



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"IZTACALA"

**ACTIVIDAD Y PATRONES ISOENZIMATICOS DE LAS
DESHIDROGENASAS DE ISOCITRATO Y MALATO,
Y CONTENIDO CATIONICO EN HOJAS DE SORGO
CRECIDO EN DIFERENTE CONCENTRACION DE Na Cl**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ROBERTO VELASCO GARCIA

1 9 8 6

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

*A mis padres y hermanos
a quien tan poco he dado
y de quienes tanto he recibido.*

*En especial a mi madre y a
mi hermana Ma. Elena que han
sido firmes pilares en la familia.*

Con amor para
una linda mujer:
R o o f o

Escucho y olvido,
veo y recuerdo,
hago y aprendo.
(Antiguo proverbio chino).

A todas las personas que de
alguna manera contribuyeron
a la formación y estableci-
miento del Plan Modular en
la Carrera de Biología.

A todos mis condiscípulos del
nuevo Plan, quienes con su com-
pañerismo y conocimientos ayuda-
ron a hacer menos difícil esta
actividad siempre grata que es
la del aprendizaje.

*Mi más sincero agradecimiento
a los profesores Angel Durán y
Agustín Vargas por haberme brin-
dado su asesoría en la parte es-
tadística.*

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Ixtacala, bajo la dirección del M. en C. Sergio González Moreno.

I N D I C E

	Página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS.....	7
___ Cultivo de las plantas	7
___ Preparación de los extractos y separación de isoenzimas	8
___ Localización celular de las enzimas	9
___ Concentración de cationes en la hoja.....	11
___ Cinética enzimática.....	11
___ Tratamiento estadístico de los datos.....	12
RESULTADOS Y DISCUSION	13
___ Patrones isoenzimáticos.....	13
___ Localización celular de las isoenzimas.....	16
___ Concentración de NaCl en el medio de crecimiento y patrones isoenzimáticos.....	20
___ Contenido catiónico.....	27
___ Contenido catiónico y actividad enzimática.....	34
CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS.....	48

ABREVIATURAS

<i>Acido Etilendiaminotetracetico</i>	EDTA
<i>Fenazina Metasulfato</i>	FMS
<i>Glutamato-Deshidrogenasa dependiente de NAD⁺</i>	NAD-GDH
<i>Isocitrato-Deshidrogenasa</i>	IDH
<i>Isocitrato-Deshidrogenasa dependiente de NAD⁺</i>	NAD-ICH
<i>Isocitrato-Deshidrogenasa dependiente de NADP⁺</i>	NADP-IDH
<i>Malato-Deshidrogenasa</i>	MDH
<i>Malato-Deshidrogenasa dependiente de NAD⁺</i>	NAD-MDH
<i>Nicotinamida Adenin Dinucleótido</i>	NAD ⁺
<i>Nicotinamida Adenin Dinucleótido Fosfato</i>	NADP ⁺
<i>Nitro Azul de Tetrazolio</i>	NBT
<i>Polivinilpirrolidona</i>	PVP
<i>Tris (hidroximetil) aminometano</i>	Tris

INTRODUCCION

La diferente tolerancia que presentan los vegetales hacia la salinidad, ha permitido clasificarlos en dos grandes grupos: a) plantas halófilas, que pueden sobrevivir y completar su ciclo de vida en suelos donde la concentración de electrolitos es elevada (superior a 300 mM para algunas sales), y - b) las glicófitas, que además de no completar su ciclo de vida, reducen su crecimiento en esos niveles de sal (24). Esta diferente tolerancia, ha hecho pensar que las enzimas de las halófilas presentan alguna "adaptación" - que les permite actuar adecuadamente en presencia de sales. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados "in vitro" demuestra que las enzimas de estas plantas son tan sensibles a la salinidad como las de glicófitas (23, 26, 33).

Se ha sugerido que la discrepancia entre las respuestas "in vivo" e - "in vitro" de las enzimas extraídas de plantas resistentes a la salinidad - podría deberse a que existe siempre una baja concentración de electrolitos en el citoplasma con respecto a otras partes de la célula (24, 33). Algunos estudios han demostrado que las halófilas pueden compartimentalizar los iones en lugares celulares específicos como son: las vacuolas (24, 30). *Suaeda maritima* creciendo en 340 mM de NaCl presentó 150 mM⁺ en el citoplasma y - 600 mM en la vacuola, mientras que en raíces de *Triglochin maritima* se encontró Na⁺ en citoplasma y vacuola en una concentración de alrededor de 100 y 150 mM cuando existía 100 y 500 mM respectivamente en el medio de crecimiento (27).

Aunque en menor número, existen también trabajos que demuestran que la compartimentalización iónica no es el único mecanismo que los vegetales poseen para resistir los efectos de una alta salinidad. La MEH de extractos de raíz de varias halófilas estudiadas, es más tolerante que la de los extrac-

tos de hoja (10), lo cual puede reflejar una "adaptación" de la enzima de rafa hacia el medio ambiente salino. Entre estas plantas, la MDH de rafa de *Barrichia frutescens* es más tolerante que muchas otras enzimas de plantas superiores; dicha especie no posee glándulas salinas o una gran succulencia, características que suelen presentar algunas halófilas. La tolerancia de su MDH a altos niveles de NaCl puede ser una adaptación hacia la salinidad.

Con respecto a los efectos que tiene la salinidad en las plantas glicófitas, se ha sugerido que los daños que produce a nivel celular, pueden ser causados por un decremento en el potencial hídrico o por la acción de los iones mismos (33). Concentraciones isosmóticas de diferentes sales han sido utilizadas con el fin de distinguir entre las relaciones adversas del agua y el efecto iónico (27), encontrándose que varias de estas sales inhiben el crecimiento en diferente grado, y algunas veces la respuesta es similar. Una distinta respuesta en el crecimiento hacia las distintas sales puede ser resultado directo de los efectos tóxicos de iones específicos sobre el metabolismo. En apoyo a esto, diversas investigaciones demuestran que las glicófitas no poseen mecanismos que protegen sus enzimas de la interacción con los iones. Estas plantas pueden contener una alta concentración de iones en el citoplasma al ser crecidas en condiciones salinas. Los análisis en la rafa de rafa creciendo en 1 y 30 mM de NaCl, mostraron que el Na^+ se encontraba en el citoplasma en una concentración de 15 y 50 mM respectivamente (16). La rafa de frijol mango creciendo en 60 mM de Cl^- contenía 30 mM de dicho ión (25).

En los párrafos anteriores, se puede observar que la mayoría de los estudios están enfocados a tratar de conocer las diferencias que se presentan a nivel celular y molecular entre las plantas resistentes y las sensibles a la salinidad, y al ser sus enzimas moléculas que juegan un papel clave en

el metabolismo, se ha puesto una mayor atención en la sensibilidad que estas presentan hacia la sal cuando está presente en el medio de reacción en estudios "in vitro", sin embargo, existe poca información acerca de los efectos que tiene la salinidad sobre la actividad enzimática de plantas superiores, cuando aquella está presente en el medio de crecimiento. Además, mientras algunos investigadores reportan que al ser aplicada la salinidad de esta manera, no afecta la actividad de las enzimas que son tolerantes ni de las que son sensibles a la salinidad (23); otros indican que la cinética de las enzimas aisladas de plantas expuestas a la sal, difieren de la cinética de las enzimas obtenidas de las plantas control (38). Por otro lado, se sabe que el polimorfismo enzimático está ampliamente distribuido en las poblaciones naturales, pero no existe alguna teoría que sea adecuada para explicar el porqué de su existencia (36). Algunos investigadores proponen que dicho polimorfismo es "selectivamente neutro", otros sin embargo, presentan evidencias de que se mantiene en las poblaciones naturales por medio de la selección natural, más no por procesos no selectivos. Esta última teoría propone que las diferentes formas de una enzima (isoenzimas) son favorecidas en diferentes ambientes (65), incrementando con esto la adaptabilidad de un organismo para hacer frente a cambios ambientales (37). De la misma manera, el crecimiento de una especie vegetal en ambientes con diferente salinidad, podría ser facilitado por la producción de isoenzimas que difieran en su tolerancia a la sal. Dicho mecanismo podría presentarse en aquellas plantas que no son capaces de regular la concentración de iones en sus células o de contrarrestar de alguna otra forma los efectos tóxicos. Se ha reportado que en el añoharo, una glicofita, aparece una nueva isoenzima de MDH cuando las plantas son crecidas en un medio salino (28). No obstante, otro estudio demostró que los patrones isoenzimáticos de esta enzima en la misma especie,

no se alteraban al crecerla en condiciones salinas similares (59).

Es necesaria una mayor investigación para tratar de esclarecer si la salinidad presente en el medio de crecimiento de una planta, le induce a presentar cambios en la actividad total y en el patrón isoenzimático de algunas de sus enzimas. Con este objetivo, en el presente trabajo se obtuvieron las cinéticas y los patrones isoenzimáticos de las enzimas NADP-IDH (EC1.1.1.42) y NAD-MDH (EC1.1.1.87) de hojas de sorgo crecido en diferente concentración de NaCl. Esta planta fue utilizada por ser una gliófita con tolerancia media a la sal (48), mientras que dichas enzimas fueron elegidas por las siguientes razones:

- Se ha encontrado que ambas presentan polimorfismo y que sus isoenzimas se encuentran tanto en la fracción soluble como en la mitocondrial (29, 30, 42, 58), el cambio en alguna de ellas podría indicarnos el sitio celular en donde tienen lugar los efectos causados por la sal.
 - Es bien conocido que la forma mitocondrial de la deshidrogenasa del malato está involucrada en el ciclo del ácido cítrico (23), sin embargo, la participación de la forma mitocondrial de la NADP-IDH en dicha vía es ampliamente discutida (45, 60). Algunos de estos investigadores han llegado a la conclusión de que la enzima dependiente de NAD puede realizar la oxidación del total del isocitrato. Otros han concluido por su parte, que sólo la NADP-IDH es capaz de hacerlo. La ausencia de NAD-IDH en la mitocondria de algunos vegetales apoya este último punto (61). De ser esto último cierto, los cambios en las formas mitocondriales de NAD-MDH y NADP-IDH pueden ayudarnos a inferir sobre las posibles variaciones que podrían presentarse en la vía metabólica mencionada, al estar la planta expuesta a un stress salino.
- Para lograr el objetivo anteriormente expuesto, se realizaron los si-

güentes puntos:

1.- Se comprobó que ambas enzimas presentaban polimorfismo y se obtuvieron sus patrones isoenzimáticos de cultivos crecidos a 5 diferentes concentraciones de NaCl durante tres diferentes tiempos de exposición.

2.- Se aislaron las fracciones soluble y mitocondrial y se obtuvieron los patrones isoenzimáticos NADP-IDH y NAD-MDH. Esto con el fin de conocer la ubicación celular que presentaba cada una de las diferentes formas moleculares que las integran.

3.- Se cuantificaron los iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} existentes en las hojas de los cultivos utilizados para la separación de las isoenzimas. Esto fue realizado para saber si existía una relación entre los patrones isoenzimáticos y la presencia o ausencia de alguno (s) de los iones. Se sabe que en las plantas un gran número de procesos enzimáticos son gobernados por los elementos esenciales. Como componentes de metabolitos, como activadores o como inhibidores, estos elementos afectan las velocidades de una multitud de reacciones catalizadas enzimáticamente. Por otra parte, es conocido que la presencia de ciertas sales en el medio de crecimiento disminuye o incrementa la absorción de otros iones presentes (2,30), los cambios encontrados en los patrones isoenzimáticos podrían estar dados por el efecto de iones diferentes a los que se varían en el exterior del vegetal.

4.- Se obtuvieron las cinéticas de las dos deshidrogenasas ya mencionadas de los cultivos expuestos durante 7 días a las 5 diferentes concentraciones de NaCl.

MATERIAS Y MÉTODOS

Cultivo de las plantas.

Aproximadamente 2900 semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench. Serie RB3030) fueron colocadas en un bastidor de malla de nylon con una abertura de 1.5 mm y con dimensiones de 21 X 21 cm. La germinación se llevó a cabo en la oscuridad con un goteo constante de agua corriente durante 72 horas. Al término de ese tiempo, las semillas habían introducido su radícula en la malla. 5 bastidores con esas características se trasladaron a recipientes de plástico que contenían NaCl en una concentración de 0, 25, 50, 100 y 150 mM en un volumen de 2700 ml de solución nutritiva Hoagland (18), siendo la raíz la única parte de la planta que estaba en contacto con la solución.

Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento con aereación constante de la solución nutritiva, una temperatura de 30° en el día y 24° por la noche, 43% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12 horas. La intensidad lumínica fue de 2100 lux. La solución nutritiva y con ella las concentraciones de NaCl se renovaron semanalmente y su volumen se mantuvo constante al ajustar diariamente el nivel inicial con agua destilada. De las plantas mantenidas bajo estas condiciones se tomaron muestras de cada uno de los cinco diferentes tratamientos a los 3, 7 y 14 días de exposición a la sal, con el fin de separar las isoenzimas y hacer las determinaciones iónicas, con 2 y 3 repeticiones respectivamente. Cabe señalar que no se tuvo ningún control de tonicidad, debido a que se ha demostrado que las sustancias más utilizadas como agentes osmóticos en el exterior de la planta, presentan inconvenientes que ponen en duda su utilización en el control de la tonicidad es adecuada. Así por ejemplo, el problema más común en el polietilenglicol es la pureza tan baja que presenta (24). Entre otros daños que se han observado en el uso de este compuesto está la precipitación de enzimas solubles (26), y su unión a las membranas microsomales -

de rafa, que puede traer como consecuencia una reducción en la permeabilidad pasiva de la membrana y al mismo tiempo un cambio en el influjo de Na^+ y K^+ (84). Refiriéndonos al manitol (otra molécula utilizada para ajustes osmóticos), se ha encontrado que éste difunde pasivamente al interior de la rafa, mientras que la sacarosa y la glucosa son tomadas por las células, acumuladas y metabolizadas (12). A pesar de ello, como se demuestra más adelante, se piensa que los cambios encontrados en el presente trabajo, son resultado de efectos de iones específicos y no de cambios en la tonicidad, lo cual es apoyado por experimentos anteriores en donde se han utilizado diferentes sales pero en concentraciones isosmóticas, y en donde se ha visto que éstas presentan un diferente grado de inhibición sobre el crecimiento de la planta (78).

Preparación de los extractos y separación de isoenzimas.

1 g. de hojas de los distintos cultivos mencionados antes, se lavaron con agua destilada y fueron homogenizadas a baja temperatura en un mortero, agregando por cada gramo de tejido, 5 ml de un medio de homogenización modificado (26), que contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y PVP-40 2%. El extracto obtenido se filtró en 8 capas de gasa y se centrifugó durante 10 minutos a 15 000 rpm. Se cuantificó la proteína que se obtenía en el sobrenadante (8) y se almacenó a $-7^\circ C$ para su posterior utilización.

Transcurridas 24 horas, se realizó la separación de isoenzimas en una placa de poliacrilamida sistema discontinuo, utilizando una concentración final de 7.5% en el gel de corrida (44). Con el fin de revelar posteriormente las enzimas NAD-MDH y NADP-IDH, se sembraron junto con 25 μ l de sacarosa al 40%, 100 y 75 μ g respectivamente de proteína total del sobrenadante obtenido de los cultivos crecidos en las diferentes concentraciones de la sal (con sus respectivas repeticiones). Se utilizó un buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3 como buffer de corrida. La electroforesis se realizó en una temperatura de $4^\circ C$, uti-

liando una corriente de 50 mAmp y 90 V en los primeros 60 minutos y 40 mAmp - con 150 V durante las 4 horas siguientes.

Después de la electroforesis, la placa fue dividida en dos partes para revelar por separado ambas ensimas por una modificación de la técnica de Fine y Costello (22). Se incubó a 37°C durante 60 minutos en la oscuridad utilizando soluciones de tinción preparadas minutos antes y que contenían, para IDH: ácido isoctrico 2.5 mM, NADP⁺ 163 µM y MgCl₂ 5 mM. Para MDH se utilizó ácido málico 11.3 mM y NAD⁺ 912 µM. Ambas soluciones contenían Tris-HCl 87.5 mM pH 8.5 FMS 25 µg/ml y NBT 313 µg/ml.

Terminada la tinción los gels se almacenaron en ácido acético al 7.5% para posteriormente fotografiarlos y obtener su densitograma. Es importante señalar que se utilizaron gels "control" para tener la seguridad de que el método de tinción que se estaba usando era específico para las ensimas que interesaba revelar.

Localización celular de las ensimas.

Las fracciones mitocondriales y soluble fueron aisladas según el esquema del diagrama 1, de las hojas de los cultivos en donde previamente se observó que aparecieron todas las isoensimas de las dos ensimas en estudio. Para MDH el máximo de formas apareció en el 7º día, y como no existían diferencias notables entre los cultivos expuestos a diferente salinidad, se optó por aislar las dos fracciones del grupo control. Las isoensimas de IDH fueron separadas de cultivos con 3 días de crecimiento, pero a diferencia de la MDH, en experimentos anteriores, ésta presentó un número variable de isoensimas en los cultivos crecidos en diferente concentración de la sal. Sin embargo, se pudo observar que después de la separación de las dos fracciones celulares, todas sus isoensimas se presentaron en cultivos con o sin NaCl.

50g DE HOJAS LAVADAS PREVIAMENTE SE LICUAN EN 150 ml DEL MEDIO DE HOMOGENEIZACION *1

FILTRACION EN 8 CAPAS DE GASA.

CENTRIFUGACION A 3,500 rpm. 10'

SOBRENADANTE, CENTRIFUGACION A 10,000 rpm. 15'

PASTILLA, RESUSPENSION EN SACAROSA 0.3 M Y CENTRIFUGACION A 3,500 rpm. 5'

SOBRENADANTE, CENTRIFUGACION A 11,000 rpm. 5'

PASTILLA, RESUSPENSION EN SACAROSA 0.3 Y CENTRIFUGACION A 3,000 rpm 5'

SOBRENADANTE, CENTRIFUGACION A 11,000 rpm. 5'

PASTILLA, RESUSPENSION EN SACAROSA 0.3 M Y CENTRIFUGACION A 11,000 rpm 5'

PASTILLA, RESUSPENSION EN AGUA (1 ml) AGITACION VIGOROSA Y CENTRIFUGACION A 15,000 rpm 10'

SOBRENADANTE: FRACCION INTRAMITOCONDRIAL

SOBRENADANTE, CENTRIFUGACION 15,000 rpm 10'

SOBRENADANTE: FRACCION SOLUBLE.

*1 MEDIO DE HOMOGENEIZACION

TRIS-HCl 85mM pH 7.3

PVP-40 3%

EDTA 5mM

SACAROSA 300mM

MERCAPTOETANOL 10 mM

DIAGRAMA 1.- PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA EL AISLAMIENTO DE LAS FRACCIONES INTRANITOCONDRIAL Y SOLUBLE. LA TEMPERATURA A LA CUAL SE REALIZO FUE DE 4°C.

Una vez cuantificada la proteína de ambas fracciones, se sembraron 100 μ g de proteína total de cada una de ellas (con repetición), para separar por electroforesis las isoenzimas de MDH e IDH de la forma ya mencionada, con la única diferencia de que la concentración de $MgCl_2$ en la solución de tinción para IDH fue elevada a 35 mM (una concentración de Mg^{++} semejante a la encontrada en el tejido foliar).

Concentración de cationes en la hoja

De los mismos cultivos utilizados para la separación de isoenzimas, se tomó 1g de hojas y se lavaron en agua destilada para mantenerlas después a una temperatura de 70°C durante 48 horas. Al término de este tiempo, se calculó el porcentaje de tejido seco por diferencia de peso y se digirió con 8 ml de ácido nítrico y con ayuda de calor. El digerido fue aforado a 100 ml con agua destilada y a partir de esta solución se tomaron alícuotas para cuantificar los iones Na^+ y K^+ por flourometría y Ca^{++} y Mg^{++} por espectrofotometría de absorción atómica (48).

Cinética enzimática.

De los cultivos crecidos durante 7 días en las diferentes concentraciones de la sal, se obtuvieron los sobrenadantes de manera similar a los utilizados para la separación de isoenzimas. La actividad enzimática fue determinada por espectrofotometría siguiendo el cambio de absorción a 340 nm en una temperatura constante de 30°C. La mezcla de reacción para NADP-IDH tenía los siguientes componentes en un volumen de 3 ml a la concentración final que a continuación se indica (modificación de un método ya reportado 26): Tris-HCl 50 mM pH 8, NADP⁺ 46.5 μ M, $MgCl_2$ 5mM e inositrato en un rango de concentración de 14 a 556 μ M. La alícuota del sobrenadante agregada contenía 45 μ g de proteína total.

La cinética de NAD-MDH se realizó en un volumen final de 3 ml de una solución que contenía Tris-HCl 93.33 mM pH 8.5, NAD⁺ 460 μ M, 15 μ g de proteína to--

tal del sobrenadante y malato desde 0.250 hasta 8 mM.

Para ambas enzimas el sustrato fue agregado a la mezcla de reacción que contenía la enzima pero no la coenzima. Se incubó durante 8 minutos a 30°C iniciándose después la reacción por la adición a la coenzima oxidada. En ensayos preliminares así como en otro trabajo (1), (en este último sólo para IDH), se demostró que la actividad incrementa con esta preincubación, permaneciendo constante durante varios minutos.

Previo a la realización de la cinética de ambas enzimas, se buscó el pH óptimo para su actividad, utilizando para ello una concentración saturante de sustrato. Una curva de pH en el rango de 6.5 a 9.0 fue hecha con una concentración de Tris similar a la utilizada en la cinética y ajustando al pH adecuado con HCl. Una vez obtenida la cinética de las enzimas de los diferentes cultivos, se procedió a calcular sus constantes Km y Vmax.

Tratamiento estadístico de los datos

Un análisis de correlación múltiple fue efectuado como apoyo para aceptar o descartar si la interacción entre iones específicos era la causa de los cambios encontrados en la concentración foliar de los diferentes cationes cuantificados. Además ayudó a saber si el cambio en alguno (s) de esos iones estaba ligado a la variación encontrada en la actividad de las isoenzimas. Se utilizó también un Análisis de Varianza Factorial para evaluar los efectos que tenían los factores salinidad (incremento en el medio de crecimiento) y tiempo (diferente tiempo de exposición a la sal) sobre la concentración de los distintos cationes cuantificados. Esto ayudó también a detectar si existía una interacción entre ambos factores. En el momento que sea necesario mencionar los resultados de esta prueba estadística se manejará la notación F_e como el valor estadístico "F" obtenido a partir de los datos, y F_t como el valor crítico de "F" tomado de tablas al nivel 0.01 de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSION

Patrones isoenzimáticos

En algunos experimentos en donde se han utilizado geles de almidón y poli-acrilamida para la separación de isoenzimas de las deshidrogenasas que aquí se estudian, se ha encontrado que el número de aquellas es variable. Así por ejemplo, la NAD-MDH puede presentar 3 (14), 4 (51,52) y hasta 5 formas moleculares (46,47). La NADP-IDH por su parte suele tener un número de isoenzimas que va de 3 a 4 (4,5,62). Asimismo, es bien conocido que la mayoría de las veces dicho número varía en las diferentes etapas del desarrollo de la planta (11,54). Estos cambios en los patrones isoenzimáticos presentes durante el desarrollo de un organismo, parecen formar parte de una "adaptación" hacia los distintos eventos moleculares que se dan durante la diferenciación celular. Rasgos característicos de células especializadas durante el desarrollo y diferenciación celular pueden estar directamente relacionados con patrones isoenzimáticos específicos. (19).

En la Figura 1 se observa que la IDH presenta 3 formas al 3er día de crecimiento, a las cuales se denominó I, II y III según su posición en dirección del ánodo hacia el cátodo. La movilidad electroforética relativa de cada una de ellas fue de 1.0, 0.85 y 0.62 respectivamente. Al 7° día de edad, la isoenzima -III desaparece, existiendo a la vez un ligero decremento en el pico I y un aumento en la intensidad de la forma II. Finalmente, se observa que en el 14° día la planta presenta sólo la isoenzima II.

Por su parte la NAD-MDH presenta un máximo de 5 formas al 7° día (Figura 2), a éstas se les asignaron las cinco primeras letras del alfabeto en el mismo orden que a las de IDH. Su movilidad electroforética relativa fue 1.0, 0.91, - 0.80, 0.65 y 0.26. Los cambios más notables en el patrón de esta enzima son la aparición de las isoenzimas "D" y "E" en el 7° día y la desaparición de esta al

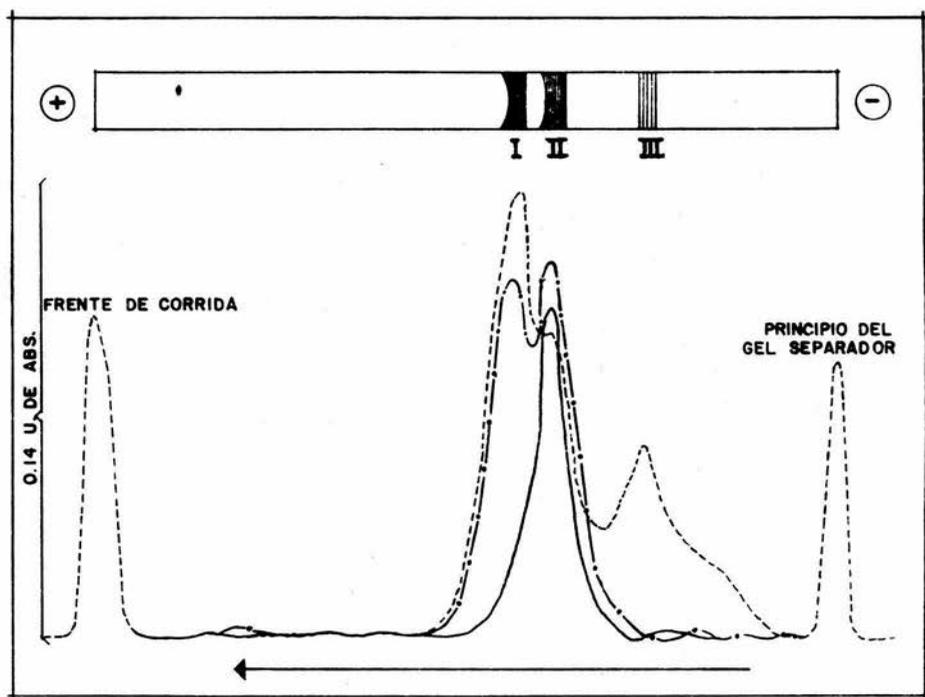


FIGURA I.- DENSITOGRAFAS DE NADP-IDH DE HOJAS DE SORGO EXPUESTO A 25 mM. DE NaCl. DURANTE 3 (-----), 7 (— · —) Y 14 DIAS (—). EN LA PARTE SUPERIOR DE LA GRAFICA SE PRESENTA EL DIBUJO DEL GEL CORRESPONDIENTE AL TERCER DIA DE EXPOSICION A LA SAL.

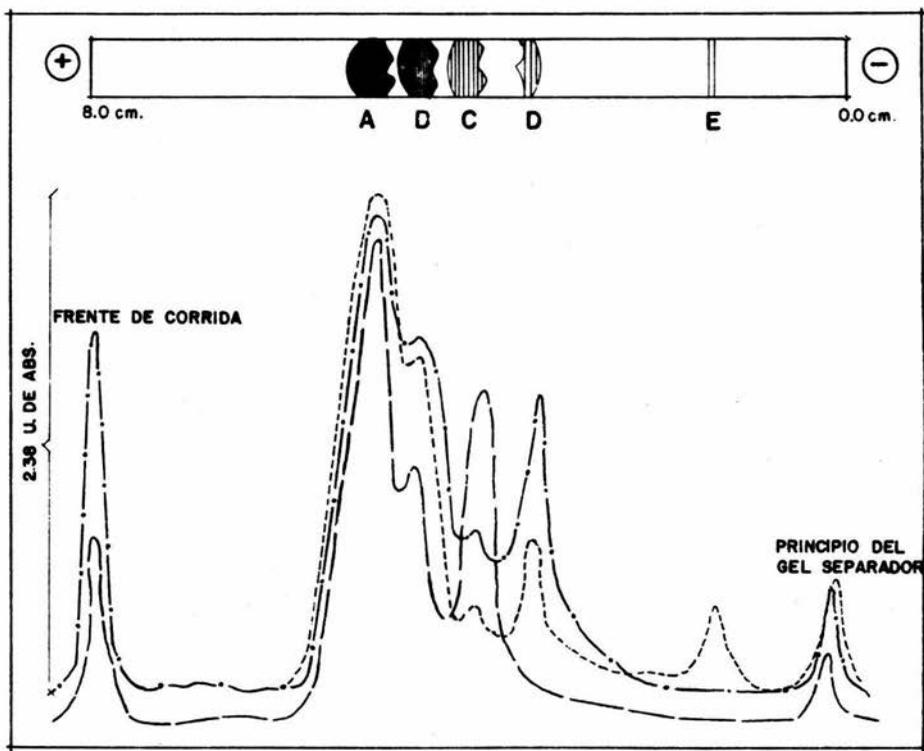


FIGURA 2.- DENSITOGRAMAS DE NAD-MDH DE HOJAS DE SORGO CECIDO EN SOLUCION NUTRITIVA DURANTE 3 (—), 7 (----) Y 14 DIAS (-·-·-). EN LA PARTE SUPERIOR DE LA GRAFICA SE PRESENTA EL DIBUJO DEL GEL CORRESPONDIENTE AL 7º DIA DE CRECIMIENTO.

tina en el 14º día. En otro trabajo ya se han reportado cambios en el número de isoenzimas de MDH, relacionados con la edad de la hoja (11), sin embargo, existe otro en donde no fue detectada variación alguna (46).

Localización celular de las isoenzimas.

En diversos estudios se ha encontrado que determinada isoenzima o un patrón isoenzimático específico está asociado a la parte soluble de la célula, y que otro tipo se presenta en un organelo de la misma célula. Esta diferente compartimentalización subcelular de las isoenzimas refleja una diferencia en los requerimientos metabólicos (19). Con el fin de saber si las diferentes formas de enzimas estudiadas en el presente trabajo mostraban una diferente localización celular, se aislaron las fracciones mitocondrial y soluble, y las isoenzimas existentes en ellas fueron separadas por electroforesis, obteniéndose después sus densitogramas. En la Figura 3 se presentan los densitogramas de NADP-IDH. Como se puede observar, aquí el grupo control sí muestra todas las isoenzimas, mientras que el patrón isoenzimático del extracto crudo del mismo grupo sólo presenta isoenzima I. Ensayos espectrofotométricos en donde se midió la actividad de la IDH en presencia de algunos cationes, demuestran que mientras el Ca^{++} inhibe a la enzima, el Mg^{++} la activa. El medio de homogenización utilizado para el aislamiento de mitocondrias contenía EDTA 5 mM; por otro lado, se agregó MgCl_2 a la solución de tinción del gel. La aparición de las isoenzimas II y III y el incremento en la intensidad de la I, podría ser explicado por la ausencia de Ca^{++} (ión inhibidor) o por el incremento en Mg^{++} (ión activador). En la misma Figura 3, se ve además que aproximadamente un 85% de la actividad total de las isoenzimas I y II se localiza en la mitocondria y sólo un 15% en el citosol. Por su parte, la isoenzima III se presenta en proporciones semejantes en ambas fracciones. Esta última sin embargo, ocupa sólo el 10% de la actividad total.

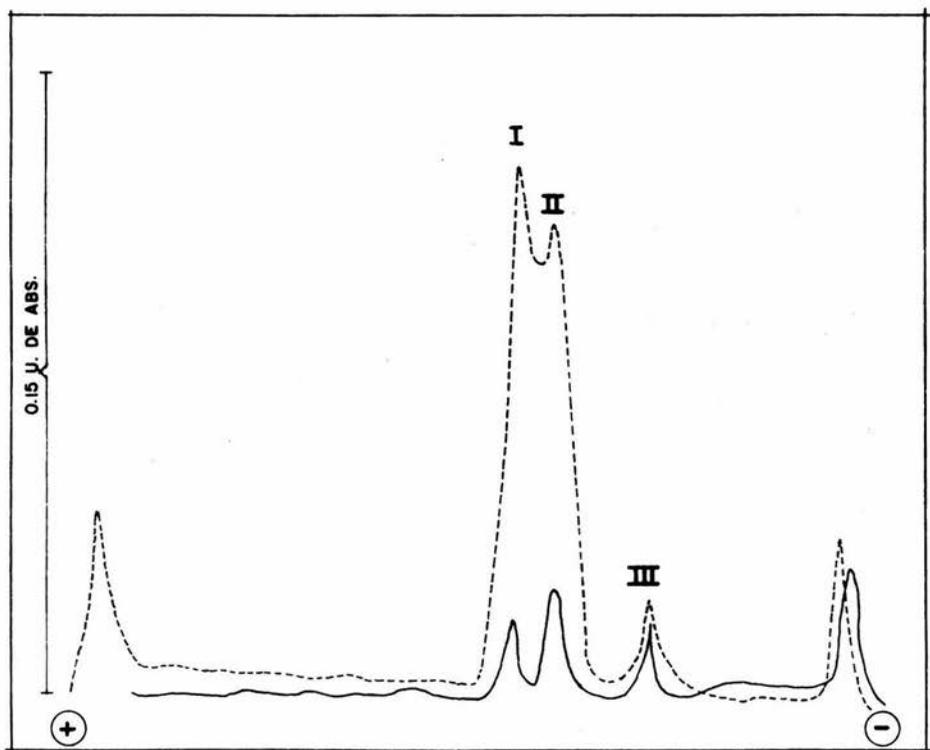


FIGURA 3.- DENSITOGRAFAS DE NADP-IDH DE LAS FRACCIONES MITOCONDRIAL (-----) Y SOLUBLE (—) DEL GRUPO CONTROL DE TRES DIAS DE CRECIMIENTO. LA CANTIDAD DE PROTEINA TOTAL SEMBRADA EN EL GEL FUE LA MISMA PARA TODAS LAS FRACCIONES (40 μg).

Resumiendo, aproximadamente un 82% de la actividad total de la NADP-IDH se localiza en la mitocondria y el resto en la fracción soluble. La posibilidad de contaminación mitocondrial en la fracción soluble se descarta, teniendo como apoyo el hecho de que el nivel de la isoenzima III mitocondrial es tan bajo que su actividad contaminante en la otra fracción no sería perceptible, sin embargo es semejante en ambas fracciones.

La existencia de isoenzimas de NADP-IDH que difieren en su localización celular, sugiere que poseen diferentes propiedades que les permiten funcionar en forma efectiva en los diferentes ambientes intracelulares en que se encuentran. La participación de las enzimas NADP-IDH y NAD-MDH en el ciclo del ácido cítrico ha despertado polémica (45,60). La ausencia de NAD-IDH en la mitocondria de algunos vegetales (61) y en las células de algunos hongos microscópicos (41), indican que la NADP-IDH puede realisar la oxidación del total del isocitrato. En el presente estudio, en repetidas ocasiones la coenzima NAD^+ reemplazó al $NADP^+$ en la solución de tinción, con la finalidad de conocer si existía alguna enzima que oxidara el isocitrato en presencia de la coenzima no fosforilada, pero ninguna isoenzima apareció, lo cual sugiere la ausencia de NAD-IDH.

Estudios realizados en mitocondria de hígado de rata, demuestran que la oxidación del isocitrato involucra a las dos distintas isoenzimas que son específicas para NAD^+ y $NADP^+$, y a una transhidrogenasa que en condiciones energéticas utiliza ATP para formar NADPH a partir de NADH y $NADP^+$ (45,60) (ver figura 4). El metabolismo del isocitrato en la mitocondria de hoja de sorgo, podría llevarse a cabo en forma similar a la que el esquema propone, pero sin la existencia del paso 1. La NADP-IDH mitocondrial puede participar con la isoenzima citoplásmica en un ciclo isocitrato-cetoglutarato que equilibra el potencial redox $NADP^+$ citosólico y mitocondrial através de la membrana mitocondrial (29,60) Dicho ciclo podría ser utilizado para proveer de $NADP^+$ de la mitocondria al - -

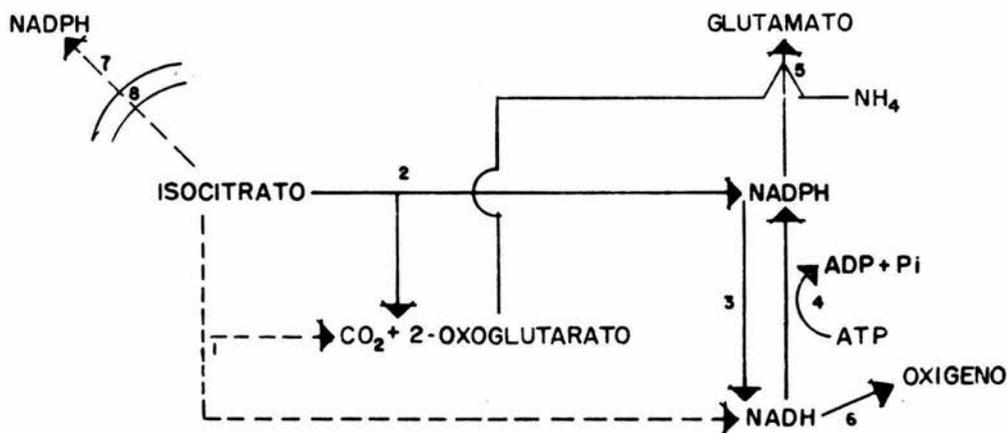


FIGURA 4.- METABOLISMO DEL ISOCITRATO. LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS SON (1) NAD-IDH, (2) NADP-IDH MITOCONDRIAL, (3) TRANSHIDROGENASA ACTUANDO DE NADP A NAD+, (4) TRANSHIDROGENASA ACTUANDO EN CONDICIONES ENERGIZADAS, (5) GLUTAMATO DESHIDROGENASA, (6) CADENA RESPIRATORIA, (7) NADP-IDH CITOPLASMICA Y (8) TRANSPORTADOR DE CITRATO.

citocool, en respuesta a una estimulación de las enzimas que utilizan estos equi-
valentes reducidos.

Refiriéndose a la NAD-IDH (Figura 5), se puede observar que presenta dos isoenzimas, "B" y "C", que son específicas de la mitocondria, mientras que la forma "D" pertenece sólo a la fracción soluble. La isoenzima "A" se localiza en ambas fracciones, pero una mayor parte (85%) se encuentra en la mitocondria. El 76% de la actividad total de la enzima se encuentra en la mitocondria y sólo un 24% en la fracción soluble.

Una cuestión importante que aún no ha sido resuelta, concierne al significado biológico de las múltiples formas de MDH en tejidos vegetales, sin embargo parece razonable el concluir que la forma mitocondrial funciona en alto grado en el metabolismo oxidativo, generando NAD⁺ reducido cuando el malato es oxidado hasta oxaloacetato en el ciclo del ácido cítrico (52). Aún cuando de la enzima soluble se den menos explicaciones sobre su significado biológico, es importante hacer notar la aparición de la isoenzima "D" en el 7º día y el incremento en su actividad al 14º. Estos cambios posiblemente son necesarios y van ligados a los cambios que se presentan en el metabolismo de la planta durante esta etapa de su desarrollo.

Concentración de NaCl en el medio de crecimiento y patrones isoenzimáticos.

En la figura 6 se muestran las fotografías de los patrones isoenzimáticos de NADP-IDH de los cultivos crecidos en diferente concentración de NaCl durante 3, 7 y 14 días. Los densitogramas de cada patrón fueron obtenidos y en la Figura 7 se ejemplifica para los cultivos con 3 días de crecimiento. A partir de ellos se calculó el área bajo la curva de cada uno de estos picos, que son reflejo de la actividad enzimática. Con los valores obtenidos se graficó de la forma que se presenta en la Figura 8, y en donde se puede observar lo siguiente:

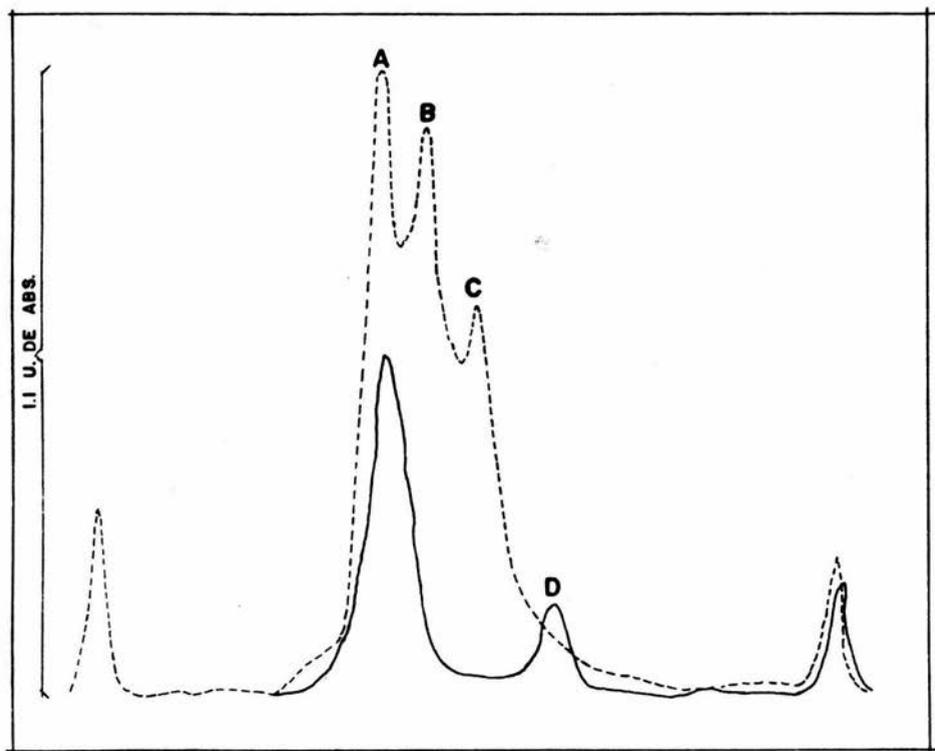
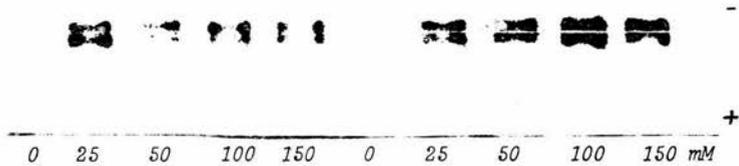
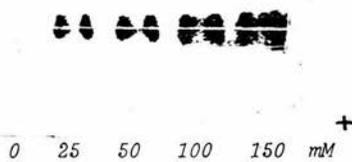


FIGURA 5.- DENSITOGRAFAS DE NAD-MDH DE LAS FRACCIONES MITOCONDRIAL (-----) Y SOLUBLE (—) DEL GRUPO CRECIDO EN SOLUCION NUTRITIVA DURANTE 7 DIAS. LA CANTIDAD DE PROTEINA TOTAL SEMBRADA EN EL GEL FUE LA MISMA PARA AMBAS FRACCIONES (24 μ g)



a)



b)

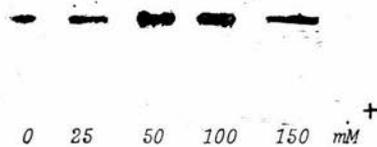


FIGURA 6.- FOTOGRAFIAS DE LOS PATRONES ISOENZIMATICOS DE NADP-IDH DE LOS CULTIVOS CRECIDOS EN DIFERENTE CONCENTRACION DE NaCl DURANTE 3 a), 7 b) y 14 DIAS c).

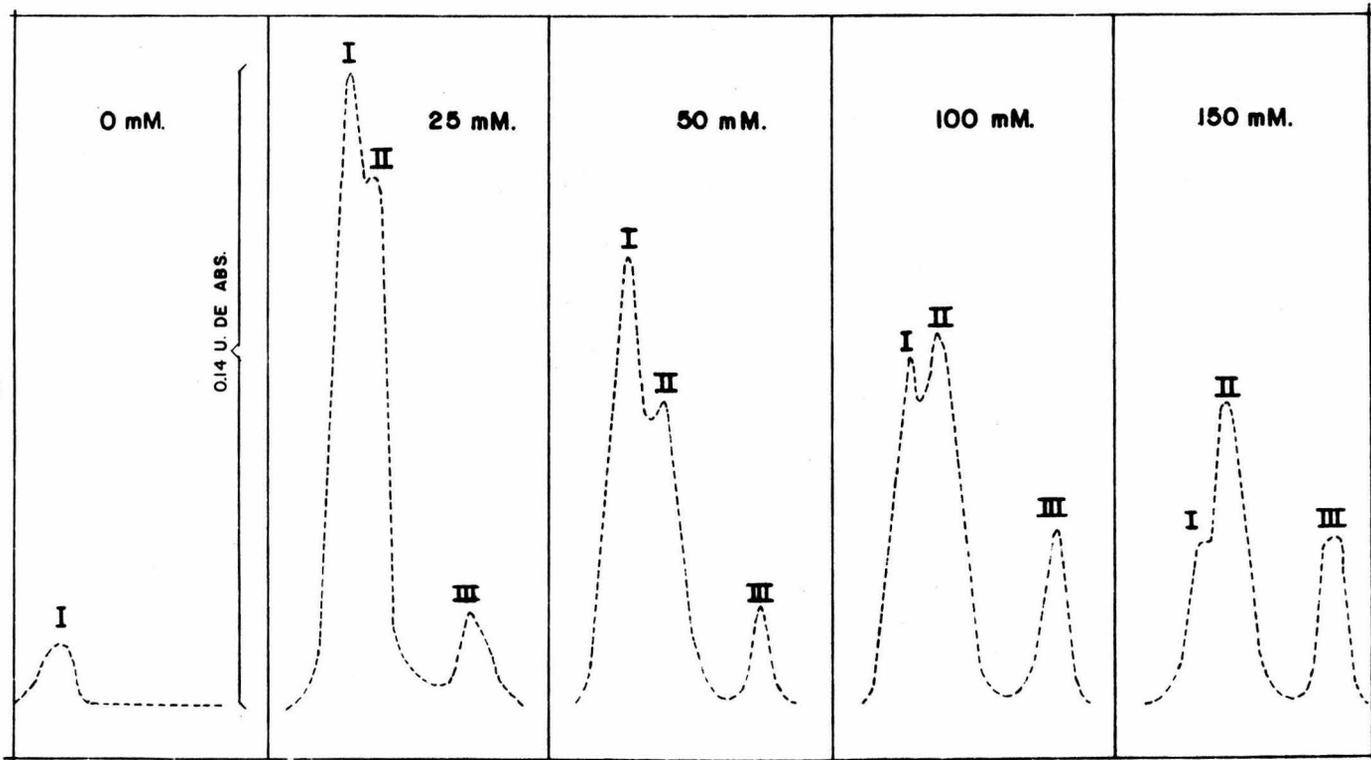


FIGURA 7.- DENSITOGRAFAS DE LOS PATRONES ISOENZIMATICOS DE NADP-IDH DE LOS CULTIVOS CRECIDOS DURANTE 3 DIAS EN DIFERENTE CONCENTRACION DE NaCl.

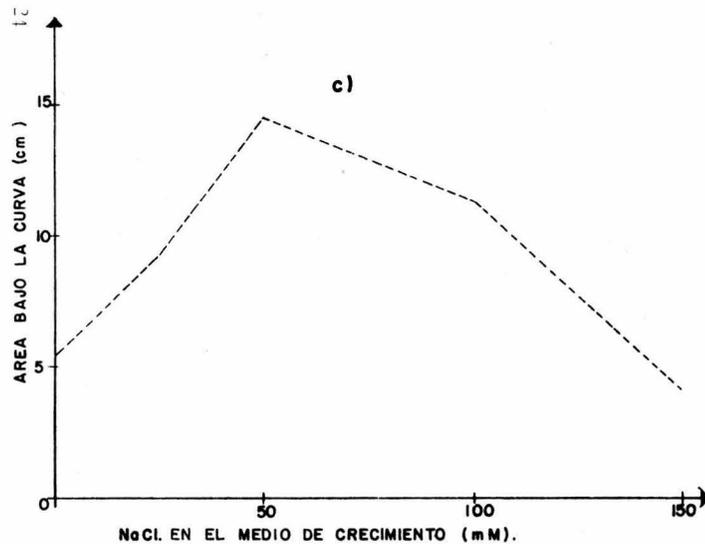
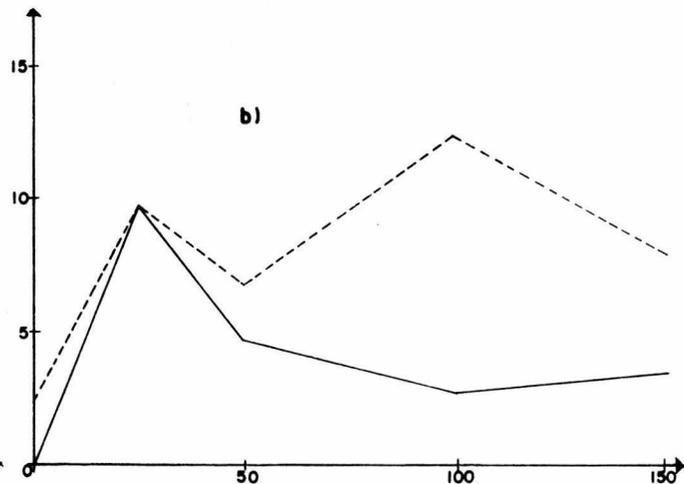
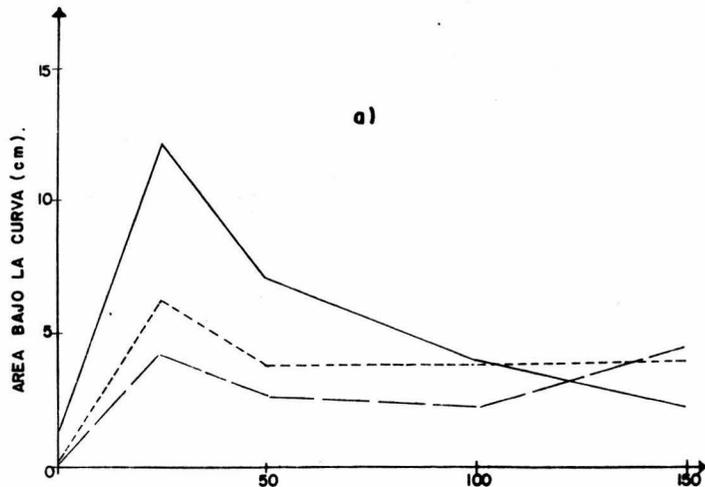


FIGURA 8.- AREA BAJO LA CURVA DE LAS ISOENZIMAS DE NADP-
IDH DE HOJAS DE SORGO CECIDO EN DIFERENTE CON-
CENTRACION DE NaCl. ISOENZIMA I (—), II (-----) Y
III (-·-·-). a), b) Y c) REPRESENTAN 3,7 Y 14 DIAS DE
CRECIMIENTO RESPECTIVAMENTE. CADA PUNTO ES LA X
DEL AREA BAJO LA CURVA DE LA ISOENZIMA OBTENI-
DA DE DOS DIFERENTES MUESTRAS DEL MISMO CUL-
TIVO.

- 1.- Como se mencionó en la primera sección de resultados, se presenta una dismi-
nución en el número de isoenzimas durante el desarrollo del vegetal.
- 2.- La actividad de las isoenzimas I y II es la única que se hace patente en las
muestras control del primero y los dos últimos días de crecimiento respecti-
vamente.
- 3.- El incremento de NaCl en el medio de crecimiento trae consigo un aumento en
la actividad de todas las isoenzimas en los tres tiempos de experimentación,
habiendo una excepción en la isoenzima II del cultivo experimental crecido -
durante 14 días en 150 mM de la sal.
- 4.- La máxima actividad enzimática se alcanza cuando existe una concentración 25
mM de la sal en los dos primeros días de estudio, y 50 mM para el 14° día.
- 5.- La actividad de la isoenzima II no disminuye considerablemente como es el ca-
so de la I, cuando la concentración de NaCl se eleva durante el 3° y 7° día.
Sin embargo, esta primera isoenzima presenta una actividad menor a la del --
mismo control en el cultivo crecido en 150 mM de NaCl durante 14 días.

La figura 9 presenta la fotografía de los patrones isoensimáticos de MAD-MDW del cultivo control y de los experimentales con 7 días de edad. De la misma forma que para IDH, se obtuvieron sus densitogramas y se calculó el área bajo la curva de cada uno de los picos, construyéndose las gráficas presentes en la Figura 10, en las que se observa que la actividad de las isoenzimas "A", "B" y "C" disminu-
ye cuando está presente la sal a una concentración de 25 y 50 mM, pero se resta-
blece y en ocasiones sobrepasa la actividad del grupo control cuando se agrega -
el NaCl a una concentración de 100 mM, para disminuir después en forma notable -
en 150 mM de la sal. Este patrón varía un poco en el 14° día para las isoenzimas
"A" y "C", ya que su actividad máxima se presenta en 50 mM. Al referirse a las
isoenzimas "D" y "E", que son de "aparición tardía", se podría decir que práctic-
amente no presentan cambios cuando se incrementa la concentración de NaCl en el

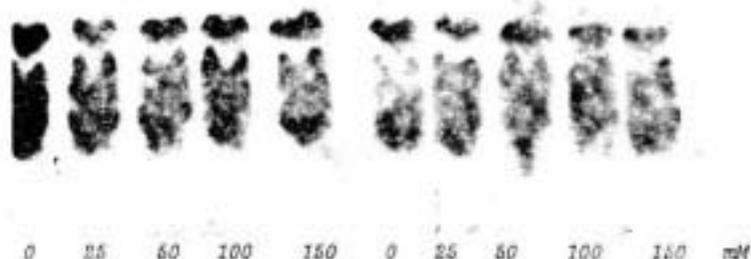
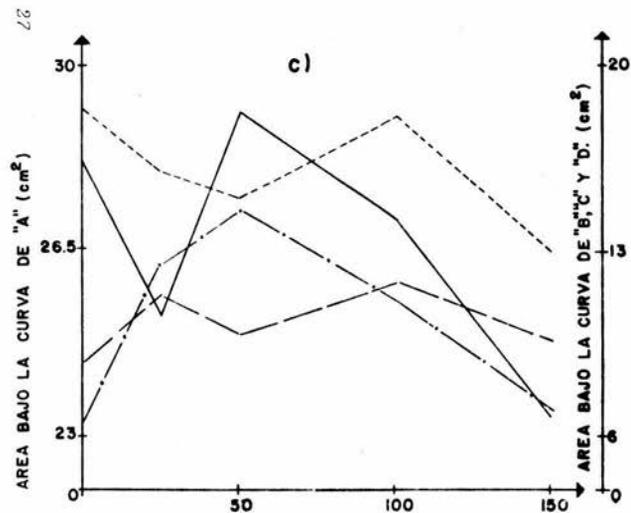
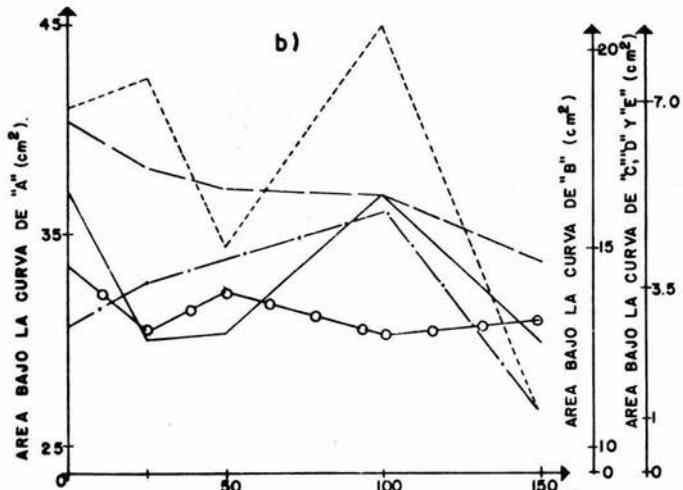
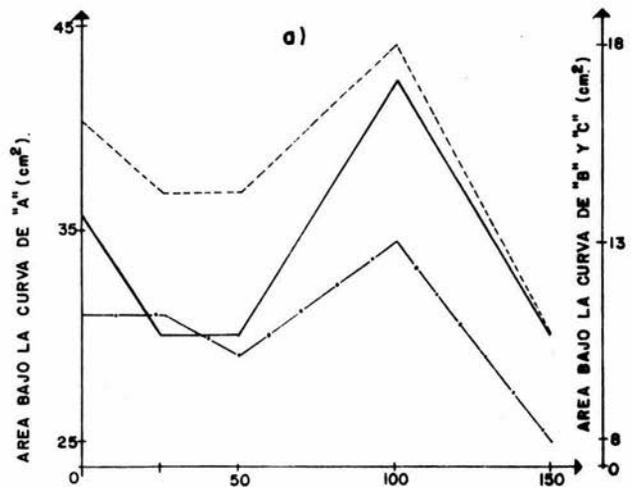


FIGURA 8.- FOTOGRAFIA DE LOS PATRONES ISOENZIMATICOS DE NAD-MDH DE LOS CULTIVOS CRECIDOS EN DIFERENTE CONCENTRACION DE NaCl DURANTE 7 DIAS. LA REPETICION PARA CADA UNO DE ELLOS FUE OBTENIDA DE MUESTRAS DIFERENTES PERO - DEL MISMO CULTIVO Y BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.



NaCl. EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO (mM).

FIGURA 10.- AREA BAJO LA CURVA DE LAS ISOENZIMAS DE NAD-MDH DE HOJAS DE SORGO CRECIDO EN DIFERENTE CONCENTRACION DE NaCl. ISOENZIMA A (—), B (-----), C (— · — · —), D (—) Y E (○—). a), b) Y c) REPRESENTAN 3, 7 Y 14 DIAS DE CRECIMIENTO RESPECTIVAMENTE.

medio de crecimiento.

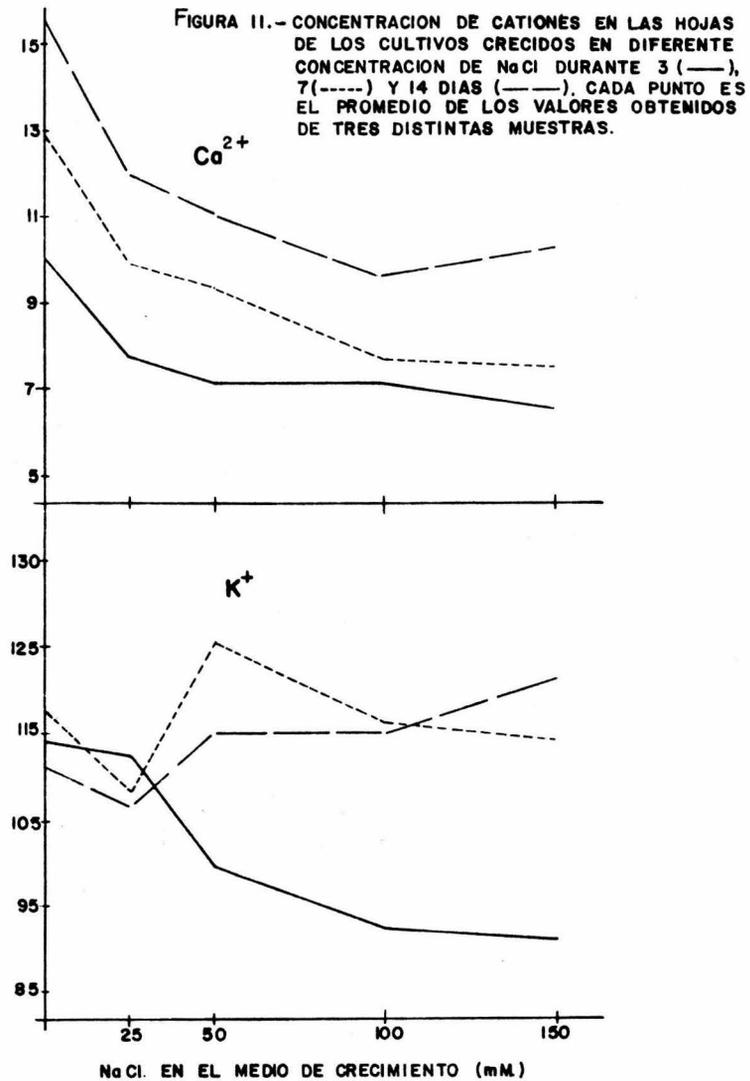
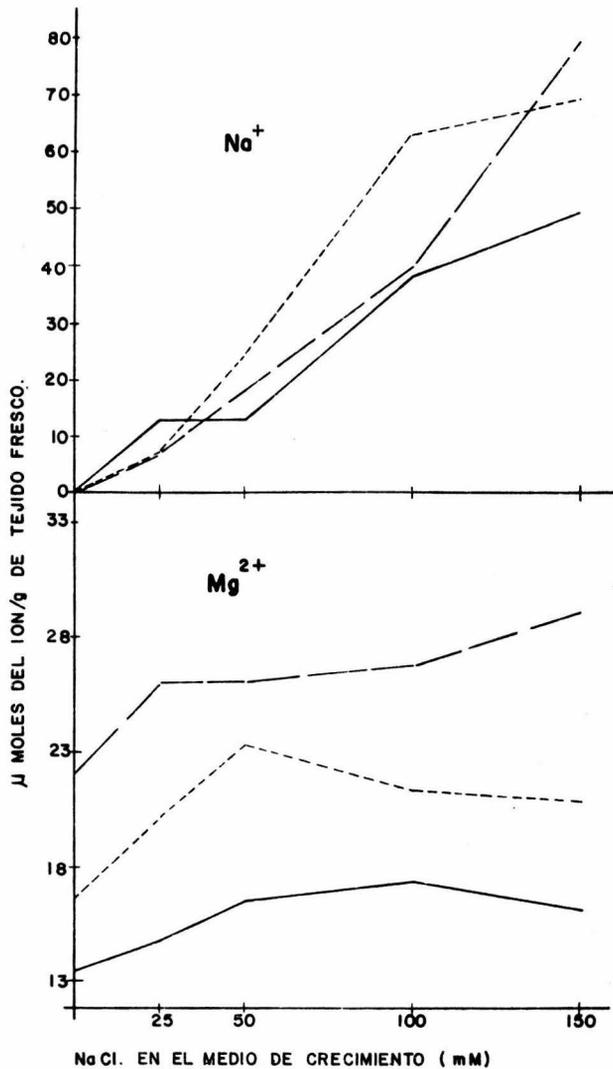
Contenido catiónico.

Con la finalidad de conocer si existía alguna relación entre los cambios isotérmicos y el cambio en la concentración de algún (os) catión (es), se cuantificaron los iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} existentes en la hoja, teniendo como variables una diferente concentración de NaCl en el medio de crecimiento y un diferente tiempo de exposición a dicha sal. Los valores obtenidos de estas cuantificaciones son presentados en la Figura 11.

El incremento de sal en el exterior de las plantas ocasiona una elevada acumulación del ión sodio en las hojas ($F_e = 116.5$, $F_t = 4.02$), llegando hasta 78 μmoles por gramo de tejido fresco (92 mM), cuando existe una concentración de 150 mM de la sal en el medio de crecimiento. Sin embargo, no se presentan cambios en la acumulación de dicho ión con respecto al tiempo ($F_e = 8.56$, $F_t = 5.39$). En otro estudio realizado en sorgo (17), se presentó un incremento en la concentración de Na^+ en la planta conforme se aumentaba el NaCl en la solución nutritiva. En *Brassica sp.* la irrigación salina trae consigo un incremento en la concentración de este mismo ión (55).

La concentración de Ca^{++} en la hoja disminuye hasta un 40% aproximadamente, cuando existe 100 mM de NaCl en el medio. Esta concentración de sal es la que causa el máximo decremento en el nivel de dicho ión. Un incremento del 20% en la concentración de Ca^{++} se presentó en los días 7° y 14° de crecimiento, pero el patrón de disminución en sus niveles causado por la sal, se conserva. Los cambios en la concentración de Ca^{++} están dados por los efectos del factor salinidad ($F_e = 108$, $F_t = 4.02$) y el factor tiempo ($F_e = 161$, $F_t = 5.39$) pero no exis-

*En los Análisis de Varianza factorial, la F_e debe ser marcadamente mayor a la F_t como para concluir que existe una relación significativa entre las dos variables experimentales (16).



te una interacción entre ellos ($Fe = 3.01$, $Pt = 3.17$).

En trabajos realizados en *Sorghum bicolor* (17), y *Plantago* sp. (21), se ha encontrado que la captación y translocación del Ca^{++} hacia las hojas disminuye al incrementar el NaCl en el exterior. Se sugiere que ocurre una interacción negativa en las raíces, impidiendo la captación y con ello la translocación del Ca^{++} hacia la parte superior de la planta (17). En diversos experimentos se ha observado que una baja concentración de Ca^{++} y una alta concentración de sal incrementa la permeabilidad de la membrana, llevando a un aumento en el transporte pasivo de Cl^- y Na^+ . Se sugiere que la causa de esto es el incremento en la proporción Na^+/Ca^{++} externo (27). Se ha propuesto también que los cationes divalentes Ca^{++} y Mg^{++} compiten con los cationes monovalentes H^+ , K^+ y Na^+ , para ocupar los sitios de enlace en los espacios libres de Donnan (?). En un experimento donde se elevaron los niveles de NaCl de 0 a 250 mM en el exterior de la planta, se encontró que el Na^+ desplaza de manera específica al Ca^{++} en la superficie externa del plasmalema, lo cual parece ser resultado de una semejanza entre los radios iónicos del cristal de ambos elementos (13). El aumento en los niveles de Na^+ y la disminución en la concentración de Ca^{++} en la hoja (Figura 11), pueden ser resultado de un fenómeno semejante.

En forma inversa al Ca^{++} , el Mg^{++} incrementa su nivel hasta en un 23% cuando la sal se presenta en una concentración de 100 mM en el medio, pero en forma similar al primero, el Mg^{++} incrementa en un 20% su concentración en el 7° y 14° día, conservándose el efecto causado por el NaCl. De este modo, el factor salinidad ($Fe = 20.25$, $Pt = 4.02$) y el factor tiempo ($Fe = 161$, $Pt = 5.39$) tampoco interactúan aquí para provocar los cambios en los niveles de Mg^{++} ($Fe = 2.95$, $Pt = 3.17$).

Se ha observado que cuando un ión esencial se presenta en niveles deficientes en la solución nutritiva, su concentración en el tejido vegetal se ve redu-

cida. En forma interesante, otros cationes son absorbidos en cantidades equiva-
lentes (34). La idea general es que un incremento en la concentración de un ca-
tión en el medio nutritivo, deprime los niveles de otros cationes en la planta.
Un antagonismo entre cationes ha sido propuesto por varios autores para expli-
car este fenómeno (2, 7, 17) y como se mencionó en párrafos anteriores, tam-
bién puede explicar el comportamiento de los iones Na^+ y Ca^{++} obtenido en el --
presente trabajo.

Por otro lado, se piensa que en las células existe un intercambio no espe-
cífico de iones que ayuda a mantener el balance electrostático. El incremento
de ciertos cationes en el tejido vegetal no es necesariamente resultado direc-
to de efectos de competencia por el acarreador (34). Tomando en cuenta lo ante-
rior, las plantas han sido clasificadas dentro de dos principales categorías -
(8): 1.- Las plantas que inhiben "constante equivalencia catiónica"; aquellas
en las que un decremento en el contenido de K^+ puede ser compensado por un in-
cremento equivalente de Na^+ o por un aumento de Mg^{++} en un 50%aproximadamente
de la concentración molar del K^+ perdido; y 2.- Las plantas que no cumplen es-
ta regla.

Las formas complementarias de las curvas de concentración de Ca^{++} y Mg^{++}
de las plantas expuestas a diferente salinidad (Figura 12), indican que el --
 Mg^{++} contribuye a compensar la deficiencia de Ca^{++} causada por un incremento -
de sal en el medio de crecimiento. Un aumento en la concentración de Ca^{++} y -
 Mg^{++} ligado al incremento en la edad ha sido anteriormente reportado en Cucu-
nis sativus (6). La función principal de estos cationes es la de mantener con-
diciones fisicoquímicas óptimas para reacciones enzimáticas, proceso de trans-
porte y estructura de la membrana (8). Un aumento en la concentración de es-
tos iones posiblemente sea necesario para que estos eventos celulares no se -
vean alterados durante el desarrollo del vegetal.

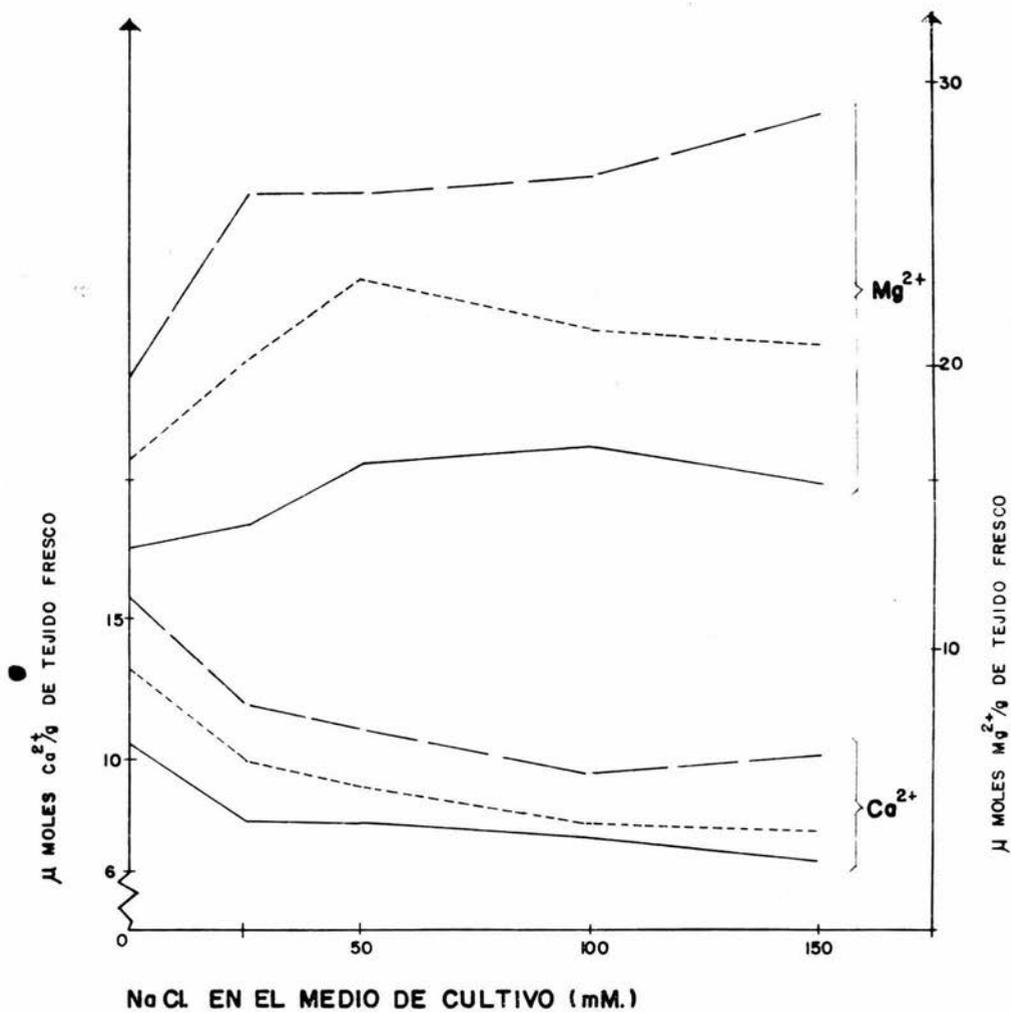


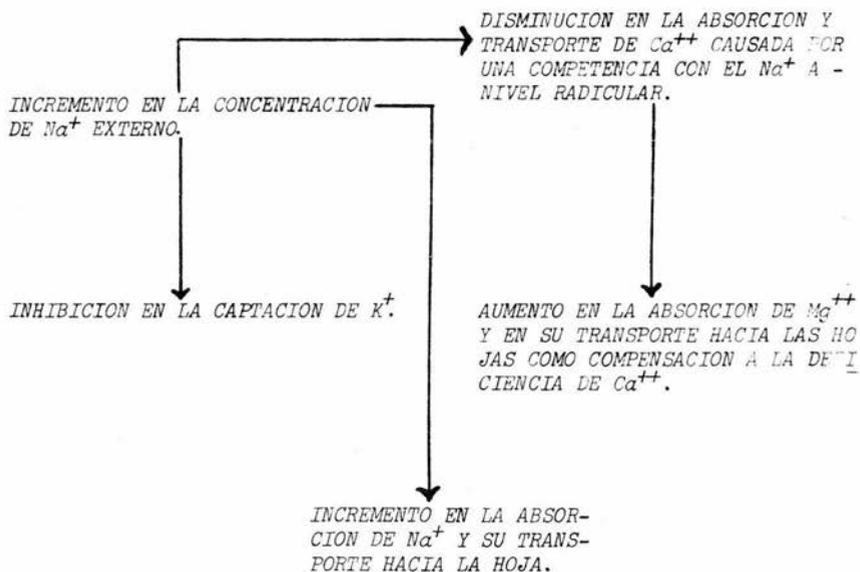
FIGURA 12.- CONCENTRACION DE LOS CATIONES Ca^{2+} Y Mg^{2+} DE LOS CULTIVOS CRECIDOS EN DIFERENTE SALINIDAD DURANTE 3 (—), 7 (-----) Y 14 DIAS (— · —).

El K^+ no presenta un comportamiento similar en los diferentes días como fue el caso de los otros cationes. En el 3° día de crecimiento, se observa una disminución del 20% cuando existe 150 mM de la sal, mientras que en los otros dos días de estudio la concentración de este catión no varía considerablemente. Se sabe que el Na^+ compite con el K^+ durante su absorción a través de la raíz (2, 7). La disminución del ión potasio causada por la sal en el 3° día de crecimiento (Figura 11), puede ser debida a una inhibición durante su captación, -- causada por un exceso de Na^+ . Al mismo tiempo, el aumento de Na^+ en la hoja puede contribuir a mantener la electroneutralidad durante la disminución del K^+ . Se ha encontrado que la concentración de K^+ presente en el tallo de *Triticum aestivum*, es superior a la necesaria para una máxima actividad enzimática, por lo que se le ha atribuido un papel adicional a este ión, el de mantener la turgencia celular (34); La sustitución del K^+ por Na^+ podría estar relacionada con esta actividad, cuando este último parece tener menos relación con la función enzimática.

El comportamiento del K^+ en los días 7° y 14° es difícil de explicar al no guardar relación con el de los otros iones. Se sabe que la selectividad por los iones K^+ y Na^+ no sólo varía entre las diferentes especies de plantas superiores, una distinta selectividad entre los órganos de una planta como son la raíz, el tallo y las hojas suele también presentarse. Aún más, diversos mecanismos de selectividad pueden operar en el mismo órgano. Al ser la raíz el órgano más utilizado para los estudios sobre selectividad iónica, diversos experimentos han demostrado que la epidermis, la endodermis, el xilema parenquimoso, el plasalema cortical y el tonoplasto pueden estar implicados en la selectividad por los iones Na^+ y K^+ (35). Cambios durante el desarrollo del sistema radicular o de algún otro órgano involucrado en esta selectividad iónica, pueden ser la causa de los diferentes efectos que tiene la salinidad sobre la con

centración de K^+ foliar en los tres diferentes días de estudio.

Los resultados anteriormente discutidos y el alto coeficiente de correlación encontrado entre los cambios de concentración de los pares Na^+ externo- Na^+ interno, Na^+ - Ca^{++} , Ca^{++} - Mg^{++} y Na^+ - K^+ (en este último al menos para el 3° día de crecimiento), sugiere que la siguiente interacción intercasiónica se deriva del incremento en la concentración de NaCl en plantas con 3, 7 y 14 días de crecimiento.



Contenido catiónico y actividad enzimática

Varios autores han reportado que las enzimas aisladas de plantas expuestas a un stress salino presentan cambios en su actividad (3,23,38,39). Algunos de estos trabajos muestran que la salinidad al ser expuesta de esta manera puede estimular la actividad enzimática (3,23), mientras que en otras investigaciones señalan que dicho factor puede incrementar la actividad de ciertas enzimas y reprimir la de otras en la misma planta estudiada (38,39). Pocos son los trabajos en donde se mencionan las posibles causas de las variaciones encontradas en la actividad enzimática. Se ha dicho que los cambios de esta actividad pueden ser debidos a: 1.- Un cambio en la concentración de enzimas preexistentes; 2.- Un cambio en el tipo de enzima (s) en el sistema y/o 3.- Una modulación de la actividad de la enzima ya existente (31).

En un estudio donde se agregó amonio al medio de crecimiento de plantas de arroz, se observó que la actividad de NAD-GDH de rafa se incrementaba, al mismo tiempo que una nueva isoenzima aparecía (40). Estudios posteriores con leucina marcada con C^{14} demostraron que este incremento en la actividad de GDH de rafa era resultado de una síntesis proteica "de novo". Como se mencionó en párrafos anteriores, el incremento de NaCl en el exterior de las plantas de sorgo, trae consigo cambios en los patrones isoenzimáticos de NADP-IDH (Figura 6). Estos cambios, de manera diferente a lo encontrado en el estudio citado anteriormente, parecen ser resultado de un efecto iónico más que de una síntesis enzimática "de novo", lo cual es apoyado por los siguientes puntos:

- 1.- El análisis estadístico de correlación múltiple aplicado, muestra un alto valor de correlación negativo entre la actividad de las tres isoenzimas de la deshidrogenasa de isocitrato y la concentración del ión calcio existente en la hoja.
- 2.- La presencia de EDTA en el medio de homogeneización utilizado para la

separación de las fracciones celulares, ocasiona la aparición de las tres isoenzimas de NADP-IDH (Figura 3), mientras que en las hojas del mismo cultivo tratadas sin el agente quelante, sólo aparece la isoenzima II (Figura 1). Esto indica que el Ca^{++} tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de dicha enzima.

- 3.- En un pequeño experimento en donde se probó el efecto de los cationes sobre la actividad de la NADP-IDH "in vitro" (Tabla I), se observó que el Ca^{++} en una concentración 18 mM, que correspondería a la que presentaron las hojas del cultivo control con 14 días de crecimiento, inhibe totalmente a dicha enzima, mientras que una concentración 35 mM de Mg^{++} , correspondiente al cultivo crecido en 150 mM de la sal durante 14 días, la activa en un 55%. Aún cuando el análisis estadístico no demuestra la existencia de una relación Mg^{++} actividad de IDH "in vivo", los resultados experimentales sugieren que ésta sí se presenta. En la misma tabla I se observa en la columna del cultivo expuesto a la sal, que la actividad en ausencia de iones se incrementa en un 66% con respecto a la de la enzima del cultivo control (un incremento semejante a cuando está el Mg^{++} "in vitro" en el grupo control). Dicha actividad no se ve alterada por la presencia del Mg^{++} como es el caso de la de este último, lo cual indica que la enzima viene ya activada por el Mg^{++} desde antes del ensayo "in vitro". Los cationes monovalentes prácticamente no tuvieron efecto cuando se presentaron "in vitro", a una concentración similar a la que se encontró como la más alta en la hoja (datos no presentados).

Los resultados mencionados anteriormente sugieren que la baja actividad de las isoenzimas de NADP-IDH en el grupo de las plantas control, está dada por un efecto inhibitorio causado por la alta concentración de Ca^{++} existente

en sus hojas. Mientras que el aumento en la actividad de las mismas enzimas en los grupos experimentales, es resultado de un efecto activador causado por el incremento en los niveles de Mg^{++} . En estudios anteriores (43,53), se demostró que el Mg^{++} activa la NADP-IDH cuando actúa en el sentido de la reacción enzimática utilizado en el presente trabajo.

Desde hace tiempo se sabe que los iones metálicos juegan un papel importante como cofactores esenciales en ciertas reacciones enzimáticas. El interés por esta clase de estudios se ha ido intensificando en los últimos años, al observarse que estos fenómenos no son importantes sólo para contribuir a aclarar los mecanismos enzimáticos, sino también por el enorme interés que tiene el control de las reacciones enzimáticas mediante cambios en la concentración de los iones Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} en la función integrada de los sistemas biológicos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, los mecanismos de inhibición y activación enzimática causados por iones inorgánicos son poco conocidos, pero se sugiere que sus efectos se presentan cuando el ión se enlaza a la enzima (23).

En mamíferos, un gran número de trabajos sugieren que la actividad de varias enzimas del ciclo del ácido cítrico, entre ellas la NAD-IDH, pueden ser influenciadas marcadamente por bajas concentraciones de Ca^{++} , pero parece no existir efecto alguno sobre la NADP-IDH (60). La concentración del catión manejada en esas investigaciones fluctúa entre 0.1 y 1.0 μM , menos de la milésima parte de la concentración de Ca^{++} encontrada en las hojas de sorgo (7 a 18 mM). La inhibición de la enzima encontrada en el presente estudio, podría ser explicada por esta alta concentración del ión calcio, cuando es bien conocido que los iones activadores pueden inhibir a concentraciones elevadas. Por otro lado, se ha encontrado que las enzimas Carboxilfosfato sintetasa y Piruvato carboxilasa requieren de Mg -ATP y Mg^{++} libre para su activación, pero son inhibidas por el Ca^{++} que compete con el Mg^{++} (60). En sorgo, parece existir una competencia similar

entre ambos iones, para alterar la actividad de la NADP-IDH, ya que un nivel alto de Mg^{++} en la hoja está ligado con una elevada intensidad de todas sus isoenzimas, mientras que en el grupo control, donde existe una alta concentración de Ca^{++} , sólo una isoenzima hace aparición y con una intensidad apenas perceptible (Figura - 6, 7 y 8).

ION	CULTIVO CONTROL. ACTIVIDAD	CULTIVO CRECIDO EN 150 mM DE NaCl. ACTIVIDAD.
LIBRE DE ION	100%	166%
Ca^{++} 16 mM	0%	0%
Mg^{++} 35 mM	155%	166%
MANITOL 280 mM	96%	166%

TABLA 1.- EFECTO DE LOS CATIONES Ca^{++} y Mg^{++} SOBRE LA ACTIVIDAD DE NADP-IDH "in vitro".

Previo a la realización de su cinética, se obtuvo una curva de pH para ambas enzimas (Figura 13). El valor óptimo para la deshidrogenasa de isocitrato fue de 8.0, semejante al encontrado para las enzimas de corazón e hígado de rata (32). - Para la enzima MDH, se observó que esta presenta su máxima actividad en un rango de pH de 7.6 a 8.0, lo cual ya ha sido reportado para las enzimas peroxisomal y - soluble de hojas de espinaca y semilla de alfalfa respectivamente (37,38). Las - cinéticas fueron obtenidas y las constantes K_m y V_{max} de las enzimas de los cultivos crecidos en diferente salinidad se calcularon para ayudar a corroborar si el incremento observado en la intensidad de las isoenzimas de IDH eran únicamente resultado de un cambio en la afinidad de la enzima por el sustrato (en párrafos anteriores se propone que es causado por cambios en la concentración de los iones - Mg^{++} y Ca^{++}). Además, la obtención de dichas constantes se realizó también con la finalidad de conocer si las enzimas de las plantas expuestas a diferente salinidad "in vivo" difieren en su cinética, ya que los trabajos que abordan este tema no presenta un cuadro claro (33, 36).

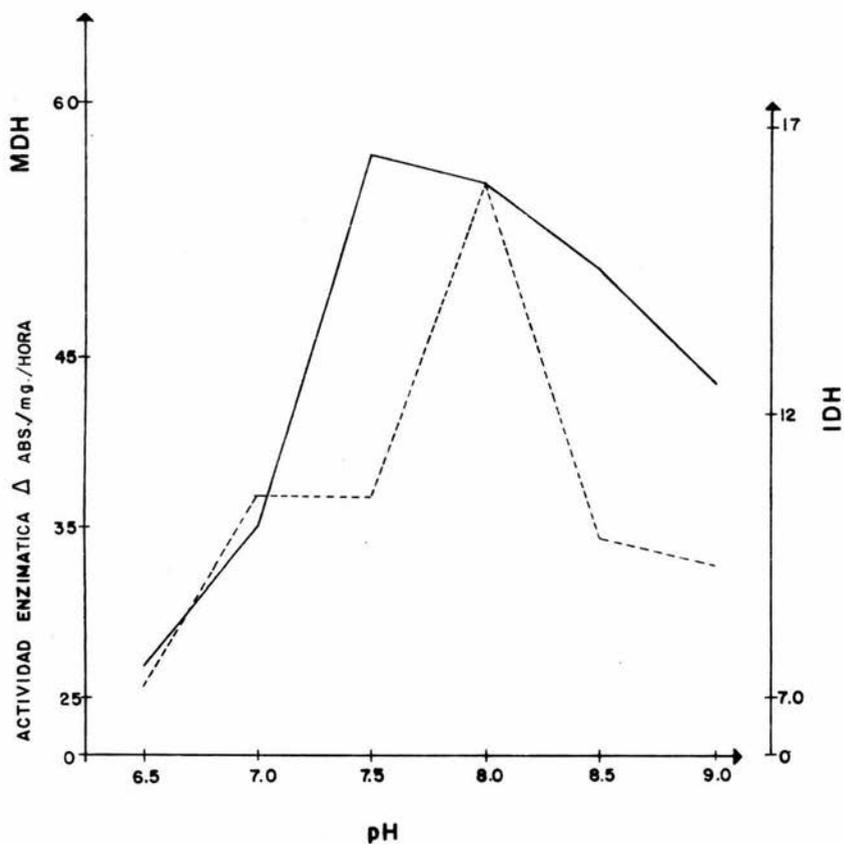


FIGURA 13.- EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS NAD-MDH (—) Y NADP-IDH (-----) DE HOJAS DE SORGO CRECIDO DURANTE 7 DIAS EN SOLUCION HOAGLAND.

En la Figura 14a, se puede observar que la gráfica de doble recíproco muestra cambios en las constantes de la enzima IDH cuando las plantas fueron expuestas a la sal. La exposición de las plantas a 25mM de NaCl lleva a un aumento en V_{max} , pero ningún cambio se presenta en su K_m (Tabla 2). Sin embargo, concentraciones mayores de 25 mM de la sal en el medio de crecimiento eleva la K_m sin que la V_{max} varíe. Observando la Figura 15 nos damos cuenta de que la máxima intensidad de la enzima en los geles (la suma de la intensidad presentada por las dos isoenzimas existentes en el séptimo día), que es reflejo de su actividad, la tiene el cultivo crecido en 25mM de NaCl, y sólo un pequeño decremento se observa en concentraciones superiores. el incremento en la actividad encontrado en 25mM de la sal, posiblemente es debido a un incremento en la síntesis enzimática, esto es sugerido por la ausencia de cambios en el valor de K_m . El aumento en la actividad encontrada en concentraciones mayores, parece estar dado por una mayor actividad de la enzima ya existente, pues un decremento en la K_m sugiere una mayor afinidad de la enzima por el sustrato. Esto último apoya la relación mencionada en párrafos anteriores, entre el incremento en la intensidad de las isoenzimas de IDH y los cambios en la concentración de Ca^{++} y Mg^{++} . Los cambios en los valores de K_m de IDH encontrados en concentraciones de sal superiores a 50 mM (Tabla 2), guardan una gran relación con los cambios encontrados en la suma del área bajo la curva del total de sus isoenzimas (Figura 16), ya que un decremento en dicha constante, cuando existe 100 mM de NaCl, trae como resultado una mayor intensidad en las isoenzimas, mientras que un incremento en la K_m hasta 13.22, cuando existe 150 mM de la sal, lleva a una menor actividad en sus isoenzimas.

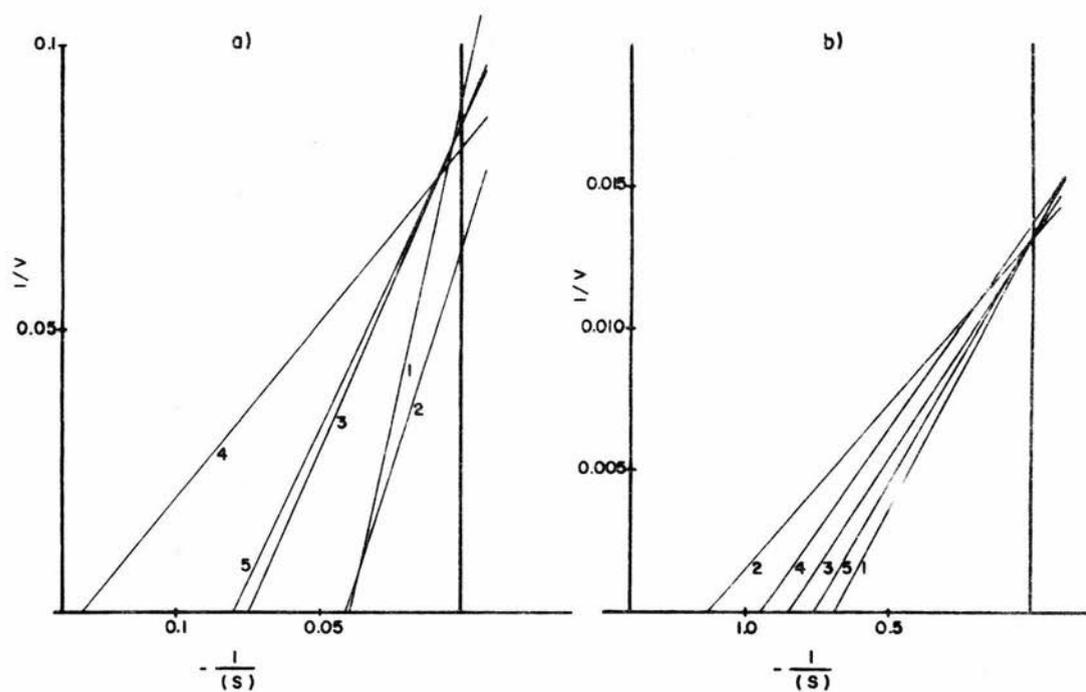


FIGURA 14.- CURVAS DE DOBLE RECÍPROCO PARA NADP-IDH (a) Y NAD-MDH (b) DE HOJAS DE SORGO CECIDO EN DIFERENTE CONCENTRACION DE NaCl DURANTE 7 DIAS. LAS LINEAS FUERON CALCULADAS UTILIZANDO UN ANALISIS DE REGRESION LINEAL. PLANTAS CECIDAS EN AUSENCIA DE SAL (1), 25 mM. (2), 50 mM. (3), 100 mM. (4) Y 150 mM. DE NaCl. (5).

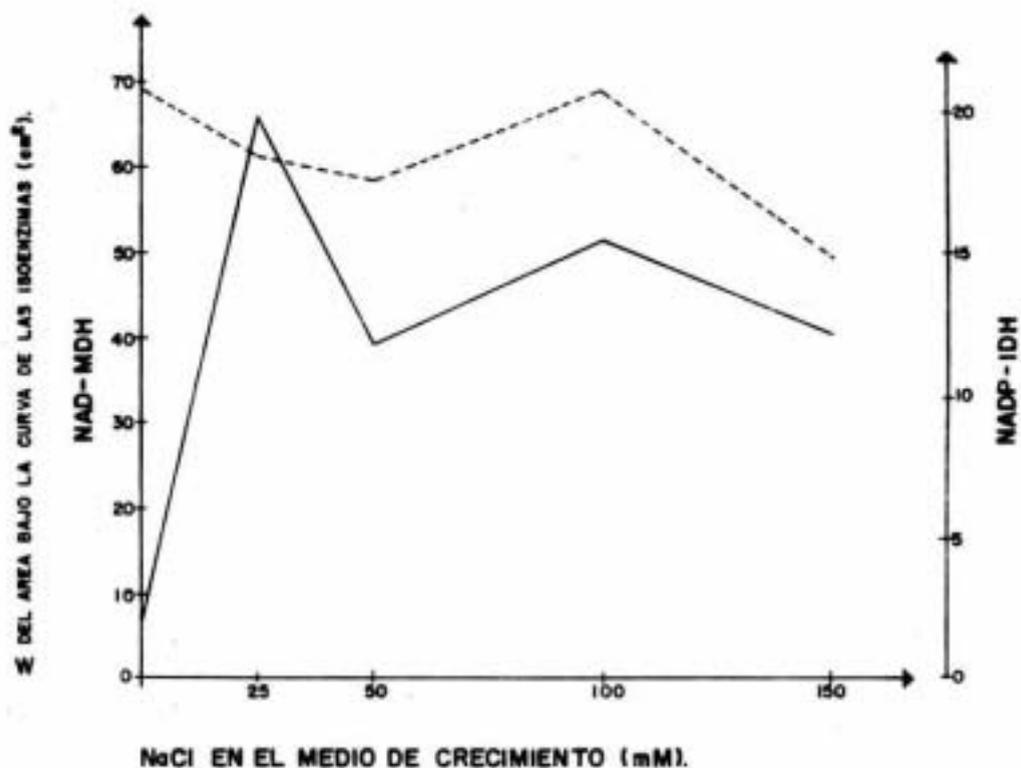


FIGURA 15.- AREA BAJO LA CURVA DEL TOTAL DE ISOENZIMAS DE NADP-IDH (—) Y NAD-MDH (-----) DE HOJAS DE SORGO CECIDO EN DIFERENTE CONCENTRACION DE NaCl DURANTE 7 DIAS.

NaCl EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO (mM)	NADP-IDH		NAD-MDH	
	Km	Vmax	Km	Vmax
0	25.91	11.58	1.47	76.61
25	24.20	16.32	0.89	74.61
50	14.12	11.83	1.16	77.71
100	7.82	12.41	1.06	71.95
150	13.22	11.89	1.34	79.45

TABLA 2.- VALORES DE Km (μ M) y Vmax (Δ ABS./mg/h) DE NADP-IDH y NAD-MDH DE HOJAS DE LOS CUCUJOS EXPUESTOS A DIFERENTE CONCENTRACION DE LA SAC DURANTE 7 DIAS (n=2).

Como se mencionó en la sección de resultados, en donde se habla sobre la localización celular de las enzimas, la ausencia de la deshidrogenasa de isocitrato que utiliza como coenzima al NAD^+ , sugiere que la forma mitocondrial de la NADP-IDH puede realizar la oxidación del total del isocitrato durante su participación en el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, los resultados también indican que la NADP-IDH presenta sus diferentes isoenzimas tanto en la fracción soluble como en la mitocondrial, lo cual dificulta el concluir si el incremento en la actividad de esta enzima, causado por la presencia del NaCl en el exterior de la planta (Figuras 7, 8 y 14a), se da solo en el interior de la mitocondria. Una mayor actividad de la enzima mitocondrial podría llevar a un aumento en la fosforilación oxidativa cuando el NADPH fuese utilizado por la transhidrogenasa para producir $NADH$ (Figura 4).

Refiriéndonos al comportamiento de las isoenzimas de NAD-MDH (Figuras 9 y 10), estas no parecen guardar relación con los cambios en la concentración de los iones mencionados. Los valores de correlación obtenidos del análisis estadístico aplicado fueron siempre muy bajos. Los cambios encontrados en el área bajo la curva de todas sus isoenzimas al exponer a la planta a diferente salinidad, no son tan drásticos como los encontrados en IDH (Figura 15). Asimismo, los efectos de los catio-

nes "in vitro" (datos no presentados), son menores que los que tienen sobre la -
IDH, siendo el ión calcio el que inhibe en mayor grado (aproximadamente en un 50%)
cuando se agrega al medio de reacción en una concentración similar a la que se -
presentaba como la más alta en la hoja.

Los valores de las constantes cinéticas de NAD-MDH (Tabla 3 y Figura 14b), k
no guardan relación con los cambios encontrados en los patrones isoenzimáticos, -
ya que mientras sólo unas pequeñas variaciones se presentan en estos últimos (Fi-
guras 9, 10 y 16), un notable decremento se da en los valores de k cuando se in-
crementa la sal en el medio (Figura 14b), sugiriendo que una mayor actividad de
la NAD-MDH se presenta cuando existe NaCl en el exterior de la rafa del vegetal.
La discordancia entre estos datos es difícil de explicar.

CONCLUSIONES.

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- La enzima NADP-IDH exhibe un máximo de 3 diferentes formas moleculares, las cuales están presentes tanto en la fracción soluble como en la mitocondrial, encontrándose la mayor parte de la actividad total de la enzima (83%) en la mitocondria. La NAD-MDH por su parte, presenta 5 isoenzimas, de las cuales 2 son específicas de la mitocondria y una del citosol. Esta enzima también presenta una mayor porción del total de su actividad en la fracción mitocondrial (75%).
- Los patrones isoenzimáticos de ambas enzimas presentan cambios durante el desarrollo del organismo, necesarios tal vez para el organismo enfrentar los distintos eventos moleculares que se presentan durante las etapas de estudio. La NADP-IDH disminuye hasta una isoenzima del 3° al 14° día de crecimiento, mientras que la NAD-MDH incrementa de 3 a 4 el número de formas moleculares, pasando por 5 en el 7° día.
- Los patrones isoenzimáticos de las dos enzimas obtenidas de los cultivos erg cidos en diferente concentración de NaCl, presentan diferencias entre sí. Las isoenzimas de NADP-IDH extraídas de plantas expuestas a la sal, muestran una mayor intensidad en los geles que la de las obtenidas del grupo control, - - siendo las enzimas del cultivo expuesto a 25 mM de NaCl las que presentan la máxima actividad. Las constantes cinéticas K_m y V_{max} de la enzima obtenida de los diferentes cultivos, sugieren que una baja concentración de la sal en el medio (25mM), lleva a un incremento en la síntesis de formas preexistentes, mientras que la exposición de las plantas a concentraciones más elevadas (hasta 150 mM), lleva a un incremento en la actividad, que no es resultado de un aumento en el número de moléculas activas, sino de un incremento en la afinidad de la enzima por el sustrato.

Los cambios en la intensidad de las isoenzimas de MDH obtenidas de los cultivos crecidos en diferente concentración de NaCl, son menos drásticos que los de IDH, pero más difíciles de explicar, ya que un pequeño decremento se presenta en la intensidad del total de sus isoenzimas cuando las plantas son expuestas a la sal, mientras que los valores de Km obtenidos de las enzimas de los diferentes cultivos, sugieren que se presenta una mayor actividad cuando el NaCl se encuentra en el medio de crecimiento.

- La alta actividad de las isoenzimas de IDH presente en las plantas crecidas en concentraciones de NaCl superiores a 25mM, guardan una estrecha relación con los niveles de los cationes Ca^{++} y Mg^{++} de la hoja. Las plantas crecidas en elevadas concentraciones de sal presentan una disminución en la absorción de Ca^{++} , que parece ser compensada por un aumento en la absorción y transporte de Mg^{++} . Ensayos realizados "in vitro" demuestran que mientras el Ca^{++} inhibe en un 100% la actividad de la enzima, el Mg^{++} la activa hasta en un 55% cuando son expuestas a concentraciones similares a las encontradas en la hoja. El incremento en la actividad enzimática parece estar dado por una baja concentración de Ca^{++} (menor inhibición) y/o por una alta concentración de Mg^{++} (activación).

Los niveles de los cationes monovalentes Na^+ y K^+ presentes en la hoja, no guardan relación con la actividad de la IDH, lo cual es apoyado por los estudios "in vitro" en donde estos cationes, en una concentración igual a la que se encontró en el total del tejido foliar, no afectan notablemente la actividad de la enzima.

Como conclusión final, podríamos decir que la exposición de plantas de sorgo a diferentes concentraciones de NaCl, trae consigo diferencias en los patrones isoenzimáticos y en la cinética de sus enzimas NADP-IDH y NAD-MDH de hoja. Estas diferencias parecen ser resultado de una distinta actividad enzimática causada

por una diferente concentración de ciertos cationes en la hoja, que es a su vez debida a una diferente concentración de NaCl en el medio de crecimiento. Los cambios encontrados por lo tanto, parecen presentarse como consecuencia de la presencia de NaCl en el medio pero no como respuesta para contrarrestar sus efectos tóxicos.

REFERENCIAS

- 1.- AITKEN, D. N., WICKEN, A. J. AND BROWN, A. D. 1970. Properties of a halophilic nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase. - *Biochem. J.* 116:125-134.
- 2.- AL-ANI, T. A. AND OUDA, N. A. 1972. Distributions of cations in bean plants grown at varying K^+ and Na^+ levels. - *Plant and Soil* 37:641-648.
- 3.- BEEF, S., SHOMER-ILAN, A. AND WEISEL, Y. 1975. Salt-stimulated phosphoenolpyruvate carboxylase in *Cakile maritima*. *Physiol. Plant.* 34:223-226.
- 4.- BELL, J. C. AND BARON, D. N. 1962. Isoenzymes of isocitric dehydrogenase. - *Biochem. J.* 82:5p-6p.
- 5.- BELL, J. C. AND BARON, D. N. 1964. Intracellular distribution of isocitrate dehydrogenase. *Biochem. J.* 90:8p.
- 6.- BENGTSSON, B. AND JENSEN, P. 1963. Uptake and distribution of calcium, magnesium and potassium in cucumber of different age. *Physiol. Plant.* 57:428-434.
- 7.- BERCEI, A., OLAH, Z., FEKETE, A. AND ERDEI, L. 1962. Potassium transport in wheat seedlings grown with different potassium supplies. *Physiol. Plant.* 55: 371-376.
- 8.- BERCEI, A., MOLLER, I. M., OLAH, Z., LUNDBORG, T. AND ERDEI, L. 1964. A model for cation content of plants based on surface potentials and surface charge densities of plant membranes. *Physiol. Plant.* 61: 529-534.
- 9.- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
- 10.- CAVALIERI, A. J. AND HUANG, A. C. 1977. Effect of NaCl on the "in vitro" activity of malate dehydrogenase in salt marsh halophytes of the U. S. *Physiol. Plant.* 41:79-84.
- 11.- CHEN, S., TOWILL, L. R. AND LOEWENBERG, J. R. 1970. Isoenzyme patterns in developing *Xanthium* leaves. *Physiol. Plant.* 23:434-443.
- 12.- CRAM, W. J. 1984. Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells. *Physiol. Plant.* 61:398-404.
- 13.- CRAMER, G. R., et al. 1985. Displacement of Ca^{++} by Na^{++} from the plasmalemma of root cells, *Plant. Physiol.* 79:207-211.
- 14.- CURRY, R. A. AND TING, I. P. 1973. Purification and crystallization of three isoenzymes of malate dehydrogenase from Zea mays seed. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:213-224.
- 15.- DANIEL, W. W. 1983. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Lima, México. p. 227.
- 16.- DAVIS, R. F. AND JAWORSKI, A. J. 1979. Effects of ouabain and low temperature on the sodium efflux pump in excised corn roots. *Plant Physiol.* 63:940-948.

- 17.- DEVITT, D., STOLZY, L. H. AND JARRELL, W. M. 1964. Response of sorghum and wheat to different K^+/Na^+ ratios at varying osmotic potentials. *Agron. J.* 76:681-688.
- 18.- DUNN, A. AND ARDITTI, J. 1968. *Experimental Physiology*. Holt, Rinehart and Winston Inc., New York. pp. 366.
- 19.- EPPENBERGER, E. M. 1975. The control of isoenzyme patterns in development. Ed: Weber, R., ed., *The biochemistry of animal development*, Vol. III. - - Academic Press, New York pp. 217-255.
- 20.- EFTSIN, E. 1966. Dual patterns of ion absorption by plant cells and by - - plants. *Nature* 212:1324-1327.
- 21.- ERDEI, L. AND KUIFER, F. C. 1979. The effect of salinity on growth, cation content, Na^+ uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol. Plant.* 47:85-99.
- 22.- FINE, I. H. AND COSTELLO, L. A. 1963. The use of starch gel electrophoresis in dehydrogenase studies. Ed: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds., *Methods in Enzymology*, Vol. VI. Academic Press, New York. pp. 958-972.
- 23.- FLOWERS, T. J., WARD, M. E. AND HALL, J. L. 1976. Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima*: some properties of malate dehydrogenase. *Trans. N. Soc. Lond. B.* 272:523-540.
- 24.- FLOWERS, T. J., TROKE, P. F. AND YEO, A. R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:89-121.
- 25.- GERSON, D. F. AND POOLE, R. J. 1972. Chloride accumulation by mung bean - root tips. *Plant Physiol.* 50:803-807.
- 26.- GREENWAY, H. AND OSMOND, C. B. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiol.* 49:266-269.
- 27.- GREENWAY, H. AND MUNNS, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- 28.- HASON-PORATH, E. AND POLJANOFF-MAYER, A. 1969. The effect of salinity on the malic dehydrogenase of pea roots. *Plant Physiol.* 44:1031-1034.
- 29.- HENDERSON, N. S. 1966. Isoenzymes of isocitrate dehydrogenase: subunit - structure and intracellular location. *J. Exp. Zool.* 158:262-274.
- 30.- HENDERSON, N. S. 1968. Intracellular location and genetic control of isoenzymes of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151:423-440.
- 31.- HOCHACHKA, P. W. AND SOMERO, G. N. 1973. *Strategies of biochemical adaptation*. W. B. Saunders Company, Philadelphia/London/Toronto. p. 2
- 32.- ISLAM, M., BELL, J. L. AND BARON, D. S. 1972. Purification and comparative properties of isoenzymes of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate---isocitrate dehydrogenase from rat heart and liver. *Biochem. J.* 129:1003-1011

- 33.- JENNINGS, D. H. 1976. The effects of sodium chloride on higher plants. *Biol Rev.* 51:453-466.
- 34.- JENSEN, P. 1968. Effects of interrupted K^+ supply on growth and uptake of K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} and Na^+ in spring wheat. *Physiol. Plant.* 58:259-266.
- 35.- JESCHKE, W. D. AND MASSEY, H. 1961. K^+ - Na^+ selectivity in roots of *Triticum*, *Helianthus* and *Allium*. *Physiol. Plant.* 62:217-224.
- 36.- JOHNSON, G. B. 1971. Metabolic implications of polymorphism as an adaptive strategy. *Nature* 232:347-349.
- 37.- JOHNSON, G. B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* 184:28-37.
- 38.- KALIN, A. AND POLJAKOFF-MAYBER, A. 1980. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacaoides* (L.) Aellen exposed to high sodium chloride concentrations. *Ann. Bot.* 47:75-86.
- 39.- KALIER, A., OMRI, G. AND POLJAKOFF-MAYBER, A. 1984. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacaoides* exposed to salinity. *Physiol. Plant.* 62:236-244.
- 40.- KANAMORI, T., KONISHI, S. AND TAKAHASHI, E. 1972. Inducible formation of γ -glutamyl dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiol. Plant.* 26:1-6.
- 41.- LE'JOHN, H. B. AND STEVENSON, R. M. 1976. Multiple regulatory process in γ -nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 251:3890-3900.
- 42.- LOWENSTEIN, J. M. AND SMITH, S. R. 1962. Intra- and extramitochondrial isocitrate dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Acta* 56:385-397.
- 43.- MALONEY, R. J. AND DENNIS, D. T. 1977. The role of divalent cations in the activation of the NADP-specific isocitrate dehydrogenase from *Pisum sativum* L. *Can. J. Biochem.* 55:928-934.
- 44.- MOORE, T. C. 1974. Polyacrylamide gel electrophoresis of plant proteins. - *In: Research experiences in plant physiology.* Springer Verlag, New York. - pp. 119-129.
- 45.- NICHOLLS, D. G. AND GARLAND, P. B. 1969. The control of isocitrate oxidation by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 114:215-226.
- 46.- O'SULLIVAN, S. A. AND WEDDING, R. T. 1972. Malate dehydrogenase isoenzymes in cotton leaves of different ages. *Physiol. Plant.* 26:34-36.
- 47.- O'SULLIVAN, S. A. AND WEDDING, R. T. 1972. Malate dehydrogenase isoenzymes from cotton leaves. *Plant Physiol.* 49:117-123.
- 48.- PATEL, P. M. WALLACE, A. AND WALLIHAN, E. F. 1975. Influence of salinity and N-P fertility levels on mineral content and growth of sorghum in sand culture. *Agron. J.* 67:622-625.

- 49.- PYE UNICAM Ltd., ed. 1975. Atomic absorption spectrophotometry with the Pye Unicam SP 1900 and SP 190 Series instruments. England. s.p.
- 50.- RAINS, D. W. AND EPSTEIN, E. 1967. Sodium absorption by barley roots: role of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol.* 42:314-318.
- 51.- ROCHA, V. AND TING, I. P. 1970. Tissue distribution of microbody, mitochondrial and soluble malate dehydrogenase isoenzymes. *Plant Physiol.* 46:754-756.
- 52.- ROCHA, V. AND TING, I. P. 1971. Malate dehydrogenases of leaf tissue from *Spinacia oleracea*: properties of three isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 147:114-123.
- 53.- SATOH, Y. AND NAKAMURA, Y. 1984. Characteristic of the reverse reactions - of the NADP-isocitrate dehydrogenase from castor bean seeds. *Physiol. - Plant.* 62:561-565.
- 54.- SCANDALIOS, J. G. 1974. Isoenzymes in development and differentiation. *Ann Rev. Plant Physiol.* 25:225-258.
- 55.- SIEGEL, S. M., SIEGEL, B. Z., MASSEY, J., LARNE, P. AND CHEN, J. 1980. Growth of corn in saline waters. *Physiol. Plant.* 50:71-73.
- 56.- STOCKING, C. R. 1958. Precipitation of enzymes during isolation of chloroplasts in carbowax. *Science* 125:1032-1033.
- 57.- WEINBERG, R. 1967. Effect of sodium chloride on the activity of a soluble malate dehydrogenase from pea seeds. *J. Biol. Chem.* 242:3000-3006.
- 58.- WEINBERG, R. 1968. An electrophoretic analysis of the isoenzymes of malate dehydrogenase in several different plants. *Plant Physiol.* 43:823-828.
- 59.- WEINBERG, R. 1970. Enzyme levels in pea seedlings grown on highly salinized media. *Plant Physiol.* 46:466-470.
- 60.- WILLIAMSON, J. R. AND COOPER, R. H. 1980. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *Feds Lett.* 117:K73-K85.
- 61.- YAMAMOTO, C. R. 1981. A metabolic pathway of isocitric acid in cotyledons of a bean *Vigna sesquipedalis*. *Plant Cell Physiol.* 2:377-389.
- 62.- YAMAMOTO, Y. 1969. Relative activities of NAD- and NADP-isocitric dehydrogenase in bean mitochondria modified by glycerol or NADP. *Plant Physiol.* 44:262-266.
- 63.- YAMAZAKI, R. K. AND TOLBERT, N. E. 1969. Malate dehydrogenase in leaf peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 178:11-20.
- 64.- YEO, A. R. AND FLOWERS, T. J. 1984. Nonosmotic effects of polyethylene glycols upon sodium transport and sodium-potassium selectivity by rice roots. *Plant Physiol.* 75:298-303.
- 65.- ZOUROS, E. 1975. Electrophoretic variation in allelozymes related to function or structure?. *Nature* 254:446-448.