el contenido de sus alcaloides, durante la época de sequía, por lo que entre las plantas que sintetizan este tipo de compuestos es probable que en forma paralela a la síntesis de prolina se produzca una síntesis de alcaloides como respuesta al estrés.

Los datos mostrados en la tabla 1 indican que en *C. roseus* efectivamente, además de sintetizar prolina (fig. 8), se produce una acumulación de hasta casi 200 % más alcaloides en el estrés de salinidad respecto al control, después de 14 días de haberse iniciado el estrés. Los datos mostrados son en base de gramo de peso seco, es decir por cada gramo de peso seco hay alrededor de 170 mg de alcaloides. Si comparamos este dato con el total de aminoácidos, incluida la prolina vemos que hay alrededor de 10 veces más alcaloides en las plantas estresadas que aminoácidos totales.

El valor del contenido de los alcaloides es un valor total, es decir incluye alcaloides de todos los tipos. Esto es importante ya que algunos alcaloides como agmatina, cuyo contenido es importante en C. roseus, posee solo 2 átomos de nitrógeno en su molécula, mientras que alcaloides menos abundantes como VLB y VLR poseen 4, lo mismo puede decirse respecto a la poza de aminoácidos. Por ello las comparaciones deben hacerse con cuidado, y para un estudio detallado de la distribución de nitrógeno en las plantas, tanto control como las sometidas a estrés, estos son parámetros que deberán tomarse en cuenta.

Esta redistribución del nitrógeno en las plantas sometidas a estrés, así como la asimilación del nitrógeno del suelo durante el estrés es llevada por un gran conjunto de enzimas. Sin embargo invariablemente el nitrógeno, no importa si es el que está siendo asimilado o el que proviene de la degradación de las proteínas, pasa a la forma de amonio el cual puede ser asimilado por 3 enzimas: la Gln que produce ácido glutámico, la GS que sintetiza glutamina y la Asparagina sintetasa que cataliza la síntesis de asparagina. Esta última enzima utiliza amonio solo en algunas especies (Loyola-Vargas et al 1987), mientras que en la mayoría, como en C. roseus (Monforte et al, datos no publicados) el donador del nitrógeno es la glutamina. Por

esta razón se midieron los niveles de GDH y GS tanto en plantas control como en las plantas sometidas a estrés.

Los niveles de GDH en la hoja y en raíz siempre se mantienen elevados, con la única excepción del efecto del estrés de salinidad en hojas de 2.5 años. En tanto que la GS de hojas y raíces de plantas de 2.5 años disminuye drásticamente a los 14 días de haber sido impuesto el estrés de salinidad el que produce los efectos más pronunciados en ambos tejidos, llegando a no ser detectable en las raíces de plantas sometidas al estrés de salinidad (fig. 15), en las plantas de 6 meses la actividad de GS no se afecta. Incluso el estrés de sequía produce un aumento del 100%, respecto al control en la actividad medible de la GS.

Los datos analizados en el párrafo anterior sugieren que en las plantas adultas la vía de (re)asimilación del nitrógeno es la de la GDH, ya que esta enzima se mantiene aun bajo condiciones severas de estrés, en tanto que la GS no se encuentra en forma activa. Este cambio en las actividades de las enzimas producido por el estrés, puede deberse a que la GS haya sido parte de las proteínas degradadas. Para analizar esta posibilidad deberá hacerse una cuantificación, mediante anticuerpos de la cantidad

absoluta de GS y determinar si la proteína ha sido degradada o si solo ha sido inactivada.

Ahora bien porque la GDH se mantiene en forma activa en condiciones que la GS no? es posible que se trate de nuevas isoenzimas. En maiz y canavalia enzifomis (Miranda, 1987) el patrón electroforético de las diferentes isoenzimas cambia conforme se impone el estrés. Ahora bien estas nuevas isoenzimas podran ser de novo, o las que ya existían pero modificadas covalentemente o incluso podrian ser resultado de un rearrreglo en la composición de las sub-unidades de la GDH. Una explicación alternativa podria ser que la prolina acumulada en respuesta al estrés (fig. 8) mantenga en solución a la GDH (Faleg et al 1984; Miranda, 1987) evitando que pierda su actividad.

En las plantas de 3 meses la situación es completamente diferente ya que si bien los niveles de actividad de la GDH se mantienen bastante elevados bajo condiciones de estrés, la GS no se inactiva en las hojas e incluso el estrés de sequia en las raíces produce un gran aumento en la actividad medible de esta enzima. La diferencia entre la GS de plantas de 2.5 años, que es sensible al estrés, y la GS de plantas de 0.5 años, que no es sensible al estrés, puede deberse a por lo menos 2 causas.

Una que puesto que los niveles de prolina son mucho más elevados en las plantas de 0.5 años (fig. 8) estos sean suficientes para mantener activa a la GS en los tejidos de las plantas sometidas a estrés. Datos del grupo de Paleg et al (1984) obtenidos con la GS de soya sugieren que esta podría ser la razón. Sin embargo en el caso de C. roseus otra explicación probablemente podría ser que la GS de plantas jóvenes sea diferente de la GS de las plantas adultas y que esta diferencia les permita responder diferencialmente al estrés. En frijol Lara et al (1986) han demostrado que la GS cambia a lo largo del crecimiento de la planta, mediante un rearrreglo en la composición de los péptidos que forman a la enzima.

Para determinar cual es la explicación correcta, habría desde luego que purificar a la GS de C. roseus de las 2 edades, analizar su composición de péptidos, así como sus propiedades cinéticas y probar la resistencia al estrés de las 2 enzimas purificadas.

Una tercera explicación podrá ser que se produzca un rearrreglo en la compartimentalización de la GS durante el estrés. La GS se encuentra tanto en el citoplasma GS(I) como en el cloroplasto GS(II) pudiera ser que durante el estrés haya un cambio en la distribución de las 2 isoenzimas que permitan mantener la actividad de la enzima.



En resumen, las plantas jóvenes resisten mejor la condición de estrés que les fue impuesta, si bien al término de los 14 días cuando las plantas sometidas al estrés de sequía fueron nuevamente regadas, tanto las jóvenes como las adultas recuperaron su turgencia, esta recuperación fue mucho más rápida en las plantas jóvenes, así como la aparición de nuevas hojas. Esta mayor resistencia podría deberse a que se mantienen activas las 2 vías de asimilación de amonio, lo que en un momento dado les permitiría manejar más eficientemente su nitrógeno o también como se ha propuesto para algunas otras especies que la acumulación de prolina funcionando como un osmorregulador, le permita a la planta sobrevivir mejor bajo condiciones de estrés. Sin olvidar que el contenido total de alcaloides 10 veces más abundantes que los aminoácidos totales, pueda estar ejerciendo también una función de osmorregulador debido a que se acumulan principalmente en la vacuola.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abdel W. & H. H. Zanran. Effects of Salts Stress on Nitrogenase Activity and Growth of Four Legumes. Biol. Plant. 23: 16-23, (1981).
- 2.- Aparicio-Tejo F, M. F. Sanchez-Diaz & J. I. Peña. Nitrogen Fixation, Stomatal Response and Transpiration in *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *T. subterraneum* Under Water Stress and Recovery. Plant Physiol., 18: 1-4, (1980).
- 3.- Aparicio-Tejo F & Manuel Sanchez-Diaz. Nodule and Leaf Nitrate Reductase and Nitrogen Fixation in *Medicago sativa* L. under Water Stress. Plant Physiol., 69: 479-482, (1982).
- 4.- Aslam M., R. C. Huffaker & D. W. Rains. Early Effects of Salinity on Nitrate Assimilation in Barley Seedlings. Plant Physiol., 78: 321-325, (1984).
- 5.- Bates L.S., R. F. Waldren & L. D. Teare. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207, (1973).
- 6.- Barash I., T. Sadon, & H. Mor. Induction of a specific isoenzyme of Glutamate dehydrogenase by ammonia in oat leaves. Nature New Biology; 244: 150-152 (1973).
- 7.- Barash I., H. Mor, & T. Sadon. Evidence for Ammonium-dependent de novo Synthesis of Glutamate Dehydrogenase in Detached Oat Leaves. Plant Physiol., 56: 856-859, (1975).
- 8.- Barazik J. M., H.V. March, Jr., & J. R. Havis. Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. Plant Physiol., 47: 828-831, (1971).
- 9.- Becana M., P.M. Aparicio-Tejo F & M. Sanchez-Diaz. Effects of water stress on enzymes of ammonia assimilation in root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). Plant Physiol.. 61: 653-657, (1981).
- 10.- Beavers, L. & R. Storey. Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. Plant physiology., 57: 882-888. (1976).
- 11.- Billard J. & J. Boucaud. Effect of NaCl on the activities of Glutamate synthase from a Halophyte *Suaeda maritima* and from a Glycophyte *Phaseolus vulgaris*. Phytochemistry., 19: 1939-1942, (1980).

12.- Botha F. & J. O.C. Small. Effect of water stress on the carbohydrate metabolism of *Citrullus lanatus* seeds during germination. *Plant Physiol.*, 77: 79-82, (1985).

13.- Pottacin A., G. Cacco & M. Saccomani. Nitrogen absorption and assimilation in NaCl-resistant and NaCl-susceptible millet genotypes (*Pennisetum americanum*). *Can. J. Bot.*, 63: 517-520, (1985).

14.- Brachet J. & L. Coscon. Changes in the total alkaloid content of *Datura innoxia* Mill. subjected to salt stress. *J. Exp. Bot.* 37: 650-656, (1986).

15.- Convin D. T. & C.M. Atkins. Nitrate, nitrite, and ammonia assimilation by leaves: effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta.*, 118: 207-224, (1974)

16.- Ciamporova M. Ultrastructure of cortical cells of maize root under water stress conditions. *Kiol. Plant.*, 22: 444-449, (1980).

17.- Cocking, E. C. & E. W. Yemm, Estimation of aminoacids by ninhydrin. *Bioch. J.*, 58: XII. (1954).

18.- Drossopoulos J.B., A.J. Karamanos & C.A. Nivais. Changes in free amino compounds during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress. *Ann. Bot.*, 56: 291-305, (1985).

19.- Ehmke A. & T. Hartmann. Control of Glutamate dehydrogenase from *lemna minor* by divalent metal ions. *Phytochem.*, 17: 637-641, (1978).

20.- Flores H & Galston A. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. 1 Physiological parameters of the response. *Planta physiol*, 75: 102-109, (1984)

21.- Fowler M.W., W. Jessup & G.S. Sarkissian. Glutamate synthetase type activity in higher plants. *Febs Lett.*, 48: 340-342, (1974).

22.- Frischknecht F. M. & T. W. Baumann. Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. *Phytochem.*, 24: 2255-2257, (1985).

23.- Fukutoku Y. & Y. Yamada. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max.*) 11. Fate of <sup>14</sup>C labelled protein. *Plant Physiol.* 81: 622-628, (1984)

- 24.- Gamble P. E., & J. J. Burke. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. *Plant Physiol.*, 76: 615-621, (1984).
- 25.- Garcia P. E., E. Suarez, M. D. Aragon, & F. Mayor. Malonate Phosphorylation in *Agave americana*. *Phytochem.*, 11: 2495-2498. (1972).
- 26.- Garg B.K., S. Mathju, S.P. Uyas & A.N. Lahiri. Influence of soil fertility on the growth and metabolism of wheat under salt stress. *Biol. Plant.*, 24: 290-295, (1982).
- 27.- Gershenzon J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. Recent advances in phytochemistry. *Phytochemical.*, Ed. R. H. Timmermann, Plenum Press, New York & London. 18: 273-321, (1983).
- 28.- Giovan C. V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochem.*, 18: 375-382, (1979).
- 29.- Gomes E. F., J. T. Frisco, F. Campos & J. E. Filho. Effects of NaCl salinity in vivo and in vitro on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. *Plant Physiol.*, 59: 183-188, (1983).
- 30.- Grieve C.M. & E.V. Maas. Betaine accumulation in salt stressed sorghum. *Plant Physiol.*, 81: 167-171, (1984).
- 31.- Guiz C., B. Hirel, G. Shedlofsky & P. Gadai. Occurrence and influence of light on the relative proportions of two Glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Sci. Lett.*, 15: 271-277, (1979).
- 32.- Harvey D. M.R., H. Stelzer, R. Brandtner & D. Kramer. Effects of salinity on ultrastructure and ion distributions in roots of *Plantago coronopus*. *Plant Physiol.*, 66: 329-339, (1985).
- 33.- Hesson E. & M. Poljakoff-mayber. Germination of pea seeds exposed to saline stress. *Israel J. Bot.*, 29: 98-104, (1980/81).
- 34.- Hegarty J. W. & H. A. Ross. Investigations of control mechanisms of germination under water stress. *Israel J. Bot.*, 29: 83-92. (1980/81).
- 35.- Heimer V. M. The effects of sodium chloride, potassium chloride and glycerol on the activity of nitrate reductase

of a salt tolerant and two non tolerant plants. *Planta*, 113: 279-281, (1973).

35.- Hsial M., K. Koch & K. Mengel. Effect of salinity and potassium on the uptake of nitrogen and on nitrogen metabolism in young barley plants. *Plant Physiol.*, 35: 310-313, (1975).

37.- Hsial M.M. & K. Mengel. Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl salinity and potassium. *Plant and Soil*, 51: 457-462, (1979).

38.- Hsial B. & P. Gadal. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol.*, 66: 619-623. (1980).

39.- Hsial B., C. Ferrot-Rechenmann, A. Suzuki, J. Vidal & P. Gadal. Glutamine synthetase in spinach leaves. *Plant Physiol.*, 69: 983-987, (1982).

40.- Hsiao T. C. Plant responses to water stress. *Ann Rev. Plant Physiol.*, 24: 519-570, (1973).

41.- Hsiao T. C. Stress metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 273: 479-500, (1976).

42.- Iljin W.S. Drought resistance in plant and physiological processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 8: 257-274 (1957).

43.- Ingle J. The regulation of activity of the enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. J.* 100: 577-589, (1966).

44.- Imanul S.M & F. Larner. Dynamics of Na, K and proline accumulation in salt-treated *Vigna sinensis*(L) and *Phaseolus aureus*. *J. Plant Physiol* 119: 133-147 (1985).

45.- Jacobsen J.V., M. D. Hanson & P. C. Chandler. Water stress enhances expression of an amylase gene in barley leaves. *Plant Physiol.*, 80: 350-359, (1986).

46.- Jager H. J. & H. R. Meyer. Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. *Oecologia* (Berl), 30: 83-96, (1977).

47.- Joy, R. W. Control of glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* roots. *Phytochem.* 12: 1031-1040, (1973)

48.- Kadir M., G. Omri & A. Poljakoff-Mayer. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimolobos portulacoides*

- exposed to salinity. *Physiol. Plant.*, 42: 238-244, (1984).
- 49.- Kanamori, T. & H. Matsumoto. Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. Biochem. Biophys.*, 152: 400-412, (1972).
- 50.- Kandpal R. P. & N. A. Rao. Alterations in the biosynthesis of proteins and nucleic acids in finger millet (*Eleusine coracana*) seedlings during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis. *Plant Sci.*, 40: 73-79. (1985).
- 51.- Nair n., I. S. Sencoran & R. Singh. Effect of water stress on the enzymes of nitrogen metabolism in mung bean (*Vigna radiata wilczek*) nodules. *Plant Cell and Environment*, 8: 195-200, (1985)
- 52.- Keys A. J. Synthesis and interconversion of glycine and serine. *The Biochemistry of Plants, A comprehensive treatise* F. L. Stumpf & E. E. Conn editors, Academic Press, Inc., Vol 5, 359-373, 1980.
- 53.- Kumar N. & P. Mohanty. Effect of water stress on the photosynthetic activity of greening wheat seedlings. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 178: 409-412, (1983).
- 54.- Langdale G. W., J. R. Thomas & T. G. Littleton. Nitrogen metabolism of stargrass as affected by nitrogen and soil salinity. *Agronomy J.*, 65: 463-470, (1973).
- 55.- Lara n. y Ortega J. L. Identificación de múltiples isoformas de Glutamino Sintasa en raíces de *Phaseolus vulgaris*. XVI Congreso Nacional de Bioquímica, 1986.
- 56.- Lea P. L. & B. J. Miflin. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251: 614-616, (1974).
- 57.- Lea P. L. & B. J. Miflin. Transport and metabolism of Asparagine and Other Nitrogen Compounds within the Plant. *The Biochemistry of plants, A comprehensive treatise.* (F. L. Stumpf & E.E. Conn. editors), Academic Press, New York Inc. Vol 5, cap 16, 569-607, 1980.
- 58.- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Vol 11. Water, Radiation, Salt, and Other Stresses. Academic Press. New York. (1980).
- 59.- Lewis O. A. n. & J. S. Fete. The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in

fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Exp. Bot.*, 24: 596-606, (1973).

60.- Lewis D. A. M. & N. N. - C study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of *Datura stramonium* L. *J. Exp. Bot.*, 26: 351-366, (1975).

61.- Liang Shiou & Tuan-Huan D. Salt and water stress induced proteins in barley aleurone layers. Supplement to *Plant Physiol.* 93:48 (1987).

62.- Lloyd N.D.H. & R.W. Joy. 2-Hydroxysuccinami acid: A product of Asparagine metabolism in Plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81: 185-192, (1978).

63.- López M. E. Variación de la nitrato y nitrito reductasa y el contenido de alcaloides por influencia en los cambios de fuentes de nitrógeno en *C. roseus*. Tesis de Licenciatura Facultad de Química UNAM. 1984

64.- Loyola V. U. M. metabolismo Nitrogenado en maíz. Tesis de doctorado en Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, (1983).

65.- Loyola-Vargas V. M. & E. Sánchez de Jiménez. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.*, 76: 536-540, (1984)

66.- Loyola-Vargas.V.M. & E. Sánchez de Jiménez. Effect of nitrate, ammonium, and glutamine on nitrogen assimilation enzymes during callus growth of maize. *J Plant Physiol.*, 125: 235-242, (1986).

67.- Loyola-Vargas. V.M., A Yañez, J Caldera, C Oropeza, M Robert, J Quiroz / R K.N. Scorer. Nitrogen metabolism in *Canavalia ensiformis* (L) D.C. II Changing activities of nitrogen assimilating enzymes during growth. *J. Plant Physiol.* In Press, 1987.

68.- Luna M., M. Bodiani, M. Felici, F. Artami & G.G. Sermanni Selective enzyme inactivation under water stress in maize. (*Zea mays* L.), and wheat (*Triticum aestivum* L) seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, 25: 153-156, (1985).

69.- Magalhães A.C., C.A. Neyra & R.H. Hageman. Nitrite assimilation and amino nitrogen synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 53: 411-415, (1974).

70.- Maton I. E. Takanashi & S. Ida. Glutamate synthase in developing pea cotyledons: Occurrence of NADH-dependent and

ferredoxin-dependent enzymes. *Plant Cell Physiol.*, 20: 1455-1459, (1979).

71.- Mellor G. E. & E. B. Tregunna. The localization of nitrate-assimilating enzymes in leaves of plants with the C-4 pathway of photosynthesis. *Can. J. Bot.*, 49: 137-142, (1971).

72.- Miranda H. m. L. Comportamiento de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio durante el estrés en *Zea mays* L y *Canavalia ensiformis*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, (1987).

73.- Murillo E. & E. Sanchez de Jiménez. Glutamate synthase in greening callus of *Bauvaria ternifolia* Schiecht. *Planta*, 597: 1-5, (1985).

74.- Nishimura M., P. Bhusawang, K. Strzalka & T. Akazawa. Developmental formation of glutamine synthetase in greening pumpkin cotyledons and its subcellular localization. *Plant Physiol.*, 70: 353-356, (1982).

75.- Oaks A., K. Jones & S. Misra. A comparison of glutamate synthase obtained from maize endosperms and roots. *Plant Physiol.*, 53: 793-795, (1979).

76.- Oaks A., I. Stulen, K. Jones, M. J. Winspear, S. Misra & I. L. Boesel. Enzymes of Nitrogen assimilation in maize roots. *Planta*, 148: 477-484, (1980).

77.- Osonubi O. & W.J. Davies. Solute accumulation in leaves and roots of woody plants subjected to water stress. *Oecologia (Berl.)*, 32: 323-332, (1978).

78.- Pessarakli M. & T. C. Tucker. Ammonium (N) metabolism in cotton under salt stress. *J. Plant Nut.*, 8: 1025-1045, (1985).

79.- Peterson G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al, which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83: 346-355, (1977).

80.- Paleg, L.G; Stewart G.F. & Bradbeer J.W. Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiology*, 75: 974-978, (1984)

81.- Plant Z. Nitrate reductase activity of wheat seedlings during exposure to and recovery from water stress and salinity. *Physiol Plant.*, 30: 212-217, (1974).



82.- Probyn T.M. & D. A. M. Lewis. The route of nitrate-nitrogen assimilation in the root of *Datura stramonium*. *J. Exp. Bot.*, 30: 299-305. (1979).

83.- Rakova N.M., L.R. Klyshev & B.R. Kosymbekov. Effects of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl on activity of the enzymes of primary ammonium nitrogen assimilation in plant roots. *Fiziol. Rastenii*, 25: 39-43, (1978).

84.- Rathnam C. K. M. & E. E. Gerald. Distribution of nitrate-assimilating enzymes between mesophyll protoplasts and bundle sheath cells in leaves of 3 groups of C-4 plants. *Plant Physiol.*, 57: 881-885, (1976).

85.- Rhodes D., G.A. Rondon & G.R. Stewart. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, 125: 201-211, (1975).

86.- Rhodes D. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor* L. *Planta*, 129: 203-210, (1976).

87.- Romero P. C. Biosintesis y farmacologia de los alcaloides de *Catharanthus roseus* derivados del indol. Tesis de licenciatura UNAM. Facultad de Quimica. (1984).

88.- Safaraliev F.M., N.P. L'Uov, A.A. Mardanov & U.L. Kretovich Factors behind decrease of nitrate reductase activity in leguminous plants under salinization. *Fiziol. Rastenii*, 31: 658-667, (1984).

89.- Sokurai N., M. Akiyama & S. Kuraishi. Roles of abscisic acid and indoleacetic acid in the stunted growth of water stressed, etiolated squash hypocotyls. *Plant Cell Physiol.*, 26: 15-24, (1985).

90.- Sankhla M. & W. Huber. Effect of salt and abscisic acid on *in vivo* activity of nitrate reductase in seedlings of *Phaseolus aconitifolius*. *Z. Pflanzensphysiol.*, 76: 467-470, (1975).

91.- Sharp R. E. & W. J. Davies. Solute regulation and growth of roots and shoots of water stressed maize plants. *Planta*, 147: 43-49, (1979).

92.- Shevyakova M. I. Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. *Fiziol. Rastenii*, 30: 768-783, (1983).

93.- Shone M. G. T. & J. Gale. Effect of sodium chloride stress and nitrogen source on respiration, growth and

- photosynthesis in Lucerne (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.*, 34: 1117-1125, (1983).
- 94.- Singh T. N., L.G. Foleg & D. Aspinall. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 45-56, (1973a).
- 95.- Singh T. N., D. Aspinall, L.G. Foleg & S.F. Roggess. Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 57-63, (1973b).
- 96.- Smirnoff N., M.D. Winslow & G.R. Stewart. Nitrate reductase activity in leaves of barley (*Hordeum vulgare*) and durum wheat (*Triticum durum*) during field and rapidly applied water deficits. *J. Exp. Bot.*, 36: 1200-1208, (1985).
- 97.- Stewart G. R. & J.A. Lee. The role of proline accumulation in Halophytes. *Planta*, 120: 279-289, (1974).
- 98.- Tallak E. N. & W. H. Muller. The influence of low plant water potential on the growth and nitrogen metabolism of the native California shrub *Lotus scoparius* (Nutt. In 1 & 5) Uttley. *Amer. J. Bot.*, 68: 402-407, (1981).
- 99.- Taylor A. A., J. De-Felice & D. C. Havill. Nitrogen metabolism in *Poterium sanguisorba* during water stress. *New Phytol.*, 90: 19-25, (1982).
- 100.- Tempest D. W. & J. L. Meers. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.*, 117: 405-407, (1970).
- 101.- Thakur P.S. & V. K. Rai. Effect of water stress on protein content in 2 maize cultivars differing in drought resistance. *Biol. Plant.*, 24: 96-100, (1982).
- 102.- Tsenov E.I. & V. V. Kabanov. Effect of sodium chloride salinization on content and formation of nucleic acids in pea leaves. *Fiziol. Rastenii*, 30: 377-383, (1983).
- 103.- Vyas S. P., S. Kathju, B.K. Garg & A. N. Lahiri. Performance and metabolic alterations in *Sesamum indicum* L. under different intensities of water stress. *Ann. Bot.*, 50: 323-331, (1985).
- 104.- Yamada E. B. & J. C. D. Toole. Effects of nitrogen and root medium water potential on growth, nitrogen uptake

and osmotic adjustment of rice. *Physiol. Plant.*, 60: 507-513, (1984).

105.- Yoneyama T. & N. Kumazawa. A kinetic study of the assimilation of N-labelled nitrate in rice seedlings. *Plant & Cell Physiol.*, 16: 21-26, (1975).