

MEDIDA DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASICA, NADH DEPENDIENTE, EN CELULAS INTACTAS DE COTILEDONES DE *CITRULLUS VULGARIS* L.

por

C. VICENTE e IRENE OLCINA

INTRODUCCIÓN

En nuestro intento de estudiar reacciones enzimáticas *in vivo* en células intactas ha sido previamente descrito que el tratamiento de cortes de tejido parenquimatoso, obtenido de cotiledones de *Citrullus vulgaris*, por alcoholes hacía posible estimar la actividad ureásica celular con rendimientos superiores a los obtenidos con extractos libres de células (1). La acción de los alcoholes se identificó como una esterificación de las fracciones pécticas de las paredes celulares, lo que tenía como consecuencia el aumento en la población de agua presente en los espacios intercelulares y, por tanto, una mayor difusibilidad del sustrato de reacción hacia células más profundas. El ser la ureasa un enzima de pared simplificaba el procedimiento (2).

Sin embargo, la acción de los alcoholes sobre la membrana celular podría ser inverso al efecto encontrado sobre la pared. Una deshidratación de los enzimas de membrana abocaría en una mayor dificultad para la permeación de sustancias hidrosolubles, posibles sustratos de reacciones enzimáticas de enclave citoplásmico. Si se confirmara este extremo, el método descrito previamente sería válido sólo para enzimas de pared pero inaplicable para el resto de los enzimas celulares.

Como enzima citoplásmico se ha escogido nitrato reductasa, cuyo sustrato es hidrosoluble y cuyas características habían sido estudiadas ya para la misma fuente (3).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado semillas de *Citrullus vulgaris* L., variedad comercial valenciana, con un poder germinativo del 95 por 100, según el método del tetrazolium (4). La actividad nitrato reductásica se estimaba incubando en un volumen final de 2 ml cortes de semillas previamente pesados, 75 μ moles de nitrato potásico, 60 μ moles de fosfato de pH 6,9 y 0,4 μ moles de NADH. La reacción se detenía al cabo de quince minutos retirando el tejido y adicionando 1 ml de sulfanilamida al 1 por 100 en CIH 1,5 N, seguido de 1 ml de N(1-naftil)-etilendiamina al 0,02 por 100. El color se desarrolla al cabo de treinta minutos, midiéndose a 540 μ m. La actividad enzimática se estima, pues, como μ moles de nítrito formados/minuto/g de peso fresco.

En los ensayos con disolventes orgánicos, el tejido se mantiene en contacto con ellos a 37° y a las concentraciones y tiempos que se indiquen. Las medidas de la actividad enzimática para extractos libres de células se llevan a cabo de igual manera, preparando los extractos como previamente se ha descrito (1).

RESULTADOS

En la tabla I se expresan los resultados obtenidos tratando previamente los cortes con propilenglicol a las concentraciones y los tiempos señalados. Según estos resultados, la actividad nitrato reductásica permanece indetectable cuando el tejido se preincuba con propilenglicol al 1 por 100, lográndose la máxima detección para la concentración del 5 por 100.

Cuando el disolvente utilizado en la preincubación es propanol-2, la actividad nitrato reductásica es detectable para todas las concentraciones y tiempos ensayados, siendo máxima para una concentración del 3 por 100 (tabla II).

En la tabla III se exponen los resultados obtenidos para tratamientos de los tejidos con cloroformo o tolueno puros. En ambos casos la actividad nitrato reductásica es fácilmente mensurable.

Para constatar que no existen pérdidas de actividad por tratamiento del tejido a las concentraciones óptimas de propilenglicol y propanol-2 se evaluó la actividad nitrato reductásica en extractos libres de células

TABLA I .

Efecto del propilenglicol sobre la medida de actividad nitrato reductásica en cotiledones de sandía

Concentraciones del alcohol %	Actividad nitrato reductásica			
	Control	Tiempo de preincubación (minutos)		
		30	45	60
—	0,01			
1		0,00	0,00	0,00
3		4,93	4,94	5,76
5		5,99	5,56	9,73
7		5,05	5,17	7,28
10		3,35	3,42	7,18

TABLA II

Efecto del propanol-2 sobre la medida de actividad nitrato reductásica en cotiledones de sandía

Concentraciones del alcohol %	Actividad nitrato reductásica			
	Control	Tiempo de preincubación (minutos)		
		30	45	60
—	0,01			
1		2,48	5,14	5,46
3		5,94	10,47	10,38
5		5,84	5,98	8,67
7		5,75	5,98	7,23
10		0,43	3,83	3,75

TABLA III

Efecto de cloroformo y tolueno sobre la medida de actividad nitrato reductásica en cotiledones de sandía

C o m p u e s t o	Actividad nitrato reductásica		
	Tiempo de preincubación (minutos)		
	30	45	60
Cloroformo.....	1,49	1,43	2,30
Tolueno.....	1,33	4,21	3,33

TABLA IV

Efecto del propilenglicol y propanol-2 sobre la medida de actividad nitrato reductásica en extractos libres de células de cotiledones de sandía

T r a t a m i e n t o	Actividad nitrato reductásica
Tampón fosfato 75 mM (pH 6,9).....	0,37
Propilenglicol 5 %/.....	0,87
Propanol-2 3 %/.....	0,42

no pretratados o preincubados con ambos disolventes a las concentraciones y tiempos estimados como óptimos. Como se demuestra en la tabla IV, ambos tratamientos multiplican la actividad detectada con respecto a los extractos que no han sufrido ningún tipo de pretratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos son claramente expresivos. El tratamiento de tejido parenquimatoso intacto de cotiledones de sandía con propilenglicol, propanol-2, cloroformo o tolueno incrementa los valores de medida de actividad nitrato reductásica con respecto a controles que no han sufrido tratamiento previo. El esperado efecto de disminución de actividad se observa solamente para las concentraciones más altas de propilenglicol o propanol-2, aunque, incluso en este caso, los valores obtenidos son superiores a los controles. Idéntico efecto se logra para extractos libres de células, interpretándose que el tejido, superhidratado en sus espacios intercelulares, es más asequible a la disgregación. La pérdida en la actividad cuando se incrementan las concentraciones de ambos alcoholes puede ser explicada, tanto en términos de modificación de la permeabilidad de membrana como debida a inactivación parcial del enzima si la concentración de alcohol en el citoplasma celular alcanza niveles demasiado altos.

RESUMEN

El tratamiento de cotiledones de *Citrullus vulgaris* con propilenglicol al 5 por 100 y propanol-2 al 3 por 100 provoca un aumento considerable en el rendimiento de medida de actividad nitrato reductásica, tanto en tejido intacto como en extractos libres de células. Este hecho está relacionado con el aumento del contenido en agua de los espacios intercelulares por esterificación de los ácidos poligalacturónicos de pared por los alcoholes utilizados en el tratamiento.

SUMMARY

The treatment of the intact tissue of the *Citrullus vulgaris* cotyledons with propilenglycol and propanol-2 at the 5% and 3% respectively provokes an increase in the output of nitrate reductase activity measurement. This increase is due to higher facility to the nitrate penetration in the intracellular spaces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Vicente, C., Olcina, I. — *Rev. Esp. Fisiol.*, 30: 71, 1974.
- (2) Vicente, C., Villalobos, N., Hernández, A. J. — *Anal. Inst. Bot. Cavanilles*, 32 (1): 269 1,975.
- (3) Villalobos, N. — Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Salamanca, 1974.
- (4) Porter, R. H., Durrell, M., Romm, H. J. — *Plant Physiol.*, 22: 149, 1947.

Cátedra de Fisiología Vegetal
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid