

00562

7

2ej

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

" ANALISIS DE LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA  
RIBULOSA BIFOSFATO CARBOXILASA/OXIGENASA EN MAIZ "

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

QUIMICAS (BIOQUIMICA) PRESENTA :

J. Eleazar Martínez Barajas.

1989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## ABREVIATURAS.

RUBISCO	Ribulosa-1,5-bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa
RuBP	Ribulosa-1,5-bifosfato
PGA	Ac. 3 fosfoglicérico
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina bifosfato
C <sub>4</sub>	Ciclo fotosintético C <sub>4</sub>
C <sub>3</sub>	Ciclo fotosintético C <sub>3</sub>
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
S	Unidades Svedberg
K <sub>act</sub>	Constante de activación
K <sub>d</sub>	Constante de disociación
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
CABP	2 carboxi-D-arabinitol-1-fosfato
DCMU	Dicloroetildimetilurea
RNA poli(A) <sup>+</sup>	RNA mensajero con cola de poli A
DTT	Ditiotreitol
CCCP	Carboxicianuro m-clorofenilhidrazona
SDS	Sulfato dodecil de sodio
TCA	Acido tricloroacético
HEPES	Ac. N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano-sulfúrico
TRIS	TRIS(hidroxiometil)-aminoetano
PPO	2,5-difenildiazol
POPOP	1,4-bis [2-(4-metil-5-feniloxazol)]-benceno
SPS	Sacarosa Fosfato Sintasa
PEPCasa	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa

## INDICE

	página
I .- Introducción	1
II .- Antecedentes bibliográficos	3
II.1 La RUBISCO	3
II.2 Regulación de la actividad de la RUBISCO	6
II.3 Regulación por luz	17
II.4 Estabilidad de la RUBISCO	19
II.5 La RUBISCO y el mejoramiento de las plantas	23
III .- Planteamiento del problema	27
IV .- Objetivos	27
V .- Diseño experimental	29
VI .- Materiales y métodos	31
VI.1 Material biológico	31
VI.2 Muestras	31
VI.2.1 Plantas adultas	31
VI.2.2 Plántulas	32
VI.2.3 Determinación de peso seco	32
VI.2.4 Determinación de clorofila	32
VI.2.5 Determinación de proteínas	34
VI.2.6 Purificación de RUBISCO de espinaca	34
VI.2.7 Obtención de anticuerpos contra RUBISCO	35

VI.2.8	Inmunoelectroforesis	38
VI.2.9	Medición de la actividad de la RUBISCO	40
VI.2.10	Líquido de Bray	41
VI.2.11	Análisis estadístico	42
VII .-	Resultados	43
VII.1	Plántulas	43
VII.2	Plantas adultas	57
VII.3	Análisis de la actividad de la RUBISCO	65
VII.3.1	Efecto del tiempo de activación	65
VII.3.2	Experimentos cruzados	70
VII.4	Efecto ambiental en plantas adultas	73
VIII .-	Discusión	83
IX .-	Conclusiones	101
X .-	Bibliografía	104

## RESUMEN

### "ANALISIS DE LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBULOSA BIFOSFATO CARBOXILASA/OXIGENASA EN MAIZ"

Los objetivos fundamentales del presente trabajo son dos:

- 1.- Analizar bioquímicamente la regulación de la RUBISCO en diferentes momentos fisiológicos del desarrollo de las plantas de maíz.
- 2.- Observar si existen posibilidades de que a través del estudio de la regulación de la actividad de la RUBISCO se puedan obtener criterios que pudieran emplearse en los trabajos de mejoramiento genético.

Los modelos experimentales utilizados también fueron dos:

- 1.- El desarrollo de una hoja en plántulas de maíz.
- 2.- El periodo de llenado de los granos de la mazorca.

Se utilizaron dos tipos de poblaciones: unas que han sido seleccionadas para aumentar su rendimiento de grano y otra que no ha sido modificada genéticamente.

Los resultados muestran que la regulación de la actividad de la RUBISCO en plántulas es diferente de la que se da en plantas adultas, pues mientras en las primeras la actividad es dependiente tanto de la capacidad que el tejido tenga para producir nueva enzima como de la acción de diversos elementos que pueden cambiar significativamente su actividad, en plantas adultas no parece haber síntesis de nuevas moléculas de enzima y los cambios que

manifiesta la actividad de la RUBISCO aparentemente están determinados por la acción de los elementos que se hicieron evidentes en plántulas, aunque no puede asegurarse que sean del mismo tipo.

Se encontró que la actividad de la enzima en términos de actividad específica y "turnover" (# de recambio de la enzima) es mayor en plántulas, posiblemente como resultado de las diferencias metabólicas que existen entre este tejido y el de plantas adultas.

Por otra parte, se pudo demostrar que los elementos que son responsables de los cambios de actividad de la RUBISCO en plantas adultas son muy sensibles a las condiciones ambientales.

En plántulas a excepción del peso fresco/hoja ninguna de las variables analizadas permitió diferenciar a los materiales seleccionados de los que no lo habían sido. Por otro lado, en plantas adultas las diferencias entre poblaciones son muy claras, se aprecian fundamentalmente en la actividad de la RUBISCO y aunque con menos claridad, también se observaron en la cantidad de proteína-RUBISCO.

Se observó que la actividad y la cantidad de RUBISCO tienden a incrementarse con los ciclos de selección. Sin embargo, la relación entre la cantidad de enzima y la actividad no es directamente proporcional, lo cual indica que el aumento en la cantidad de enzima es solamente uno de los varios factores que intervienen en el fenómeno y por lo mismo solo da una explicación parcial de las diferencias tan significativas que tiene el rendimiento de grano en los materiales usados.

## ABSTRACT

During the grain filling period of maize a significant increment in RUBISCO activity has been observed.

This work has two fundamental objectives:

1.- The biochemical analysis of the regulation of RUBISCO at different moments of development of plants of maize.

2.- The analysis of the possibility to use biochemical regulation of RUBISCO as a biochemical parameters for plant breeding.

We used two models:

1.- One developing leaf in seedlings of maize.

2.- The grain filling period in adult plants.

In this work RUBISCO activity and RUBISCO protein were measured in maize seedlings and adult leaves in order to study the mechanism regulating this phenomenon.

In adult leaves RUBISCO protein remained constant while activity increased 4-5 fold, but when the plants grow in adverse conditions we could not observe any activation.

In seedlings RUBISCO activity and RUBISCO protein both increased in a parallel fashion until maximum leaf expansion.

It appears that RUBISCO activity is regulated at posttranscriptional levels depending on the stage of plant development; this activity is also regulated by the environment.

Seedlings from selected and non selected materials didn't show any differences in the parameters analysed (except the fresh weight per leaf).



In the other hand adult plants show marked differences among both populations.

It was observed that both RUBISCO activity and RUBISCO protein tend to increase throughout selection, however the ratio between both parameters is not kept proportional, this points out that the increase in RUBISCO as protein is only one factor of productivity among others.

## I.- INTRODUCCION.

La Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RUBISCO) no solamente es la enzima más abundante en la naturaleza sino que también tiene un papel fundamental para la vida de las plantas pues participa en la conversión de la energía solar en energía química (proceso de fotosíntesis).

Por otra parte, bajo ciertas condiciones ambientales la enzima puede incorporar  $O_2$  y con ello dar origen a la fotorrespiración, la cual es una vía desasimilatoria responsable de la pérdida de grandes cantidades de fotosintatos.

Desde hace muchos años esta enzima es estudiada por diferentes grupos en todo el mundo y con los resultados de esas investigaciones se ha logrado reunir una cantidad muy importante de información que, sin embargo, está todavía muy lejos de ser suficiente para entender adecuadamente de que manera se regula la actividad de esta enzima en las diferentes plantas.

A pesar de lo anterior, algunos grupos no se han desanimado y continúan haciendo esfuerzos para lograr resultados prácticos de la información disponible y puede decirse que actualmente uno de los propósitos más importantes es obtener genéticamente plantas más productivas ya sea aumentando la eficiencia de la RUBISCO o disminuyendo la actividad fotorrespiratoria.

El trabajo realizado por nuestro grupo en los últimos años, puede ubicarse en ésta área de investigación y tiene como antecedentes los resultados que Loza-Tavera et al. (1987) reportaron en un estudio en maíz durante el período de llenado de

los granos.

En ese trabajo, analizando el comportamiento de la actividad de la RUBISCO, se encontró que coincidiendo con la fuerte demanda de fotosintatos que significa para la planta la mazorca en formación, en la hoja inmediatamente superior a la mazorca hay un incremento muy notable en la actividad de la RUBISCO.

Este incremento es mayor en las plantas que fueron seleccionadas para mayor rendimiento de grano, lo cual es muy interesante dadas las posibilidades prácticas que se pueden derivar de éste conocimiento.

En éste sentido, el presente trabajo está enfocado a explicar bioquímicamente las causas del aumento en la actividad de la RUBISCO durante el período de llenado del grano y a entender el efecto que sobre ese mecanismo podrían tener el estado fisiológico de la planta y las condiciones ambientales donde ésta se desarrolla.

## II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

### II.1.- La RUBISCO.

La Ribulosa-1,5-Bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RUBISCO ; E. C. 4. 1. 1. 39) es una enzima localizada en el estroma de los cloroplastos de todos los organismos que realizan fotosíntesis. Tiene una función dual; la primera consiste en la carboxilación de la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) formándose dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (PGA) y con ello da principio la fotosíntesis. La segunda es la incorporación de una molécula de  $O_2$  a otra de RuBP para formar una molécula de PGA y otra de 2-P-fosfoglicolato, con lo cual da inicio la fotorrespiración (Akazawa, 1979).

Durante mucho tiempo no se aclaró adecuadamente la presencia de dos actividades tan diferentes en una misma enzima, pero finalmente, se demostró que tanto la actividad de carboxilasa como la de oxigenasa son llevadas a cabo por la misma enzima. El  $CO_2$  actúa como inhibidor de la actividad de oxigenasa y el  $O_2$  hace lo mismo con la actividad de carboxilasa (Ryan and Tolbert, 1975).

En el desarrollo normal de las hojas de las plantas superiores bajo condiciones de iluminación continua o en ciclos día-noche, los cloroplastos se desarrollan a partir de organelos rudimentarios llamados proplastidios, los cuales son más pequeños que los cloroplastos, carecen de clorofila y de tilacoides; al ser iluminados se induce un marcado incremento en la cantidad de diversas proteínas dentro de las cuales se encuentra la RUBISCO. El efecto de la luz sobre la acumulación de la RUBISCO involucra

la participación de un sistema capaz de detectar y transducir la señal de la luz para cambiar la expresión de los genes (Ellis et al., 1984).

La RUBISCO está formada por dos tipos de subunidades. La subunidad grande (LS) que está codificada en el DNA del cloroplasto, es sintetizada allí mismo y constituye el producto más importante del sistema genético del cloroplasto y la subunidad pequeña (SS) que está codificada en el DNA nuclear y se sintetiza en los ribosomas del citoplasma como un precursor que después se transporta al interior del cloroplasto (Ellis, 1981).

La translocación del precursor de la SS al interior del cloroplasto requiere de ATP. En cloroplastos aislados se ha observado que el transporte tiene una  $K_m$  aparente para MgATP de 0.9 mM y que la velocidad máxima se alcanza con 5 mM. (Flügge and Hinz, 1986). El mecanismo involucrado es oscuro; sin embargo, el hecho de que tratamientos con fosfatasa alcalina impidan el transporte hace suponer la existencia de un traslocador específico que podría estar siendo fosforilado y de esa manera, permitir la entrada del precursor de la SS al interior del cloroplasto (Flügge and Hinz, 1986).

Todo lo anterior plantea problemas muy especiales de coordinación pues debe tomarse en cuenta que en el cloroplasto cada círculo de DNA contiene una copia del gen de la LS, que los cloroplastos son poliploides y que cada célula tiene muchos cloroplastos. De allí que en cada célula existan varios cientos de genes para la LS. Por su parte, en muchos eucariotes se ha

observado que la SS está codificada por una pequeña familia multigenica nuclear (Ellis, 1981).

Analizando diferentes etapas en el desarrollo de la segunda hoja de plántulas de trigo se encontró que las cantidades de los mensajes de las dos subunidades capaces de ser traducidos artificialmente por los sistemas de síntesis de proteínas de germen de trigo y *E. coli*, se regulan de manera similar, pues en ambos casos se observó que tienden a disminuir a medida que las hojas envejecen. Sin embargo, la relación de uno con respecto al otro fué casi constante (Speirs and Brady, 1981).

Un estudio paralelo realizado en el mismo modelo sirvió para determinar el comportamiento de la proteína. Se encontró que la tendencia de la holoenzima es muy similar a la de los mensajes y la evidencia mostrada durante todo el estudio señala que aparentemente la cantidad de subunidades no ensambladas es sumamente pequeña (Brady, 1981).

La holoenzima es altamente soluble y puede alcanzar hasta 300 mg ml<sup>-1</sup> en el estroma *in vivo*. La LS obtenida por el tratamiento de la holoenzima con detergentes o pH elevado es insoluble en medios acuosos. Sin embargo, *in vivo* es soluble gracias a que forma complejos con otra proteína denominada solubilizadora de la subunidad grande (BP) (Ellis, 1981), la cual después de la RUBISCO, es la proteína más abundante en el estroma (Hemmingsen and Ellis, 1986).

La BP también está codificada en el genoma nuclear y se sintetiza en el citoplasma como un precursor que luego es

transportado al cloroplasto. Ya en él, se presenta en forma de complejos de peso molecular variable los cuales pueden ser disgregados reversiblemente agregando MgATP 5 mM. Las subunidades formadoras de tales complejos tienen un peso molecular de 60 Kd (Ellis et al., 1984).

Recientemente se ha informado que el peso molecular de los complejos que forma la BP en promedio es de 720 Kd y que en realidad son dos tipos de subunidades las que los están formando cada una con pesos moleculares cercanos a 59.8 Kd. Los anticuerpos contra la BP no cruzan con los formados contra la LS y lo contrario tampoco sucede (Hemmingsen and Ellis, 1986).

Una vez formado el complejo entre la BP y al LS, este puede romperse reversiblemente con la adición de ATP 2 mM. No se ha podido establecer el papel del ATP pero aparentemente en este caso no se utiliza para fosforilar a las proteínas (Hemmingsen and Ellis, 1986).

La RUBISCO purificada de plantas C-4 es muy similar a la extraída de plantas C-3 como espinaca, papa, calabaza, y lechuga. El gran parecido en lo que se refiere a actividad, peso molecular de la holoenzima y de las subunidades, coeficiente de sedimentación y composición de aminoácidos, permite sugerir que ésta enzima ha sido altamente conservada durante la evolución (Berger et al, 1983).

## II.2.- Regulación de la actividad de la RUBISCO.

En suspensiones de lisados de cloroplastos frescos de

espinaca, la actividad oxigenasa de la RUBISCO tiene un pH óptimo de 8.6 a 8.8 y la Km para ribulosa-1,5-bifosfato es de 45  $\mu\text{M}$ , mientras que la Km para  $\text{O}_2$  es muy grande y probablemente esté entre 1 y 2 atm. (Bahr and Jensen, 1974). A su vez, la Km para  $\text{CO}_2$  depende del organismo estudiado, pero en general se ha observado que oscila entre 250 y 300  $\mu\text{M}$  (Miziorko and Lorimer, 1983).

El efecto del pH sobre las actividades de la enzima cuando éstas se ensayan a las concentraciones ambientales de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  sugiere que el pH del estroma puede ser un punto muy importante para establecer la magnitud del flujo de C por una u otra vía metabólica (Bahr and Jensen, 1974).

Para estudiar la actividad oxigenasa de la RUBISCO de espinaca, la enzima requiere de una activación previa, la cual se logra incubándola con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y es inactivada si éstos se remueven por filtración en gel. La actividad observada es dependiente de las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  así como del pH a que se lleva a cabo la activación, lo cual indica que en la activación está involucrada la formación reversible de un complejo enzima- $\text{CO}_2$ -Mg. Dado que el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{O}_2$  interactúan competitivamente por el sitio catalítico, la activación de la oxigenasa con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  indica que la molécula de  $\text{CO}_2$  que participa en la activación no es la misma que interviene en la reacción de carboxilación (Badger and Lorimer, 1976).

También en espinaca se ha observado que para medir la actividad carboxilasa de la RUBISCO al igual que para la actividad oxigenasa la enzima también requiere de un proceso de



activación con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La activación es linealmente dependiente de la concentración de  $\text{CO}_2$  e independiente de la de  $\text{Mg}^{2+}$ . Los análisis cinéticos indican que la enzima primero reacciona con el  $\text{CO}_2$ , que lo hace de manera reversible y que éste es el paso que determina la velocidad de la reacción, que enseguida y de manera muy rápida entra el  $\text{Mg}^{2+}$  para formar un complejo ternario. Además, se propone que la activación de la RUBISCO ocurre por la formación de un carbamato en el residuo de Lys que ocupa la posición 201 en las moléculas de la LS (Lorimer et al. 1976).

En la bacteria *Alcaligenes eutrophus* se demostró que la RUBISCO al ser activada con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  experimenta cambios muy considerables de actividad. La enzima inactiva tiene un coeficiente de sedimentación  $S_{20,v}$  de 17.5 S y a medida que va siendo activada éste cambia a 14.3 S. Los cambios observados fueron reversibles (Bowien and Gottschalk, 1982).

En la actualidad muchos trabajos realizados sobre las dos actividades de la RUBISCO reportan una activación previa de la enzima misma que se lleva a cabo de muy diversas maneras llegando a extremos como el reportado para hojas de cilantro en donde la activación se da elevando las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{NaHCO}_3$  a 20 mM y 10 mM respectivamente e incubando 10 min a  $30^\circ\text{C}$  (McCurry et al. 1978).

Un estudio realizado con la tercera hoja de plántulas de trigo reporta que el  $\text{CO}_2$  ambiental al igual que el  $\text{Mg}^{2+}$  son muy importantes para que la RUBISCO esté activa, sin embargo, en la célula aparentemente existen otros compuestos como el ortofosfato

inorgánico que son capaces de estimular la actividad de la RUBISCO a niveles superiores de los que podrían obtenerse incubándola con concentraciones saturantes de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Boyle and Keys, 1987).

Otros autores partiendo de cálculos acerca de las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en el cloroplasto pensaron que éstas eran muy bajas en relación a las que se requerieren para lograr *in vitro* una actividad máxima de la RUBISCO y que probablemente en las células otros metabolitos podrían ayudar a que el proceso fuera más eficiente. Algunos compuestos que mostraron efectos positivos fueron el gluconato-6-P, carboxiribitol- $\text{P}_2$ , fosfato inorgánico, fructosa- $\text{P}_2$ , NADPH y glicerato-3-P mientras que otros compuestos como carboxiarabinitol- $\text{P}_2$ , xilulosa- $\text{P}_2$  y 2-pentanona- $\text{P}_2$  no estimularon la activación y se comportaron como inhibidores competitivos respecto a la RuBP. Los dos grupos de compuestos parecen interaccionar de manera diferente con la enzima, los activadores lo hacen rápido y reversiblemente mientras que los segundos lo hacen lentamente. De acuerdo con un modelo elaborado con los resultados experimentales se sugiere que los compuestos que tienen un efecto positivo se unen a la enzima ya activada por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y estabilizan el complejo ternario formado mientras que los que tienen efecto negativo aparentemente tienen preferencia por formas inactivas de la enzima (McCurry et al. 1981).

Por otra parte, se ha reportado que la RuBP es un fuerte inhibidor de la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . En espinaca se observó que cuando la holoenzima se incubaba con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en ausencia de

RuBP cada mol de proteína toma 4.5 moles de  $\text{CO}_2$  contra 0.56 que entran si se incubaba en presencia de 1 mM de RuBP (Jordan and Chollet, 1983).

La inhibición por RuBP es menos fuerte en *Rhodospirillum rubrum* cuya RUBISCO está formada por dímeros de LS. En los dos casos la inhibición sucede porque aparentemente la RuBP al reaccionar con la enzima provoca cambios que hacen difícil la entrada de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Jordan and Chollet, 1983).

Sin embargo *in vivo* los cloroplastos de espinaca pueden acumular cantidades muy considerables de RuBP cuando éstos se encuentran en ausencia de  $\text{CO}_2$ . La desactivación de la enzima parece estar dada fundamentalmente por la ausencia de  $\text{CO}_2$ , la presencia de PGA puede estabilizar a la enzima activada y no se observó correlación entre la desactivación que la enzima sufre y los niveles de RuBP acumulada y es probable que los efectos inhibitorios que otros autores han reportado sean originados por compuestos contaminantes de la RuBP utilizada en los ensayos (Sicher et al. 1981).

En 1982 se reportaron mutantes de *Arabidopsis* que para realizar la fotosíntesis requerían concentraciones ambientales de  $\text{CO}_2$  muy superiores a las normales. No se encontraron diferencias electroforéticas ni cinéticas en la RUBISCO de las mutantes y se observó que ese carácter estaba controlado por un gen nuclear con herencia mendeliana simple cuyo producto era muy importante en el proceso de activación de la enzima por lo que se le denominó rca (regulador de la activación de la carboxilasa). Sin embargo, quedó

la duda acerca del papel de este factor: si éste participaba directamente en la activación o si lo hacía evitando la acumulación de compuestos inhibidores (Somerville et al. 1982).

El análisis electroforético de las proteínas del estroma de las plantas mutantes reveló la ausencia de dos proteínas de aproximadamente 50 Kd cada una y con experimentos de reconstitución usando extractos normales de *Arabidopsis* y de espinaca se reforzó la idea original sobre el papel de estos polipeptidos. Con estos resultados se propuso que la activación que la RUBISCO requiere para ser activa *in vivo* es catalizada por una enzima a la que se denominó RUBISCO-activasa cuyo mecanismo de acción permanecía oscuro, pero que por sus requerimientos (luz y membranas tilacoidales), permitía establecer relaciones entre los procesos productores de energía (transporte de  $e^-$ ) y los que hacen uso de la misma (fotosíntesis) (Salvucci et al. 1985).

Con preparaciones de RUBISCO activasa de espinaca parcialmente purificada se observó que la  $K_{act}(CO_2)$  de la RUBISCO activada por este sistema era de 4  $\mu$ molar, contra 25-30  $\mu$ molar que se había observado en el sistema de activación espontánea de la RUBISCO con  $CO_2$  y  $Mg^{2+}$  (Portis et al. 1986).

La activación de la RUBISCO es independiente del sistema Ferredoxina-Tioredoxina que cataliza la activación de varias enzimas fotosintéticas mediante su reducción con electrones provenientes del agua y en este caso, la activación se da aún en presencia de aceptores artificiales como metil viológeno y piocianina los cuales interrumpen el flujo de electrones (Portis

et al. 1986).

El mismo grupo que descubrió la RUBISCO activasa la purifico de espinaca, contra la cual se hicieron anticuerpos. Usando éstos elementos se puso de manifiesto la presencia de los dos polipéptidos que la forman en organismos tan diversos como *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*, espinaca, tabaco, soya, frijol, chícharo, avena, cebada y maiz. Las cantidades absolutas y las relaciones entre los dos polipéptidos variaron de un organismo a otro, pero el haberlos encontrado en especies con orígenes y metabolismos tan diferentes, permitió a estos autores plantear la hipótesis de que la participación de ésta nueva enzima posiblemente constituyera un mecanismo general de regulación de la actividad de la RUBISCO (Salvucci et al. 1987).

Otros estudios mostraron que en espinaca existe solo un gen de RUBISCO activasa y que los dos polipeptidos que normalmente se observan tienen su origen en un precursor de 51 Kd el cual contiene un polipéptido de tránsito de 58 aminoácidos. Una vez que el péptido ha entrado al cloroplasto, da origen al de 45 Kd y éste a su vez al de 41 Kd. Normalmente el de 41 Kd es el más abundante, pero hay ejemplos en donde las cantidades de los dos polipeptidos son iguales (espinaca) o en donde el de 45 Kd es el más importante (maiz) (Werneke et al. 1988).

Sin embargo, sea cual sea la relación entre ellos, esta no cambia durante el desarrollo o en respuesta a factores ambientales como la luz. Por otra parte, en los mutantes *rca* de *Arabidopsis* se encontro que el mensaje de RUBISCO activasa es de un tamaño

considerablemente mayor (aproximadamente 200 nucleótidos), lo cual hace pensar que estos mutantes se originan por corrimiento del marco de lectura o por alguna otra causa que obstaculiza su expresión correcta (Werneke et al. 1988).

También se han hecho experimentos para tratar de entender el mecanismo de acción de ésta enzima y así, se demostró que en los cloroplastos de los mutantes rca cuando son iluminados, ocurren los mismos cambios que se dan en plantas normales como son aumento del pH y movilización de iones como  $Mg^{2+}$  entre otros pues la actividad de la fructosa-1,6-bifosfatasa que es afectada por estas variables fué idéntica en ambos casos (Salvucci et al. 1986).

Por otra parte, el sistema de RUBISCO activasa es dependiente de ATP (Streusand and Portis, 1987) y aunque no se ha podido establecer que papel juega este metabolito, Werneke y col. (1988) han identificado en los polipeptidos de RUBISCO activasa dos sitios que posiblemente tengan afinidad por nucleótidos.

También se ha observado que hay otros metabolitos como ADP, DHAP y PGA que tienen un efecto inhibitorio muy importante sobre la actividad de la RUBISCO activasa y que la relación que establecen con respecto a las cantidades de ATP puede ser muy importante para entender la regulación del sistema (Robinson and Portis, 1988).

Partiendo de los antecedentes de que la actividad de la RUBISCO es considerablemente mayor en plantas iluminadas, se hizo un estudio en tabaco y se observó que en la oscuridad aproximadamente la mitad de los sitios activos de la RUBISCO están

ocupados por un inhibidor fosforilado de peso molecular pequeño. La unión del inhibidor a la RUBISCO se da mejor si se ensaya en presencia de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , pero el inhibidor puede ser removido con altas concentraciones de  $\text{SO}_4^{=}$ . Lo mismo sucede cuando la enzima se precipita con sulfato de amonio al 50 %, pero la precipitación con polietilenglicol (PEG) es inefectiva (Servaites, 1985).

En extractos de papa se pudo demostrar que el compuesto inhibidor antes referido corresponde al 2-carboxi-D-arabinitol-1-fosfato (CABP). Además, se observó que la afinidad del inhibidor por la RUBISCO no es la misma en todas las especies en donde se encuentra este compuesto, posiblemente como consecuencia de la competencia del compuesto con otros ésteres de fosfato (Gutteridge et al. 1986).

El CABP es estable en medio ácido y en calor, pero no es resistente a la acción de fosfatasa alcalina, la cual lo puede afectar aún cuando esté unido a la enzima. El inhibidor se localizó en el cloroplasto y se observó que la disminución de su efecto inhibitorio, que se aprecia cuando los tejidos son iluminados, es contrarrestado por DCMU, lo cual hace pensar que *in vivo* las cantidades de CABP podrían ser controlados por una fosfatasa dependiente del fotosistema II (Seemann et al. 1985).

Un estudio reciente demostró que este tipo de regulación de la actividad de la RUBISCO esta ampliamente distribuido en las plantas superiores y que no es exclusivo de un grupo taxonomico. Sin embargo, es muy importante hacer la aclaración de que no se encontro en gramineas como cebada, trigo y maiz (Servaites et

al. 1986).

La información que se ha mencionado hasta ahora permite distinguir dos formas de regulación de la actividad de la RUBISCO.

La primera involucra la reacción reversible de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para formar un carbamato con un residuo de Lys que ocupa la posición 201 en la LS y no forma parte del sitio activo de la enzima, de tal manera que la actividad máxima de la RUBISCO puede lograrse incubándola con concentraciones saturantes de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Este proceso parece estar controlado por la RUBISCO-activasa (Kobza and Seemann, 1988).

En la segunda, a la enzima previamente activada, el CABP se une en el sitio activo con una  $K_d = 0.1 \times 10^{-6}$  M con lo que se torna inactiva (Seemann et al. 1985). En éste caso, la actividad máxima de la RUBISCO no se restaura por la incubación con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Kobza and Seemann, 1988).

Por la forma como se regula la actividad de la RUBISCO, en las plantas C-3 se han identificado los siguientes grupos:

1.- *Phaseolus* La actividad de la enzima es controlada por los niveles de CABP los cuales responden a la intensidad luminosa que reciben las plantas. Una vez removido el inhibidor, para lograr la máxima actividad de la RUBISCO no se requiere activación con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Kobza and Seemann, 1988).

2.- *Beta* La actividad de la enzima es controlada tanto por niveles de inhibidor como por la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Kobza and Seemann, 1988).

3.- *Spinacea* No se ha demostrado la presencia de CABP, pero



los experimentos realizados señalan la posibilidad de que existan otros inhibidores y al igual que en el grupo anterior, se ha observado la necesidad de un periodo de activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Kobza and Seemann, 1988).

Ultimamente se ha propuesto que al momento de pasar a la oscuridad, las plantas empiezan a sintetizar CABP en tanto que cuando ocurre lo contrario da inicio la degradación del mismo. En éste caso, los datos se interpretaron en términos de que la síntesis de CABP es considerablemente más lenta que su degradación (Seemann et al. 1988).

La información disponible indica que la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  tiene lugar en la LS y que además, es ella la que cataliza las reacciones de carboxilación y oxigenación. En el caso de la SS su importancia no ha podido establecerse con claridad. Se ha sugerido que puede ayudar a disminuir el valor de  $K_m(\text{CO}_2)$ ; otros autores opinan que facilita la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y hay también quienes consideran que ayuda a disminuir el efecto de compuestos inhibidores. Sin embargo, los datos al respecto son contradictorios y lo único que parece evidente es que ayuda a la holoenzima a adquirir y mantener la estructura que le permite llevar a cabo sus funciones (Miziorko and Lorimer, 1983).

Al respecto son interesantes los resultados de Andrews (1988) quien demostró que la LS de *Synechococcus* en ausencia de la SS tiene una actividad apenas apreciable.

### II.3.- Regulación por luz.

Los cambios de luz proporcionan las bases para la regulación de bastantes fenómenos que ocurren durante el desarrollo de las plantas. El primer paso en todas las fotorespuestas es la absorción de la luz por un fotoreceptor. El fitocromo, un pigmento proteico que absorbe luz roja es el fotoreceptor mejor caracterizado en las plantas superiores. De los genes cuya expresión se ha demostrado que está regulada por el fitocromo destaca el de la SS de la RUBISCO, el cual, con experimentos de traducción *in vitro* de RNA poli(A)<sup>+</sup> ha permitido observar que un punto muy importante de ese control es la velocidad con que se lleva a cabo la transcripción de los genes, al respecto diversos autores han reportado la existencia de una región de tamaño variable pero menor de 500 pb localizado antes del inicio de la transcripción y que aparentemente es responsable del reconocimiento del estímulo luminoso (Kuhlemier et al. 1987).

De acuerdo con este planteamiento, en *Chlorogonium* se ha demostrado que la síntesis de la RUBISCO está controlada por luz azul, pues las células, al ser iluminadas, incrementaron fuertemente las cantidades de RNAm para las dos subunidades y las de los respectivos polipéptidos lo cual indica la posible existencia y participación de un fotoreceptor diferente al fitocromo (Roschner and Zetsche, 1986).

En cotiledones de *Amaranthus hypocondriacus* la síntesis de los polipéptidos correspondientes a las dos subunidades se incrementa notablemente cuando las plantas son llevadas a luz

(Berry et al. 1986). Esto se da en un periodo menor a 4 h. A tiempos mayores (12 h) se observa además el incremento en los RNAm. Los niveles de los mensajes y de las subunidades bajan cuando las plantas son nuevamente puesta en oscuridad. Por medio de DCMU (inhibidor del transporte de  $e^-$ ) y CCCP (desacoplante de la fosforilación) se observó que la falta de ATP no es la causa de este fenómeno (Berry et al. 1986).

También en los cotiledones de *Amaranthus* se observó que en las primeras 4 h después de que las plántulas son pasadas de luz a oscuridad, las cantidades de LS y SS disminuyeron 10 y 20 veces más que las del resto de las proteínas. Estos cambios no correspondieron con los niveles de RNAm funcional para cada subunidad y se observó que en la oscuridad se incrementa notablemente la cantidad de mensaje funcional asociado a polisomas pero que no se traduce, por lo cual se sugiere que durante las primeras horas de ausencia de luz la traducción de los mensajes de la LS y SS es inhibida (Berry et al. 1988).

Sin embargo, parece que la respuesta de las plantas superiores a la luz no se da en todos los casos de la misma manera. Por ejemplo, en cotiledones de calabaza se observó que la iniciación de la acumulación de los mensajes de la LS y SS ocurre 2 o 3 días después de la siembra, coincide con la aparición de RNA ribosomal cloroplástico y son fenómenos independientes a la recepción o no de luz por las plantas (Walden and Leaver, 1981).

#### II.4.- Estabilidad de la RUBISCO.

Durante la expansión de la hoja no. 12 de plantas de arroz, la actividad de la RUBISCO se incrementa muy rápido y logra su punto más alto 10 días después de que ésta ha alcanzado su superficie máxima (Makino et al. 1984a). A medida que la hoja entra en senescencia se observa que la conductancia de  $\text{CO}_2$  declina más lentamente que la actividad de RUBISCO por lo que los niveles de  $\text{CO}_2$  intracelulares se mantienen altos. Esto indica que la resistencia estomatal aparentemente no es limitante de la fotosíntesis. La pérdida de actividad de la RUBISCO es similar a la desaparición de la RUBISCO y por otra parte, las propiedades cinéticas de la enzimas no cambian durante toda la vida de la hoja, lo cual les permite proponer que probablemente la RUBISCO se sintetiza masivamente al inicio y persiste gracias a que tiene un recambio pequeño (Makino et al. 1984a).

Un estudio realizado con hojas primarias de plántulas de cebada mostró un comportamiento similar (Friedrich and Huffaker, 1980).

Otros autores han observado que los cloroplastos gradualmente van sufriendo modificaciones importantes lo cual podría incrementar las resistencias internas a la difusión del  $\text{CO}_2$  y esto si podría constituir una fuerte limitante en la capacidad fotosintética de los tejidos (Wittenbach et al. 1980).

Hasta ahora no se sabe mucho acerca de la forma como se degrada la RUBISCO. Sin embargo, analizando la senescencia de la 1a. hoja de plántulas de trigo se observó que la disminución en la

cantidad de RUBISCO se da antes de que desaparezcan los cloroplastos (Mae et al. 1984). Con estos resultados, los autores sugieren la posibilidad de que la degradación de la enzima pudiera ocurrir dentro del mismo cloroplasto. Sin embargo, es necesario considerar que esos experimentos no son suficientes para descartar la posibilidad de que la RUBISCO pudiera salir de los cloroplastos y ser degradada en otro lugar.

El esclarecimiento de este punto es de vital importancia tanto académica como práctica. Al respecto, cabe mencionar un estudio en hojas de arroz en donde se encontró que la cantidad de RUBISCO sintetizada estaba en relación directa con la cantidad de N de que la planta disponía. A medida que la hoja envejeció la RUBISCO disminuyó por lo que se sugiere que dada la abundancia de la RUBISCO en la célula y la forma de sus relaciones con el N ambiental, esta enzima podría constituir un almacén importante de N orgánico que la planta podría reutilizar (Makino et al. 1984b).

Se han realizado diversos estudios utilizando diferentes modelos experimentales con el propósito de encontrar una explicación a la forma como ocurre la degradación de la RUBISCO.

En las hojas de cebada sometidas a envejecimiento (cortadas), se observó que se incrementa la actividad de dos endopeptidasas localizadas en la vacuola y que aparentemente se presentan otro tipo de proteasas cuya localización en la célula no fue precisada, pero que al igual que las de la vacuola, son altamente activas sobre azocasina y RUBISCO purificada (Miller and Huffaker, 1985). Estos resultados sugieren que algunas de estas nuevas

proteasas podrian estar localizadas en el interior de los cloroplastos. Sin embargo, no se pudo descartar la posibilidad de que la degradación de los mismos y de sus componentes se llevara a cabo con la participación de las enzimas vacuolares.

En las mazorcas tiernas de maiz se aislaron 4 aminopeptidasas y una endopeptidasa de pesos moleculares de 92, 86.5, 83, 61 y 67 Kd respectivamente. Las aminopeptidasas fueron fuertemente inhibidas por  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  y p-mercuriobenzoato en tanto que la endopeptidasa lo fue solamente por p-mercuriobenzoato, pero la localización de todas ellas tampoco fué establecida (Vodkin and Scandalios, 1980).

Aislando cloroplastos intactos de chicharo y usando sustratos artificiales se demostro que en el estroma existen tres aminopeptidasas con pesos moleculares de 269, 84 y 42 Kd respectivamente. A diferencia de las de vacuola, éstas tienen un pH óptimo mayor de 7.0 y son inhibidas por DTT, lo cual hace pensar que son mas activas durante la noche. Sus características son muy similares en diferentes etapas del desarrollo de las plantas, lo cual hace suponer que su funcion fisiológica no se restringe a la etapa de senescencia. Con el ensayo utilizado no se encontraron carboxipeptidasas (Liu and Jagendorf, 1986).

Tambien en cloroplastos aislados de plántulas de cebada se identificaron tres aminopeptidasas de pesos moleculares de 66.7, 56.5 y 54.6 Kd distribuidas en proporciones más o menos iguales en el estroma y en los tilacoides. Las enzimas resultaron sensibles a inhibidores de tipo sulfhidrilo. La actividad de las mismas

disminuyó con la senescencia de las hojas, pero no desaparecieron ni se observaron formas nuevas y con polipéptidos artificiales demostraron ser selectivas para cierto tipo de aminoácidos, por lo cual se sugiere que su participación podría consistir en desestabilizar a las moléculas de RUBISCO para que después continúe su degradación (Thayer et al. 1988).

Al respecto, experimentos hechos en *S. cereviceae* consistentes en la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa y la unión de la ubiquitina al extremo amino terminal de la misma demostraron que la degradación de la  $\beta$ -galactosidasa era más rápida si la ubiquitina se unía a Phe, Leu, Asp, Lys, Arg y Pro, razón por la cual se propone que en los sistemas biológicos la existencia de aminopeptidasas podría ser fundamental, pues permitirían la exposición de algunos de los residuos antes mencionados y de esa manera controlarían controlar la velocidad de degradación de las proteínas (Bachmair et al. 1986).

Sin embargo, existen experimentos que muestran que durante la senescencia, la degradación de la RUBISCO no es mayor o menor que la que sufren el resto de las proteínas. En un análisis de las hojas primarias de plántulas de cebada se observó que el porcentaje de la RUBISCO en la proteína soluble al principio es de 60 % y que a medida que el envejecimiento avanza esta proporción no solo se mantiene sino que incluso llega a aumentar hasta un 80 % aunque finalmente termina siendo el 52 % (Friedrich and Huffaker, 1980).

En la hoja bandera de trigo durante el llenado de los granos

se observó que aun cuando la proteína total va disminuyendo el porcentaje de RUBISCO con respecto a la proteína soluble se mantiene casi siempre por arriba del 40 % (Wittenbach, 1979).

En muchas plantas y en soya en particular, se ha observado que los primeros síntomas de la senescencia son la declinación en la actividad fotosintética, clorofila y N total de la hoja así como un incremento notable en la actividad proteolítica y que junto con estos cambios se observa desorientación en las lamelas de los cloroplastos (Wittenbach et al. 1980).

Sin embargo, estudios realizados en las hojas primarias de plántulas de cebada mostraron que la pérdida de clorofila es posterior a la degradación de la RUBISCO y que aparentemente la degradación de ambas ocurre por mecanismos distintos que probablemente tengan una regulación diferente (Friedrich and Huffaker, 1980).

#### II.5.- La RUBISCO y el mejoramiento de las plantas.

El maíz es una planta  $C_4$  y éstas, a diferencia de las que tienen el ciclo  $C_3$ , realizan la fijación del  $CO_2$  con la participación de dos enzimas fundamentales: la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa, E.C. 4.1.1.31) y la RUBISCO. En el funcionamiento de ambas es muy importante la compartimentalización que manifiestan: la PEPCasa se localiza mayoritariamente en las células del mesófilo en tanto que la RUBISCO lo hace en las del haz vascular (Ray and Black, 1979).

La PEPCasa realiza la fijación primaria del  $CO_2$  mediante la



carboxilación del fosfoenolpiruvato, el malato formado pasa a las células de la vaina del haz vascular en donde es descarboxilado. El  $\text{CO}_2$  producido de esta manera es el que aprovecha la RUBISCO para llevar a cabo el ciclo de Calvin (Ray and Black, 1979).

Desde hace mucho tiempo se sabe que la capacidad de crecimiento de todos los órganos de la planta está determinada por la eficiencia con que se fija el  $\text{CO}_2$  y la forma en que se distribuyen los productos sintetizados (Gifford and Evans, 1983).

Diferentes grupos de investigadores han abordado el problema desde varios puntos de vista. Así, Christensen y col. (1981), mostraron que el reparto de los productos de la fotosíntesis es un fenómeno muy complejo y observaron que en maíz cuando la mazorca se quita tres días después de que fue polinizada, disminuye notablemente la vida de las hojas; su metabolismo también se modifica pues aumenta la cantidad de azúcares y baja la de compuestos nitrogenados.

En un sistema similar, Crafts-Brandner y Poneleit (1987b) encontraron que al quitar la mazorca, además de los cambios mencionados, se observa que la actividad fotosintética disminuye considerablemente como resultado de la pérdida de actividad tanto de la RUBISCO como de la PEPCasa, siendo ésta última la que resulta más afectada. Los mismos autores señalan que estos cambios son independientes de la concentración interna de  $\text{CO}_2$  (la cual cambia muy poco), por lo que sugieren que la PEPCasa podría tener un papel regulador muy importante y participar de alguna manera en el reconocimiento de las señales que podría enviar el órgano que

recibe los productos.

La importancia de la fotosíntesis en la producción y el hecho de que en las plantas  $C_4$  ocurra con la participación de dos enzimas, ha motivado a muchos investigadores a preguntarse cual de ellas es la más importante.

Usuda (1984) encontró que en plántulas de maíz la tasa fotosintética está estrechamente relacionada con la actividad de la RUBISCO, lo cual sugiere que la regulación de esta enzima puede constituir un paso crítico en la magnitud de la fotosíntesis realizada. Además señala que otros autores no han encontrado esa correlación, probablemente como resultado de no considerar adecuadamente la capacidad fotosintética de cada uno de los tejidos que forman a la planta.

Crafts-Brandner y Poneleit (1987a), analizando el comportamiento de la actividad fotosintética en diferentes poblaciones de maíz durante el periodo de llenado del grano, encontraron que la actividad de la RUBISCO estuvo fuertemente correlacionada con el consumo de  $CO_2$  en tanto que la actividad de la PEPCasa mostró una actividad siempre alta y sin relación aparente con el consumo de  $CO_2$ , por lo cual proponen que en esta etapa del desarrollo de las plantas de maíz también es la RUBISCO y no la PEPCasa la que limita la fijación de  $CO_2$ .

De igual forma, analizando el periodo de llenado del grano, en nuestro laboratorio (Loza-Tavera et al. 1987) se encontró que en esa etapa, la actividad de la RUBISCO se incrementa notablemente, siendo los cambios mayores en las poblaciones que

fueron seleccionadas genéticamente para aumentar su rendimiento de grano. Por su parte, la actividad de la PEPCasa no presentó mayores cambios y tampoco fueron evidentes grandes diferencias entre las poblaciones analizadas.

Los resultados de este último trabajo hacen pensar que los avances logrados con la selección para mayor rendimiento de grano a que se sometieron las plantas han sido posibles gracias a que se modificaron aspectos importantes en la cantidad y/o regulación de la RUBISCO.

Sin embargo las relaciones entre la actividad de la RUBISCO y el rendimiento de grano de los cultivos a pesar de haberse estudiado con cierto detalle en diferentes especies son ambiguas, ello tal vez se deba a la complejidad del fenómeno y a que probablemente no se han utilizado los modelos experimentales más adecuados (Zelitch, 1982).

### III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los antecedentes se ha hecho énfasis sobre el papel tan importante de la RUBISCO en todos los seres vivos que realizan fotosíntesis y es palpable la necesidad de entender mejor la regulación de su actividad, pues de ello podrían derivarse contribuciones a la solución de importantes problemas agrícolas relacionados con la producción.

Con base en lo anterior, el presente trabajo se estructura buscando dar respuestas a dos cuestiones fundamentales:

- 1.- Bioquímicamente: ¿De que manera se regula la actividad de la RUBISCO en maíz? y ¿Cómo se afecta la regulación por el estado fisiológico de los tejidos analizados?
  
- 2.- ¿Que posibilidades existen de que a través del estudio de la regulación de la actividad de la RUBISCO se puedan obtener criterios que pudieran emplearse en los trabajos de mejoramiento genético?

### IV.- OBJETIVOS.

Sobre el particular se hace la aclaración de que éste trabajo forma parte de las actividades que se realizan dentro de un proyecto interdisciplinario que tiene como objetivo fundamental explicar bioquímicamente las características de las plantas de

maiz que se distinguen por sus altos rendimientos de grano.

Como una consecuencia de lo anterior, se tienen considerados otros objetivos no menos importantes como es el analizar las posibilidades de obtener criterios bioquímicos que puedan ser propuestos para ser utilizados en los programas de mejoramiento de esta y otras especies.

Con base en lo anterior, para este trabajo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1 .- Analizar si el incremento en la actividad de la RUBISCO que se ha reportado durante el periodo de llenado de los granos en maiz está determinado por incrementos en la cantidad de la enzima respectiva.
- 2 .- Observar si el fenomeno reportado en plantas adultas es característico de esa etapa, o si es algo que se manifiesta en otras etapas fisiológicas de la planta.
- 3 .- Explorar las posibilidades de que existan diferencias significativas en la regulacion de la actividad de la RUBISCO en variedades con rendimientos de grano contrastantes.
- 4 .- Analizar las posibilidades de que los parametros que muestren esas probables diferencias entre poblaciones sean recomendados como criterios de seleccion de nuevos materiales con mayor nivel de rendimiento.

## V.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Con el fin de juzgar la validez de los planteamientos anteriores y para cumplir con los objetivos planteados con base en ellos, los experimentos se hicieron usando dos modelos biológicos:

### 1 .- El desarrollo de una hoja en plántulas de maíz.

Este período se caracteriza por un crecimiento vegetativo muy activo y necesario para que la planta logre su establecimiento.

### 2 .- El período de llenado de los granos de la mazorca.

Por información en la literatura (Tanaka and Yamaguchi, 1972) en donde se analizó la contribución relativa de las diferentes hojas al rendimiento de grano y por investigaciones realizadas por nuestro grupo (Loza-Tavera et al. 1987) se decidió que la hoja inmediatamente superior a la mazorca es la más indicada para estudiar los cambios que pudiera sufrir la regulación de la actividad de la RUBISCO durante el período de llenado del grano.

En los dos casos se usaron dos tipos de poblaciones de maíz de la variedad Zacatecas 58: mejoradas y la ORIGINAL. Las primeras

proviene de la población ORIGINAL de la cual fueron seleccionadas por mayor rendimiento de grano, a través de 13 y 18 ciclos de selección masal estratificada y que amablemente fueron proporcionadas por el Dr. José Molina Galán del Centro de Genética del Colegio de Posgraduados, Montecillos, Edo. de México.

La razón de utilizar éstos materiales es que se dispone tanto de la población ORIGINAL como de las poblaciones que han sido derivadas de los diferentes ciclos de selección y entre las cuales existen diferencias significativas en el rendimiento de grano (en este programa de mejoramiento los incrementos en el rendimiento se han sostenido en 3.9 % / ciclo (Loza-Tavera et al. 1987)1).

Esto hace que el conjunto de materiales sea idóneo para investigar si la regulación de la actividad de la RUBISCO está involucrada con la mayor capacidad de rendimiento que se observa en las poblaciones que han sido mejoradas y al mismo tiempo, dado que permiten estudiar las modificaciones que van sufriendo las poblaciones a medida que van siendo mejoradas, pueden establecerse correlaciones entre tales cambios y el rendimiento de grano, es decir, se puede explorar la posibilidad de obtener nuevos criterios para seleccionar plantas con mayor capacidad de rendimiento.

## VI.- MATERIALES Y METODOS.

### VI.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

En éste estudio se utilizaron plantas de maíz de la variedad Zacatecas 58 ORIGINAL y de poblaciones derivadas de la mismas obtenidas después de 13 y 18 ciclos de selección masal para rendimiento de grano (SM-13 y SM-18 respectivamente). Se usaron plantas en dos etapas de desarrollo: plantas adultas y plántulas.

En el caso de plantas adultas, los materiales fueron sembrados por el Dr. José Molina Galán en los terrenos del Colegio de Posgraduados en Montecillos, Edo. de México bajo condiciones de riego.

Para los análisis de plántulas, éstas se obtuvieron en invernadero y se tomaron diferentes etapas del desarrollo de la segunda hoja (cuadro 1).

### VI.2 - MUESTREOS.

#### VI.2.1.- PLANTAS ADULTAS.

Para el análisis de las plantas adultas se hicieron muestreos semanales de la hoja inmediatamente superior a la mazorca en siete plantas tomadas al azar durante el periodo de llenado del grano el cual se consideró como el comprendido desde el momento en que hubo floración masculina en el 50 % de la población hasta que los granos de la mazorca alcanzaron la madurez fisiológica (dicho periodo tuvo una duración aproximada de 50 días).



Primeramente las hojas se pesaron, se lavaron con detergente y se enjuagaron con abundante agua destilada.

Después se les cortaron los extremos y la nervadura central. Hecho lo anterior, se combinaron las siete hojas y buscando que quedaran igualmente representadas se hicieron paquetes de 5 g los cuales se guardaron en N líquido. Los análisis se hicieron por triplicado en estas muestras.

#### VI.2.2.- PLANTULAS.

En el caso de plántulas, el análisis se limitó a diferentes edades fisiológicas en el desarrollo de la segunda hoja (cuadro 1).

Para esto a las hojas seleccionadas se les cortó la vaina y de manera individual a cada hoja se le hicieron las determinaciones que se reportan. Las determinaciones se repitieron entre 8 y 10 veces.

#### VI.2.3.- DETERMINACION DE PESO SECO.

Las muestras se pusieron en calor seco a 60°C hasta que el peso de las mismas se mantuvo constante.

#### VI.2.4.- DETERMINACION DE CLOROFILA.

Se hizo a partir de 0.5 g de hojas, los cuales se homogeneizaron con 7 ml de acetona al 80 %. Las lecturas se hicieron en un espectrofotometro Pye Unicam SP6-550 según lo reportado por Bruinsma (1963).

CUADRO 1

EDADES FISIOLÓGICAS SELECCIONADAS PARA EL ANÁLISIS DE LA SEGUNDA HOJA EN PLANTULAS DE MAÍZ DE LAS VARIETADES ZACATECAS 58 ORIGINAL Y SM-18.

ETAPA	DESCRIPCIÓN
1	LA SEGUNDA HOJA APENAS ES VISIBLE EN TANTO QUE LA HOJA COTILEDONAR PERMANECE ENROLLADA Y AUN NO SE LE DISTINGUE LA LIGULA.
2	LA SEGUNDA HOJA CONTINUA ENROLLADA. LA LAMINA FOLIAR DE LA HOJA COTILEDONAR SE HA EXTENDIDO Y SU LIGULA ES VISIBLE PERO AUN NO SE EXPONE.
3	LA SEGUNDA HOJA EMPIEZA A DESENRROLLARSE. LA PRIMERA TIENE LA LIGULA BIEN EXPUESTA Y SE DISTINGUE UNA PEQUEÑA PARTE DE LA LAMINA DE LA TERCER HOJA.
4	LA SEGUNDA HOJA NO SE HA DESENRROLLADO COMPLETAMENTE. TIENE UN TAMAÑO CASI IGUAL AL DE LA HOJA COTILEDONAR LA TERCER HOJA YA ES CLARAMENTE VISIBLE PERO PERMANECE ENROLLADA.
5	TANTO LA PRIMERA COMO LA SEGUNDA HOJAS TIENEN LA LIGULA EXPUESTA. SON VISIBLES LAS LAMINAS DE LA TERCERA Y CUARTA HOJAS. EN ESTE MOMENTO LA SEGUNDA HOJA HA ALCANZADO SU TAMAÑO MÁXIMO Y DEJA DE CRECER.
6	3 DÍAS DESPUÉS DE QUE LA SEGUNDA HOJA HA ALCANZADO SU TAMAÑO MÁXIMO.
7	5 DÍAS DESPUÉS DE QUE LA SEGUNDA HOJA HA ALCANZADO SU TAMAÑO MÁXIMO.

#### VI.2.5.-DETERMINACION DE PROTEINAS.

La medición de éstas se hizo en el extracto de las hojas, para lo cual se tomaron alícuotas de 150  $\mu$ l que se precipitaron con TCA al 72 % a 0°C por 30 min., se centrifugó a 2500 g por 15 min. y el precipitado se resuspendió en agua y se ajustó el pH a 8.0. La determinación final se hizo siguiendo el método de Peterson (1977), la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Pye Unicam SP6-550. Con albúmina de bovino se elaboró una curva patrón de 0 a 500  $\mu$ g.

#### VI.2.6.- PURIFICACION DE RUBISCO DE ESPINACA.

Se siguió el método de Wishnick and Lane (1971) al cual se hicieron algunas modificaciones. Todos los pasos se llevaron a cabo a 0°C.

Se homogeneizaron 40 g de hojas de espinaca sin nervadura con 50 ml de amortiguador Tris-HCl 25 mM con pH 7.5

Se filtró con 4 capas de gasa y se centrifugó 30 min a 10,000g (centrifuga Beckman J2-21 rotor JA-20). Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de 35 % y se centrifugó otros 15 min a 10,000g. Al sobrenadante se le añadió más sulfato de amonio hasta que la concentración final fue 55 % y se volvió a centrifugar 15 min a 10,000g.

El precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-HCl 25 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 0.1 M y pH 7.5.

El nuevo extracto se pasó por una columna de Sephadex G-100 de la que se eluyó con el amortiguador usado para la

resuspensión que se hizo después de la precipitación con sulfato de amonio al 55 %.

La proteína se siguió por su absorbancia a 280 nm y las fracciones que contenían el primer gran pico de proteína se reunieron y se dializaron contra un amortiguador compuesto de Tris-HCl 25 mM, EDTA 0.1 mM y pH de 7.5

El dializado se pasó por una columna de DEAE-celulosa y se lavó exhaustivamente con el amortiguador de dialisis. La muestra se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M. La proteína se siguió por su absorbancia a 280 nm y las fracciones que contenían el pico de proteína se reunieron y se precipitaron con sulfato de amonio al 55 %. El precipitado se recuperó centrifugando 30 min a 10,000g y se resuspendió en un volumen mínimo de amortiguador de dialisis.

El siguiente paso consistió en dializar contra el mismo amortiguador para quitar el exceso de sales.

El dializado se pasó por una columna de DEAE-Sephadex A-50, de donde se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M, la proteína se recuperó de la misma manera como se mencionó antes.

La proteína obtenida de este último paso al ser analizada por electroforesis en geles de acrilamida nativos y desnaturalizantes con SDS mostro las bandas esperadas de una muestra pura de RUBISCO con pesos moleculares que son muy semejantes a los reportados en la literatura (Wishnick and Lane, 1971).

#### VI.2.7.- OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA RUBISCO.

Con la RUBISCO de espinaca purificada por el esquema descrito, se inocularon conejos de un mes de edad. La suspensión

inyectada se obtuvo mezclando partes iguales de la solución proteica con el adyuvante completo de Freund. El esquema utilizado es el que a continuación se presenta, mismo que fué utilizado por Yáñez-Estrada (1982) para la obtención de anticuerpos contra la deshidrogenasa glutámica.

Esquema utilizado para la obtención de anticuerpos contra RUBISCO.

días	mezcla antígeno-adyuvante		antígeno µg	vía
	volúmen ml			
0	0.4		100	cojinetes plantares
8	0.4		100	subcutánea dorsal
36	1.0		250	" "
43	1.0		250	" "
51	1.5		300	" "
59	1.0		600	" "
70	1.5		1300	subcutánea abdominal
76	sangrado	de	prueba	
86	1.5		1300	subcutánea abdominal
97	2.0		1500	" "
104	sangrado	de	prueba	
105	punción	cardiaca		

La sangre obtenida se dejó coagular y se incubó 1 h a 37°C.

Después se centrifugó 10 min a 4000g a 4°C.

El título de los anticuerpos se obtuvo determinando la

capacidad del suero para formar precipitados con la máxima dilución del antígeno. Para este propósito se preparó una solución de RUBISCO al 1 % y el título obtenido fue de 1:16000. El suero obtenido se dividió en alícuotas y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Después se usó para la determinación de RUBISCO por inmunoelectroforesis.

#### VI.2.8.- INMUNOELECTROFORESIS (Laurell, 1972).

Soluciones empleadas:

Amortiguador para geles: Tris-HCl 15 mM, glicina 7.5 mM y pH 9.0

Amortiguador de corrida: Tris-HCl 30 mM, glicina 15 mM a pH de 9.0

Solución para teñir: Azul de comassie 0.1 %, alcohol etílico 30 %, ácido acético 10 %.

Solución para desteñir: Alcohol etílico 30 % y ácido acético 10 %

Solución conservadora: Acido acético 5 %

Procedimiento.

Para elaborar las placas se preparan 14 ml de una solución con 1 % de agarosa y se pone en baño maría a  $90^{\circ}\text{C}$  hasta que se funde. Se toman 2 ml, se distribuyen sobre toda la placa y se deja secar.

El resto de la solución se deja enfriar hasta  $50^{\circ}\text{C}$  y entonces se agregan 150  $\mu\text{l}$  de la solución de anticuerpos evitando que se

formen burbujas e inmediatamente se pone sobre la primera capa, debe tenerse especial cuidado en que la distribución sea uniforme. Una vez que esta última ha solidificado, se pone en una cámara húmeda y se deja enfriar a 4°C.

Finalmente se hacen los orificios para las muestras, se ponen éstas (10  $\mu$ l) y sobre ellas se colocan 5  $\mu$ l de una solución de azul de bromofenol al 0.1 % que se usa como indicador de la corrida.

Las placas se colocan en el equipo (LKB 2117 Multiphor) y el circuito se cierra estableciendo un puente con papel filtro.

La corrida se hace a 10°C, con voltaje constante a 10 V  $\text{cm}^{-1}$  y en esas condiciones tarda aproximadamente 8h en alcanzar el extremo opuesto.

Después de esto, las placas se humedecen con agua, se cubren con una capa de papel filtro húmedo y 5 secas, se coloca una placa de vidrio sobre ellos y se presan con algún objeto que pese aproximadamente 1 kg. La presión se repite 3 veces a intervalos de 2 a 3 min.

Posteriormente las placas se lavan con una solución de NaCl 0.1 M en la que permanecen 15 min y después se presan. El lavado con NaCl y el prensado posterior se repiten una vez más.

Para teñir las placas se colocan en la solución de azul de Comassie durante 5 min.

Finalmente, las placas se lavan con agua corriente por 2 o 3 min y después se ponen en la solución para destañir en donde permanecen por 4 o 5 h.

En estas condiciones el método permitió cuantificar la



cantidad de proteína-RUBISCO en soluciones que contenían de 0 a 1 mg de proteína-RUBISCO/ml.

#### VI.2.9.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO (Pike, 1987).

Las hojas de plántulas (o del material al que se le va a medir la actividad), se pesaron y se tomó una parte para la determinación de clorofila. El resto se homogenizó en un mortero frío con 1 ml de amortiguador de extracción compuesto por  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.25 mM, DTT 5 mM, ascorbato de sodio 0.1 M, ácido dietiltiocarbámico 0.35 mM, HEPES 100 mM y pH de 7.8.

El extracto se microfugó 5 min (Microfuga Beckman B) y el sobrenadante se usó para hacer las determinaciones de actividad, proteína soluble y proteína-RUBISCO.

El ensayo se llevó a cabo en viales de cristal que normalmente se usan para contar líquido de centelleo a los que se les agregaron 50  $\mu\text{l}$  de amortiguador de ensayo (compuesto de DTT 5mM,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, HEPES 100 mM y pH 8.2), 5  $\mu\text{l}$  de ribulosa-1,5-bifosfato 20 mM, 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  0.5 M con actividad específica de 0.1  $\mu\text{Ci } \mu\text{mola}^{-1}$  (Amersham) y 5  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático.

En casi todos los experimentos se hizo una activación previa de la RUBISCO; para ello el extracto se mezcló con una solución concentrada de  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{NaHCO}_3$  hasta alcanzar una concentración final de 10 mM y 15 mM respectivamente y se incubó a 30°C por 9.5 min. y con esta preparación enzimática se procedió a hacer la medición de la actividad.

En algunos experimentos no se realizó esta activación; en estos casos las concentraciones finales de  $MgCl_2$  y  $NaHCO_3$  se mantubieron y solamente se suprimió el tiempo de activación.

Para hacer el ensayo, en los viales se pusieron todos los componentes, se incubaron a  $30^{\circ}C$  por 2 min. e inmediatamente se inició la reacción agregando el extracto enzimático.

Para cada extracto se hicieron cuatro puntos: 0, 20, 40 y 60 seg. al término de los cuales la reacción se paró agregando  $100 \mu l$  de una solución de  $HCl$  3 N en metanol.

El siguiente paso fue evaporar las muestras en baño maria para quitar el  $CO_2$  radioactivo que no fué incorporado por la reacción.

El precipitado se resuspendió en  $75 \mu l$  de agua y se mezcló con 7 ml de líquido de Bray.

Para cuantificar la cantidad de radioactividad incorporada las muestras se dejaron reposar en oscuridad al menos 2 h y se analizaron en un contador de centelleo. (Packard MINAXI  $\beta$  SERIE 4000).

#### VI.2.10.- LIQUIDO DE BRAY (Bray, 1960).

Este se preparo de la siguiente manera PPO 2g, POPOP 0.1g, naftaleno 30 g, etilenglicol 10 ml, metanol 50 ml y se aforo con dioxano a 500 ml.

Se agito hasta que dejaron de observarse cristales y se guardó a temperatura ambiente protegido de la luz.

#### VI.2.11.- Analisis estadístico.

Los resultados presentados en el caso de plántulas son promedios de 8 a 10 repeticiones independientes y de 3 para el de plantas adultas, en las gráficas cada punto se presenta con la desviación estándar obtenida.

Por otra parte, los promedios se compararon mediante la prueba de t (Snedecor and Cochran, 1980) y cuando las diferencias entre ellas fueron mayores a las calculadas con una  $p=0.05$  se les menciona como significativas, en tanto que si fueron mayores a las obtenidas con  $p=0.01$  se les refiere como altamente significativas.

## VII.- RESULTADOS.

Los resultados obtenidos se desglozan en los siguientes puntos y al mismo tiempo se señalan las poblaciones usadas en cada caso:

VII.1.- Plántulas (poblaciones ORIGINAL y SM-18).

VII.2.- Plantas adultas (poblaciones ORIGINAL y SM-18).

VII.3.- Análisis de la actividad de la RUBISCO.

VII.3.1.- Efecto del tiempo de activación (población SM-18).

VII.3.2.- Experimentos cruzados (población SM-18).

VII.4.- Efecto ambiental en plantas adultas (poblaciones ORIGINAL y SM-13).

Y a continuación se presentan con detalle:

### VII.1.- PLANTULAS.

El crecimiento de la segunda hoja en las poblaciones ORIGINAL y SM-18, se siguió midiendo diferentes parámetros.

En las figuras 1 y 2 se presentan las tendencias que en las etapas seleccionadas para este estudio mostraron los valores de peso fresco (P.F.) y peso seco (P.S.) por hoja respectivamente.

Como puede verse en las graficas, el crecimiento que están experimentando las hojas se refleja en el comportamiento de las variables.

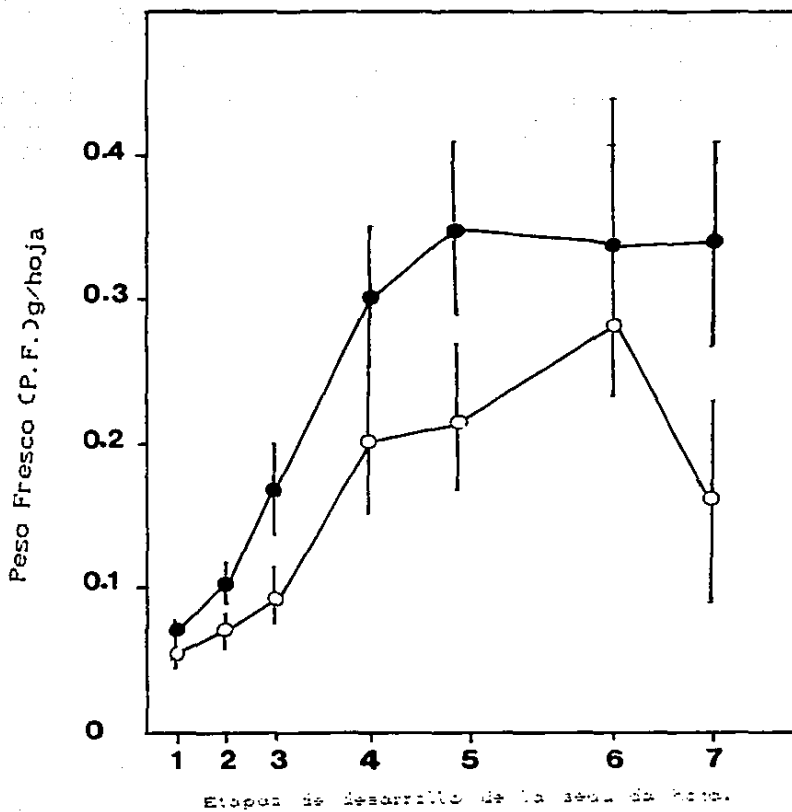


Fig. 1 Incremento del peso fresco de la segunda hoja de plántulas de maíz en las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

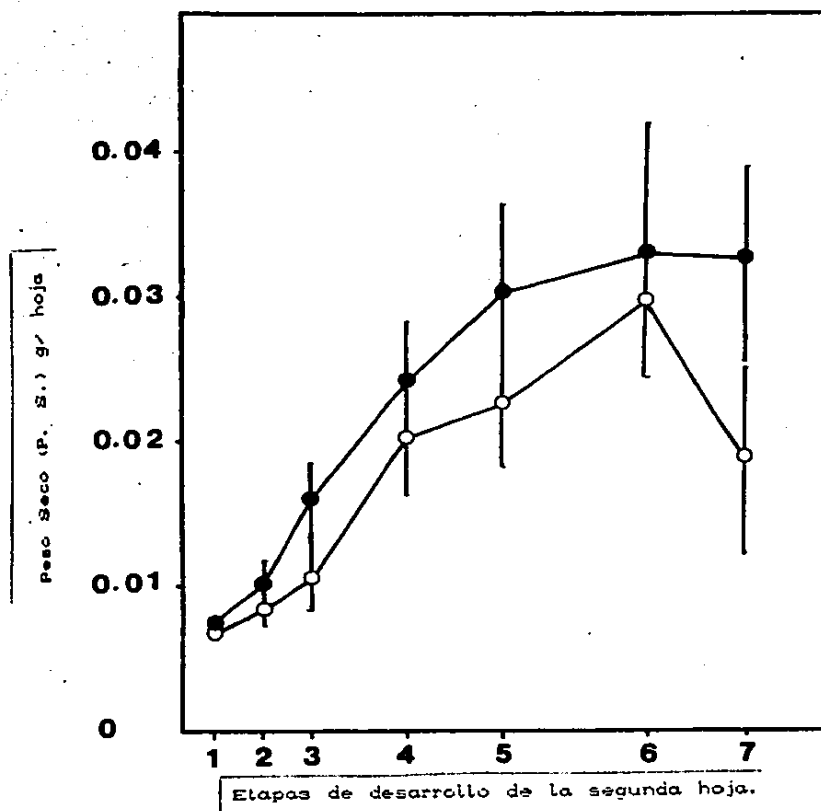


Fig.2 Incremento del peso seco de la segunda hoja de plántulas de maíz en las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

En ellas se ve que las hojas de la población SM-18 son más pesadas que las de la población ORIGINAL, la cual al final tiene una caída que no se observa en la población mejorada.

También puede apreciarse que en el P.F./hoja (fig. 1) en casi todas las etapas hay diferencias altamente significativas entre las dos poblaciones y que la significancia desaparece si estas se comparan por su P.S./hoja (fig. 2).

La caída que al final que para las dos variables muestra la población ORIGINAL tiene su origen en la pérdida de materia seca (fig. 2) y puede haberse ocasionado por una traslocación muy activa o por un fenómeno de descompensación metabólica en el cual, al ser mayores las necesidades metabólicas que la capacidad del tejido para sintetizar nuevos materiales, pudo tener lugar la degradación de materia acumulada con anterioridad. Dado que todos los materiales se crecieron en las mismas condiciones, las diferencias tan claras que se observan entre las poblaciones ORIGINAL y SM-18, puede ser un indicador de aspectos que las pueden distinguir, pero que desafortunadamente, las características del estudio realizado no permiten hacer mayores consideraciones al respecto.

Por otra parte, en la figura 3 se presenta el comportamiento de la relación P.S./P.F., la cual es una medida de la proporción del P.F. que es P.S. y como puede verse, no hay cambios bruscos, pero se observa que la población ORIGINAL tiene siempre valores más altos, algunos de ellos estadísticamente diferentes a los de la población SM-18, lo cual indica que la población SM-18 tiende a

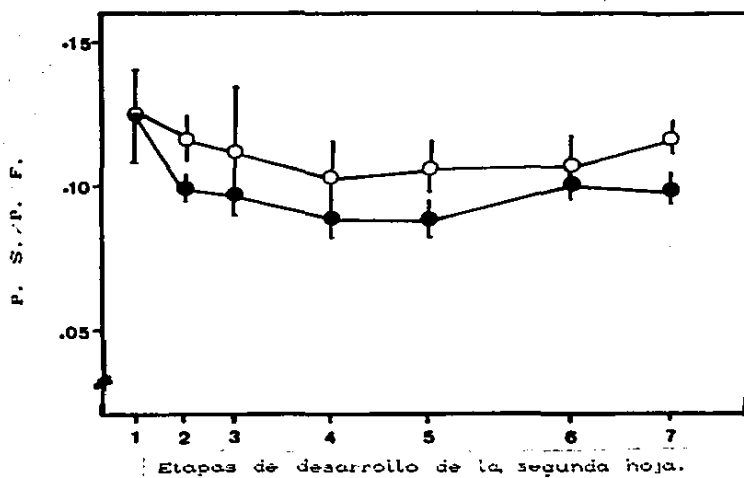


Fig.3 Cambios de la relación P.S./P.F. durante el crecimiento de la segunda hoja en plántulas de maíz de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).



tener menos materia seca por unidad de tejido que la presente en la población ORIGINAL. Esto puede deberse a que por alguna razón, la población SM-18 tiene un mayor contenido de agua, pero también puede deberse a diferencias en la capacidad de traslocación, la cual si fuera superior en la población SM-18, podría explicar las diferencias que con respecto a la población ORIGINAL se observan en la producción de materia seca.

En la figura 4 se muestra la cantidad de clorofila/g P.F. y en este caso, las diferencias entre poblaciones no son significativas, es decir, en ambos casos el contenido de clorofila se incrementa en la misma proporción a medida que se desarrollan las hojas. La caída que se observa al final, sin tener significado estadístico, refleja los deterioros que empiezan a sufrir las hojas por envejecimiento.

La figura 5 presenta la cantidad total de proteína/g P.F. y como puede verse, este valor sigue una tendencia inversa al desarrollo de la hoja. Esto indica que durante el crecimiento de las hojas la acumulación de agua y de otros materiales (fotosintatos, clorofila, etc.) es más rápida que la acumulación de proteína.

La figura 6 muestra la cantidad de proteína-RUBISCO/g P.F., se observa un comportamiento muy parecido en las dos poblaciones hasta la 5a. etapa del desarrollo de la hoja y básicamente es de constante incremento. A partir de allí, empieza una disminución de la RUBISCO en forma lenta pero notable.

Es importante señalar que salvo en la etapa 6, las

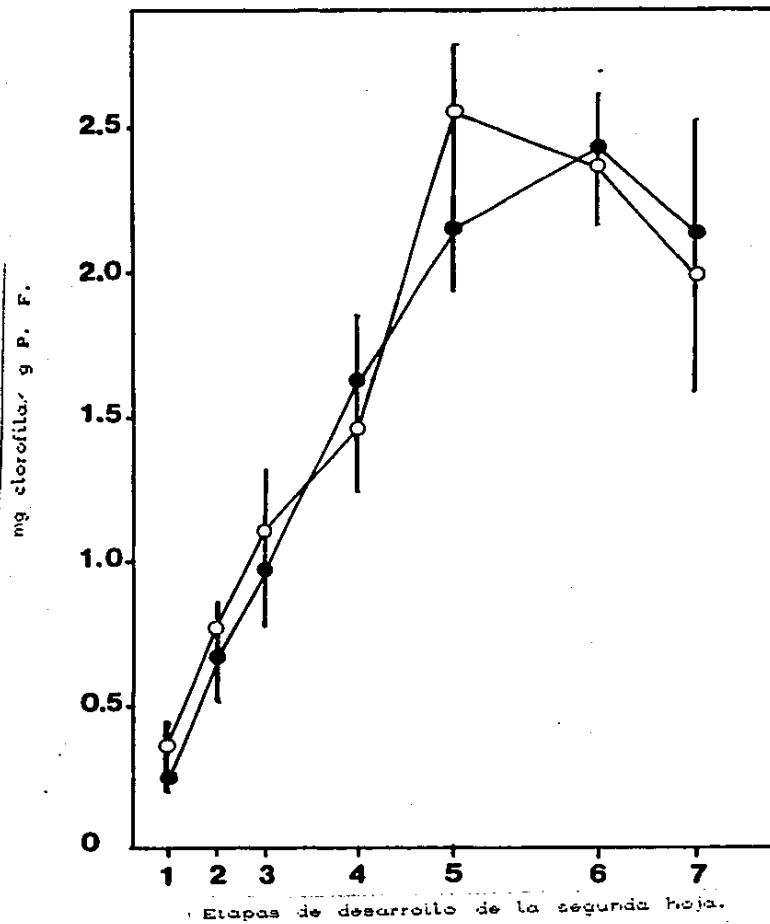


Fig.4 Incremento de la cantidad de clorofila durante el crecimiento de la segunda hoja de plántulas de maíz de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

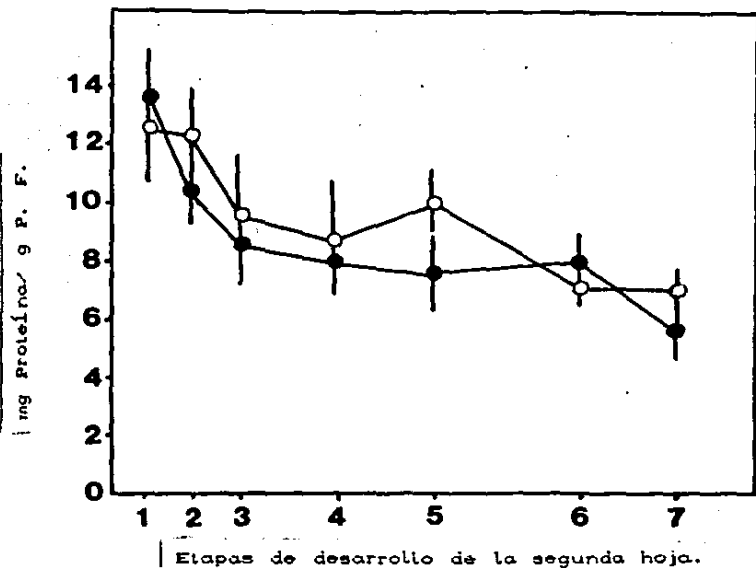


Fig.5 Cambios de la cantidad de proteína soluble en plántulas de maíz de las variedades Original (O) y SM-18 (●).

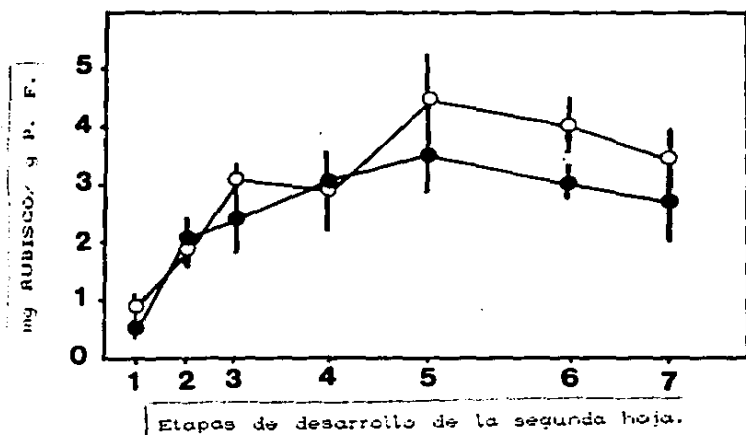


Fig.6 Cambios en la cantidad de RUBISCO en plántulas de maíz de las variedades Original (O) y SM-18 (●).

diferencias entre las dos poblaciones no son significativas. Sin embargo, se observa que en las tres últimas etapas, existe una tendencia en la que la población ORIGINAL muestra valores mayores que los de la población mejorada.

El peso de las hojas considerablemente mayor en la población SM-18 y la cantidad de RUBISCO (figs. 1 y 6), hacen pensar que las plantas de esta última población son más eficientes dado que aparentemente necesitan una cantidad de proteína-RUBISCO por unidad de tejido menor que la que muestra la población ORIGINAL.

En la figura 7 aparece el comportamiento de la fracción proteína-RUBISCO/proteína soluble durante el desarrollo de la hoja. Como puede verse, es claro el aumento de esta relación conforme las hojas incrementan su peso. Sin embargo, salvo en la etapa 6, las diferencias entre las dos poblaciones no son estadísticamente significativas.

Es importante resaltar que a medida que las hojas se desarrollan, la composición de la proteína total presente sufre cambios cualitativos muy importantes. En este caso, puede verse que el % de proteína-RUBISCO en la composición de la proteína total se incrementó y durante el tiempo de vida de la hoja pasó del 5 al 50 %.

Las figuras 8, 9 y 10 muestran la actividad de la enzima expresada en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2 \text{min}^{-1}$ , fijadas por: g de P.F., mg de proteína y mg de proteína-RUBISCO respectivamente.

En la figura 8 se ve que la actividad de la enzima por unidad de tejido no muestra diferencias significativas entre las

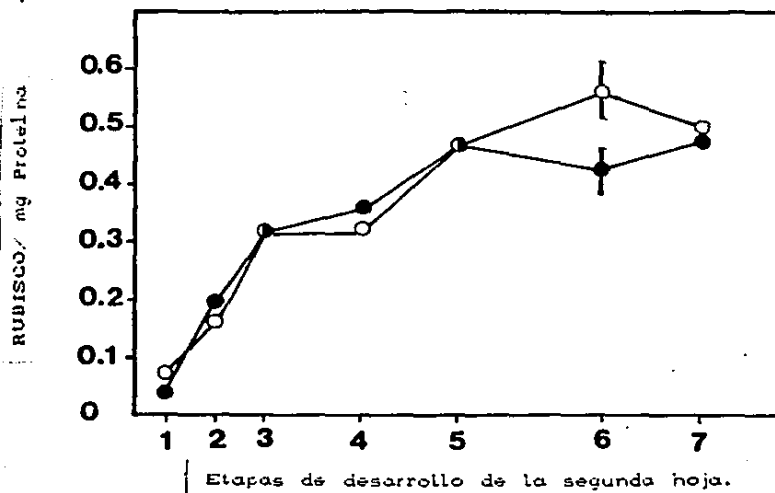


Fig. 7 Comportamiento de la relación RUBISCO/proteína soluble en plántulas de maíz de las variedades Original (O) y SM-18 (●).

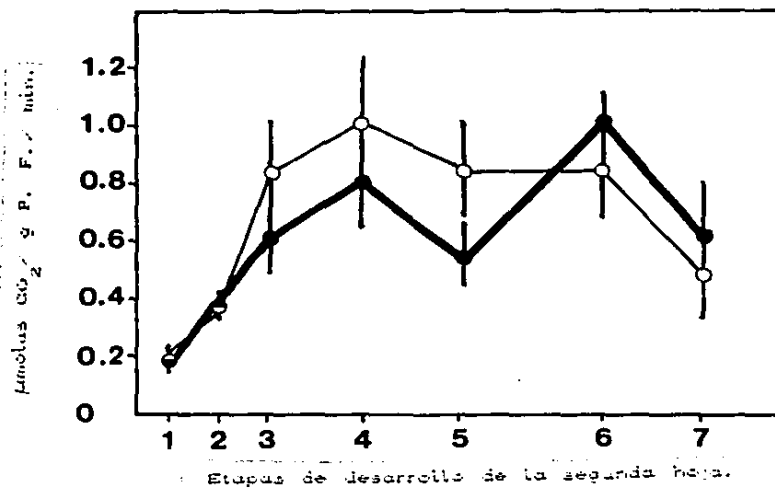


Fig. 8 Actividad de RUBISCO durante el crecimiento de la segunda hoja en plántulas de maíz de las variedades Original (O) y SM-18 (●).

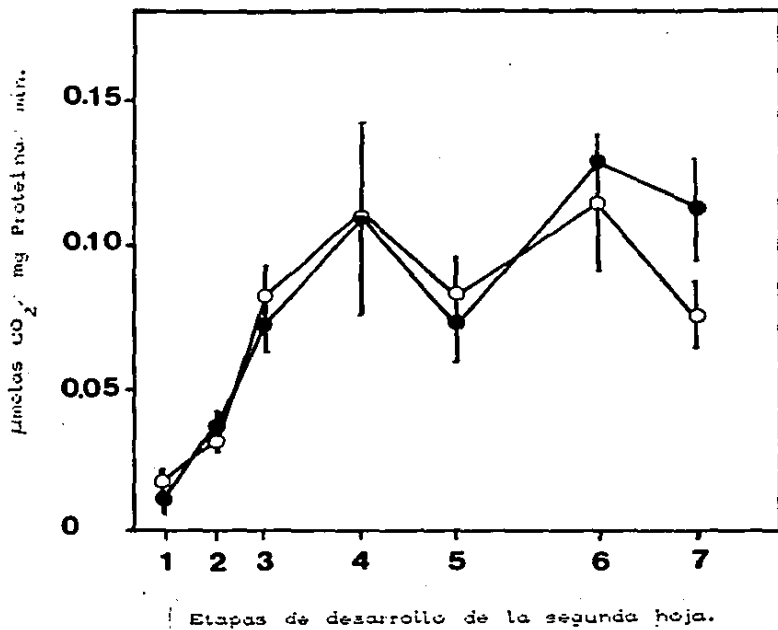


Fig.9 Comportamiento de la actividad de la RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz en las variedades Original (O) y SM-18 (●).

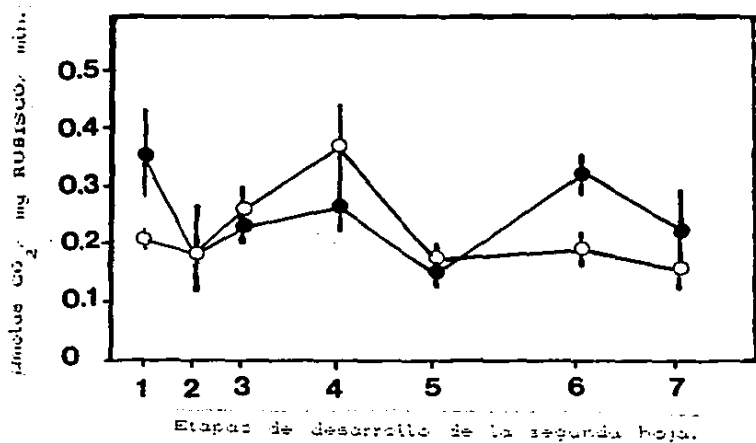


Fig.10 Actividad de RUBISCO durante el crecimiento de la segunda hoja en plántulas de maíz de las variedades Original (O) y SM-18 (●).

poblaciones, pero es claro que en los dos casos la actividad se incrementa; esto era de esperarse, pues ya en las figuras 6 y 7 se habían mostrado los aumentos tan notables que en términos absolutos y relativos tiene la cantidad de proteína-RUBISCO. Sin embargo, cuando se compara esta figura con la No. 6 en donde a su vez, se presenta la cantidad de proteína-RUBISCO/g P.F. puede verse que la enzima deja de acumularse en la 5a. etapa, en tanto que la actividad tiende a estabilizarse en la 4a.

Esta situación da la impresión de que a partir de la 4a. etapa existe un exceso de proteína-RUBISCO.

La figura 9 muestra el comportamiento de la actividad específica de la enzima y se observa que ésta se incrementa considerablemente durante el crecimiento de las hojas, al mismo tiempo que se ha incrementado la proteína-RUBISCO y cambia la composición de la proteína total, como se puede apreciar en las figuras 5 y 7.

En la figura 10 se ve que la actividad de la enzima expresada por mg de proteína-RUBISCO no es constante durante las etapas estudiadas y es evidente que durante las primeras 5 etapas los cambios que se dan en las dos poblaciones son muy similares, pero a partir de allí, la población mejorada supera significativamente a la población ORIGINAL. Este hecho puede interpretarse como consecuencia de mayor estabilidad en la enzima o de las condiciones que en la literatura se han mencionado como fundamentales para mantener su actividad (Wittenbach *et al.* 1980).

Sin embargo, estos resultados y la gran semejanza que hasta

ahora se ha mostrado en las dos poblaciones sugieren que probablemente los cambios observados a lo largo del estudio son producidos por efectos ajenos a la enzima misma.

La expresión de los resultados por unidad de tejido permite comparar a las dos poblaciones. Sin embargo, los datos manejados de esta manera ocultan la importancia de las diferencias que consistentemente se observaron en el peso de las hojas de las dos poblaciones.

La figura 11 presenta la cantidad de proteína-RUBISCO/hoja. Las diferencias entre las poblaciones no son significativas, pero contrario a lo que se observó en la figura 6 en donde la misma variable se expresó por unidad de tejido, aquí los valores de la población mejorada son ligeramente superiores durante todo el desarrollo de la hoja y no solo eso, sino que además, la población mejorada alcanza un poco antes el punto máximo.

La caída posterior que ambas poblaciones sufren también es menos brusca en la población mejorada y eso como ya se mencionó antes, puede interpretarse como resultado de mayor estabilidad de la enzima.

La figura 12 muestra la actividad de la enzima expresada por hoja y al igual que en los casos anteriores, aquí también las diferencias entre poblaciones no son significativas, sin embargo, se aprecia una tendencia de la población SM-18 de superar a los valores de la población ORIGINAL. En la gráfica se ve que en las dos poblaciones las tendencias son idénticas, localizándose la diferencias más importantes en las etapas 6 y 7 en donde los



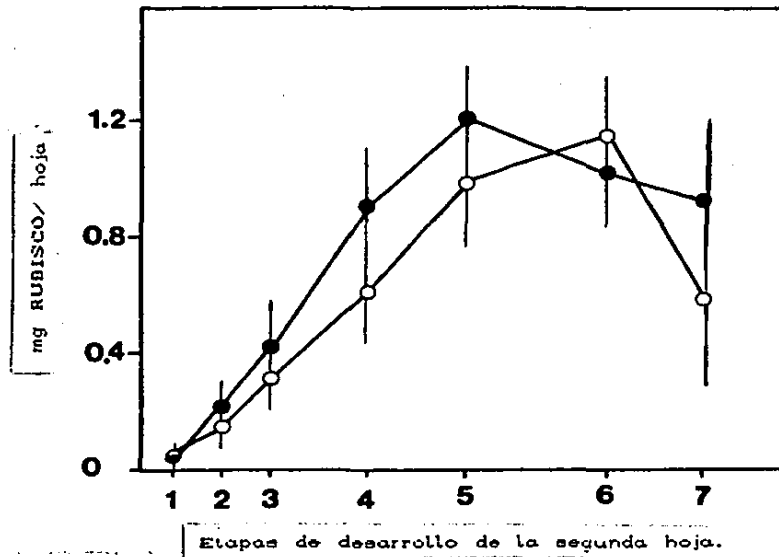


Fig.11 Incrementos del contenido de RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz en las variedades Original (O) y SM-18 (●).

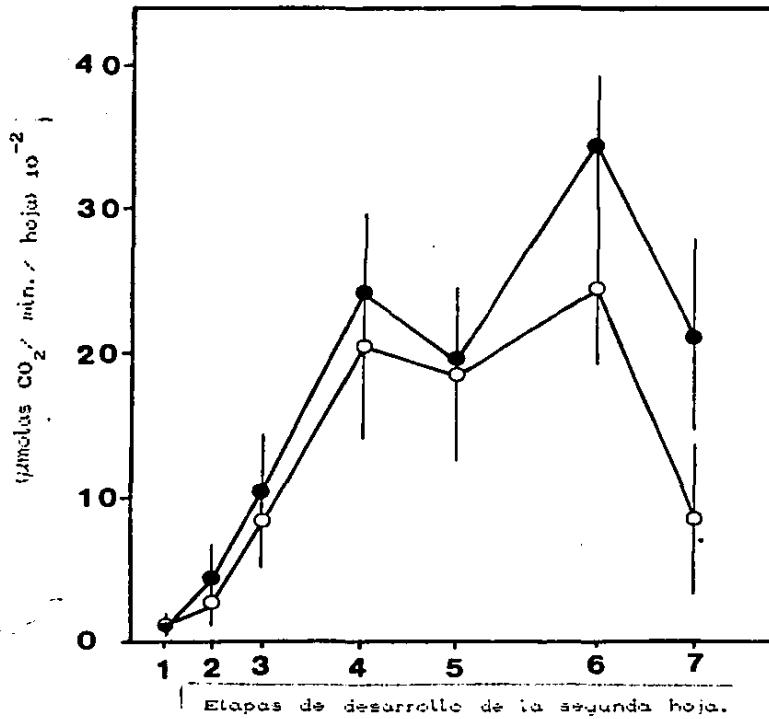


Fig.12 Incremento en la actividad de la RUBISCO durante el desarrollo de la segunda hoja de plántulas de maíz en las variedades ORIGINAL (O) y SM-18 (●).

valores de la población mejorada son más altos que los de la ORIGINAL. Esto podría ser una consecuencia de mayor duración en las condiciones que permiten el funcionamiento de la enzima, pues como se recordara en la figura 6 se mostro que en esas mismas etapas la cantidad de proteina-RUBISCO por unidad de tejido es mayor en la población ORIGINAL.

Es importante remarcar que a diferencia de lo mostrado en las gráficas 6 y 8, las figuras 11 y 12 muestran que gracias al mayor peso de las hojas, las diferencias aunque pequeñas ahora se establecen en favor de la población mejorada, y suponiendo una estrecha relación entre el peso y la área foliar, lo anterior parece indicar que la población SM-18 tiene una relación funcional proteina-RUBISCO/superficie foliar más eficiente.

#### VII.2.- PLANTAS ADULTAS.

En este punto se presentan los resultados del análisis de la hoja inmediatamente superior a la mazorca en las dos poblaciones de maíz: ORIGINAL y SM-18, durante el periodo de llenado del grano. Antes de pasar a la descripción de los resultados debe hacerse la siguiente aclaración:

Los experimentos con plantas adultas se hicieron en dos ciclos agrícolas, el primero en donde se utilizaron las poblaciones ORIGINAL y SM-18 resulto afectado por una fuerte sequía y aun cuando se hicieron todos los análisis. fue necesario establecer otro experimento con las poblaciones ORIGINAL y SM-18 ahora bajo condiciones mejor controladas en el que por

complicaciones diversas no fue posible realizar el primer muestreo.

Para facilitar la exposición, se ha invertido el orden y se presenta primero el experimento realizado en condiciones donde el agua no fué limitante.

La figura 13 muestra los valores de la relación entre P.S. y P.F. obtenidos en las poblaciones ORIGINAL y SM-18. Como puede observarse, la relación no manifiesta cambios importantes durante todos los muestreos.

Además, no se aprecian diferencias significativas entre los valores de las dos poblaciones. Esto puede deberse a que efectivamente la cantidad de agua en los tejidos permanece constante durante todo el periodo estudiado, lo cual puede indicar que el periodo de estudio no comprende la etapa de senescencia franca. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que los valores de las variables consideradas hayan cambiado en la misma proporción y por eso, la relación se mantuvo.

En la figura 14 se presentan los valores de la clorofila durante el estudio y puede verse que las diferencias entre poblaciones son poco importantes. Sin embargo, ambas poblaciones a partir del tercer muestreo muestran una caída y que para el séptimo muestreo se ha reducido a la mitad la cantidad de clorofila inicialmente presente en la hoja, lo cual sí constituye una señal evidente de daños graduales pero seguramente importantes en la capacidad fotosintética.

En la figura 15 se muestra la cantidad de proteína soluble/g

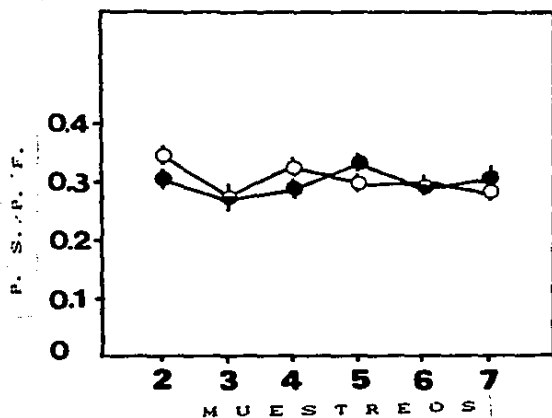


Fig.13 Valores de la relación P.S./P.F. en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

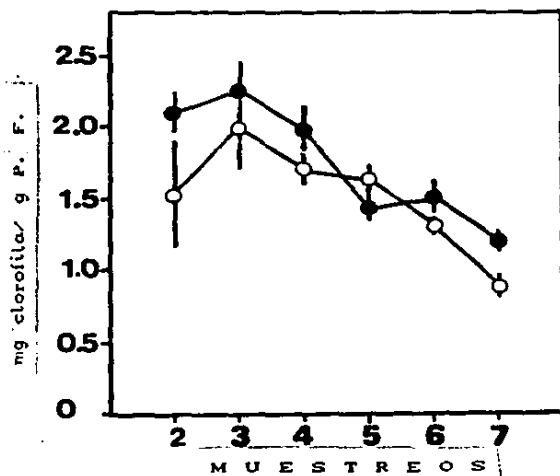


Fig.14 Contenido de clorofila en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

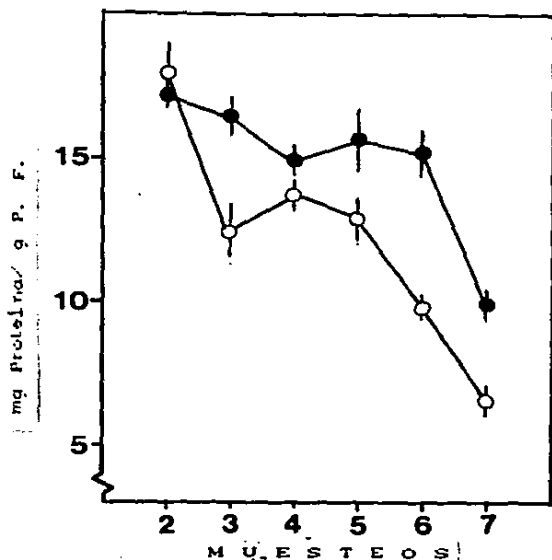


Fig.15 Contenido de proteína soluble en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

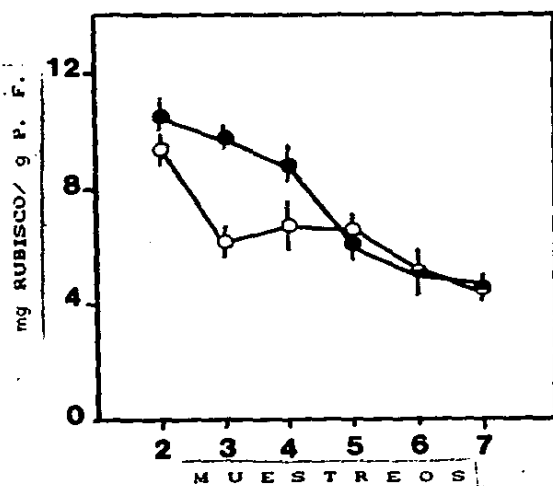


Fig.16 Contenido de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

P.F. En este caso, la mayoría de las diferencias entre las poblaciones son estadísticamente significativas. Las gráficas señalan que la población mejorada tiene más proteína que la ORIGINAL. Sin embargo, las características de las curvas son muy similares aunque la tendencia a disminuir que se observa al final del estudio es más fuerte en la población ORIGINAL.

La figura 16 presenta la cantidad de proteína-RUBISCO/g P.F.

Se ve que durante los tres primeros muestreos hay diferencias importantes a favor de la población mejorada como consecuencia de una disminución acelerada de la cantidad de proteína-RUBISCO en la población ORIGINAL. En el 5o. muestreo las diferencias entre ellas son mínimas y continúan en la caída en forma paralela.

La figura 17 por su parte muestra, el comportamiento de la fracción proteína-RUBISCO/proteína soluble, el análisis de estos resultados indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones: en la población ORIGINAL los cambios a lo largo del estudio son mínimos, se tiene un valor de 0.5 y solo hasta el último muestreo sube a 0.65. A su vez, en la población SM-18 se identifican dos niveles el primero con un valor promedio de 0.6, comprende los primeros 4 muestreos y a partir del 5o. muestreo, el valor baja a cerca de 0.4 en promedio.

Esta aparente superioridad de la población ORIGINAL es consecuencia de la disminución antes mencionada de la proteína total de ésta población (fig. 15), pues como puede verse en la figura 16, en los tres últimos muestreos no se observan diferencias significativas en la cantidad de proteína-RUBISCO por

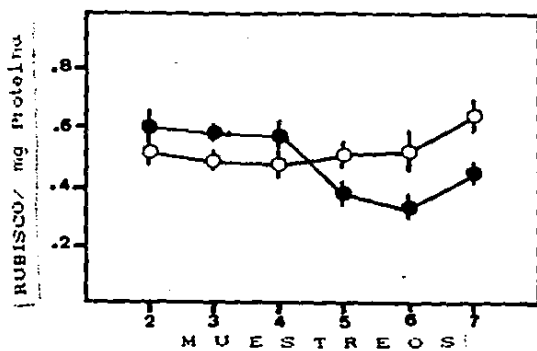


Fig.17 Valores de la relación RUBISCO/proteína soluble en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

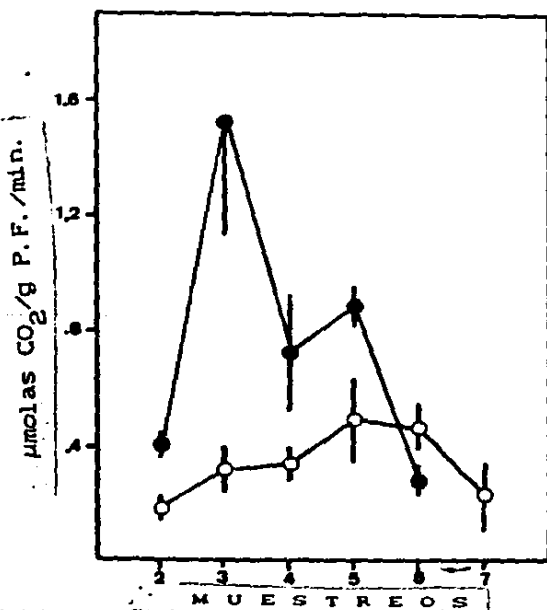


Fig.18 Actividad de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

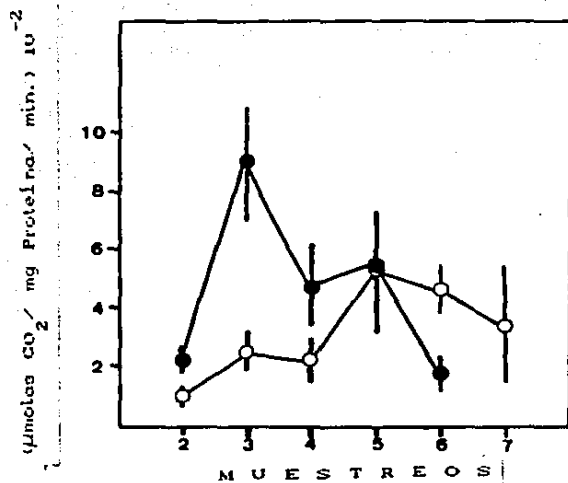


Fig.19 Actividad de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).

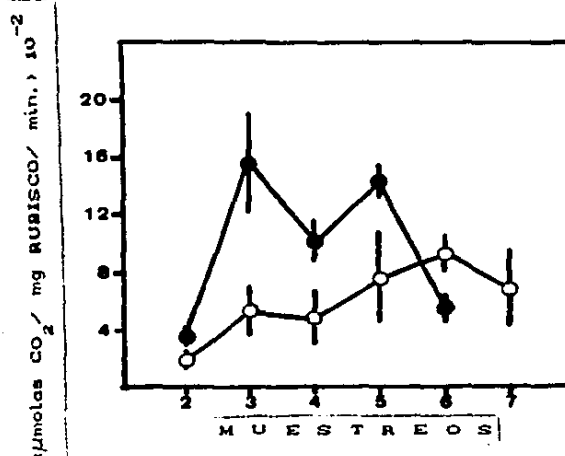


Fig.20 Actividad de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-18 (●).



gramo de P.F. entre las dos poblaciones.

Las figuras 18, 19 y 20 presentan la actividad enzimática de la RUBISCO expresada por g P.F., mg de proteína soluble y mg de proteína-RUBISCO respectivamente y como puede observarse, falta la actividad correspondiente al muestreo 7 de la población SM-18. Sin embargo, los valores que se presentan son suficientes para dar una buena idea de las características del fenómeno analizado.

La figura 18 muestra que la actividad de la RUBISCO/g P.F. es mucho mayor en la población SM-18 a lo largo de casi todo el período de llenado del grano. En las dos poblaciones se observan incrementos durante el inicio del período: en el caso de la población mejorada los aumentos son cercanos al 400 % ambos valores calculados con respecto a la actividad del segundo muestreo.

Otro hecho muy importante que se observa en la gráfica es el relacionado con la distribución de la actividad en el tiempo. La población SM-18 presenta el valor más alto de actividad en el 3er. muestreo, en tanto que la población ORIGINAL lo hace en el 5o. Esto puede ser muy significativo si se consideran las condiciones agrícolas del país, que se caracterizan porque las épocas con condiciones ambientales adecuadas para el crecimiento y desarrollo de las plantas son limitadas por factores como la falta de agua y la presencia de heladas. Estos elementos, dependiendo del momento en que llegaran a presentarse, podrían afectar de manera diferente a cada población.

En la figura 19 se presenta el comportamiento de la actividad

de la RUBISCO/mg de proteína soluble y como puede verse, el patrón descrito en la figura anterior básicamente no se modifica y tal vez, aquí sea más fácil apreciar las diferencias que existen entre poblaciones en lo que se refiere a la distribución de la actividad en el tiempo.

Finalmente la figura 20 muestra a la actividad de la RUBISCO en función de la cantidad de proteína-RUBISCO y puede verse que a lo largo del estudio experimenta cambios comparables a los que sufre la actividad total.

Este punto es muy interesante pues demuestra que a pesar de que la cantidad de proteína-RUBISCO/g P.F. está disminuyendo durante el período de llenado del grano (fig. 16), la actividad de la enzima se incrementa tal vez como resultado de cambios endógenos que la afectan.

En la gráfica 20 también puede apreciarse que la actividad de la RUBISCO en ambas poblaciones tiene dos puntos máximos, para la población SM-18, son de magnitud similar y claramente pueden verse en los muestreos 3 y 5, en tanto que para la población ORIGINAL, aunque están menos definidos, puede observarse que se presentan en los muestreos 3 y 6 y que el primero es aproximadamente la mitad del segundo.

### VII.3.- ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO.

#### VII.3.1.- EFECTO DEL TIEMPO DE ACTIVACION.

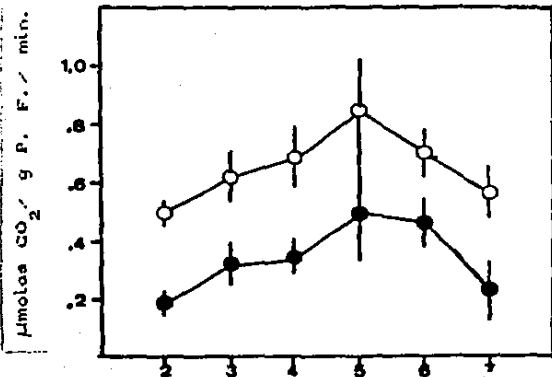
Para analizar la capacidad de activación de la RUBISCO por

$\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{+2}$  *in vitro* se diseñó un experimento que consistió en medir la actividad de la RUBISCO con y sin el tratamiento de activación con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{+2}$  para de ésta manera obtener y comparar la actividad debida al estado de activación endógeno y la resultante de un estado de activación máximo logrado artificialmente *in vitro*. Este tipo de experimentos se realizó tanto en el estadio de plantas adultas (poblaciones ORIGINAL y SM-18) como en el de plántulas (población SM-18).

En las figuras 21, 22 y 23 se analizan los resultados de plantas adultas de las poblaciones ORIGINAL. Se compara la actividad medida con y sin el tratamiento de activación *in vitro* y se expresa como  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2 \text{ min}^{-1}$  fijadas por: g P.F., mg de proteína soluble y mg de proteína-RUBISCO respectivamente.

Lo primero que se observa es que los patrones que se obtienen con los tres parámetros son muy parecidos. También se observa que la actividad medida sin el tratamiento de activación *in vitro* supera en aproximadamente 150 % a la que se obtuvo cuando los extractos fueron activados.

Las figuras 24, 25 y 26, en el mismo orden presentan los resultados del análisis que se hizo en plantas adultas de la población SM-18. En ellas se ve que al igual que en la población ORIGINAL, la actividad de la enzima cuando ésta se mide sin recibir el tratamiento de activación artificial es mayor que la que se tiene si éste se da. Sin embargo, en éste caso, las diferencias entre los dos sistemas son menores que en la población ORIGINAL, aún cuando también son estadísticamente significativas.



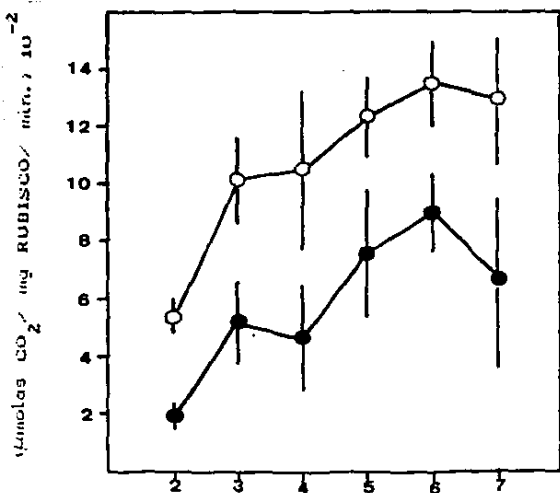
MUESTRAS Fig. 21

Valores de actividad de RUBISCO en la población ORIGINAL medida con activación (●) y sin activación previa (○).



MUESTRAS Fig. 22

Valores de actividad de RUBISCO en la población ORIGINAL medida con activación (●) y sin activación previa (○).



MUESTRAS Fig. 23

Valores de actividad de RUBISCO en la población ORIGINAL medida con activación (●) y sin activación previa (○).

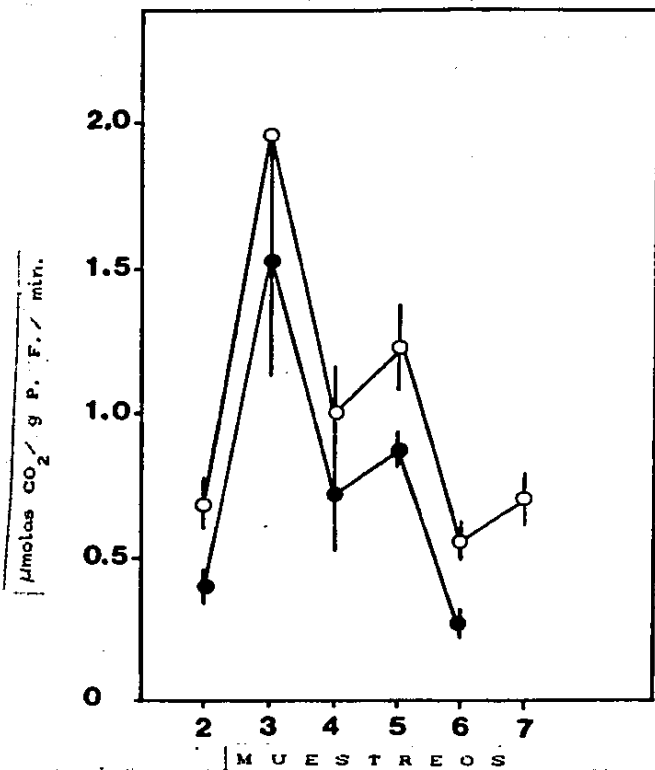


Fig.24 Valores de actividad de RUBISCO en la población SM-18 medida con activación (●) y sin activación previa (○).

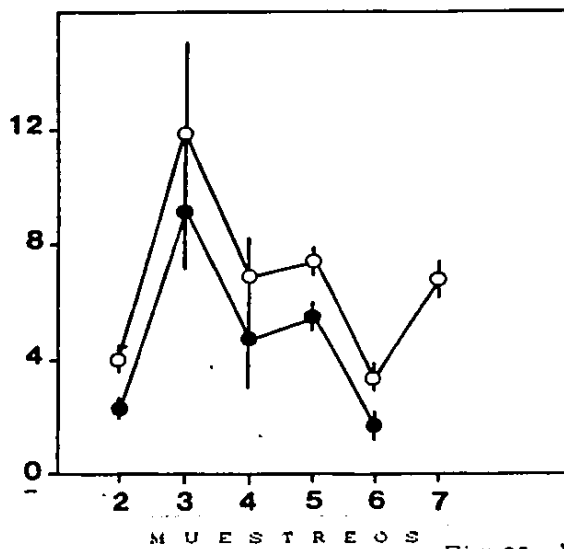


Fig.25 Valores de actividad de RUBISCO en la población SM-18 medida con activación (●) y sin activación previa (○).

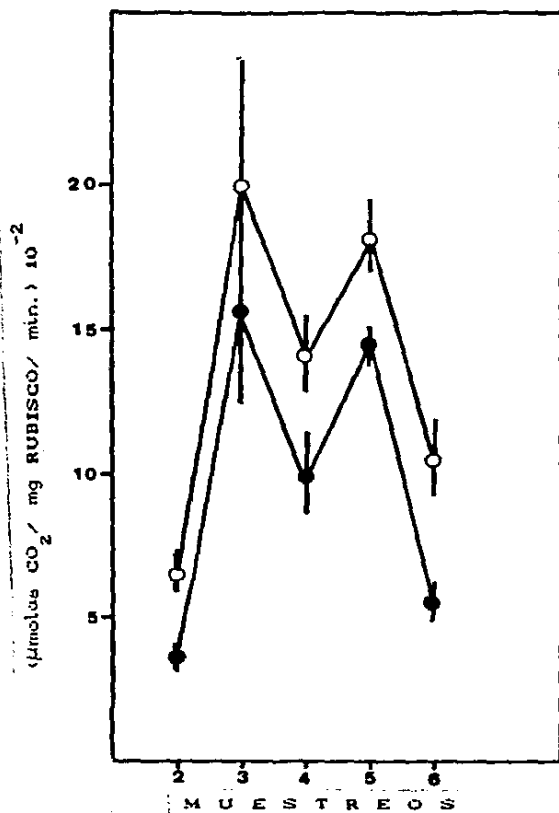


Fig. 26 Valores de actividad de RUBISCO en plantas adultas de la población SM-18 medida con activación (●) y sin activación previa (○).

En las figuras 27, 28 y 29 con un orden similar, muestran los resultados que se obtuvieron al analizar a la población SM-18 en la etapa de plántula. Las gráficas en todos los casos muestran un efecto positivo del proceso de activación *in vitro*. Esto es especialmente claro en las figuras 28 y 29 en donde se comparan las actividades en función de la cantidad de proteína soluble y enzima respectivamente y allí puede verse que hasta la etapa 5 no hay cambios significativos en los valores obtenidos con las dos formas de medir la actividad de la RUBISCO. En cambio, en las etapas 6 y 7 se pone de manifiesto un fuerte efecto positivo del tiempo de activación, que hace que las mediciones hechas de ésta manera superen hasta en 150 % a los valores obtenidos sin dicho tratamiento.

Este grupo de experimentos muestra que en las plantas adultas la activación artificial con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  no estimula la actividad de la enzima sino que al contrario, los datos indican que bajo las condiciones en que se da, el tratamiento resulta negativo siendo la población ORIGINAL la que sufre los efectos de inhibición más severos mientras que en plántulas al menos en las dos etapas finales sucede lo contrario.

### VII.3.2.- EXPERIMENTOS CRUZADOS.

Los experimentos anteriores mostraron que en plantas adultas el comportamiento que exhibe la actividad de la RUBISCO podría estar determinado por cambios internos que afecten directamente a la actividad de la enzima. Sobre esto, en la literatura se ha

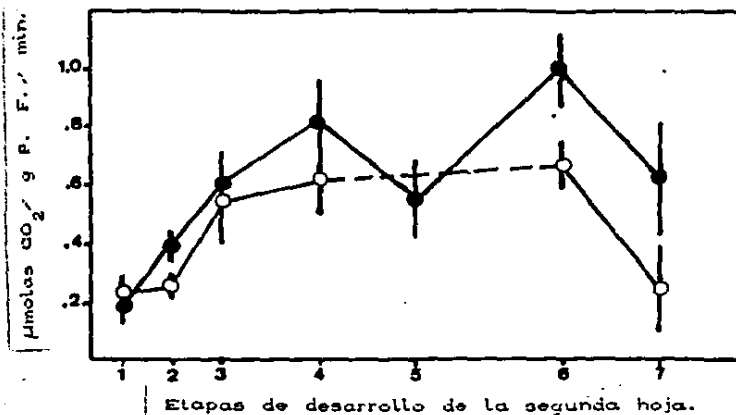


Fig.27 Valores de actividad de RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz de la población SM-18 medida con activación (●) y sin activación previa (○).

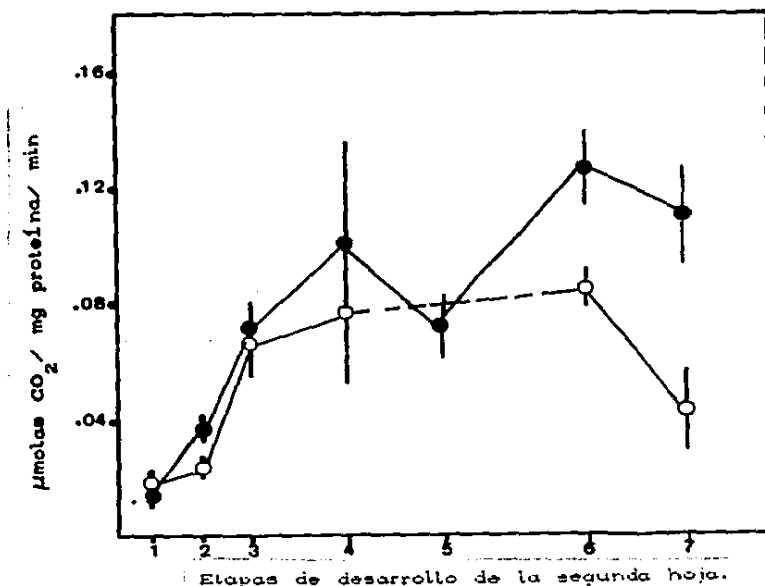


Fig.28 Valores de actividad de RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz de la población SM-18 medida con activación (●) y sin activación previa (○).



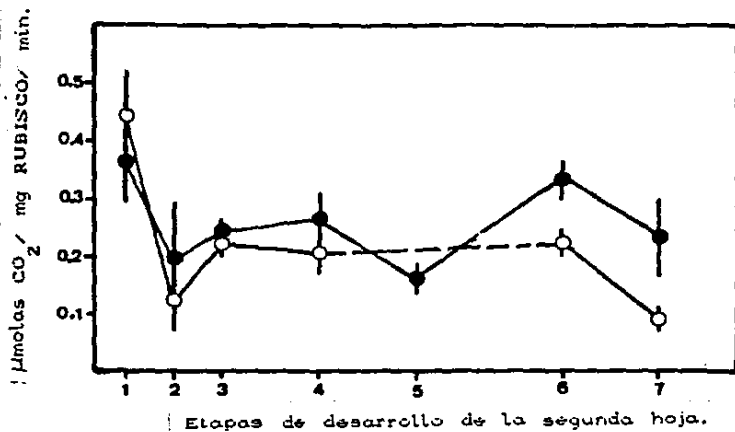


Fig.29 Valores de actividad de RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz de la población SM-18 medida con activación (●) y sin activación previa (○).

mencionado la posibilidad de que diversos compuestos estén participando como inhibidores y/o activadores de la RUBISCO (McCurry et al.1981).

De esto se desprende que si los niveles de estos reguladores cambiaran por aumentar o disminuir durante el período de llenado del grano, la actividad enzimática potencialmente medible se alteraría. Para explorar esta posibilidad, se hicieron una serie de experimentos que consistieron en medir la actividad de la enzima en extractos preparados a partir de hojas de plantas adultas de la población SM-18 en los muestreos 2 y 3 los cuales se caracterizan por tener baja y alta actividad de RUBISCO respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 2 y como puede observarse, no se detecta la presencia de este tipo de compuestos ya que si éstos fueran responsables de la baja actividad observada en el muestreo 2, al aumentar la participación de éste en las mezclas, el fenómeno de inhibición se observaría con claridad, lo cual no ocurre. Tampoco sucede lo contrario, que sería el resultado lógico si el extracto del muestreo 3 tuviera un activador.

#### VII.4.- EFECTO AMBIENTAL EN PLANTAS ADULTAS.

Un experimento establecido con las poblaciones ORIGINAL y SM-13 (población obtenida después de 13 ciclos de selección masal) diseñado para analizar la actividad de la RUBISCO durante el período de llenado del grano se vió afectado por una fuerte sequía. Los efectos más severos ocurrieron entre los muestreos 3 y

TABLA 2

PRESENCIA DE INHIBIDORES Y ACTIVADORES DE RUBISCO  
EN HOJAS DE MAIZ EN EL PERIODO DE LLENADO DE GRANO

MEZCLAS		$\mu\text{moles CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g P.F.}^{-1}$		
% de extracto		TEORICO	OBTENIDO	% desviación
A	B			
0	100	0.747	0.747	0
15	85	0.686	0.697	+ 1.8
30	70	0.626	0.612	- 2.2
50	50	0.545	0.526	- 4.5
70	30	0.464	0.451	- 2.5
100	0	0.343	0.343	0

Extracto A : 14 días después de antesis, con baja actividad de RUBISCO.

Extracto B : 21 días después de antesis, con alta actividad de RUBISCO.

4. No obstante, se hicieron todas las mediciones planeadas con el objeto de aprovechar la información para observar el efecto de la falta de agua en este período del crecimiento de la planta que es una limitante que se presenta con frecuencia en los campos de nuestro país.

En las figuras 30 y 31 se muestra el comportamiento de la relación P.S./P.F. y clorofila/g P.F. de las dos poblaciones mencionadas. En ambos casos se ve que no hay diferencias entre las poblaciones, como ocurrió en los experimentos sin efecto de sequía.

Sin embargo, en el 4o. muestreo el efecto de la sequía se manifestó aumentando la relación P.S./P.F. y disminuyendo la cantidad de clorofila.

En términos generales también se puede observar que los valores de éstos parámetros son más bajos en este experimento que los obtenidos en el que se llevó a cabo en buenas condiciones de irrigación (figs. 13 y 14), lo cual hace pensar que las condiciones desfavorables afectaron a las plantas desde antes de la etapa identificada como de sequía severa (muestreos 3 y 4).

La figura 32 presenta la tendencia de la proteína total. A diferencia de las variables anteriores, ésta no manifiesta el efecto ambiental. Tampoco se aprecian grandes diferencias entre poblaciones y posiblemente lo más importante sea que en este caso se observó una caída más moderada al final del período que la que se presentó en el experimento con irrigación constante (fig. 15). Sin embargo no debe olvidarse que aquí la composición de los

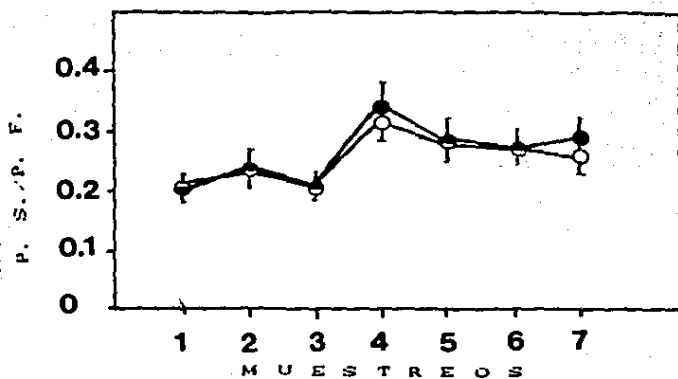


Fig.30 Valores de la relación P.S./P.F. en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-13 (●).

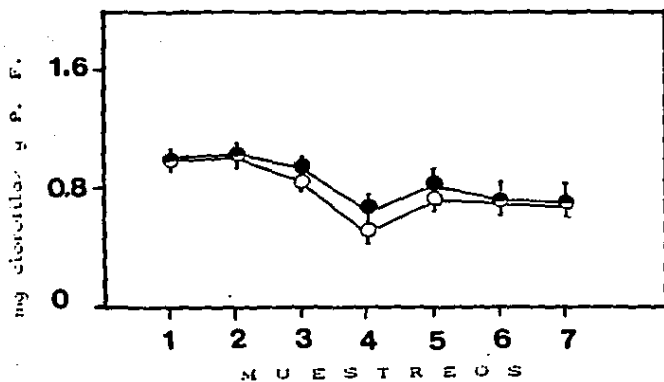


Fig.31 Contenido de clorofila en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-13 (●).

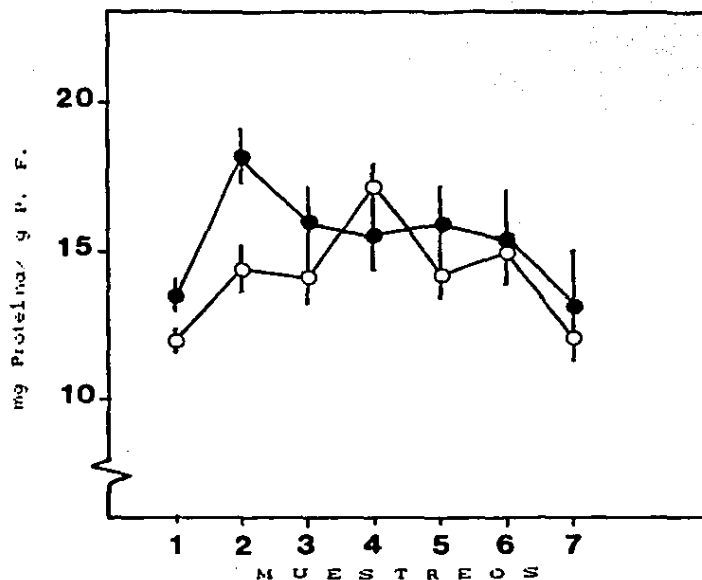


Fig.32 Contenido de proteína soluble en plantas adultas de las poblaciones ORIGINAL (○) y SM-13 (●).

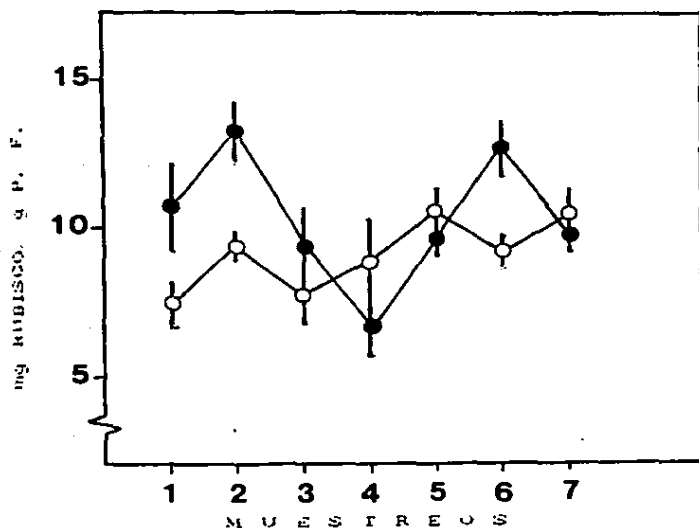


Fig.33 Contenido de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (○) y SM-13 (●).

materiales se vió seriamente afectada: la figura 30 que muestra la relación P.S./P.F. indica que la proporción de materia seca/materia fresca se incrementó y que por lo mismo, la proteína puede estar sobre estimada.

Las figuras 33 y 34 presentan la cantidad de proteína-RUBISCO/g P.F. y el comportamiento de la fracción proteína-RUBISCO/proteína soluble y al igual que en las variables anteriores en las dos poblaciones puede verse el efecto de la sequía consistente fundamentalmente en una caída estadísticamente significativa en los valores de las dos variables.

Aparentemente los daños fueron un poco más severos en la población mejorada sobre todo en lo que se refiere a la cantidad de proteína-RUBISCO/g P.F. (fig. 33) pues mientras la población mejorada manifiesta una caída estadísticamente significativa, en la población ORIGINAL no se observan cambios considerables.

Por otra parte, en la figura 34 se ve que después del muestreo 4 hay una aparente recuperación en la cantidad de proteína-RUBISCO, sin embargo, analizando las figuras 32 y 33 en donde se presenta la cantidad de proteína soluble y de proteína-RUBISCO/ g P.F. respectivamente, puede verse que esa aparente recuperación que se observa en la segunda parte de la gráfica 34 se debe fundamentalmente a que la proteína soluble cae mucho más rápido que la proteína-RUBISCO.

En la figura 35 se muestra la actividad de la enzima expresada por unidad de tejido y resulta claro que se presentan cambios estadísticamente muy significativos: primero aumentó la

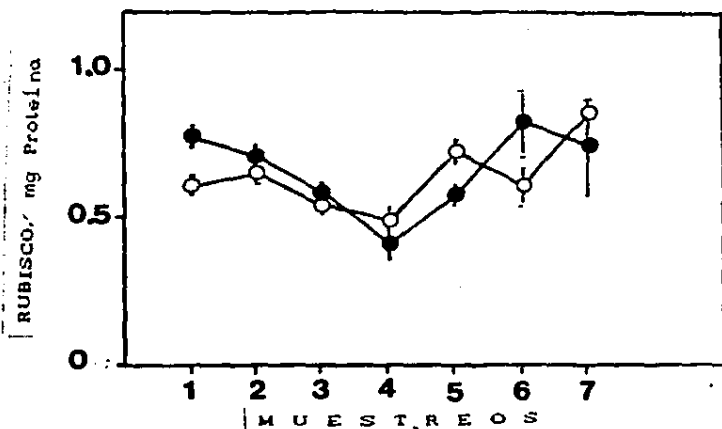


Fig.34 Valores de la relación RUBISCO/proteína soluble en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-13 (●).

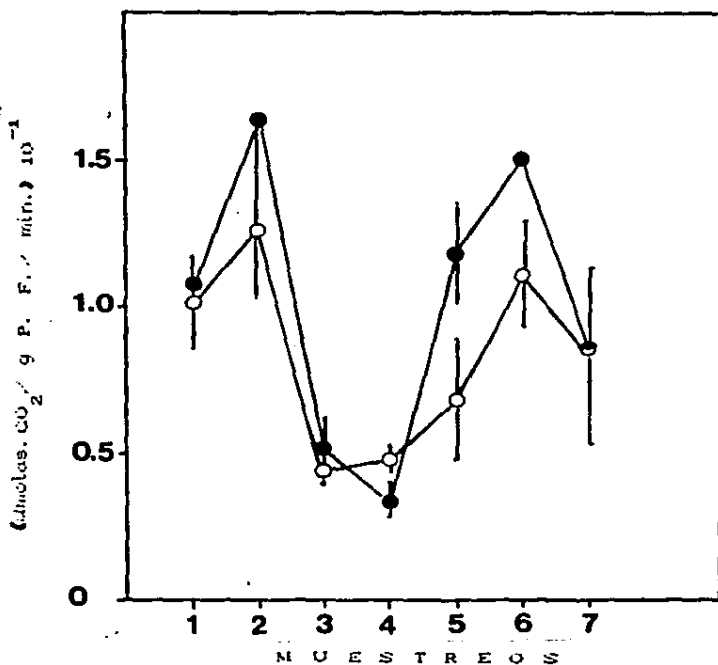


Fig.35 Actividad de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-13 (●).



actividad como era de esperarse y alcanzó un máximo en el segundo muestreo, para luego caer bruscamente en los muestreos 3 y 4.

Cuando la sequía dejó de observarse, la actividad se recuperó y alcanzó un 2o. máximo (menor que el primero) en el muestreo 6 para finalmente quedar con niveles ligeramente menores a los iniciales.

Por su parte, en las figuras 36 y 37 aparece la actividad expresada por mg de proteína soluble y por mg de proteína-RUBISCO respectivamente. Se ve que la caída que se observa en los muestreos 3 y 4 es real puesto que se manifiesta en estos parámetros con la misma intensidad. Llama la atención la figura 37, la cual muestra que la población ORIGINAL sufre los efectos de la sequía en los muestreos 3, 4 y 5 mientras que en la población mejorada solo se observan en los muestreos 3 y 4. Esto sugiere que la población mejorada tiene la capacidad de recuperarse más rápidamente.

Los resultados muestran que a diferencia del experimento llevado a cabo en buenas condiciones ambientales, en éste caso, los incrementos en actividad fueron menores, solo se dieron al inicio y al final del período probablemente porque la sequía dañó el mecanismo responsable de activar a la RUBISCO durante el período de llenado del grano.

También cabe la posibilidad de que la señal responsable del incremento en la actividad de la RUBISCO haya dejado de producirse y en este sentido, la recuperación que se observa en los siguientes muestreos (4-7) se podría explicar como consecuencia de

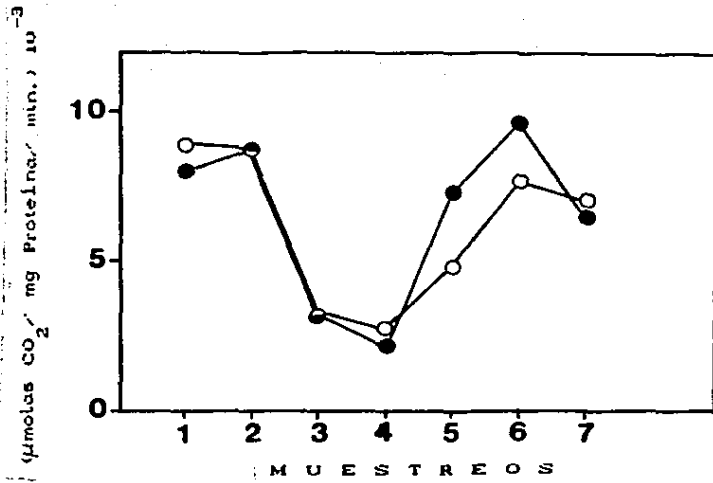


Fig.36 Actividad de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones Original (O) y SM-13 (●).

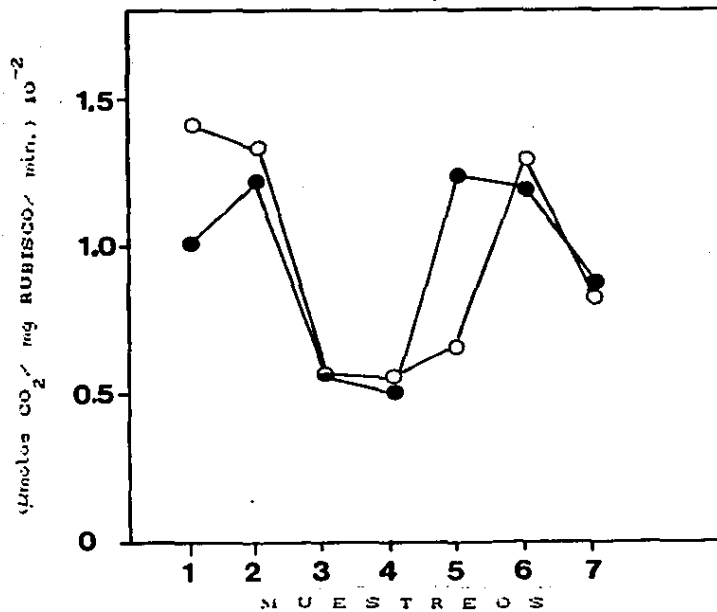


Fig.37 Actividad de RUBISCO en plantas adultas de las poblaciones ORIGINAL (O) y SM-13 (●).

que la planta al reencontrarse en las condiciones ambientales favorables, vuelve a adquirir la capacidad de producir señales o de responder a ellas. Esto es muy importante pues independientemente de cual sea la causa que origina el incremento en la actividad de la RUBISCO durante el período de llenado del grano, los datos muestran que el mecanismo tiene flexibilidad y capacidad de recuperación muy considerables.

## VIII-DISCUSSION.

### 1).- Regulación *In vivo* de la actividad de la RUBISCO.

Los resultados mostrados señalan que la regulación de la actividad de la RUBISCO en maíz es dependiente del estado de desarrollo de las plantas analizadas y del estado fisiológico en que se encuentren. Además, los mecanismos implicados son muy afectados por el ambiente.

a).- En las plántulas pueden distinguirse dos formas de regulación:

La primera comprende de las etapas 1 a 4 según se puede apreciar en las figuras 6 y 8 que muestran los aumentos en la cantidad y actividad de la enzima respectivamente. Se observa que los aumentos que manifiesta la actividad de la RUBISCO están determinados fundamentalmente por el incremento en la cantidad de proteína-RUBISCO. Por otra parte, los datos presentados en la figura 6 permiten observar que el método empleado para cuantificar la enzima es adecuado y aunque al final la proporción de proteína-RUBISCO en la proteína total es elevada (en la fig. 7 se aprecia que llega al 55 %), en la literatura (Rocher *et al.* 1989) se ha mencionado que utilizando un modelo similar la proporción de proteína-RUBISCO en la proteína total va de 36 al 47 % dependiendo de la variedad utilizada, por lo cual se considera que estos resultados no están dentro de los límites esperados.

La otra forma de regulación se aprecia con mayor claridad en la población SM-18 en las etapas 5, 6 y 7 y como puede observarse en las mismas figuras, la relación entre la cantidad de proteína-RUBISCO y su actividad no es lineal es decir, en esas etapas en la figura 6 se ve que la cantidad de proteína-RUBISCO tiende a disminuir, en tanto que la actividad (figura 8) manifiesta un incremento importante y estadísticamente significativo.

Los resultados de la primera parte concuerdan con otros que ya han sido descritos (Makino et al. 1984b), los cuales señalan que muy probablemente durante la primera parte del desarrollo de las hojas la proteína-RUBISCO se sintetiza masivamente y que puede persistir durante toda la vida de las hojas gracias a que tiene un recambio pequeño que según Humprey and Davies (1975) corresponde a un  $t \frac{1}{2}$  de  $7.79 \pm 0.92$  días.

Sin embargo, también se ha mencionado que en esas condiciones no se observan diferencias en las características cinéticas de la enzima (Makino et al. 1984b) y ante eso, los resultados que comprenden a las etapas 5, 6 y 7 están en aparente contradicción ya que los cambios tan notables que se observan en la eficiencia de la RUBISCO probablemente involucran modificaciones en las características cinéticas de la enzima (fig. 10). Más aún analizando la figura 10 en donde se muestra la actividad en función de la cantidad de enzima puede verse que durante todo el desarrollo de la segunda hoja, la enzima experimenta cambios significativos en su número de recambio, los cuales son fáciles de confundir durante

la primera parte del desarrollo debido a la activa síntesis de enzima que ocurre en esos momentos.

Todo esto demuestra que durante el desarrollo de la segunda hoja en maíz, la actividad de la RUBISCO es producto tanto de la síntesis de nuevas moléculas de enzima (en la primera etapa) como de cambios en la regulación de la actividad de las mismas (probablemente en relación a su estado de activación).

b).- En cuanto a la regulación de la enzima en las plantas adultas, en la figura 17 se aprecia que la proporción de proteína-RUBISCO de la proteína total es cercana al 60 %.

Puesto que en las mediciones de ésta proteína se utilizó el mismo método que se empleó en el caso de plántulas, hace pensar que efectivamente, en plantas adultas la cantidad de proteína-RUBISCO por unidad de tejido es superior a la que se encuentra en plántulas.

Por otra parte, los datos indican que en plantas adultas la regulación de la actividad de la RUBISCO es independiente de la cantidad de enzima, pues como puede verse en las figuras 16 y 18 que muestran el comportamiento de la proteína-RUBISCO y de la actividad de la misma respectivamente, no hay paralelismo entre ellas y resulta muy claro que en ese período la actividad de la RUBISCO experimenta cambios muy significativos independientes de la concentración de proteína-RUBISCO (fig. 20).

Con los resultados aquí reportados no es posible establecer en forma definitiva si las causas de estas diferencias son las mismas que originan los cambios observados en plántulas. Sin embargo, los datos presentados sugieren que hay diferencias muy

significativas en los mecanismos que regulan la actividad de la RUBISCO, los cuales parecen estar relacionados con el estado fisiológico de los tejidos.

Comparando los valores de unidades de actividad enzimática por unidad de proteína RUBISCO, obtenidos en igualdad de circunstancias (con activación previa con  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), se observa que en la población ORIGINAL en plantas adultas se tiene un intervalo de  $0.01952 \pm 0.0017$  a  $0.0903 \pm 0.013$   $\mu\text{molas CO}_2 \text{ mg RUBISCO}^{-1} \text{ min}^{-1}$  mientras que en plántulas estos mismos valores oscilan entre  $0.16 \pm 0.030$  y  $0.380 \pm 0.012$   $\mu\text{molas de CO}_2 \text{ mg RUBISCO}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (cuadro 3a). En la población SM-18 sucede algo similar: en plantas adultas la actividad varía de  $0.0379 \pm 0.009$  a  $0.1572 \pm 0.0335$  en tanto que en plántulas los valores van de  $0.2304 \pm 0.0237$  a  $0.3674 \pm 0.0828$   $\mu\text{molas de CO}_2 \text{ mg RUBISCO}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (cuadro 3b), lo cual indica que probablemente el estado de activación de la enzima en los dos modelos es diferente; y/o que la estabilidad en ambos casos no es la misma.

Por otra parte, los experimentos realizados con las poblaciones que sufrieron un periodo de sequía durante el llenado del grano muestran también esta falta de correlación entre actividad enzimática y cantidad de enzima. En efecto cuando se analiza el modelo de plantas adultas bajo condiciones ambientales adversas, se observa que la sequía evitó el incremento de la actividad mostrado en experimentos anteriores durante el llenado del grano.

Las figuras 33 y 35 muestran el comportamiento de la proteína-RUBISCO y el de su actividad respectivamente en el

TABLA 3a

COMPARACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO.  
POBLACION ORIGINAL.

ADULTAS d. d. a.	$\mu\text{molas CO}_2 \text{ mg RUBISCO}^{-1} \text{ min}^{-1}$ C/A	S/A	EFFECTO DE LA ACTIVACION*
14	0.01952+/-0.0017	0.0539+/-0.006	36.21
21	0.0524 +/-0.0157	0.1018+/-0.0166	51.47
28	0.0466 +/-0.0183	0.1053+/-0.0287	44.25
35	0.0758 +/-0.0223	0.1231+/-0.0154	61.57
42	0.0903 +/-0.013	0.1356+/-0.0148	66.59
49	0.0664 +/-0.03	0.1291+/-0.0228	51.43
			X= 51.92
			+/-11.08

PLANTULAS.

ETAPAS\*\*

1	0.215 +/- 0.015
2	0.019 +/- 0.010
3	0.263 +/- 0.050
4	0.038 +/- 0.012
5	0.185 +/- 0.015
6	0.205 +/- 0.030
7	0.160 +/- 0.030

d.d.a. días después de antesis.

C/A actividad medida con activación.

S/A actividad medida sin activación.

\* % de la actividad medida sin activación.

\*\* la descripción de las etapas esta en el cuadro 1.



TABLA 3b

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO.  
POBLACION SM-18.

ADULTAS d. d. a.	$\mu\text{molas CO}_2 \text{ mg RUBISCO}^{-1} \text{ min}^{-1}$		EFECTO DE ACTIVACION*
	C/A	S/A	
14	0.0879+/-0.009	0.0655+/-0.006	57.86
21	0.1572+/-0.0335	0.2000+/-0.048	78.60
28	0.0992+/-0.013	0.1406+/-0.014	70.55
35	0.1455+/-0.0054	0.1812+/-0.012	80.29
42	0.0556+/-0.0054	0.1044+/-0.012	53.25
			X= 68.11
			+/-12.14
<b>PLANTULAS</b>			
<b>ETAPAS**</b>			
1	0.3674+/-0.0828	0.4401+/-0.085	83.48
2	0.1936+/-0.0963	0.1244+/-0.047	155.62
3	0.2430+/-0.0163	0.2251+/-0.022	107.95
4	0.2691+/-0.0386	0.2083+/-0.027	129.18
5	0.1571+/-0.0160	n. d.	
6	0.3934+/-0.0305	0.2252+/-0.019	148.04
7	0.2340+/-0.0237	0.0922+/-0.019	253.79

d.d.a.

días después de antesis.

C/A

actividad medida con activación.

S/A

actividad medida sin activación.

\*

% de la actividad medida sin activación.

\*\*

la descripción está en el cuadro 1.

experimento de sequía y como puede verse, hay una caída importante en la cantidad de enzima (sobre todo en la población SM-13). Sin embargo, la pérdida de enzima y la de actividad no son proporcionales, mientras que la disminución de la actividad es de 6 a 7 veces, a la de RUBISCO proteína solo corresponde un factor de 2. De aquí puede deducirse que la disminución en la cantidad de enzima no es el único factor implicado en la pérdida de la actividad y tal vez tampoco es el más importante porque seguramente la RUBISCO proteína está en exceso.

El fenómeno incremento en la actividad de la RUBISCO durante el período de llenado del grano ya ha sido reportado con anterioridad a este trabajo (Loza-Tavera et al, 1987). Sin embargo, no ha sido explicado satisfactoriamente y sobre el particular se han mencionado varias posibilidades que deben ser tomadas en cuenta.

A).- Regulación por contenido endógeno de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

La primera se refiere a que los niveles de  $\text{CO}_2$  intracelulares podrían ser los responsables del cambio de actividad en la enzima ya que éste no solo es utilizado como sustrato, sino que además, se le ha mencionado junto con el  $\text{Mg}^{2+}$  y otros compuestos como responsables del estado de activación de la enzima (Boyle and Keys, 1987).

Los resultados de los experimentos en donde se midió la actividad bajo condiciones de activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son contrastantes con los valores de los controles en que no se

hizo esta activación previa (figs. 23, 26 y 29, tablas 3a y 3b)

En plántulas, durante la 1a. parte del estudio del período de crecimiento de la hoja no se aprecian diferencias significativas en la actividad de RUBISCO medida en cualquiera de las dos condiciones. Sin embargo, en las etapas finales hay un marcado efecto positivo de la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (fig. 29).

Para plantas adultas sucede lo contrario: la activación *in vitro* en lugar de estimular, causa una disminución muy significativa en la actividad de la RUBISCO de las poblaciones analizadas, lo cual es consistente a todo lo largo del período de llenado del grano (figs. 23 y 26, cuadros 3a y 3b).

Estos resultados parecen indicar que (salvo en la última parte del desarrollo de las hojas de plántulas), tanto en el crecimiento de la hoja como en hojas de plantas adultas el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  intracelulares no son limitantes de la actividad de la RUBISCO. Por lo tanto, el incremento en actividad durante el llenado de grano no parece ser debido a modulaciones generadas por cambios endógenos de estos metabolitos.

Un aspecto que llama la atención es el efecto negativo que el proceso de activación tuvo sobre los extractos de plantas adultas y que en ningún momento se observó en plántulas.

Este fenómeno puede ser consecuencia de la acción de diversas proteasas que al encontrarse en condiciones adecuadas (no se usaron inhibidores de proteasas y la activación se llevó a cabo a  $30^\circ\text{C}$  por 9.5 min (Randall et al, 1977)), podrían ser capaces de dañar la enzima.

En plántulas se ha demostrado la existencia de diversas proteasas (Mae et al, 1984; Miller and Huffaker, 1985) y el hecho de que no se observen los efectos negativos que la activación causó en plantas adultas puede indicar que en plántulas las proteasas son menos abundantes o bien, que son diferentes a las que se encuentran en plantas adultas. Esto podría explicar por que la actividad de la RUBISCO es mayor en plántulas (cuadros 3a y 3b).

Sin embargo, se realizaron algunos experimentos preliminares con inhibidores de proteasas y diferentes tiempos de activación (cuyos datos no se muestran) y los resultados señalan que aparentemente el efecto negativo que el periodo de activación tiene sobre la actividad de la RUBISCO en plantas adultas no es producto de la acción de proteasas. Sin embargo deben realizarse estudios más cuidadosos para descartar tal posibilidad.

#### B).- Regulación por inhibidores y activadores.

Otra posibilidad que podría ayudar a entender las causas que determinan los cambios de actividad que la RUBISCO experimenta se relaciona con reportes que han aparecido en la literatura y que mencionan que la actividad de la RUBISCO puede modificarse por efecto de compuestos que han demostrado ser activadores o inhibidores de esta enzima (McCurry et al, 1981; Boyle and Keys, 1987).

Al respecto, los resultados que se presentan en el cuadro 2 corresponden a experimentos consistentes en medir la actividad de mezclas de extractos de hojas de maíz con actividad de RUBISCO

de niveles contrastantes. Como puede observarse, no se detecta la presencia de compuestos con tales características, a no ser que éstos estuvieran unidos a la enzima con una  $K_d$  excesivamente baja. Esta posibilidad aunque parece poco probable de momento no es posible descartarla con el tipo de experimentación que se llevó a cabo.

C).- Regulación por RUBISCO-activasa.

La tercera posibilidad que conviene analizar para explicar los cambios que experimenta la actividad de la RUBISCO se refiere a la participación de una enzima denominada RUBISCO-activasa (Somerville *et al.* 1982) y que según diversos autores (Portis *et al.* 1986; Robinson *et al.* 1988), controla el estado endógeno de activación de la RUBISCO con el consiguiente incremento de enzima funcional.

Se ha observado que en espinaca la RUBISCO-activasa constituye el 2% de la proteína total de la hojaya que en un sistema reconstituido con RUBISCO purificada, la inhibición del proceso de activación espontánea con  $CO_2$  y  $Mg^{2+}$  que provoca la RuBP puede ser eliminada si se agrega ATP y RUBISCO-activasa, cuya actividad a su vez, es inhibida por ADP (Robinson *et al.* 1988).

Con base a lo anterior, se ha propuesto el siguiente esquema de acción de la RUBISCO-activasa (Robinson *et al.* 1988):

En la oscuridad, la relación ATP:ADP es baja e inhibe fuertemente a la RUBISCO-activasa, pero los niveles de RuBP son también bajos por lo cual el estado de activación de la RUBISCO

es dependiente de la concentración de  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . A su vez, en luz, los niveles de RuBP son lo suficientemente altos para evitar la activación espontánea de la RUBISCO e incluso, pueden desactivar a las moléculas ya activadas por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Aparentemente la RUBISCO-activasa en estas condiciones en que tiene un suministro constante de ATP puede activar a los complejos RUBISCO-RuBP y en este caso, la activación esencialmente depende de la RUBISCO-activasa.

Por otra parte, es probable que el modelo anterior tenga otras complicaciones pues Parry y col. (1988), señalan que para estudiar a la RUBISCO-activasa son necesarios compuestos como la fructuosa-1,6-bifosfato, ATP y Pi que normalmente se presentan como contaminantes de la RuBP comercial. Los autores proponen que, fisiológicamente tales compuestos también podrían ser importantes pues en la célula tal vez ayuden a remover a la RuBP y eviten al menos parte de la inhibición que ésta puede provocar en el proceso de activación.

Como puede apreciarse, la posible participación de la RUBISCO-activasa en la regulación de la actividad de la RUBISCO permite hacer nuevos planteamientos para futuras investigaciones.

En cuanto a lo que aquí se presenta, y por las evidencias que en los últimos años se han acumulado en la literatura, no sería raro que esta enzima tuviera una función muy activa en los cambios que experimenta la actividad de la RUBISCO durante el período de llenado del grano. Para investigar esta posibilidad podrían

utilizarse los modelos experimentales aquí empleados, haciendo énfasis en la relación que esta enzima aparentemente tiene con los niveles de pozas endógenas de otros compuestos importantes como es la RuBP.

Los resultados obtenidos en esta investigación no son suficientes para sugerir que alguna de las posibilidades analizadas pudiera ser la responsable del cambio de actividad que experimenta la RUBISCO durante el período de llenado del grano y que aparentemente también se manifiesta en plántulas, sobre todo en las etapas más avanzadas del desarrollo de la segunda hoja. Sin embargo, la existencia del fenómeno ha sido plenamente demostrada y su esclarecimiento constituye, como ya se ha mencionado antes, temas de investigaciones futuras que sería muy interesante realizar.

## 2).- Marcadores bioquímicos de productividad.

Otro objetivo fundamental del presente trabajo fue analizar la posibilidad de que a través del estudio de la regulación de la actividad de la RUBISCO se pudieran generar criterios adecuados para seleccionar en la etapa de plántulas plantas de mayor capacidad de rendimiento de grano.

Los datos señalan que en la etapa de plántulas la cantidad de proteína-RUBISCO (fig. 7) no permitiría distinguir en la población ORIGINAL a plantas potencialmente más productivas ya que no hay diferencias en esta variable entre la población ORIGINAL y las que

han sido seleccionadas durante 18 ciclos de selección masal.

El valor de la actividad de la enzima (fig. 10) en teoría podría ser utilizado, pues en las etapas 6 y 7 (sobre todo en la primera) permite observar que la población SM-18 supera significativamente a la ORIGINAL. Sin embargo, en la práctica puede resultar un criterio difícil de manejar por lo elaborado de las determinaciones en grandes poblaciones de maíz.

Por su parte, la variable Peso Fresco/hoja (fig. 1) muestra que el peso de las mismas en la población SM-18 es significativamente superior a las de la población ORIGINAL. Seguramente esas diferencias en la capacidad de crecimiento tienen una explicación bioquímica, pero mientras ésta no se conozca con detalle, la aplicación de la variable P.F./hoja como criterio único de selección será muy limitada pues es poco confiable.

Otro aspecto en el que pueden diferenciarse las dos poblaciones utilizadas es en el tiempo durante el cual las hojas son capaces de seguir creciendo. En las figuras 1 y 2 se aprecia que las hojas de la población SM-18 tienen una vida promedio más larga que las de la población ORIGINAL, sin embargo, la utilidad de este criterio puede ser tan criticable como el anterior.

En las plantas adultas las diferencias entre una y otra población son más claras. Las figuras 16 y 33 muestran que en la proteína-RUBISCO tanto en buen ambiente como en ambiente adverso hay diferencias estadísticamente significativas en favor de las poblaciones mejoradas. En los experimentos llevados a cabo en buenas condiciones ambientales cuando se analiza el comportamiento



de la actividad de la enzima (fig. 18 y 20) las diferencias entre poblaciones son evidentes. Esta diferencia sin embargo, no guarda proporción con las que se observaron en relación a la cantidad de enzima, la cual durante la primera parte del periodo de llenado del grano mostró cambios estadísticamente significativos a favor de la población SM-18 (Fig. 16), pero no así en la siguiente parte del análisis.

Esta situación indica que en el transcurso de la selección a que han sido sometidas las poblaciones mejoradas una parte de la respuesta lograda podría ser explicada por incrementos en la cantidad de enzima, pero aparentemente esta no es la causa más importante, sino los otros mecanismos que regulan su actividad.

En la literatura se señala que el rendimiento de grano es un carácter que depende de la participación de diferentes procesos fisiológicos y por lo tanto, que está controlado por una diversidad de genes (Allard, 1978). Los datos que aquí se presentan apuntan en el mismo sentido.

Algunos de los procesos que podrían estar involucrados en el rendimiento son los siguientes :

- A).- Características de la relación que se establece entre la fuente de fotosintatos (hojas) y los órganos que los demandan (mazorca en formación).

Al respecto se ha mencionado que los órganos que demandan fotosintatos ejercen una profunda influencia sobre el metabolismo

de las hojas que las producen (Crafts-Brandner and Foneleit, 1987b). En este sentido cabe la posibilidad de que la mayor actividad de RUBISCO que se observa en las plantas mejoradas sea una consecuencia de que en ellas la mazorca haya adquirido la capacidad de mandar a la hoja señales cualitativa o cuantitativamente diferentes a las que envía la población ORIGINAL.

Otra posibilidad también relacionada con este punto es la que se refiere a la capacidad de las hojas para responder a las señales que la mazorca envía y de acuerdo con esto, la mayor actividad que muestra la población SM-18 podría deberse a que el mejoramiento genético realizado haya hecho más eficiente el sistema responsable de la respuesta.

Algunos aspectos que sería conveniente analizar dado que podrían ser responsables de esa mayor capacidad de respuesta son los siguientes:

- Mayor sensibilidad a los estímulos.

Esta situación es difícil de analizar dado que no se sabe cuales podrían ser las señales implicadas, pero independientemente de eso, cabría la posibilidad de que siendo de la misma naturaleza y magnitud, la mayor respuesta que se observa en la población SM-18, sea debida a la existencia de un sistema que las detecta y traduce con más eficiencia.

- Estabilidad de la enzima.

En plántulas se ha reportado que la vida media de la RUBISCO es de 7.79 +/- 0.92 días (Humphrey and Davies, 1975). Sin embargo, datos obtenidos de experimentos recientemente realizados en este laboratorio (resultados no mostrados) hacen pensar que en las plantas adultas dicho valor es más alto que el mencionado (Loza-Tavera, comunicación personal). Por otra parte, varios autores han demostrado la existencia de proteasas en el cloroplasto (Miller and Huffaker, 1985) y esta situación aunada a la larga vida de la molécula, obliga a considerar la posibilidad de que durante ese tiempo la enzima sufra daños diversos que podrían hacerla menos activa.

En ese sentido y juzgando por la sensibilidad que las poblaciones mostraron a la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  *in vitro* (tablas 3a y 3b) y aún cuando los experimentos preliminares que se mencionaron antes indican que aparentemente dicho fenómeno no se relaciona con la actividad de proteasas, de momento no es posible descartar por completo esa posibilidad, es decir, es probable que la población SM-18 tenga una actividad de proteasas menor que la que se detecta en la población ORIGINAL. De ahí que sea interesante analizar que efecto ha tenido el mejoramiento genético sobre las características y la actividad de tales enzimas.

- RUBISCO-activasa.

Aunque ya se mencionó antes, no está por demás remarcar

la importancia de analizar el efecto que ha tenido la selección a que se han sometido estas plantas sobre el sistema RUBISCO-activasa.

- Características de la RUBISCO.

Tampoco puede dejarse de lado la posibilidad de que la RUBISCO de la población ORIGINAL sea cualitativamente diferente a la de las poblaciones mejoradas. La figura 20 muestra que al principio del periodo de llenado del grano, cuando aparentemente no se han establecido las condiciones que caracterizan el fenómeno, la actividad de la RUBISCO en la población SM-18 es el doble de la de la observada en la ORIGINAL.

B).- Traslocación y reparto de los fotosintatos.

Los datos aquí mostrados indican que las variables analizadas están de alguna manera relacionadas con la productividad de las plantas. Sin embargo, como ha podido observarse, la relación no es directa. Ello indica que las variables manejadas no son suficientes.

A propósito de esto, en la literatura hay reportes en donde se señala que la capacidad de crecimiento de los órganos de las plantas está determinada tanto por la eficiencia con que se fija el  $\text{CO}_2$  como por la forma en que se distribuyen los productos sintetizados (Gifford and Evans, 1983).

Sobre la traslocación de fotosintatos se sabe que la sacarosa fosfato sintasa (SPS) es la enzima que controla este proceso, al respecto, recientemente apareció una comunicación en donde se señala que la actividad de esta enzima está directamente correlacionada con la capacidad que tienen las plántulas de diferentes variedades de maíz para crecer con mayor o menor rapidez (Rocher et al. 1989). Por lo anterior se considera que a fin de comprender mejor lo que sucede en las plantas de maíz durante el crecimiento y en el período de llenado de grano, e incrementar con ello las posibilidades de encontrar marcadores bioquímicos que pudieran ser usados como criterios de selección en programas de mejoramiento, deberán hacerse otras investigaciones tendientes a esclarecer las interpretaciones que aquí se han presentado y donde el estudio de la RUBISCO-activasa y de la SPS deberá ser considerado.

Dada la cantidad de variables que es necesario contemplar, el estudio del fenómeno desde el punto de vista bioquímico es bastante complicado y no sería sorprendente que las explicaciones que finalmente pudieran encontrarse tuvieran serios inconvenientes para su uso en grandes poblaciones, por lo cual se sugiere que en la medida en que se realicen estos estudios se incorporen otras variables de tipo fisiotécnico como podrían ser el índice de cosecha, el análisis de la arquitectura de la planta y otras que además de dar una nueva dimensión al estudio, junto con los resultados bioquímicos podrían ahora si proporcionar criterios adecuados desde todos los puntos de vista para ser usados con éxito en los programas de mejoramiento.

## IX.- CONCLUSIONES.

Con base en los datos que se han mostrado y el análisis que de ellos se ha hecho, el trabajo realizado permite llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- La regulación de la actividad de la RUBISCO en la etapa de plántulas es diferente a la que se observa cuando éstas se encuentran en el período de llenado del grano.
- 2.- En plántulas, durante la primera parte del desarrollo de la segunda hoja, la actividad está determinada por la velocidad con que se acumula la enzima. Después, la actividad de la enzima queda sujeta a otro tipo de regulación.
- 3.- En plantas adultas durante el período de llenado del grano la regulación de la actividad de la RUBISCO es independiente de la cantidad de la enzima y los mecanismos responsables del incremento en la actividad de la RUBISCO son probablemente de origen metabólico. Además, estos mecanismos son altamente afectados por las condiciones ambientales (sequía) en que se desarrollan las plantas.

- 4.- En plántulas, el análisis de la regulación de la actividad de la RUBISCO y de los parámetros relacionados con su crecimiento, no permiten distinguir entre poblaciones de plantas que pertenecen a variedades genéticamente relacionadas pero con diferencias muy significativas en su capacidad de producción.
  
- 5.- En plantas adultas, durante el periodo de llenado del grano la actividad de la RUBISCO es significativamente superior en las poblaciones mejoradas por lo que sí parece factible poder distinguir en este estadio a plantas con diferencias en su capacidad productiva.
  
- 6.- En plantas adultas se observa que las poblaciones mejoradas durante la primera parte del periodo de llenado del grano tienen cantidades de proteína-RUBISCO ligeramente superiores (aunque estadísticamente significativas) a las que se encuentran en la población ORIGINAL.
  
- 7.- Aún cuando se observa que el contenido de RUBISCO es una variable que se incrementa en la población ORIGINAL de las mejoradas.

8.- Para investigaciones posteriores aparte de las variables contempladas en este estudio, el modelo deberá incluir aproximaciones a los elementos que regulan los cambios de actividad de la RUBISCO y a los que determinan de que manera se reparten los fotosintatos producidos.



## LITERATURA CITADA.

- Allard, R. W. 1978. Principios de la mejora genética de las plantas. Ed. Omega, Barcelona, Esp. Tercera Edición.
- Andrews, T. J. 1988. Catalysis by cyanobacterial Ribulose-Bisphosphate Carboxylase large subunits in the complete absence of small subunits. J. Biol. Chem. 263, 12213-12219
- Akazawa, T. 1979. Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxilase. In Photosynthesis II. Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 6. Edited by M. Gibbs and E. Latzko. Springer-Verlag. pp. 208-222
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. 1986. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science 234 179-186
- Badger, M. R. and Lorimer, G. H. 1976. Activation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Oxygenase. The role of  $Mg^{2+}$ ,  $CO_2$  and pH. Arch. Biochem. Biophys. 175, 723-729
- Bahr, J. T. and Jensen, R. G. 1974. Ribulose Bisphosphate Oxygenase activity from freshly ruptured spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 164, 408-413
- Berger, B. J., Ku, M. S. B., Potter, J. W. and Evans, J. J. 1983. Purification and characterization of maize Ribulose-1,5-bisphosphate

- Carboxylase. *Phytochemistry* 22(5) 1127-1132
- Berry, J. O., Carr, J. P. and Klessing, D. F. 1988. mRNAs encoding Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4190-4194
- , Nikolau, B. J. , Carr, J. P. and Klessing, D. F. 1986. Translational regulation of light induced Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase gene expression in amaranth. *Mol. and Cel. Biol.* 6(7) 2347-2353
- Bowien, B. and Gottschalk, E.-M. 1982. Influence of the sedimentation properties of Ribulose Bisphosphate Carboxylase from *Alcaligenes eutropus*. *J. Biol. Chem.* 257, 11845-11847
- Boyle, F. A. and Keys, A. J. 1987. The state of activation of ribulose -1,5-bisphosphate carboxylase in wheat leaves. *Photosynthesis Research* 11, 97-108
- Brady, C. J. 1981. A Coordinated decline in the synthesis of subunits of Ribulosebisphosphate carboxylase in aging wheat leaves I. Analyses of isolated protein, subunits and ribosomes. *Aust. J. Plant Physiol.* 8, 591-602
- Bray, C. A. 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid

scintillation counter. Anal. Biochem. 1,  
229-235

Bruinsma, J. 1963. The Quantitative analysis of  
chlorophylls a and b in plant extracts.  
Phytochem. and Photobiol. Pergamon Press.  
Great Britain, 2 241-269

Crafts-Brandner, S. J. and Poneleit, C. G. 1987a. Carbon  
dioxide exchange rates, Ribulose Bisphosphate  
Carboxylase/Oxygenase and Phosphoenolpyruvate  
Carboxylase activities and kernel growth  
characteristics of maize. Plant Physiol. 84,  
255-260

----- and ----- 1987b. Effect of ear  
removal on CO<sub>2</sub> exchange and activities of  
Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase  
and Phosphoenolpyruvate Carboxylase of maize  
hybrids and inbred lines. Plant Physiol. 84,  
261-265

Christensen, L. E.; Below, F. E. and Hageman, R. H.  
1981. The effect of ear removal on senescence  
and metabolism of maize. Plant Physiol. 68,  
1180-1185

Ellis, R. J. 1981. Chloroplast protein synthesis,  
transport and assembly. Ann. Rev. Plant  
Physiol. 32, 111-137

-----, Gallagher, T. F., Jenkins, G. I and Lennox,

- C. R. 1984. Photoregulation of the biosynthesis of Ribulose Bisphosphate Carboxylase. *J. Embryol. Exp. Morph.* 83 Supplement, 163-178
- Evans, J. R. and Austin, R. B. 1986. The specific activity of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase in relation to genotype in wheat. *Planta* 167, 344-350
- Flugge, I. and Hinz, G. 1986. Energy dependence of protein traslocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 160, 563-570
- Friedrich, J. W. and Huffaker, R. C. 1980. Photosynthesis, leaf resistances and Ribulose -1,5-bisphosphate Carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 65, 1103- 1107
- Gifford, R.M. and Evans, L.T. 1983. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 485-509
- Gutteridge, S., Parry, M. A. J., Burton, S., Keys, A. J., Mudd, A., Feeney, J., Servaites, J. C. and Pierce, J. 1986. A nocturnal inhibitor of carboxylation leaves. *Nature* 324, 274-276
- Hemmingen, S. M. and Ellis, J. R. 1986. Purification and properties of Ribulosebisphosphate carboxylase large subunit binding protein. *Plant Physiol.* 80, 269-276

- Humprey, T. J. and Davies, D. D. 1975. A sensitive method for measuring protein turnover based on the measurement of 2-<sup>3</sup>H-labeled amino acids in proteins. *Biochem. J.* 156, 561-568
- Jordan, D. B. and Chollet, R. 1983. Inhibition of Ribulose Bisphosphate Carboxylase by substrate Ribulose-1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 258, 13752-13758
- Kobza, J. and Seemann, J. R. 1988. Mechanisms for light-dependent regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3815-3819
- Kuhlemier, C., Green, P. J. and Chua, N.-H. 1987. Regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 221-257.
- Laurell, C.-B. 1972. Electroimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29 Suppl. 124, 71-82
- Liu, X.-Q. and Jagendorf, A. T. 1986. Neutral peptidases in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 81, 603-608
- Lorimer, G. H., Badger, M. R. and Andrews, T. J. 1976. The activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. equilibria, kinetics a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 15(3) 529-536

- Loza-Tavera, H., Serrano, B., Molina, J. D., Ortega-Delgado, M. L. and Sánchez-de-Jiménez, E. 1987. CO<sub>2</sub>-fixation enzymes in maize (*Zea mays*) and grain yield. *Can. J. Bot.* 65, 607-611
- Mae, T., Kai, N., Makino, A. and Ohira, K. 1984. Relation between Ribulose Bisphosphate Carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat. *Plant and Cell Physiol.* 25(2) 333-336
- Makino, A., Mae, T. M. and Ohira, K. 1984. Changes in photosynthetic capacity in rice leaves from emergence through senescence. Analysis from Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and leaf conductance *Plant and Cell Physiol.* 25(3) 511-521
- , ----- and ----- .1984. Relation between nitrogen and Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant and Cell Physiol.* 25(3) 429-437
- Miller, B. L. and Huffaker, R. C. 1985. Differential induction of endoproteinasases during senescence of attached and detached barley leaves. *Plant Physiol.* 78, 442-446
- Miziorko, H. M. and Lorimer, G. H. 1983. Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase

- McCurry, S. D., Hall, N. P., Pierce, J., Paech, C. and Tolbert, N. E. 1978. Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygenase from parsley. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 895-900
- , Pierce, J., Tolbert, N. E. and Orme-Johnson, W. H. 1981. On the mechanism of effector-mediated activation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase. J. Biol. Chem. 256, 6623-6628
- Parry, M. A. J., Keys, A. J., Foyer, C. H., Furbank, R. T. and Walker, D. A. 1988. Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity by activase system in lysed spinach chloroplasts. Plant Physiol. 87, 558-561
- Peterson, G. L. A. 1977. Simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83, 346-356
- Pike, C. S. 1987. Ribulose Bisphosphate Carboxylase assay. Información presentada en el congreso internacional de Plant Physiology.
- Portis, A. R., Salvucci, M. E. and Ogren, W. L. 1986. Activation of Ribulosebisphosphate Carboxylase oxygenase at physiological  $CO_2$  and ribulosebisphosphate concentrations by RUBISCO Activase. Plant Physiol. 82, 967-971

- Randall, D. D., Nelson, C. J. and Asay, K. H. 1977. Ribulose Bisphosphate Carboxylase altered genetic expression in tall fescue. *Plant Physiol.* 59, 38-41
- Ray, T.B. and Black, C. C. 1979. The  $C_4$  and crassulacean and acid metabolism pathways. The  $C_4$  pathway and its regulation. In *Photosynthesis II* vol. 6. Edited by Gibbs, M. and Latzko, E. *Encyclopedia of Plant Physiology.* Springer-Verlag pp. 77-98
- Robinson, S. P., Streusand, V. J., Chatfield, J. M. and Portis, A. R. 1988. Purification and assay of Rubisco Activase from leaves. *Plant Physiol.* 88, 1008-1014
- and Portis, A. R. 1988. Involvement of stromal ATP in the light activation of Ribulose-1,5-bisphosphate in intact isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 86, 293-298
- Rocher, J. P., Prioul, J. L., Lechamy, A. Reyss, A. and Joussaume, B. 1989. Genetic variability in carbon fixation, Sucrose-P-Synthase and ADP-glucose pyrophosphorylase in maize plants of differing growth rate. *Plant Physiol.* 89, 416-420
- Roscher, E. and Zetsche, K. 1986. The effects of light quality and intensity on the synthesis of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase and its



- mRNAs in the alga *Chlorogonium elongatum*.  
Planta 167, 582-586
- Ryan, F. J. and Tolbert, N. E. 1975. Ribulose  
Diphosphate Carboxylase-Oxygenase. J. Biol.  
Chem. 250(11), 4229-4233
- Salvucci, M. E., Werneke, J. M., Ogren, W. L. and  
Portis, A. R. 1987. Purification and species  
distribution of Rubisco Activase. Plant  
Physiol. 84, 930-936
- , Portis, A. R. and Ogren, W. L. 1985. A  
soluble chloroplasts protein catalyzes  
Ribulosebisphosphate Carboxylase-Oxygenase  
activation *in vivo*. Plant Physiol. 70, 381-387
- Seemann, J. R., Berry, J. A., Freas, S. M. and Krump, M.  
A. 1985. Regulation of Ribulose Bisphosphate  
Carboxylase activity by light modulated inhibitor  
catalysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,  
8024-8028
- , Kirschbaum, M. U. F., Sharkey, T. D. and  
Percy, R. W. 1988. Regulation of Ribulose-1,5-  
Bisphosphate Carboxylase activity in *Alocasia  
macrorrhiza* in response to steps changes in  
irradiance. Plant Physiol. 88, 148-152
- Servaites, J. C. 1985. Binding a phosphorylated  
inhibitor to Ribulose Bisphosphate  
Carboxylase-Oxygenase during the night. Plant  
Physiol. 78, 839-843

- , Parry, M. A. J., Gutteridge, S. and Keys, A. J. 1986. Species variation in the predawn inhibition of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase. *Plant Physiol.* 82, 1161-1163
- Sicher, R. C., Hatch, A. L., Stumpf, D. K. and Jensen, R. G. 1981. Ribulose-1,5-Bisphosphate and activation of the carboxylase in the chloroplasts. *Plant Physiol.* 68, 252-255
- Somerville, C. R., Portis, A. R. and Ogren, W. L. 1982. A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP Carboxylase *in vivo*. *Plant Physiol.* 70, 381-387
- Speirs, J. and Brady, C. J. 1981. A coordinated decline in the synthesis of subunits of ribulosebisphosphate carboxylase in aging wheat leaves II. Abundance of messenger RNA. *Aust. J. Plant Physiol.* 8, 603-618
- Tanaka, A. and Yamaguchi, J. 1972. Dry matter production yield components and grain yield of the maize plant. *J. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ.* 57, 71-132
- Thayer, T. T., Choe, H. T., Rausser, S. and Huffaker, R. C. 1988. Characterization and subcellular localization of aminopeptidases in senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 87, 894-897
- Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. 1980. *Statistical*

Methods. The Iowa State University Press, USA.  
pp 228-229

Streusand, V. J. and Portis, A. R. 1987. Rubisco  
Activase mediates ATP-dependent activation of  
Ribulosebisphosphate Carboxylase. Plant  
Physiol. 85, 152-154

Usuda, H. 1984. Variations in the photosynthesis rate  
and activity of photosynthetic enzymes in  
maize leaf tissue of different ages. Plant  
and Cell Physiol. 25(7): 1297-1301

Vodkin, L. O. and Scandalios, J. G. 1980. Comparative  
properties of genetically defined peptidases  
in maize. Biochemistry. 19, 4660-4667

Walden, R. and Leaver, C. J. 1981. Synthesis of  
chloroplast proteins during germination and  
early development of cucumber. Plant Physiol.  
67, 1090-1096

Werneke, J. M., Zielinski, R. E. and Ogren, W. L. 1988.  
Structure and expression of spinach leaf cDNA  
encoding Rubisco Activase. Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 85, 787-791

Wishnick, M. and Lane, D. M. 1971. Ribulose Diphosphate  
Carboxylase from spinach leaves. In Methods in  
Enzymology. Vol. XIXIII. Edited by A. San  
Pietro. Academic Press pp. 570-577

Wittenbach, V. A. 1979. Ribulose Bisphosphate Carboxylase  
and proteolytic activity in wheat leaves from

anthesis through senescence. *Plant Physiol.*  
64, 884-887

-----, Ackerson, R. C., Giaquinta, R. T. and  
Herbert, R. R. 1980. Changes in  
photosynthesis, Ribulose Bisphosphate Carboxy-  
lase, proteolytic activity and ultrastructure  
of soybean leaves during senescence. *Crop.*  
*Sci.* 20, 225-231

Yáñez Estrada, L. G. 1982. Caracterización de un cultivo  
*in vitro* de células de maíz en suspensión. La  
deshidrogenasa glutámica durante el ciclo  
celular. Tesis Profesional. U. A. del Edo. de  
Mex. Escuela de Química.

Zelitch, J. 1982. The close relationship between net  
photosynthesis and crop yield. *Bio Science*,  
32: 796-803.

00562

8

29

SECRET  
1970

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

1989

ESTA TESIS SE REALIZO EN LOS LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ", BAJO LA DIRECCION DEL DR. JOSE ANTONIO HOL---GUIN HUESO.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU

1er VOCAL

DR. JOSE ANTONIO HOLGUIN HUESO

SECRETARIO

DRA. MARINA GAVILANES RUIZ

SUPLENTE

DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO

SUPLENTE

DRA. ROSARIO MUÑOZ CLARES