

00562
9
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado

INFLUENCIA DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA SOBRE LOS NIVELES DE
LOS SOLUTOS COMPATIBLES GLICINA BETAINA Y PROLINA DURANTE LA
PERDIDA DE AGUA EN *Amaranthus hypochondriacus* L.

TESIS

Que para obtener el grado de maestro en
Ciencias Químicas (Bioquímica)

Presenta

Q B Elisa Miriam Valenzuela Soto



12 JUN 1989

NO ADEUDA LIBROS
EN BIBLIOTECA
CENTRAL

México, D. F.

1989

TESIS CON
VALLA 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.

ABREVIATURAS

CRA	Contenido relativo de agua
Mpa	Megapascales
PEG	Polietilén glicol
Pf	Peso fresco
Pt	Peso en turgencia máxima o saturación
Ψ	Potencial de agua
Ψ_{π}	Potencial osmótico
Ψ_p	Potencial de turgencia o de presión
GB	Glicina betaina
NADPH	Nicotinadenina-dinucleotido fosfato
gPS	Gramo de peso seco
rpm	Revoluciones por minuto

INDICE

	pagina
I.- INTRODUCCION	1
II.- ANTECEDENTES.....	3
II.1. Agua	3
II.1.1. Valor termodinámico del agua	3
II.1.2. Potencial de agua y sus componentes	4
II.1.3. Relaciones de agua en las células vegetales	5
II.1.4. Volumen celular y su relación con los potenciales hídricos	7
II.1.5. Contenido relativo de agua	7
II.2. Amaranto	8
II.3. Salinidad	11
II.4. Solutos compatibles	13
II.4.1. Glicina betaína	14
II.4.2. Prolina	17
III.- HIPOTESIS	19
IV.- OBJETIVOS	20
V.- MATERIALES Y METODOS	21
V.1. Material biológico	21
V.2.. Tratamiento de pérdida de agua	21
V.2.1. Explantes.....	21
V.2.2. Planta completa.....	21
V.3. Medición del contenido relativo de agua.....	22
V.4.. Medición de metabolitos.....	22
V.4.1. Medición de glicina betaína.....	22
V.4.2. Medición de prolina.....	23
V.5. Precursor radiactivo.....	24

V.6. Salinidad.....	25
V.6.1. Planta completa	25
V.6.2. Explantes	25
V.7. Tratamiento con calcio	25
VI. RESULTADOS	26
VI.1. Presencia de glicina betaína en hojas de amaranto	26
VI.2. Capacidad del amaranto para sintetizar glicina betaína en respuesta a déficit de agua	26
VI.3. Determinación de aa concentración óptima de PEG	26
VI.4. Efecto de la pérdida de agua sobre el CRA	29
VI.5. Establecimiento de un sistema que responda bioquímicamente a la pérdida de agua en función del contenido relativo de agua	29
VI.6. Efecto de oscuridad sobre el sistema	33
VI.7. Efecto de calcio	34
VI.8. Determinación de colina como precursor de glicina betaína	37
VI.9. Efecto de cloruro de sodio	39
VI.10. Efecto de calcio durante el estrés salino	45
VII. DISCUSION	48
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. REFERENCIAS	58

RESUMEN

En este trabajo se presenta un estudio sobre la influencia del contenido relativo de agua (CRA) sobre los niveles de glicina betaina y prolina.

Los dos modelos de trabajo que se utilizaron son: explantes de hoja y planta completa de 6 semanas de edad de *Amaranthus hypochondriacus* L. La pérdida de agua se provocó, para los explantes mediante el uso de una solución de polietilén glicol (PM 6000) al 17.8% (PEG potencial hídrico de -1.0 MPa) y para la planta completa mediante la suspensión de riego durante siete días.

Paralelamente se examinó el efecto de salinidad sobre los dos sistemas (explantes y planta completa); para ello se trabajó con dos concentraciones distintas de cloruro de sodio 150 mM para explantes y 300. mM para la planta completa. Se analizó además el efecto que pudiera tener el Ca^{++} sobre la pérdida de agua y sobre el estrés salino.

Se midieron los niveles de glicina betaina y prolina durante la pérdida de agua y el estrés salino.

Se encontró que el explante y la planta completa presentan velocidades de pérdida de agua distintas pero responden acumulando glicina betaina dentro de un mismo intervalo (70-60%) de Contenido Relativo de Agua (CRA).

Por otra parte, la prolina no se acumula en explantes sometidos a déficit de agua. La planta completa acumula 900% con respecto al control a un contenido relativo de agua muy bajo (55-35%).

En el estrés por salinidad los dos sistemas utilizados, planta completa y explante, responden acumulando

glicina betaína (250% y 300% con respecto al control, respectivamente) No se encontró una relación directa de acumulación con respecto al Contenido Relativo de Agua.

Por otra parte, la prolina solo se acumula en la planta completa (750% con respecto al control).

El calcio parece tener en ambos tratamientos (pérdida de agua y salinidad) un efecto protector, permitiéndole al sistema de explantes responder a Contenidos Relativos de Agua más elevados, con respecto a los tratamientos sin calcio.

Se concluye que las hojas de amaranto son capaces de sintetizar glicina betaína. La acumulación de ésta se dá independientemente de la velocidad de pérdida de agua. El contenido relativo de agua es un parámetro adecuado para conocer el *status* hídrico de un tejido. La acumulación de prolina sólo puede ser estudiada en planta completa ya que no se acumula en explantes. La glicina betaína se acumula en respuesta a salinidad; no existe relación entre dicha acumulación y el contenido relativo de agua. El calcio tiene un efecto protector contra la pérdida de agua en el sistema de explantes. La luz estimula la acumulación de glicina betaína.

Summary

Influence of relative water content (RWC) on glycine betaine and proline levels.

It has been used two systems for this work: detached leaves and whole plants of 6 weeks of age of *Amaranthus hypochondriacus* L.. Water lost to detached leaves has been performed using polyethylen glycol 6000 17.8% equivalent to -1.0 MPa water potential. Water lost to whole plants has been provoked by water withholding by 7 days.

Salinity effect on both systems has been studied; two concentrations of NaCl was used: 150 mM to detached leaves and 300 mM to whole plants. Calcium influence on the water lost and salinity stress was analyzed.

Glycine betaine and proline levels during water lost and salinity stress was measured.

Detached leaves and whole plants showed different water lost velocities. Biochemical response measured as glycine betaine accumulation is presented in the same range of relative water content (RWC 70-60%).

However, detached leaves under water deficit were unable to accumulate proline. Whole plants accumulated proline 900% with regard to control to low RWC (55%-35%).

Under salinity stress, both systems used, whole plants and detached leaves accumulated glycine betaine (250% y 300% with regard to control respectively). It has not been found correlation of accumulation of glycine betaine and RWC in this stress type. On the other hand, proline only was accumulated in whole plants (750% with regard to control).

Under water lost and salinity stress calcium seems a protective effect. Calcium permit to system of detached leaves to respond in RWC greater with regard to without calcium treatments.

It has been concluded that amaranto leaves are able to synthesize glycine betaine. This accumulation is water lost velocity independent. RWC is a good a good parameter to know the tissue hydric status. Proline accumulation under salinity stress; it has not relation between glycine betaine accumulation and RWC. Calcium has a protective effect against water lost in detached leaves system. Glycine betaine accumulation is syimulated by light.

I.- INTRODUCCION

La disponibilidad del agua es usualmente la limitante más importante del crecimiento y supervivencia de una planta. En ocasiones una planta morirá o detendrá su crecimiento debido a un déficit en la cantidad de agua disponible para ella, ya sea por falta de riego o por grandes cantidades de sales disueltas en el suelo (principalmente NaCl).

A lo largo del desarrollo evolutivo las plantas han desarrollado una gran cantidad de estrategias adaptativas para sobrevivir en escasez de agua, ésto ha traído como consecuencia que muchas especies vegetales regulen su metabolismo y fisiología de diversas maneras en función de la cantidad de agua disponible.

Se ha propuesto que las plantas al perder agua, sufren un cambio en su potencial hídrico (éste se hace más negativo) y como consecuencia a dicho cambio disparan una serie de mecanismos que le permiten evitar la pérdida de más agua. Algunos de esos mecanismos que se han propuesto son: la toma de iones tales como Na^+ , K^+ y NO_3^- y la síntesis y la acumulación en los tejidos de la planta de solutos orgánicos entre ellos glicina betaína, prolina, azúcares, malato, citrato y oxalato. Con estas estrategias la célula vegetal aumenta su potencial osmótico (lo hace más negativo) con lo que impide mayor pérdida de agua. De esta manera le es posible a la célula mantener la turgencia y sobrevivir (Greenway, y Munns 1980; Hanson y Hitz, 1982; Wyn Jones y Gorham, 1983).

Por otro lado, se empieza a pensar que los cambios en el volumen celular pueden generar señales celulares más específicas de la pérdida de agua que los cambios fisicoquímicos de potencial de agua (Kaiser, 1982; Berkowitz y Gibbs, 1988). La medición de los cambios en el volumen celular puede ser hecha a través de un método indirecto conocido como Contenido Relativo de Agua (CRA) (Sinclair y Ludlow 1985).

Se consideró importante estudiar la acumulación de glicina betaína y prolina en relación a cambios en el contenido relativo de agua provocados por pérdida de agua en hojas de amaranto, ya que la glicina betaína y la prolina se han descrito como osmolitos citoplasmáticos que se acumulan por acción del déficit de agua tanto en bacterias como en plantas.

Se escogió al amaranto como modelo de estudio debido a que es una planta mesofítica, C-4 que tiene un uso muy eficiente de agua.

El amaranto pertenece a la familia de las amarantáceas; es una planta con metabolismo C-4, no resistente a sequía, pero que tiene las estrategias metabólicas, anatómicas y fisiológicas de una planta C-4 para hacer un uso más eficiente de agua. El amaranto probablemente sufre cambios en su metabolismo al ser sometido a déficit de agua, algunos cambios podrían ser a nivel del metabolismo nitrogenado. En la actualidad el amaranto está recibiendo gran interés debido a su gran valor nutritivo y a que tiene una alta eficiencia en el uso de agua.

II.- ANTECEDENTES

II.1.- Agua.

La distribución de la vegetación y el tipo o especie de ésta sobre la superficie de la tierra esta controlada más por la disponibilidad del agua que por cualquier otro factor. Debido a esto, la relación entre la planta y el agua ha sido de gran interés para muchos científicos durante generaciones. El agua constituye el 80-90% del peso fresco de una planta. Una disminución en el contenido de agua de la planta casi siempre causa una disminución en la actividad fisiológica. A lo largo del desarrollo evolutivo han surgido una gran cantidad de estrategias adaptativas para sobrevivir en escasez de agua. (Kramer, 1969).

II.1.1. Valor termodinámico del agua.

La importancia del agua en los organismos vivos resulta de sus propiedades fisicoquímicas únicas. Como son, entre otras su alto calor específico (4.2 J g^{-1}); el calor de vaporización que es el más alto conocido hasta hoy (2441 J g^{-1} a 100°C); y el calor de fusión (333.6 J g^{-1}) el cual es también inusualmente alto. Ahora bien, el alto calor específico del agua tiende a estabilizar las temperaturas de los organismos vivos y su medio ambiente que lo rodea. El alto calor de vaporización del agua hace que la evaporación de ésta tenga un efecto pronunciado de enfriamiento y la condensación tiene un efecto de calentamiento (Kramer, 1969).

El agua al ser transparente a la radiación visible

permite a la luz penetrar a través de ella y hace posible que las algas lleven a cabo fotosíntesis y crecimiento a profundidades considerables en medios acuosos. Además posee alta fuerza cohesiva interna entre las moléculas que le dan una fuerza de tensión y una viscosidad más alta que la de muchos otros líquidos. Esto permite la fuerza de tensión requerida por la teoría de cohesión para que la circulación de el agua se cumpla.

Por otra parte, el agua al ser una molécula dipolar tiene una alta constante dieléctrica la cual contribuye a su comportamiento como un solvente polar casi perfecto.

Todas estas características son de gran importancia en las relaciones agua-planta (Kramer, 1969).

II.1.2. Potencial de agua y sus componentes.

Cuando el agua fluye de abajo hacia arriba puede producir trabajo. El agua en la base ha perdido parte de su capacidad para hacer trabajo y tiene un contenido de energía libre menor que cuando está en la parte de arriba. Así, se tiene un flujo de agua cuya fuerza conductora es la diferencia en energía libre entre la parte de arriba y la de abajo.

De manera similar, el movimiento de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera es debido a las diferencias en el contenido de energía (capacidad para hacer trabajo) del agua en las diferentes partes del sistema. Por tanto, se puede decir que el agua fluye del suelo hacia la atmósfera a través de la planta en respuesta a un gradiente de energía.

Entre los fisiólogos de plantas, es común expresar el contenido de energía libre del agua en forma de potencial de agua (Ψ). El cual se define como la energía libre por unidad de volumen de agua, asumiendo que el potencial del agua pura es cero bajo condiciones estándar. En vista de que la energía por unidad de volumen tiene las mismas dimensiones que la presión, el potencial de agua es expresado en unidades de presión ya sea el bar o el Mega Pascal (MPa).

En el sistema suelo-planta-atmósfera, los potenciales de agua son usualmente negativos y el agua fluye a través de regiones con valores más negativos, esto es, la atmósfera tiene un potencial de agua más negativo que la planta y ésta a su vez tiene un potencial de agua más negativo que el del suelo. En el tejido vegetal, el potencial de agua puede alcanzar el equilibrio por la aparición de una presión hidrostática (presión de turgencia) y por lo tanto se puede expresar por la ecuación

$$\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p$$

donde Ψ_{π} representa el potencial osmótico y Ψ_p representa el potencial de presión o de turgencia (Fitter y Hay, 1981)

II.1.3. Relaciones de agua en las células vegetales.

En una célula vegetal el medio externo es el agua en la pared celular y en los espacios intercelulares (apoplasto) el cual está sujeto a la presión atmosférica. La mayor parte del agua celular está contenida en la vacuola. La membrana celular y el tonoplasto (membrana vacuolar) pueden considerarse un complejo semipermeable. El potencial hídrico del citoplasma es más negativo que el del apoplasto por lo

tanto el agua tiende a fluir hacia el citoplasma, el potencial hídrico de la vacuola es más negativo que el del citoplasma por lo que el agua fluye hacia la vacuola, aumentando el potencial de agua de ésta y así incrementa el volumen de la vacuola. En una célula éste flujo de agua podría continuar hasta que la diferencia en potencial de agua entre apoplasto, citoplasma y vacuola llegue al equilibrio.

En una hoja, el volumen celular esta limitado por la pared celular y sólo un pequeño influjo de agua puede ser acomodado por la elasticidad de las paredes celulares. Consecuentemente la presión de turgencia desarrollada en la vacuola, presiona el citoplasma contra la superficie interna de la pared celular aumentando el potencial de agua vacuolar. Al aumentar la presión de turgencia las células se presionan una contra otra con el resultado que las hojas originalmente flácidas, incrementan su turgencia. En el equilibrio la presión de turgencia alcanza su valor máximo y ya no hay tendencia para que más agua fluya del apoplasto a la vacuola.

Es común asumir que el agua citoplasmática está en equilibrio termodinámico con el agua vacuolar. Consecuentemente, bajo muchas condiciones, el potencial de agua en el citoplasma será idéntico al de la vacuola, pudiendo simplemente decir que

$$\Psi_{\text{cel}} = \Psi_{\text{cit}} = \Psi_{\text{vac}}$$

el potencial de agua celular es igual al potencial de agua citoplásmico y este a su vez es igual al potencial de agua de la vacuola (Fitter y Hay, 1981).

II.1.4. Volumen celular y su relación con los potenciales hídricos.

El volumen celular está íntimamente ligado a los cambios en el potencial de agua celular, ya que al tomar agua la célula aumenta su volumen hasta donde su módulo elástico se lo permite. Por el contrario, al perder agua el volumen celular disminuye dándose un aumento en el potencial osmótico (se hace más negativo) como se muestra en el diagrama de Hófler (fig 1).

Recientemente se ha propuesto que cambios en el volumen celular podrían estar involucrados en cambios metabólicos tanto en células animales (Cala, Finn, 1985; Mills, 1987) como en células vegetales (Kaiser, 1981a, 1981b, 1982; Robinson 1985; Berkowitz, 1988,). En los experimentos de Kaiser se ha estudiado la relación entre volumen celular, volumen cloroplástico y fotosíntesis, encontrándose una estrecha relación entre cambios en el volumen y actividad fotosintética.

II.1.5. Contenido Relativo de Agua.

En los dos párrafos anteriores se han descrito las relaciones hídricas celulares de células "típicas", sin embargo existe considerable variación en el potencial osmótico vacuolar entre especies vegetales. También la respuesta a la pérdida de agua en las células de algunas especies puede ser diferente a la mostrada en el diagrama de Hofler. Puesto que alguna especies resistentes a sequía evitan la pérdida de turgencia (y por tanto no dejan de crecer) por acumulación de solutos dentro de la vacuola, haciéndose más

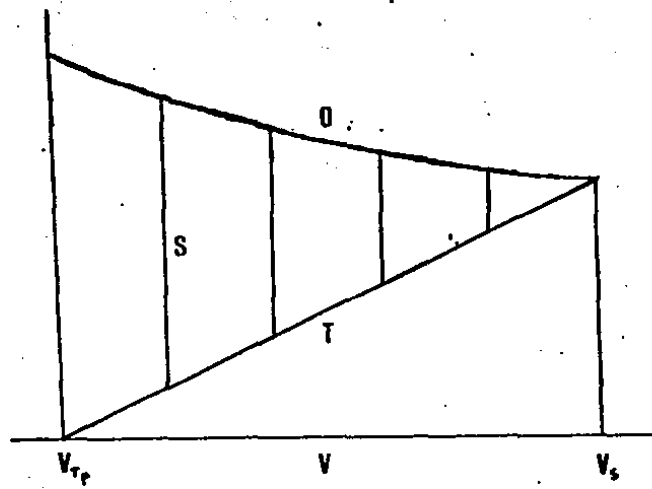


FIG. 1 DIAGRAMA DE HOFLER

V: volumen de la célula; V_s : a plasmólisis, V_{Tp} a saturación completa. O: Potencial ósmótico del fluido celular. T: Presión de turgencia. S: tensión de succión

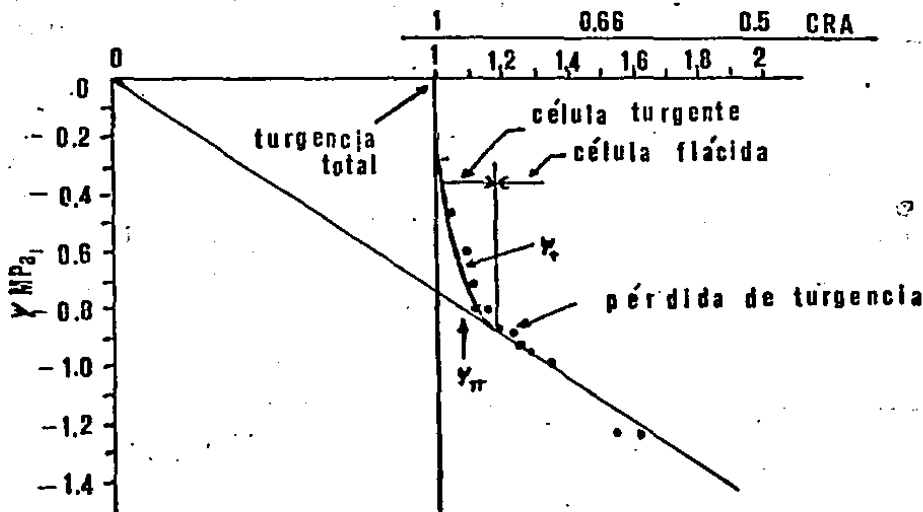


DIAGRAMA DE HOFLER MODIFICADO POR RICHTER

CRA: Contenido relativo de agua

ψ potencial de agua

ψ_t potencial total

ψ_π potencial osmótico

negativo el potencial osmótico.

Debido a ésto y a las dificultades metodológicas que representan las mediciones de potenciales hídricos, algunos autores (Sinclair y Ludlow, 1985) prefieren indicar la pérdida de agua en el tejido por la fracción de agua perdida, parámetro conocido como Contenido relativo de agua (CRA) más que por la depresión en el potencial de agua. El CRA ha mostrado ser una medida más adecuada que los potenciales hídricos, para correlacionar la actividad metabólica con la pérdida de agua. Se considera posible utilizar el CRA como un indicador del volumen celular (Ritcher 1978, ver fig 1). Además, se dice que el CRA puede indicarnos los cambios en el volumen celular por las siguientes razones: 1) la densidad del agua no sufre grandes cambios al incrementar la temperatura del ambiente durante los tratamientos de pérdida de agua por lo que es posible considerarla de 1 g/ml y 2) se puede suponer que al secar un tejido únicamente se pierde agua, por lo que su peso permite calcular la variación de volumen, con base en la densidad del agua. Finalmente es necesario aclarar que no se está considerando al CRA como el volumen total real de las células sino como un estimador del mismo.

II.2. Amaranto

El amaranto es una planta con metabolismo C-4, mesofítica, no es resistente a la sequía pero muestra un uso de agua muy eficiente (300 g de agua transpirada / g de materia seca producida), mientras que el trigo y la cebada, que son plantas C-3, tienen un mayor consumo de agua por gramo

de materia seca producida (540 y 520 respectivamente) (Larcher, 1975, citado por Fitter y Hay, 1983).

Dado que el amaranto no es resistente a la sequía, no presenta características morfológicas o fisiológicas semejantes las que se han descrito en plantas resistentes a sequía. El amaranto no cuenta con un sistema radicular excepcionalmente grande, no tiene tallos suculentos, no cuenta con hojas pequeñas, ni suberizadas, no tiene estomas sumergidos y no tiene vellosidades.

Una característica que es de llamar la atención en el amaranto, es su rápida toma de agua para restablecer la turgencia de sus hojas, ésta se lleva a cabo en aproximadamente 20 minutos. Esta característica ha sido uno de los motivos para llevar a cabo estos estudios sobre la influencia que pudiera tener la pérdida de agua sobre el metabolismo celular. Otra razón importante, es el hecho de que el amaranto es una dicotiledonea mesofítica, no resistente a sequía. Es posible esperar cambios y reajustes celulares para adaptarse a la pérdida de agua.

No existen estudios bioquímicos sobre respuesta del amaranto a pérdida de agua, la gran mayoría de los estudios, son sobre aspectos nutricionales por su alta calidad proteica y agronómicos para determinar si es resistente a sequía y para evitar la gran variabilidad genética que se presenta en esta familia. En estudios realizados en este laboratorio, Del Río Portilla (1988) encontró que el amaranto presenta un punto de marchitez permanente de 37% de CRA; y el punto de daño celular en 42% de CRA.

II.3. Salinidad.

El crecimiento y supervivencia de las plantas en alta salinidad dependen de su adaptación a bajos potenciales de agua y a altas concentraciones de Na^+ y Cl^- . El efecto adverso de bajo potencial de agua externo puede ser remediado por toma de electrolitos ya sea en la vacuola o en el citoplasma pero esta toma crea daño por exceso de iones. Por tanto las posibles adaptaciones varían entre la exclusión de Na^+ y Cl^- o bien la rápida toma de esos iones para usarlos como los solutos iónicos principales en las células (Greenway y Munns, 1980).

Se conoce poco acerca de los mecanismos que afectan el crecimiento y la supervivencia celular en plantas sometidas a estrés salino, ya que no se ha podido distinguir entre el daño causado por la disminución en el potencial de agua y el de exceso de iones. Greenway y Munns (1980) sugieren que en plantas no halófitas las hojas expandidas son afectadas por el exceso de iones y que las hojas en expansión son afectadas por el déficit de agua. En estas últimas, no se conoce cómo es que los iones ejercen su efecto adverso, se ha sugerido que podría afectar la permeabilidad de la membrana o la estabilidad de las actividades enzimáticas.

Se ha propuesto que los mecanismos primarios que proporcionan resistencia a salinidad a las células incluyen: enzimas estables en alta salinidad, exclusión de iones y compartimentalización de iones (Daines y Gould, 1985; Ahmad et al., 1987). En las dos últimas posibilidades, un requerimiento secundario es corregir el desbalance osmótico

causado por la redistribución de los iones a través de las membranas.

Una manera de evitar el daño celular y mantener el crecimiento en este tipo de estrés, es la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma para que estos contribuyan al balance osmótico, cuando los electrolitos están en menor concentración en el citoplasma que en la vacuola y para proteger a las enzimas de las altas concentraciones de electrolitos en el citoplasma. Los solutos que se incrementan a alta salinidad en muchas especies incluyen glicina betaína (Storey y Wyn Jones, 1975; Grieve y Maas, 1984), prolina (Lone et al., 1987) y sacarosa (Perry et al., 1987).

La evidencia disponible en halófitas principalmente, sugiere que la glicina betaína puede tener un papel en el mantenimiento del crecimiento más que en la supervivencia celular; la prolina en cambio parece tener un papel relacionado con la supervivencia más que con el mantenimiento del crecimiento (Greenway y Munns, 1980).

La interacción entre Na^+ y Ca^{++} ha sido extensivamente investigada. Uno de los puntos estudiados ha sido el del papel del Ca^{++} en el transporte selectivo de cationes, especialmente K^+ en células vegetales (Kent y Lauchli, 1985, Ben-Hayyim, 1987).

Cramer y sus colaboradores (1985, 1986) han demostrado que uno de los problemas que se presentan en las células sometidas a estrés salino, es que el Na^+ desplaza al Ca^{++} asociado a la membrana celular. Por otro lado, se sabe que la relación celular Na^+/K^+ es de gran importancia

para el metabolismo. Comúnmente se acepta que a altas concentraciones de NaCl, se dá una competencia entre Na^+ y K^+ que conduce a reducidos niveles de K^+ intracelular. Los altos niveles de K^+ intracelular han sido correlacionados con altos niveles de tolerancia a salinidad (Croughan et al., 1979, Watad et al., 1983, Ben-Hayyim et al., 1985, 1987).

En varios sistemas vegetales se ha demostrado que el efecto diferencial de altas concentraciones de NaCl esta parcialmente relacionado con bajas concentraciones de Ca^{++} , tales estudios apoyan la idea de que el efecto protector del Ca^{++} se debe al mantenimiento de la integridad de la membrana, que evita la salida de K^+ (Kurth et al., 1986 Ben-Hayyim, 1987). No existe información disponible sobre si existe interacción entre K^+ y Ca^{++} .

II.4. Solutos Compatibles

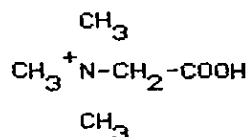
En varias revisiones se ha reconocido que en células de baja vacuolación, los compuestos orgánicos y el K^+ hacen la mayor contribución a la adaptación hiperosmótica; mientras que en células altamente vacuoladas el KCl y/o el NaCl son los osmóticos más importantes (a excepción de las bacterias halofílicas) (Wyn Jones y Gorham 1983). Los citosolutos orgánicos acumulados son frecuentemente llamados solutos compatibles, el término fué introducido por Borowitzka y Brown (1974) para describir sustancias no inhibitorias y con función metabólica que se acumulan cuando la planta está sometida a bajos potenciales de agua. Un número de posibles solutos compatibles han sido reconocidos en plantas superiores y muchos más en organismos inferiores (Poljakoff-Mayber et

al., 1987).

Se ha producido suficiente evidencia para demostrar en cada caso que la acumulación de estos osmoprotectores es de valor adaptativo más que un reflejo de daño metabólico. Por otro lado no se ha encontrado una relación entre la resistencia a sequía y potencial acumulatorio de prolina aunque si se ha encontrado esta relación en el caso de glicina betaina (Grumet y Hanson, 1986).

II.4.1. Glicina betaina.

La glicina betaina (N,N,N -trimetilglicina) es un compuesto cuaternario de amonio el cual se acumula en las hojas de un amplio rango de especies vegetales en respuesta a estrés de agua y/o salino. Su fórmula es:



Se ha reportado que la glicina betaina se acumula en halófitas tales como *Spartina*, *Suaeda maritima* y *Beta maritima* (Wyn Jones et.al. 1977, Briens et.al. 1982, Stumpf 1985). No-halófitas tales como espinaca, cebada, trigo y sorgo (Hanson y Scott, 1980; Hanson y Hitz, 1982; Wyn Jones y Storey, 1981; Grieve y Maas, 1984; McDonnell y Wyn Jones, 1988). La mayoría de las especies estudiadas que acumulan glicina betaina pertenecen ya sea a la familia de las quenopodiaceas o a la de las gramineas

También se ha encontrado que las cianobacterias halofíticas acumulan altas concentraciones de glicina betaina

cuando son crecidas bajo condiciones salinas (Reed et al., 1984, Moore et al., 1987). Al igual que las eubacterias (Imhoff y Valera, 1984; Cairney et al., 1985; Landfald y Strom, 1986)

La vía de síntesis de glicina betaina ha sido estudiada en dos tipos de plantas C-3 (Hitz et al., 1981; Coughlan y Wyn Jones, 1982) una en quenopodiaceas y la otra en gramíneas (fig 2). La P-colina que es oxidada a betainaldehído y posteriormente a glicina betaina, proviene de serina fotorrespiratoria, en las quenopodiaceas (Coughlan y Wyn Jones, 1982). En las gramíneas proviene de la degradación de fosfolípidos (Hanson y Rhodes, 1983; McDonnell y Wyn Jones, 1988). La oxidación de la P-colina se lleva a cabo en el cloroplasto (Hanson y Scott, 1980) y es influenciada por la luz (Weigel et al., 1986), de ahí es exportada al citoplasma donde se acumula. Se ha encontrado una isoenzima de la reacción de betainaldehído a glicina betaina en citoplasma (Weigel et al., 1988) pero la mayor parte de la síntesis se dá en el cloroplasto.

Se ha propuesto que la acumulación de éste compuesto en las especies vegetales en particular, es importante en la respuesta al estrés porque tiene un significado adaptativo. Se ha propuesto que este compuesto actúa como un osmótico no tóxico localizado preferencialmente en el citoplasma y en el cloroplasto de las células vegetales donde puede actuar como un protector de enzimas (Wyn Jones y Storey 1981; Robinson, 1985; Grumet y Hanson, 1986), en la compartimentalización de iones (Ahmad, et.al. 1987), en la estabilización de membranas (Jolivet, 1982) y en la

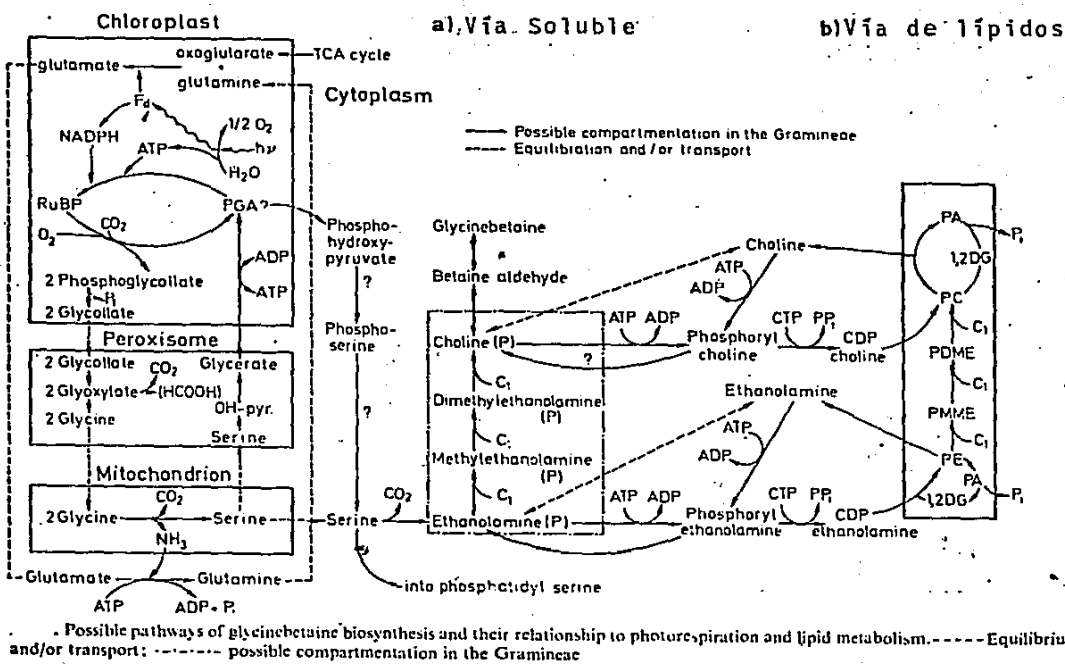


Fig. 2.- Posibles rutas de biosíntesis de glicina betainas. - - - - Equilibrio y/o transporte; - - - - posible compartimentalización en las gramíneas, Coughlam y Wyn Jones (1982).

replicación del DNA a nivel bacteriano (Meury, 1988).

II.4.2. Prolina

Algunas especies vegetales y algunas bacterias acumulan prolina libre como respuesta a un déficit de agua o cuando se encuentran en un medio salino (Paleg, 1981). Muchos estudios se han llevado a cabo para conocer las causas metabólicas de la acumulación de prolina durante el estrés de agua proponiéndose las siguientes: 1) Su posible papel como osmolito compatible, regulando y reduciendo la pérdida de agua celular. 2) Como protector de enzimas, ya que la prolina afecta la solubilidad de ciertas proteínas por interacción de la prolina con los residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína (Paleg, 1984). 3) La prolina puede ser una fuente de energía y grupos amino rápidamente utilizables (Paleg, 1981).

Entre las especies vegetales más estudiadas que acumulan prolina libre se encuentran: cebada, frijol, maíz, trigo, soya, algodón y tabaco (Singh et al., 1973; Mc Michael y Elmore, 1977; Hanson et al., 1979; Dix y Pierce, 1981; Moftah y Michel, 1987; Ibarra et al. 1988).

En las plantas superiores, la principal ruta de síntesis de prolina se localiza en el cloroplasto y su precursor es el ácido glutámico (fig 3). La prolina se oxida a glutámico de nuevo mediante una serie de reacciones semejantes a las que le dieron origen (fig 4).

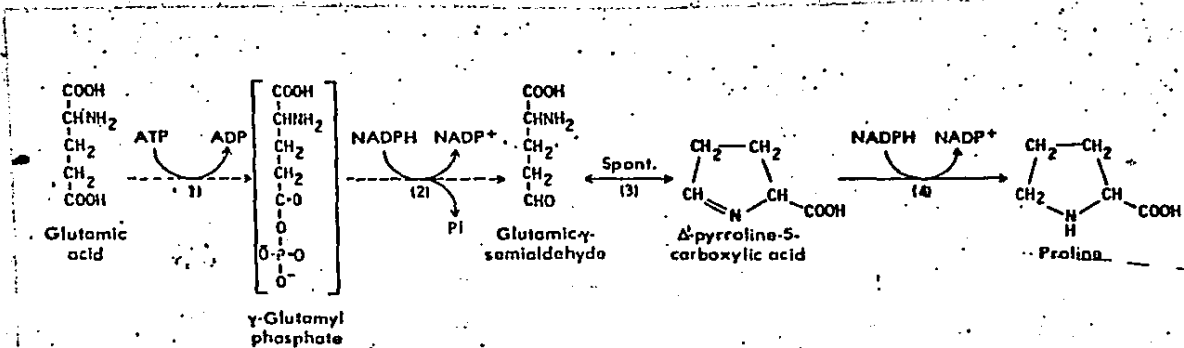


Fig. 3. Vía de Síntesis de Prolina.

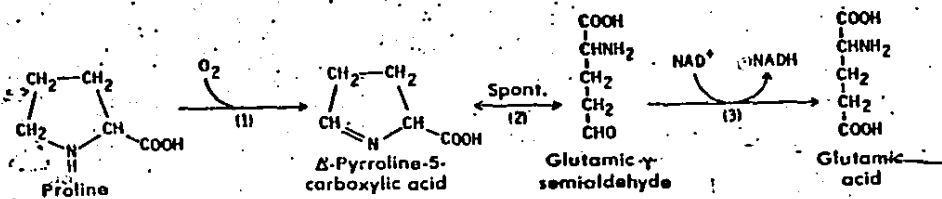


Fig. 4. Vía de oxidación de Prolina.

III.- HIPOTESIS

La pérdida de agua en una célula provoca que se dé un cambio en su volumen celular, en el potencial de solutos y en el potencial de turgencia. Por otro lado, se ha reportado que el contenido relativo de agua puede ser un reflejo de los cambios de volumen celular. El cambio en el volumen celular hace que se den cambios en la pared y/o membrana celular, los cuales pueden ser traducidos en señales de pérdida de agua; esto traerá como resultado cambios metabólicos y fisiológicos. Entre los cambios metabólicos se esperaría la acumulación de solutos, entre ellos glicina betaína y prolina. Y dado que en la mayoría de los estudios realizados sobre cambios metabólicos en respuesta a déficit de agua se ha acumulado mucha información en la cual se desconoce la cantidad de agua presente en el tejido; es importante caracterizar metodologías de fácil aplicación y que nos den mayor información acerca del *status* hídrico del tejido sometido a déficit de agua.

Con base a lo anterior se propone que los cambios en el contenido relativo de agua provocados por la pérdida de agua tienen influencia sobre las señales que directa o indirectamente inducen la acumulación de glicina betaína y prolina.

IV.-.OBJETIVO

Caracterizar un sistema que responda bioquímicamente al los cambios en contenido relativo de agua provocados por pérdida de agua. La respuesta bioquímica se estudia a través de la acumulación de glicina betaína y prolina.

IV.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar si la glicina betaína se encuentra presente en las hojas de amaranto.
- 2.- Establecer si la planta es capaz de sintetizar glicina betaína y prolina como consecuencia al déficit de agua.
- 3.- Caracterizar si el sistema de explantes responde de la misma manera que la planta completa.
- 4.- Determinar qué relación existe entre la acumulación de glicina betaína y el contenido relativo de agua.
- 5.- Estudiar qué otros factores influyen en la síntesis de glicina betaína (Luz, oscuridad, NaCl y Ca⁺⁺).

V.- MATERIALES Y METODOS

V.1.- Material biológico.

Se utilizaron hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. tipo mercado (INIFAP, Chapingo, México; donado por el Ing. Eduardo Espitia). Las plantas se crecieron en tierra bajo condiciones de invernadero con fotoperíodo de 12-14 horas, temperatura de 18°-30°C. Se utilizaron las hojas totalmente expandidas de plantas de 6 a 8 semanas de edad.

V.2.- Tratamiento de pérdida de agua.

V.2.1.- Explantes.

Se utilizaron 2 metodologías para provocar el déficit de agua de los explantes de hoja:

Hojas totalmente expandidas se colocaron en una cámara de crecimiento a 25°C y con luz durante 8 horas y se dejaron secar al aire, esto significa sin ninguna solución deshidratante.

Se tomaron hojas maduras y turgentes y se sumergió el pecíolo en solución de PEG 6000 para un potencial de agua de -1.0 MPa. Un grupo de estas hojas se colocó en luz y el otro en oscuridad. Se tomaron de 8-9 hojas a 1,2,4,6,8 y 10 horas, se congeló (en congelador de -70° C) el tejido para medir tanto el CRA como GB y prolina.

V.2.2.- Planta completa.

Se formaron dos grupos de plantas; uno se mantuvo en oscuridad y el otro en luz, se dejaron de regar durante 7 días las de luz y 12 días las de oscuridad. Diariamente se tomaron de 8-9 hojas para determinar el

contenido relativo de agua (CRA) y para cuantificar glicina betaína (GB) y prolina.

V.3.- Medición del contenido relativo de agua.

Se cortaron círculos de 8 mm de diámetro de cada hoja, se pesaron para determinar el peso fresco (Pf), inmediatamente después fueron colocados en la cámara de saturación. Esta se guardó en una bolsa de plástico negro por cuatro horas (tiempo establecido para el sistema por Del Río 1988). Al finalizar este tiempo se pesaron de nuevo para conocer el peso de turgencia máxima (Pt). Posteriormente, los discos de hoja se colocaron en una estufa a 80°C con vacío, por 24 horas para obtener el peso seco constante (Ps). El CRA se calculó con la siguiente fórmula:

$$CRA = \frac{Pf - Ps}{Pt - Ps} \times 100$$

(Slavík, 1974).

V.4.- Determinación de metabolitos.

V.4.1.- Medición de glicina betaína.

El extracto se obtiene a partir de 1 gramo de hojas, las cuales se pulverizan en mortero, se pasan a un tubo de vidrio y se le añade 5 ml de agua desionizada. Se homogeniza en politrón (Ultra turrax, Janke-Kunkel Ika-Werk) por 45 segs., se filtra a través de 6 capas de gasa y se le añade TCA (concentración final de 10%). Se centrifuga a 15000 rpm por 20 min. Se toma el sobrenadante y se extrae el TCA con éter etílico (por tres veces). Cada muestra es neutralizada y puesta a secar en una estufa con vacío y a 80°C (Precision,

GCA company). Se resuspenden las muestras en 200 μ l de agua desionizada y 100 μ l se toman para cuantificación de aminos cuaternarias y 100 μ l se pasan a través de una columna de Dowex-50W (Sigma, H⁺, 200-300 mesh). Se lava con agua y se eluye con 4 ml de NH₄OH 4N, el eluido se pone a secar en la estufa con vacío a 80^oC. Se resuspende la muestra en 100 μ l de agua. A cada muestra se le añade reactivo de Dragendorff y se centrifuga a 7000 g. Con mucho cuidado se quita todo el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 ml de KI 2.45 M, se toman 10 μ l y se llevan a 1 ml con KI 0.49 M. Se lee a 467 nm contra un blanco de KI 0.49 M (método de Stumpf, 1984).

Preparación del reactivo de Dragendorff:

Mezclar partes iguales de Bi(NO₃)₂ 0.35 M y KI 2.45 M.
(Stumpf, 1984)

Activación de la resina Dowex-50 W.

Se prepara en batch, se lava con alcohol etílico al 96% caliente, después se lava con abundante agua y se le agrega HCl 1 N por 1 h (agitando con frecuencia), finalmente se lava varias veces con agua desionizada hasta pH neutro (manual de Sigma).

V.4.2.- Cuantificación de prolina.

Cada muestra se homogeniza en un mortero con ac. sulfosalicílico al 3% en proporción 0.5g de tejido a 10 ml. de ácido sulfosalicílico. El homogenado se filtra a través de un embudo Buchner con papel filtro Whatman #2 en un matraz Kitasato al vacío. Se pasan 2 ml del filtrado a un tubo de ensayo (15x150). A cada tubo se le añaden 2 ml de ácido acético glacial y 2 ml de ninhidrina ácida. Se agitan las

mezclas y se ponen a reaccionar 1 hora en baño maría a ebullición. La reacción se detiene en un baño de hielo. Una vez que adquieren la temperatura ambiente se extrae la muestra con 4 ml de tolueno, agitando en vortex por 15-20 seg. Se aspira el tolueno con pipeta Pasteur y se lee a 520 nm (método de Bates, 1973).

Preparación de ninhidrina ácida:

En oscuridad

Para 50 ml	1.25 g de ninhidrina
	30 ml de ácido acético glacial
	20 ml de ácido fosfórico 6M

Calentar ligeramente para disolver.

V.5.- Precursor radiactivo.

V.5..1.- [³H]-Colina.

Se utilizó cloruro de [metil-³H]-colina (Amersham) en una cantidad de 0.37 MBq/por experimento. Se tomó una alícuota de 10 μ l de colina radiactiva, se colocó en un tubo de Eppendorff, donde se sumergió el pecíolo de una hoja, para que ésta absorviera la colina, durante 30 minutos. Después se le añadieron 50 μ l de agua, una vez tomados por la hoja, ésta se colocó en una solución de PEG (ϕ = -1.0 MPa) y/o en una de NaCl 150 mM, se dejó por 6 horas en luz y/o oscuridad según fuera el caso. Posteriormente se dividió en tres partes; pecíolo, parte distal y parte proximal de la hoja, se congelaron a -70°C. Las muestras se homogenizaron en un tubo con una varilla de vidrio y arena. Al extracto se le añade TCA (10% concentración final) y se centrifuga a 15000

rpm por 20 minutos. Se toma el sobrenadante y se neutraliza. Se pasa el extracto a través de una columna de Dowex-50W (Sigma), la cual separa colina de glicina betaina, se lava con agua y se eluye con 4 ml de NH_4OH 4N, se toma una alícuota de 100 μl del eluido a la cual se le añaden 3 ml de líquido de centelleo y se determina la radiactividad.

El medio de incubación (solución de PEG o de NaCl) se procesó como el sobrenadante del extracto de hojas pasándolo a través de una columna de Dowex-50W y se siguió la misma metodología que para los extractos de hoja.

V.6.- Salinidad.

V.6.1.- Planta completa.

Las plantas fueron regadas durante 7 días con NaCl 300 mM y mantenidas en fotoperíodo normal. Cada día se tomaron de 8-9 hojas y se les midió el CRA y su contenido de (GB) y prolina.

V.6.2.- Explantes.

Los pecíolos de los explantes fueron sumergidos en NaCl 150 mM y puestos en luz. Se tomaron de 8-9 hojas a 1,2,4,6 y 8 horas. Se midió el CRA y se congeló el resto del tejido para cuantificar GB y prolina.

V.7.- Tratamiento con Calcio.

Para los tratamientos de pérdida de agua en explantes se utilizó CaCl_2 3mM + PEG ($\varphi = -1.0$ MPa). Para el tratamiento con cloruro de sodio se utilizó CaCl_2 3mM + NaCl 150 mM.

VI.- RESULTADOS

Todos los resultados presentados en este trabajo son la media de cuando menos 3 repeticiones.

VI.1.- Presencia de glicina betaína en hojas de amaranto.

Las hojas totalmente expandidas de amaranto sin déficit de agua poseen de 0-10 nmoles/gps de glicina betaína.

VI.2.- Capacidad del amaranto para sintetizar glicina betaína en respuesta a déficit de agua.

Los explantes de amaranto sin déficit de agua contienen cantidades muy pequeñas de GB. Los explantes sometidos a pérdida de agua por secado al aire a 25°C y en luz durante 8 horas, presentan una acumulación del 600% de GB (fig 5).

VI 3.- Determinación de la concentración óptima de PEG.

Esta determinación se llevó a cabo en explantes de hoja.

Se probaron varias concentraciones de PEG para obtener diferentes potenciales de agua (fig 6) se decidió utilizar la concentración de PEG, a 17.8% (potencial hídrico de -1.0 MPa) ya que a ésta concentración se obtuvo una acumulación de GB alta, y un cambio en el CRA menor que con las otras concentraciones de PEG, en la figura 6 se puede observar que a la concentración de PEG para un potencial de agua de -0.8 MPa, se obtiene una acumulación mayor de glicina betaína, pero el CRA no es menor de 60%, era de interés disminuir el CRA y por ello se utilizó la concentración de PEG

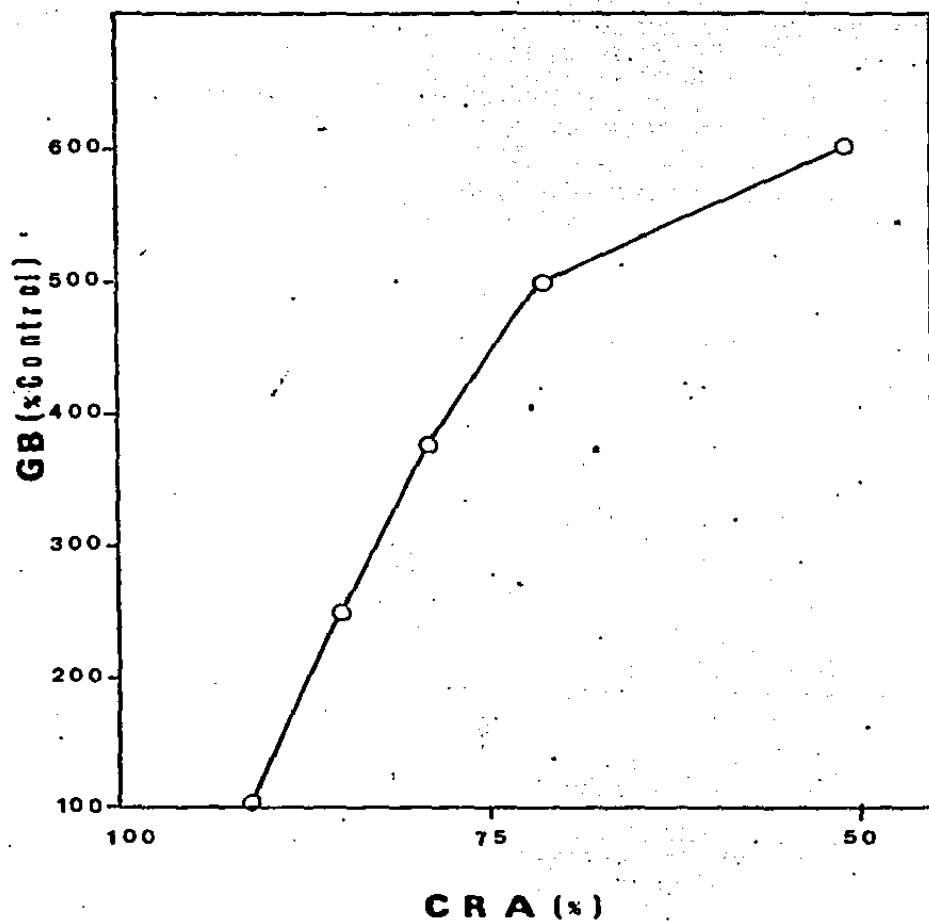


Fig. 5 --Acumulación de glicina betaina en explantes sometidos a déficit de agua (secado al aire)

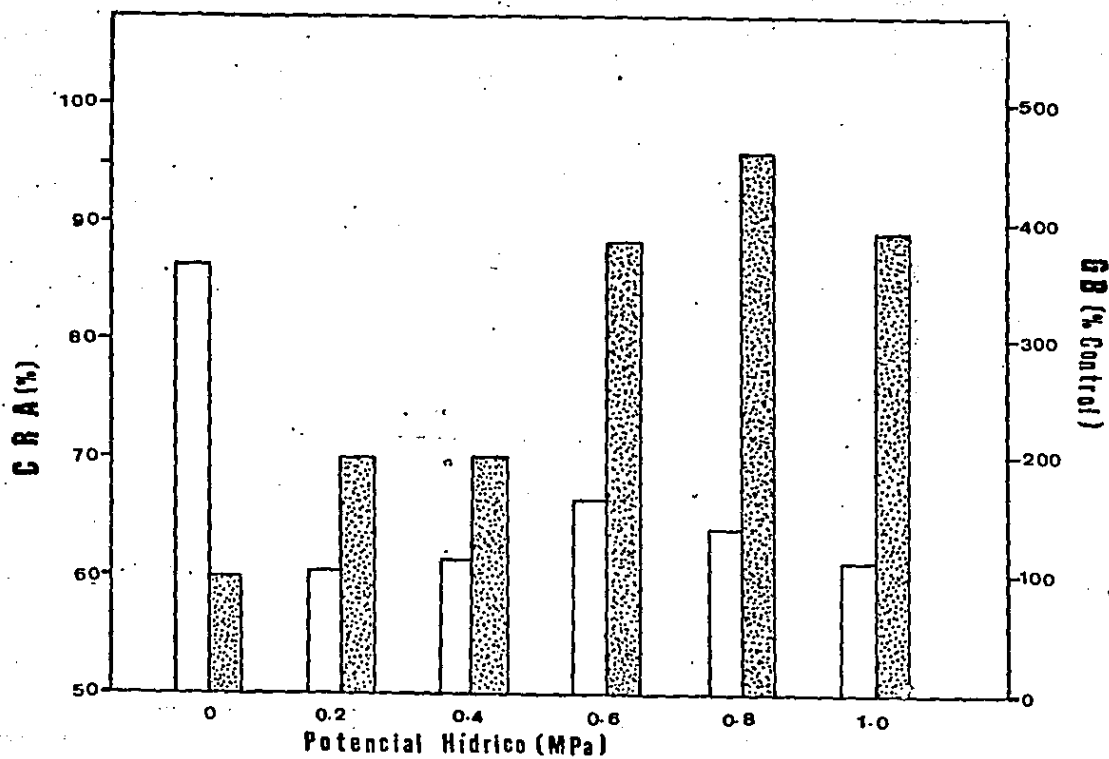


Fig. 6 Efecto de diferentes potenciales de agua provocados por soluciones de diferentes concentraciones de PEG sobre la acumulación de glicina betaina y el CRA a un mismo periodo de tiempo (4h.).

de 17.8%.

VI.4.- Efecto de la pérdida de agua sobre el CRA.

El CRA es un parámetro que puede ser utilizado como un indicador del *status* hídrico del tejido. En las figuras 7 y 8 se ve el efecto de la pérdida de agua, sobre el CRA en planta completa (fig 7) y en explante (fig 8). Los explantes presentan una velocidad de pérdida de agua mayor que las hojas de la planta completa; los primeros alcanzan un CRA de 60% a las 10 horas, mientras que el mismo valor de CRA se alcanza en 6 días en la planta completa.

VI.5.- Establecimiento de un sistema que responda bioquímicamente a la pérdida de agua en función del CRA.

Se ha reportado que la GB y la prolina son osmolitos compatibles que se acumulan en hojas de plantas bajo estrés salino e hídrico, por tal razón su acumulación se utilizó como parámetro bioquímico de respuesta a déficit de agua en dos sistemas, planta completa y explante. En amaranto la pérdida de agua ocasiona un incremento en los niveles de GB tanto en el sistema de planta completa como en el de explante (fig 9, 600% con respecto al control). El incremento observado se alcanzó en un rango de CRA de 60-70% independiente de la velocidad de pérdida de agua en los dos sistemas.

A diferencia de lo observado en la acumulación de GB, la prolina solamente es acumulada en las hojas de plantas completas (fig 10), aquí se observó un incremento del 900% con respecto al control. Los explantes no son capaces de

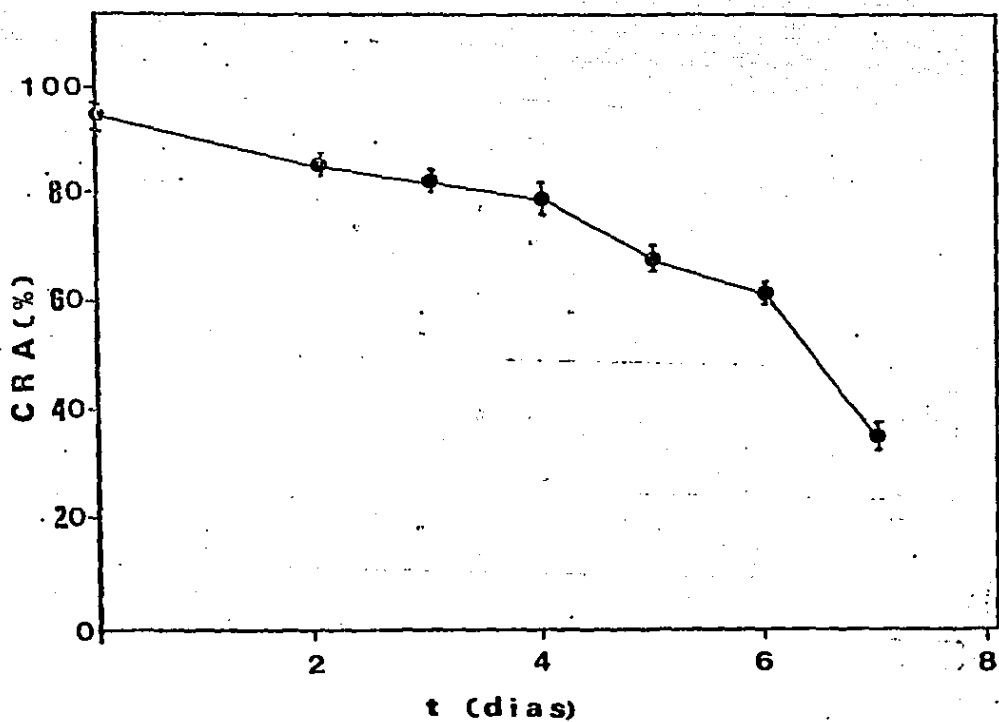


FIG. 7 Cambios en el contenido relativo de agua (CRA) de plantas sometidas a pérdida de agua durante 7 días sin riego expresados en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones y la desviación estándar.

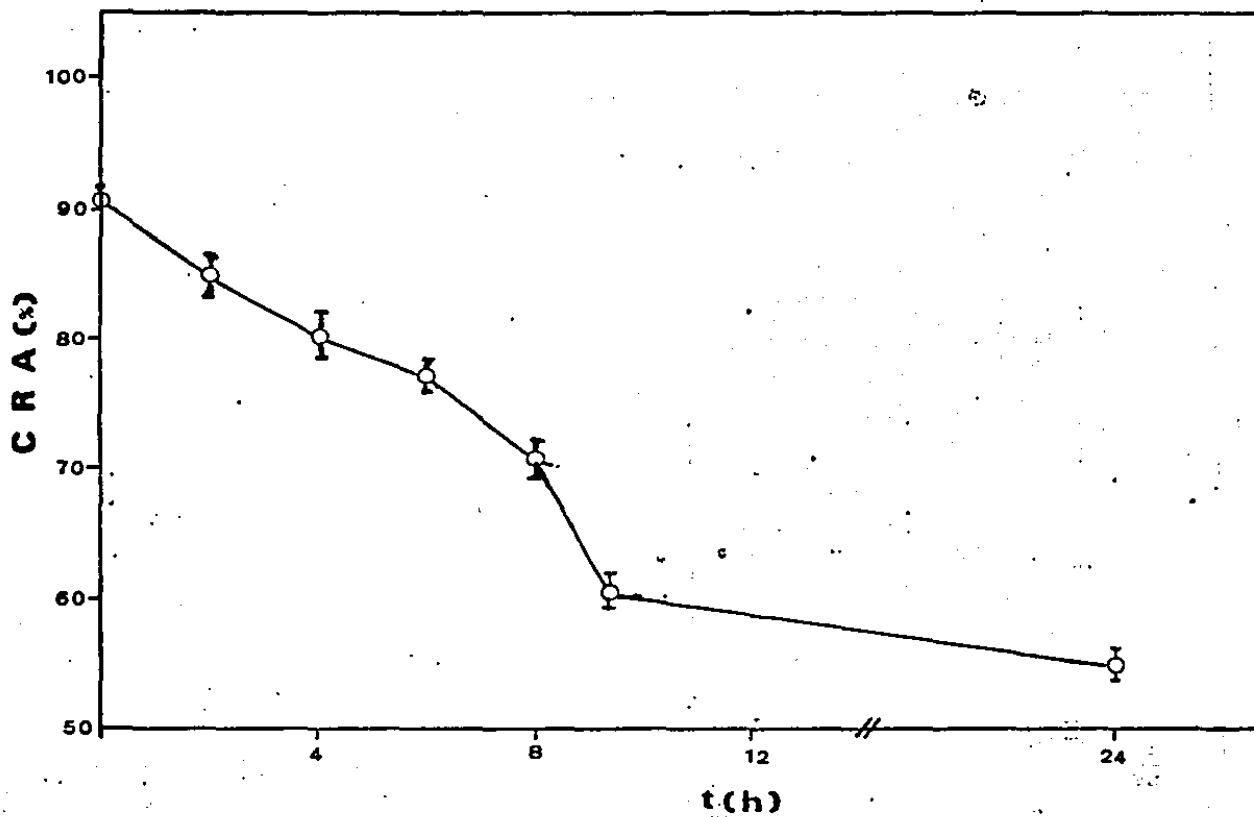


Fig. 8 Efecto de la pérdida de agua sobre el contenido relativo de agua en explantes sometidos a déficit de agua con solución de PEG ($\psi = -1.0\text{MPa}$).

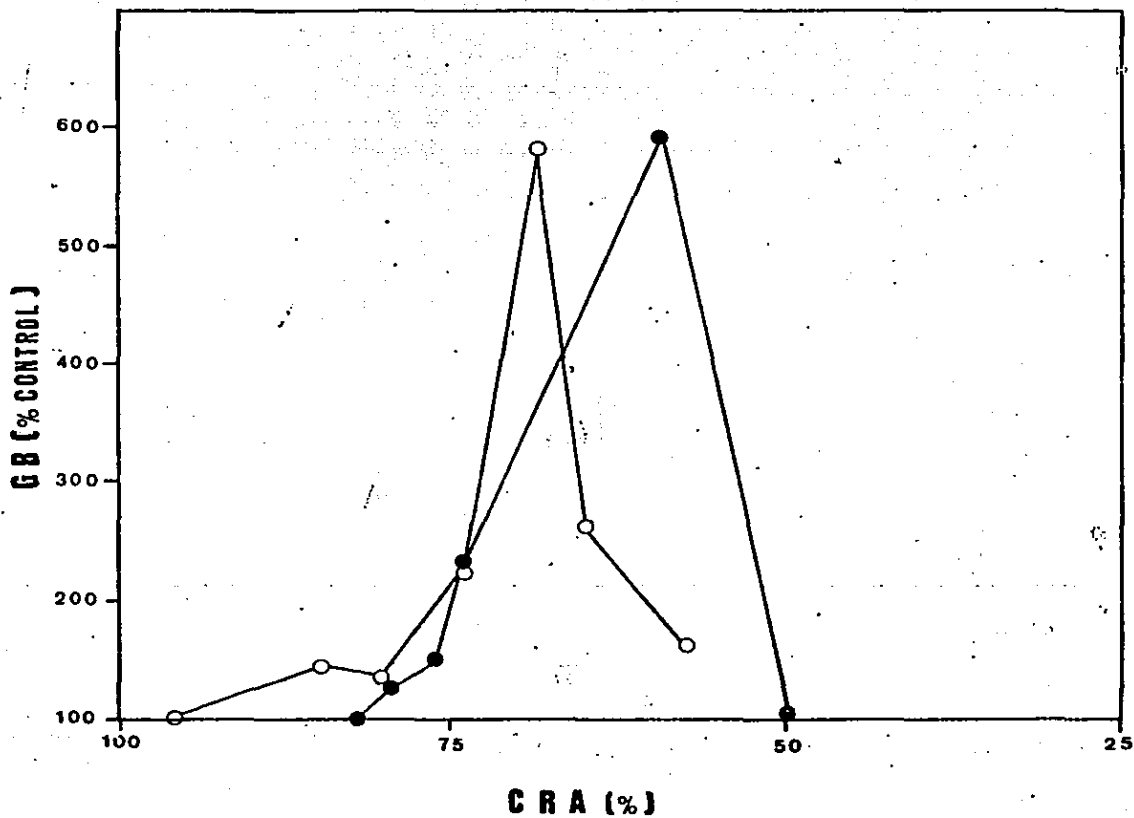


Fig. 9 Relación entre la acumulación de glicina betaina y pérdida de agua en explantes (PEG. -1.0MPa) (○) y planta completa (7 días sin riego) (●).

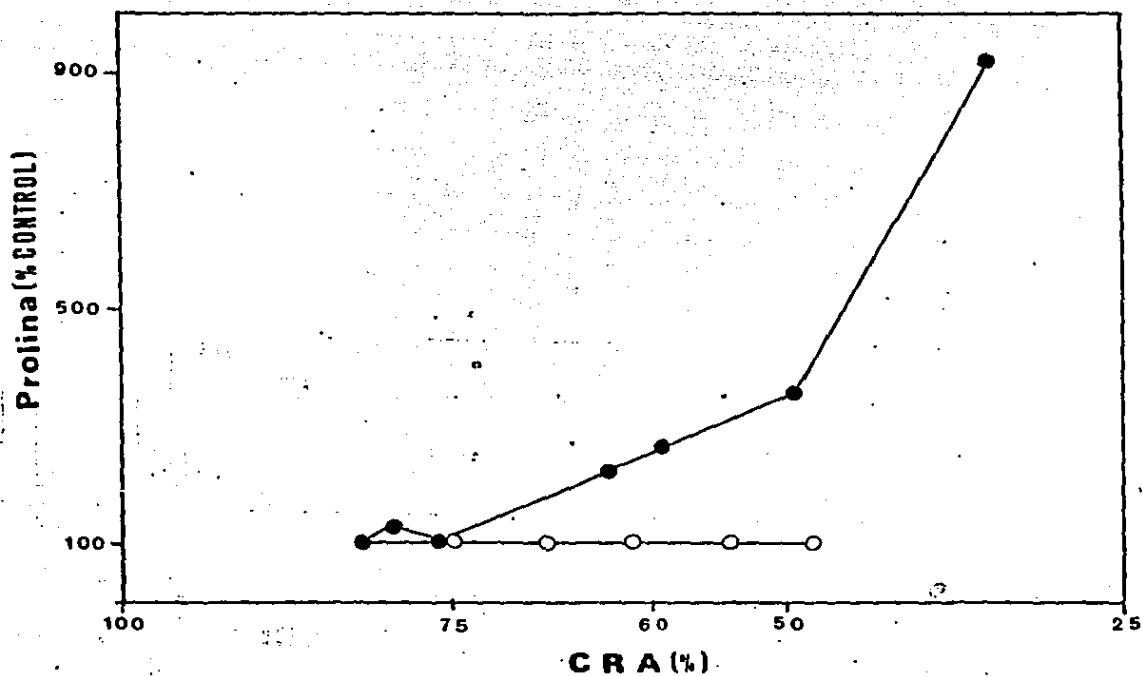


Fig. 1 ○ Efecto de la pérdida de agua sobre la acumulación de prolina en explantes (PEG, -1.0MPa) (○) y en planta completa (7 días sin riego) (●).

acumular dicho compuesto (fig 10). La prolina en las plantas completas se acumula a CRA de 55-35%.

VI.6.- Efecto de oscuridad sobre el sistema.

Hanson y colaboradores han reportado que la síntesis de la GB es dependiente de luz (1986,1988), por lo cual fué de interés determinar si en el sistema de explantes sometidos a déficit de agua en oscuridad se presenta la acumulación de GB.

Se encontró que el sistema de explantes capaz de sintetizar y acumular GB aún en oscuridad (fig 11, 500% con respecto al control) en un intervalo de CRA de 70-80%. En el sistema de planta completa en oscuridad el CRA casi no varía a lo largo de 11 días descendiendo bruscamente en las siguientes 24 hs hasta un CRA donde se considera que ya alcanzaron su punto de marchitez permanente, por lo cual no se cuantificó GB.

VI.7.- Efecto de calcio.

El calcio ha sido ampliamente reportado como, un protector de membranas (Cramer et al., 1986) y puesto que se sabe que células sometidas a estrés de agua sufren daño membranal, se pensó que sería interesante estudiar el efecto del calcio en el sistema de explantes.

Las hojas se sometieron a déficit de agua mediante el uso de PEG 6000 ($\psi = -1.0$ MPa) y se le añadió CaCl_2 .

En la fig 12 se puede observar la acumulación de 500% con respecto al control de GB en un

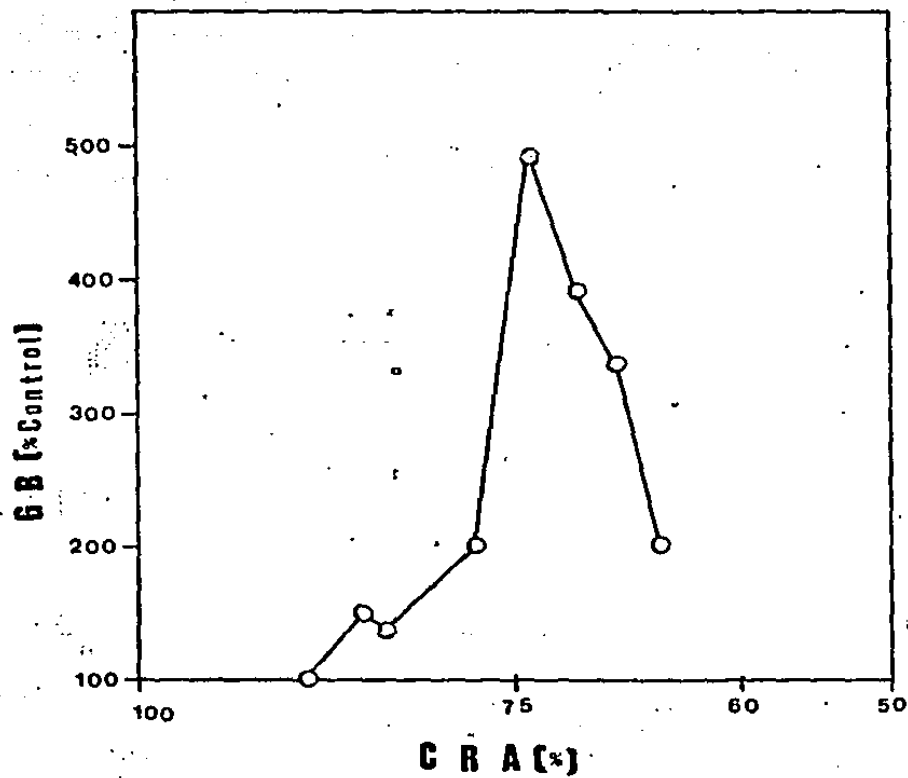


Fig. 11 Relación entre la acumulación de glicina betaina, producida por pérdida de agua, y oscuridad.

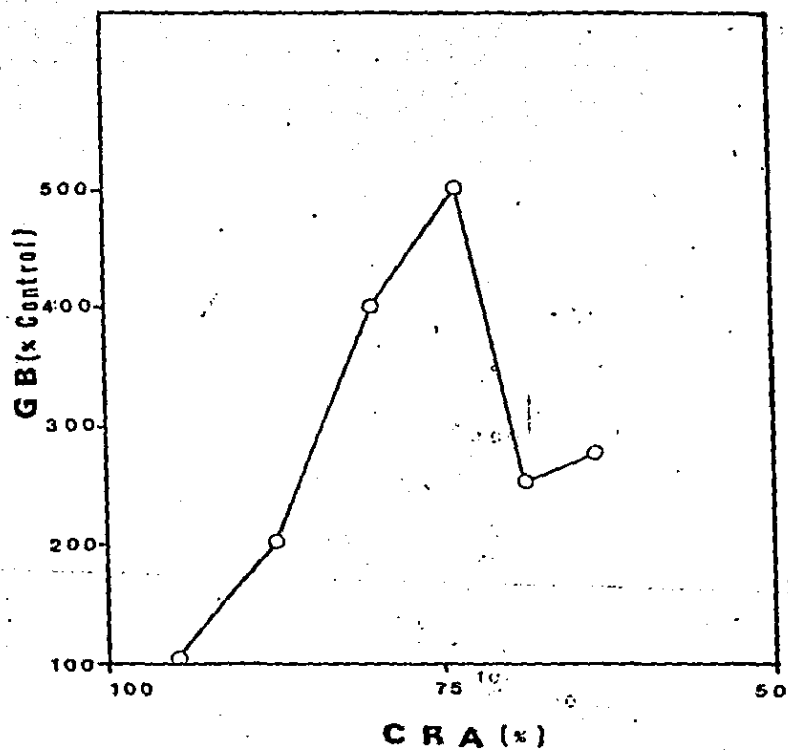


Fig. 12 Efecto de calcio (CaCl_2 3mM) sobre la acumulación de glicina betaina de explantes en luz sometidos a pérdida de agua (PEG, -1.0MPa).

intervalo de CRA de 80-70%, este intervalo es menor al que se muestra en la figura 9 (CRA de 70-60%), en la cual el sistema de explantes no contiene calcio.

VI.8.- Determinación de Colina como precursor de Glicina betaína.

Se ha reportado que la colina es el precursor de la GB, la colina citoplásmica entra al cloroplasto y ahí es oxidada hasta GB. Se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando [³H]-colina, la cual fué captada por los explantes y posteriormente éstos se sometieron a pérdida de agua utilizando la solución de PEG de -1.0 MPa (en luz tabla 1 y en oscuridad tabla 2) y a estrés salino con NaCl 150 mM en luz (tabla 3).

En la tabla 1 se puede observar que la hoja es capaz de absorber [³H]-colina y transformarla en [³H]-glicina betaína cuando se encuentra en déficit de agua. El 61.9% de la colina es transformada a glicina betaína en luz, en la tabla 2 observamos que en oscuridad la hoja transforma solo el 37% de la [³H]-colina en [³H]-glicina betaína. Por otra parte, con base a la información de que la glicina betaína no es metabolizada (Ladyman et al., 1980), se analizó el medio de incubación, con respecto a la presencia de glicina betaína. Se encontró que un porcentaje de 7.8% de la glicina betaína sintetizada es exportada al medio de incubación (PEG en luz) y 18.5% es exportada en oscuridad (tabla 2)

Tabla 1.- Toma y conversión de [³H]-Colina en [³H]-Glicina betaína, por explantes de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* sometidas a déficit de agua en luz.

CPM × 10³


	Radiactividad			% Radiactividad total	
	Total	GB	% GB	Total	GB
	1086	626	57.6	22.3	20.8
	1942	1152	59.3	40.0	38.2
	1496	1002	66.9	30.7	33.2
	345	237	68.7	7.0	7.8
Total	4869	3017	61.9	100.0	100.0

Tabla 2.- Toma y conversión de [³H]-Colina en [³H]-Glicina betaína, por hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L., sometidas a déficit de agua en oscuridad.

CPM × 10³



	Radiactividad			% Radiactividad total	
	Total	GB	% GB	Total	GB
	492	368	74.8	9.8	19.8
	2780	900	32.4	55.3	48.4
	456	248	54.3	9.1	13.3
	1300	345	26.6	25.8	18.5
Total	5028	1861	37.0	100.0	100.0

Tabla 3.- Toma y conversión de [³H]-Colina en [³H]-Glicina betaína por explantes de hoja de *Amaranthus hypochondriacus*, en NaCl 150 mM en luz.

CPM x 10³

	Radiactividad			% Radiactividad total	
	Total	GB	% GB	Total	GB
	608	382	62.8	23.1	33.5
-----	1332	581	42.9	50.5	50.9
-----	52	28	5.3	2.0	2.5
-----	644	150	23.4	24.4	13.2
Total	2636	1141	43.3	100.0	100.0

En la tabla 3 se muestra que bajo estrés salino y en luz sólo un 43.3% de la [³H]-colina tomada por el explante es transformada a [³H]-glicina betaína. (tabla 3). La exportación al medio de incubación es de 13.2%, ésta es mayor que en el caso de déficit de agua en luz.

VI.9.- Efecto de cloruro de sodio.

El estrés salino ha sido objeto de un gran número de estudios, éste tipo de estrés presenta tanto un cambio en el *status* de agua del tejido como un daño celular provocado por los iones Na⁺ y Cl⁻ *per se*. Se ha reportado que algunas especies halófitas y no-halófitas acumulan grandes cantidades de glicina betaína (Poljakoff et al., 1988). Para estudiar el efecto de NaCl, primero se determinó la

concentración óptima de NaCl aplicada a los explantes que permitiera ver una respuesta bioquímica. Se hicieron experimentos con concentraciones de 100, 150, 200, 300, 400 y 500 mM a un mismo intervalo de tiempo (4 h), midiendo al mismo tiempo el CRA. Los resultados obtenidos con 100, 150 y 200 se muestran en la fig 13. Los datos con 300, 400 y 500 mM no se presentan debido a que en estas concentraciones se observó grave daño tisular en los explantes durante el periodo de estrés; de tal manera que no se cuantificó el CRA ni la glicina betaína.

Una vez que se determinó que la concentración óptima de NaCl, en la cual existe mayor acumulación de glicina betaína, era 150 mM se procedió a someter a los explantes a estrés con la mencionada concentración por un periodo de 8 h en luz, encontrándose una acumulación de glicina betaína de 300% con respecto al control, (fig 14). Los datos se presentan en función del tiempo ya que el CRA casi no varió.

La planta completa se expuso también a una concentración salina de 150 mM. Se encontró que la planta no manifiesta ningún tipo de estrés (las hojas no se ven marchitas, ni hay acumulación de GB ni prolina) ni daño aparente de ningún tipo, en un tiempo de 15 días; se observó una disminución en el crecimiento de las plantas a los dos meses de estar en éste tratamiento. Se procedió a usar 300 mM durante 7 días, encontrándose que la planta en luz es capaz de sintetizar glicina betaína 250% con respecto al control (fig 15).

De igual manera la planta sintetiza prolina 800% con respecto al control, (fig 16) en éste tipo de estrés.

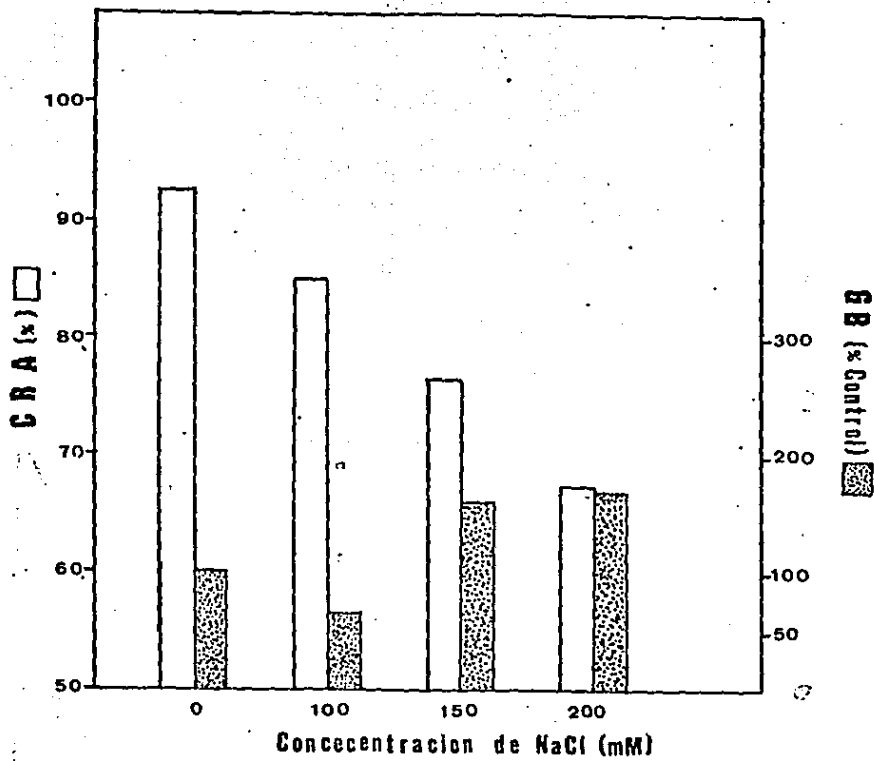


Fig.13 Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre la acumulaci3n de glicina betaína y el CRA a 4h de estr3s y en luz.

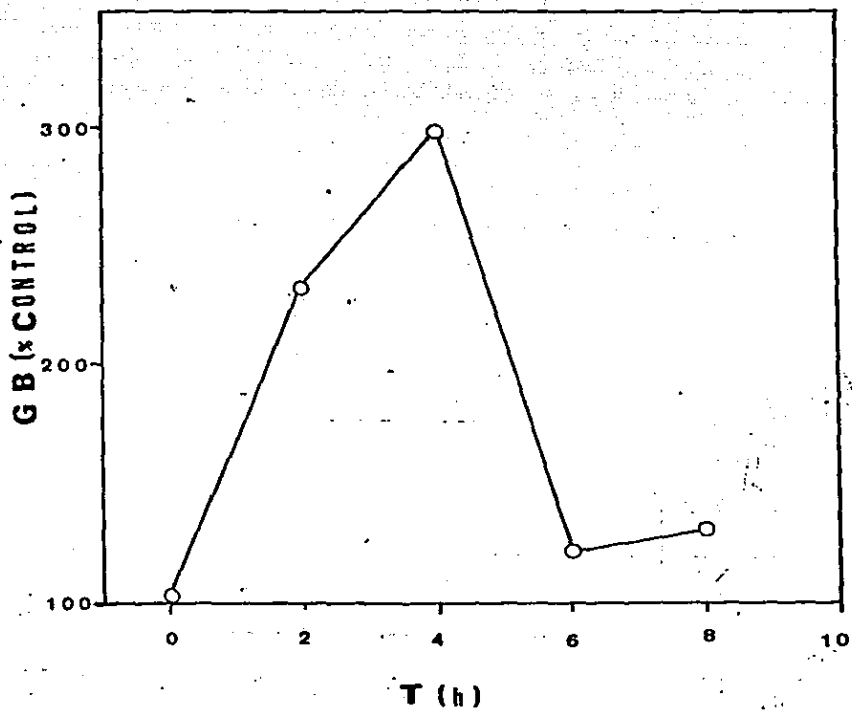


FIG. 14 Acumulación de glicina betaína en respuesta a NaCl 150 mM en explantes en luz.

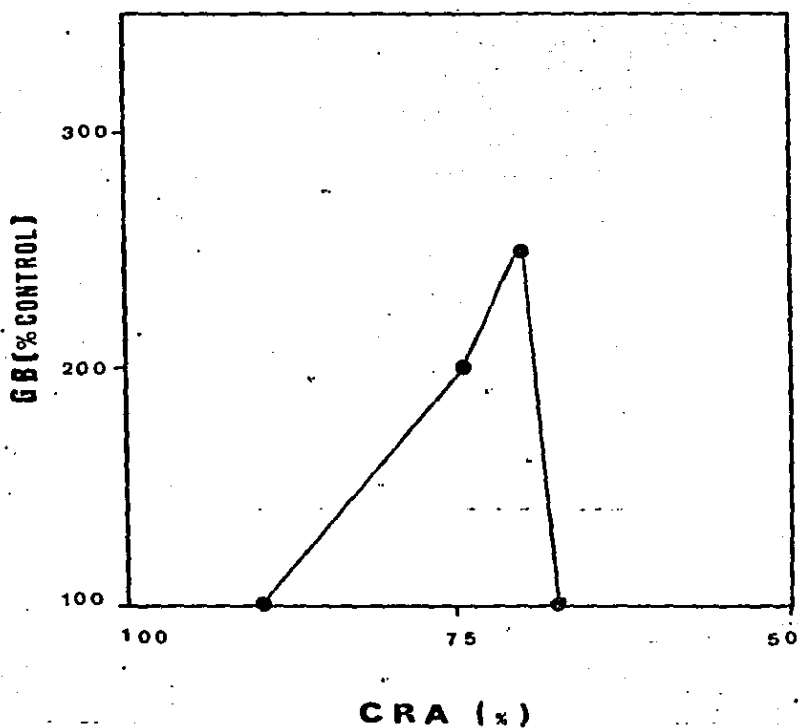


Fig. 15 Efecto de NaCl 300mM sobre la acumulación de glicina betaina en planta completa en luz.

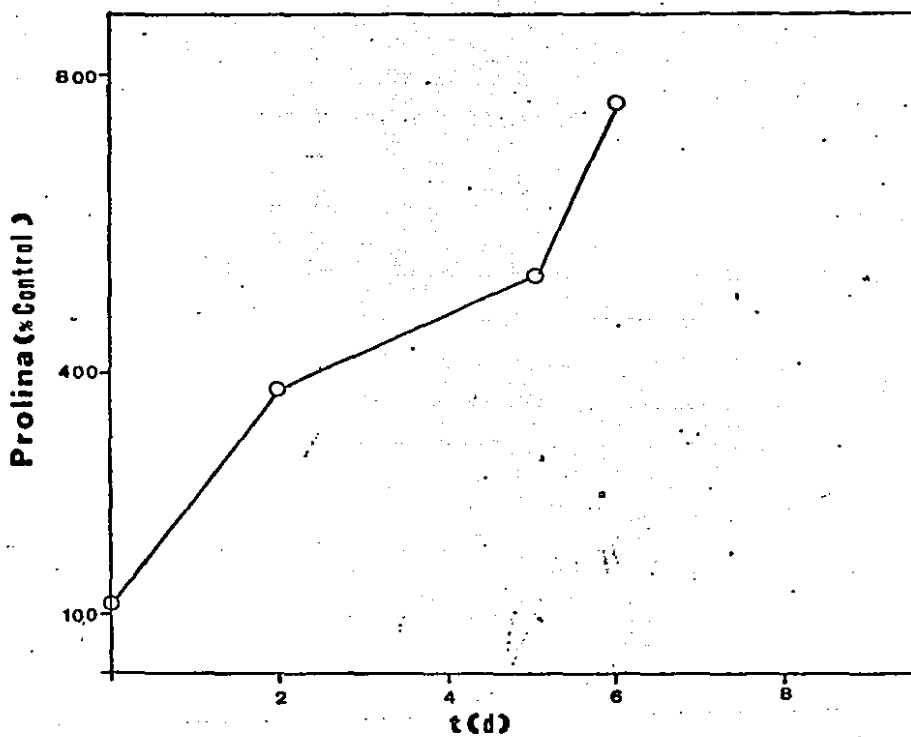


Fig.16 Relación entre la acumulación de prolina en plantas completas sometidas a estrés con NaCl 300 mM en luz.

VI.10.- Efecto de calcio durante el estrés salino.

Se ha reportado que un componente del estrés salino es el daño que éste causa a nivel de la membrana celular (Cramer et al. 1985). Los iones Na^+ son capaces de desplazar iones Ca^{++} de las membranas celulares provocando un cambio en la plasticidad de la membrana lo cual ocasiona que los iones y el agua que se encuentran en el citoplasma se desplacen hacia el exterior, produciendo un daño celular. Por otra parte, se sabe que si a un suelo salino se le añade Ca^{++} , el daño por sal es anulado. En base a estos datos, se llevó a cabo una serie de experimentos para conocer el efecto que el Ca^{++} pudiera tener en los explantes sometidos a salinidad.

En la figura 17 se muestra el efecto de CaCl_2 3 mM en 100, 150 y 200 mM de NaCl durante 4 horas. Aquí se muestra que el CRA casi no varía, sin embargo, se presenta acumulación de glicina betaína, 220%, 300% y 190% con respecto al control, para 100, 150 y 200 mM de NaCl respectivamente. En la fig 18 se muestran los resultados con NaCl 150 mM y CaCl_2 3mM durante 8 horas. El calcio parece tener un efecto protector sobre el sistema de respuesta. Los explantes responden acumulando glicina betaína, 280% con respecto al control, a tiempos más cortos (2 h) en comparación de su contraparte que no contiene calcio (ver fig 14); el pico máximo de acumulación en los explantes con calcio, se observa a las 2 h, el cual se presentó a las 4 h cuando el sistema no contiene calcio. Por otra parte, en ambos tratamientos (sin calcio y con calcio) se dá acumulación de GB.

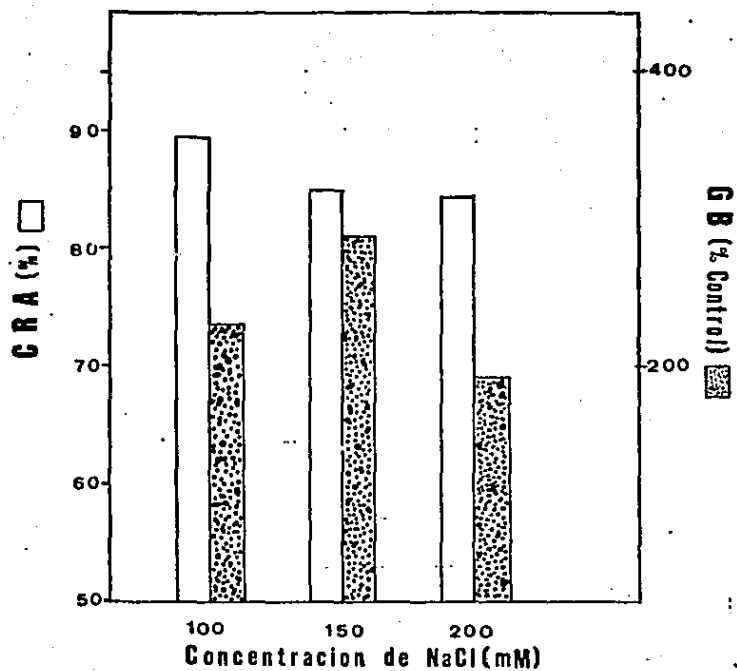


Fig. 17 Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y de CaCl_2 3mM sobre la acumulación de glicina betaina y el CRA a 4h. de éstress.

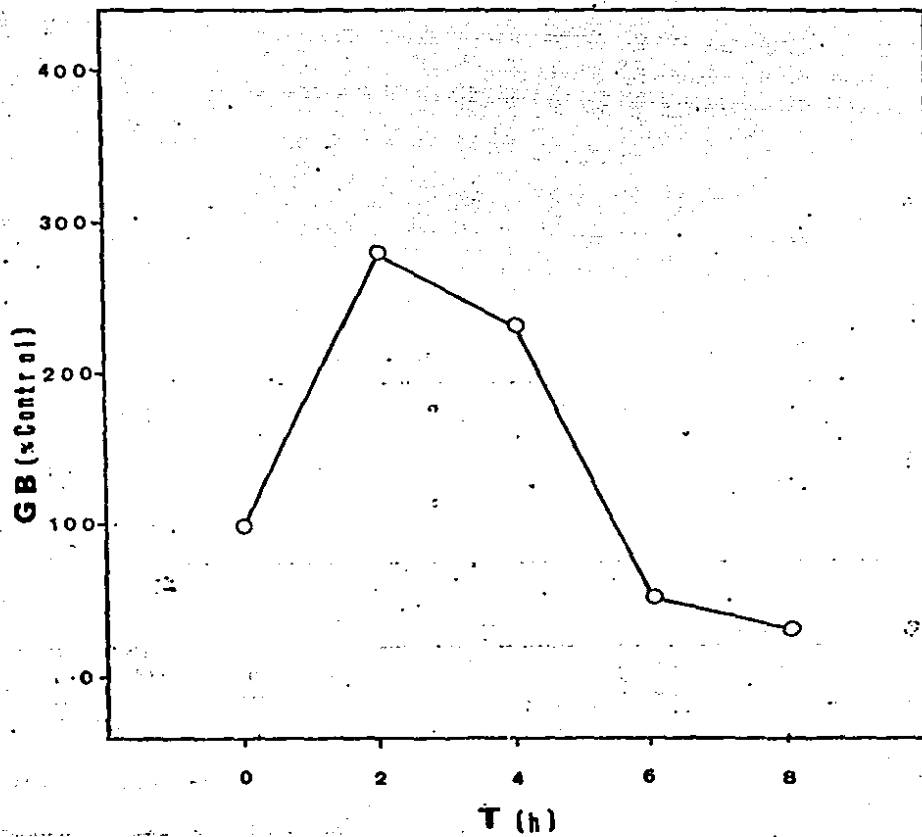


Fig.18 Efecto de CaCl_2 3 mM en la acumulación de glicina betaína por explantes en solución de NaCl 150 mM en luz.

VII.- DISCUSION

Las respuestas bioquímicas a déficit de agua con frecuencia han sido reportadas en función del tiempo en que se dejó de regar o en función del potencial hídrico u osmótico (Mc donnell y Wyn Jones, 1988; Ahmad y Wyn Jones, 1979; Storey y Wyn Jones, 1977) alcanzado por el sistema puesto en estrés. Al reportar cambios metabólicos en función del tiempo, se desconoce el *status* hídrico del tejido y las conclusiones obtenidas de tales estudios no pueden correlacionarse con cambios bioquímicos referidos a pérdida o estrés de agua. Por otra parte las mediciones de potencial hídrico u osmótico, tienen problemas metodológicos que no permiten conocer el contenido de agua real en el tejido. Las mediciones de potencial hídrico se hacen a lo largo de varias horas sin tomar en cuenta (como se muestra en este trabajo) si la célula lleva a cabo ajuste osmótico o no. Por otra parte la medición del potencial osmótico se lleva a cabo congelando y moliendo el tejido sin tomar en cuenta que al moler se mezcla el agua del apoplasto con la del interior de la célula. Problemas de este tipo provocan errores al momento de interpretar los datos y relacionarlos con cambios bioquímicos.

Un método que se puede utilizar para conocer el *status* hídrico del tejido es el CRA. Este método es sencillo y no estresante para el tejido. Este método tiene la ventaja de que mide la cantidad relativa de agua presente en el tejido. De esta manera se puede hacer una correlación entre el cambio en la cantidad relativa de agua presente en el tejido y cambios metabólicos. Además este parámetro es un indicador del volumen celular (Richter, 1978) y puesto que la pérdida de

agua provoca cambios en el volumen celular (Kaiser, 1982; Berkowitz y Gibbs, 1988) es posible correlacionar los cambios en el volumen celular (medido a través del CRA) con los cambios bioquímicos. Los cambios más estudiados con respecto al volumen celular han sido sobre la fotosíntesis (Robinson, 1985; Kaiser, 1982; Berkowitz y Gibbs, 1988).

En los datos sobre cambios de contenido relativo de agua se observa que las hojas de amaranto son capaces de acumular glicina betaína (fig 5). Este resultado era en parte esperado ya que en la literatura se ha reportado que la glicina betaína se acumula como respuesta a estrés de agua y/o salino en plantas pertenecientes a la familia *Chenopodiaceae* y *Gramíneae*. y puesto que la familia *Amaranthaceae* es muy cercana a la *Chenopodiaceae*, era probable que el amaranto acumulara glicina betaína como respuesta a pérdida de agua.

Durante el tratamiento de pérdida de agua en explantes y planta completa en presencia de luz, se encontró que existe una acumulación de glicina betaína dentro de un intervalo de CRA de 60-70% (fig 9) , independientemente de la velocidad de pérdida de agua y como se observa en las figs 7 y 8, el explante y la planta completa pierden agua a diferentes velocidades. Este fenómeno es de gran importancia, dado que se puede asumir que el CRA es un parámetro adecuado para correlacionar cambios en el metabolismo celular (acumulación de glicina betaína en éste caso), con déficit de agua. El amaranto acumula glicina betaína dentro de un intervalo definido de CRA independientemente de como se lleva a cabo el proceso de pérdida de agua. Si consideramos que el CRA puede

ser un indicador indirecto del volumen celular, estos datos concuerdan con los reportados por Kaiser (1982) quien encontró que la actividad fotosintética de diversas plantas con diferente capacidad de manejo de agua, está determinada por un mismo intervalo de volumen celular.

El patrón de acumulación de glicina betaína observado en los dos sistemas, planta completa y explante, sugiere que este compuesto es muy móvil ya que no hay evidencias de que sea degradado en plantas (Ladyman et al., 1980). En estudios con trigo en estrés salino, se ha reportado que la disminución tan brusca de la concentración de glicina betaína esta relacionada con la senescencia de la hoja (McDonnell y Wyn Jones, 1988).

Se ha especulado mucho acerca del posible papel de la glicina betaína dentro del metabolismo celular durante el déficit de agua. En estudios con plantas halófitas se encontró que éste compuesto se acumula en altas concentraciones (400 $\mu\text{mol/gps}$) y se propuso que pudiera tener un papel como osmorregulador (Wyn Jones y Storey, 1977). En hojas de amaranto la cantidad acumulada (aproximadamente 4 $\mu\text{mol/gps}$) no es suficientemente grande (no contribuye de manera significativa para aumentar el potencial osmótico en el citoplasma, calculos realizados en este laboratorio nos indican que 4 $\mu\text{mol/gps}$ representan 7×10^{-5} MPa) como para asignarle un papel de osmorregulador. Es posible que a tales concentraciones tenga un papel en el sistema de señales que le indiquen a la célula que esta perdiendo agua. No se sugiere que la glicina betaína tenga un papel de segundo mensajero

sino más bien que éste compuesto sea parte de un sistema de efectos en cascada en donde la glicina betaína sintetizada podría tener acción directa y específica en sistemas como síntesis de DNA (Meury, 1988), síntesis de RNA y proteínas, activación de sistemas enzimáticos y membranales, etc. Un compuesto de alto costo celular, como lo es la glicina betaína, debe tener una función bien determinada dentro del metabolismo.

Muchos experimentos deberán llevarse a cabo para poder probar lo anterior, nuestros datos son insuficientes para saber si esto es cierto.

La prolina es otro osmolito compatible reportado que se acumula bajo estrés de agua y/o salino (Bogges et al., 1976; Naidu et al., 1987).

La respuesta de acumulación de prolina se dió de manera diferente. Los explantes no son capaces de acumular éste imino ácido, en cambio la planta completa acumula prolina (fig 10). Este comportamiento ya había sido observado y reportado en maíz (Ibarra et al., 1988), los autores proponen que probablemente se deba a que la raíz tiene un sensor que le indica a la planta que esta en déficit de agua. Al utilizar explantes la señal proporcionada por la raíz no está presente.

Por otra parte, la planta de amaranto sometida a sequía acumula prolina a CRA muy bajo (punto máximo 35% de CRA, valor en el cual las hojas de amaranto ya sufren daño celular y ya alcanzaron el punto de marchitez permanente) cuando la glicina betaína ha disminuido a niveles basales (Fig 10). Algunos autores aseguran que la acumulación de prolina se

dá bajo estrés de agua severo (Hanson et al., 1979a); los datos obtenidos en esta investigación sugieren que la acumulación de prolina en éste caso, es resultado de daño metabólico más que una respuesta a la pérdida de agua para llevar a cabo osmorregulación, por lo tanto no tiene un valor adaptativo y no puede usarse como un indicador para seleccionar plantas resistentes a sequía.

Se ha reportado que la síntesis de glicina betaína es estimulada por luz (Weigel et al., 1986 y 1988). Al llevar a cabo déficit de agua en hojas de amaranto, en oscuridad, los explantes acumulan glicina betaína (Fig 11 y tabla 2). Los experimentos con [³H]-colina indican que la síntesis es menos eficiente en oscuridad que en luz (ver tablas 1 y 2). En estudios con las dos últimas enzimas de la vía de síntesis de la glicina betaína Weigel y colaboradores (1986, 1988) han reportado que la enzima que cataliza la reacción de oxidación de colina a betaínaldehído es estimulada por luz. Esta estimulación es a través de la disponibilidad de NADPH y además requiere O₂, se desconoce aún a que nivel exactamente actúan. Esto explica en parte la baja eficiencia en la acumulación de glicina betaína observada en la tabla 2. Por otro lado, se ha reportado que la relación NADPH/NADP alcanza un máximo a muy baja irradiación (Heber et al., 1982) y puesto que la cámara utilizada para los experimentos de oscuridad se abría a intervalos regulares la irradiación podría ser suficiente para producir pequeñas cantidades de NADPH y O₂ suficientes para oxidar a la colina para finalmente transformarse en glicina betaína.

La P-colina que es oxidada a betaínaldehído, en la

quenopodiaceas, proviene de serina fosforrespiratoria (Coughlan y Wyn Jones, 1982). La P-colina puede provenir de otras vías metabólicas; se ha reportado que en las gramíneas, este compuesto proviene de la degradación de los fosfolípidos (Hitz et al., 1981; McDonnell y Wyn Jones, 1988). Las amarantáceas y las quenopodiáceas pertenecen al orden de las centrospermas, por pertenecer al mismo orden se sugiere que probablemente el amaranto sintetice la glicina betaína a partir de serina fosforrespiratoria. Esto explicaría la acumulación de amonio y activación de Glutamino sintetasa (GS) que preceden a la acumulación de glicina betaína observada en experimentos paralelos a este trabajo, llevados a cabo en este laboratorio (Gamboa et al., 1989). Sin embargo hay que señalar que el amaranto es una planta que lleva a cabo metabolismo C-4 y esto podría indicar que el origen de la serina no sea totalmente respiratorio (las plantas C-4 tienen niveles bajos de esta vía) y por lo tanto aún hay que definir el origen de la P-colina en el amaranto.

Al estudiar los efectos celulares del estrés salino, se ha encontrado que este tiene dos componentes, uno de pérdida de agua y otro de daño por exceso de iones; y no ha sido posible separarlo uno del otro. Existen varias especies vegetales (halófitas y no halófitas) que en presencia de altas concentraciones de NaCl acumulan glicina betaína (Storey y Wyn Jones, 1975; Ahmad y Wyn Jones, 1979; McDonnell y Wyn Jones, 1988; Hanson y Rhodes 1983). Las hojas de amaranto sometidas a estrés salino parecen sufrir más por un daño iónico que por la pérdida de agua y esto se puede observar en las figuras 14 y 15, donde la acumulación de glicina betaína

se reporta en función del tiempo ya que el CRA casi no varía. Estos datos sugieren fuertemente que la acumulación de glicina betaína es por el efecto de los iones Na^+ y Cl^- per se y no como una respuesta a pérdida de agua.

Se han propuesto varios papeles para la glicina betaína durante el estrés salino entre ellos protección de los sistemas enzimáticos y compartimentalización de iones (Wyn Jones 1984; Ahmad et al., 1987). El hecho de que el Na^+ se compartimentalice en la vacuola está bien documentado, Ahmad (1987) encontró que la glicina betaína parece actuar a nivel de tonoplasto facilitando la entrada de Na^+ en la vacuola. En amaranto, sometido a salinidad, encontramos que la acumulación de glicina betaína es menos eficiente que en déficit de agua (ver tablas 1 y 3 y figs 7, 8, 14 y 15). Es posible pensar que bajo las concentraciones de NaCl utilizadas en este trabajo la glicina betaína pudiera estar actuando a nivel de transporte de iones hacia la vacuola, como lo demostraron Wyn Jones y colaboradores (1984) en vacuolas de betabel. Concentraciones por arriba de 200 mM de NaCl, son muy tóxicas para los explantes. Como se menciona en resultados (sección VI.8.) cuando se usaron concentraciones de 300, 400 y 500 mM el tejido sufrió un grave daño tisular.

El calcio es un factor importante en la resistencia de varias plantas a salinidad y a déficit de agua. Se sabe que el estrés causa daño en la membrana celular. Cramer y colaboradores (1985 y 1986) encontraron que los iones Na^+ desplazan a los iones Ca^{++} de las membranas. Por otra parte se encontró que el efecto del NaCl sobre el calcio asociado a membrana es predominantemente intracelular (Lynch y Lauchli,

1988), en estos experimentos se encontró que el NaCl depleta a la célula de calcio. Con base en sus datos estos autores propusieron un modelo hipotético del papel del NaCl; Este modelo predice que la salinidad activa el sistema regulatorio de fosfoinosítidos el cual altera la actividad del Ca^{++} citosólico. Esta respuesta podría disparar una variedad de cambios metabólicos en células salinizadas que podrían tener un significado adaptativo para resistencia a salinidad.

Al adicionar calcio extracelular es posible que disminuye el efecto de salinidad debido a un aumento en la entrada de calcio y una disminución en la entrada de sodio.

En los experimentos de pérdida de agua (fig 9) y de salinidad (fig 14), se observa que el calcio posiblemente disminuya el daño membranal evitando así la salida rápida de agua y iones (entre ellos K^+). Pero por otro lado, este ión no protege del daño intracelular de pérdida de agua o de los iones Na^+ y Cl^- sobre los sistemas enzimáticos. Como se puede observar en las figs 10 y 15 en los dos tratamientos se acumula glicina betaína a concentraciones semejantes. La acumulación de glicina betaína se dá a un CRA (70-80%) más elevado (para déficit de agua) y a tiempos más cortos (para salinidad). El calcio parece tener en ambos tratamientos un efecto protector, permitiéndole al sistema responder a un CRA mayor y a tiempos más cortos, con respecto a los tratamientos sin calcio, además del efecto protector de membranas.

Estos datos sugieren la posibilidad de que el calcio, en los explantes de amaranto, pueda tener un efecto similar al descrito por Lynch y colaboradores (1988). La pérdida de agua y/o salinidad podrían estar provocando cambios

en la liberación de los fosfoinosítidos de la membrana plasmática y estos provocar cambios en la concentración de Ca^{++} citosólico. Este efecto podría repercutir en cambios metabólicos entre ellos síntesis y acumulación de glicina betaina para defenderse del estrés, dado que se conoce que a través del calcio se regulan varios sistemas enzimáticos (Sane et al., 1987; Lynch y Lauchli, 1988).

VIII.- CONCLUSIONES

- 1.- Las hojas de amaranto son capaces de sintetizar glicina betaína independientemente de la velocidad de pérdida de agua.
- 2.- El status hídrico del tejido puede ser medido en función del contenido relativo de agua.
- 3.- Existe una estrecha relación entre el contenido relativo de agua y la acumulación de glicina betaína.
- 4.- La acumulación de prolina sólo puede ser estudiada en el sistema de planta completa.
- 5.- La glicina betaína y la prolina se acumulan en respuesta a salinidad. No existe relación entre esta acumulación y el contenido relativo de agua.
- 6.- El calcio tiene un efecto protector contra la pérdida de agua en el sistema de explantes.
- 7.- La luz estimula la acumulación de glicina betaína.

Parte de este trabajo ha sido enviado para su publicación a *Journal of Plant Physiology* : Influence of cellular volume on rapid biochemical changes during water loss in *Amaranthus hypochondriacus* L.. Gamboa de Buen A., E.M. Valenzuela and E. Murillo.

REFERENCIAS

- 1.- Ackerson R.C. (1981) Osmoregulation in cotton in response to water stress. *Plant Physiol* 67:489-493.
- 2.- Ahmad N. and R.G. Wyn Jones (1979). Glycinebetaine, Proline and inorganic ion levels in barley seedlings following transient stress. *Plant Sci Letters* 15:231-237.
- 3.- Ahmad N., R.G. Wyn Jones and W. Jeschke. (1987) Effect of exogenous glycinebetaine on Na^+ transport in barley roots. *J Exp Botany* 191:913-921.
- 4.- Bates, L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies *Plant and Soil* 39:205-207.
- 5.- Ben-Hayyim G., P. Spiegel-Roy, H. Neumann (1985) Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt tolerant cell lines of *Citrus aurantium* *Plant Physiol* 78:144-148.
- 6.- Ben-Hayyim G. (1987) Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured citrus cells. *Plant Physiol* 85:430-433.
- 7.-Berkowitz G.A. and M. Gibbs (1988) Reduced osmotic potential effects on photosynthesis. Identification of stromal acidification as a mediating factor. *Plant Physiol* 71:905-911.
- 8.- Boggess S.F., C.R. Stewart, D. Aspinall, L.G. Paleg (1976) Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol* 58:398-401.
- 9.- Borowitzka L.J. and A.D. Brown (1974) The salt relations of marine and halophylic species of the unicellular green alga *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible

solute. Arch Microbiol 96:137-152.

- 10.- Briens M. and F. Larher (1982). Osmoregulation in halophytic higher plants; a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. Plant Cell Environ 5:287-292.
- 11.- Cairney J., L. R. Booth, and C.F. Higgins (1985). Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium* proU encodes an osmotically induced betaine transport system. J Bacteriol 164:1224-1232.
- 12.- Cala P.M. (1985) Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: Strategies for identifying alkali metal/H⁺ transport **falta revista** vol 44, #9 2500-2507.
- 13.- Coughlan, S.J. and R.G. Wyn Jones (1982) Glycine betaine biosynthesis and its control in detached leaves of spinach. Planta 154:6-17.
- 14.- Croughan T.P., S.J. Stavarek, D.W. Rains (1979). Selection of a NaCl-tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Sci 18:959-963.
- 15.- Cramer G.R., A. Lauchli and V.S. Polito (1985) Displacement of Ca⁺⁺ by Na⁺⁺ from the plasmalemma of root. A primary response to salt stress. Plant Physiol 79:207-211.
- 16.- Cramer G.R., A. Lauchli and E. Epstein (1986). Effects of NaCl and CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. Plant Physiol 81:792-797.
- 17.- Daines R.J. and A.R. Gould (1985). The cellular basis of salt tolerance studied with tissue cultures of the halophytic grass *Districhlis spicata*. J Plant Physiol

- 18.- Del Río Portilla M.A. (1988). El contenido relativo de agua: Características en *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis de licenciatura. ENEP Zaragoza, México.
- 19.- Dix P.J. and R.S. Pierce (1981). Proline accumulation in NaCl resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 102:243-248.
- 20.- Finn A.L. (1984). Volume dependent pathways in animal cells. Regulatory mechanism. Thematic Symposium presented at the 68th Annual meeting of the federation of American Societies for Experimental Biology, St Louis Missouri.
- 21.- Fitter A.H. and R.K.M. Hay (1981). Environmental Physiology of Plants. Academic Press Inc.. London. Pags.118-167.
- 22.- Gamboa de Buen A., E.M. Valenzuela and E. Murillo (1989). Influence of cellular volume on rapid biochemical changes during water loss in *Amaranthus hypochondriacus* L. Submitted to J Plant Physiol.
- 23.- Gorham J., O.S. Tomar and R.G. Wyn Jones (1988). Salinity-induced changes in the chemical composition of *Leucaena leucocephala* and *Sesbania bispinosa*. J Plant Physiol 132:678-682.
- 24.- Greenway H. and Rana Munns (1980). Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. Ann Rev Plant Physiol 31:149-190.
- 25.- Grieve, C.M. and E.V. Maas (1984). Betaine accumulation in salt stressed sorghum. Physiol Plant 61:167-171.

- 26.- Grumet R. and A.D. Hanson (1986). Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. Aust J Plant Physiol 13:353-364.
- 27.- Guerrero F.D. and J.E. Mullet (1988). Reduction of turgor induces rapid changes in leaf translatable RNA. Plant Physiol 88:401-408.
- 28.- Hanson A.D., C.E. Nelsen, A.R. Pedersen and E. H. Everson (1979a). Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. Crop Sci 19:489-493.
- 29.- ----- and R.E. Tully (1979b). Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. Plant Physiol 64:467-471.
- 30.- ----- and N.A. Scott (1980). Betaine synthesis from radioactive precursors in attached water-stressed barley leaves. Plant Physiol 66:342-348.
- 31.- ----- W.D. Hitz (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. Ann Rev Plant Physiol 33:163-203.
- 32.- Hanson, A.D. and D. Rhodes (1983). ¹⁴C Tracer evidence for synthesis of coline and betaine via phosphoril base intermediates in salinized sugarbeet leaves. Plant Physiol 71:692-700.
- 33.- Hitz W.D., D. Rhodes and A.D. Hanson (1981). Radiotracer evidence implicating phosphoryl and phosphatydil bases as intermediates in betaine synthesis by water-stressed barley leaves. Plant Physiol 68:814-822.
- 34.- Heber U., U. Takahama, S. Neimanis, M. Shimizu-Takahama (1982). Transport as the basis of the Kok effect. Levels

- of some photosynthetic intermediates and activation of light-regulated enzymes during photosynthesis of chloroplasts and green leaf protoplasts. *Biochem Biophys Acta* 679:287-299.
- 35.- Ibarra-Caballero J., C. Villanueva-Verduzco, J. Molina-Galán and E. Sanchez-de-Jimenez (1988). Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: A tissue differentiation requirement. *J Exp Botany* 204:889-897.
- 36.- Ilahi I. and K. Dorffling (1982). Changes in abscisic acid and proline levels in maize varieties of different drought resistance. *Physiol Plant* 55:129-135.
- 37.- Imhoff J.F. and F. Valera (1984). Betaine is the main compatible solute of halophylic eubacteria. *J Bacteriol* 160:478-479.
- 38.- Kaiser W.M., G. Kaiser, P.K. Prachuab, S.G. Wildman and U. Heber (1981a). Photosynthesis under osmotic stress. Inhibition of photosynthesis of intact chloroplasts, protoplasts and leaf slices at high osmotic potentials. *Planta* 153: 416-422.
- 39.- Kaiser W.M., W.U. Wistepper and W. Urloach (1981b). Photosynthesis of isolated chloroplasts and protoplasts by hypotonic treatment and its effect on photosynthesis. *Planta* 151:375-380.
- 40.- ----- (1982) Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hygro-, meso- and xerophytes under osmotic stress. *Planta* 154:538-545.
- 41.- Kent L.M., and A. Lauchli (1985). Germination and

- seedling growth of cotton salinity-calcium interactions.
Plant Cell Environ 8:155-159.
- 42.- Kramer Paul J. (1969). Plant Soil water relationships: A modern synthesis. Mc Graw Hill book Company N.Y., Cap 1 pags 59-60.
- 43.- Kurth E., G.R. Cramer, A. Lauchli, and E. Epstein (1986). Effects of NaCl and CaCl₂ on cell enlargement and cell production in cotton roots. Plant Physiol 82:1102-1106.
- 44.- Ladyman J.A.R., W.D. Hitz and A.D. Hanson (1980). Translocation and metabolism of glycinebetaine by barley plants in relation to water stress. Planta 150:191-196.
- 45.- Landfald B. and A.R. Strom (1986). Choline -glycinebetaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 165:849-855.
- 46.- Lone M.I., J.S.H. Kueh, R.G. Wyn Jones and S.W.J. Bright (1987). Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. J Exp Botany 188:479-490.
- 47.- Lynch J. and A. Lauchli (1988). Salinity affects intracellular calcium in corn roots protoplasts . Plant Physiol 87:351-356.
- 48.- McDonnell E. and R.G. Wyn Jones (1988). Glycine-betaine biosynthesis and accumulation in unstressed and salt-stressed wheat. O Exp Botany 201:421-430.
- 49.- McMichel B.L. and C.D. Elmore (1977). Proline accumulation in water stressed cotton leaves. Crop Sci 17:905-908.

- 50.- Meury J. (1988). Glycinebetaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. Arch Microbiol 149:232-239.
- 51.- Mills Jonh (198). The cell cytoskeleton: Possible role in volume control. Current topics in membranes and transport-volume. Academic Press, Inc. pags 75-96.
- 52.- Moftah A.E. and B.E. Michel (1987). The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves.Plant Physiol 83:238-240.
- 53.- Moore D.J., R.H. Reed and W.D.P. Stewart (1987). A glycinebetaine transport system in *Aphanothece halophytica* and other glycinebetaine synthesising cyanobacteria. Arch Microbiol 147:399-405.
- 54.- Morgan J.M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants.Ann Rev Plant Physiol 35:299-319.
- 55.- Naidu B.P., G.P. Jones, L.G. Paleg and A. Poljakoff-Mayber (1987). Proline analogues in *Melaleuca* species: Response of *Melaleuca lanceolata* and *M. uncinata* to water stress and salinity. Aust J Plant Physiol 14:669-677.
- 56.- Paleg L.G. and D. Aspinall (1981). Proline accumulation: Physiological aspects. In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. L.G. Paleg and D. Aspinall(Eds). Academic Press, Sidney. pp 215-228.
- 57.- -----, G.R. Stewart and J.W. Bradbeer (1984). Proline and glycinebetaine influence protein solvation. Plant Physiol 75:974-978.

- 58.- Perry C.A., R.A. Leigh, A.D. Tomas, R.E. Wyse and J.L. Hall (1987). The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet. *Planta* 170:353-361.
- 59.- Poljakoff-Mayber A., D.E. Symon, G.P. Jones, B.P. Naidu and L.G. Paleg (1987). Nitrogenous compatibles solutes in native south Australian plants. *Aust J Plant Physiol* 14:341-350.
- 60.- Reed R.H., J.A. Chudek, R. Foster, W.D.P. Stewart (1984). Osmotic adjustment in cyanobacteria from hypersaline environments. *Arch Microbiol* 198:333-337.
- 61.- Richter Hanno (1978). A diagram for description of water relations in plant cells and organs. *J Exp Botany* 112:1197-1203.
- 62.- Robinson S.P. (1985). Osmotic adjustment by intact isolated chloroplasts in response to osmotic stress and its effects on photosynthesis and chloroplast volume. *Plant Physiol* 79:996-1002.
- 63.- Sane, P.V., N. Kumar. M. Bajjal, K.K. Singh and V. K. Kochhar (1987). Activation of nitrate reductase by calcium and calmodulin. *Phytochemistry* 26:1289-1291.
- 64.- Singh T.N., L.G. Paleg and D. Aspinall (1973). Stress metabolism. I.- Nitrogen metabolism and growth in barley plant during water stress. *Aust J Biol Sci* 26:45-56.
- 65.- Sinclair T. R. and M. M. Ludlow (1985). Who taught plants thermodynamics?. The unfulfilled water potential. *Aust J Plant Physiol* 12:213-218.
- 66.- Slavík, B. (1974). Methods of studying plant water relations. Academia Publishing House The Czechoslovak.

Academy of Sciences. Prague. pp 146.

- 67.- Stewart G.R. and A.D. Hanson (1980). Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In: Adaptation of plants to water stress and high temperature stress. Turner N.C. and P.J. Kramer (Eds). Wiley Interscience Publication. N.Y.. pp173-186.
- 68.- Stewart G.R. (1981) Proline accumulation: Biochemical aspects. In: Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. L.G. Paleg and D. Aspinall. Academic Press. Sidney. pp 243-259.
- 69.- Storey R. and R.G. Wyn Jones (1975). Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. Plant Sci Letters 4:161-168.
- 70.- Stumpf D.K. (1984). Quantitation and purification of quaternary ammonium compounds from halophyte tissue. Plant Physiol 75:273-274.
- 71.- Turner N.C. (1981). Technique and experimental approaches for the measurement of plant water status. Plant and Soil 58:339-366.
- 72.- Watad A.A., L. Reinhold and H.L. Lerner (1983). Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. Plant Physiol 73:624-629.
- 73.- Weigel P., E.A. Weretilnyk and A.D. Hanson (1986). Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. Plant Physiol 82:753-759.
- 74.- -----, C. Lerma and A.D. Hanson (1988). Choline oxidation by intact spinach chloroplasts. Plant Physiol 86:54-60.

- 75.- Wyn Jones R.G., R. Storey, R.A. Leigh, N. Ahmad and A. Pollard (1977). A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: Regulation of cell membrane activities in plants. E. Marré and Ciferri (Eds). Elsevier/North Holland. Amsterdam. pp 121-136.
- 76.- -----, ----- (1981). Betaines. In: Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. L.G. Paleg and D. Aspinall (Eds). Academic Press Sydney. pp 171-208.
- 77.- ----- and J. Gorham (1983). Osmoregulation. In: Encyclopedia of plant physiology. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and A. Ziegler (Eds) Springer-Verlag. Vol 12 C pp35-54.
- 78.- ----- (1984). Phytochemical aspects of osmotic adaptation. In: Recent advances in phytochemistry. F.A. Loewus (Ed). Academic Press London. pp 345-365.