

Localización subcelular de cuatro sistemas enzimáticos en pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*)

A. BERNAL, J. DÍAZ & F. MERINO

*Departamento de Biología Animal y Biología Vegetal. Facultad de Ciencias
Universidad de La Coruña. 15071 La Coruña. España*

Resumen

BERNAL, A., DÍAZ, J. & MERINO, F. (1993). Localización subcelular de cuatro sistemas enzimáticos en pimiento de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 4: 59-67

Se han aislado cloroplastos a partir de hojas de pimiento de Padrón, con objeto de investigar la localización subcelular de los sistemas enzimáticos 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH; EC 1.1.1.44), fosfogluco isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), fosfogluco mutasa (PGM; EC 2.7.5.1.) y siquímico deshidrogenasa (SKDH; EC 1.1.1.25). Los resultados muestran como una de las dos isoenzimas de cada sistema, se encuentra localizada en el cloroplasto. El estudio del lixiviado de polen nos ha permitido obtener la otra isoenzima, localizada en el citosol, con lo cual se confirma la doble compartimentación citosólica y cloroplástica de estas enzimas, ya conocida en otras especies.

Palabras clave: Cloroplasto, isoenzima, 6-PGDH, PGM, PGI, SKDH, citosol, polen, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*.

Abstract

BERNAL, A., DÍAZ, J. & MERINO, F. (1993). Subcellular location of four enzymatic systems in Padrón pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 4: 59-67

In order to know the subcellular location of the enzymatic systems 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH; EC 1.1.1.44), phosphoglucomutase (PGM; EC 2.7.5.1), phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9) and shikimate dehydrogenase (SKDH; EC 1.1.1.25), chloroplasts have been isolated from Padrón pepper leaves. The electrophoretic analyses show that one of the two isoenzymes of each system is placed in the chloroplast. Studing the pollen lixiviated we have obtained the other isoenzyme, placed in the cytosol; therefore the double cytosolic and chloroplastic location of these enzymes, also demonstrated for other species, has been confirmed.

Key words: Chloroplast, isoenzyme, 6-PGDH, PGM, PGI, SKDH, cytosol, pollen, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*.

INTRODUCCION

La mayoría de los datos experimentales obtenidos acerca de las isoenzimas vegetales en los últimos años no solamente han ayudado a cono-

cer la estructura de las poblaciones y las relaciones filogenéticas entre especies afines, sino que también han permitido revelar algunos rasgos característicos de casi todos los sistemas enzimáticos. Entre los más importantes se encuentran la estabilidad del número de loci para

sistemas enzimáticos específicos y la consecuente compartimentación subcelular de las isoenzimas. Este fenómeno fue analizado en profundidad por GOTTLIEB (1982), e investigaciones posteriores han confirmado y ampliado, en general, estas conclusiones.

La compartimentación de las funciones celulares es un rasgo típico de los organismos superiores, la cual es necesaria por razones de tipo energético y es de fundamental importancia en los procesos de metabolismo celular, regulación y diferenciación. En las plantas, el número de isoenzimas de un sistema enzimático particular, a menudo refleja el número de compartimentos subcelulares en los cuales se requiere la misma actividad enzimática (GOTTLIEB, 1982), y de hecho esto es frecuente en los cloroplastos y en el citosol.

Existen trabajos que demuestran la doble compartimentación, citosólica y cloroplástica, de las enzimas de la glicolisis y de la ruta de las pentosas fosfato en diferentes especies. Asimismo, algunos autores han sugerido idéntica compartimentación para la ruta del ácido siquímico, perteneciente al metabolismo secundario y responsable de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (JENSEN, 1985). En pimiento prácticamente no se ha estudiado la localización de las citadas rutas, y los trabajos realizados en otras solanáceas son escasos o inexistentes.

Todo ello nos ha llevado a estudiar la localización subcelular de los sistemas enzimáticos 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH; EC 1.1.1.44), fosfogluco isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), fosfogluco mutasa (PGM; EC 2.7.5.1) y siquímico deshidrogenasa (SKDH; EC 1.1.1.25), en *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, utilizando técnicas de fraccionamiento subcelular y de purificación de orgánulos, para la obtención de cloroplastos. Simultáneamente se ha obtenido la fracción citosólica por medio del lixiviado de polen. La posterior comparación de la fracción cloroplástica y de la fracción citosólica, con la de extractos de hojas por medio de electroforesis, nos ha permitido identificar las diferentes isoenzimas con su correspondiente compartimento subcelular, lo que constituye el objeto del presente trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron hojas de plantas de pimiento *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cultivadas en invernadero.

Aislamiento y purificación de cloroplastos

Todas las operaciones se realizaron a 4°C. Para el aislamiento y purificación de cloroplastos se empleó el método de PALMA *et al.* (1986), que es una modificación del método descrito por SCHWITZGUEBEL & SIEGENTHALER (1984). Las hojas se homogeneizaron en un medio que contenía manitol 0,35M, cisteína 4mM, EDTA.Na2 1mM, BSA al 0,2% en tampón MOPS-KOH 30mM pH 7,5 con una proporción 1:2, p:v. El homogeneizado se filtró a través de 8 gasas y una tela de Mira cloth (40µ de diámetro de poro), y el eluido resultante se centrifugó a 80g durante 1 minuto. El sobrenadante de esta primera centrifugación, se sometió a continuación a una centrifugación de 3000g durante 1 minuto. El precipitado, enriquecido en cloroplastos, se resuspendió cuidadosamente con ayuda de un pincel n° 4, en un medio de lavado que contenía manitol 0,3M, EDTA.Na2 1mM, BSA al 0,2% en tampón MOPS-KOH 20 mM pH 7,2 y se centrifugó nuevamente a 3000g durante 1 min.

El nuevo precipitado de cloroplastos lavados se resuspendió en un volumen mínimo de medio de lavado (1-2ml), depositándose 1ml de esta suspensión sobre un gradiente discontinuo de Percoll, con la siguiente composición: 1,3ml al 60%; 3,1ml al 45%; 2ml al 27% y 2ml al 21% de Percoll (v/v). Las últimas capas estaban suplementadas con 1,2-propanodiol 0,1M. Los gradientes se prepararon en tampón MOPS-KOH 10mM pH 7,2, conteniendo sacarosa 0,25M y BSA al 0,2%.

El gradiente se centrifugó a 20.000g durante 30 minutos, y a continuación se eluyó por desplazamiento ascendente de sacarosa (45%) empleándose un fraccionador de gradientes. Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1ml.

Estudio del gradiente

La concentración de clorofila se determinó según el método de ARNON (1949). La determinación de la densidad aproximada de las soluciones de Percoll se llevó a cabo, a temperatura ambiente, con un refractómetro de mano Shibuya (p/p). La integridad de los cloroplastos aislados se determinó por el método de LILLEY *et al.* (1975) basado en la reducción del ferricianuro, siguiendo la disminución de la absorbancia a 410nm.

Medida de actividades enzimáticas

La medida de la actividad citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1) usando citocromo c reducido como sustrato, se realizó de acuerdo con SCHNARRENBURGER *et al.* (1971). Las actividades enzimáticas se calcularon utilizando un ϵ_{550} de $21 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del citocromo c reducido (TOLBERT *et al.*, 1968).

Para medir la actividad hidroxipiruvato reductasa (EC 1.1.1.29) se utilizó el método descrito por TOLBERT *et al.* (1970), y en el caso de la fosfoenol piruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31) se utilizó el método descrito por BESFORD *et al.* (1985). Las actividades enzimáticas empleadas en estos dos ensayos se calcularon utilizando un ϵ_{340} de $6,22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del NADH (VIGIL, 1983).

La medida de la actividad enzimática 6-PGDH (EC 1.1.1.44) se realizó según el método descrito por TANKSLEY & KUEHN (1985), y la actividad PGI (EC 5.3.1.9) se midió según el método descrito por WEEDEN & GOTTLIEB (1982). La actividad PGM (EC 2.7.5.1) se determinó basándose en el método de SICHER (1989), con ligeras modificaciones, mediante un sistema de enzimas acoplados: el medio de reacción estaba compuesto por NADP 0,5 mM, glucosa 1 fosfato 2mM, 0,5u/ml de G6PDH, tampón Tris ClH 0,1M pH 8,0 y enzima. La reacción se inició por la adición de glucosa 1 fosfato y los incrementos de absorbancia a 340 nm se siguieron durante 5 minutos. Las actividades enzimáticas empleadas en estos tres últimos ensayos se calcularon utilizando un ϵ_{340} de $6,22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del NADP.

Técnica del lixiviado de polen

La técnica del lixiviado de polen se realizó según el método descrito por Weeden y GOTTLIEB (1980). El polen fresco se recogió a partir de flores de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* y se depositó directamente en un tampón Tris ClH 50mM pH 8,00. Aproximadamente se depositaron 15mgr de polen en 1ml de tampón, y se dejó lixiviar de 4 a 24 horas a 4°C. Los extractos eran utilizados posteriormente para la electroforesis (25ml) y para la realización de las medidas enzimáticas. El homogeneizado de polen se obtuvo triturando el lixiviado con la ayuda de un poter, en el mismo tampón en que se depositaba a lixiviar, congelándose a continuación. Posteriormente se procedió a su inmediata descongelación y se centrifugó a 20.000g durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante y realizándose las medidas de las actividades enzimáticas así como la electroforesis en gel de almidón.

Electroforesis en gel de almidón

Todas las muestras obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de almidón según las técnicas utilizadas previamente por MERINO DE CÁCERES & BERNAL PITA DA VEIGA (1992).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las isoenzimas fueron separadas por PAGE en disco utilizando geles de poliacrilamida al 7,7% siguiendo el método de DAVIS (1964) con modificaciones. La electroforesis se realizó usando un tampón para el electrodo compuesto por Tris 0,2M, EDTA 2mM y ácido bórico 0,15M, pH 8,5 (GURIES & LEDIG, 1978). Los geles se tiñeron para la actividad SKDH con una solución con tampón Tris-ClH 0,1M, MTT 0,8mM, PMS 0,1mM, NADP 0,22mM y ácido siquímico 1mM, que es una modificación de la técnica de ROTHE (1988).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las Figs. 1, 2 y 3 muestran algunas características fisiológicas de la preparación de

cloroplastos obtenidos por centrifugación en un gradiente de Percoll. En éste se puede apreciar la existencia de tres valores máximos de clorofila que representan la fracción de cloroplastos rotos, ($d= 1,043\text{gr/cm}^3$, integridad= 33,66%) y las dos siguientes, las fracciones de cloroplastos íntegros ($d= 1,061\text{ gr/cm}^3$, integridad= 86,33% y $d= 1,076\text{gr/cm}^3$, integridad= 78,0% respectivamente) (Figs. 1 y 2). En estas dos fracciones de cloroplastos íntegros podemos observar como la enzima PGI presenta dos máximos de actividad (Fig. 2). También aparecen (Fig. 3) las actividades citocromo c oxidasa e hidroxipiruvato reductasa, enzimas marcadoras de mitocondrias y peroxisomas respectivamente, pudiéndose apreciar como en las fracciones de cloroplastos íntegros, la contaminación por ambos orgánulos es muy pequeña.

Hemos determinado cuales eran las enzimas plásticas utilizando los cloroplastos intactos y comparando sus extractos con los de hoja, por medio de electroforesis. En el caso de la SKDH

se utilizaron geles de poliacrilamida, debido a la baja resolución de los geles de almidón para esta enzima. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por distintos autores en otras especies, se observan algunas diferencias.

En cuanto a la 6-PGDH, en *Capsicum* hemos detectado la presencia de dos formas isoenzimáticas de esta enzima de la ruta de las pentosas fosfato, de las cuales la más anódica (6-PGDH-a) aparece localizada en los cloroplastos, mientras que 6-PGDH-b está en el citosol (Fig. 4A). En *Lycopersicon* TANKSLEY & KUEHN (1985) detectan la presencia de cuatro formas de 6-PGDH de las cuales, 6-PGDH-C, con una movilidad intermedia respecto a A, B y D, aparece en la fracción cloroplástica.

Sabemos que tanto PGI como PGM, enzimas pertenecientes a la glicolisis y gluconeogénesis, tienen una doble compartimentación, esto es, que existe una isoenzima citosólica y otra cloroplástica, pero no siempre su movilidad electroforética es la misma. Así en PGI, la

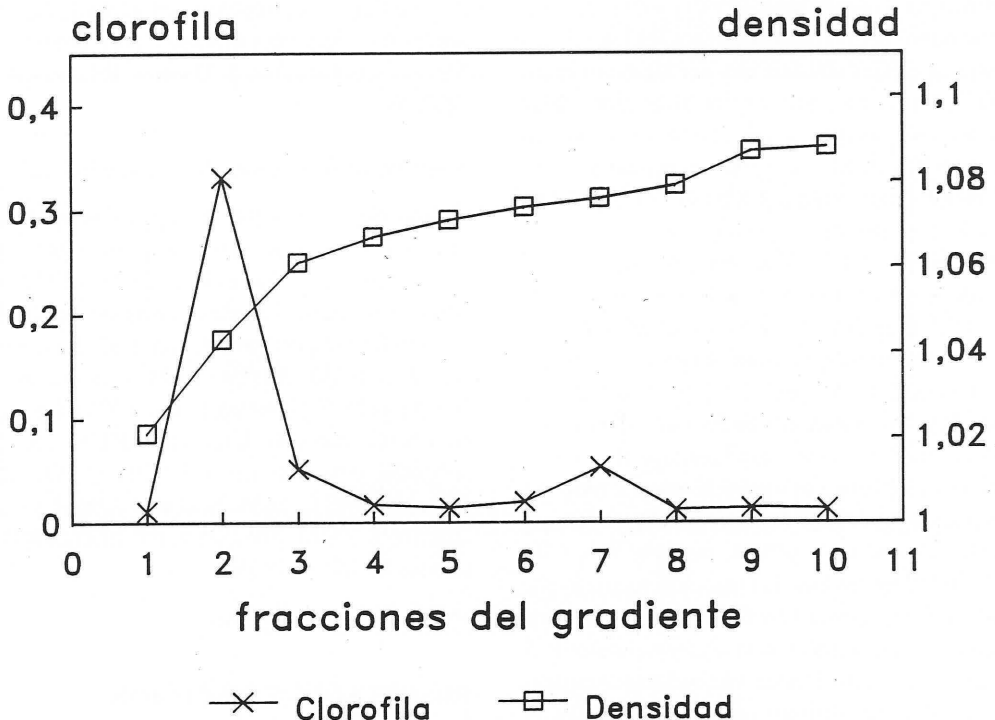


Fig. 1. Distribución de clorofila (mgr/ml) y densidad (gr/cm³) a lo largo del gradiente de Percoll. Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1ml. Los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

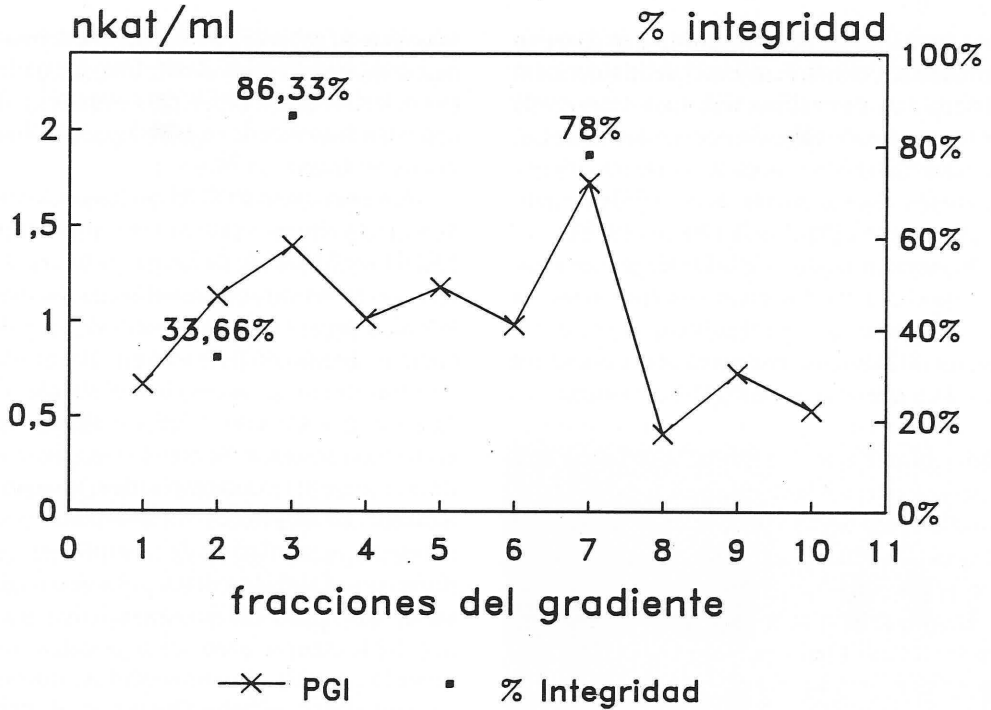


Fig. 2. Distribución de la enzima fosfogluco isomerasa (PGI) a lo largo del gradiente de Percoll e integridad de los cloroplastos en las fracciones más significativas. Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1ml. Los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

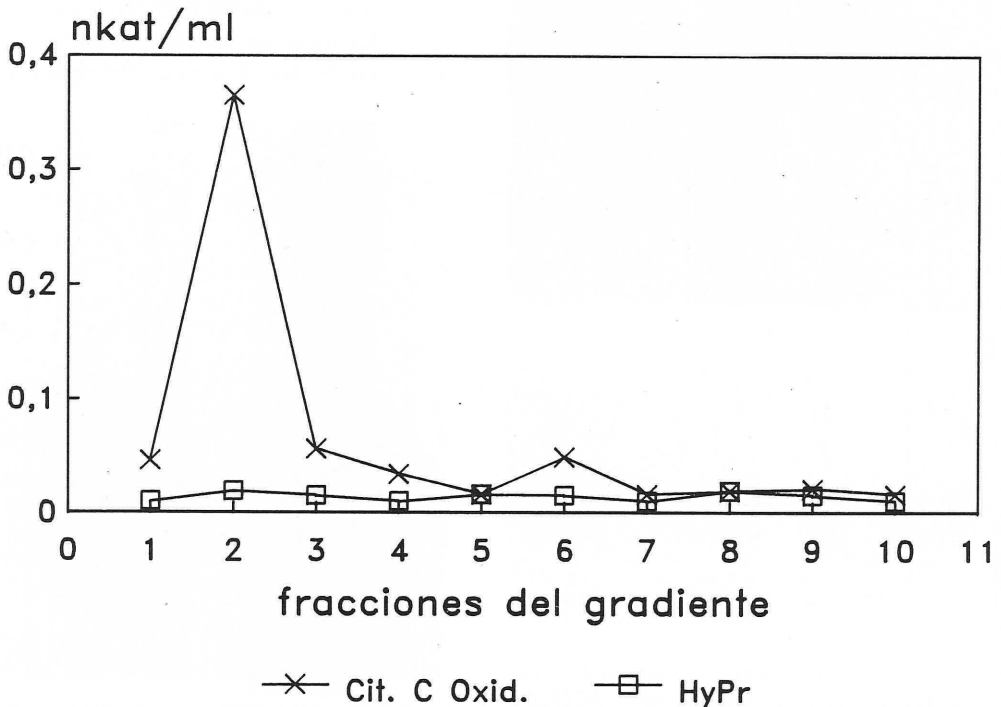


Fig. 3. Distribución de enzimas marcadoras de contaminación a lo largo del gradiente de Percoll. Citocromo c oxidasa (Cit. C Oxid.) e hidroxipiruvato reductasa (HyPr). Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1ml. Los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

isoenzima PGI-a está localizada en la fracción cloroplástica, mientras que la PGI-b parece estar limitada al citosol (Fig. 4B). Estos resultados también están de acuerdo con los hallazgos en espinaca (SCHNARRENBERGER & OESER, 1974), rábano (SCHNARRENBERGER *et al.*, 1975) y remolacha azucarera (SIMCOX & DENNIS, 1978).

El comportamiento de la PGM varía en algunas especies. Como en el caso anterior aparecen dos isoenzimas, pero en el guisante la forma más anódica (PGM-a) se corresponde con la isoenzima citosólica, mientras que la PGM-b es cloroplástica

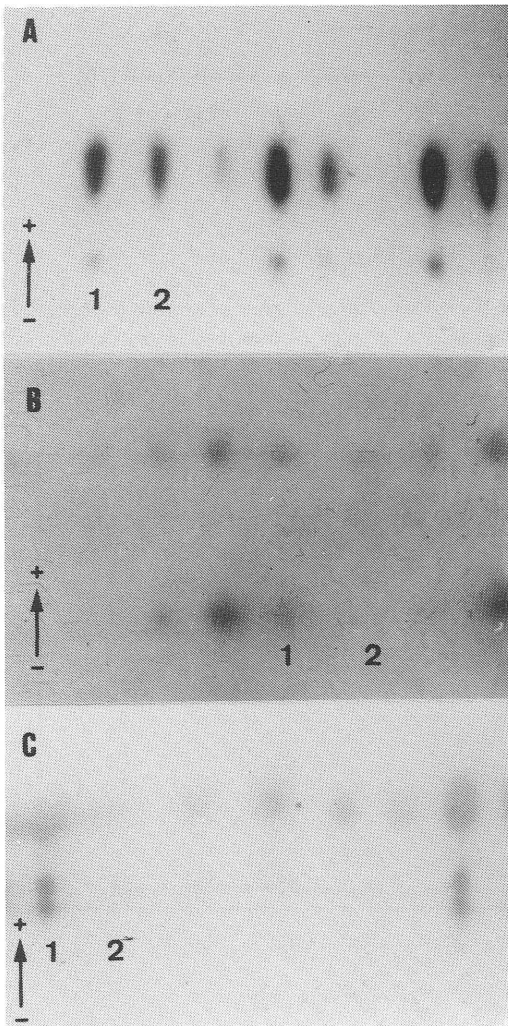


Fig. 4. Patrones de isoenzimas, en geles de almidón, de los sistemas 6-PGDH (A), PGI (B) y PGM (C). Línea 1=homogeneizado de hoja, línea 2=fracción de cloroplastos.

(Weeden & Gottlieb, 1980). En nuestro material, la isoenzima PGM-a tiene una localización cloroplástica y la PGM-b citosólica (Fig. 4 C), como también sucede en espinaca (Mühlbach & Schnarrenberger, 1978).

Con respecto a la SKDH, podemos distinguir dos isoenzimas, que hemos denominado SKDH-a y SKDH-b, de las que sólo la primera aparece en los cloroplastos (Fig. 5). Dichos resultados sugieren la existencia de una doble compartimentación de la enzima, observada anteriormente en guisante (ROTHE *et al.*, 1983; MOUSDALE & COGGINS, 1985), mientras que en espinaca (FIEDLER & SCHULTZ, 1985) sólo se ha detectado actividad cloroplástica, aunque esta ausencia de actividad extraplástica pudiera deberse a la regulación de la siquímica deshidrogenasa. También existen evidencias indirectas de que la ruta del ácido siquímico presenta una doble compartimentación ya que se ha observado síntesis de aminoácidos aromáticos en cloroplastos aislados (BICKEL *et al.*, 1978), y en otras enzimas de la ruta (JENSEN, 1985; MOUSDALE & COGGINS, 1985) se ha encontrado tanto la forma citosólica como la cloroplástica.

La técnica anteriormente expuesta, nos permitió identificar las enzimas cloroplásticas, y por exclusión, las citosólicas. Pero para confir-

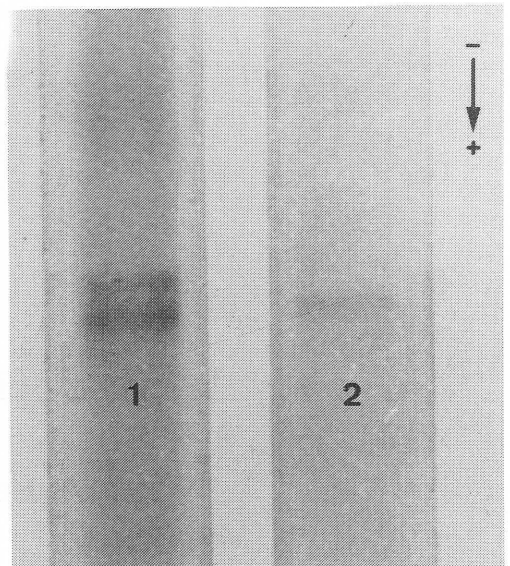


Fig. 5. Patrón de isoenzimas, en geles de poliacrilamida, del sistema SKDH. 1= homogeneizado de hoja, 2= fracción de cloroplastos.

mar estos resultados recurrimos a la técnica del lixiviado de polen, que nos permitió obtener pequeñas cantidades de enzima citosólica. Nuestro estudio muestra como a las 8 horas de mantener el polen sumergido en el tampón, la enzima marcadora citosólica alcanza su valor máximo, un 43,48% (Tabla I), proporción que disminuye posteriormente, y que presenta unos niveles de contaminación muy bajos. En 1980 WEEDEN & GOTTLIEB, trabajando con distintas especies vegetales, estudian el comportamiento en los lixiviados de polen de diferentes enzimas del metabolismo primario, y llegan a la conclusión de que durante las primeras horas de empapado del polen en un tampón apropiado, las enzimas citosólicas de los sistemas estudiados

salen al exterior, quedando aquellas formas enzimáticas ligadas a orgánulos confinadas al interior del grano.

A las 24 horas, observamos como la proporción de actividad de PEPc ha descendido hasta un 5,92%. Esto tiene su explicación en que después de este tiempo la mayor parte de los granos de polen se han roto, liberando todo su contenido enzimático, y es muy probable que esta enzima se vea afectada por algún componente externo. Esta pérdida de actividad enzimática también ha sido detectada en otras especies. En *Oenothera organensis* a las 19 horas ya se detecta la ausencia de una banda perteneciente al patrón de esterases, sugiriendo MAKINEN & BREWBAKER (1967) que dicha banda

TABLA I. Actividades enzimáticas marcadoras en el lixiviado de polen a diferentes tiempos. Las actividades se expresan en nkat/ml. Los resultados son el promedio de tres experiencias independientes

Fracción	PEPc		Cit. C Oxid.		HyPr	
	nkat/ml	%	nkat/ml	%	nkat/ml	%
Homogeneizado						
Polen	1,35	100	0,864	100	1,53	100
Lixiviado polen						
4 horas	0,186	13,77	0,000	0	0,082	5,35
8 horas	0,587	43,48	0,000	0	0,101	6,60
12 horas	0,362	26,81	0,000	0	0,088	5,75
24 horas	0,080	5,92	0,011	1,27	0,088	5,75

TABLA II. Actividades enzimáticas en el lixiviado de polen en diferentes tiempos. Las actividades se expresan en nkat/ml. Los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

Fracción	6PGDH		PGI		PGM	
	nkat/ml	%	nkat/ml	%	nkat/ml	%
Homogeneizado						
Polen	1,56	100	6,52	100	5,33	100
Lixiviado polen						
4 horas	0,017	1,08	0,995	15,26	0,047	0,8
8 horas	0,017	1,08	1,611	24,70	0,118	2,2
12 horas	0,012	0,7	0,971	14,89	0,028	0,4
24 horas	0,066	5,28	1,46	22,39	0,059	0,93

es sensible hacia algún factor externo que afecte a la solución enzimática. Este hecho también es aplicable al resto de las enzimas, ya que los otros tres sistemas enzimáticos presentan su máximo de actividad a las 8 horas, con un descenso a las 12 horas (Tabla II). En cambio, el incremento que experimentan a las 24 horas, más que a una mayor proporción de enzima citosólica se puede presumir que corresponda a un incremento en la contaminación debido a la ruptura de los granos de polen. Así, la enzima marcadora mitocondrial que no se había detectado hasta el momento, presenta una actividad del 1,27% a las 24 horas.

Una vez confirmada la existencia de actividad enzimática en el lixiviado de polen, así como la naturaleza predominantemente citosólica de este componente enzimático, con un grado de contaminación mínimo, se pasó a examinar los patrones electroforéticos de aquellos sistemas que mejor se resolvían en los geles de almidón. Para ello, se comparó el patrón de bandas de dos enzimas (PGI y PGM) en diferentes fracciones: homogeneizado de hoja y lixiviado de polen. Los resultados venían a confirmar lo ya observado, que las isoenzimas citosólicas se correspondían con aquellas formas isoenzimáticas que no aparecían en los geles de almidón cuando aislábamos cloroplastos, esto es, las formas menos anódicas (Fig. 6). Esta menor movilidad de las formas citosólicas para las enzimas PGI y PGM, está de acuerdo con los resultados obtenidos por WEEDEN & GOTTLIEB (1980) en espinaca, en donde la forma menos anódica de estas dos enzimas coincide con la forma citosólica, mientras que en guisante sólo aparece la forma menos anódica de PGI, apareciendo la forma más anódica de PGM en el lixiviado de polen.

Los resultados obtenidos en este trabajo vienen a confirmar los resultados obtenidos en otras plantas sobre la existencia de una doble compartimentación, citosólica y plastidial. Estudios posteriores nos permitirán ampliar estos conocimientos sobre la actividad de las distintas isoenzimas en los diferentes compartimentos subcelulares, así como conocer la evolución que puedan experimentar a lo largo del desarrollo.

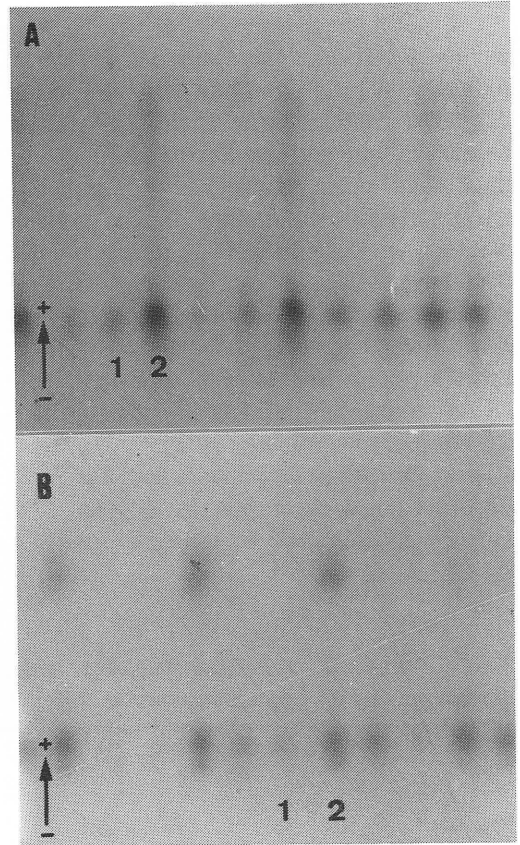


Fig. 6. Patrones de isoenzimas, en geles de almidón, de los sistemas PGI (A), y PGM (B). Línea 1=lixiviado de polen, línea 2= homogeneizado de hoja.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARNON, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Physiol.*, **24**: 1-15.
- BICKEL, H., PALME, L. & SCHULTZ, G. (1978). Incorporation of shikimate and other precursors into aromatic amino acids and prenilquinones of isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry*, **17**: 119-124.
- BESFORD, R.T., WITHERS, A.C. & LUDWIG, L.J. (1985). Ribulose biphosphate carboxylase activity and photosynthesis during leaf development in the Tomato. *J. Exp. Bot.*, **36**: 1530-1541.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **212**: 404-427.

- FIEDLER, E. & SCHULTZ, G. (1985). Localization, purification and characterization of shikimate oxidoreductase-dehydroquinase hydrolyase from stroma of spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **79**: 212-218.
- GOTTLIEB, L.D. (1982). Conservation and duplication of isoenzymes in plants. *Science*, **216**: 373-380.
- GURIES, R.P. & LEDIG, F.T. (1978). Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Heredity*, **40**: 27-32.
- JENSEN, R.A. (1985). The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol. Plant.*, **66**: 164-168.
- LILLEY, R.M., FITZGERALD, M.P., RIENITS, K.G. & WALKER, D.A. (1975). Criteria of intactness and the photosynthetic activity of spinach chloroplast preparations. *New Phytol.*, **75**: 1-10.
- MAKINEN, Y. & BREWBAKER, J.L. (1967). Isoenzyme polymorphism in flowering plant. I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. *Physiol. Plant.*, **20**: 477-482.
- MERINO DE CÁCERES, F. & BERNAL PITA DA VEIGA, A. (1992). Estudio de la variabilidad isoenzimática en distintas poblaciones de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **3**: 77-84.
- MOUSDALE, D.M. & COGGINS, J.R. (1985). Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta*, **163**: 241-249.
- MUHLBACH, H. & SCHNARRENBERGER, C. (1978). Properties and intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves. *Planta*, **141**: 65.
- PALMA, J.M., SANDALIO, L.M. & DEL RÍO, L.A. (1986). Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: A reappraisal of a controverted cellular localization. *J. Plant Physiol.*, **125**: 427-439.
- ROTHER, G.M. (1988). Determination of molecular mass, Stoke's radius, frictional coefficient and isomeric type of non-denatured proteins by time-dependent pore gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **9**: 307-316.
- ROTHER, G.M., HENGST, G., MILDENBERGER, I., SCHARER, H. & UTESCH, D. (1983). Evidence for an intra and extraplastidic prechorismate pathway. *Planta*, **157**: 358-366.
- SCHNARRENBERGER, C. & OESER, A. (1974). Two isoenzymes of glucose phosphate isomerase from spinach leaves and their intracellular compartmentation. *Eur. J. Biochem.*, **45**: 77-82.
- SCHNARRENBERGER, C., OESER, A. & TOLBERT, N.E. (1971). Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.*, **48**: 566-574.
- SCHNARRENBERGER, C., TETOUR, M. & HERBERT, M. (1975). Development and intracellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate cycle in radish cotyledons. *Plant. Physiol.*, **56**: 836-840.
- SCHWITZGUEBEL, S.P. & SIEGENTHALER, P.A. (1984). Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant. Physiol.*, **75**: 670-674.
- SICHER, R.C. (1989). Evidence for a light dependent increase of phosphoglucomutase activity in isolated, intact spinach chloroplasts. *Plant. Physiol.*, **89**: 557-563.
- SIMCOX, P.D. & DENNIS, D.T. (1978). Isoenzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinus communis*. *Plant. Physiol.*, **61**: 871-877.
- TANKSLEY, S.D. & KUEHN, G.D. (1985). Genetics, subcellular localization, and molecular characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase isoenzymes in Tomato. *Biochem. Genet.*, **23**: 441-454.
- TOLBERT, N.E., OESER, A., KISAKI, T., HAGEMAN, R.H. & YAMAZAKI, R.K. (1968). Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Biol. Chem.*, **243**: 5179-5184.
- TOLBERT, N.E., YAMAZAKI, R.K. & OESER, A. (1970). Localization and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles. *J. Biol. Chem.*, **245**: 5129-5136.
- VIGIL, E.L. (1983). Microbodies. In: Hall, J.L. & Moore, A.L. (Eds.), *Isolation of membranes and organelles from plants cells*: 221-236. Academic Press. London.
- WEEDEN, N.F. & GOTTLIEB, L.D. (1980). Isolation of cytoplasmic enzymes from pollen. *Plant. Physiol.*, **66**: 400-403.
- WEEDEN, N.F. & GOTTLIEB, L.D. (1982). Dissociation, reassociation, and purification of plastid and cytosolic phosphogluconate isomerase isozymes. *Plant. Physiol.*, **69**: 717-723.