

29 204



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"EL POSIBLE PAPEL DEL NITRATO COMO  
OSMORREGULADOR EN CELULAS DE  
Bouvardia ternifolia"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**ALICIA MARIA SANCHEZ ESCARCEGA**

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1989

**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:

|  | PAG. |
|--|------|
| Resumen.....                             | 1    |
| I. Introducción.....                     | 2    |
| Relaciones hídricas.....                 | 2    |
| Nitrato.....                             | 7    |
| Cultivo de células.....                  | 14   |
| <i>Bouvardia ternifolia</i> .....        | 21   |
| Objetivo.....                            | 23   |
| II. Materiales y Metodos.....            | 24   |
| Material biológico.....                  | 24   |
| Material de vidrio.....                  | 25   |
| Reactivos.....                           | 26   |
| Equipo.....                              | 26   |
| Medios de cultivo.....                   | 26   |
| Curvas de crecimiento.....               | 29   |
| Determinación de nitratos.....           | 30   |
| Soluciones para nitratos.....            | 31   |
| Curvas de absorción de nitratos.....     | 32   |
| III. Resultados y Discusión.....         | 34   |
| Cultivos.....                            | 34   |
| Inducción y mantenimiento de callos..... | 34   |
| Cultivo de células en medio líquido..... | 38   |
| Preparación de los cultivos.....         | 40   |
| Determinación de nitratos.....           | 43   |
| Absorción de nitratos.....               | 46   |
| Tratamientos con nitratos.....           | 46   |
| IV. Conclusiones.....                    | 63   |
| V. Referencias.....                      | 64   |

Agradecimientos.

## R E S U M E N :

Células de *Bouvardia ternifolia* en cultivo líquido y en ayuno de nitrato por 15 horas, absorben casi el 50% del nitrato del medio, durante las primeras 2 horas; en las siguientes 3 horas, hay un flujo de salida de un 90% del nitrato absorbido resultando una toma neta de nitratos de solo 10%.

Se propuso que este flujo de entrada y salida de nitratos es un mecanismo de ajuste osmótico.

Se expusieron los tejidos, a compuestos que provocan ajuste osmótico celular (NaCl, KCl, polietilenglicol y sacarosa) y se determinaron las modificaciones en la toma y salida de nitrato.

Se encontró que ningún osmolito modifica el fenómeno de toma y exclusión de nitrato; por ello se concluye que este fenómeno no tiene un origen osmótico.

## I. INTRODUCCION.

El rápido crecimiento de la población mundial y las limitaciones geográficas de tierras para la agricultura han provocado serias consideraciones en la expansión de cultivos a tierras consideradas desfavorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Entre las causas más importantes de la baja sobrevivencia y poca productividad de cultivos vegetales se encuentran las sequías y las altas concentraciones de sales en los terrenos de siembra (17).

### I.1. Relaciones hídricas.

En casos donde la planta es sometida a condiciones desfavorables de agua y concentraciones salinas, la célula vegetal se ve obligada a modificar su potencial osmótico interno, por lo que ha habido un gran interés en el estudio de la habilidad de células de plantas superiores para regular éste potencial. (12, 23, 33).

La cantidad de agua que puede obtener una planta es uno de los factores de mayor importancia para su desarrollo, este compuesto esencial, constituye hasta un 70% del peso fresco

de muchos organismos vegetales. La tasa de crecimiento de una célula vegetal y la eficiencia en sus procesos fisiológicos son mayores cuando la turgencia celular es máxima (15).

Así mismo las plantas han desarrollado estrategias adaptativas para poder conquistar medios donde el abastecimiento de agua es muy bajo, estas adaptaciones pueden consistir en regulaciones metabólicas y fisiológicas de diferentes formas.

Una medida para determinar el estado hídrico de una planta es el potencial de agua o potencial hídrico ( $\psi$ ).  $\psi$  es definida como la energía libre por mol de agua, es decir la energía disponible para realizar trabajo (2) donde  $\psi$  es igual a cero en el caso del agua pura.  $\psi$  se expresa como:

$$\psi = \psi_0 + \psi_p$$

donde  $\psi_0$  es el potencial osmótico y  $\psi_p$  es el potencial de presión o de turgencia. El potencial osmótico resulta de la presencia de solutos en el agua y estos reducen el potencial hídrico proporcionalmente a la concentración de solutos. El potencial de presión aumenta al potencial hídrico por la presión impuesta sobre un sistema contenido, ya que cuando el agua entra a la célula se desarrolla una presión en contra de la membrana (16).

El potencial hídrico se expresa en unidades de presión, ya sean bars o Pascales (Pa), donde

$$10 \text{ bar} = 1 \text{ megaPa}$$

y tendrá un gradiente de valores negativos en el caso de un sistema tierra-planta-atmósfera (15).

En una célula vegetal, el bajo abastecimiento de agua y la alta concentración de sales en el medio tienen el mismo efecto, ya que ambos causan una disminución en el potencial osmótico; la diferencia entre estas dos condiciones desfavorables consiste en que, el bajo abastecimiento de agua es producido por solutos impermeables a la membrana celular (polietilenglicol), mientras en el caso de la alta concentración de sales es causada por varios iones, principalmente por  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que pueden ser transportados hacia ambos lados de la membrana celular (1).

Los mecanismos de regulación osmótica necesitan de una señal para iniciar su respuesta fisiológica; esta señal puede ser el volumen celular, que se verá modificado por flujos de entrada y salida de agua.

Cuando la presión osmótica externa se ve aumentada, provoca la salida de agua y el volumen celular se ve disminuido, hasta que se genera una presión osmótica que iguale las presiones externas e internas a las que se sometió la célula. Cuando el abastecimiento de solutos intracelular se ve incrementado la célula puede recobrar su estado turgente inicial.

Una respuesta de la célula ante la pérdida de agua es transportar o sintetizar ciertos solutos específicos con el fin de aumentar la concentración del medio interno celular y disminuir el potencial osmótico interno y así evitar mayor pérdida de agua.

Los compuestos que sintetiza o acumula una célula pueden ser de muy variada naturaleza según la especie vegetal de que se trate. Se ha reportado la acumulación de aminoácidos (prolina), aminas cuaternarias (glicina betaína, trigonelina, colina), compuestos sulfurados (taurina), carbohidratos (sacarosa), ácidos orgánicos (málico, cítrico, oxálico) y compuestos nitrogenados inorgánicos (nitrato) Tabla 1 (4, 7).



| ESPECIE VEGETAL                   | A   | B   | C   | D  | E   | F  | G   | H   |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|
| <i>Sorghum vulgare</i>            | 791 | 1   | 32  | 37 | 29  | 11 | -   | -   |
| <i>Medicago sativa</i>            | 265 | 25  | 54  | 31 | 25  | 19 | 200 | -   |
| <i>Gossypium nirsutum</i>         | 228 | 18  | 126 | 54 | 18  | 92 | -   | -   |
| <i>Hordeum vulgare</i>            | 77  | 8   | 99  | 23 | 11  | 36 | 250 | 10  |
| <i>Beta vulgaris</i>              | 167 | 229 | 1   | 51 | 44  | 20 | -   | 17  |
| <i>Lycopersicum esculentum</i>    | 181 | 6   | 58  | 42 | 25  | 75 | -   | -   |
| <i>Phaseolus vulgaris</i>         | 170 | 0   | 45  | 20 | 5   | -  | -   | -   |
| <i>Capsicum frutescens</i>        | 190 | 13  | 2   | 30 | 5   | -  | -   | -   |
| <i>Potamogeton schweinfurthii</i> | 223 | 37  | 73  | 37 | 133 | 12 | -   | -   |
| <i>Daucus carota</i>              | 113 | 3   | -   | -  | 10  | -  | 150 | 270 |
| <b>cultivo de tejidos</b>         |     |     |     |    |     |    |     |     |
| <i>Helianthus annuus</i>          | 30  | 3   | 2   | -  | 5   | 1  | -   | 100 |
| <b>tejido de hipocotilo</b>       |     |     |     |    |     |    |     |     |

Tabla 1. Principales componentes en la presión osmótica encontrados en hojas y brotes de plantas vasculares.  
 A: K<sup>+</sup> (mM); B: Na<sup>+</sup> (mM); C: Ca<sup>2+</sup> (mM); D: Mg<sup>2+</sup> (mM); E: Cl<sup>-</sup> (mM); F: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mM); G: Ácidos orgánicos (mEq g<sup>-1</sup>);  
 H: Azúcares (mM). Datos para azúcares y nitratos bajo condiciones semejantes con caesaco (F).

## 1.2. Nitrato.

El nitrógeno es un elemento de suma importancia para el metabolismo celular, forma parte indispensable de aminoácidos, ácidos nucleicos, así como de la mayoría de otras macromoléculas orgánicas de todas las células.

El nitrógeno puede ser tomado por la planta en forma de amonio o nitrato; este último es un anión formado por un átomo de nitrógeno y tres de oxígeno ( $\text{NO}_3^-$ ), dándole una carga negativa al ion.

Las células de la raíz toman el nitrógeno teniendo una mayor preferencia por el nitrógeno en forma de nitrato, que como amonio (3). La absorción depende de el área de la superficie de la raíz, tanto como en la capacidad y la cantidad de acarreadores de la membrana (9). El transporte de nitrato es por mucho, el transporte más abundante de nitrógeno inorgánico en la gran mayoría de las plantas.

La absorción de muchos iones puede presentar una respuesta lineal, pero en el caso del nitrato se presenta una respuesta de tipo logarítmico, que implica que el transportador presenta saturación por sustrato (Figura 1) (19).

# CINETICA DE ABSORCION DEL NITRATO

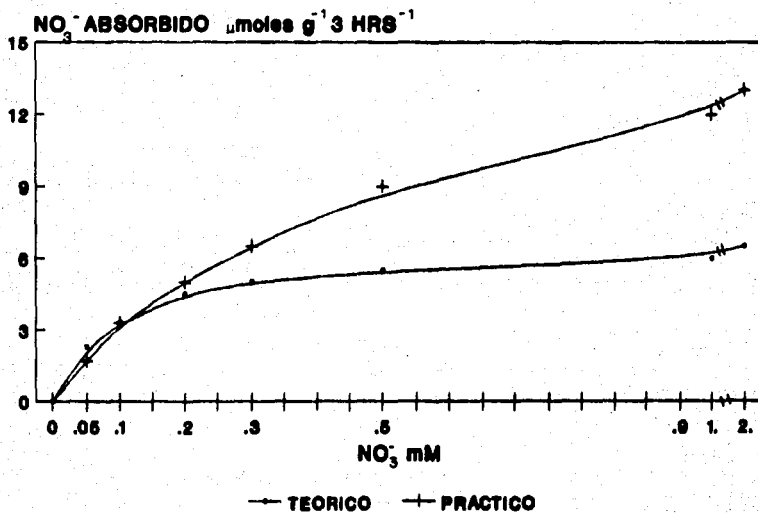


Fig. 1

Se han reportado dos tipos de transportadores en la membrana según la concentración externa del nitrato puede ser un transporte de alta o de baja afinidad. Hay evidencia que indica que el transporte de nitratos es dependiente de ATP, aunque hasta la fecha, no ha sido reportado un sistema de ATPasa en el transporte de aniones para plantas superiores (19, 7).

En la toma de nitratos como función del tiempo se observa al inicio una fase de reposo, seguida de una toma logarítmica; ésto indica que el sistema es inducible, como el de una enzima que se presenta ante su sustrato (Figura 2) (19).

Nielsen (26) ha hecho una severa crítica de la interpretación de los datos para el transporte de iones; en el caso del potasio ha reinterpretado los datos disponibles y propone que la toma del ion se presenta en dos etapas; una, con características semejantes a las de los acarreadores, para bajas concentraciones y otra, con propiedades de canal de transporte para altas concentraciones del ion.

La toma de nitratos puede verse modificada por las concentraciones internas del ion. En el interior la regulación se lleva a cabo por la nitrato reductasa que va reduciendo el nitrato a nitrito, por lo que, al saturarse la enzima, se

## ABSORCION DEL NITRATO EN FUNCION DEL TIEMPO

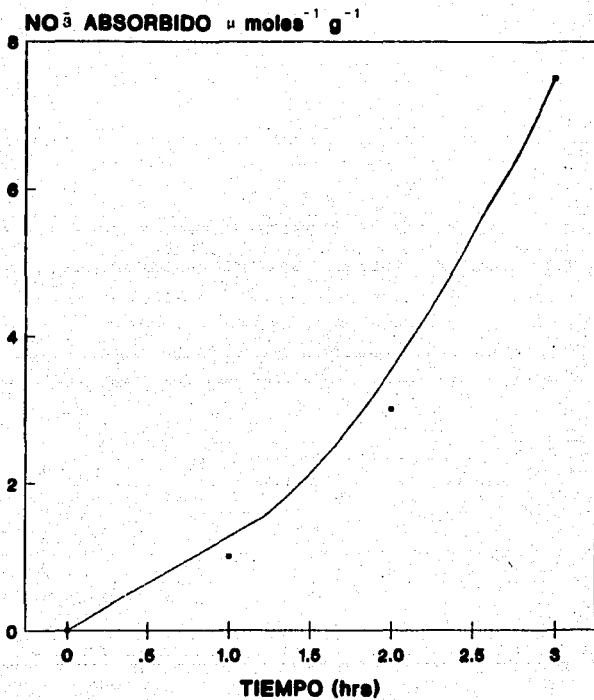


Fig. 2

inhibe la entrada de nitrato, con la posible presencia de flujos de salida por parte de la célula (30, 31).

Así mismo la presencia de otros iones puede alterar el transporte del nitrato; estos iones pueden ser de igual o diferente carga. Por ejemplo, la presencia de calcio acelera la entrada del nitrato, ya que las cargas positivas del calcio que se encuentran cerca de la pared celular enmascaran las cargas negativas de ésta, haciendo que los iones con carga negativa, como el nitrato, se acerquen más fácilmente a los transportadores de la membrana. (Figura 3)

Existe influencia en el transporte de nitrato por iones como el potasio, cloruro, sulfato, bromuro, aunque esta influencia es muy pequeña (19).

El nitrato ya dentro de la célula tiene posibilidad de tomar tres rutas diferentes. (30)

- A) REDUCCION.
- B) ALMACENAMIENTO.
- C) TRANSPORTE.

## EFFECTO DEL CALCIO EN LA TOMA DE NITRATO

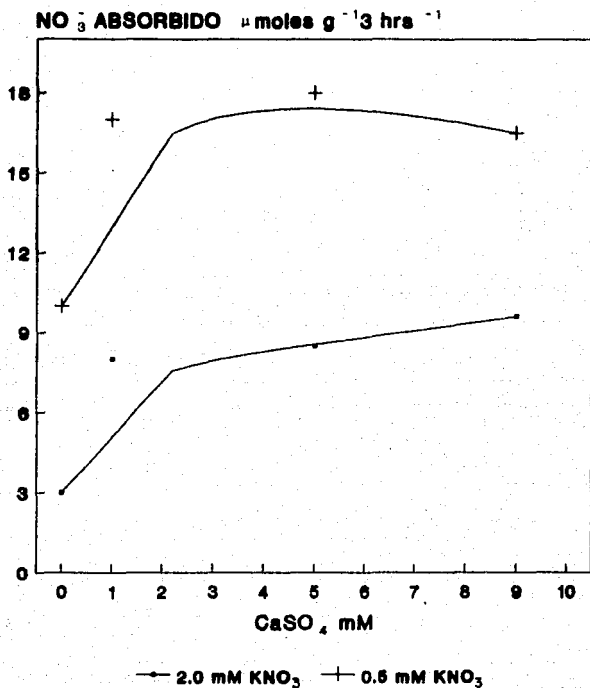


Fig. 3

El nitrato para ser integrado al metabolismo, y como parte del ciclo del nitrógeno tiene que ser reducido a nitrito, reacción que es mediada por la enzima nitrato reductasa (4).



- a) nitrato reductasa.
- b) nitrito reductasa.
- c) glutamina sintetasa.
- d) glutamato sintetasa (GOGAT).

El nitrógeno es acumulado a concentraciones internas constantes, independientes de las concentraciones externas, lo que sugiere una homeostásis (8). El nitrato puede ser almacenado en las vacuolas. Las pozas de almacenamiento son más abundantes en células jóvenes y pueden variar por influencia de la glucosa (30).

Es necesaria cierta concentración de nitrato exógeno para mantener e inducir a la enzima nitrato reductasa, ya que el nitrato almacenado en la vacuola, no está disponible para ser reducido (20, 29, 30).

El nitrato absorbido por la raíz, es transportado por el xilema hasta las hojas, donde se realiza la mayor parte de la



reducción del nitrato a nitrito, ya que la nitrato reductasa es más abundante en estos tejidos.

Cram (8) ha encontrado que el transporte de nitrato puede ser inducido en cultivo de células de tabaco.

### 1.3. Cultivo de Células.

El uso de la planta completa como sistema de estudio de la regulación celular del potencial osmótico presenta ciertas restricciones, como el hecho de la presencia de varios tipos de células desdiferenciadas, que no responden de igual manera a un cambio osmótico en el exterior por no encontrarse en un mismo estado fisiológico (1, 18, 19).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) representa una alternativa para este tipo de investigación. CTV es un término que se utiliza para designar el crecimiento de células, protoplastos o cualquier tejido vegetal *in vitro* es decir, manteniendo células bajo condiciones ambientales controladas y con aporte exógeno de todos los nutrientes que requiere para su desarrollo (25).

En la mayoría de los cultivos se requiere de reguladores para un crecimiento adecuado; las más comunes por su uso son las

de los grupos de las auxinas y las citocininas, y en menor grado las giberelinas.

El cultivo de tejidos presenta características muy particulares como son:

- a) Su crecimiento es relativamente rápido.
- b) Se puede mantener el cultivo en condiciones ambientales y nutricionales controlada por tiempo indefinido.
- c) Se tiene un control de la asépsia del medio, eliminando contaminación por microorganismos.
- d) Establecido el cultivo se tiene material biológico abundante y homogéneo sin importar los ciclos ecológicos del año.

En los últimos treinta años esta técnica ha permitido el crecimiento de una infinidad de plantas, así como mantenerlas en estados de dediferenciación como son los callos y el cultivo en suspensión.

Los cultivos de callos son tejidos que se obtienen a partir de la proliferación desorganizada de un segmento o explante de cualquier órgano vegetal, creciendo generalmente como una masa de células sobre un medio sólido.

Los callos tienen un crecimiento lento y éste se lleva a cabo en la periferia de la masa amorfa, dando lugar a un gradiente nutritivo, teniendo un mejor abastecimiento las células de la parte inferior y menos nutrientes las células de las capas superiores.

Los callos pueden ser compactos y duros, o pueden disgregarse fácilmente (friables), siendo estos últimos más adecuados para inducir los cultivos líquidos; de igual forma, la coloración de los callos puede variar de acuerdo a los pigmentos que contienen, entre los cuales se encuentran: clorofilas, flavonoides, antocianinas, etc.

Las células que forman los callos son altamente vacuoladas, muy parecidas a las células que forman el parénquima y con formas muy variadas, que van desde esféricas hasta alargadas.

El cultivo en suspensión es el crecimiento de células libres y aisladas o pequeños agregados celulares que se cultivan en medios líquidos y con agitación constante.

Como se mencionó anteriormente, los cultivos líquidos se inician a partir de la transferencia de secciones de tejido de callo, el cual es disgregado, y se mantiene inoculando medio fresco con alícuotas de un volumen conocido del cultivo madre; en esta forma, si se llevan a cabo resiembras en un

mismo período, la densidad celular del inóculo será más o menos constante y debe contener entre  $0.5$  y  $2.5 \times 10^5$  células por mililitro.

La cinética de crecimiento de los cultivos líquidos semeja aquella producida por las bacterias, pero siempre a tiempos más largos en los vegetales.

Aunque no todas las especies vegetales en cultivo líquido han presentado la misma curva característica, en general se puede observar que si se grafica el número de células contra el tiempo de incubación, se obtiene una curva con cinco fases muy bien definidas.

La primera fase o fase de reposo sucede poco tiempo después del inóculo, consiste en la preparación para la división celular; continúa la fase exponencial y luego la fase de crecimiento lineal donde la velocidad de división es máxima y el crecimiento es mayor; al término de esta fase el tejido entra a la fase de desaceleración en el cual la división celular se ve disminuida. En la fase estacionaria el número de células se mantiene casi constante por algún tiempo, hasta que empieza a verse disminuido como consecuencia de lisis celular en el tejido (Figura 4) (36).

## CRECIMIENTO NORMAL DE CELULAS EN SUSPENSION

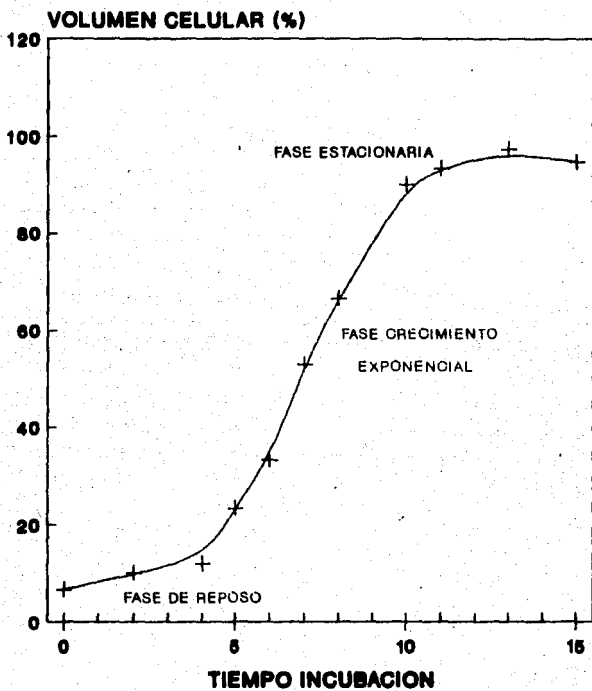


Fig. 4

El cultivo líquido de células aumenta su biomasa por división celular y por crecimiento celular hasta que los factores externos, como la cantidad de nutrientes y el oxígeno, actúan como limitantes para continuar su crecimiento (34).

Esta curva puede verse modificada, como consecuencia del parámetro utilizado para medir el crecimiento del cultivo; las mediciones pueden ser con base en el peso fresco total del cultivo, peso seco total, número de células, cantidad de proteína o de DNA, índice mitótico o paquete del volumen celular (PVC).

En el caso del paquete del volumen celular, éste sigue aumentando aún durante la fase estacionaria, ya que aunque las células no se dividen, éstas incrementan su tamaño por la toma de agua, lo que se refleja en el aumento del paquete.

La forma de las células en suspensión varía tanto como la de las células de caldo, y presentan una pared más gruesa de lo normal.

Las células en suspensión tienen un metabolismo más rápido, debido a esto, su división celular es más rápida, pero también, es mayor el número de mutaciones cromosómicas y las ploidías a diferentes niveles.

A diferencia del cultivo de callos donde se presenta un gradiente nutricional (27), en el cultivo líquido no sucede lo mismo, ya que todas las células se encuentran sumergidas en el medio nutritivo, de tal forma que las células tienen una cinética de crecimiento mucho mayor a la de las células en cultivo sólido.

Las células en cultivo tanto sólido como líquido, se verán afectadas en su morfología y características al haber variaciones en los componentes del medio nutritivo, como son vitaminas, fuentes de carbono, nitrógeno, etc; pero principalmente se verán afectados por los reguladores a los que está expuesto y la concentración de los mismos.

De igual forma, la edad del cultivo y el número de resiembras a las que se ha sometido, afectan de manera importante la morfología y las respuestas fisiológicas del tejido.

#### 1.4. *Bouvardia ternifolia*.

El presente trabajo se realizó con células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schl., o "Trompetilla", perteneciente a la familia Rubiaceae, del orden de las Rubiales.

Es una planta que puede ser herbácea o arbustiva, mide de 1 a 1.5 m de altura, con superficie glabra. Sus hojas miden entre 3-6 cm de largo, tienen pecíolos clípticos, lanceolados o acuminados, la base es redondeada y de borde entero. Sus flores son rojas de 2-2.5 cm de largo, agrupadas en cimas terminales. La forma de su flor semeja una trompeta, y de aquí su nombre común.

Florece durante los meses de julio a septiembre, y está ampliamente distribuida en el Valle de México, siendo más abundante en la zona sur.

Se ha reportado como remedio contra la disenteria; la raíz pulverizada, se considera como hemostático (32); también se ha reportado como posible anticarcinógeno (citado en 13, 14).

Estudios de laboratorio, realizados con anterioridad han demostrado que *B. ternifolia* puede considerarse como uno de los mejores cultivos para realizar trabajos bioquímicos,



fisiológicos, etc (10, 11, 13, 14), ya que presenta las siguientes características:

- a) Rápida proliferación del cultivo en medio sólido.
- b) No acumulación de productos tóxicos.
- c) Cultivo en suspensión homogéneo, con agregados celulares de 3 a 9 células.
- d) El tiempo de duplicación poblacional es entre 24 y 36 horas.
- e) Tanto callo como cultivo líquido, con alta viabilidad celular al iniciar la fase estacionaria.
- f) Posibilidad de obtener cultivo de callos a partir de cualquier parte de la planta, hojas, raíz, tallo.

### 1.5. Objetivo.

En estudios preliminares en células de *Bouvardia ternifolia* se presentaron flujos de entrada y salida de nitrato en tiempo relativamente cortos (4.5 hrs).

La importancia metabólica del nitrato en las células y las proposiciones que se han hecho acerca de la posibilidad de que el nitrato tenga un papel como osmorregulador en vegetales; aunque esta teoría no ha sido objeto de muchas investigaciones, según se aprecia en la información de la literatura, en el presente trabajo se ha estudiado el posible papel del nitrato como osmorregulador en cultivo de células de *Bouvardia ternifolia*.

## II. MATERIALES Y METODOS

Material biológico.

Material de vidrio.

Reactivos.

Equipo.

Medio de cultivo.

Curva de crecimiento.

Soluciones para tratamientos con nitratos.

Determinación de nitratos.

Curvas de absorción de nitratos.

### II.1.1 Material biológico.

Se generó una línea celular de *Bouvardia ternifolia* en junio de 1987, haciéndose resiembras cada 10 y 20 días para medio líquido y sólido respectivamente.

Las semillas de *B. ternifolia* se esterilizaron de la siguiente manera:

- a) Lavado con agua corriente por 30 minutos
- b) Inmersión en alcohol al 70% por 1 minuto, enjuagadas con agua destilada estéril (3 veces).
- c) Inmersión en hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) al 5% v/v por 10 minutos, enjuagadas con agua destilada estéril (3 veces)

Las semillas desinfectadas se hicieron germinar en un medio de agar (9 g/l), sacarosa (30 g/l), y se adicionó con ácido

2,4-diclorofenoxiacético (1 mg/l) y cinetina (0.005 ppm) para inducir callo. Las semillas se incubaron en cámaras de crecimiento a 27°C con luz continua por 3-4 semanas.

Cuando se observan los primeros cúmulos de células, se efectúa una resiembra a medio fresco; esta resiembra debe realizarse antes de que se pueda confundir el origen del callo y poder determinar el órgano del que proviene.

Para el cultivo en suspensión madre, se disgregaron 2 g de callo, de forma mecánica y se inocularon 50 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml; se incubaron en cámaras de crecimiento con agitación rotatoria de 125 rpm, a 27°C y luz continua.

Para mantener el cultivo líquido, se tomaron 5 ml del cultivo madre, para inocular 20 ml de medio nutritivo en matraces Erlenmeyer de 125 ml; las condiciones de incubación fueron las mismas (13).

#### 11.1.2. Material de vidrio.

Todo el material empleado se lavó con detergente, se enjuagó con agua destilada y se secó en estufa. Para la determinación de nitratos el material se lavó con mezcla crómica, se enjuagó con agua destilada y se secó en estufa.

### 11.1.3. Reactivos.

Se emplearon reactivos de las casas J. T. Baker, Merck y Sigma, todos con grado analítico.

### 11.1.4. Equipo.

Balanza analítica, Mettler.

Balanza granataria, OHAUS.

Placas de calentamiento y agitación, Thermolyne.

Cámara de crecimiento a 27±2°C.

Centrífuga, MSE.

Micropipetas, Finnpiette, de 50-200 µl y 1-5 ml.

Agitador, Vortex-Thermolyne.

Espectrofotómetro, Pye Unicam SP6.550.

Potenciómetro, Conductronic.

Campana de flujo laminar, VECO.

Autoclave, Electric Steroclave 25X.

Microcentrífuga, IEC Micro MB-centrifuge.

### 11.2.1. Medios de Cultivo.

Para el crecimiento de los callos se empleó el medio de Murashige y Skoog (25) modificado. Se adicionó con 0.005 ppm de cinetina y 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético

(2,4-D) y con agar 9 g/l. En todos los medios se ajustó el pH a 5.6-5.8 con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio 1M.

Las concentraciones de macro y micro nutrientes de este medio se presentan en la Tabla II.

Las soluciones se adicionaron en el orden indicado, en un volumen de 200-400 ml de agua con agitación constante para luego llevarlo a el volumen total.

La cinetina (Merck) se disolvió en 2 ml de HCl 100 mM, una vez disuelta, se ajustó el pH a 5 con NaOH 100 mM. El mismo proceso se llevó a cabo para el 2,4-D (Merck); se disolvió en 3 ml de NaOH 100 mM y se ajustó el pH a 8 con HCl 100 mM, antes de agregarse al medio.

La sacarosa (Merck) se agregó en una concentración de 30 g/l y finalmente con un potenciómetro se ajustó el pH del medio entre 5.6-5.8, empleando HCl o NaOH 1M, para terminar aforando a un litro.

| Solución | Compuesto                             | Solución conc.<br>( mg/ml ) | Volúmen para<br>l ) |
|----------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| A        | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 8800.00                     | 5 ml                |
| B        | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 7400.00                     | 5 ml                |
| B        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 3000.00                     | "                   |
| B        | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O  | 446.00                      | "                   |
| C        | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>        | 640.00                      | 5 ml                |
| C        | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 860.00                      | "                   |
| C        | KI                                    | 83.00                       | "                   |
| C        | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O  | 2.50                        | "                   |
| C        | NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 2.50                        | "                   |
| C        | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O  | 25.00                       | "                   |
| D        | Mio-inositol                          | 2000.00                     | 5 ml                |
| D        | Ac. Nicotínico                        | 10.00                       | "                   |
| D        | Piridoxina. HCl                       | 10.00                       | "                   |
| D        | Tiamina                               | 10.00                       | "                   |
| D        | Glicina                               | 40.00                       | "                   |
| E        | KNO <sub>3</sub>                      | 220.00 mg                   |                     |
| E        | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 25.85 mg                    |                     |
| E        | Na <sub>2</sub> EDTA                  | 37.25 mg                    |                     |

TABLA II. Soluciones de los nutrientes para el medio nutritivo de *Bouvardia ternifolia*.

El agar bacteriológico (Merck) para los medios de cultivo sólido, se adicionó en una concentración de 9 g/l después de ajustar el pH, para evitar dañar el electrodo, en un vaso de precipitado de 1 l, se fundió por calor y con agitación.

Los medios se envasaron de la siguiente forma: para medio sólido 25 ml en frascos Gerber, se taparon con papel aluminio. Para medio líquido 20 ml de en matraces Erlenmeyer de 125 ml, igualmente se tapó con papel aluminio. Ambos tipos de medio se esterilizaron durante 15 minutos a 1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Al finalizar el proceso se dejó enfriar, para luego poder mantener el medio en refrigeración hasta su uso.

#### 11.2.2. Curva de crecimiento.

El crecimiento celular del tejido líquido se determinó por paquete del volumen celular (PvC), se transfirió un volumen conocido del cultivo en suspensión a tubos cónicos graduados de 50 ml para centrifuga, se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Se determinó el aumento del volumen del paquete celular, durante 14 días. Cada 48 horas se tomaron 3 muestras y se determinó el paquete del volumen celular de cada una, haciendo un promedio de las tres mediciones.



### 11.2.3. Determinación de nitrato.

Se utilizó una técnica colorimétrica, propuesta por Cataldo y colaboradores (5), que se modificó, para la determinación de volúmenes pequeños. Haciendo 6 repeticiones por cada tratamiento.

#### Soluciones:

Ácido salicílico: se disolvió 1 g en 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Esta solución sirve para 40 determinaciones, no se debe usar después de 3 días, y debe agitarse bien, ya que se forman gradientes.

Hidróxido de sodio 2 M: se disolvieron 80 g en 1 l de agua destilada y sirve para 100 determinaciones, se puede guardar hasta 2 meses.

De la solución de ácido salicílico se ponen 50  $\mu$ l en tubos de ensayo de 130 x 15 mm, se agregan 50  $\mu$ l de la muestra de nitratos a determinar, y se agita por 20 minutos, después de este tiempo, se agregan 10 ml de la solución de NaOH 2 M para neutralizar.

La reacción es extremadamente exotérmica, por lo que se deben mantener los tubos de ensayo y las soluciones en hielo.

Los tubos de ensayo, ya con el NaOH se agitan en vortex para evitar gradientes, después de que se ha enfriado esta solución, se lee en el espectrofotómetro a 410 nm.

#### 11.2.4. Soluciones para nitratos.

Soluciones para provocar ajuste osmótico:

|                        |      |        |  |
|------------------------|------|--------|--|
| NaCl                   | 150  | mM     |  |
| NaCl                   | 300  | mM     |  |
| Polietilenglicol (PEG) | -1.3 | megaPa |  |
| "                      | -0.5 | megaPa |  |

Todas las soluciones anteriores, fueron adicionadas con sacarosa 30 g/l y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  5 mM como fuente de nitratos. El paquete celular se lavó e incubó en una solución de  $\text{CaCl}_2$  5 mM y sacarosa 30 g/l.

Se hizo un tratamiento con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrato adicionado con sacarosa 30 g/l; éste fue el único caso donde el lavado e incubación de paquete celular se realizó con una solución con sacarosa 30 g/l, pero sin  $\text{CaCl}_2$ .

Todas las soluciones se esterilizaron durante 15 minutos a 1  $\text{kg/cm}^2$  de presión y guardadas en refrigeración.

#### 11.2.5. Curvas de absorción de nitratos.

Se utilizaron cultivos de células en suspensión de 9 días. Se determinó el paquete celular centrifugando a 2500 rpm por 5 minutos (aproximadamente 2000 g') y se eliminó el sobrenadante antes de resuspender en una nueva solución. En todos los casos se hicieron diluciones 1:3 del paquete celular y la solución.

Se hicieron 3 lavados con  $\text{CaCl}_2$  5mM y se dejó incubar en esta solución durante 15 hrs, a excepción del tratamiento con  $\text{KNO}_3$ , donde se lavó e incubó únicamente con sacarosa. Después de este período, se volvió a lavar 2 veces para iniciar los diferentes tratamientos.

En todos los tratamientos, el tejido ya resuspendido, se dejó en matraces Erlenmeyer de 125 ml con agitación rotatoria de 130 rpm a 27°C.

Cada 0.5 hr se tomó 1 ml de la suspensión, se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó 3 minutos, en microcentrifuga a 12 000 rpm (12 000 g'), se tomó una muestra del sobrenadante, que se guardó en congelador (-20°C), hasta el momento de hacer la determinación del contenido de nitratos. (Figura 5) Se procesaron todas las muestras de un tratamiento, a un mismo tiempo.

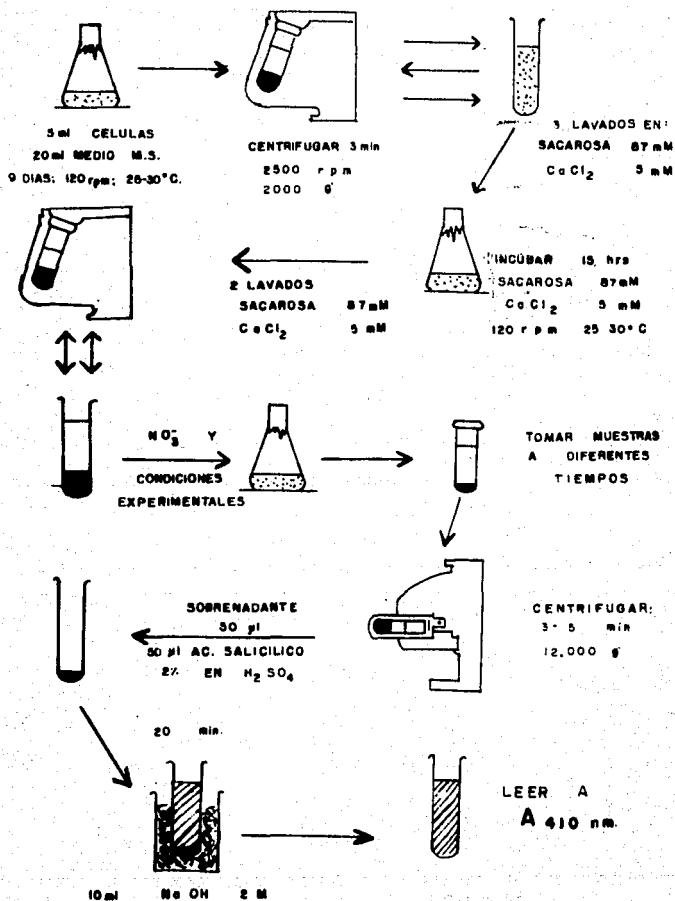


Figura 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### III.1. Cultivos.

#### III.1.1. Inducción y mantenimiento de callos.

La inducción de callo se llevó a cabo a partir de la radícula, ya que se ha reportado que, a pesar de la dediferenciación celular que se produce en el callo, se presentan diferencias bioquímicas entre los callos provenientes de radícula y de hoja de *Bouvardia ternifolia* (13).

Para el cultivo de cualquier tejido vegetal se requiere del aporte exógeno de nitrógeno; este elemento puede ser tomado por la planta en forma de nitrato o amonio y en el caso de muchas especies se utilizan ambos.

Entre las diferencias bioquímicas que se aprecian, se encuentran las modificaciones en las velocidades de crecimiento según la fuente de nitrógeno que se utiliza, en el tejido de radícula se observa un mejor crecimiento cuando la fuente de nitrógeno es a base de nitratos (13).

Ya que la toma de nitrógeno por la planta se lleva a cabo a través de la raíz, se consideró más apropiado inducir el callo a partir de la radícula, por ser el tejido que origina

a la raíz, así mismo se consideró el hecho de que los tejidos de raíz y radícula tienen un mejor crecimiento cuando la fuente de nitrógeno es nitrato y no amonio.

En el tejido de *Bouvardia ternifolia* a partir de radícula el crecimiento celular fué más eficiente utilizando nitratos y sin el aporte de amonio (13).

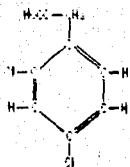
En este caso, el suplemento de nitrógeno en el medio nutritivo fue específicamente a base de nitrato de potasio, con el propósito de que la célula se habituara a este ion, y tuviera una adaptación previa a los tratamientos para provocar ajuste osmótico.

Aunque Fernández (13) reporta diferencias en la concentración de reguladores para el medio de inducción y el medio de mantenimiento de callo, no se encontraron diferencias significativas al utilizar un solo medio con la misma concentración de fitorreguladores, 2,4-D y cinetina (Figura 6), tanto para inducción como para mantenimiento (Tabla III).

El tejido de callo de *B. ternifolia* es incoloro y no fotosintético, por lo que no es importante la cantidad de luz en que se disponga, creciendo con una velocidad igual en luz como en oscuridad.

**2, 4 - D**

(Acido  
2,4-diclorofenoxiacético)



**CINETINA**

(6-furfurilaminopurina)

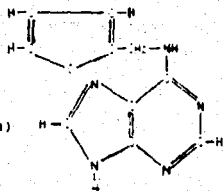


Fig. 6  
Fitoreguladores utilizados para  
los cultivos de células de  
*Bouvardia ternifolia*.

| FITORREGULADORES: | 2,4 -D<br>(mg/l) | CINETINA<br>(mg/l) |
|-------------------|------------------|--------------------|
| CONCENTRACIONES   |                  |                    |
| REPORTADAS        |                  |                    |
| INDUCCION         | 1                | ----               |
| MANTENIMIENTO     | ----             | 1                  |
| UTILIZADAS        | 1                | 5                  |

Tabla III. Concentraciones de fitorreguladores reportadas por Fernández, L. (12), para cultivos de tejidos de *Bouvardia ternifolia*



El tejido también tiene la característica de ser muy friable, es decir forma callos blandos, lo que facilita y acelera el cultivo líquido para crecer células en suspensión, ya que las células de *Bouvardia* se disgregan fácilmente. En las resiembras se puede tener cultivo líquido sin agregados de gran tamaño a la segunda semana de haber iniciado el cultivo en suspensión (Figura 7).

### III.1.2. Cultivo de células en medio líquido.

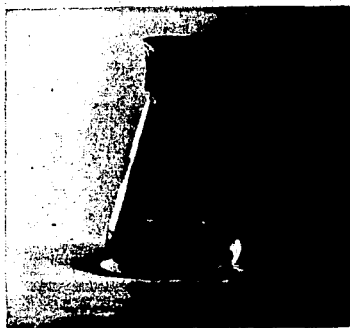
Para graficar la curva de crecimiento del cultivo se midió la cantidad de tejido por paquete de volumen celular; este parámetro arrojó datos reproducibles y apoyados por la información de la bibliografía para *Bouvardia ternifolia* (10, 11, 13, 14).

Debido a que el tejido en suspensión de *B. ternifolia* presenta pocos agregados celulares, retiene mucha agua, por lo que al hacer mediciones de peso fresco se presentaron variaciones muy altas, debido a que el tiempo para eliminar el exceso de agua por vacío, no está bien determinado lo que altera fácilmente el peso final.

Se tomaron mediciones del cultivo cada cuarenta y ocho horas durante 14 días. En el segundo día termina la fase



A



B

Figura 7. Células de *Bouvardia ternifolia*. A: Inducción de callo a partir de semillas. B: Cultivo de células en suspensión.

de reposo, y empieza el crecimiento exponencial; al octavo día ha terminado su crecimiento e inicia su fase estacionaria (Figura 8).

Se utilizaron cultivos de 9 días. En este momento el tejido se encontraba al inicio de la fase estacionaria, de tal forma que el número de células era constante en el cultivo.

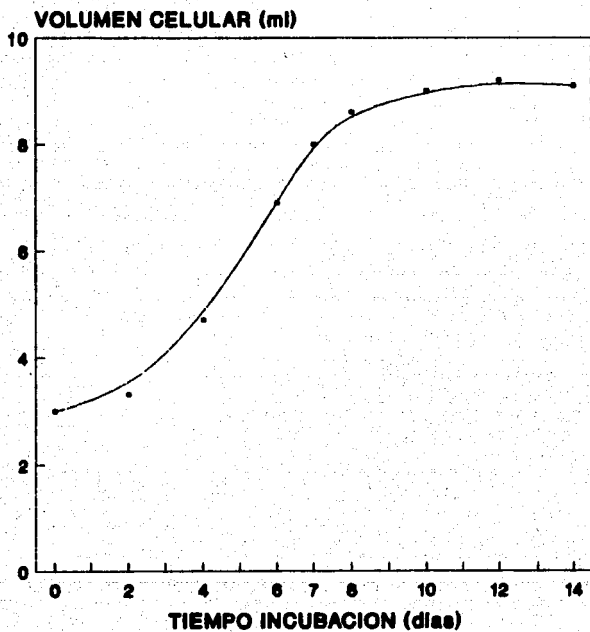
Debido a que la cinética de crecimiento de estas células es muy rápida, es muy difícil distinguir contaminaciones por hongos o bacterias en los cultivos, por lo que fué necesario llevar a cabo un control de contaminación por microscopía de luz, para verificar la ausencia de microorganismos, asegurándose de tener cultivos axénicos.

### III.2.1. Preparación de los cultivos.

Fuó necesario lavar el tejido para eliminar el medio nutritivo en el que se encontraban creciendo hasta ese momento, ya que este medio nutritivo tenía cierta concentración de nitratos, lo que alteraba los resultados de la toma del ion en los tratamientos para provocar ajuste osmótico.

También se consideró que las células deberían permanecer por algún tiempo en la solución de lavado, para eliminar el exceso de nitrato dentro de ellas, y durante el tratamiento

## CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION



—●— *Bouvardia ternifolia*

Fig. 8

mantuvieran avidez por el nitrato, siendo 15 horas el período adecuado, para después proseguir con los tratamientos con nitrato.

Así mismo este período de incubación serviría para inhibir la nitrato reductasa, ya que esta enzima necesita concentraciones externas de nitrato para su inducción (29). La enzima nitrato reductasa reduce el nitrato a nitrito, y haberla tenido presente durante los tratamientos hubiera significado una disminución del nitrato, como tal dentro de la célula. De tal forma que la acumulación del nitrato hubiera sido menor.

Se consideró realizar los lavados e incubación con una solución que mantuviera cierto potencial osmótico, y la célula al ser expuesta no sufriera un choque osmótico.

Se decidió utilizar una solución de  $\text{CaCl}_2$  (9), para que el calcio ayudara a mantener las membranas de las células. Se utilizó la concentración de 5 mM, siendo la misma concentración que se usara en los tratamientos con nitratos.

Se decidió agregar a las soluciones de lavado-incubación y de tratamientos una fuente de carbono, para que las células llenaran sus requerimientos energéticos durante todo el tratamiento. La fuente de carbono que se utilizó fue sacaro-

sa, considerando a este compuesto ideal, por ser el mismo que se utilizara en todos los medios nutritivos (8).

La concentración de sacarosa que se utilizó (87 mM) en esta solución (87 mM), es la misma que se agrega en el medio nutritivo y en los tratamientos de nitratos.

Se realizaron tres lavados con esta solución, en diluciones 1:3 antes de iniciar los tratamientos con nitratos (Figura 5).

Todas las soluciones a excepción de la solución para el tratamiento del efecto del calcio en la toma de nitrato, fueron adicionadas con sacarosa.

### III.3.1. Determinación de nitratos.

Para la determinación de los nitratos se utilizó la técnica descrita por Cataldo y colaboradores (6), esta técnica se basa en la nitrificación del anillo del ácido salicílico (Figura 9).

El método de Cataldo tuvo que ser modificado pues las concentraciones de las soluciones que se proponen en su documento son para plantas completas. De tal forma que para las células en suspensión, las concentraciones de las soluciones de

**ACIDO  
SALICILICO**

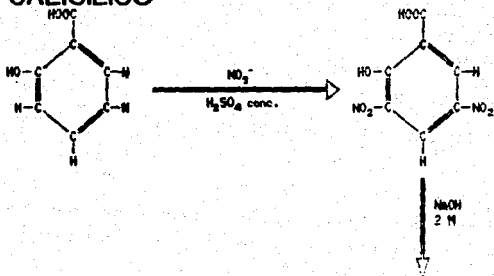
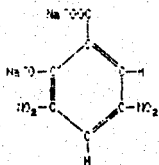


Figura 9.

Nitrificación del anillo del ácido salicílico, con ácido sulfúrico concentrado.

A 419



nitratos eran muy elevadas (20 mM) y tuvieron que ser disminuidas (5 mM) para que fueran detectadas por el sistema de medición, sin diluir.

Solo se midió el nitrato que se encontraba en el exterior celular, pero se debe considerar que la toma total de nitratos es el resultado de los flujos de entrada y salida de nitratos en la célula (28, 35).

El método, aunque no se ve afectado por otros compuestos como amonio, cloruros o nitritos, presenta una alta variabilidad. (6, 9, 22)

La alta variabilidad del método de determinación de nitratos fué compensada con el número de repeticiones de los experimentos; se realizaron seis repeticiones de cada muestra de cada experimento. Se hizo un análisis estadístico de los resultados, obteniendo la media ( $\bar{x}$ ) y desviación estandar (DE), en la que se observan valores en un intervalo no mayor al 12%.



#### III.4. Absorción de nitratos

##### III.4.1. Tratamientos con nitratos.

En la técnica reportada por Cataldo y colaboradores (5) se utilizan plantas completas, expuestas a concentraciones de 20 mM de nitrato de potasio, pero al exponer las células a estas concentraciones de nitratos, no fueron detectables los cambios, por lo que se trabajó a una menor concentración que fué de 5 mM.

Siempre se determinó la concentración de nitratos en el exterior celular. En todas las gráficas, la toma de nitratos se reporta con base en el porcentaje, considerando el 100% en el tiempo 0.

El tiempo para los tratamientos con nitratos fue determinado por los experimentos preliminares que se realizaron. Inicialmente se trabajó con periodos de tiempo largos de hasta 72 horas. En este tiempo se ve disminuida la concentración de nitratos en el exterior, en un porcentaje muy alto. Pero es en las primeras 5 horas en donde se ve mejor la toma de nitratos, por lo que se realizaron tratamientos de 4.5 horas de exposición, después de 15 horas de ayuno de nitrato.

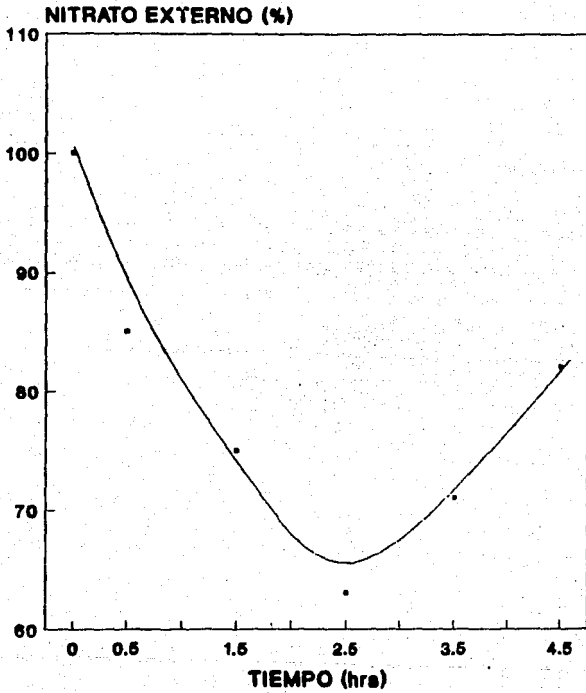
Se consideró el tratamiento con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  como control de la toma de nitrato, por parte de las células y se utilizó el calcio como contra-ion, ya que fué con calcio donde hubo una mejor toma de nitrato y no con potasio; lo anterior se ve reforzado con la información de la literatura donde se menciona que el calcio facilita la entrada de nitrato, ya que las cargas positivas del calcio enmascaran las cargas negativas de la membrana, por lo que los aniones se ven atraídos hacia los acarreadores de membrana (19).

La Figura 10 representa la toma normal de nitratos en células en suspensión en presencia de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  5 mM y sacarosa 87 mM. Se puede observar una toma de nitratos hasta 65% en 2.5 hrs, después de este tiempo se ve una salida de nitrato alcanzando un 65% a las 4.5 hrs.

En el tratamiento con nitrato de potasio 5mM y sacarosa 87mM se observa (Figura 11), una entrada de nitrato, llegando a una concentración de 73% en el exterior, a las dos horas y media, y prosigue una salida de nitratos alcanzando 89% de nitrato en el exterior a las 4.5 hrs.

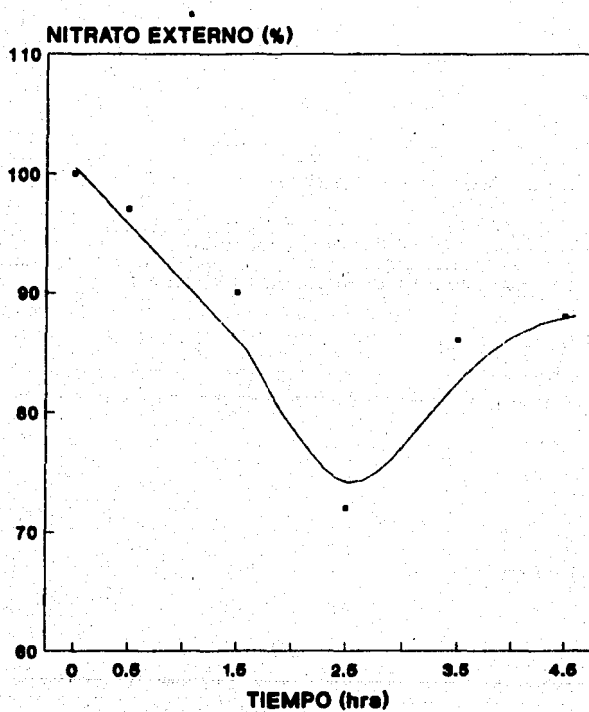
Los tratamientos para provocar ajuste osmótico se realizaron con NaCl y KCl en concentraciones de 150 y 300 mM, y Poli-etilenglicol -0.5 y -1.0 megaPa.

**TOMA TOTAL DE NITRATO**  
**Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5mM)**



**Fig. 10**

**TOMA TOTAL DE NITRATO  
KNO<sub>3</sub> (5 mM)**



**Fig. 11**

Los tratamientos con NaCl 150 y 300 mM son las concentraciones reportadas por Díaz de León (10, 11), en donde la célula sufre un estrés salino y lleva a cabo ajustes metabólicos o fisiológicos.

En el tratamiento con NaCl 150 mM, la fuente de nitratos fue  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  5 mM y sacarosa 87 mM. Se observa que la célula toma nitratos durante la primera hora, llegando a una toma hasta del 30%, a las tres horas y media; se observa un flujo de salida de nitratos, alcanzando en el exterior una concentración del 145%, después de este periodo la célula recupera un poco del nitrato que había sacado anteriormente. Es evidente que una concentración de más del 100% de nitratos en el exterior, indica que hubo un flujo de salida de nitratos de las pozas celulares (Figura 12).

Esta salida de nitrato hasta encontrarse una concentración de 146% en el exterior, podría indicar una influencia de los cloruros como inductores de la salida y/o entrada por un transporte antiport, pero sin que esto implique un papel específico del nitrato como osmolito.

El tratamiento con NaCl 300 mM se realizó bajo las mismas condiciones que el tratamiento de 150 mM. La toma de nitratos fue hasta de un 20% en la primera hora, seguida de una salida de nitratos hasta alcanzar 90% en el exterior, a las tres

## EFFECTO DEL NaCl (150 mM) SOBRE LA TOMA DE NITRATO

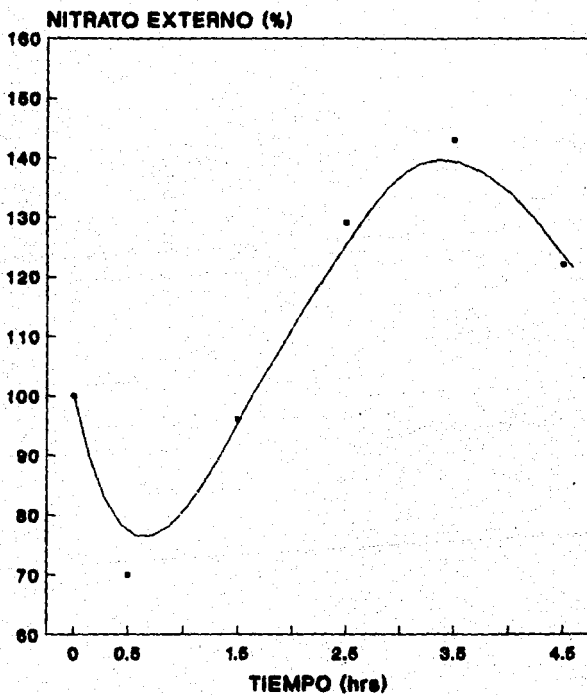


Fig. 12

horas (Figura 13). El cloruro de sodio a 300 mM no provoca la salida de nitrato de las pozas intracelulares, este efecto del cloruro como inductor de la salida de nitrato, se ha perdido quizá por que a estas concentraciones ya existe un severo estrés salino que daña los sistemas membranales.

Para los tratamientos con polietilenglicol (PEG) se utilizó  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y sacarosa en las mismas concentraciones que para los tratamientos de NaCl. El PEG se utilizó en dos concentraciones que provocan un potencial osmótico de -0.5 megaPa y -1.3 megaPa, a estas concentraciones ya se provoca un ajuste osmótico, para células en cultivo en suspensión (1, 2, 17). En la toma de nitratos durante el efecto del PEG -0.5 megaPa, se observa una disminución del nitrato en el exterior celular de un 10% en la primera hora, en la siguiente hora (2 hrs) se presenta una salida de nitratos al medio hasta alcanzar 95% exterior, se ve otra fase de toma de nitratos, hasta un 10% en el exterior a las 4.5 horas (Figura 14).

Durante el tratamiento con PEG -1.3 megaPa se observa una toma de nitratos de 10% en la primera hora y sigue una salida de nitrato de la célula hasta un 95% de nitrato externo a las 2.5 horas, para la hora 4 se ve una disminución del nitrato externo hasta 20% (Figura 15).

## EFFECTO DEL NaCl (300 mM) SOBRE LA TOMA DE NITRATO.

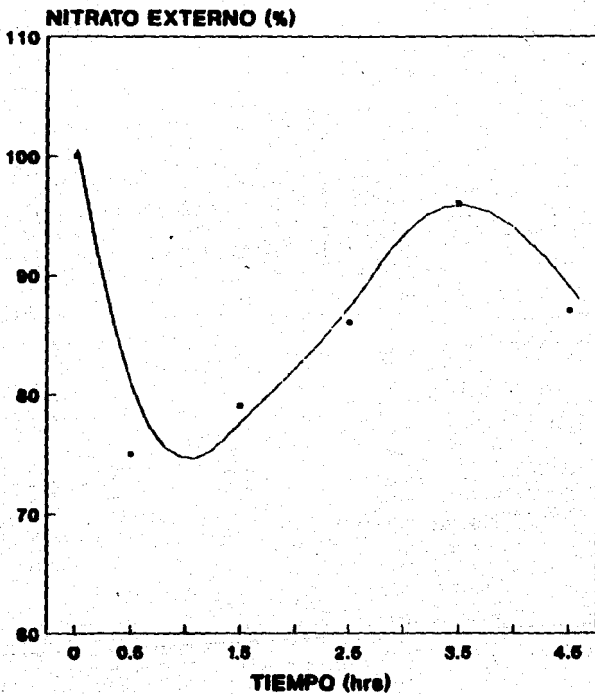


Fig. 13



## EFFECTO DEL PEG (-0.5 megaPa) SOBRE LA TOMA DE NITRATO

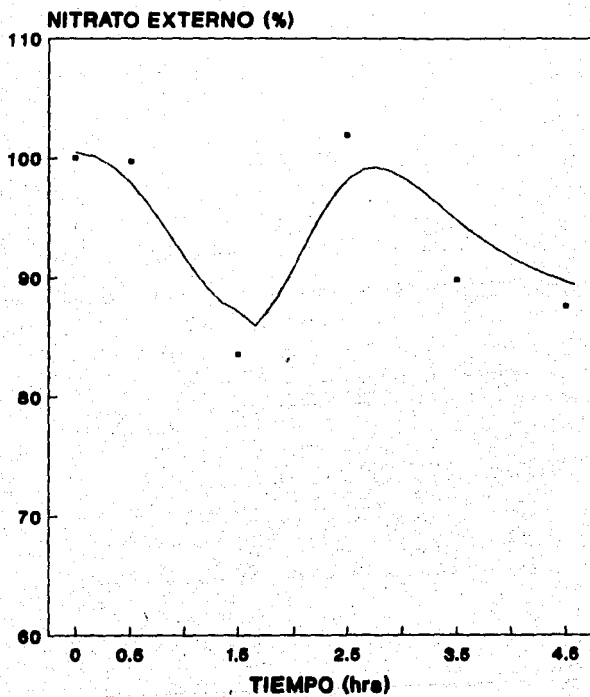


Fig. 14

## EFFECTO DEL PEG (-1.3 megaPa) SOBRE LA TOMA DE NITRATO

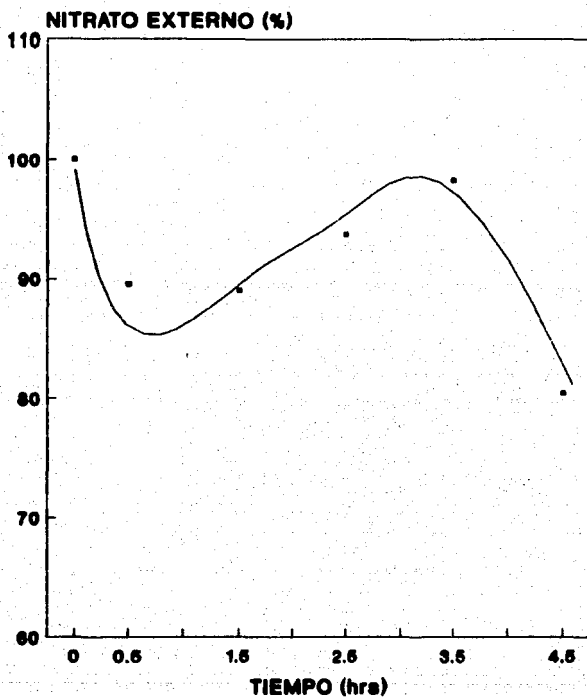


Fig. 15

Se observa que una disminución radical del potencial osmótico, no hace variar el fenómeno de toma y salida de nitratos, por lo que puede sugerirse que el nitrato entra y sale independientemente del potencial osmótico del medio.

Para estudiar la posibilidad de que la sacarosa fuera el compuesto que se acumulara, en respuesta a un ajuste osmótico, se efectuó un tratamiento en el que se excluyó el carbohidrato de las soluciones de lavado-incubación y de la solución con nitratos. Se realizó una solución de  $\text{CaCl}_2$  5 mM y una solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  con la misma concentración.

En la Figura 16 se observan los resultados de los tratamientos sin sacarosa. La toma de nitratos se presenta en un 10% en la primera hora continuando con un flujo de salida hasta alcanzar un 95% de nitratos en el exterior celular.

Se realizaron experimentos con KCl, en las mismas condiciones y concentraciones que para los tratamientos de NaCl. Los resultados arrojados por estos experimentos apoyan la evidencia de que el nitrato no constituye un osmolito para las células de *Bouvardia ternifolia*. Sin embargo, es claro que el  $\text{K}^+$  tiene un efecto importante en el transporte de nitrato (Figuras 17 y 18), que no fue analizado, por no ser considerado como parte de los objetivos del trabajo.

# TOMA DE NITRATO SIN SACAROSA EN EL MEDIO

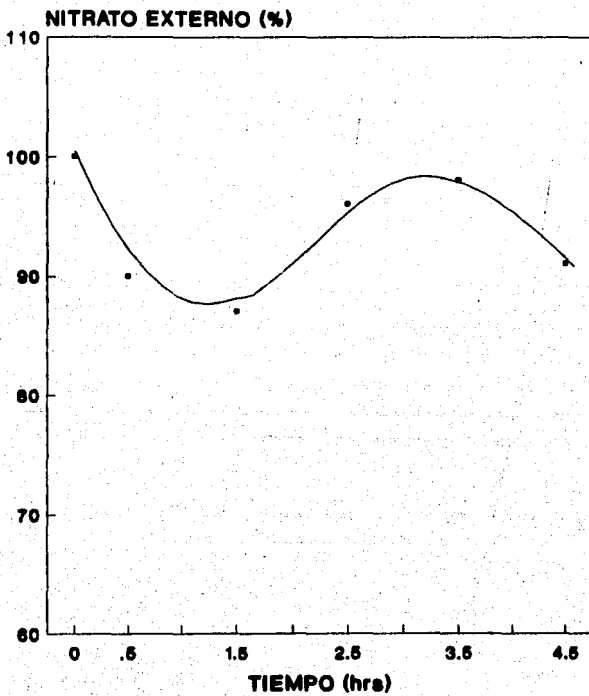


Fig. 16

## EFFECTO DEL KCl (150 mM) SOBRE LA TOMA DE NITRATO

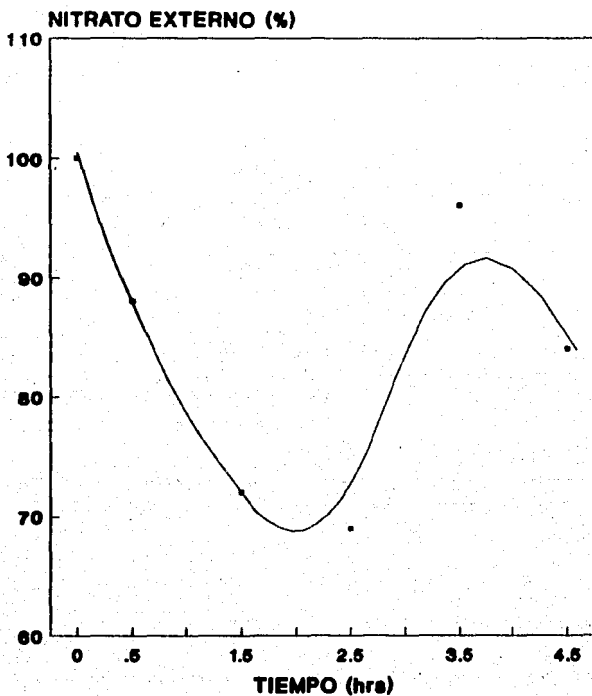


Fig. 17

Se ha sugerido al nitrato como un osmolito en células de plantas superiores (6, 35); esta hipótesis se ha basado en los flujos de entrada y salida que presenta el nitrato en periodos relativamente cortos; sin embargo, analizando los resultados obtenidos en los tratamientos de NaCl, KCl y PEG y su efecto sobre la toma de nitratos por la célula, podemos concluir que el nitrato no representa un compuesto con papel osmorregulador para *B. ternifolia*, ya que las curvas de absorción del nitrato no se ven modificadas ante la presencia de compuestos que provocan un estrés hídrico.

De ser un osmorregulador el nitrato, se hubiera esperado que ante la presencia de las sales (NaCl y KCl) y el PEG, se acumulara dentro de la célula para equilibrar el potencial osmótico interno de la célula. Esta acumulación hubiera sido rápida y durante las curvas de absorción, por lo tanto no se hubiera presentado un flujo de salida tan pronunciado, o se hubieran visto modificaciones en la absorción, ante las diferentes condiciones hídricas a las que fueron expuestos los tejidos.

Los siguientes experimentos fueron enfocados a estudiar las posibles causas que provocan los flujos de entrada y flujos de salida de nitrato en tiempos tan cortos (4.5 hrs).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## EFFECTO DEL KCl (300 mM) SOBRE LA TOMA DE NITRATOS

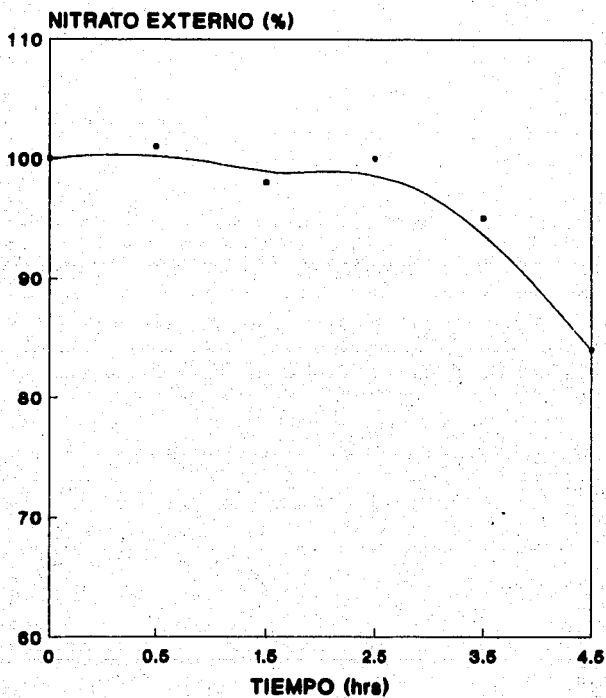


Fig. 18

Se investigó el posible efecto del calcio sobre la toma de nitratos, para lo cual se diseñó un experimento donde se excluyera el calcio de las soluciones de lavado-incubación y utilizando en el tratamiento de nitrato otro contra-ion. La fuente de nitrato fue a base de  $\text{KNO}_3$  en concentración 5mM y sacarosa 87 mM. Los resultados de este tratamiento se presentan en la Figura 19.

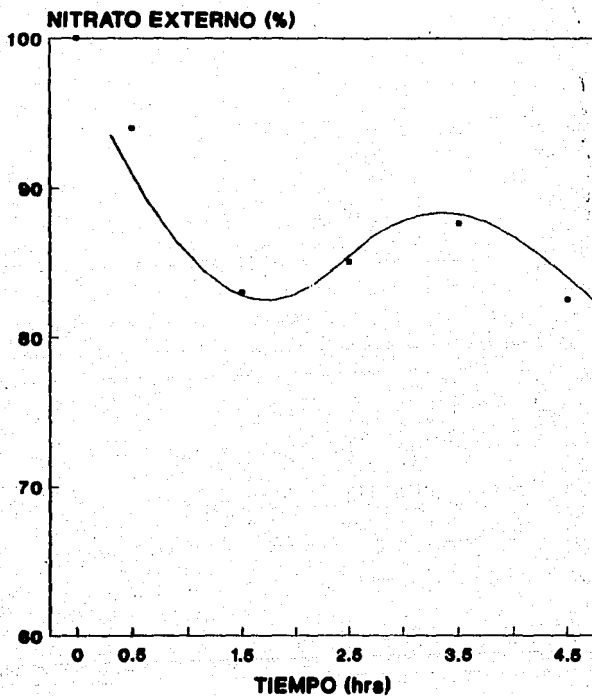
Se puede observar en la Figura 19 que la toma de nitratos no se ve modificada en ausencia de calcio.

Los flujos de entrada y salida de nitratos no se pueden explicar como causa de la nitrato reductasa, ya que esta enzima necesita ser activada por concentraciones externas constantes de nitrato y durante el periodo de incubación el ion fue eliminado. Podemos inferir que el nitrato no se reduce a nitrito dentro de la célula, para luego oxidarse a nitrato y provocar una diferencia de gradiente y salir de la célula.

El pH de las soluciones en todos los tratamientos presentó el mismo valor al inicio y al término del periodo de exposición del nitrato. El pH en los tratamientos siempre se conservó en un intervalo desde 5.7\_3, considerándose como pH fisiológico. Por lo tanto no parece estar involucrado un transporte de protones en el fenómeno; si existiera un transporte activo



**TOMA DE NITRATO  $\text{KNO}_3$  (5mM)  
SIN CALCIO EN EL MEDIO**



**Fig. 19**

mediado por una ATPasa de protones, podrían esperarse cambios en el pH del medio, sin embargo esto no sucede.

Podemos describir la toma de nitratos para *Bouvardia ternifolia* de la siguiente manera. Se presenta inicialmente una fase donde el flujo de entrada es mucho mayor a el flujo de salida, si éste existe. En una segunda fase se presenta un flujo de salida mayor al flujo de entrada de nitratos a la célula. Una tercera etapa indica que el flujo de entrada es superior al de salida, lo que nos hace pensar que es un proceso oscilatorio de la célula.

El fenómeno de flujos que aquí se describe, y que no había sido descrito anteriormente, se propone como un proceso oscilatorio, donde posiblemente la célula en una primera etapa tome demasiados nitratos y se ve obligada a sacar el exceso, pero en el momento de la salida hay un flujo superior al del exceso, por lo que requiere absorber otra cantidad de nitratos para llenar el faltante. Este proceso sería sucesivo hasta que la célula alcance el equilibrio de concentraciones, entre lo que requiere y lo que absorbe o elimina.

## CONCLUSIONES

1) Considerando que en *Bouvardia ternifolia* se presentan flujos de nitrato en tiempos muy cortos (4.5 horas), se propone el cultivo de células de *Bouvardia ternifolia* como herramienta para el estudio de flujos de entrada y salida de nitrato.

2) Se desecha la hipótesis, que se ha propuesto del nitrato como un osmorregulador en células de *B. ternifolia*, no pudiendo extender estos resultados a todas las plantas vasculares, ya que no se puede olvidar que las células en cultivos *in vitro*, presentan modificaciones metabólicas, aún no muy bien determinadas.

3) Se proponen los flujos de entrada y salida de nitratos como un proceso oscilatorio para regular la concentración del nitrato dentro de la célula.

4) Este trabajo ha sido sometido a revisión para su publicación en la revista *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. An international journal on in vitro culture of higher plants.* New York.

## CONCLUSIONES

1) Considerando que en *Bouvardia ternifolia* se presentan flujos de nitrato en tiempos muy cortos (4.5 horas), se propone el cultivo de células de *Bouvardia ternifolia* como herramienta para el estudio de flujos de entrada y salida de nitrato.

2) Se desecha la hipótesis, que se ha propuesto del nitrato como un osmorregulador en células de *B. ternifolia*, no pudiendo extender estos resultados a todas las plantas vasculares, ya que no se puede olvidar que las células en cultivos *in vitro*, presentan modificaciones metabólicas, aún no muy bien determinadas.

3) Se proponen los flujos de entrada y salida de nitratos como un proceso oscilatorio para regular la concentración del nitrato dentro de la célula.

4) Este trabajo ha sido sometido a revisión para su publicación en la revista *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. An international journal on in vitro culture of higher plants. New York.

REFERENCIAS:

(1) Ben-Hayyim, G. 1987. Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylen glycol-induced after stress in cultured citrus cells. *Plant Physiol.* 85:430-433.

(2) Bidwell, R. G. S. 1979. *Fisiología vegetal.* AGT Editor. A. México, p.p. 63-69.

(3) Bowman, D. C. y J. L. Paul. 1988. Uptake and assimilation of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  by nitrogen-deficient perennial ryegrass turf. 88:1303-1309.

(4) Breevers, L. y R. H. Hegeman. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 495-522.

(5) Briens, M. y F. Larher. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of solute carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant Cell and Environment.* 5:287-292.

(6) Cataldo, D. A., M. Haroon, L. E. Schrader y V. L. Yoooungs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in: Plant tissue by nitritation of salicylic acid. *Com. Soil Sci And Plant Analysis.* 6(1):71-80.

(7) Clement, C. R., L. H. P. Jones y M. J. Hopper. 1977. Uptake of nitrogen from flowing nutrient solution: Effect of terminated and intermittent nitrate supplies. In: Hewitt, E. J. y C. V. Cutting. (ed). *Nitrogen assimilation of plants.* Academic Press. New York.

(8) Cram, J. W. 1976. Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply. In: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (ed). *Encyclopedia of plant physiology.* New series. New York. Vol. 2A. pp.289-308.

(9) Dhugga, S. K., J. G. Waines. y R. T. Leonard. 1988. Nitrate absorption by corn roots. *Plant Physiol.* 16:759-763.

(10) Díaz de Leon. J. L., H. Soto, M. T. Merchant, y L. Díaz de Leon. 1981. Biochemical and ultrastructural changes induced by NaCl in cell cultures derived from *Bouvardia ternifolia*. In: San Pietro, A. (ed). *Biosaline Research. A look to the future.* Plenum Press. New York. p.p. 461-466.

- (11) Díaz de Leon, L., L. Arcos, J. L. Díaz de Leon, y H. Soto. 1981. Protein biosynthesis by *Bouvardia ternifolia*. In: San Pietro, A. (ed). Biosaline Research. A look to the future. Plenum Press. New York. p.p. 455-460.
- (12) Epstein, E., J. D. Notlyn, D. W. Rush, R. W. Kingbury, D. B. Kelly, G. A. Cunningham y A. F. Wrona. 1980. Saline culture of crops: A genetic approach. *Science*. 210:399-404.
- (13) Fernández, L. 1979. Metabolismo nitrogenado en cultivo de tejidos de *Bouvardia ternifolia*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, U. N. A. M. México.
- (14) Fernández, L., E. Sánchez De Jiménez. 1982. In vitro culture of *Bouvardia ternifolia*. *Can. J. Bot.* 60:917-921.
- (15) Fitter, A. H. y R. K. M. Hay. 1983. Environmental physiology of plants. Academic Press. New York. p.p. 120-160.
- (16) Greeulach, V. A. 1973. Plant function and structure. MacMillan, Publishing Co., New York. p.p. 183-190.
- (17) Handa, K. A., R. A. Bressan, S. Handa y P. M. Hasegawa. 1982. Tolerance to water and salt stress in cultured cells. In: A. Fujiwara (ed). Plant Tissue Culture. Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokio. p.p. 471-474.
- (18) Handa, A. K., R. A. Bressan, S. Handa, y P. M. Hasegawa. 1982. Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medium containing poly-ethylenglycol. *Plant Physiol.* 69:514-521.
- (19) Huffaker, R. C. y D. W. Rains. 1978. Factors influencing nitrate acquisition by plants; assimilation and fate of reduced nitrogen. In: Nielsen, D. R. y J. G. MacDonald. (ed). Nitrogen in the environment. vol.2. Academic Press. New York.
- (20) Lutge, U. y N. Higinbotham. 1978. Transport in plants. Springer-Verlag. New York.
- (21) Mackown, C. T. 1987. Nitrate uptake and assimilation following nitrate deprivation. *Jo. Exp. Bot.* 38: 192-1090.

(22) Mackown, C. T., W. A. Jackson, y R. J. Volk. 1983. Partitioning of previously-accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta*. 157:8-14.

(23) Marx, J. L. 1979. Plants: Can they live in salt water and like it?. *Science*. 206:1163-1169.

(24) Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.

(25) Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497

(26) Nielsen, P. 1989. Multiphasic uptake of potassium by corn roots. No linear component. *Plant Physiol.* 89:231-237.

(27) Ortuño, O. L. 1988. Efecto de la fuente de nitrógeno en enzimas del metabolismo nitrogenado durante el ciclo de crecimiento en cultivo de tejidos de *Catharanthus roseus*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza". U. N.A.M. México.

(28) Oscarson, P., B. Ingemarsson, M. af Ugglas, y C. M. Larsson. 1987. Short-term studies of  $\text{NO}_3^-$  in *Pisum* using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . *Planta*. 170:550-555.

(29) Osmond, B. C. 1976. Ion absorption and carbon metabolism in cells of higher plants. In: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Enciclopedia of plant physiology. New Series. New York. Vol. 2 A. p.p. 352-354.

(30) Oaks, A. 1977. Nitrate reductase in roots and its regulation. In: Hewitt, E.J. y C. V. Cutting. (ed). Nitrogen assimilation of plants. Academic Press. New York.

(31) Oaks, A., M. Poule, V. J. Goodfellow, L. A. Cass, y H. Deising. 1988. The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88:1067-1072.

(32) Sánchez, S. O. 1974. La flora del Valle de México. ed. Herrero. México. p.p. 375.

(33) Schobert, B. 1977. Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants. J. Theor. Biol. 68:17-26.

(34) Street, H. E. 1977. Plant tissue and cell culture. 2nd ed. Blackwell Scientific Pub. Oxford.

(35) Teyker, H. R., W. A. Jackson, R. J. Volk, y R. H. Moll. 1988. Exogenous  $^{15}\text{NO}_3^-$  influx and endogenous  $^{14}\text{NO}_3^-$  efflux by two maize (*Zea mays* L.) inbreds during nitrogen deprivation. Plant Physiol. 86:778-781.

(36) Thomas, E. y Davey. M. R. 1975. From single cell to plant. Springer Verlag ed. New York Inc.

(37) Wilson, C. M. 1971. Plant nucleases polyacrylamide gel electrophoresis or corn ribonucleases isoenzymes. Plant Physiol. 48:64-68.