

17
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza"

Efecto de la fuente de nitrógeno en las enzimas del
metabolismo nitrogenado durante el ciclo de crecimiento
en cultivo de tejidos de Catharanthus roseus

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

LEOBARDO ORTUÑO OLEA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



México, D. F.

1988



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.

AIA	Acido indolacético
ADP	Difosfato de adenosina
AS	Asparagino sintetasa
ATP	Trifosfato de adenosina
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
EDTA	Etilendiamino tetraacetato
FAD	Flavin adenín dinucleótido
Fd	Ferredoxina
GDH	Deshidrogenasa glutámica
Gln	Glutamina
Glu-Na	Acido glutámico neutralizado
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamino sintetasa
GTP	Trifosfato de Guanosina
IDP	Difosfato de inosina
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	Fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
PC	Medio de Phillips y Collins
Pi	Fosfato inorgánico
rp	Recién preparado
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano

ÍNDICE.

	Pag.
Introducción	1
I. Antecedentes	5
1.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L) G. Don	5
2.1. Cultivo de Tejidos	7
2.2. Crecimiento de Tejidos en cultivo, en diferentes fuentes nitrogenadas	9
3.1. Metabolismo Nitrogenado	11
3.2. Nitrato Reductasa	15
3.3. Nitrito Reductasa	18
3.4. Glutamino sintetasa	20
3.5. Glutamato Sintasa	24
3.6. Glutamato Deshidrogenasa	26
II. Materiales y Métodos	32
II.2.1. Medio de cultivo.	33
II.2.2. Fuentes nitrogenadas.	35

II.2.3. Curvas de crecimiento.	35
II.2.4. Preparación del extracto enzimático.	35
II.2.5.1. Actividad enzimática de la GS.	36
II.2.5.2. Actividad enzimática de la GOGAT-NADH.	37
II.2.5.3. Actividad enzimática de la GDH-NADH.	38
II.2.5.4. Actividad enzimática de la GDH-NAD ⁺ .	39
II.2.6. Determinación de proteínas.	40
II.2.7. Determinación de aminoácidos (glutamato).	41
II.2.8. Determinación de nitratos.	41
II.2.9. Determinación de nitritos.	42
II.2.10. Determinación de amonio.	42
III. Resultados y Discusión	43
Conclusiones	50
Bibliografía	51
APENDICE I	64

INTRODUCCION

El término cultivo de tejidos vegetales (CTV) designa a todos los métodos para cultivar asépticamente células, protoplastos, tejidos especializados y órganos de plantas en medios nutritivos y bajo condiciones ambientales controladas (1). Durante las últimas 3 décadas se ha logrado cultivar una amplia variedad de plantas mediante esta técnica, varios cientos de ellas se pueden cultivar en un estado de dediferenciación como el de callos y cultivos en suspensión.

Desde hace tiempo se ha contemplado la producción de metabolitos secundarios (aceites esenciales, glucósidos, enzimas y alcaloides) a través de los CTV. Estos sistemas pueden proveer un suministro continuo y homogéneo de materia prima en un estado fisiológico uniforme, debido a su independencia del medio ambiente, al mantenerlos en condiciones controladas. Además, los CTV se pueden manipular más fácilmente que las plantas completas para incrementar los rendimientos del producto; en las plantas, la obtención máxima del producto es relativamente fija y difícil de mejorar, debido principalmente a la heterogeneidad natural de la materia prima, variaciones del contenido del producto, suministros irregulares, etc. (2).

Por otro lado, se sabe que los CTV pueden o no contener vías metabólicas idénticas a las presentes en las plantas (3), por lo cual es posible generar compuestos aún desconocidos.

Para que sea útil como fuente industrial alterna de compuestos secundarios, un cultivo de células debe satisfacer varios requisitos: un buen rendimiento del producto final es esencial; además, la acumulación en la célula o la liberación al medio deberá ser más rápida que la degradación; las células deberán ser genéticamente estables y producir una cantidad constante del producto; asimismo, la producción tendrá que ser costeable.

A pesar del gran potencial industrial que tienen los CTV, todavía existen problemas que impiden su explotación comercial para la producción de metabolitos secundarios. Entre los problemas más comunes están los siguientes: su crecimiento lento, su inestabilidad genética, la agregación celular, el control de la diferenciación celular, la incapacidad para crecer autótroficamente, así como factores morfológicos (2).

Hasta ahora, se han reportado más de 15 especies en las que la producción de compuestos secundarios en cultivos de células se aproxima o excede la producción en la planta completa (2-4).

La planta *Catharanthus roseus* contiene casi todos los alcaloides derivados del indol y ha sido ampliamente estudiada en los últimos 25 años (5). En CTV de esta especie se han reportado cerca de 15 alcaloides (6-9). Doller et al. (10) indican la presencia de serpentina y restos de raubasina en 5 diferentes líneas celulares (callo) de *C. roseus*; sobre las bases de peso seco, se encontraron 0.5% de alcaloides, bajo condiciones favorables. Zenk et al. (11) lograron seleccionar 2 líneas celulares con una notable producción de serpentina y ajmalicina, el rendimiento fue del 1.3% en base a peso seco.

Desde hace varias décadas se han emprendido numerosas investigaciones encaminadas a obtener información sobre la influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y la producción de alcaloides en CTV de *C. roseus*. La tendencia en estas investigaciones es optimizar las velocidades de crecimiento por medio de la reformulación de los medios de cultivo y la modificación de las condiciones ambientales en las que crecen los cultivos (2).

Entre las variables que se han estudiado están las siguientes: la concentración de sacarosa (12-13); la ausencia de fosfato y nitrógeno inorgánico (12); la adición de fosfato (14), triptofano (11, 15) y triptamina (10); la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (12, 16) y de ácido indolacético y

benciladenina (11); la temperatura de incubación del cultivo (3); la concentración de CO_2 (17, 18); la tasa de aereación (19, 20) y el estrés de sequía (21).

El departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química de la UNAM y el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) han establecido una serie de investigaciones sobre el metabolismo nitrogenado y la obtención de alcaloides en *C. roseus* (22-25). El objetivo principal es generar el conocimiento básico que permita obtener la síntesis de metabolitos secundarios y con ello, la posibilidad de manipular dicho proceso, tanto en plantas como en CTV. El modelo experimental empleado asume que la fuente de nitrógeno puede influir en la biosíntesis de los alcaloides derivados del indol (Fig. 1).

El interés de este trabajo se centra en la investigación básica sobre el metabolismo nitrogenado en CTV de *C. roseus*. En base a lo anterior, los objetivos planteados fueron los siguientes:

1) Estudiar el crecimiento de tejidos de *Catharanthus roseus*, cultivados en diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato, amonio y una mezcla de ambos).

2) Determinar el efecto de la fuente nitrogenada en la actividad de las siguientes enzimas: glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y deshidrogenasa glutámica (GDH), a lo largo del ciclo de crecimiento.

3) Cuantificar las concentraciones (pozas metabólicas) de proteínas, aminoácidos, nitratos, nitritos y amonio durante el periodo de crecimiento.

Síntesis de alcaloides derivados del Indol

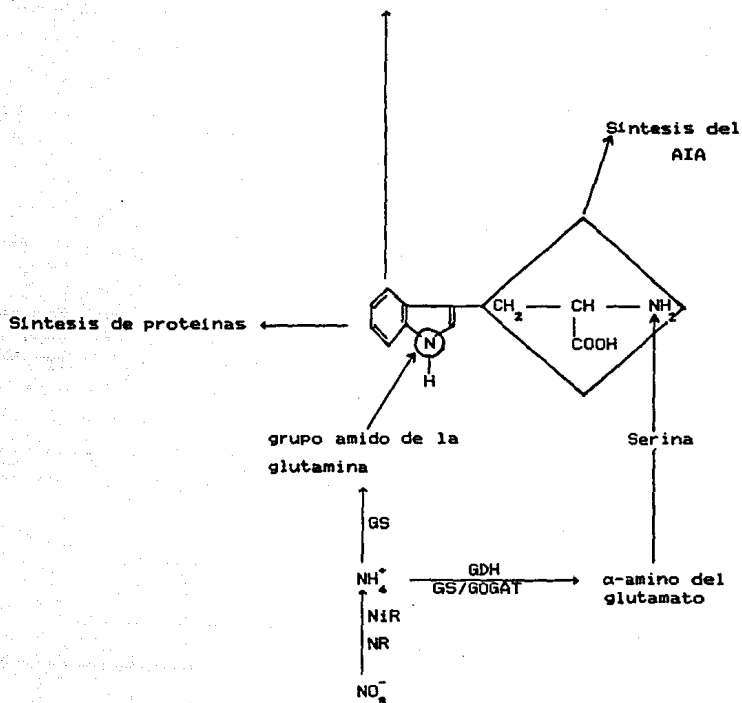


Fig 1. Modelo del proyecto de *Catharanthus roseus*

I. ANTECEDENTES

1.1. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Catharanthus es una angiosperma dicotiledónea originaria de Madagascar y dispersada por cultivo a todo el mundo (26).

En México se distribuye en las zonas tropicales de Jalisco, Yucatán, Puebla, Veracruz y Oaxaca. Asimismo se le encuentra cultivada para ornato en Michoacán, Guerrero, Morelos, Campeche, Tabasco, Querétaro, Quintana Roo y Baja California. No se conoce la fecha exacta de introducción a nuestro país; se sabe que desde 1894 se cultiva en Veracruz y Jalisco (27).

Originalmente el género fue establecido como *Vinca*, por Linneo en 1753. La planta ha recibido desde entonces los siguientes nombres científicos: *Vinca rosea*, *Lochnera rosea*, *Ammocallis rosea*, y *Catharanthus roseus*. En 1828, Ludwig Reichenbach propuso el nombre genérico de *Lochnera* para la planta referida por mucho tiempo como *Vinca rosea*; no obstante, Pichon en 1948 enlista ya 34 diferencias entre *Lochnera* y *Vinca*. El nombre *Lochnera* quedó invalidado porque se parece a *Lochneria*, una tiliácea descrita en 1777 por Scopoli. En 1838 George Don la da el nombre de *Catharanthus* al género tipificado por *Vinca*. Actualmente la filiación aceptada (27) es la de Pichon (1951):

Familia : Apocynaceae

Subfamilia : Plumertioidae

Tribu : Alsotonieae

Subtribu : Catharantinae

Sección 1 : *Lochnera* (Reichb.f.) Pich.

Género y especie : *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

El género *Catharanthus* presenta 6 especies: *C. roseus*, *C. lanceus*, *C. pusillus*, *C. trichophyllus*, *C. longifolius* y *C. scitulus* (28).

Catharanthus roseus es un arbusto pequeño y erguido, de 30 a 60 cm de altura, perenne, común en las regiones tropicales. Es de crecimiento rápido, leñosa en su base, con ramas erectas; hojas simples, enteras, opuestas, sin estípulas, siempre verdes, coriáceas, mucronadas y obtusas. Se producen una o más flores por tallo, desde la mitad de la primavera al principio del otoño. Existen por lo menos 4 variedades: albus (con flores blancas), roseus (flores rosas), acellatus y villasus (flores mezcla de blanco y rojo). Los nombres comunes que recibe son: pervinca, maravilla, ninfa, teresita, vicaria, pata de perro, etc. (27). El número cromosómico de esta especie es $2n = 16$ (26).

C. roseus es una planta ampliamente estudiada en los últimos 25 años. Desde el siglo pasado se le emplea como agente hipoglucemiante oral.

La planta contiene casi todos los tipos de alcaloides derivados del indol, hasta la fecha se han detectado más de 130 alcaloides (5) con diversas actividades farmacológicas. Entre éstos están 4 alcaloides de gran uso: la vincristina (VCR), la vinblastina (VLB), la vinleurosina y la vincosidina.

A tales alcaloides se les ha encontrado efecto sedante, hipnótico, analgésico, emético, etc. La VCR y la VLB son empleados con éxito desde 1963 en el tratamiento de la leucemia y otros cánceres humanos. Varios estudios han probado que ambos alcaloides prolongan la vida de animales cancerosos aún en las etapas terminales del cáncer.

Estos alcaloides inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El mecanismo de acción no está todavía muy claro, parece ser que detienen la mitosis en la metafase; los efectos tóxicos son reversibles en periodos variables posteriores a la suspensión del tratamiento (27, 29).

Los alcaloides aislados de la planta se presentan en muy pequeños porcentajes (0.00025 %) por lo que se requieren grandes cantidades de ella para una producción comercial. De VLB y VCR se obtienen 1 g y 20 mg por tonelada de planta respectivamente. Para

satisfacer la demanda mundial, dicha especie se colecta tanto de fuentes naturales como cultivadas, localizadas en Madagascar, Australia, Sudáfrica, Antillas Británicas, Sudamérica, Europa, la India y el sur de los E. U. (5, 27).

2.1. Cultivo de Tejidos

Al igual que en los estudios con plantas completas, en cultivo de tejidos vegetales (CTV) se presentan ventajas y desventajas. Las ventajas radican en la reproducibilidad, uniformidad y posible control del cultivo, la disponibilidad inmediata de grandes cantidades de células y el bajo nivel de organización estructural en relación a la planta. Las desventajas son el esfuerzo continuo para mantener los cultivos, la posibilidad de que éstos puedan cambiar durante los subcultivos, y la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos, al nivel planta completa (4).

Se han efectuado numerosos estudios bioquímicos en CTV, ya sea con callos o con cultivos en suspensión. El callo es una masa desorganizada de células en proliferación, puede ser inducido sobre inóculos de varios órganos de casi cualquier planta (30).

Muchos callos, especialmente aquellos que se cultivan sobre concentraciones hormonales altas empiezan a ser friables y pueden ser separados en paquetes de células en proliferación y en células individuales, al transferirlos a un medio líquido en agitación (31).

En el nivel celular, la mayoría de las células del callo se caracterizan por su gran tamaño e irregularidad de forma. Las células son altamente vacuoladas y presentan hileras citoplasmáticas en donde el movimiento de los plastos es fácilmente visto al microscopio de contraste de fases. No presentan formación de pared celular secundaria o lignificación. Los cloroplastos están en la etapa proplasto-amiloplasto y no se observan plasmodesmos.

Dispersados por todo el callo, pero usualmente localizados, están presentes de 5 a 10 centros meristemáticos, bajo la superficie superior. Las células de éstos son distintivamente más pequeñas, presentan menor vacuolación y suelen tener plasmodesmos, las asociaciones celulares son crecientes y se presenta pectina intercelular. Dichos centros sirven como áreas principales de crecimiento aunque otras células pueden ocasionalmente sufrir mitosis (32).

En relación al crecimiento del callo, éste es relativamente lento. Las células nuevas son formadas en la periferia de la masa del callo, la cual presenta un gradiente nutricional que va desde las células que están en contacto con el medio de cultivo hasta las que crecen en la superficie del callo (33).

Se sabe que el tejido original ejerce poca influencia sobre las propiedades morfológicas y bioquímicas de una línea celular. En otras palabras, después de cultivos prolongados, el callo derivado de cualquier tejido de una misma planta, tendrá usualmente similares o idénticas características morfológicas. Esto es especialmente pronunciado si se mantiene un esquema estricto de subcultivos y medios control (32). Además de lo anterior, la idea de que el callo está compuesto de células no diferenciadas es incierta. Las células del callo no son del todo uniformes morfológica o fisiológicamente y algunas variaciones genéticas en forma de endopoliploidías son comunes (34, 35).

Por otro lado, muchos fenómenos, especialmente aquellos relacionados con la organogénesis son frecuentemente observados solo en cultivos recién formados. El tiempo de cultivo prolongado causa una disminución proporcional en el potencial morfogenético de la línea celular. Esto se ha reportado en un gran número de tejidos cultivados. La pérdida del potencial para diferenciarse ha sido explicada por aneuploidía acumulada, aberraciones cromosómicas, habituación hormonal, heterocromatinización, mutación espontánea y selección durante cultivos extensivos, etc. Su causa precisa aún no es entendida y se han reportado datos contradictorios (32).

2.2. Crecimiento de Tejidos en Cultivo, en Diferentes Fuentes Nitrogenadas.

Los cultivos de células utilizan por lo general nitrato o nitrato más amonio como fuentes de nitrógeno. Estas fuentes son las más comunes, sin embargo no son las únicas. Los cultivos en suspensión de soya crecen bien en urea (si se adiciona Ni^{+2} al medio de cultivo) y en glutamina (36). Los cultivos de rosa (var. Paul's scarlet), sicamor, tabaco, jitomate y zanahoria, presentan un buen crecimiento en urea (37). Las células de tabaco pueden crecer en caseína hidrolizada, urea o ácido γ -aminobutírico como única fuente de nitrógeno (38); asimismo el crecimiento de células de zanahoria se ha logrado en glutamina, caseína hidrolizada o en alanina (39). La arginina y el nitrato se han empleado juntos para el crecimiento de células de caña de azúcar (40).

El nitrato es adecuado como única fuente de nitrógeno para células de tabaco (37, 41), jitomate, soya y zanahoria (37), rosa (var. Paul's scarlet) (42, 43), trigo (44), lino, rábano y gualda (45), *Datura innoxia* (46) y sicamor (47). (ver apéndice 1 para consultar los nombres científicos).

La adición de amonio al medio conteniendo nitrato como única fuente de nitrógeno aumenta el crecimiento en soya (48, 49), cebolla (50), lino, rábano y gualda (45) y se requiere para el crecimiento de células de zanahoria (39).

Craven *et al.* (51) encontraron diferencias en los ácidos orgánicos libres, los aminoácidos, los azúcares y el K^+ en inóculos de zanahoria que crecieron en KNO_3 ó en NH_4NO_3 . Asimismo, Bergmann *et al.* (41) han demostrado diferencias en la concentración de glutamina, alanina, malato y el nivel de la enzima málica en células de tabaco cultivadas en nitrato más amonio. Tales resultados muestran diferencias entre los tejidos que crecen en nitrato y los que crecen en nitrato más amonio; sin embargo, las bases de estas diferencias aún no se conocen.

En los casos donde el NO_3^- y el NH_4^+ son aplicados juntos en el medio de cultivo, el NH_4^+ es usado preferencialmente y el NO_3^- solo

es tomado y asimilado cuando el NH_4^+ ha sido asimilado y transformado en nitrógeno orgánico (52).

El crecimiento de células vegetales con amonio como única fuente de nitrógeno solo se ha logrado suministrando al mismo tiempo ácidos intermediarios del ciclo de Krebs (53). Esto se ha reportado en soya (36, 54), tabaco y jitomate (37), en alfalfa (44), zanahoria (37, 39) y en trompetilla (55) (ver apéndice 1).

Aparentemente la concentración intracelular de amonio no es la causa primaria de la inhibición del crecimiento. Se ha sugerido que la disminución en el pH del medio con amonio como única fuente de nitrógeno, provoca la incapacidad de las células para crecer en ese medio (39, 49, 53). En relación a lo anterior, mediante la titulación potenciométrica continua del cultivo se ha logrado que crezcan células en suspensión de zanahoria (56), soya y una especie de *Ipomoea* (57) con amonio como única fuente de nitrógeno.

No obstante, aún no es claro si la función de los ácidos del ciclo de Krebs es controlar el pH dentro de los límites tolerables. Se ha supuesto que tales ácidos pueden suministrar esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos (37).

Además de la disminución en el pH del medio, asociada con el crecimiento de células vegetales en amonio como única fuente de nitrógeno, también ocurren aumentos en el pH del medio cuando las células crecen en nitrato como única fuente de nitrógeno (49, 57) o cuando el amonio es utilizado y el nitrato permanece en el medio de cultivo (58, 59).

Varios reportes indican que la velocidad de utilización del amonio y del nitrato es diferente a diferentes valores de pH. En cultivos en suspensión de *Ipomoea* spp., la velocidad a la que el nitrato es empleado se aumenta cuando el pH disminuye (58). En células cultivadas de raíz de jitomate (60) se observó que dependiendo de la fuente nitrogenada, el pH del medio debe ser el adecuado. De este modo, cuando la fuente es nitratos, el pH óptimo para el crecimiento es de 4.7 a 4.9; y cuando es amonio, el pH debe ser de 7.0 a 7.2 .

3.1. Metabolismo Nitrogenado.

El nitrógeno interviene en casi todas las reacciones bioquímicas de los organismos vivos. Se le encuentra en proteínas, ácidos nucleicos, reguladores del crecimiento, porfirinas, vitaminas, en algunos metabolitos secundarios, etc.

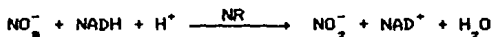
El nitrógeno atmosférico es fijado por algunos microorganismos y convertido en amonio, el cual puede ser oxidado por la flora del suelo hasta nitrato. Las plantas pueden utilizar cualquiera de estas 2 formas asimilables de nitrógeno, pero preferentemente utilizan nitratos.

La fijación biológica del nitrógeno es mediada por la nitrogenasa, la cual se encuentra en ciertos microorganismos de vida libre (*Asospirillum*, *Cyanobacteria*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, etc.) y en 2 importantes relaciones simbióticas que involucran *Actinomyceles* o *Rhizobium*. Mediante este sistema enzimático, tales organismos pueden reducir al nitrógeno atmosférico hasta amonio con el empleo de un donador de e^- (la ferredoxina) y ATP como fuente de energía. La enzima está formada por 2 metaloproteínas diferentes, una que solo contiene hierro y otra que contiene hierro y molibdeno (61).

La transformación de nitrógeno inorgánico a material orgánico implica una secuencia de reacciones:

- a) Reducción del nitrato hasta amonio.
- b) Asimilación del amonio a glutamato.
- c) Transaminación del glutamato a aminoácidos primarios.
- d) Síntesis de otros aminoácidos.

La primera parte del proceso, la reducción de nitrato a amonio, se realiza en dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes. La conversión de nitrato a nitrito es catalizada por la nitrato reductasa (NR, EC.1.6.6.1) (62,63):



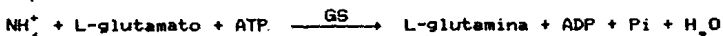
La reducción del nitrito a amonio se efectúa mediante la enzima nitrito reductasa (NiR, EC.1.7.7.1) (62, 64) :



El amonio así formado puede ser asimilado por 2 vías diferentes:

- 1.- Vía glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT)
- 2.- Vía deshidrogenasa glutámica (GDH).

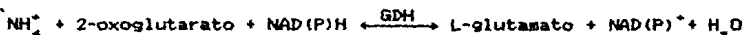
En la primera vía, el amonio se asimila inicialmente en el amido de la glutamina, en presencia de la enzima glutamino sintetasa (GS, EC.6.3.1.2):



A continuación, la glutamina reacciona con el 2-oxoglutarato en presencia de la glutamato sintasa (GOGAT, EC.1.4.7.1), para producir 2 moléculas de glutamato:



En la segunda vía se produce directamente glutamato, a través de la deshidrogenasa glutámica (GDH, EC.1.4.1.2):



Una vez que el amonio se ha incorporado a una molécula orgánica como grupo amino del ácido glutámico, es translocado a otras moléculas orgánicas para formar los demás aminoácidos mediante las enzimas denominadas transaminasas (Fig 2).

Ambas vías operan en las plantas dependiendo de una serie de factores como la relación luz/obscuridad, niveles de agua, relación CO_2/O_2 en la atmósfera, temperatura, etc. (61).

Una tercera vía posible de asimilación del amonio parece ser la de la asparagino sintetasa (AS, EC.6.3.1.4), en esta vía la enzima toma amonio y produce asparagina en vez de glutamina, que puede también donar su grupo amido a otras moléculas (61, 65):

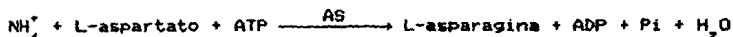
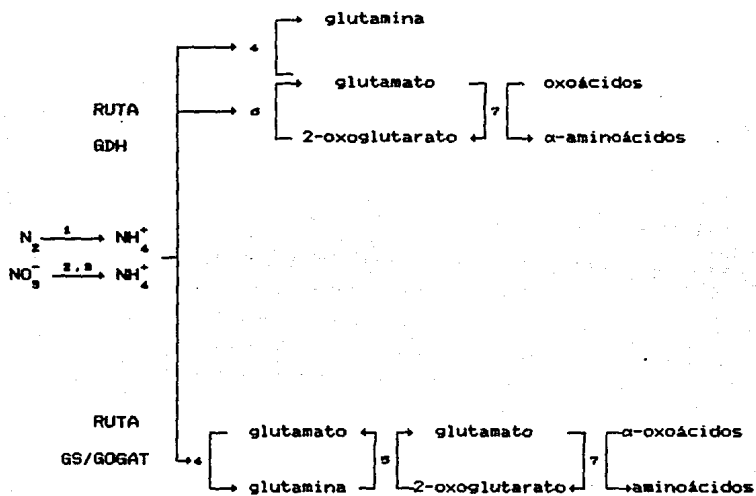


Fig.2. Ruta de asimilación del nitrógeno en plantas superiores (61).



1. Nitrogenasa
2. Nitrato reductasa, NR
3. Nitrito reductasa, NiR
4. Glutamino sintetasa, GS
5. Glutamato sintasa, GOGAT
6. Deshidrogenasa glutámica, GDH
7. Transaminasas

3.2. Nitrato Reductasa.

La NR se ha identificado y caracterizado de extractos de plantas superiores, bacterias, hongos y algas. Existe poca información sobre sus propiedades físicas, debido en parte a las dificultades experimentadas en purificar a la enzima (66).

El pH óptimo de extracción es de 8.2-8.5, se requieren grupos sulfhidrilos y agentes reductores que eviten la oxidación de la enzima (63, 67).

En plantas superiores, la NR se ha extraído de embriones, cotiledones, escutelos, células de aleurona, raíces, hojas, células cultivadas, etc. En extractos extensivamente purificados, el peso molecular varía entre 160,000 D en maíz y 500,000 D en espinaca (64). La NR de espinaca presenta 7 subunidades al realizar electroforesis en gel empleando dodecil sulfato de sodio y mercaptoetanol (68).

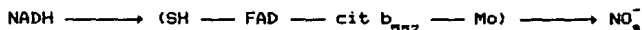
La enzima está localizada en el citoplasma y puede utilizar piridín-nucleótidos o metilviológeno reducido como donadores de los e^- (65, 69).

En soya se han detectado 2 NR, diferentes, una dependiente de NADH (EC. 1.6.6.1) y la otra de NAD(P)H (EC. 1.6.6.2). No obstante, ambas enzimas muestran actividad con los 2 nucleótidos. Una similar falta de especificidad se ha demostrado en un restringido número de especies; se ha supuesto que en los extractos está presente una nucleótido fosfatasa, la cual puede convertir al NADPH a NADH, siendo este último el que media la reducción (66).

Las K_m para NO_3^- , NADPH y NADH para la enzima de soya, dependiente de NAD(P)H, fueron: 4500 μM , 1.5 μM y 39 μM respectivamente; en el caso de la NR dependiente de NADH estos valores fueron 200 μM , 200 μM y 8 μM , respectivamente (63).

La enzima parcialmente purificada contiene flavina y grupos hemo, asimismo, se ha demostrado que el molibdeno es un componente esencial de la NR (66).

Se ha propuesto que en la reducción del NO_3^- , los e^- van desde el donador hasta el nitrato a través de una cadena de transporte de e^- en la siguiente secuencia (70, 71):



La enzima se inhibe con tungsteno (71, 72), con cianamida y azida (66), con algunos aminoácidos, HCN, CO_2 y agentes quelantes (71-73).

Se ha demostrado que la NR es inducible por el NO_3^- , tanto en hojas como raíces (65, 69) y en células cultivadas (38, 74); el incremento de la actividad se debe a una síntesis *de novo*. La inducción de la NR dependiente de NADH, debida al NO_3^- , solo se ha demostrado en plántulas de arroz y frijol (63). El cloranfenicol y ciertos nitrocompuestos orgánicos inducen también la actividad de la enzima (63).

La NR de plantas superiores se estimula con fosfato, se ha propuesto que éste puede acomplejar al Mo de la enzima, facilitando así su reducción (63).

El amonio aumenta la actividad de la NR en hojas de maíz pero no en raíz o tallos (75). La combinación de amonio y nitrato induce la actividad de la enzima en células de rosa (var. Paul's scarlet) en suspensión (42); el amonio y la glutamina evitan su inducción en soya (36) y el amonio parece reprimirla en *Ipomoea* spp. (76). En raíces de cebada y en leña, el amonio inhibe la inducción de la NR; sin embargo en otros tejidos de plantas, la aparición de la NR, inducida por nitrato, no es influenciada por el amonio (66).

Se ha reportado que la respuesta de las NR de hoja y raíz a adiciones de aminoácidos es diferente (77) y que las K_m para NADH y NO_3^- son diferentes en ambos tejidos (78), lo cual sugiere que las enzimas de los 2 tejidos son diferentes. En células en cultivo, la NR es inhibida por algunos aminoácidos (37, 38).

La evidencia experimental sugiere que el NH_4^+ y ciertos aminoácidos regulan ya sea la actividad o la inducción de la NR. No obstante, se ha demostrado que los niveles tanto de amonio como de aminoácidos, requeridos para inhibir o activar el desarrollo o actividad de la NR están en el rango mM. Tales concentraciones son mucho mayores que las encontradas en tejidos vegetales (μM). Recientemente se ha propuesto que las adiciones de NH_4^+ y aminoácidos afectan la asimilación del nitrato y la biosíntesis de otros aminoácidos más que a la NR en sí (65).

La nitrato reductasa se ha estudiado en cultivo de tejidos de soya (36, 49), zanahoria y jitomate (37), tabaco (38, 79), rosa (var. Paul's scarlet) (42,43), *Datura innoxia* (46), trigo (49), *Ipomoea* spp. (76), alfalfa (80), sicamor (81) y *Convolvulus arvensis* (82) (ver apéndice 1).

3.3. Nitrito Reductasa.

La NiR cataliza la reducción de nitrito (exógeno o producido como consecuencia de la reducción del nitrato) a amonio. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que la reacción es estequiométrica y no se liberan compuestos intermediarios.

La enzima (EC. 1.7.7.1) se ha estudiado ampliamente en extractos de bacterias, hongos, algas y plantas superiores. Emplea ferredoxina o metilviológeno como donadores de los e^- , ya sea en tejidos verdes o tejidos no fotosintéticos; se localiza en el cloroplasto (65, 66) o en los plastos de las raíces (65, 83).

Washitani y Sato (84) descubrieron la presencia de la NiR en proplastos de células de tabaco cultivadas; la actividad en los proplastos fue 6.3 veces mayor que en el homogenado celular, sugiriendo que en estos organelos se efectúa buena parte de la reducción del nitrito.

La NiR de extractos de plantas superiores, extensivamente purificados, tiene un peso molecular cercano a 62,000 D y aparentemente no contiene subunidades (66). Se ha propuesto que la enzima consiste de 2 subunidades idénticas de 37,000 D cada una (68). En extractos de espinaca y calabaza, así como en el alga *Chlorella*, se ha logrado determinar la composición de aminoácidos de la NiR (64).

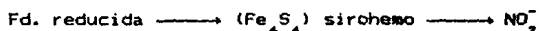
La NiR dependiente de ferredoxina tiene un pH óptimo de actividad entre 7 y 8. En extractos de plantas superiores la K_m para el NO_2^- varía entre 10 y 60 μM , la K_m para ferredoxina varía de 10 a 70 μM , en tanto que la K_m para el metilviológeno es de 70 μM (64).

La NiR parcialmente purificada de hojas verdes exhibe cantidades variables de actividad de hidroxilamina reductasa, indicando que la enzima no es totalmente específica para el NO_2^- . La afinidad de la enzima para el NO_2^- es de 10 a 100 veces mayor que para la hidroxilamina y esta última no afecta la tasa de

conversión de nitrito a amonio. Se ha propuesto que la actividad de hidroxilamina reductasa sirve para eliminar a la hidroxilamina, la cual puede provenir del metabolismo de las oximas e hidroxamatos (66).

El espectro de absorción de la NiR de espinaca mostró que ésta posee 5 átomos de hierro (un centro Fe_4S_4 y un grupo prostético sirohemo) por cada molécula de enzima. El centro Fe_4S_4 reacciona rápidamente con reductores y es sensible a la presencia de ligandos hemo (85).

La enzima parece aportar 6 e⁻ a una molécula de nitrito en pasos rápidos de 1 e⁻ cada uno. El movimiento de e⁻ desde la ferredoxina hasta el NO_2^- parece proceder de acuerdo al siguiente esquema (64):



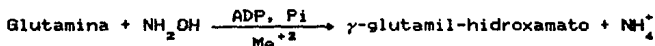
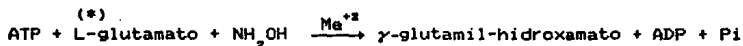
La inhibición de la NiR de plantas superiores por p-CMB (p-cloromercuribenzoato), mersalil sódico, acetato fenil mercurico y DTNB (ácido 5, 5-ditiobis-2-nitrobenzoico), demuestran la presencia de grupos SH presumiblemente asociados con residuos de cisteína. La inhibición por cianuro de potasio en calabaza y espinaca parece ser de tipo competitivo ($K_i = 0.37 \mu\text{M}$ con respecto al NO_2^-). Con CO forma un complejo, el cual puede evitarse con nitrito, hidroxilamina, cianuro y sulfito (64, 86).

La enzima de plantas superiores puede ser inducida por la adición de NO_2^- ó NO_3^- (65).

En cultivo de tejidos, la nitrito reductasa se ha medido en células de trigo (49) e *Ipomoea* spp. (76), en tabaco (84, 87) y en rosa (var. Paul's scarlet) (88); en *Ipomoea*, la adición de amonio al medio de cultivo reduce los niveles de la enzima.

3.4. Glutamino sintetasa.

La GS está presente tanto en eucariontes como procariontes; se ha detectado en bacterias, hongos, algas, plantas superiores y animales. La enzima cataliza las siguientes reacciones:



En las reacciones de síntesis (*), la GS puede emplear tanto L como D-isómeros del glutamato, siendo el D-isómero menos efectivo; los valores de Km y Vmáx con hidroxilamina y amonio son similares. En la reacción de transferencia, la enzima es altamente específica para la L- glutamina (89).

En las angiospermas la enzima está presente en casi todos los órganos de la planta. La actividad específica generalmente es mayor en las hojas que en las raíces (89, 90).

En las hojas, la enzima se localiza en los cloroplastos (91), aunque también se ha detectado en el citoplasma (92). En raíces, la enzima se encuentra tanto en el citoplasma (93) como en los plastos (83). Nato et al. (94) han demostrado que la GS del cloroplasto es una glucoproteína, mientras que la del citoplasma no lo es.

La GS de plantas superiores tiene un peso molecular en el rango de 350,000 a 400,000 D. En semillas de chícharo y en nódulos de soya, la enzima consiste de 8 subunidades idénticas de aproximadamente 45,000 D (89, 90).

En angiospermas, la enzima requiere Mg^{+2} , Mn^{+2} ó Co^{+2} para su actividad. La naturaleza del catión, su concentración y proporción de la concentración de ATP, influyen sobre su actividad. El pH óptimo para la reacción de síntesis con Mg^{+2} es de 8 y con Mn^{+2} está en el rango de pH 5-6. La actividad de la enzima aumenta al aumentarse las concentraciones de ATP y Mg^{+2} (89, 95). En raíces de arroz, el Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} y Ni^{+2} inhibieron fuertemente la actividad de la GS, probablemente debido a que reaccionan con el grupo tiol de la enzima; en adición a lo anterior, el acetato fenil mercúrico y el ácido p-hidroximercuri-fenil sulfónico inhibieron casi completamente su actividad, y ésta fue recuperada por la adición de cisteína (96), lo cual sugiere la necesidad de grupos SH para su actividad.

Los valores de la K_m para el L-glutamato varían entre 1 y 15 mM, dependiendo de la fuente de la enzima y de la concentración de Mg^{+2} ; para el ATP son cercanos a 1 mM. La GS tiene una elevada afinidad para el amonio; el valor de la K_m para éste es muy bajo, de 1 a 20 μM (89, 90).

En angiospermas se ha reportado que varios nucleótidos, entre ellos AMP, ADP, IDP y GTP inhiben la actividad de la GS (96-98). La inhibición por ADP y AMP indica la posibilidad de un control de la enzima mediante cambios en la carga energética de la célula.

Los niveles de la enzima en raíces de chícharo se aumentan con sacarosa, glucosa y fructosa a concentraciones de 0.5-2 g/l; el mayor incremento se ha observado con sacarosa a 20 g/l. Un incremento similar con estos azúcares se observó en la NR (99). En contraste, bajas concentraciones de sacarosa (100, 101), galactosa, manosa y xilosa (99) disminuyen el nivel de la GDH. La respuesta diferencial de GS y GDH a varios azúcares y a sus concentraciones indica que no están reguladas por un simple cambio de energía, sino que varios mecanismos están involucrados (99).

La respuesta de la GS a diferentes sales de amonio (102), difiere también de la respuesta de la GDH (103) y de la NR (104).

Varios reportes indican que el fosfato y algunos aminoácidos afectan la actividad de la GS. El carbamoil fosfato y el fosfato inhiben a la GS de algunas angiospermas (89, 97). La GS de lema y haba (89, 98) es inhibida por alanina y por glicina, a diferencia de la enzima de arroz (97), la cual no es afectada por los aminoácidos, incluyendo alanina y glicina; no obstante, la asparagina, la arginina y el triptofano sí tienen un pequeño efecto inhibitorio sobre la GS de arroz (90).

En lema (105) y en el alga *Chlorella* (106) la glutamina inhibe la actividad de la GS; no obstante, en chícharo (107) se ha observado lo contrario. Por otro lado, la glutamina aumenta los niveles de la GDH en lema (105) y en lupino (101). Se ha sugerido entonces que la glutamina controla los niveles de ambas enzimas, ejerciendo un control negativo sobre la GS y un control positivo sobre la GDH. A pesar de que la evidencia apunta hacia un control de la GS por varios aminoácidos, se han presentado reportes contradictorios y la función que desempeñan en la regulación de la enzima aún no es claro.

Se ha detectado la presencia de formas múltiples de la GS en un buen número de plantas superiores. Una forma de la enzima (denominada GS₁) está presente en semillas no germinadas y cotiledones, así como en plantas etioladas. En tejidos verdes se ha confirmado la presencia de una GS diferente (denominada GS₂) (90). Algunas angiospermas presentan tanto GS₁ como GS₂ en el mismo tejido, en diferentes proporciones (108).

Estudios sobre la localización subcelular de las formas de GS indican que la GS₁ está presente en el citoplasma mientras la GS₂ solo se localiza en los cloroplastos (89, 90).

En la mayoría de los órganos de plantas estudiadas, los pesos moleculares de las isoformas de GS son muy similares y varían de 330,000 a 370,000 D (90); sin embargo, la composición de aminoácidos parece ser diferente (109).

En arroz, cebada y calabaza, la GS₁ tiene un pH óptimo menor

que la GS_2 . Asimismo, la GS_2 tiene una afinidad más baja para el L-glutamato y es menos estable térmicamente que la GS_1 . Además, los compuestos que acomplejan grupos tiol inactivan rápidamente a la GS_2 y tienen poco efecto sobre la GS_1 (90).

Estudios inmunológicos con las isoenzimas de la GS han demostrado que ambas son diferentes pero que cada isoforma es muy similar entre diferentes plantas (108).

Varios reportes indican que la GS del cloroplasto es sintetizada en el citoplasma y exhibe una regulación por luz. Cuando hojas etioladas de plantas C_3 y C_4 son expuestas a la luz, se observa un incremento de 4-10 veces en la actividad de la enzima. (89, 90). Asimismo, varios inhibidores de la síntesis de proteínas tienen un marcado efecto sobre la GS_2 durante el enverdecimiento, mientras que la GS_1 no parece ser afectada (110).

La GS del helecho *Osmunda regalis* (111) parece estar controlada por un sistema de desactivación/reactivación bajo transiciones luz/ oscuridad y en amonio 2 mM. Probablemente la desactivación/reactivación implique cambios en los grupos disulfuro de la enzima; resultados similares se han observado en lema (105).

Debido a su abundancia, su localización y su baja K_m para el amonio, la GS probablemente sea la enzima responsable de la asimilación primaria del amonio en hojas y raíces (65, 112).

Se ha sugerido que la GS_1 , debido a su localización en el citoplasma, puede funcionar en la reasimilación del amonio proveniente de la fotorrespiración (90, 113). Por otro lado, los altos niveles de actividad de GS_2 en comparación con los de GOGAT, apoyan la función de la GS_2 en la desintoxicación del amonio dentro del cloroplasto (90, 114).

En cultivo de tejidos, la ruta GS/GOGAT se ha estudiado en cultivos provenientes de trompetilla (55), rosa (var. Paul's scarlet) (115), tabaco (116), zanahoria (117), soya (118) y maíz (119) (ver apéndice 1).

3.5. Glutamato Sintasa.

La GOGAT fue originalmente descubierta en bacterias; a la fecha se ha reportado en una amplia variedad de algas, briofitas, pteridofitas y plantas superiores (89, 112, 120).

Existen dos y posiblemente tres isoformas de GOGAT, una que usa ferredoxina como donador de e^- (EC.1.4.7.1), una que usa NADH (EC. 1.4.1.14) y posiblemente una dependiente de NADPH (EC. 1.4.1.13).

La GOGAT-ferredoxina parece ser común a todos los eucariontes fotosintéticos, a diferencia de la GOGAT dependiente de piridín-nucleótidos, la cual no se ha detectado en los tejidos fotosintéticos de las plantas superiores (89).

En hojas verdes, la ferredoxina reducida es el principal donador de e^- (65); en extractos de raíz de arroz (121) se observó actividad de GOGAT con metilviológeno, ésta fue aproximadamente el 25% de la obtenida con ferredoxina. En los tejidos no fotosintéticos de las angiospermas, la GOGAT presenta actividad con NADH y NADPH; la tasa de reducción con NADH siempre es mayor que con NADPH (117, 122-124). Posiblemente la aparente falta de especificidad de nucleótido sea explicada por la conversión del NADPH a NADH, debida a una transhidrogenasa o fosfatasa (89).

La GOGAT dependiente de piridín-nucleótidos parece localizarse exclusivamente en los plastos de las raíces (65, 125). No obstante, Match y Takahashi (126), han detectado la coexistencia de la GOGAT-Fd y la GOGAT-NADH en cloroplastos de brotes etiolados de chícharo, en enverdecimiento. La actividad de la GOGAT-Fd aumentó casi 10 veces durante el enverdecimiento, mientras la actividad de la GOGAT-NADH no cambió; el incremento fue inhibido por cicloheximida o cloranfenicol. A diferencia de estos resultados, en hojas de maíz en enverdecimiento (127), no se detectaron cambios en el nivel de la GOGAT-Fd.

La enzima purificada de nódulos de lupino consiste de un solo polipéptido de 235,000 D, mientras que la GOGAT-Fd de haba tiene un peso molecular de 150,000 (89, 128).

En cotiladones de chícharo (122) y en células de soya en suspensión (118), la GOGAT es específica para la L-glutamina y el 2-oxoglutarato. Los valores de Km de la enzima de chícharo fueron: 13.3 μM para NADH y 27.7 μM para NADPH; 1.43 mM para L-glutamina y 0.96 mM para el 2-oxoglutarato.

La mayoría de las GOGAT, dependientes de piridín-nucleótidos tienen un pH óptimo cercano a 7.5, excepto en lupino, que es de 8.5 (89).

Los análogos de glutamina, azaserina y 6-diazo-5-oxo-L-norvalina (DON), inhiben tanto a la GOGAT-Fd como a la dependiente de piridín-nucleótidos (105, 118, 128). Los cloruros de Co^{+2} , Ni^{+2} y Cd^{+2} son potentes inhibidores de la GOGAT-Fd de haba, al igual que cierto número de aminoácidos, entre ellos L-aspartato y L-asparagina (128).

Se ha reportado que la actividad de la GOGAT-NADH se aumenta con varias fuentes de nitrógeno inorgánico (55, 118, 119). Bajas concentraciones de amonio incrementan la actividad de la GOGAT-NADH en células de soya en suspensión (118). El NO_2^- y el NH_4^+ , juntos o por separado aumentaron la actividad de la enzima en tejidos de maíz cultivados; el incremento más pronunciado fue con NO_2^- (119, 129). Rana y Srivastava (129) sugieren que el NO_2^- induce una síntesis *de novo* de la GOGAT-NADH en raíces de maíz cultivadas, a la vez que la protege contra la degradación o inactivación.

Loyola y Sánchez (119) sugieren que las 2 enzimas de GOGAT no tienen la misma función en plantas superiores. La GOGAT-NADH funcionaría principalmente en la asimilación del nitrógeno mientras la GOGAT-Fd puede servir para exportar equivalentes reductores del cloroplasto.

3.6. Glutamato Deshidrogenasa.

La GDH parece ser una enzima de ocurrencia universal. Se ha detectado en numerosas especies de plantas superiores, en briofitas, pteridofitas, algas, hongos, bacterias y un buen número de tejidos animales (89).

En plantas superiores se han descrito 3 formas de GDH con diferentes especificidades de nucleótido: 1) L-glutamato: NAD⁺ oxidorreductasa (desaminante), EC.1.4.1.2; 2) L-glutamato: NAD(P)⁺ oxidorreductasa (desaminante), EC.1.4.1.3 y 3) L-glutamato: NADP⁺ oxidorreductasa (desaminante), EC.1.4.1.4.

La enzima EC.1.4.1.2 se localiza en las mitocondrias de un buen número de tejidos (93, 130). Varios reportes indican que la enzima también se localiza en el citoplasma (83, 112, 131); no obstante, Davies y Teixeira (130) encontraron una gran similitud entre las GDH purificadas de mitocondria y citoplasma en chícharo y concluyeron que la GDH soluble es liberada de la mitocondria durante la extracción.

Las GDH mitocondriales reaccionan con NADH y NADPH en sentido aminativo, mostrando mucho mayor actividad con NADH. La proporción de actividad NADH/NADPH es 1-20:1 (89, 130, 132). En dirección desaminante, las actividades con NADP⁺ siempre son menores que con NAD⁺ (89, 133, 134), aunque en algunos casos no se ha encontrado actividad con NADP⁺ (135-137).

La enzima EC.1.4.1.3 se ha detectado exclusivamente en los cloroplastos (132, 136-138), difiere de la enzima mitocondrial en los valores de Km para ciertos sustratos y en la movilidad electroforética; las 2 actividades se consideran debidas a isoenzimas separadas.

En haba (137), la GDH de cloroplasto muestra mayor actividad con NADPH que con NADH; la proporción de actividad NADH/ NADPH fue 1:1 en lechuga (138), 1.4:1 en soya (136) y 2:1 en acelga (132).

La enzima EC.1.4.1.4 se ha descrito en cloroplastos del alga *Caulerpa simplicius* (139) y en proplastos de tabaco (84).

La GDH mitocondrial de plantas superiores tiene un peso molecular entre 210,000 y 290,000 D (89, 130, 132); aunque se han detectado pesos moleculares de 51,000 en caupí (135) y 350,000 en soya (136).

La reacción de aminación para muchas GDH es óptima en el rango de pH 7.5-8.3 (130, 133, 134, 136) y comúnmente a pH 8 (132, 135, 138, 140). El pH óptimo para la desaminación está en el rango 8.4-9.5 (89, 130, 132, 136).

La GDH-NADH de plantas superiores parece ser una metaloproteína. El EDTA causa una inactivación de la enzima en sentido aminativo y desaminativo en muchas especies (84, 125, 130, 133, 135). La reactivación se logra por la adición de Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} y Co^{+2} ; los cationes más efectivos son Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} .

La enzima parece contener grupos SH, como lo indica la inhibición, por p-HMB (p-hidroximercuribenzoato), la cual es revertida por el glutatión reducido (130, 135, 140).

En células de tabaco (133), el ATP y el ADP ejercen inhibición competitiva en ambas direcciones, el efecto es prevenido por el AMP. Asimismo, el citrato y el fumarato inhiben la aminación mientras el oxalacetato inhibe la desaminación; los efectos son revertidos por Ca^{+2} . La inhibición por ATP y varios ácidos carboxílicos sugiere que la actividad de GDH está regulada por el sistema involucrado en la producción de energía. (89, 133).

El ATP inhibe a la GDH de *lemna* (105) en dirección aminante. En chícharo (130), el ATP, el 2-oxoglutarato, el NH_4^+ y el glutamato actúan como inhibidores competitivos en la aminación, mientras el NADH y varios ácidos del ciclo de Krebs inhiben la desaminación. Davies y Teixeira (130), proponen que la proporción NAD^+/NADH puede jugar un importante papel en el control de la GDH mitocondrial. De este modo, cuando los niveles de ácidos del ciclo de Krebs son altos, la proporción NAD^+/NADH es baja y la desaminación del glutamato es inhibida. Si los niveles de ácidos carboxílicos caen, la proporción NAD^+/NADH aumenta, la desaminación no es inhibida y los intermediarios del ciclo de Krebs son producidos a expensas del glutamato (89).

Por otro lado, la enzima parece ser regulada por cambios en el nivel de azúcares. La actividad de la GDH-NADH se ve disminuida por la sacarosa en chícharo y en lupino (101), así como en *Lemna perpusilla* (100).

Los valores de K_m para el 2-oxoglutarato, NAD^+ , NADP^+ y NADPH , obtenidos de diversas fuentes son similares y caen dentro de cierto rango (89). Por el contrario, los valores de K_m para el glutamato, amonio y NADH varían ampliamente de una fuente a otra (130, 133, 135). Las variaciones se han atribuido a interacciones homotrópicas entre las moléculas de sustrato y a las diversas condiciones de ensayo utilizadas.

Se ha detectado la existencia de formas múltiples de GDH en extractos de plantas superiores. En maíz (141) se reportan 7 isoenzimas de la GDH, localizadas en la mitocondria y dependientes de NADH . La GDH presenta un patrón electroforético de 7 bandas en haba (134), 6 en lupino (142), 4 en calabaza (143) y rosa (var. Paul's scarlet) (144) y 1 sola en caupi (135).

La GDH de chicharo constituye patrones específicos de 7 isoenzimas en cada tejido. Un patrón (GDH-I) se encuentra en cotiledones y brotes jóvenes. En raíces y brotes viejos se localiza además un segundo patrón (GDH-II); ambos patrones se localizan exclusivamente en la mitocondria (145) y consisten de la misma molécula en diferentes estados conformacionales (146).

La GDH de alfalfa presenta un patrón de isoenzimas en cotiledones y uno diferente en raíces; en brotes se encuentra un patrón mezclado, compuesto de isoenzimas tanto de GDH-I como de GDH-II. Una distribución similar de los patrones enzimáticos de la GDH se ha detectado en ricino y en lupino (147). Ambos patrones tienen pH óptimos similares así como igual especificidad de sustrato y propiedades cinéticas. Se ha supuesto que pueden estar relacionados con la diferenciación celular o con diferentes funciones fisiológicas.

Cammaerts y Jacobs (148) han detectado en *Arabidopsis thaliana* 2 genes no alélicos, responsables de la síntesis de 2 tipos diferentes de subunidades, las cuales al asociarse aleatoriamente en un complejo hexamérico dan como resultado el patrón electroforético de 7 bandas, observado en esta especie.

Se ha presentado evidencia de que altas concentraciones de amonio (2-15 mM) pueden inducir la síntesis de la GDH-NADH en extractos de plantas superiores (53, 105, 142, 149-153). El aumento en los niveles de la enzima se debe a una síntesis *de novo* (105, 113, 153, 154).

Considerables incrementos en los niveles de la GDH mitocondrial se han observado también en hojas etioladas y senescentes (113, 155). La evidencia apoya el papel de la GDH en la desintoxicación del amonio; no obstante, en hojas de calabaza (143) y alfalfa (147) el amonio exógeno no afecta los niveles ni los patrones isoenzimáticos de la GDH.

Otras fuentes de nitrógeno afectan también la actividad de la enzima. El NO_3^- aumenta la actividad de la GDH-NADH en plántulas de maíz (154). Altas concentraciones de aminoácidos pueden incrementar la actividad de la GDH en las angiospermas (105, 156); en algunos casos se ha observado un efecto inhibitorio de los aminoácidos sobre la desaminación (130, 133). Se ha propuesto entonces la existencia en las plantas superiores, de formas de la enzima funcionalmente distintas; la GDH mitocondrial podría contener isoenzimas con un papel anabólico a altas concentraciones de amonio, diferentes de aquellas responsables de la desaminación oxidativa del glutamato (89, 157).

En tejidos de plantas superiores la GDH tiene una baja afinidad para el amonio, su K_m es de 10-70 mM (89, 133, 135, 140, 145) mientras que la GS presenta una K_m para el amonio de 1-20 μM , razón por la cual se considera a esta última como la enzima responsable de la asimilación primaria del amonio (112).

Es posible, sin embargo, que los valores de K_m de la GDH para el amonio dentro de la célula sean menores que los valores determinados *in vitro* o que altas concentraciones de amonio se puedan localizar en la célula (65). Recientemente se ha detectado que la K_m de la GDH para el amonio disminuye marcadamente a bajas concentraciones de amonio (158-160); parece haber una afinidad creciente de la GDH para el amonio a bajas concentraciones; tales resultados apoyan el papel anabólico de la enzima en la asimilación de amonio.

Se ha propuesto que la GS asimila principalmente niveles fisiológicos de amonio y efectúa la asimilación del que se genera en la fotorrespiración, mientras que la GDH mitocondrial solo es operativa como auxiliar de la GS, cuando están presentes concentraciones elevadas de amonio (113, 145). Estudios con mitocondrias aisladas de chícharo indican que éstas reasimilan menos del 15% del amonio total producido en la transformación de glicina a serina. Asimismo, la reasimilación del amonio producido

en la fotorrespiración es inhibida por la sulfoximina metionina (un inhibidor específico de la GS), lo cual sugiere que el amonio generado intramitocondrialmente es difundido al citoplasma y reasimilado por la vía GS/GOGAT (92, 161).

Buena parte de la evidencia indica que la GDH es activa principalmente en la oxidación del glutamato más que en su síntesis (65, 89, 120).

Cammaerts y Jacobs (113) proponen que la GDH tiene 2 funciones: la GDH-NADH puede funcionar rápidamente con altos niveles de nitrógeno exógeno o endógeno mientras la GDH-NAD⁺ es responsable del abasto de energía a la célula durante la asimilación debida a GS.

En cultivo de tejidos in vitro, la GDH se ha estudiado en soya (49, 118), trompetilla (55), rosa (var. Paul's scarlet) (115, 144), tabaco (131, 159, 162), trigo (156), zanahoria (163), frijol (164) y maíz (165) (ver apéndice 1).

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1.1. Material biológico.

Se emplearon callos de *Catharanthus roseus*, originados a partir de tejido foliar. La línea celular fue generada en noviembre de 1982. Los callos son de color verde y contienen hasta 100 μg de clorofila total por gramo de peso fresco (25, 167).

II.1.2. Material de vidrio.

Todo el material empleado se lavó con detergente, se enjuagó con agua destilada y se secó en estufa.

II.1.3. Reactivos.

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

II.1.4. Equipo.

Balanza analítica, Mettler
Balanza granataria, OHAUS
Placas de calentamiento y agitación, Thermolyne
Potenciómetro, Conductronic
Campana de flujo laminar, VECO
Autoclave, Electric Steroclave 25X
Cámara de crecimiento a 25°C
Estufa de vacío, Precision
Congelador a -70°C, Forma Scientific
Politrón, PCU-2
Centrifugas, Beckman, J2-21 y MSE
Refrigerador a -20°C, Congelador
Micropipetas, Finnpiptette, de 0-5, 5-20, 50-200 y 200-1500 μl
Agitador, Vortex-Genie
Baño de temperatura constante, Colora
Espectrofotómetro, Carl Zeiss M4 QIII

II.2.1. Medio de cultivo.

Para el crecimiento de los callos se empleó el medio de Phillips y Collins (166), adicionado con 3 mg/l de 6-bencil aminopurina (6-BAP). En estas condiciones se reportan aumentos en el peso fresco de hasta el 300% (167).

Las concentraciones de macro y micronutrientes de este medio se presentan a continuación:

Compuesto	Concentración (mg/l)	Solución	Solución conc. (mg/100 ml)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ^m	435.00	A	4350
$MnSO_4 \cdot H_2O$ ^m	15.00	A	150
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ^m	5.00	A	50
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ^m	0.10	A	1
KH_2PO_4 ^m	325.00	B	3250
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ^a	85.00	B	850
NH_4NO_3 ^m	1000.00	C	5000
KNO_3 ^b	2100.00	C	10500
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ^b	600.00	D	3000
KI ^a	1.00	E	100
H_3BO_3 ^m	5.00	F	500
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ^m	0.10	F	10
Inositol ^a	250.00	G	2500
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ^b	27.95	H	279.5
Na_2EDTA ^m	37.23	H	372.3
Piridoxina-HCl ^m	0.50	I	50
Tiamina ^m	2.00	I	200

^b Baker

^m Merck

^a Sigma

De cada solución concentrada se prepararon 100 ml, 1 litro de medio de cultivo se preparó de la siguiente manera:

Solución	ml/l de medio
A	10
B	10
C	20
D	20
E	1
F	1
G	10
H	10
I	1

Las soluciones se añadieron en el orden indicado, en 200-400 ml de agua con agitación constante.

La 6-BAP (Merck) se disolvió (3 mg/l) en un poco de NaOH 0.1 N; una vez disuelta se acidificó (pH 3-4) con HCl 0.1 N antes de agregarse al medio.

La sacarosa (Merck) se añadió a una concentración de 25 g/l y finalmente se ajustó el pH del medio a 5.4-5.5 (con un potenciómetro, empleando HCl ó NaOH 0.1 N) antes de aforar a 1 litro.

El agar (Merck) se lavó previamente en un filtro de placa porosa hasta que el agua de lavado fuera incolora. Una vez limpio y seco, se adicionó al medio (8 g/l) en un matraz de 2 litros y se fundió por calor y agitación.

El medio se envasó (8 ml) en tubos de cultivo de 10 x 2.5 cm, se tapó con papel aluminio y se esterilizó durante 15 minutos a 1 kg/cm² de presión. Una vez esterilizado, se dejó enfriar y se guardó en el refrigerador hasta su uso.

II.2.2. Fuentes nitrogenadas.

Se emplearon 3 fuentes nitrogenadas para el crecimiento de los callos. El control fue el medio de Phillips y Collins (PC), el cual tiene una fuente balanceada de nitrógeno (20.77 mM de KNO_3 y 12.5 mM de NH_4NO_3). Las otras 2 fuentes fueron el medio PC con NO_3^- 20 mM únicamente (como KNO_3) y el medio PC con NH_4^+ 2 mM (como NH_4Cl); en este último caso se repuso el K^+ como KCl 20.77 mM.

II.2.3. Curvas de crecimiento.

Se sembró 1 g de callo en cada una de las 3 fuentes nitrogenadas, cada muestra por sextuplicado; las operaciones se efectuaron en condiciones estériles. Los callos se mantuvieron bajo luz continua (luz blanca fluorescente, 8 watt/m²) y a 25 ± 1°C.

Se determinó el aumento en peso fresco y peso seco durante 20 días. Cada 2 días se pesaron 6 muestras de cada tratamiento en una balanza analítica. Una vez pesadas, se separaron 300 mg de callo de cada muestra, el resto se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Las porciones de 300 mg se secaron en una estufa de vacío a 60°C hasta obtener peso constante.

II.2.4. Preparación del extracto enzimático.

El tejido congelado se molió en un mortero (previamente enfriado) hasta convertirlo en un polvo muy fino, el cual se dejó descongelar. Todo el procedimiento de extracción se efectuó a 4°C. Una vez descongelado el tejido pulverizado, se le adicionó el tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, mercaptoetanol 5 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mM, pH 8.2) en una relación 1:2.5 p/v y polivinilpirrolidona al 5% p/p. La mezcla se homogeneizó por 2 minutos en un politrón PCU-2. El extracto así obtenido se pasó a

través de 4 capas de gasa (previamente humedecida con tampón) y se centrifugó a $14,000 \times g$, a $4^{\circ} C$ durante 30 minutos en un rotor JA-20. El sobrenadante de la centrifugación (denominado extracto crudo) se empleó para las determinaciones enzimáticas y cuantificación de las pozas metabólicas (168).

II.2.5.1. Actividad enzimática de la GS.

Se determinó por el método de Elliot, modificado por Kanamori y Matsumoto (96). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	50.0 mM	1.7 ml, 1.6 ml, 1.5 ml	pH 7.5
ATP rp	8.0 mM	0.2 ml	pH 7.0
Glu-Na	83.3 mM	0.5 ml	pH 7.0
MgSO ₄	33.3 mM	0.1 ml	
NH ₂ OH rp	10.0 mM	0.3 ml	pH 7.0
Cisteína	3.3 mM	0.1 ml	
Extracto rp.		<u>0.1 ml, 0.2 ml, 0.3ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris-HCl. La reacción se inició con la adición del Glu-Na y la mezcla se incubó por 10 minutos a $37^{\circ}C$.

Las determinaciones se hicieron por triplicado, en un volumen final de 3.0 ml.

En cada determinación se usó un blanco a tiempo cero, el cual contenía todos los reactivos y el mismo volumen de extracto pero la reacción se detuvo a tiempo cero añadiendo 1 ml del reactivo de cloruro férrico (volúmenes iguales de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ al 10% en HCl 0.2 N, ácido tricloroacético al 24% y HCl al 50%).

Después de centrifugar a $3,000 \times g$ durante 15 minutos, se registró la absorbencia del sobrenadante a 540 nm respecto a cada blanco (ver figs. 2.3 y 2.4).

La velocidad de la reacción se expresó como μ moles de γ -glutamyl-hidroxamato formados por minuto, para ello se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.1.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de γ -glutamyl-hidroxamato por minuto, bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó como unidades enzimáticas por mg de proteína (168).

II.2.5.2. Actividad enzimática de la GOGAT-NADH.

Se determinó por el método de Beavers y Storey (122), modificado (168). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.7 ml, 1.6 ml, 1.5 ml	pH 7.5
2-oxoglutarato	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
Gln	30 mM	0.5 ml	
NADH rp	80 μ M	0.2 ml	
Extracto rp		0.1ml , 0.2 ml, 0.3 ml	
Volumen total		<u>3.0 ml</u>	

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris-HCl.

La mezcla de todos los componentes, excepto el NADH, se incubó a 30°C por 2 minutos y después se inició la reacción añadiendo NADH 80 μ M. Se trazó una gráfica de la disminución de la absorbencia a 340 nm en función del tiempo; se usó solo la parte lineal de la gráfica (ver figs. 2.5 y 2.6).

A la lectura de cada muestra se le restó la de su respectivo blanco; para obtener este blanco, en la mezcla se sustituyó al 2-oxoglutarato y a la glutamina por un volumen equivalente de Tris-HCl.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NADH convertidos por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la fig. 2.2.

Las unidades enzimáticas fueron expresadas como nmoles de cofactor oxidado por minuto. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por mg de proteína .

II.2.6.3. Actividad enzimática de la GDH-NADH.

Se determinó por el método de Joy (169), con algunas modificaciones (168). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.7 ml, 1.6 ml, 1.5 ml	pH 8.2
2-oxoglutarato	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
NH ₄ Cl	100 mM	0.5 ml	
NADH rp	160 μ M	0.2 ml	
Extracto rp		<u>0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris-HCl.

La mezcla de todos los componentes, excepto el NADH, se incubó a 30°C por 2 minutos, iniciándose entonces la reacción con el NADH. Se trazó una gráfica de la disminución de la absorbencia a 340 nm en función del tiempo; se usó solo la parte lineal de la gráfica (ver figs. 2.7 y 2.8).

Al valor de cada muestra se le restó el de su blanco respectivo; para obtener este blanco, en la mezcla de reacción se substituyó al 2-oxoglutarato y al NH₄Cl por un volumen equivalente de Tris-HCl.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NADH transformados por minuto. La actividad específica se expresó como la velocidad de la reacción por mg de proteína.

II.2.5.4. Actividad enzimática de la GDH-NAD⁺.

Se determinó por el método de Loyola (168). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tris-HCl	100 mM	2.2 ml, 2.1 ml, 2.0 ml	pH 9.4
Glu-Na	60 mM	0.5 ml	pH 7.0
β -NAD rp	600 μ M	0.2 ml	pH 8.0
Extracto rp		<u>0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris.

La mezcla de todos los componentes, excepto el β -NAD, se incubó a 30°C por 2 minutos, la reacción se inició con el β -NAD. Se trazó una gráfica del incremento en la absorbencia a 340 nm respecto al tiempo; se usó solo la parte lineal de la gráfica (ver figs. 2.9 y 2.10).

Al valor de cada muestra se le restó el de su respectivo blanco (el Glu-Na se substituyó por su volumen de Tris).

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD⁺ transformados por minuto; la actividad específica fue la velocidad de la reacción por mg de proteína.

II.2.6. Determinación de proteínas.

Se siguió la técnica de Peterson (170). Las determinaciones se hicieron con 0.1 y 0.2 ml de extracto crudo. Se elaboró una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA) de 10-100 $\mu\text{g/ml}$ (fig 2.11). El procedimiento a seguir para la curva patrón y las muestras fue el mismo:

Reactivo A. Mezclar volúmenes iguales de:

- Solución básica de cobre-tartrato-carbonato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.1%, Na_2CO_3 al 10% y $\text{KC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 0.2%)
- NaOH 0.8 N
- Dodecil sulfato de sodio al 10%
- Agua destilada

Reactivo B:

Un volumen de reactivo de Folin-ciocalteau se mezcla con 5 volúmenes de agua destilada.

La técnica empleada fue la siguiente:

A la muestra más agua destilada ($V_{\text{final}} = 1 \text{ ml}$) se le añade 0.1 ml de desoxicolato de sodio al 0.15%, se agita y se deja reposar 10 minutos en hielo.

Se agregan 0.1 ml de ácido tricloroacético al 72%, previamente enfriado y se deja en hielo durante 20 minutos.

Se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos, se desecha el sobrenadante y se dejan escurrir los tubos.

Se agrega 1 ml de agua destilada a la pastilla y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Se añade 1 ml del reactivo A, se agita y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Se agregan 0.5 ml del reactivo B, se agita y se deja formar color por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se lee la absorbencia a 750 nm.

II.2.7. Determinación de aminoácidos (glutamato).

Se empleó la técnica de Cocking (171). Las determinaciones se hicieron por duplicado, con 25 y 50 μl de extracto. Se elaboró una curva patrón con ácido glutámico de 5-50 $\mu\text{g/ml}$ (fig 2.12). El procedimiento seguido para la curva patrón y las muestras fue el mismo.

Solución A:

2.1008 g de ácido cítrico monohidratado se disuelven en 20 ml de NaOH al 4%, se añaden 0.08 g de SnCl_2 y se afora a 50 ml.

Reactivo de ninhidrina:

A 10 ml de la solución A se le añaden 0.4 g de ninhidrina previamente disuelta en 10 ml de metilcelosolve (etilen glicol monometil éter). Debe usarse recién preparado.

La técnica fue la siguiente:

A la muestra más agua destilada (V. final=1 ml) se le agrega 1 ml del reactivo de ninhidrina y se pone a ebullición por 30 minutos, tapando los tubos para evitar la evaporación.

Se deja enfriar y se añaden 2.5 ml de isopropanol al 50%.

Se agita y se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Se lee la absorbencia a 570 nm.

II.2.8. Determinación de nitratos.

Se siguió la técnica de Nicholas y Nason (172). Las determinaciones se hicieron con 5 y 10 μl de extracto. Se elaboró una curva patrón con KNO_3 de 5-25 $\mu\text{g/ml}$ (fig 2.13). Las muestras se procesaron de igual manera que la curva patrón:

A la muestra más agua destilada (V. final=1.5 ml) se le añaden 0.1 ml de ácido amidosulfónico al 10% (rp). Se agita y se deja reposar 2 minutos.

Se añaden 0.4 ml de ácido perclórico al 20 % p/v . Se lee la absorbancia a 210 nm, debe agitarse la mezcla antes de leer.

II.2.9. Determinación de nitritos.

Se empleó la técnica de Nicholas y Nason (172). Las determinaciones se hicieron con 0.1 y 0.2 ml de extracto. La curva patrón fue con NaNO_2 de 2-10 nmoles/ml (fig. 2.14). El ensayo de las muestras y la curva patrón fue el mismo:

A la muestra más agua destilada (V. final=1 ml) se le agrega 1 ml de sulfanilamida al 1% p/v en HCl 1.5 N .

La mezcla se agita y se añade 1 ml de naftilendiamina al 0.02% (rp). Se agita nuevamente y se lee la absorbancia a 540 nm después de 10 minutos.

II.2.10. Determinación de amonio.

Se efectuó por el método del indofenol (173). Las determinaciones se hicieron con 0.1 y 0.2 ml de extracto. Se elaboró una curva patrón con NH_4Cl de 5-50 μM (fig. 2.15). El procedimiento seguido para las muestras y la curva patrón fue el mismo:

Solución A: fenol 0.106 M + nitroprusiato de sodio 0.17 mM .

Solución B: NaOH 0.125 N + hipoclorito de sodio 11 mM .

A la muestra + agua destilada (V. final=2 ml) se le agregan 5 ml de la solución A. Se agita y se añaden 5 ml de la solución B.

Se agita nuevamente y se deja desarrollar color por 30 minutos. Se lee la absorbancia a 575 nm, agitar antes de leer.

Fig. 2.1. Curva patrón de γ -glutamil-hidroxamato
 $y = 0.04282 (x) + 0.00576$ $r^2 = 0.9926$

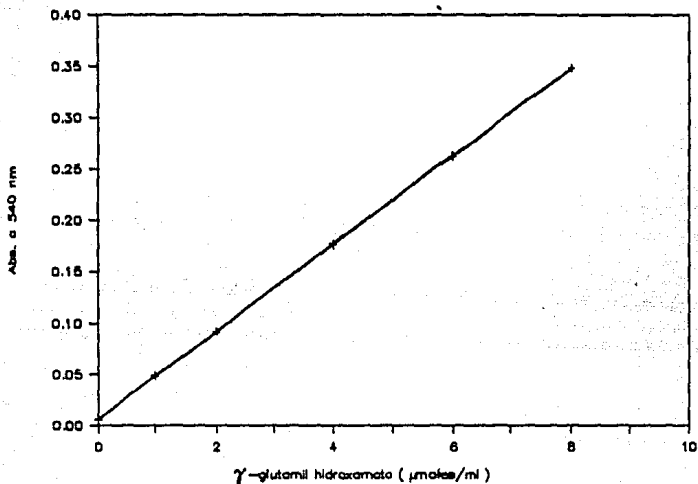
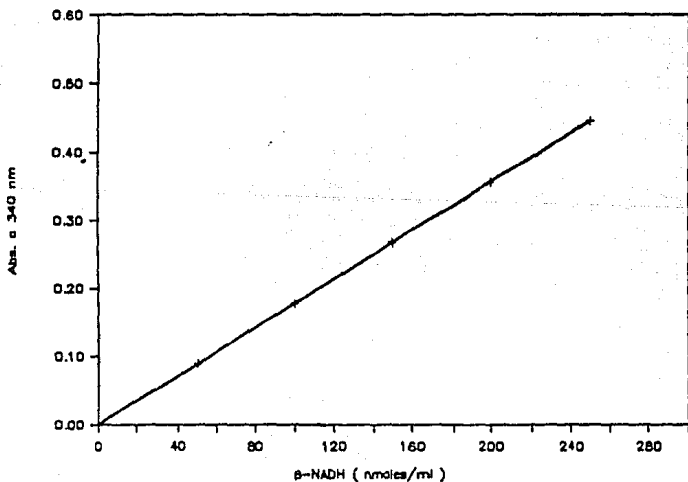


Fig. 2.2. Curva patrón de NADH
 $y = 0.00138 (x) - 0.00057$ $r^2 = 0.9974$



GS

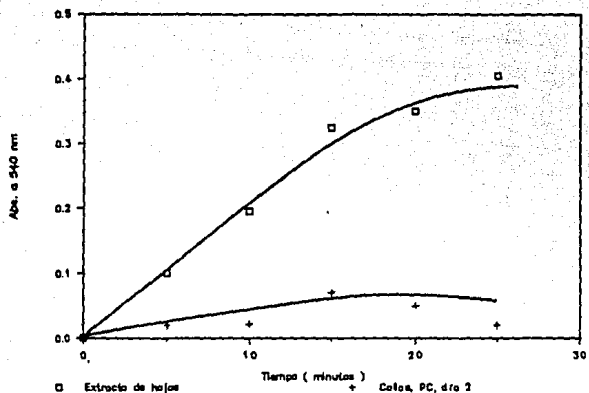


Fig. 2.3. Linearidad de la reacción de la GS respecto al tiempo. El volumen de extracto se mantuvo constante (0.2 ml).

GS

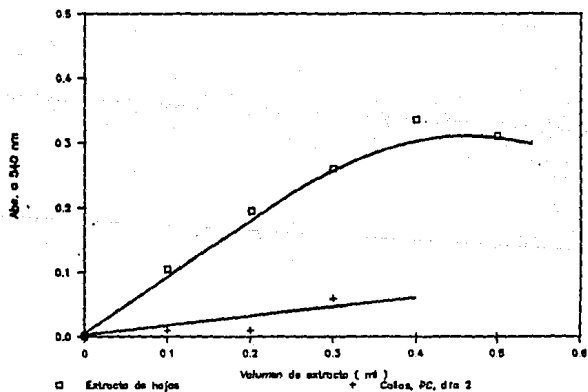


Fig. 2.4. Linearidad de la reacción de la GS respecto al volumen de extracto enzimático (10 minutos de incubación)

GOGAT-NADH

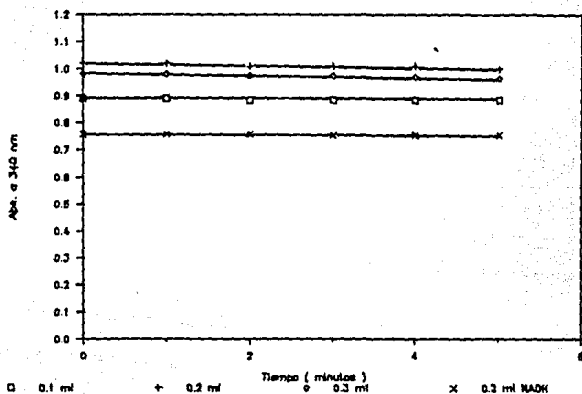


Fig. 2.5. Linearidad de la reacción de la GOGAT respecto al tiempo, empleando diferentes volúmenes de extracto de callos del día 10 en medio PC.

GOGAT-NADH

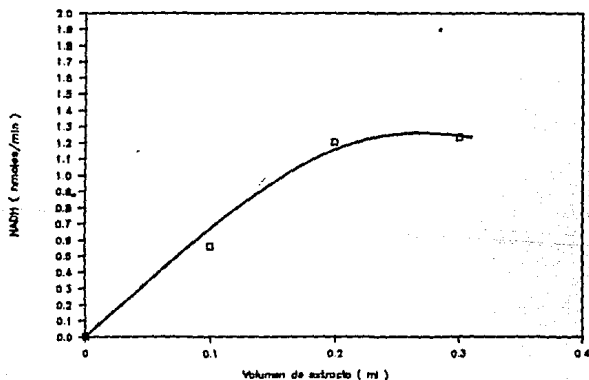


Fig. 2.6. Linearidad de la reacción de la GOGAT respecto al volumen de extracto enzimático. Medio PC, día 10 (5 minutos de incubación).

GDH-NADH

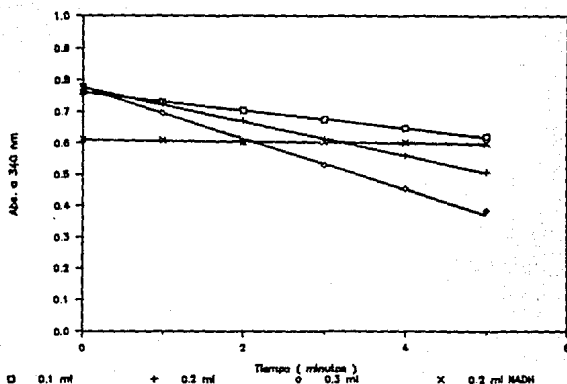


Fig. 2.7. Linealidad de la reacción de la GDH-NADH respecto al tiempo, empleando varios volúmenes de extracto de callos del día 10 en medio PC.

GDH-NADH

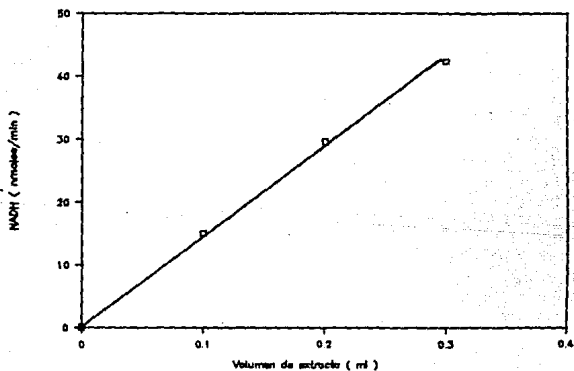


Fig. 2.8. Linealidad de la reacción de la GDH-NADH respecto al volumen de extracto enzimático. Medio PC, día 10 (5 minutos de incubación).

GDH-NAD⁺

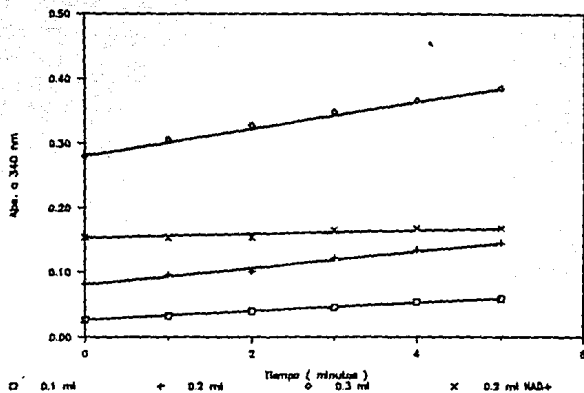


Fig. 2.9. Linearidad de la reacción de la GDH-NAD⁺ respecto al tiempo, empleando varios volúmenes de extracto de callos del día 10 en medio PC.

GDH-NAD⁺

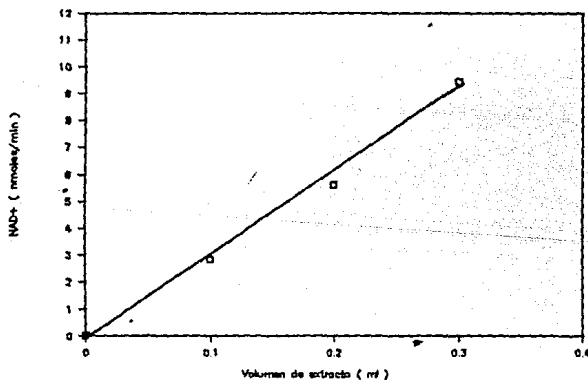


Fig. 2.10. Linearidad de la reacción de la GDH-NAD⁺ respecto al volumen de extracto enzimático. Medio PC, día 10 (5 minutos de incubación).

Fig. 2.11. Curva patrón de proteínas.
 $y = 0.00582 (x) + 0.0074$ $r^2 = 0.9903$

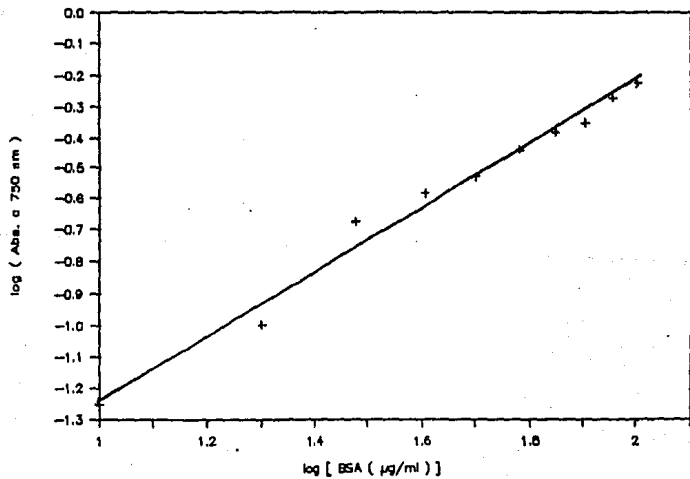
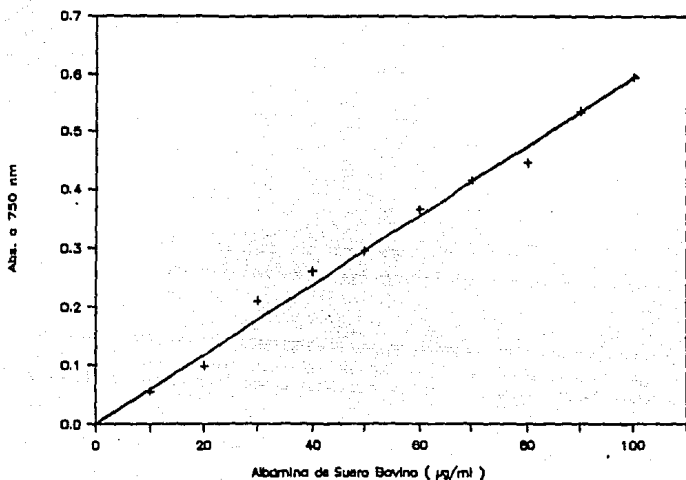


Fig. 2.12. Curva patrón de glutámico
 $y = 0.031(x) + 0.0124$ $r^2 = 0.9903$

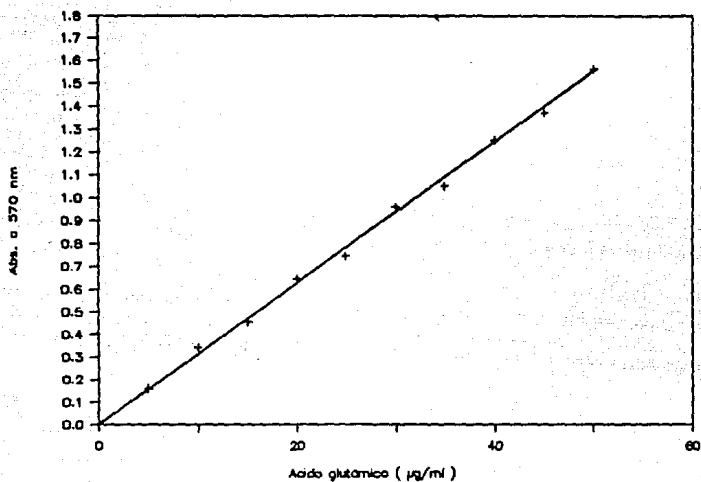


Fig. 2.13. Curva patrón de nitratos.
 $y = 0.03748(x) + 0.1196$ $r^2 = 0.9935$

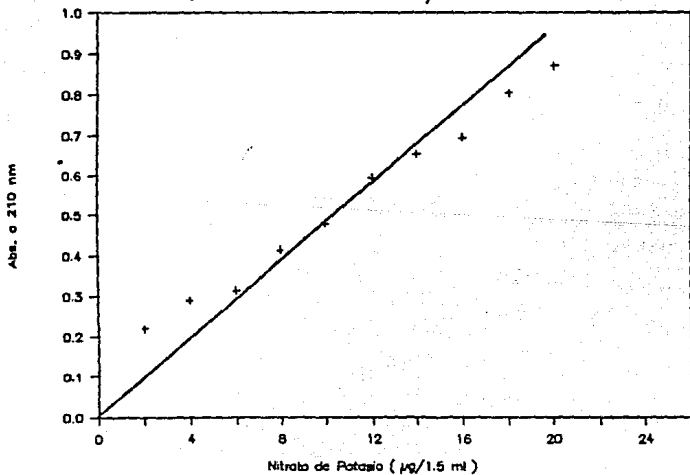


Fig. 2.14. Curva patrón de nitritos
 $y = 0.0136 (x) + 0.0073$ $r^2 = 0.9921$

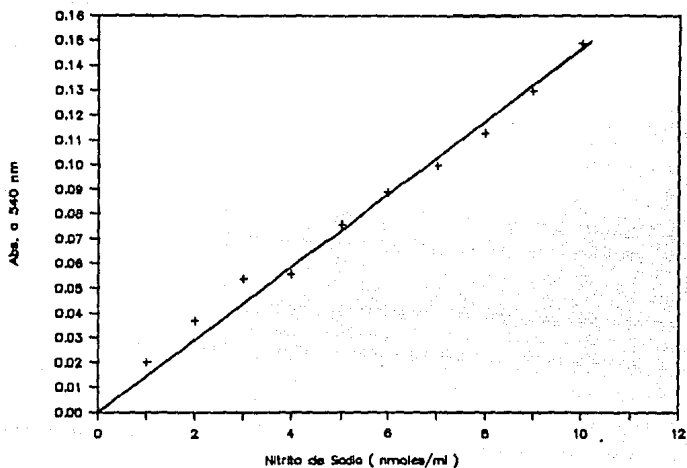
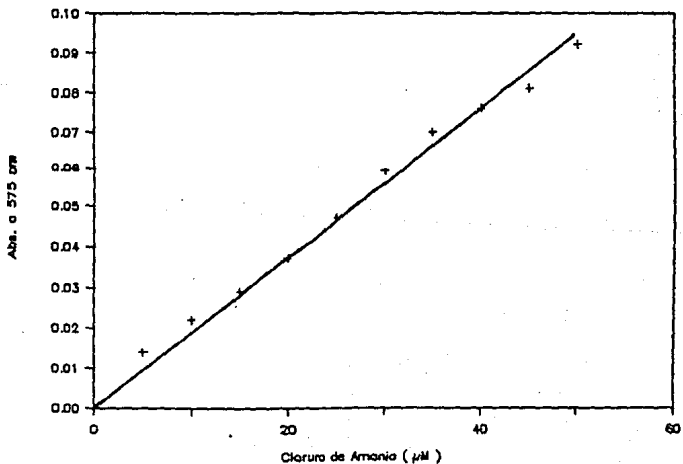


Fig. 2.15. Curva patrón de amonio
 $y = 0.0018 (x) + 0.0045$ $r^2 = 0.9938$



III. RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1. Curvas de Crecimiento.

Se determinó la curva de crecimiento de los callos de *Catharanthus roseus* en el medio PC con diferentes fuentes de nitrógeno (figs. 3.1 y 3.2). El ciclo de crecimiento tuvo una duración de 20 días. El crecimiento en las 3 fuentes nitrogenadas presentó típicamente una fase lag, comprendida entre los días cero y 2; una fase de crecimiento exponencial, del día 4 al 14 y una fase estacionaria a partir del día 16.

El máximo aumento en peso fresco fue del 441% y se observó a los 18 días en el medio PC. Cabe hacer notar que el ciclo de crecimiento de *C. roseus* en el medio de Murashige y Skoog, adicionado con 3 ppm de AIA y 6-BAP tiene también una duración de 20 días, con un máximo aumento en peso fresco del 100% a los 16 días (25).

En la fig. 3.1 se presenta el aumento en peso fresco de los callos cultivados en las 3 fuentes nitrogenadas; cada punto de la gráfica es el promedio de 6 determinaciones independientes. Como puede verse el mayor aumento en peso fresco se presentó en el medio PC, el cual como ya se mencionó contiene nitrato y amonio en forma balanceada. Un aumento menor se observó en el medio con NO_3^- , 20 mM mientras que en NH_4^+ 2 mM el crecimiento fue muy escaso, menor al 100%.

A diferencia de lo anterior, en la fig. 3.2 se observa que el medio con nitrato presentó un aumento en peso seco muy similar al del medio PC, lo cual significa que los callos de *C. roseus* pueden crecer bien tanto en una mezcla de NO_3^- y NH_4^+ (medio PC), como en NO_3^- únicamente. No obstante, como se aprecia en la fig. 3.1, la mezcla de nitrato más amonio es más adecuada para el cultivo de el callo ya que produce un mayor aumento en peso fresco. Por otro lado, el menor aumento en peso fresco observado en el medio con nitrato, respecto al control, sugiere que la absorción de agua se

ve disminuída de alguna manera en las células que crecen sobre nitrato.

Los callos no crecieron bien en el medio con amonio 2 mM, debido probablemente a una disminución en el pH del medio, como se ha reportado en otras especies (39, 49, 53, 57).

Además de la disminución del crecimiento en el medio con amonio como única fuente de nitrógeno, se observó que los callos, originalmente de color verde, adquirieron un color blanco-amarillo en este medio; este cambio no se observó en las otras 2 fuentes nitrogenadas. Se sabe que el amonio es tóxico y no puede ser acumulado sin daño a la célula. A relativamente bajas concentraciones, este ion desacopla los sistemas de transporte de electrones y promueve la oxidación de los nucleótidos de piridín (66). Es factible que al desacoplar la fotosíntesis el amonio, se favorezca la acumulación de radicales libres (generados por la luz), los cuales pueden romper moléculas con enlaces insaturados, tales como pigmentos, lípidos, etc. (Dr. E. Murillo, comunicación personal). Por lo tanto es posible que en los callos que perdieron su color verde se haya presentado una desdiferenciación de los plastos.

La variación del crecimiento de los callos, medido como aumento en peso fresco y seco se reflejó en la variación de la concentración de proteínas durante el ciclo de crecimiento (fig. 3.7). Los máximos en la poza de proteínas corresponden a la fase exponencial media (día 10) y al inicio de la fase estacionaria (días 16-18). Como puede verse, aunque la variación de la poza de proteínas es diferente en las 3 fuentes nitrogenadas, en el medio control y en nitrato se mantuvo un nivel similar, mientras que en el medio con amonio el nivel de esta poza fue inferior al de las otras fuentes nitrogenadas.

III.2. Enzimas del metabolismo del nitrógeno.

Se determinó la variación de la actividad de las enzimas GDH, GS y GOGAT en homogenados de callo durante el ciclo de crecimiento.

El patrón de actividad de la GDH se muestra en las figs. 3.3. y 3.4; los resultados son el promedio de 3 determinaciones. Tanto en sentido aminativo (fig. 3.3.) como desaminativo (fig. 3.4), se detectó la mayor actividad en el medio PC con amonio 2 mM. Esta estimulación de la actividad de la GDH por el amonio se ha reportado ya en cultivos *in vitro* de maíz (165) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia*) (174), así como en numerosos tejidos vegetales (105, 142, 149-152).

El comportamiento de la GDH aminativa fue muy similar en el medio PC y en el medio PC con nitrato, excepto que en este último la actividad decae después del día 18. En sentido desaminativo la actividad de la GDH en el medio con nitrato fue ligeramente superior a la del control y decae nuevamente después del día 18.

La GDH, en ambos sentidos, presentó 2 picos de actividad en el medio con amonio (días 6 y 12), los cuales corresponden casi al inicio y final de la fase de crecimiento exponencial. En el medio con nitrato se observó solo 1 pico de actividad (días 12-14) mientras que en el medio control fueron 2 (días 12-14 y 20). Estos resultados sugieren un papel anabólico de la GDH ya que en las 3 fuentes nitrogenadas uno de los picos de actividad de la enzima coincidió con el final de la fase de crecimiento exponencial, lo cual puede indicar que la GDH contribuye en buena medida para la asimilación del amonio en esos días.

Ya que el glutamato es el producto de la reacción de la GDH, es de esperarse que los picos de actividad de la enzima correspondan a los de la poza de aminoácidos. Como puede verse en la fig. 3.8, en los días de mayor actividad de la GDH se presentaron los máximos en la poza de aminoácidos. No obstante, a

pesar de que la actividad de la GDH se vió estimulada en el medio con amonio, la poza de aminoácidos fue muy similar en el medio PC y en el medio con amonio, mientras que en el medio con nitrato esta poza siempre fue menor. Lo anterior se debe a que la relación de actividad $NADH/NAD^+$ fue muy similar en amonio y en el medio control (tabla 3.1) mientras que en nitrato fue ligeramente inferior.

Tabla 3.1. GDH, relación de actividad $NADH/NAD^+$.

Medio PC	5.912/1*
Nitrato	4.332/1
Amonio	5.634/1

* La relación es el promedio de la actividad del día 2 al día 20.

En la fig 3.5 se observa la variación de la actividad de la GS durante el ciclo de crecimiento; los resultados son el promedio de por lo menos 2 determinaciones. Como puede apreciarse, en general la variación de la actividad de la GS (fig. 3.5) fue similar a la variación de la de GDH (fig. 3.3). No obstante, en algunos días la actividad de la GS no se detectó o permaneció a un nivel muy bajo (días 6 y 10), en contraste con la actividad de la GDH, la cual se mantuvo durante todo el ciclo de crecimiento. Lo anterior es significativo ya que apoya la función de la GDH en la asimilación del amonio.

Al igual que la GDH, la GS presentó un pico de actividad los días 12-14 en las 3 fuentes nitrogenadas. En el medio con amonio la actividad de la GS se mantuvo durante todo el periodo de crecimiento; asimismo, en este medio se observó el pico de mayor actividad, lo cual es lógico si se considera la alta afinidad de la GS por el amonio.

En relación a la GOGAT-NADH, al igual que en el caso de la GS, no se detectó actividad en ciertos días (fig. 3.6). Se esperaba que los máximos de actividad de ambas enzimas fueran similares ya que el producto de la reacción de la GS (glutamina) es uno de los sustratos de la GOGAT; no obstante, esto no fue así. Asimismo, la actividad de esta última enzima mostró un comportamiento irregular ya que en los días en que no se observó actividad de la GS, la actividad de la GOGAT sí fue detectable.

Por otra parte, la variación de la actividad de la GOGAT fue muy parecida en el medio control (mezcla de nitrato y amonio) y en el medio con nitrato 20 mM. Resultados similares se han reportado en callos y células en suspensión de *Bouvardia ternifolia* (55, 174), cultivadas en el medio MS con nitrato 20 mM. Sin embargo, a diferencia de lo reportado en callos de maíz (119, 129), el nitrato no estimuló la actividad de esta enzima en los callos de *Catharanthus roseus*.

III.3. Pozas metabólicas de nitrógeno.

En cada uno de los extractos empleados en las determinaciones enzimáticas se evaluó la variación de la concentración de proteínas, aminoácidos, nitratos, nitritos y amonio; los resultados, expresados por gramo de peso fresco y peso seco, son el promedio de 2 determinaciones independientes.

Bajo las condiciones de ensayo no fue posible detectar el nivel de amonio en ninguno de los extractos aún cuando se emplearon volúmenes de extracto de hasta 2 ml. Lo anterior indica que el amonio libre intracelular no está presente en los callos o se encuentra a concentraciones menores de 5 μ M (la curva patrón

empleada comprendió el rango 5-50 μ M). El hecho de que no se detectara al amonio en los cultivos, puede indicar que este ion es reasimilado muy eficientemente, sobre todo si se considera que los callos (en el medio PC y en nitrato) son verdes.

Analizando las figs. 3.7 y 3.8 puede verse que el comportamiento de la poza de proteínas y aminoácidos fue similar en base a peso fresco y peso seco. En general un aumento en la concentración de aminoácidos redundó en un aumento en la poza de proteínas. De este modo, los picos de los días 6 y 14 en la poza de aminoácidos del medio PC, fueron seguidos de dos picos en la poza de proteínas, los días 10 y 16 respectivamente.

Es interesante hacer notar que el nivel de la poza de proteínas y aminoácidos al inicio y final del ciclo de crecimiento presentó algunas diferencias en las 3 fuentes nitrogenadas. En el medio PC ambas pozas se incrementaron ligeramente hacia el final del período, mientras que en el medio con nitrato mantuvieron el mismo nivel y disminuyeron en el medio con amonio. Lo anterior recuerda el patrón de crecimiento observado en la fig. 3.1.

En la fig. 3.8 se observa que el nivel de la poza de aminoácidos en el medio con nitrato siempre fue menor que el del medio con amonio, tanto en base a peso fresco como a peso seco; a diferencia de la poza de proteínas (fig. 3.7), la cual mostró un nivel más alto en el medio con nitrato. Esta diferencia se explica por el mayor aumento en peso fresco y peso seco observado en el medio con nitrato en relación al medio con amonio (figs. 3.1 y 3.2), así como por la diferente relación de actividad de la GDH en estos dos medios (tabla 3.1).

Por otra parte, los máximos en la poza de proteínas, los días 16 (en el medio PC) y 18 (en el medio con amonio), coincidieron

con los niveles más bajos observados en la poza metabólica de nitratos (fig. 3.9). Esto es comprensible, ya que la fuente original del nitrógeno orgánico es el NO_3^- , el cual como se recordará (ver sección de antecedentes) es transformado hasta amonio por acción de la nitrato y de la nitrito reductasa.

En las figs. 3.9 y 3.10 se muestran las pozas de nitratos y nitritos respectivamente. Como puede verse, el nivel y la variación de ambas pozas fue similar en las 3 fuentes nitrogenadas; la presencia de estos iones en los cultivos crecidos en amonio se explica por el hecho de que los callos se habían mantenido antes en el medio PC (el cual contiene NO_3^- y NH_4^+) y las células de éstos almacenan nitrato en sus vacuolas.

En relación a la poza de nitritos, se observó poca variación en las 3 fuentes nitrogenadas (fig. 3.10a); en general, el nivel de esta poza se mantuvo constante durante el crecimiento de los cultivos, a excepción de un pico el día 14 en el medio con nitrato. En el medio PC, tanto la poza de nitratos (fig. 3.9b), como la de nitritos (fig. 3.10b) presentaron los niveles más altos en base a peso seco, así como varios picos.

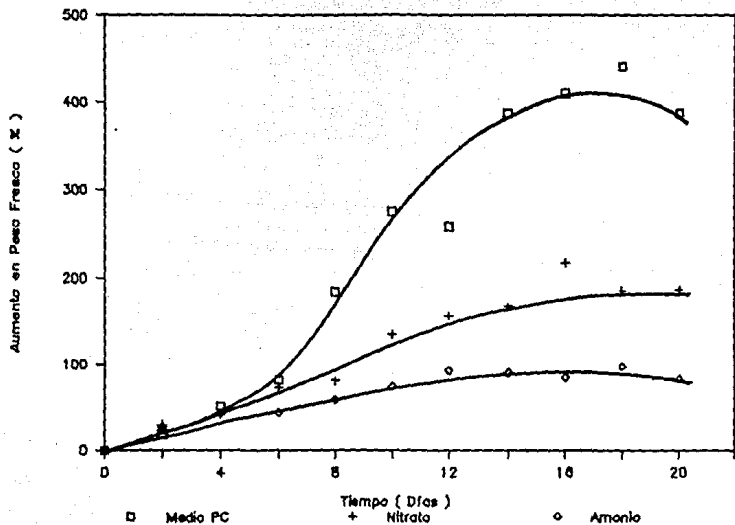


Fig. 3.1. Curva de crecimiento de *Catharanthus roseus* en medio PC con diferentes fuentes de N. Luz continua y T= 25°C.

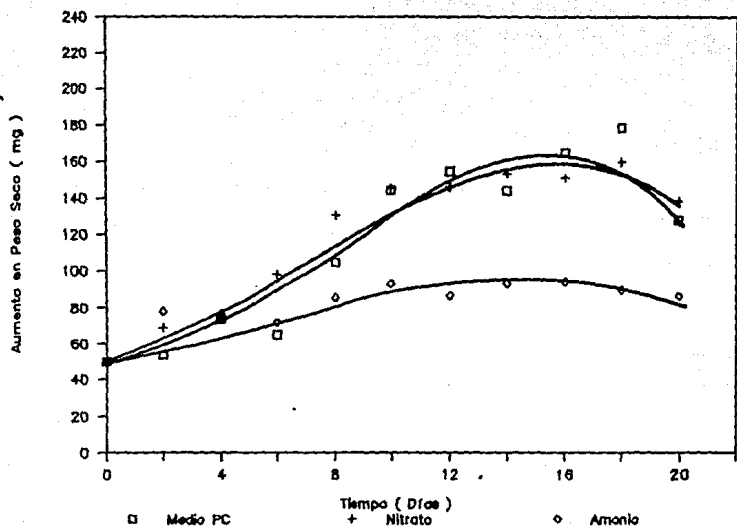


Fig. 3.2. Curva de crecimiento de *Catharanthus roseus* en medio PC con diferentes fuentes de N. Luz continua y $T=25^{\circ}\text{C}$.

GDH-NADH

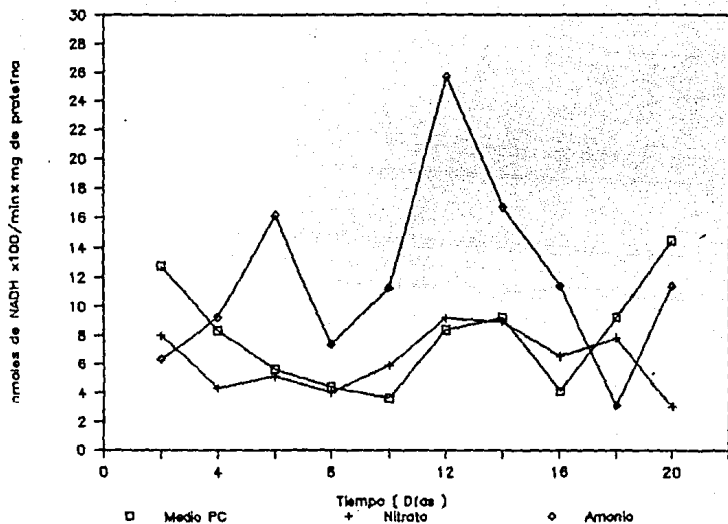


Fig. 3.3. Actividad específica de la GDH-NADH durante el ciclo de crecimiento en medio PC con diferentes fuentes de nitrógeno.

GDH-NAD⁺

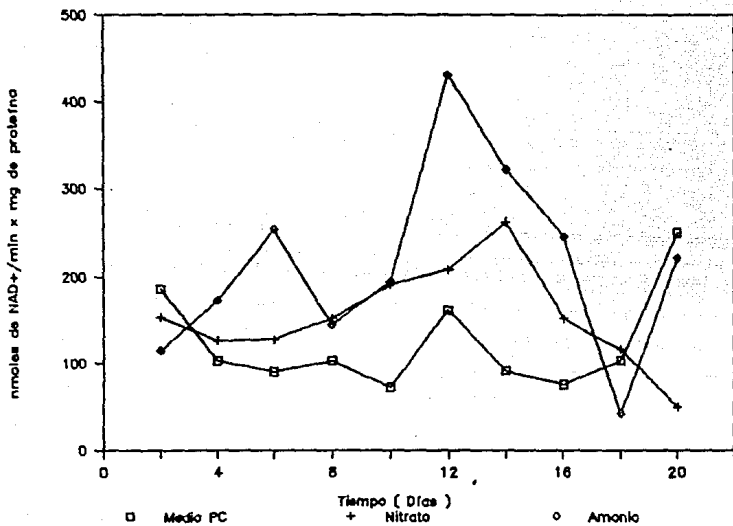


Fig. 3.4. Actividad específica de la GDH-NAD⁺ a lo largo del ciclo de crecimiento, bajo diferentes fuentes de nitrógeno.

GS

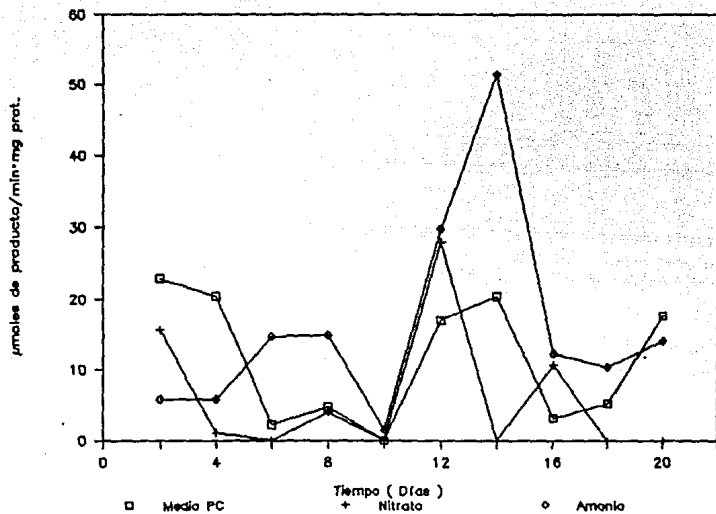


Fig. 3.5. Variación de la actividad específica de la GS durante el ciclo de crecimiento en medio PC con diferentes fuentes de nitrógeno.

GOGAT-NADH

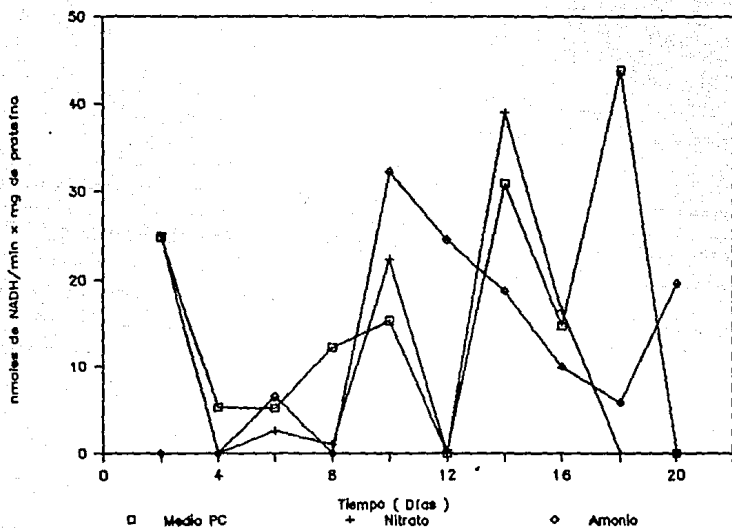


Fig. 3.6. Variación de la actividad específica de la GOGAT-NADH a lo largo del ciclo de crecimiento en medio PC con diferentes fuentes de nitrógeno.

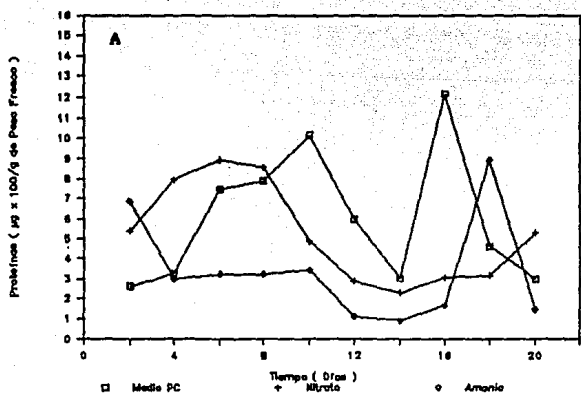
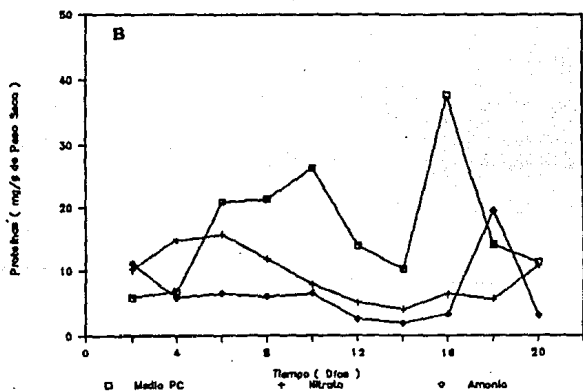


Fig. 3.7 Variación de la poza de proteínas durante el ciclo de crecimiento, por gramo de tejido fresco (A) y seco (B).



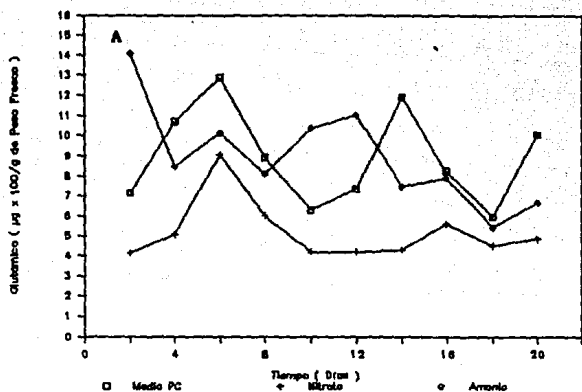
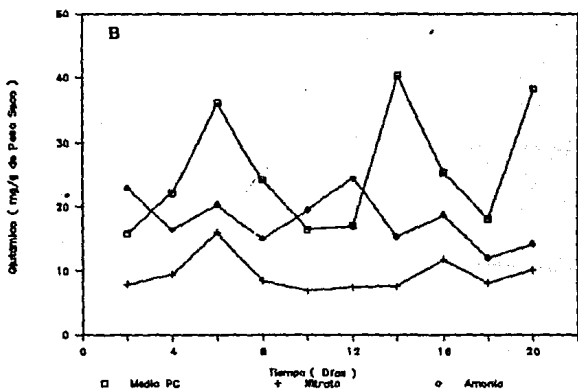


Fig. 3.8. Variación de la poza de aminoácidos (ácido glutámico) durante el ciclo de crecimiento, en base a peso fresco (A) y peso seco (B).



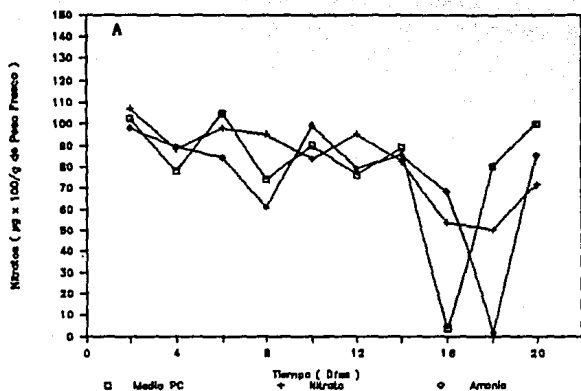
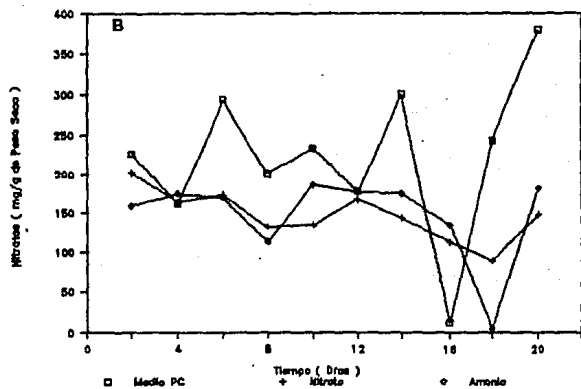


Fig. 3.9. Variación de la poza de nitratos durante el ciclo de crecimiento, en base a peso fresco (A) y peso seco (B).



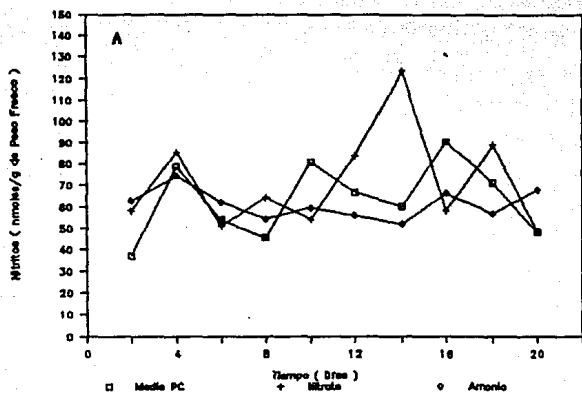
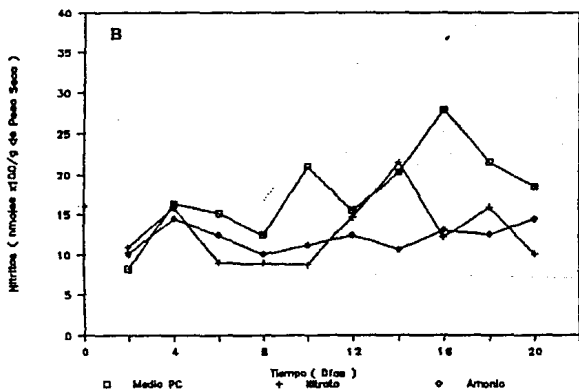


Fig. 3.10. Variación de la poza de nitritos a lo largo del ciclo de crecimiento, por gramo de peso fresco (A) y seco (B)



CONCLUSIONES.

1) Se logró determinar que los callos de *Catharanthus roseus* crecen bien tanto en una mezcla de nitrato y amonio (medio PC) como en nitrato únicamente (medio PC con NO_3^- 20 mM); el máximo aumento en peso fresco observado fue de 441% en el medio PC.

2) En el medio con nitrato se registró un menor aumento en peso fresco respecto al control, mientras que en ambos medios el aumento en peso seco fue muy similar; sugiriendo esto que en las células que crecen sobre nitrato opera un mecanismo que limita la absorción de agua.

3) Los resultados mostraron que en los callos de *C. roseus* se encuentran presentes tanto la ruta GS/GOGAT como la de GDH. No obstante, se encontró evidencia que apoya el papel de la GDH en la síntesis del glutamato más que en su degradación, como lo demuestra el hecho de que tanto la GS como la GDH presentaran el mismo pico de actividad hacia el final de la fase de crecimiento exponencial y que en los días en que la GS no presentó actividad, la de GDH sí fue detectable.

4) Se pudo observar que el amonio 2 mM estimula la actividad de la GDH, tanto en sentido aminativo como desaminativo.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
- 2.- Loyola-Vargas, V. M. y J. Reyes. (1985). El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. En: El cultivo de tejidos vegetales en México. M. L. Robert y V. M. Loyola compiladores. CICY/Conacyt. México. pp. 125-132.
- 3.- Staba, E. J. (1982). Production of useful compounds from plant tissue cultures. In: *Plant Tissue Culture*. A. Fujiwara ed. Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo. pp. 23-30.
- 4.- Dougall, D. K. (1981). Tissue Culture and the study of secondary (natural) products. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. V. 7. Secondary Plant Products. P. K. Stumpf and E. E. Conn eds. Academic Press. New York. pp. 21-34.
- 5.- Romero-Castillo, P. (1984). Biosíntesis y farmacología de los alcaloides de Catharanthus roseus, derivados del indol. Revisión bibliográfica, tesis de licenciatura (QFB). Fac. de Química, UNAM.
- 6.- Patterson, B. D. and D. P. Carew. (1969). Growth and alkaloid formation in Catharanthus roseus tissue cultures. *Lloydia*, 32: 131-140.
- 7.- Stöckigt, J. and J. Soll. (1980). Indole alkaloids from cell suspension cultures of Catharanthus roseus and C. ovalis. *Planta medica*, 40: 22-30.
- 8.- Petiard, V. and D. Courtois. (1983). Recent advances in research for novel alkaloids in Apocynaceae tissue cultures. *Physiol. Veg.*, 21: 217-227.
- 9.- Miura, Y., K. Hirata and N. Kurano. (1987). Isolation of vinblastine in callus culture with differentiated roots of Catharanthus roseus (L.) G. Don. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 611-622.
- 10.- Doller, G., A. W. Alferman and E. Reinhard. (1976). *Planta Medica*, 30: 14-20.
- 11.- Zenk, M. H., H. El-Shagi, H. Arens, J. Stöckigt, E. W. Weiler and B. Deus. (1977). Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. In: *Plant Tissue Culture and its biotechnological application*. W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk eds. Springer. Berlin. pp. 27-43.
- 12.- Knobloch, K. H., G. Bastand and J. Berlin. (1982). *Phytochem.*, 21: 591-594.
- 13.- Merillon, J. M., M. Rideau and J. C. Chenieux. (1984). Influence of sucrose on levels of Ajmalicine, Serpentine and Tryptamine in Catharanthus roseus cells in vitro. *Planta Medica*, 50: 497-500.

- 14.- Sasse, F., K. Knobloch and J. Berlin. (1982). Induction of secondary metabolism in cell suspension cultures of Catharanthus roseus, Nicotiana tabacum and Peganum harmala. In: Plant tissue culture. A. Fujiwara ed. Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo. pp. 343-344.
- 15.- Krueger, R. J. and D. P. Carew. (1978). *Lloydia*, 41: 327-337.
- 16.- Carew, D. P. and R. J. Krueger. (1977). *J. Nat. Prod.*, 4: 326-336.
- 17.- Maurel, B. and A. Pareilleux. (1985). Effect of carbon dioxide on the growth of cell suspensions of Catharanthus roseus. *Biotechn. Lett.*, 7: 313-318.
- 18.- Maurel, B. and A. Pareilleux. (1986). Carbon dioxide fixation and growth of heterotrophic cell suspensions of Catharanthus roseus. *J. Plant Physiol.*, 122: 347-356.
- 19.- Hegarty, P. K., N. J. Smart, A. H. Scragg and M. W. Fowler. (1986). The aeration of Catharanthus roseus L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: The inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. *J. Experim. Bot.*, 37: 1911-1922.
- 20.- Ducos, J. P. and A. Pareilleux. (1986). Effect of aeration rate and influence of pCO₂ in large-scale cultures of Catharanthus roseus cells. *Appl. Microb. and Biotech.*, 25: 101.
- 21.- Frischknecht, P., M. Bättig and T. Baumann. (1987). Effect of drought and wounding stress on indole alkaloids formation in Catharanthus roseus. *Phytochem.*, 28: 707-710.
- 22.- Gómez-Noriega, I. (1984). Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el metabolismo nitrogenado y el contenido de alcaloides de Catharanthus roseus. Tesis de licenciatura (QFB). Fac. de Química, UNAM.
- 23.- López-Baeza, M. E. (1984). Variación de la nitrato y nitrito reductasa y el contenido de alcaloides por influencia en los cambios de fuente de nitrógeno en Catharanthus roseus. Tesis de licenciatura (QFB). Fac. de Química, UNAM.
- 24.- Loyola-Vargas, V. M., I. Gómez, M. E. López, J. Reyes, M. Fierro and M. L. Robert. (1986). Changes in the activity of the enzymes involved in nitrogen metabolism in Catharanthus roseus depending on different nitrogen sources. *Can. J. Bot.*, 64: 2052-2056.
- 25.- Velazco-Rodriguez, M. del C. (1987). Actividad de las enzimas del metabolismo nitrogenado y contenido de alcaloides durante el ciclo de crecimiento de cultivos *in vitro* en Catharanthus roseus. Tesis de licenciatura (QFB). Fac. de Química, UNAM.

26.- Taylor, M. and R. N. Farnsworth. (1975). The Catharanthus alkaloids. M. Dekker ed. New York.

27.- Waizel-Bucay, J. (1979). Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de tres especies de plantas con propiedades anticancerígenas. México. CCH, UNAM.

28.- Farnsworth, R. N. (1961). The pharmacognosy of the periwinkles: Vinca and Catharanthus. *Lloydia*, 24: 105-138.

29.- Jara-Reyes, S. (1981). Vinca rosea, su posible interés farmacéutico. Revisión bibliográfica 1970-1979, tesis de licenciatura (QFB). Fac. de Química, UNAM.

30.- Hussey, G. (1980). In vitro propagation. In: Tissue culture methods for plant pathologists. D. S. Ingram and J. P. Helgeson eds. Blackwell Scientific Pub. Great Britain. pp. 51-61.

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

32.- Greeshoff, P. M. (1978). Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured in vitro. In: Phytohormones and related compounds. A comprehensive treatise. V. II. Letham, Goodwin and Higgins eds. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 1-29.

33.- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk. (1981). Plant tissue culture methods and applications in agriculture. T. A. Thorpe ed. Academic Press, Inc. New York. pp. 170-172.

34.- Murashige, T. (1973). Somatic plant cells. In: Tissue culture. Methods and applications. P. K. Kruse Jr. and M. K. Patterson Jr. eds. Academic Press, Inc. pp. 170-172.

35.- IAPTC. (1982). Plant tissue culture. A. Fujiwara ed. Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo. pp. 405-442.

36.- Oaks, A. (1974). The regulation of nitrate reductase in suspension cultures of soybean cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 372: 122-126.

37.- Bechrend, J. and R. I. Mateles. (1975). Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of aminoacids on growth. *Plant Physiol.*, 58: 584-589.

38.- Filner, P. (1966). Regulation of the nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 118: 29-310.

39.- Wheterell, D. F. and D. K. Dougall. (1976). Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.*, 37: 97-103.

40.- Maretzki, A., L. G. Nickell and M. Thom. (1969). Arginine in growing cells of sugarcane. Nutritional effects, uptake and incorporation into proteins. *Physiol. Plant.*, 22: 827-839.

41.- Bergmann, L., W. Grosse and P. Koth. (1976). Influence of ammonium and nitrate on N-metabolism, malate accumulation and malic enzyme activity in suspension cultures of Nicotiana tabacum. *Z. Pflanzenphysiol.*, 80: 60-65.

42.- Mohanty, B. and J. Fletcher. (1976). Ammonium influence on the growth and nitrate reductase activity of Paul's scarlet rose suspension cultures. *Plant Physiol.*, 58: 152-155.

43.- Jones, R. W., A. J. Abbott, E. J. Hewitt, D. M. James and G. R. Best. (1976). Nitrate reductase activity and growth in Paul's scarlet rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum. *Planta*, 133: 27-34.

44.- Fukunaga, Y., J. King and J. J. Child. (1976). The differential effects of TCA-cycle acids on the growth of plant cells cultured in liquid media containing various nitrogen sources. *Planta*, 130: 199-202.

45.- Gamborg, O. L. (1970). The effects of aminoacids and ammonium on the growth of plant cells in suspension cultures. *Plant Physiol.*, 45: 372-375.

46.- Fukunaga, Y. and J. King. (1982). The effect of L-amino acids on the growth and nitrate reductase activity in cultured cells of Datura innoxia. *Plant Sci. Lett.*, 24: 45-54.

47.- Jessup, W. and M. W. Fowler. (1976). Interrelationships between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. I. Effects of glutamate and nitrate as alternative nitrogen sources on cell growth. *Planta*, 132: 119-123.

48.- Sargent, P. A. and J. King. (1974). Investigations of growth-promoting factors in cultured soybean root cells and the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine and aminoacids. *Can. J. Bot.*, 52: 1747-1755.

49.- Bayley, J. M., J. King and O. L. Gamborg. (1972). The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta*, 105: 15-24.

50.- Dunstan, D. I. and K. C. Short. (1977). Improved growth of tissue cultures of Allium cepa. *Physiol. Plant.*, 41: 70-72.

51.- Craven, G. H., R. L. Mott and F. C. Steward. (1972). Solute accumulation in plant cells. IV. Effects of ammonium ions on growth and solute content. *Ann. Bot.*, 36: 897.

52.- Fowler, M. W., R. Watson and I. Lyons. (1982). Substrate utilization, carbon and nitrogen by suspension cultured plant cells. In: *Plant Tissue Culture*. A. Fujiwara ed. Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo. pp. 225-228.

53.- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk. (1970). The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen sources. *Plant Physiol.*, 45: 598-600.

54.- Polacco, J. C. (1976). Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. I. Assimilation of urea. *Plant Physiol.*, 58: 350-357.

55.- Sánchez de J., E. and L. Fernández. (1983). Biochemical parameters to assess cell differentiation of Bouvardia ternifolia schlecht callus. *Planta*, 158: 377-383.

56.- Dougall, D. K. and D. C. Verna. (1978). Growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures with ammonium ion as a sole nitrogen source. *In vitro*, 14: 180-186.

57.- Martin, S. M., D. Rose and V. Hui. (1977). Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. *Can. J. Bot.*, 55: 2838-2843.

58.- Rose, D. and S. M. Martin. (1975). Effect of ammonium on growth of plant cells (Ipomoea sp.) in suspension cultures. *Can. J. Bot.*, 53: 1942-1949.

59.- Veliky, I. A. and D. Rose. (1973). Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 51: 1837-1844.

60.- Sheat, D. E., B. H. Fletcher and H. E. Street. (1959). Studies on the growth of excised roots. VIII. The growth of excised tomato roots supplied with various inorganic sources of nitrogen. *New Phytol.*, 58: 128-141.

61.- Loyola, V. M., E. Sánchez y E. Murillo. (1981). El metabolismo del nitrógeno en las plantas. *Naturalista*, 2: 112-116.

62.- IUB. (1979). Enzyme nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Academic Press. New York.

63.- Hageman, R. H. and A. J. Reed. (1980). Nitrate reductase from higher plants. *Methods in enzymology*, 69: 270-280.

64.- Vega, J., J. Cárdenas and M. Losada. (1980). Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods in enzymology*, 69: 255-270.

65.- Oaks, A. and B. Hirel. (1985). Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 345-365.

66.- Beevers, L. and R. Hageman. (1980). Nitrate and nitrite reduction. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. V. 5. Aminoacids and derivatives. P. K. Stumpf, E. Conn and B. J. Mifflin eds. Academic Press. New York. pp. 115-168.

67.- Tsung, M. K., R. Warner and A. Klien. (1982). In vitro stability of nitrate reductase from barley leaves. *Phytochem.*, 21: 531-533.

68.- Notton, B. A. and E. J. Hewitt. (1979). Nitrogen assimilation of plants. E. J. Hewitt and C. V. Cutting eds. Academic Press. New York. pp. 227-244.

69.- Dalling, N. J., N. E. Tolbert and R. Hageman. (1972). Intracellular location of nitrate reductase. II. Wheat roots. *Biochim. Biophys. Acta*, 283: 513-519.

70.- Klien, N. and H. Garret. (1979). Immune electrophoretic determination in Neurospora crassa. *Analytical Biochem.*, 95: 97-102.

71.- Wray, L. J. and P. Filner. (1970). Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *J. Biochem.*, 110: 715-725.

72.- Ramarao C. S., M. Srinivassan and S. Naick. (1981). Origin of reductant for reduction of nitrate and nitrite in rice and wheat leaves in vivo. *New Phytol.*, 87: 517-525.

73.- Timpo, E. E. and C. A. Neyra. (1983). Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in Phaseolus vulgaris. *Plant Physiol.*, 72: 71.

74.- Zielke, H. and P. Filner. (1971). Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. *J. Bio. Chem. V.*, 6: 1772-1779.

75.- Metha, P. and H. S. Srivastava. (1980). Comparative stability of ammonium and nitrate induced nitrate reductase activity in maize leaves. *Phytochem.*, 19: 2527-2530.

76.- Zink, M. and I. Veliky. (1977). Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductase in cultured Ipomoea spp. cells. *Can. J. Bot.*, 55: 1557-1568.

77.- Radin, J. W. (1975). Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. *Plant Physiol.*, 55: 178-182.

78.- Sanderson, G. W. and E. C. Cocking. (1964). Enzymatic assimilation of nitrate in tomato plants. I. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Physiol.*, 39: 416-422.

79.- Heimer, Y. M. and P. Filner. (1970). Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. Properties of a variant cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, 215: 152.

80.- Fukunaga, Y., J. King and J. Child. (1980). The influence of the TCA cycle acids on nitrate utilization by cultured plant cells. *Plant Sci. Lett.*, 19: 9-19.

81.- Young, M. (1973). Studies on the growth in culture of plants cells. XVI. Nitrogen assimilation during nitrogen-limited growth of Acer pseudoplatanus L. cells in chemostat culture. *J. Exp. Bot.*, 24: 1172-1185.

82.- Harvey, R. G., T. J. Muzik and R. L. Warner. (1973). Differences in nitrogen requirements of two clones of Convolvulus arvensis in vitro. *Am. J. Bot.*, 60: 76-79.

- 83.- Mifflin, B. J. (1974). The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. *Plant Physiol.*, 54: 550-555.
- 84.- Washitani, I. and S. Sato. (1977). Studies on the function of proplastids in the metabolism of *in vitro* cultured tobacco cells. I. Localization of nitrite reductase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.*, 18: 117-125.
- 85.- Lancaster, M., J. Vega and L. Kamin. (1979). Identification of the iron sulfur center of spinach ferredoxin-nitrite reductase as a tetranuclear center and preliminary EPR studies of mechanism. *J. Biol. Chem.*, 254: 1268-1271.
- 86.- Mazakas, S. and G. Tamura. (1981). Some properties of ferredoxin-nitrite reductase from *Spinacia oleracea*. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 1615-1620.
- 87.- Chroboczek-Kelker, H. and P. Filner. (1971). Regulation of nitrate reductase and its relationships to the regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 252: 69-82.
- 88.- Jordan, D. and J. Fletcher. (1979). The relationship between NO₂ accumulation, nitrate reductase and nitrite reductase in suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Plant Sci. Lett.*, 17: 95-99.
- 89.- Stewart, G. R., A. F. Mann and P. A. Fentem. (1980). Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, Glutamine synthetase and Glutamate synthase. In: *Biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. V. 5. P. K. Stumpf and E. E. Conn eds. Academic Press, New York. pp. 271-327.
- 90.- Mc Nally, S. and B. Hirel. (1983). Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Veg.*, 21: 761-774.
- 91.- O'Neal, D. and K. W. Joy. (1973). Localization of glutamine synthetase in chloroplasts. *Nature, New Biol.*, 248: 61-62.
- 92.- Wallsgrave, R. M., R. J. Lea and B. J. Mifflin. (1979). Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.*, 63: 232-236.
- 93.- Susuki, A., P. Gadal and A. Oaks. (1981). Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta*, 151: 457-461.
- 94.- Nato, F., B. Hirel, A. Nato and P. Gadal. (1984). Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: A glycosylated protein. *FEBS Lett.*, 175: 443-446.
- 95.- O'Neal, D. and K. W. Joy. (1974). Glutamine synthetase in pea leaves. Divalent cation effects, substrate specificity and other properties. *Plant Physiol.*, 54: 773-779.

96.- Kanamori, T. and H. Matsumoto. (1972). Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. Biochem. Biophys.*, 152: 404-412.

97.- O'Neal, D. and K. W. Joy. (1975). Pea leaf glutamine synthetase regulatory properties. *Plant Physiol.*, 55:968-974.

98.- Stewart, G. R. and D. Rhodes. (1977). A comparison of the characteristics of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from Lemna minor. *New Phytol.*, 79: 257-268.

99.- Sahulka, J. and L. Lisá. (1980). Effect of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. *Physiol. Plant.*, 50: 32-36.

100.- Duke, S. H., H. Wenzler and W. Koukkan. (1975). The effect of sucrose on glutamate dehydrogenase activity in Lemna perpusilla. *Plant Physiol.*, 56, suppl. 354: 66.

101.- Ratajczak, L., W. Ratajczak and H. Mazurowa. (1981). The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. *Physiol. Plant.*, 51: 277-280.

102.- Sahulka, J. and L. Lisá. (1979). Regulation of glutamine synthetase level in isolated pea roots. I. Differential effects of ammonium salts in sugar-supplied roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 174: 646-652.

103.- Sahulka, J. and A. Gaudinova. (1976). Enhancement of glutamate dehydrogenase activity in excised pea roots by exogenously supplied acids. *Z. Pflanzenphysiol.*, 78: 13-23.

104.- Sahulka, J. (1977). The effect of some ammonium salts on nitrate reductase level, on *in vivo* nitrate reduction and on nitrate content in excised Pisum sativum roots. *Biol. Plant.*, 19: 113-128.

105.- Rhodes, D., G. A. Rendon and G. R. Stewart. (1976). The regulation of ammonia assimilating enzymes in Lemna minor. *Planta (Berl.)*, 120: 203-210.

106.- Evstigneeva, Z. G., K. B. Asseva, N. A. Motchallina and W. L. Kretovich. (1971). Regulation of plant glutamine synthetase by ammonium and nitrate. *Biokhimiia (Moscow)*, 35: 388-393.

107.- Kretovich, W. L. (1978). Regulation of enzymes controlling ammonia metabolism in plants. In: *Regulation of Developmental Processes in plants*. H. R. Schutte and D. Gross eds. Gustav Fischer Verlag. New York. pp. 47-69.

108.- Mc Nally, S. F., B. Hirel, P. Gadal, A. F. Mann and G. R. Stewart. (1983). Glutamine synthetase isoforms in higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.*, 72: 22-25.

109.- Kretovich, W. L., Z. G. Evstigneeva, A. V. Puskin and T. Z. Dzokharidze. (1981). Two forms of glutamine synthetase in leaves of Cucurbita pepo. *Phytochem.*, 20: 625- 629.

110.- Hirel, B., J. Vidal and P. Gadal. (1982). Evidence for a cytosolic dependent light induction of chloroplastic glutamine synthetase in etiolated rice leaves. *Planta*, 155: 17-23.

111.- Taylor, A. A. and G. R. Stewart. (1980). The effect of ammonia and light/dark transitions on the level of glutamine synthetase activity in Osmunda regalis. *Plant Sci. Lett.*, 20: 125.

112.- Mifflin, B. J. and P. Lea. (1977). The pathway of nitrogen assimilation in plants. In: *Progress in Biochemistry*. V. 4. L. Reinhold, J. B. Harborne and T. Swain eds. Pergamon Press, Oxford. pp. 1-26.

113.- Cammaerts, D. and M. Jacobs. (1983). A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of Arabidopsis thaliana. *Planta*, 163: 517-526.

114.- Suzuki, A. and P. Gadal. (1982). Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.*, 69: 848-852.

115.- Mohanty, B. and J. Fletcher. (1980). Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Physiol. plant.*, 48: 453-459.

116.- Skokut, T. (1978). Initial organic products of assimilation of ^{15}N -ammonium and ^{15}N -nitrate by tobacco cells cultured on different sources of nitrogen. *Plant Physiol.*, 62: 299

117.- Dougall, D. K. (1974). Evidencé for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58: 639-646.

118.- Chiu, J. Y. and P. D. Shargool. (1979). Importance of glutamate synthase in glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 63: 409-415.

119.- Loyola-Vargas, V. M. and E. Sánchez de Jiménez. (1986). Regulation of glutamine synthetase/glutamate synthase cycle in maize tissues. Effect of the nitrogen source. *J. Plant Physiol.*, 124: 147-154.

120.- Lea, P. J. and B. J. Mifflin. (1975). The occurrence of glutamate synthase in algae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64: 856-862.

121.- Arima, Y. (1978). Glutamate synthase in rice root extracts and the relationship among electron donors and its activity. *Plant Cell Physiol.*, 6: 955-961.

122.- Beevers, L. and R. Storey. (1976). Glutamate synthase in developing cotyledons of Pisum sativum. *Plant Physiol.*, 57: 862-866.

- 123.- Fowler, M. W., W. Jessup and G. S. Sarkissian. (1974). Glutamate synthetase type activity in higher plants. *FEBS Lett.*, 48: 340-342.
- 124.- Dougall, D. and J. Bloch. (1976). A survey of the presence of glutamate synthase in plant cell suspension cultures. *Can. J. Bot.*, 54: 2924-2927.
- 125.- Chou, K. H. and W. E. Splittstoesser. (1972). Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.*, 40: 550-554.
- 126.- Match, T. and E. Takahashi. (1981). Glutamate synthase in greening pea shoots. *Plant and Cell Physiol.*, 22: 727-731.
- 127.- Harel, E., P. J. Lea and B. J. Miflin. (1977). The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. *Planta*, 134: 195-200.
- 128.- Wallsgrave, R. M., E. Harel and B. J. Miflin. (1977). Studies on glutamate synthetase from the leaves of the higher plants. *J. Exp. Bot.*, 104: 588-592.
- 129.- Rana, P. S. and H. S. Srivastava. (1986). Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.*, 88: 413-416.
- 130.- Davies, D. D. and A. N. Teixeira. (1975). The synthesis of glutamate and the control of glutamate dehydrogenase in pea mitochondria. *Phytochem.*, 14: 647-656.
- 131.- Emes, M. J. and M. W. Fowler. (1979). The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. *Planta*, 144: 247-253.
- 132.- Nesselhut, T. H. and G. Harnischfeger. (1980). Properties of glutamate dehydrogenase of Beta vulgaris. *Physiol. Plant.*, 50: 1-5.
- 133.- Takahashi, Y. and K. Furuhashi. (1980). Properties of glutamate dehydrogenase purified from green tobacco callus tissue. *Plant Cell Physiol.*, 21: 1067-1075.
- 134.- Fawole, M. O. (1977). Glutamate dehydrogenase from Vicia faba. *Can. J. Bot.*, 55: 1850-1856.
- 135.- Fawole, M. O. and D. Boulter. (1977). Purification and properties of glutamate dehydrogenase from Vigna unguiculata (L) Walp. *Planta*, 134: 97-102.
- 136.- Mc Kenzie, E. A. and E. M. Lees. (1981). Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 212: 290-297.
- 137.- Leech, R. M. and P. R. Kirk. (1968). An NADP- dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of Vicia faba. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32: 685-690.

138.- Lea, P. J. and D. A. Thurman. (1972). Intracellular location and properties of plant L-glutamate dehydrogenases. *J. Exp. Bot.*, 23: 440-449.

139.- Gayler, K. R. and W. R. Morgan. (1976). *Plant Physiol.*, 58: 283-287.

140.- Bulen, W. A. (1956). The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 62: 173-183.

141.- Yue, S. B. (1969). Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants. *Plant Physiol.*, 44: 435-437.

142.- Kretovich, V. L., T. Karyakina, V. Yazykova and V. Florenskaya. (1974). Induction of glutamate dehydrogenase by ammonium in lupine seedlings. *USSR Plant Physiol.*, 21: 247-251.

143.- Kretovich, V. L., T. I. Karyakina, V. V. Yazykova and L. I. Sidel'nikova. (1974). Induction of glutamate dehydrogenase by ammonia in the roots of pumpkin seedlings. *Doklady Akademii Nauk. SSSR*, 213: 970-973.

144.- Nash D. T. and M. E. Davies. (1975). Isoenzyme changes during the growth cycle of Paul's scarlet rose cell suspensions. *Phytochem.*, 14: 2113-2118.

145.- Nauen, W. and T. Harmann. (1980) Glutamate dehydrogenase from Pisum sativum L. *Planta*, 148: 7-16.

146.- Pahlich, E. (1972). Sind die multiplen formen der glutamat dehydrogenase aus erbsenkeimlingen conformer. *Planta* (Berlin), 104: 78-88.

147.- Nagel, M. and T. Hartmann. (1980). Glutamate dehydrogenase from Medicago sativa L. Purification and comparative kinetic studies of the organ-specific multiple forms. *Z. Naturforsch.*, 35c: 406-415.

148.- Cammaerts, D. and M. Jacobs. (1983). A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of Arabidopsis thaliana. *Plant Sci. Lett.*, 31: 65-73.

149.- Joy, K. W. (1969). Nitrogen metabolism of Lemna minor. II. Enzymes of nitrate assimilation and some aspects of their regulation. *Plant Physiol.*, 44: 849-853.

150.- Kretovich, V. L., T. I. Karyakina, L. I. Sidel'nikova and G. S. Kaloshina. (1972). Effect of ammonium salts on the isoenzymes of pea seedlings glutamate dehydrogenase. *Doklady Akademii Nauk. SSSR.*, 202: 225-227.

151.- Kretovich, W. L., T. L. Karyakina and L. Y. Sydel'nikova. (1973). Regulation of glutamate dehydrogenase by ammonia in wheat shoot. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, 208: 464-467.

152.- Shepard, D. V. and D. A. Thurman. (1973). Effect of nitrogen source upon the activity of glutamate dehydrogenase of Lemna gibba. *Phytochem.*, 12: 1937-1946.

153.- Barash, I., T. Sadon and H. Mor. (1974). Relationship of glutamate dehydrogenase levels to free aminoacids, amides and ammonia in excised oat leaves. *Plant. and Cell Physiol.*, 15: 563.

154.- Rana, P. S. and H. S. Srivastava. (1982). Glutamate dehydrogenase activity and assimilation of inorganic nitrogen in maize seedlings. *Biochem. Physiol. Pflansen.*, 177: 633-642.

155.- Laurière, C. and J. Daussant. (1983). Identification of the ammonium-dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Physiol. Plant.*, 58: 89-92.

156.- Bayley, J. M., J. King and O. L. Gamborg. (1972). The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta*, 105: 15-24.

157.- Lee, D. W. (1973). Glutamate dehydrogenase isoenzymes in Ricinus communis seedlings. *Phytochem.*, 12: 2631-2634.

158.- Pahlich, E. and Ch. Gerlitz. (1980). Deviations from Michaelis-Menten behaviour of plant glutamate dehydrogenase with ammonium as variable substrate. *Phytochem.*, 19: 11-13.

159.- Furuhashi, K. and Y. Takahashi. (1982). Control of glutamate dehydrogenase from green tobacco callus mitochondria by Ca^{+2} and pH. *Plant Cell Physiol.*, 23: 179-184.

160.- Tischner, R. (1984). Evidence for the participation of NADP-glutamate dehydrogenase in the ammonium assimilation of Chlorella sorokiniana. *Plant Sci. Lett.*, 34: 73-80.

161.- Hartmann, T. and A. Ehmke. (1980). Role of mitochondrial glutamate dehydrogenase in the reassimilation of ammonia produced by glycine serine transformation. *Planta*, 140: 207-208.

162.- Jong, D., E. Jansen and A. Olson. (1967). Oxidoreductive and hydrolytic enzyme patterns in plant suspension culture cells. *Exp. Cell Res.*, 47: 139-156.

163.- Lee, D. and D. Dougall. (1973). Electrophoretic variation in glutamate dehydrogenase and other isoenzymes in wild carrot cells cultured in the presence and absence of 2,4-D. *In vitro*, 8: 347-352.

164.- Arnison, P. and W. Boll. (1975). Isoenzymes in cell cultures of bush bean Phaseolus vulgaris cv. Contender; isoenzymatic changes during the callus culture cycle and difference between stock suspension cultures derived from a single seedling. *Can. J. Bot.*, 53: 261-271.

- 165.- Loyola-Vargas, V. M. and E. Sánchez de Jiménez. (1984) Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.*, 78: 536-540.
- 166.- Phillips, G. C. and G. B. Collins. (1979). *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19: 59-64.
- 167.- Méndez-Zeel, B. M. (1986). Obtención y caracterización de un cultivo fotosintético de Catharanthus roseus. Tesis de licenciatura (QFB). Esc. de Química, Univ. Aut. Yucatán.
- 168.- Loyola-Vargas, V. M. (1983). Metabolismo nitrogenado en Maíz. Tesis doctoral en Ciencias Químicas (Bioquímica). Fac. de Química, División de Estudios de Posgrado, UNAM.
- 169.- Joy, K. W. (1973). Control of glutamate dehydrogenase from Pisum sativum roots. *Phytochem.*, 12: 1031-1040.
- 170.- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83: 346-356.
- 171.- Cocking, E. C. and E. W. Yemm. (1954). Estimation of aminoacids by ninhidrin. *Biochem. J.*, 58: XII.
- 172.- Nicholas, D. J. and A. C. Nason. (1971). Determination of nitrate and nitrite. *Methods of Enzymology*, 23: 491-503.
- 173.- Kaplan, A. (1965). Urea nitrogen and urinary ammonia. *Stand. Methods Clin. Chem.*, 5: 245-256.
- 174.- Murillo, E. and E. Sánchez de Jiménez. (1984). Alternative pathways for ammonium assimilation in Bouvardia ternifolia cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.*, 117: 57-68

APENDICE I.

Nombre común	Nombre científico
Acelga	<i>Beta vulgaris</i>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>
Arroz	<i>Oryza sativa</i>
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i>
Caña de azúcar	<i>Saccharum officinarum</i>
Caupí	<i>Vigna unguiculata</i>
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>
Cebolla	<i>Allium cepa</i>
Chicharo	<i>Pisum sativum</i>
Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i>
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Gualda	<i>Reseda luteoli</i>
Haba	<i>Vicia faba</i>
Jitomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>
Lemna, lentejilla	<i>Lemna minor</i>
Lino	<i>Linum usitatissimum</i>
Lupino, garbancillo	<i>Lupinus luteus</i>
Maíz	<i>Zea mays</i>
Maravilla, pervinca	<i>Catharanthus roseus</i>
Rábano	<i>Amaracia lapathifolia</i>
Ricino, higuerilla	<i>Ricinus communis</i>
Rosa	<i>Rosa spp.</i>
Sicamor, sicomoro	<i>Acer pseudoplatanus</i>
Soya	<i>Glycine max</i>
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>
Trigo	<i>Triticum monococcum</i>
Trompetilla	<i>Bouvardia ternifolia</i>
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>