

00581

1
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Química

**Regulación de la expresión de los genes
que codifican la ribulosa bifosfato
carboxilasa/oxigenasa durante el
desarrollo de maíz.**

T E S I S

**Que para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
p r e s e n t a l a**

**Maestra en Ciencias (Genética)
HERMINIA DE JESUS LOZA TAVERA**

**Bajo la Asesoría de la Doctora:
ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ**

México, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES Y REVISION DE LITERATURA	6
1. Reacciones catalizadas por la RUBISCO	
1.1. Oxigenación	6
1.2. Carboxilación	9
2. Estructura de la RUBISCO	9
3. Síntesis y ensamblaje de la RUBISCO	9
4. Organización de los genes que codifican la subunidad pequeña de de la RUBISCO	11
5. Organización de los genes que codifican la subunidad grande de la RUBISCO	14
6. Patrones de expresión <i>in vivo</i> de los genes que codifican las subunidades de la RUBISCO	15
7. Regulación de la expresión de los genes que codifican la subunidad grande de la RUBISCO	17
8. Regulación de la expresión de los genes que codifican la subunidad pequeña de la RUBISCO	19
8.1. Factores que actúan en cis: secuencias génicas en el promotor	19
8.2. Factores regulatorias que actúan en trans	20
8.3. Otras regiones que afectan la expresión de los genes de la subunidad pequeña	21
9. Resultados previos en el análisis de la actividad y contenido de proteína RUBISCO en maíz	21
IV. HIPOTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIALES Y METODOS	
1. Material biológico	25
2. Definición de los estadios estudiados	
2.1. Plántulas	25
2.2. Plantas adultas	25
3. Condiciones de crecimiento y hojas estudiadas	
3.1. Plántulas	25
3.2. Plantas adultas	26

4. Estimación de los niveles de los RNAs mensajeros que codifican las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO	
4.1. Muestra	26
4.2. Extracción de RNA	27
4.3. Electroforesis de RNA en agarosa	28
4.4. Transferencia de RNA a soporte sólido (membranas de nylon)	29
4.5. Hibridación RNA-DNA (Northern)	29
4.6. Descripción de las sondas utilizadas para cuantificar los RNAs mensajeros de la RUBISCO	30
4.7. Amplificación y purificación de las sondas	31
4.8. Marcaje de las sondas con ^{32}P	31
5. Experimentos de síntesis y degradación de la RUBISCO en la segunda hoja de plántulas	31
5.1. Estadios estudiados y obtención del tejido	32
5.2. Alimentación del tejido con metionina marcada con ^{35}S (pulso y seguimiento)	33
5.3. Extracción	33
5.4. Cuantificación de la radiactividad tomada por el tejido	34
5.5. Purificación de RUBISCO empleando gradientes de sacarosa	34
5.6. Análisis de las fracciones en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	34
5.7. Cuantificación densitométrica de proteína en las bandas correspondientes a las subunidades de RUBISCO producidas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.	37
5.8. Digestión de bandas de proteína obtenidas de geles de poliacrilamida y cuantificación de radiactividad en las bandas	42
5.9. Fluorografía y autorradiografía	42
6. Identificación inmunológica de los polipéptidos de la RUBISCO transferidos a soporte sólido (Western blot)	42
6.1. Purificación de RUBISCO de espinaca	43

6.2. Preparación de la holoenzima y de los polipéptidos que la componen para ser empleados como inóculos	44
6.3. Electroelución	44
6.4. Esquema de inmunización	45
6.5. Purificación de los anticuerpos	45
6.6. Titulación de los anticuerpos	46
6.7. Transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa	46
6.8. Análisis inmunológico de los filtros	47
7. Síntesis de RUBISCO en hojas de plantas adultas durante el período de llenado de grano	47
7.1. Estadios estudiados en plantas adultas	48
7.2. Alimentación del tejido con metionina marcada con ^{35}S (pulso y seguimiento)	48
7.3. Extracción	49
7.4. Experimento I. Electroforesis en geles de poliacrilamida no-desnaturalizantes	50
7.4. Experimento II	50
VII. RESULTADOS	
1. Análisis de RNAs mensajeros de la RUBISCO en plántulas	51
2. Análisis de RNAs mensajeros de la RUBISCO en plantas adultas	52
3. Resultados de los experimentos de pulso y seguimiento en plántulas	
3.1. Captación e incorporación de radiactividad a proteína en extractos	54
3.2. Análisis cualitativo de las electroforesis de RUBISCO	60
3.3. Identificación de RUBISCO por Western blot	62
3.4. Cuantificación de proteína y radiactividad en las bandas electroforéticas correspondientes a las subunidades de la RUBISCO	66
3.5. Resultados de las autorradiografías	80
4. Resultados de los experimentos de pulso y seguimiento en adultas	

4.1. Experimento I	82
4.2. Experimento II	82
5. Corolario	86
6. Artículo: "Regulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Expression in Second Leaves of Maize Seedlings from Low and High Yield Populations"	89
VIII. DISCUSION	
1. Regulación de la expresión de la RUBISCO durante el desarrollo de la segunda hoja de plántulas	90
2. Regulación de la expresión de la RUBISCO en la hoja superior a la mazorca de plantas adultas durante el llenado de grano	94
3. Diferencias en los mecanismos de regulación de la RUBISCO entre plántulas y plantas adultas	96
4. Algunas diferencias observadas entre la población original y la mejorada	97
5. Coordinación entre el contenido de mensajes y de subunidades de la RUBISCO	99
6. Análisis de los experimentos de pulso y seguimiento	100
IX. CONCLUSIONES	103
X. LITERATURA CONSULTADA	104

I. RESUMEN

Se analizó la regulación de la expresión de los genes que codifican la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO; E.C. 4.1.1.39) en maíz, durante el desarrollo de la segunda hoja de plántulas y en la hoja superior a la mazorca en plantas adultas durante el llenado de grano. En plántulas se escogieron siete estadios de desarrollo de la hoja, en adultas se hicieron seis muestreos semanales. Se cuantificaron los transcritos de las dos subunidades de la RUBISCO comparándolos con la actividad y la proteína RUBISCO. Se realizaron también experimentos de pulso y seguimiento para determinar la síntesis y degradación de esa enzima. En plántulas los niveles de los dos RNAs mensajeros aumentaron paralelamente hasta el tercer estadio; después el de la subunidad grande disminuyó lentamente mientras que el de la subunidad pequeña lo hizo abruptamente desapareciendo en el sexto estadio. La actividad y la proteína RUBISCO aumentaron hasta el quinto estadio y luego permanecieron estables. Estos resultados indican que en el desarrollo temprano de la hoja el aumento coordinado de esos parámetros es regulado a nivel transcripcional, mientras que a partir del tercer estadio parece que un control postranscripcional entra en juego ya que disminuyen los RNAs mensajeros pero no la proteína. En el quinto estadio la velocidad de síntesis de la RUBISCO disminuye notablemente por lo que se sugiere que la gran estabilidad de la enzima explica su presencia hasta el final del estudio (regulación postraduccional). En plantas adultas el RNA mensajero de la subunidad grande mostró una tendencia a disminuir paralelamente al comportamiento de la proteína RUBISCO. Aunque el mensaje de la subunidad pequeña se detectó en escasas cantidades durante todo el muestreo, en los experimentos de pulso se observó marca radiactiva en las dos subunidades de la enzima, lo cual implica que para formar la holoenzima RUBISCO la regulación debe ocurrir a nivel traduccional. En conclusión parece ser que diferentes niveles de regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO actúan en los distintos momentos del desarrollo de la planta para dar cuenta del funcionamiento adecuado de las hojas.

SUMMARY

The regulation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO; E.C. 4.1.1.39) genes in maize was studied in the second leaf of seedlings and in the leaf above the ear of adult plants during the grain filling period. In seedlings seven stages of development were selected, while in adult plants six samples were taken weekly. Transcripts of the two genes codifying RUBISCO polypeptides were measured and they were compared with the activity and RUBISCO-protein levels. Pulse and chase experiments were also made to determine the synthesis and degradation of the enzyme. In seedlings the levels of the two mRNAs increased up to the third stage. After that, the large subunit message diminished slowly while the small subunit message did it sharply, disappearing at the sixth stage. The activity and RUBISCO-protein levels increased to the fifth stage and then remained stable. These results suggest that at early stages of leaf development the coordinated increase of these parameters is regulated at transcriptional level. From the third stage forward, it seems that a post-transcriptional control plays an important role in regulating RUBISCO genes expression, since the mRNAs decreased but RUBISCO-protein remains constant. At the fifth stage RUBISCO synthesis decreased notably, suggesting that the great stability of the enzyme may account for its presence until the end of the study (post-translational regulation). In adult plants the large subunit message trended to decrease, as did it RUBISCO-protein. Although the small subunit message was detected in scarce amounts over the whole period of sampling, in the pulse experiments radioactive mark in the two subunits of the enzyme was observed, implying that to produce RUBISCO holoenzyme the regulation must be at translational level. In conclusion, it seems that in RUBISCO gene expression several levels of regulation act at different moments during plant development to account for the correct function of the leaves.

II. INTRODUCCION

El estudio del proceso fotosintético ha sido de gran importancia ya que ha permitido conocer los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo para que los compuestos inorgánicos se transformen en materia orgánica por acción de la energía radiante. Este conocimiento ha brindado la posibilidad de efectuar manejos adecuados de los cultivos con el objeto de aumentar la producción de biomasa, principalmente en plantas de interés económico.

La ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO; E.C. 4.1.1.39) es una de las enzimas clave en la producción de carbohidratos por las plantas a través del proceso fotosintético. Es la primera enzima en el ciclo de reducción fotosintética del carbono y su función es tomar el CO₂ y fijarlo en la ribulosa bifosfato (RuBP), para producir un compuesto inestable de seis átomos de carbono que al escindirse produce dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA). Este compuesto sufre una serie de transformaciones para producir, a partir de la entrada de varias moléculas de CO₂ al ciclo, sacarosa y RuBP, con lo cual el sustrato de la RUBISCO se regenera (Fig. 1, Benson *et al.*, 1950). La RUBISCO es la proteína vegetal más ampliamente estudiada y se ha propuesto que su actividad podría ser uno de los pasos limitantes en el proceso fotosintético (Hageman *et al.*, 1967).

La RUBISCO está constituida por 16 subunidades (Jensen y Bahr, 1977) de dos tipos diferentes y en cantidades iguales, las cuales están codificadas en dos genomas distintos: la subunidad grande en el genoma cloroplástico y la subunidad pequeña en el nuclear. Este origen heterólogo de las subunidades ha conducido al estudio de la coordinación en la expresión de estos genes para producir la holoenzima funcional. En experimentos realizados *in vitro* se ha determinado que la regulación por luz de los genes de la subunidad pequeña ocurre primariamente a nivel transcripcional (Manzara y Grissem, 1988). Asimismo se ha determinado que la regulación de la expresión de los genes de la subunidad grande ocurre primariamente a nivel postranscripcional, con énfasis en estabilidad y procesamiento de RNA y en regulación traduccional de la expresión génica.

La mayoría de los estudios para determinar los puntos de regulación de la actividad de la RUBISCO y de la expresión de los genes que la codifican, han sido realizados en etapas tempranas del

desarrollo de las plantas, en sistemas *in vitro* y/o aplicando variables como luz, temperatura, reguladores de crecimiento, etc. Sin embargo, no es posible suponer que la información obtenida de estos trabajos pueda aplicarse a todos los momentos del desarrollo de una hoja, ya que los procesos fisiológicos que se llevan a cabo cambian en función a los requerimientos del desarrollo. Por tal motivo el interés de este trabajo reside en determinar en que niveles está ocurriendo la regulación de la expresión de los genes que codifican la RUBISCO, así como determinar las velocidades de síntesis y degradación de los polipéptidos que la componen, durante todo el desarrollo de la segunda hoja en plántulas y durante el período de llenado de grano en la hoja superior a la mazorca en plantas adultas de maíz.

En estos dos momentos del desarrollo, el funcionamiento de las hojas es distinto. En el caso de las plántulas, el estudio se inicia cuando la hoja recién emerge del coleóptilo, atraviesa por el momento de máxima expansión y capacidad fotosintética y finaliza cuando ha empezado a envejecer. A través de este proceso la hoja debe desarrollar su maquinaria fotosintética y establecerse como tejido autótrofo para sostener su crecimiento. Cuando logra su mayor expansión, su actividad fotosintética ayuda a sustentar el crecimiento de hojas más jóvenes que inician su desarrollo y que no tienen su maquinaria fotosintética totalmente instalada. En el envejecimiento, se inicia la destrucción de varios de sus componentes los cuales en algunos casos serán translocados y esto provoca la disminución de la actividad fotosintética y la muerte del tejido (Turgeon, 1989).

En el caso de plantas adultas el estudio se lleva a cabo cuando el tejido foliar ya está totalmente maduro y la hoja ha llegado a su máxima expansión, es decir, el proceso de desarrollo ya ha concluido. En este momento es cuando el tejido foliar debe expresar su capacidad fotosintética al máximo y durante un tiempo largo (varias semanas), ya que los compuestos de fijación de CO₂ que produzca esta hoja serán utilizados para la generación de los componentes de la mazorca, el desarrollo del embrión y el llenado de grano (Tanaka y Yamaguchi, 1977). Posteriormente la hoja empieza a envejecer y a translocar parte de sus componentes hacia la mazorca en desarrollo (Fondy y Geiger, 1981).

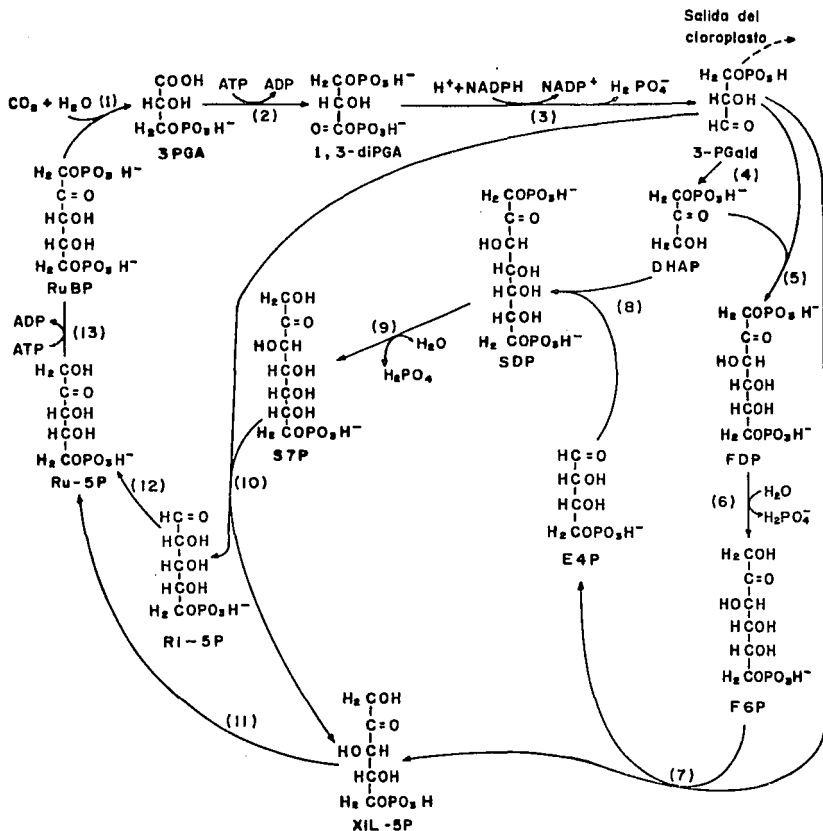


Figura 1. Reducción fotosintética del carbono. Abreviaturas: 3PGA, ác. 3-fosfoglicérico; 1,3-diPGA, ác. 1,3 difosfoglicérico; 3-PGald, gliceraldehído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; FDP, fructosa 1,6-difosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; XIL-5P, xilulosa 5-fosfato; SDP, sedoheptulosa 1,7-difosfato; S7P, sedoheptulosa 7-fosfato; R1-5P, ribosa 5-fosfato; Ru-5P, ribulosa 5-fosfato; RuBP, ribulosa 1,5-bifosfato. Los nombres de las enzimas que catalizan las reacciones son: (1) ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa; (2) fosfoglicerato cinasa; (3) gliceraldehído fosfato dehidrogenasa (NADP); (4) triosa fosfato isomerasa; (5) fructosa 1,6-difosfato aldolasa; (6) hexodifosfatasa; (7) glicolaldehído transferasa; (8) sedoheptulosa 1,7-difosfato aldolasa; (9) heptodifosfatasa; (10) glicolaldehído transferasa; (11) ribulosa fosfato epimerasa; (12) ribosa fosfato isomerasa; (13) fosfo-ribulosa cinasa.

III. ANTECEDENTES Y REVISION DE LITERATURA

1. Reacciones catalizadas por la RUBISCO

La ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO; E.C. 4.1.1.39) está presente en todos los organismos fotosintéticos, desde bacterias hasta plantas superiores. Debido a que es una proteína muy abundante, ha sido estudiada desde hace muchos años. Inicialmente fue identificada como una enzima de carboxilación pero posteriormente se determinó que es capaz de realizar también la oxigenación del mismo sustrato, la ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP) (Ogren, 1984). Este compuesto al ser carboxilado en el ciclo de reducción fotosintética del carbono, produce dos moléculas de ac. 3-fosfoglicérico (3-PGA) y al ser oxigenado produce una molécula de 3-PGA y otra de ac. fosfoglicólico dando lugar al proceso conocido como fotorrespiración (Fig. 2, Mizioro y Lorimer, 1983).

1.1. Oxigenación.

La oxigenación de la RuBP (Fig. 2a) constituye la primera reacción de la vía conocida como fotorrespiración y de la cual no se sabe cual es su función en las plantas. En esta reacción el O₂ compete con el CO₂ por la misma enzima y sustrato lo cual explica la mayor inhibición de la fotosíntesis a bajas concentraciones de CO₂ en plantas con fotosíntesis de tipo C₃, en donde el proceso de fotorrespiración es claramente detectable. Sin embargo en plantas con fotosíntesis de tipo C₄ como el maíz, esta reacción no es detectable. Esta ausencia de fotorrespiración parece estar determinada por el tipo de anatomía que presentan estas plantas y por la localización de la RUBISCO en ellas. En las plantas de tipo C₃ la RUBISCO se localiza en las células del mesófilo en cambio en las plantas de tipo C₄ está confinada a las células de la vaina del haz vascular. En estas plantas la concentración de CO₂ en células del haz vascular es más alta que en células del mesófilo lo que limita que el O₂ pueda competir con el CO₂ por el sitio activo de la enzima, dejándolo disponible para que ocurra la reacción de carboxilación (Fig. 3). De ahí que las plantas de tipo C₄ sean fotosintéticamente más eficientes (Lorimer y Andrews, 1981).

Fig 2. Reacciones que cataliza la RUBISCO

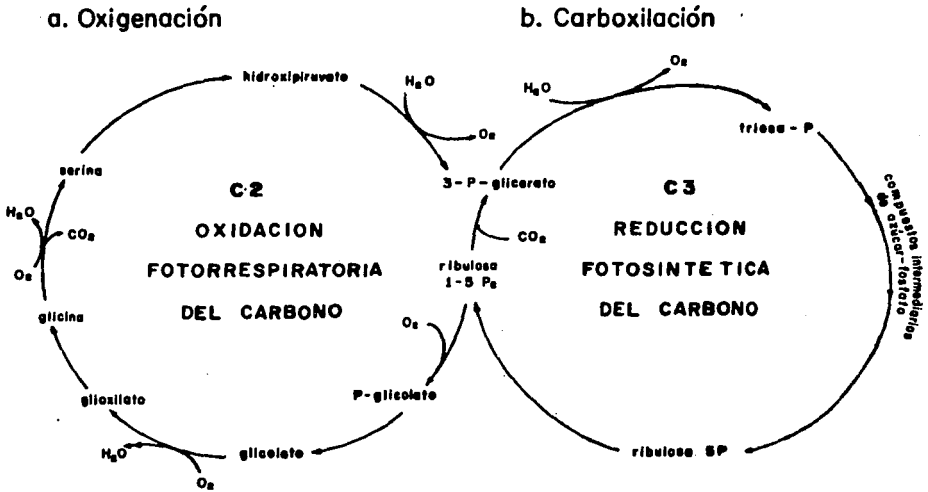


Figura 2. -Reacciones que cataliza la RUBISCO. La integración de los ciclos de fotorrespiración y de reducción fotosintética del carbono se lleva a cabo por la oxigenación o carboxilación de la RuBP. El ciclo C3 opera en forma independiente. El C2 es parasítico, pues depende del C3 para regenerar la RuBP. (Basado en Lorimer, 1981).

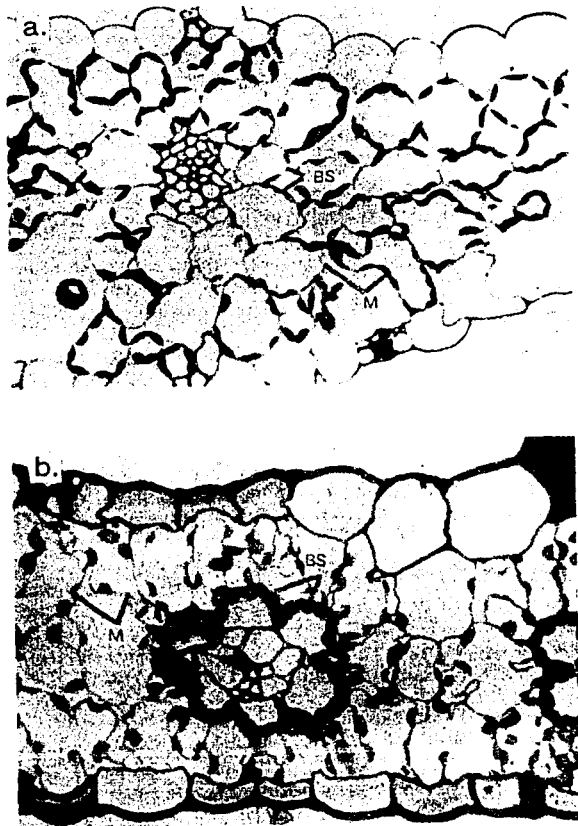


Figura 3. Secciones transversales de hojas. a) Avena (planta C₃) b) maíz (planta C₄). BS células de la vaina del haz vascular; M células del mesófilo. En b) es claramente visible la anatomía Kranz formada por las células de la vaina del haz vascular. (Salisbury y Ross, 1978)

1.2. Carboxilación.

La reacción de carboxilación (Fig. 2b) constituye la primera reacción en el ciclo de reducción fotosintética del carbono o ciclo Calvin-Benson-Bassham. En plantas del tipo fotosintético C₄, este ciclo se realiza en los cloroplastos de las células de la vaina del haz vascular (Fig. 4), las cuales se localizan en el interior del tejido foliar (Fig. 3). Debido a esta distribución el CO₂ que carboxila a la RuBP no es el que proviene de la atmósfera sino de la descarboxilación del ácido málico. Este ácido es sintetizado en los cloroplastos del mesófilo a través del ciclo de Hatch y Slack (Hatch y Slack, 1970).

Para que se lleve a cabo la reacción la enzima debe ser activada con CO₂ y Mg²⁺. Para una detallada explicación de los mecanismos bioquímicos involucrados en la activación y la catálisis revisar el artículo de Lorimer, 1981. Recientemente se ha encontrado que la RUBISCO activasa tiene un papel muy importante en la regulación de la actividad de esta enzima (para una revisión detallada sobre este tema consultar el artículo de Salvucci, 1989).

2. Estructura de la RUBISCO

La RUBISCO es una holoenzima que en plantas superiores tiene un peso molecular de 550,000. Está constituida por dos tipos de subunidades, la grande con un peso molecular aproximado de 55,000 y la pequeña con peso molecular aproximado de 14,000. La holoenzima es un hexadecámero de ocho subunidades grandes y ocho pequeñas (Jensen y Bahr, 1977). Durante mucho tiempo se consideró que la subunidad grande poseía el sitio catalítico (Lorimer y Miziorko, 1980) y la subunidad pequeña jugaba un papel regulatorio escasamente comprendido. Sin embargo, se ha determinado que la subunidad pequeña es necesaria para la catálisis (Andrews y Ballment, 1983) y participa estructuralmente en el sitio activo de la enzima (Larimer *et al.* 1987). La conformación espacial de esta enzima está siendo estudiada con detalle para determinar las interacciones entre los dos tipos de subunidades y los residuos participantes en la catálisis (Lundquist, 1990).

3. Síntesis y ensamblaje de la RUBISCO.

Aunque esta enzima se localiza en los cloroplastos, solamente la subunidad grande es codificada en el genoma del orgánulo (Chan y

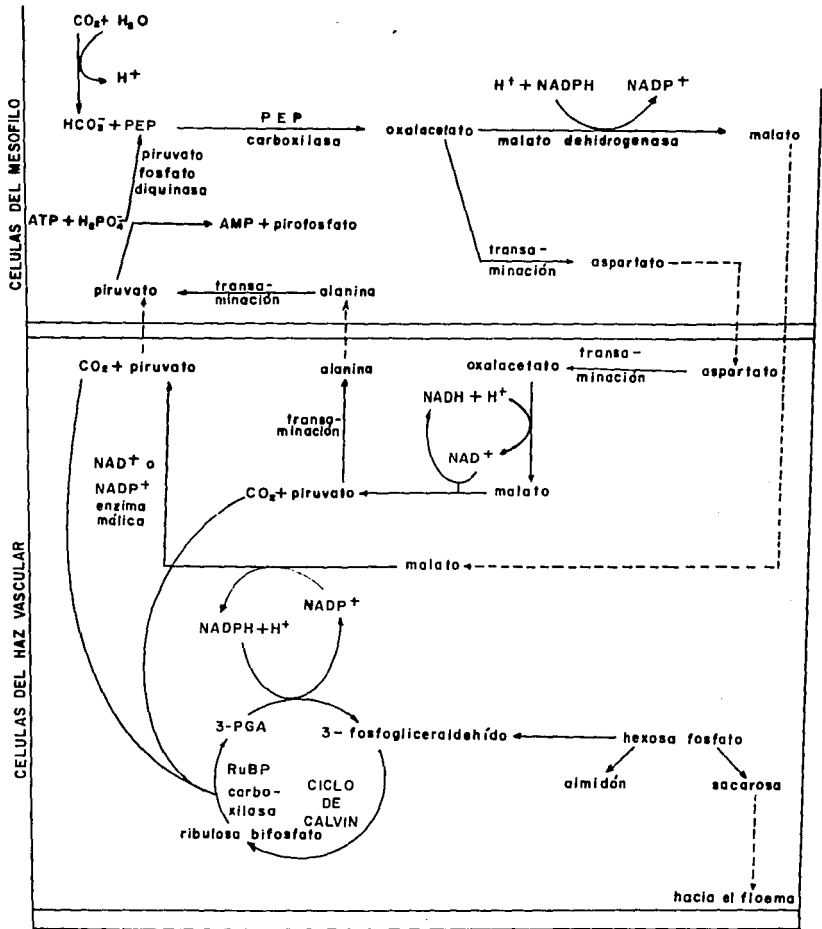


Figura 4. División metabólica del trabajo en células del mesófilo y de la vaina del haz vascular en plantas C₄. El CO₂ es fijado inicialmente en las células del mesófilo formando ácidos de cuatro carbonos que son trasladados hacia las células de la vaina del haz vascular, donde son descarboxilados. El CO₂ que se libera es fijado en los cloroplastos de esas células mediante el ciclo de reducción fotosintética del carbono, cuyos productos son sacarosa y almidón. Después de la descarboxilación de los ácidos de cuatro carbonos, las moléculas de tres carbonos producidas, tales como piruvato y alanina, regresan a las células del mesófilo donde son transformadas en fosfoenolpiruvato para reiniciar el ciclo de fijación del CO₂. (Adaptado de Salisbury y Ross, 1978).

Wildman, 1972) y sintetizada sobre ribosomas cloroplásticos (Blair y Ellis, 1973). La subunidad pequeña está codificada en el núcleo y es sintetizada en los ribosomas citoplásmicos (Kawashima y Wildman, 1972) como un precursor con un peso molecular de 20 kD, el cual es transportado a los cloroplastos y procesado en el estroma en donde también es ensamblado (Fig. 5, Smith y Ellis, 1979).

Al ser sintetizada la subunidad grande se asocia a una proteína conocida como proteína de unión a la subunidad grande (LSBP: large subunit binding protein), lo cual es requisito para que ocurra el ensamblaje de la holoenzima completa (Cannon *et al.*, 1986). Recientemente se le ha asignado el papel de "chaperonina" a esta proteína y el ensamblaje de la RUBISCO se ha estudiado como un sistema modelo para analizar el mecanismo de acción de este tipo de proteínas (Roy, 1989; Gatenby y Ellis, 1990).

4. Organización de los genes que codifican la subunidad pequeña de la RUBISCO.

En todas las plantas superiores estudiadas, la subunidad pequeña está codificada por una familia multigénica en el genoma nuclear (*rbcS*) cuyo número varía dependiendo de la especie. Por ejemplo, en soya se han detectado al menos diez miembros (Berry-Lowe *et al.*, 1982), en petunia ocho miembros (Dunsmuir *et al.*, 1983), en chicharo cinco miembros (Coruzzi *et al.*, 1983), en tomate cinco miembros (Sugita *et al.*, 1987) y en maíz al menos tres miembros (Sheen y Bogorad, 1986).

Las familias de subunidad pequeña más ampliamente caracterizadas son las de petunia, chicharo y tomate donde la mayoría de los genes han sido secuenciados y su organización y/o su localización cromosómica ha sido determinada. En tomate, los cinco genes *rbcS* están localizados en tres loci genéticos situados en dos cromosomas distintos. El locus *Rbcs-1* se localiza en el cromosoma 2 y contiene un gen; el locus *Rbcs-2* está situado en el cromosoma 3 y también contiene un gen y el locus *Rbcs-3* localizado en el cromosoma 2 (Vallejos *et al.*, 1986) contiene 3 genes arreglados en tándem en una región de 10 kb denominados *Rbcs-3A*, *Rbcs-3B* y *Rbcs-3C* (Sugita *et al.*, 1987).

Se ha determinado que todos estos genes contienen al menos dos intrones. Los cuatro genes contenidos en *Rbcs-1* y *Rbcs-3* son similares en estructura y cada uno posee dos intrones de 100 pb; el primero

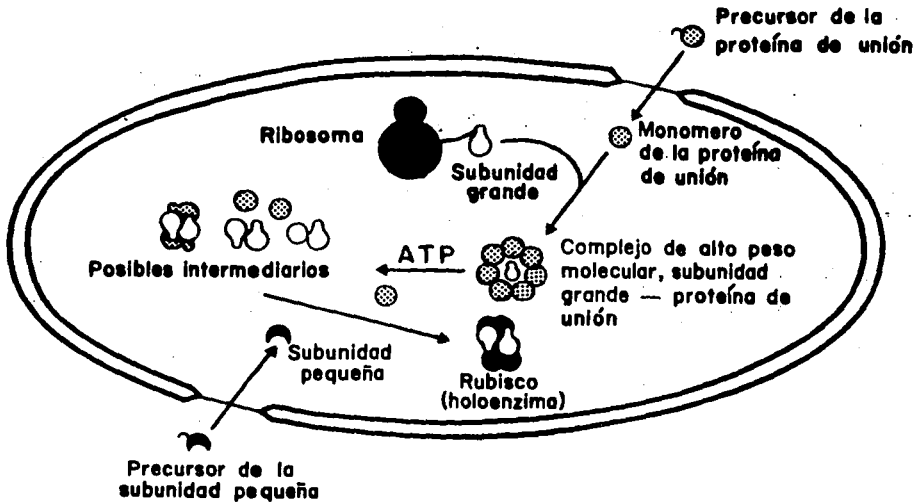


Figura 5. Eventos en el ensamblaje de la RUBISCO. La subunidad grande de la RUBISCO (LS) se sintetiza en los cloroplastos mientras que la subunidad pequeña (SS) y la proteína de unión a la subunidad grande (LSBP) son sintetizadas en el citoplasma y transportadas al cloroplasto. La SS es sintetizada como un precursor de peso molecular de 20,000 que debe procesarse al cruzar la membrana cloroplástica para hacerla funcional. La LSBP actúa como chaperonina es decir, asiste en el ensamblaje de las subunidades de la RUBISCO dentro del cloroplasto (Adaptado de Roy, 1989)

localizado entre los codones 2 y 3 y el segundo entre los codones 41 y 42 del polipéptido maduro. El gen *Rbcs-2* contiene además de los dos intrones señalados anteriormente, un tercer intrón localizado dentro del codón 59. El primero y tercer intrón de *Rbcs-2* tienen 999 y 435 bp y parece que no contienen marcos de lectura abiertos (open reading frames). En petunia la organización es muy semejante. Un gen con dos intrones se localiza en un locus; otro gen con tres intrones se localiza en el segundo locus y un arreglo en tándem de genes con dos intrones se localiza en el tercer locus (Dean *et al.*, 1985; Sugita *et al.*, 1987). En el caso de chícharo los cinco miembros de la familia génica se localizan en un solo locus en el cromosoma 5 (Polans *et al.*, 1985) y todos los genes contiene 2 intrones (Coruzzi *et al.*, 1984; Timko *et al.*, 1985). En trigo y maíz han sido encontrados genes con un solo intrón (Broglie *et al.*, 1983; Lebrun *et al.*, 1987). La posición de los intrones en los genes que contienen solamente dos, corresponde a la posición del primero y segundo intrones en los genes que poseen tres intrones. En el caso de trigo y maíz el único intrón corresponde a la posición del intrón 1 de los genes de dicotiledóneas.

Aunque las estructuras de los genes *rbcS* pueden variar entre especies y aún dentro de una misma especie, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones codificadoras están conservadas entre familias génicas y altamente conservadas dentro de una determinada familia génica. Analizando los miembros de la familia *rbcS* de tomate, se descubren ciertos patrones aplicables a petunia y chícharo. Primero: la secuencia de nucleótidos está conservada variando de 86 a 100% entre los genes *rbcS*. Segundo: muchas de las substituciones de nucleótidos son silenciosas, resultando en una mayor conservación en la secuencia de aminoácidos (91-100% en tomate). Tercero: la mayoría de las substituciones de aminoácidos ocurren en la secuencia del péptido señal tal que en tomate, los cinco genes codifican cuatro diferentes polipéptidos precursores, que son procesados para producir solo tres diferentes polipéptidos maduros. Cuarto: la conservación de la secuencia es mayor entre genes de un mismo locus que entre genes de diferentes loci. Por ejemplo en chícharo donde estos genes están codificados en un solo locus, la máxima variación en la secuencia de aminoácidos es únicamente de 1% (Fluhr *et al.*, 1986a). Quinto: los genes *rbcS* de tomate codifican polipéptidos de

180 ó 181 aminoácidos, de los cuales 57 ó 58 aminoácidos corresponden a la secuencia de señal y 123 al polipéptido maduro. El mismo caso se presenta en petunia, chícharo y tabaco, mientras que en monocotiledóneas parece ser más variable. En *Lemna* la secuencia de tránsito es de 57 aminoácidos y la del polipéptido maduro es de 120 aminoácidos, mientras que las secuencias correspondientes en maíz son 47 y 122 aminoácidos y en trigo 46 y 128 aminoácidos para las secuencias señal y codificadora respectivamente (Manzara y Gruissem, 1988).

5. Organización de los genes que codifican la subunidad grande de la RUBISCO.

Los genes que codifican la subunidad grande de la RUBISCO (*rbcl*) se localizan en el genoma cloroplástico. Existe un gen por cada molécula de DNA, pero hay una gran cantidad de moléculas de DNA por cloroplasto y varios cloroplastos por célula, por lo cual existe una gran cantidad de copias del gen de la subunidad grande de la RUBISCO por célula. En algunos casos pueden ser miles de copias.

En genomas cloroplásticos que tienen la típica estructura invertida repetida, el gen *rbcl* está localizado en una región de copias únicas contigua a y opuesta en polaridad a los genes policistrónicos que codifican las subunidades β y ϵ de la ATPasa de cloroplasto (*atpB/E*). En todas las plantas estudiadas se ha encontrado que la secuencia codificadora *rbcl* es continua, con una longitud de 1.4 kb y que codifica un polipéptido de aproximadamente 475 aminoácidos. Las secuencias codificadoras están altamente conservadas entre diferentes especies con la mayoría de los cambios nucleotídicos ocurriendo en el extremo 3'. Además muchos de los cambios de bases son silenciosos resultando en mayor homología entre las secuencias de aminoácidos. Por ejemplo la homología entre los nucleótidos de maíz y espinaca es de 84% mientras que la homología entre las correspondientes secuencias de aminoácidos es de 90% (Zurawski *et al.* 1981). En especies altamente relacionadas tales como petunia y tabaco, la secuencia de aminoácidos está conservada 97% y las secuencia nucleotídicas de las regiones flanqueadoras 5' y 3' son también altamente homólogas (Aldrich *et al.*, 1986). En especies menos emparentadas, la conservación de las secuencias nucleotídicas entre las regiones flanqueadoras 5' y 3' es considerablemente más baja, aunque los dominios funcionales están

conservados (Zurawski y Clegg, 1987).

6. Patrones de expresión *in vivo* de los genes que codifican las subunidades de la RUBISCO.

Al analizar los patrones de expresión del gen *rbcS* en chícharo, petunia y tomate, ha sido posible observar que sus niveles de RNA mensajero muestran acumulación diferencial en los distintos órganos estudiados (Coruzzi *et al.*, 1984; Fluhr *et al.*, 1986b; Dean *et al.*, 1985; 1987; Sugita y Gruissem, 1987). En todos los casos la acumulación mayor de mRNA para ese gen se presentó en hojas, fue bastante más baja en otros tejidos y no existió en raíces.

En lo que respecta al tipo de gen que se expresa en cada tejido, se observó que en petunia un gen (SSU 301) es el que se expresa más fuertemente en todos los tejidos y la proporción de expresión de los otros genes cambia de tejido a tejido. En chícharo dos genes (*rbcS-3A* y *rbcS-3C*) son los que se expresan más fuertemente en todos los tejidos, pero la proporción relativa de los otros genes también cambia de tejido a tejido. En tomate los genes más fuertemente expresados varían en los diferentes tejidos. Por ejemplo en plántulas etioladas y frutos *Rbcs-3B* y *Rbcs 3C* no se expresan, mientras que en hojas maduras son los expresados más altamente. Otra observación importante de estos estudios es la gran diferencia entre el gen más expresado y el menos expresado en hojas maduras, siendo de 25 veces o más para petunia, 10 veces para chícharo y sólo cuatro veces para tomate.

Los resultados encontrados con respecto a la expresión de los genes *rbcS* en tomate indican que también existe una regulación diferencial dependiente del desarrollo. Durante el desarrollo de la hoja en tomate, el nivel de expresión de los genes cambia de tal forma que aunque *Rbcs-2* y *Rbcs-3B* son los genes más altamente expresados en hojas inmaduras, *Rbcs-3B* y *Rbcs-3C* lo son en hojas maduras. También ha sido observada una regulación diferencial de la expresión de los genes *rbcS* y *rbcL* durante el desarrollo y maduración del fruto del tomate. Después de la polinización, los niveles de mRNA para *rbcS* y *rbcL* en el pericarpio de tomate incrementan durante 15 días y luego decrecen, tal que en el fruto rojo y maduro *rbcS* no es detectable y sólo son encontrados bajos niveles de transcritos de *rbcL* (Piechulla *et al.*, 1986). Este descenso en la expresión parece ser regulado por el

desarrollo y no es simplemente una consecuencia del proceso de senectud, ya que se ha observado la activación de la expresión de genes específicos para la maduración durante este tiempo además del mantenimiento de la expresión constitutiva de otros genes. Otro ejemplo de regulación de la expresión de los genes *rbcS* y *rbcl* dependiente del desarrollo es observada en plántulas etioladas de amaranto y maíz cultivadas en la oscuridad. En ellas los niveles estables de mRNA para *rbcS* y *rbcl* incrementan independientemente de la luz durante el desarrollo (Nelson *et al.*, 1984, Berry *et al.*, 1985). En tomate un conjunto de la familia multigénica *rbcS*, constituido por *Rbcs-1*, *-2* y *-3A*, se expresa en plántulas etioladas y la expresión de *Rbcs-1* en particular puede ser regulada en base al desarrollo.

Aunque los transcritos para *rbcS* y *rbcl* pueden ser detectados en algunas plántulas cultivadas en la oscuridad, se han descrito incrementos dramáticos en los niveles estables de mRNA en respuesta a la luz en tomate (Sugita y Gruissem, 1987), maíz (Nelson *et al.*, 1984; Sheen y Bogorad, 1985; 1986), amaranto (Berry *et al.*, 1985), mostaza (Oelmüller *et al.*, 1986) y chicharo (Sasaki *et al.*, 1981; 1984, Thompson *et al.*, 1983); aunque el incremento en *rbcS* en todos los casos fue mayor que el incremento de *rbcl*. En tomate este incremento representa un aumento en los niveles estables de mRNA de todos los cinco genes *rbcS*, pero los dos genes que no son expresados en plántulas etioladas y son los más altamente expresados en hoja madura *Rbcs-3B* y *-3C* mostraron un significativo retraso (de tres a nueve horas) en la acumulación de transcritos. En maíz la luz también puede actuar para modificar la expresión de *rbcS* y *rbcl* en una forma específica del tipo celular. Aunque los transcritos de estos genes se encuentran tanto en células de mesófilo como de vaina del haz vascular en hojas de maíz etioladas, los niveles de estos mRNAs disminuyeron en las células del mesófilo y permanecieron constantes en las células de la vaina del haz vascular cuando se iluminaron las hojas (Sheen y Bogorad, 1985; 1986).

Mientras que la luz estimula la expresión de *rbcS* y *rbcl*, la ausencia de luz reduce los niveles de expresión. En el caso de *rbcS*, es evidente el control diferencial de los genes individuales en la oscuridad. Por ejemplo, cuando plantas de tomate maduras cultivadas en invernadero se transfieren a oscuridad total por 24 horas, los niveles de transcritos de *rbcl* no caen sustancialmente (menos de dos veces),

mientras que el nivel de transcritos totales de *rbcS* mostró un decremento marcado. Cuando los niveles individuales de transcritos *rbcS* fueron estudiados bajo estas condiciones, se encontró que después de 12 horas en la oscuridad, los transcritos de *Rbcs-1*, *3B* y *3C* habían disminuido hasta niveles no detectables, mientras que *Rbcs-2* y *-3A* sólo decrecieron 33 y 40% respectivamente en relación a los niveles presentados en la luz (Sugita and Gruijssem, 1987). Con base en los patrones de expresión en la oscuridad, los cinco genes *rbcS* pueden dividirse en tres grupos: *Rbcs-1* que es el único gen expresado en la oscuridad en cotiledones, pero no en hojas; *Rbcs-2* y *-3A* los cuales son expresados en la oscuridad en cotiledones y en hojas maduras y *Rbcs-3B* y *-3C* que no son expresados en la oscuridad en ningún tejido. Será de interés determinar qué factores son responsables de las diferencias en expresión en estos tres grupos de genes y si grupos similares pueden ser identificados en otras familias *rbcS*.

7. Regulación de la expresión de los genes que codifican la subunidad grande de la RUBISCO.

Los cambios en la expresión del gen *rbcL* inducidos por luz y durante el desarrollo del cloroplasto han sido estudiados en varias plantas superiores y se ha propuesto que existe control a nivel transcripcional, post-transcripcional y traduccional (Berry *et al.*, 1985; Inamine *et al.*, 1985; Rodermel y Bogorad, 1985; Berry *et al.*, 1986; Sasaki *et al.*, 1987; Tobin y Siverthorne, 1985). En muchos casos sin embargo, el control transcripcional de la expresión del gen no ha sido adecuadamente distinguido del recambio diferencial de mRNA y de la variación en niveles de DNA durante el desarrollo del cloroplasto. Por ejemplo, Inamine *et al.* (1985) han demostrado que el incremento de tres veces en los niveles de RNA mensajero de *rbcL* observado durante el enverdecimiento en plántulas de chícharo, podía ser explicado por un incremento similar en el número de copias de DNA y que el incremento de diez a veinte veces observado en los niveles del polipéptido LS era debido a un control traduccional de la expresión. Por otro lado, Sasaki *et al.* (1987) estudiaron los cambios en el número de copias del DNA cloroplástico y en los niveles de mRNA de *rbcL* en el enverdecimiento de plántulas de chícharo sujetas a diferentes intensidades de luz y encontraron que el aumento en los niveles de mRNA para *rbcL* no estaba

necesariamente correlacionado con un incremento en el número de copias del DNA en el cloroplasto. Ellos han sugerido que la expresión de *rbcl* es regulada a niveles transcripcional y post-transcripcional, aunque el tema de la estabilidad del mRNA no ha sido estudiado. Recientemente Deng y Gruissem (1987) han proporcionado evidencia de que la expresión génica del cloroplasto es regulada primariamente a nivel post-transcripcional. Ellos han encontrado que, aunque la actividad transcripcional general del genoma del cloroplasto se incrementa en respuesta a la iluminación, las actividades transcripcionales de la mayoría de los genes del cloroplasto, incluyendo *rbcl*, no cambian en relación una a la otra. Más aún, encontraron que los cambios en la actividad transcripcional del genoma del cloroplasto eran independientes del número de copias de DNA y que las actividades transcripcionales relativas de ciertos genes, incluyendo *rbcl*, correlacionaban con la fuerza del promotor como lo determinaron Gruissem y Zurawski' (1985a). De esto se desprende que el control transcripcional de la expresión génica del cloroplasto ocurre a un nivel global, con eficiencias de transcripción relativas dictadas por la fuerza de promotores individuales y que la expresión de genes individuales está controlada primariamente a nivel post-transcripcional.

Las regiones promotoras del gen *rbcl* de espinaca y maíz han sido definidas funcionalmente usando extractos para transcripción *in vitro* derivados de esas plantas (Gruissem y Zurawski, 1985b; Hanley-Bowdoin y Chua, 1987). La región promotora *rbcl* contiene dos elementos de secuencia críticos llamados *cpt1* y *cpt2* los cuales son análogos a las secuencias procarlióticas consenso '-35' y '-10' respectivamente y han mostrado tener significado funcional en la expresión genética del cloroplasto (Gruissem y Zurawski, 1985b). Aunque se han descrito múltiples sitios de iniciación de la transcripción para varios genes *rbcl* (Palmer *et al.*, 1982; Crossland *et al.*, 1984; Poulsen, 1984; Mullet *et al.*, 1985), experimentos *in vitro* han mostrado que sólo hay un transcrito primario y que transcritos más cortos son probablemente productos procesados (Crossland *et al.*, 1984; Mullet *et al.*, 1985). En la mayoría de los casos, la región promotora *rbcl* definida anteriormente corresponde a los sitios de iniciación de estos transcritos primarios (Zurawski y Clegg 1987).

8. Regulación de la expresión de los genes que codifican la subunidad pequeña de la RUBISCO.

8.1. Factores que actúan en cis: secuencias génicas en el promotor.

Al analizar las diferentes familias multigénicas *rbcS* en plantas superiores, diferentes patrones de expresión son observados: a) la luz afecta la expresión de los genes *rbcS* en la mayoría pero no en todas las plantas estudiadas; b) el efecto de la luz es mediado por el fitocromo y uno o más receptores de luz azul, cuya influencia puede variar con el estadio de desarrollo de la hoja; c) la regulación por luz de la expresión de los genes *rbcS* ocurre primariamente a nivel transcripcional, pero también cierta estabilidad diferencial del mRNA ha sido observada (Flores y Tobin, 1986; Tobin y Silverthorne, 1985; Kuhlemeier *et al.*, 1987). Además de la regulación por luz, la expresión *in vivo* es órgano-específica y regulada en función al desarrollo.

Puesto que la regulación de la expresión de *rbcS* parece ser primariamente a nivel transcripcional, muchos investigadores se han dedicado a analizar la región precedente (upstream) de los genes *rbcS* con el objeto de encontrar secuencias específicas de DNA responsables de dirigir los distintos patrones de expresión (Dean *et al.*, 1985; Fluhr *et al.*, 1986a). Se han identificado varias secuencias precedentes en los genes *rbcS*, las cuales correlacionan con algunos de los patrones de expresión específicos detectados. Alineando estas secuencias es posible observar que los dos genes de tomate que son expresados constitutivamente en la oscuridad, *Rbcs-2* y *-3A*, comparten tres secuencias comunes: una secuencia rica en CT, la secuencia 5'-GGATGAGATAAGAYTA y la secuencia 5'-CACGTGG/TCAC, las cuales también están presentes en dos genes de petunia (Dean *et al.*, 1985) y en los genes de tabaco. Un subconjunto de genes de la familia *rbcS* (*Rbcs-1*, *-3B* y *-3C*) que no contiene estas secuencias comparte la característica de que su expresión decrece rápidamente a niveles no detectables cuando las plantas son colocadas en la oscuridad. Estas correlaciones entre patrones de expresión en la oscuridad observadas en tomate no se sabe si existen en otras familias *rbcS* pues no existen experimentos semejantes.

Existen otras secuencias conservadas a las que no se les ha detectado alguna relación con algún tipo de expresión diferencial. Estas secuencias pueden clasificarse en tres categorías. La primera

categoría comprende aquellas secuencias conservadas en todos los genes *rbcS* y que probablemente juegan un papel fundamental en la expresión de estos genes. Estas incluyen la caja 'TATA', una secuencia similar a la caja 'CAAT' y la secuencia 5'-GTGTGGTTAA/CTATG, llamada 'caja II' (Fluhr *et al.*, 1986b) la cual se ha demostrado que funciona como un silenciador en la oscuridad para los genes *rbcS*. La segunda categoría de secuencias conservadas incluye aquellas que están conservadas entre todos los miembros de una familia génica *rbcS* específica o entre todos los genes *rbcS* de especies estrechamente relacionadas. Estas incluyen la secuencia de la 'caja I', 5'-TTCAA; la secuencia de la 'caja III', 5'-ATCATTTTCAC; y la secuencia consenso 5'-GAAACCTTATCA. El significado de esta última secuencia no es claro pero parece funcionar en algunos aspectos de la expresión génica que son únicos en plantas con cotiledones fotosintéticamente activos en contraposición a cotiledones que sirven principalmente como órganos de reserva. La tercera categoría incluye aquellas secuencias que están conservadas entre algunos miembros de familias génicas emparentadas y podrían tener algún significado funcional o simplemente reflejar diferencias en el linaje de los genes.

Ha sido demostrado por experimentos con plantas transgénicas, que las regiones precedentes de los genes *rbcS* son suficientes para dirigir su expresión regulada por luz y tejido-específica (Kuhlemeier *et al.*, 1987). Sin embargo, empleando el método de delección por mutagénesis de esas regiones ha sido posible definir elementos intensificadores (enhancer-like elements) los cuales son capaces de dirigir la expresión regulada por luz y órgano-específica en cualquier orientación con respecto al promotor.

8.2. Factores regulatorios que actúan en trans.

En lo que respecta a la identificación de factores regulatorios que actuando en trans se asocian a alguna de las secuencias génicas reguladoras de los genes *rbcS*, en chícharo ha sido identificado un factor nuclear denominado GT-1. Este factor interacciona con las secuencias de las cajas II y III localizadas en la región precedente (upstream) de los genes *rbcS*. Green y colaboradores (1987) identificó otras cuatro secuencias denominadas cajas II¹, III¹, II² y III², las cuales también unen al factor GT-1. Estas secuencias muestran mucha variación cuando se comparan con la caja II. Estas variaciones pueden

indicar que GT-1 puede unirse a muchas secuencias relacionadas o que puede existir una familia de proteínas GT-1 cuyos miembros no diferencian entre sitios *in vitro* pero que reconocen secuencias específicas *in vivo*.

Otros factores que han sido identificados son: el factor de unión a la caja G (GBF) cuya secuencia consenso TCTTACACGTGGCAYY fue derivada al compararla con secuencias semejantes en genes que responden a luz (Giuliano *et al.*, 1988); el factor 3AFI que se une a la secuencia AAATAGATAAATAAAACTT que se encuentra repetida cuatro veces y el factor AT-1 que se une a la secuencia AATATTTTTATT y que es similar a otra secuencia observada en genes *cab* que también responden a luz (Gilmartin *et al.*, 1990). Otro factor encontrado recientemente en *Lemna gibba* (Buzby *et al.*, 1990) y que fue denominado LRF-1 (light-regulated nuclear factor) se demostró que está asociado al proceso de inducción por luz mediada por fitocromo de la expresión del gen SSUSB.

8.3. Otras regiones que afectan la expresión de los genes de la subunidad pequeña

Aunque varios investigadores han mostrado que las regiones precedentes a los genes *rbcS* son suficientes para la expresión regulada por luz y órgano-específica, Dean y colaboradores (1989) han mostrado que secuencias subsecuentes al codón de iniciación de la traducción, en *petunia* influyen el nivel de la expresión de los genes. Esto puede ser debido a la presencia de elementos intensificadores (enhancers) o a regulación post-transcripcional de la expresión de estos genes.

9. Resultados previos en el análisis de la actividad y contenido de proteína RUBISCO en maíz.

El análisis de la actividad de la RUBISCO así como la cantidad de proteína RUBISCO y otros parámetros fisiológicos en plantas adultas de maíz, ha sido realizado previamente (Loza Tavera, 1984; Loza-Tavera *et al.*, 1987; Martínez-Barajas, 1989). De esto se concluye que la actividad de la RUBISCO aumenta durante el período de llenado de grano hasta un máximo a la mitad del período para luego disminuir al final del mismo (Fig. 6) mientras que la proteína-RUBISCO disminuye a través de todo el período aunque se mantiene más o menos sin variación en relación a la proteína total la cual también disminuye (Fig. 7b).

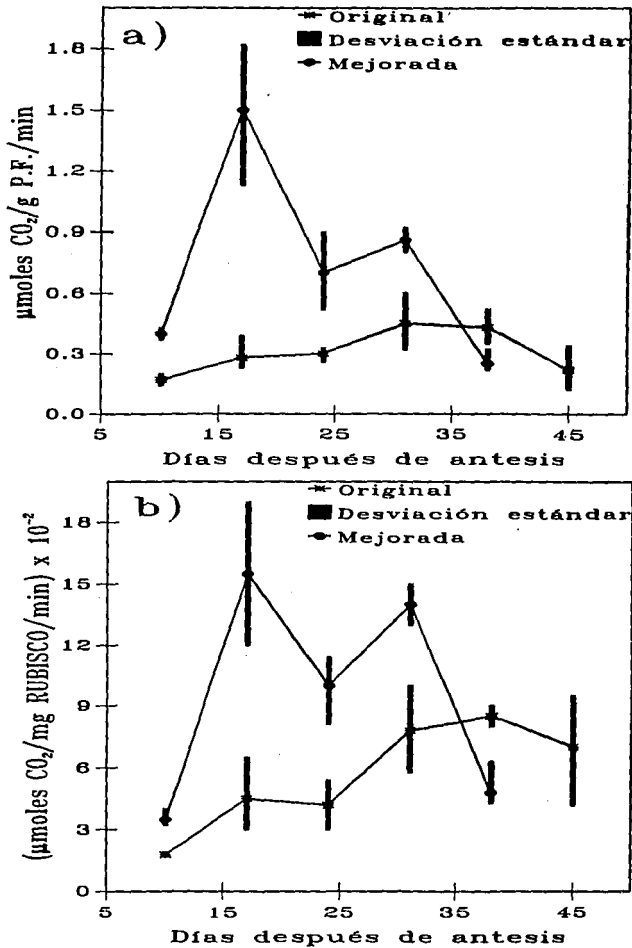


Figura 6. Actividad de la RUBISCO en plantas adultas de maíz durante el llenado de grano. La actividad de la RUBISCO fue determinada en extractos crudos de la hoja superior a la mazorca. a) Actividad expresada con base en el peso fresco. b) Actividad específica expresada con base en la cantidad de proteína RUBISCO. Estos datos corresponden a las figuras 18 y 20 de la tesis de maestría de Martínez-Barajas (1989).

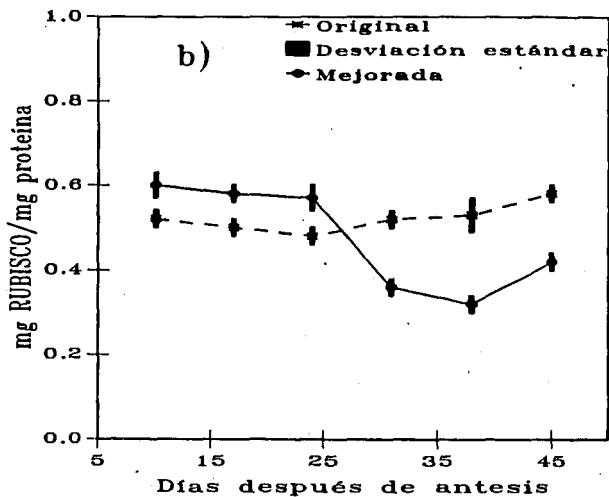
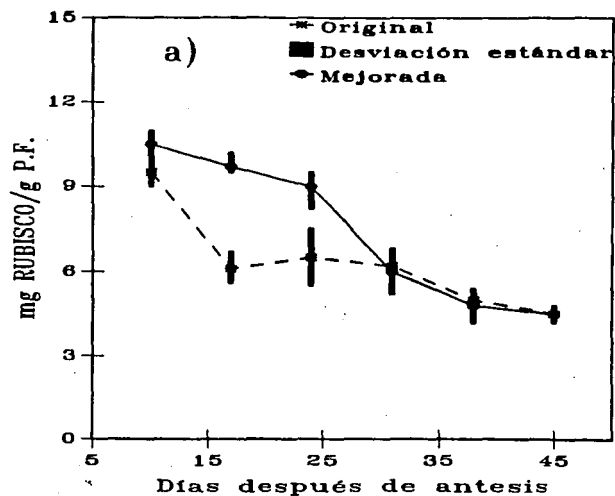


Figura 7. Proteína-RUBISCO en plantas adultas de maíz durante el llenado de grano. La proteína-RUBISCO fue determinada por inmunorocket en extractos crudos de la hoja superior a la mazorca. a) Proteína-RUBISCO expresada como miligramos por gramos de peso fresco (mg/g P.F.) b) Proteína-RUBISCO expresada como miligramos por miligramo de proteína soluble total (mg/mg proteína). Estos datos corresponden a las figuras 16 y 17 de la tesis de maestría de Martínez-Barajas (1989).

IV. HIPOTESIS

Si el principal punto de regulación de la actividad de la RUBISCO fuera a nivel transcripcional entonces los niveles de RNAs mensajeros que codifican a sus subunidades deberían seguir el comportamiento que presentara la actividad de esta enzima en los diferentes estadios fisiológicos que se estudiaran.

Así mismo, debido a que la RUBISCO es una holoenzima constituida equimolecularmente por subunidades grandes y pequeñas, se esperaria, si lo propuesto en el enunciado anterior es cierto, que los niveles de ambos RNAs mensajeros se expresaran en forma paralela.

V. OBJETIVOS

1. Determinar los niveles de RNAs mensajeros de los genes que codifican la RUBISCO en dos diferentes periodos del desarrollo de la planta de maiz: durante el desarrollo de la segunda hoja en plántulas y durante el periodo de llenado de grano en plantas adultas.
2. Determinar las velocidades de síntesis y degradación de los polipéptidos que constituyen a la RUBISCO en los estadios de desarrollo antes señalados.

VI. MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico.

El material biológico utilizado fueron dos poblaciones de maíz de la variedad Zacatecas 58 la cual es una variedad derivada de una colecta en el estado de Zacatecas realizada por el Dr. José Molina Galán, profesor investigador del Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Montecillo Edo. de México. Las poblaciones estudiadas fueron la Original (Ori) y la población mejorada producida después de 18 ciclos de Selección Masal Visual Estratificada para mayor rendimiento de grano (SM-18).

2. Definición de los estadios estudiados

2.1. Plántulas.

En plántulas se analizó el desarrollo de la segunda hoja considerando diferentes estadios durante el proceso. Debido a que las plántulas crecen a diferente velocidad dependiendo de la temperatura, la luz, la fertilización y otros factores ambientales a las que están expuestas, se decidió definir morfológicamente los diferentes estadios sin considerar el tiempo de crecimiento necesario para alcanzarlo. Así, se definieron siete estadios de desarrollo que fueron empleados en el análisis. La descripción de los estadios se presenta en la Figura 1 del artículo "Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase expression in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations" publicado en 1990 en la revista *Plant Physiology* (93:541-548), el cual se anexa en este escrito.

2.2. Adultas.

El inicio del estudio en plantas adultas se consideró el momento en el que el cultivo presentaba el 50% de floración masculina. A partir de entonces se realizaron muestreos semanales durante todo el período de llenado de grano y hasta 45 días después. En los últimos muestreos el grano ya había alcanzado su madurez fisiológica observandose la capa negra en la base del grano.

3. Condiciones de crecimiento y hojas estudiadas.

3.1. Plántulas.

En plántulas los estudios se realizaron en la segunda hoja. Las

semillas fueron puestas a germinar en macetas con tierra de hoja colocadas en un invernadero localizado en la Fac. de Química. Se regaron regularmente con agua corriente y las hojas fueron colectadas cortándolas en el momento en que presentaban el estadio de desarrollo deseado.

3.2. Plantas adultas.

En plantas adultas la hoja seleccionada para el estudio fue la inmediata superior a la mazorca ya que es una de las que participan más activamente en el proceso de llenado de grano (Tanaka y Yamaguchi, 1977). Las plantas fueron cultivadas en terrenos de siembra del Colegio de Posgraduados en Montecillo, Edo. de México, localizado a 19°53'N y 98°53'W y 2245m de altitud. La densidad de siembra fue de 50,000 plantas por hectárea y la fertilización al suelo fue de 120-80-00 kg/Ha (N-P-K). Después de la siembra las plantas fueron irrigadas cada 10 días antes del inicio del período de lluvia y posteriormente sólo cuando fue necesario (Martínez-Barajas *et al.* 1992).

4. Estimación de los niveles de los RNAs mensajeros que codifican las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO.

Los niveles de RNA mensajeros para las subunidades de la RUBISCO en los tejidos estudiados fueron estimados empleando la siguiente ruta metodológica:

- a. extracción de RNA total del tejido foliar
- b. separación del RNA en geles de agarosa
- c. transferencia del RNA a membranas de nylon
- d. hibridación con sondas específicas para los genes en estudio marcadas con ³²P
- e. autorradiografía
- f. medición densitométrica del RNA hibridado y estimación de la proporción de RNAs mensajeros

4.1. Muestra.

Para plántulas se tomó un mínimo de cinco hojas para completar 1.5 g de tejido del estadio deseado. En los estadios muy jóvenes (primero y segundo) las hojitas se tomaron enteras, en el caso de los estadios donde la hoja ya estaba más desarrollada, la base y la punta fueron

cortadas y sólo se tomó la parte central.

Para adultas se hicieron grupos con hojas de cinco plantas de cada población (Original y SM-18). Las hojas fueron cortadas, colocadas en una bolsa de plástico sobre hielo y transportadas al laboratorio de Botánica del Colegio de Posgraduados. Ahí se tomó el tercio central de las hojas, se les quitó la nervadura central y se formaron paquetes que se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se llevaron a la Fac. de Química, en donde se guardaron a -70°C hasta que fueron procesadas. Todas las muestras se tomaron entre las 10:00 y 12:00 horas. Para la extracción de RNA se pesaron dos gramos de tejido foliar tomado de un grupo de cinco plantas.

4.2. Extracción de RNA.

Los métodos correspondientes al análisis de los RNA mensajeros de la RUBISCO de maíz, están descritos en el artículo "Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase expression in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations" incluido en este trabajo. Sin embargo en esta sección se darán más detalles metodológicos con el propósito de facilitar el empleo de estas técnicas.

El procedimiento de extracción y manejo de RNA para análisis por Northern fue realizado empleando todo el material de cristalería lavado perfectamente con detergente y con ácido sulfúrico concentrado y enjuagado abundantemente con agua destilada y desionizada. Posteriormente todo el material fue esterilizado a 15 lbs de presión durante 15 min. Asimismo durante el desarrollo experimental se trabajó con guantes de plástico y frente a mechero.

El método que se empleó para la extracción del RNA (Sheen and Bogorad, 1985) fue seleccionado después de haber probado otros métodos (extracción con CTAB y ultracentrifugación) y haber encontrado que era el que daba mejores resultados y de más fácil aplicación en el laboratorio en donde se desarrollaría el trabajo.

El tejido foliar (1.5 g) fue colocado en un mortero frío y macerado con nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo fino. Inmediatamente se le agregó el amortiguador de extracción (4.5 ml) (Tris-HCl 100 mM, [pH 8.6], 2% de sarkosil, tiocianato de guanidina 4 M, EDTA 25 mM, EGTA 25 mM, β -mercaptoetanol 100 mM) y fenol destilado

saturado con STE (2.25 ml) (NaCl 10 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM). La mezcla se agitó vigorosamente en el Vortex durante 5 minutos y luego se le agregó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (2.25 ml) continuando con la agitación durante otros 5 minutos. La mezcla fue centrifugada para separar la fase acuosa y ésta fue reextraída con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) tres o cuatro veces más, hasta no observar proteína precipitada en la interfase. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa fueron precipitados agregando 0.6 volúmenes de isopropanol frío y dejando la preparación a -20°C durante toda la noche.

Las preparaciones de RNA de plantas presentan una gran cantidad de polisacáridos que dificultan la resuspensión del RNA después de su precipitación. Para quitar los polisacáridos la pastilla de RNA fue lavada dos veces con etanol 70%, secada al vacío y resuspendida en 0.9 ml de una solución de acetato de sodio 0.1M (pH 6.0) a 0°C . Los polisacáridos fueron precipitados agregando etanol para llevar la solución al 10% y manteniendo la muestra a 0°C durante 10 min. La preparación fue centrifugada a 10,000g durante 15 min a 0°C recuperando el sobrenadante. Los ácidos nucleicos fueron precipitados del sobrenadante agregando un volumen de isopropanol y dejando a -20°C por dos horas. Los ácidos nucleicos fueron recuperados centrifugando nuevamente la preparación. La pastilla que contenía los ácidos nucleicos fue lavada dos veces con etanol al 70%, secada al vacío y resuspendida en agua desionizada estéril. Esta preparación fue almacenada a -70°C . (Herrera-Estrella, 1987 comunicación personal). La cuantificación de RNA se hizo considerando $A_{260}=1$ como $40 \mu\text{g}/\text{ml}$. La relación A_{260}/A_{280} nunca fue de 2 como se recomienda para RNA de otras fuentes. Podría ser que el alto contenido de pigmentos presentes en tejidos vegetales impida lograr esta relación. Las relaciones obtenidas en las extracciones de RNA de maíz variaron entre 1.4 y 1.7. Sin embargo, no se encontraron problemas en la transferencia del RNA a nylon ni en la hibridación.

4.3. Electroforesis de RNA en agarosa

Treinta μg de RNA total de cada muestra problema fueron desnaturalizados en 50% (v:v) de formamida desionizada, formaldehído 2.2 M, amortiguador de fosfatos 1X (10X= 100 mM fosfato de sodio [pH 7]

y EDTA 10 mM [pH 8.0]) a 65°C durante 10 min y cargados en un gel de agarosa al 1.2% (p:v) conteniendo 2.6 M de formaldehído. El gel de 0.4 x 13 x 18 cm fue corrido en una electroforesis horizontal empleando amortiguador de fosfatos 1X y aplicando 10 mA durante toda la noche hasta que el colorante (xilén cianol) llegaba a 4 cm del borde (aprox 15 h). Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) por un minuto y destañados en agua destilada hasta visualizar las bandas de RNA ribosomal. Los contenidos de RNA en los carriles de las electroforesis fueron normalizados densitométricamente empleando para ello un negativo ampliado de una fotografía del gel teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de onda corta (TM 36 Chromato-vue shortwave transilluminator, U.V.P. Inc.). El densitómetro empleado fue un GS 300 transmittance/reflectance scanning densitometer (Hoeffer Scientific Instruments) conectado a un integrador (LKB 2200 recording integrator).

4.4. Transferencia del RNA a soporte sólido (membranas de nylon)

El RNA fraccionado en el gel de agarosa fue transferido a membranas de nylon (Nytram, Schleicher and Shuell) por capilaridad empleando una solución SSC 20X (20X=NaCl 3M; citrato trisódico 0.03 M, [pH 7.0]) y fijado en el filtro por medio de un tratamiento con luz ultravioleta, usando un transiluminador de onda corta durante 7.5 min. Posteriormente las membranas fueron remojadas a 65°C durante 15 min en 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2mM EDTA y 0.1% SDS (p:v) para remover al RNA que no se unió a la membrana.

4.5. Hibridación RNA-DNA (Northern)

Las membranas fueron prehibridadas dentro de una bolsa de plástico sellada durante 2 h a 65°C con 0.15 ml de solución de prehibridación (amortiguador de fosfatos 0.5 M [pH 7.2], BSA 1% (p:v), SDS 1% (p:v) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado en agua hirviendo durante 10 min) por cm² de membrana y con agitación lenta. Después de esa preincubación en la bolsa sellada se hizo un pequeño agujero por el cual se agregó la sonda de DNA marcada radiactivamente con ³²P previamente desnaturalizada en agua hirviendo durante 10 min. La bolsa se selló nuevamente y se dejó en agitación lenta a 65°C durante toda la noche. Posteriormente la membrana fue lavada como sigue: a) 5 min a

temperatura ambiente con 2X SSC (1X=0.15 M NaCl, 0.0015 M citrato de sodio [pH 7.0]), b) 30 min a 65°C con 2X SSC y 1% (p:v) SDS y c) 30 min a temperatura ambiente con 0.1X SSC. Durante estos lavados la membrana se inspeccionó con un contador Geiger para detectar la pérdida de la marca inespecifica unida a los filtros. Después de los lavados la membrana fue secada y expuesta a una película de rayos X (X-Omat S, Kodak), con pantallas intensificadoras (Du Pont). El cassette donde se encontraba la membrana y la película se mantuvo a -70°C por el tiempo necesario para que aparecieran las manchas producidas por la marca radiactiva pegada al filtro. La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría y normalizadas en base al RNA total aplicado en cada carril. La cantidad de RNA por tratamiento está expresada como porcentaje, correspondiendo el 100% al tratamiento que presentaba la mayor cantidad de RNA.

4.6. Descripción de las sondas utilizadas para cuantificar los RNAs mensajeros de la RUBISCO.

La sonda utilizada para detectar la expresión del gene de la subunidad grande de la RUBISCO fue el plásmido pZmc 460. Este plásmido contiene el fragmento Bam 9 de DNA cloroplástico (Jolly *et al.* 1981) con una longitud de 4.9 kpb insertado en el sitio Bam HI de pBR322. El fragmento Bam 9 contiene el gen de la subunidad grande (1.6 kpb) y el extremo 5' de un transcrito divergente codificando las subunidades beta y épsilon del CF₁. El plásmido para la subunidad grande se recibió purificado, por lo cual fue necesario introducirlo a *Escherichia coli* para poder amplificarlo.

El plásmido pZmc 460 fue introducido por transformación (Maniatis *et al.*, 1982) en la cepa SF8 la cual es susceptible a ampicilina. La transformación con el plásmido le brindó resistencia por lo que se seleccionaron las cepas resistentes cultivando la bacteria en medio con ampicilina.

La sonda para la subunidad chica, el plásmido SS37, contiene un inserto de 700 pb introducido entre los sitios Bam HI y Eco RI del plásmido pUC13.

Ambos plásmidos fueron donados por la Dra. Jean H. Lukens del Department of Cellular and Developmental Biology de la Universidad de Harvard en Cambridge Mass. U.S.A.

4.7. Amplificación y purificación de las sondas.

Las cepas conteniendo los plásmidos fueron cultivadas en medio Luria (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, timidina 50 mg/l, ampicilina 20 mg/l) durante 24 horas. Los plásmidos fueron extraídos empleando el método de lisis alcalina y fueron purificados en gradientes de cloruro de cesio por centrifugación a 130,000g y 48 h (Clewell y Helinski, 1969). El inserto clonado con el gen *rbcL* fue aislado digiriendo pZmc 460 con Bam H1 y Sma1 para producir un fragmento de DNA de 3.48 kpb en el cual la mayoría de los genes *CF₁* estaban ausentes. El inserto *rbcS* fue aislado digiriendo SS37 con Bam H1 y Eco R1. Los fragmentos resultantes de estas digestiones fueron separados por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión en amortiguador TBE (Tris-base 89 mM, ác. bórico 89 mM, EDTA 2 mM) y recobrados cortando las bandas que contenían los insertos y colocándolas en tubos de microcentrifuga previamente pesados. Agregar agua destilada en una relación 1.5:1 de agarosa y calentar los tubos en agua hirviendo durante 7 min (método descrito en el instructivo de random primer extension labeling system, DuPont/NEN)

4.8. Marcaje de las sondas con ³²P.

Los insertos fueron marcados con [α -³²P]dCTP (180-230 TBq mmol⁻¹, Du Pont/NEN) usando el sistema de marcaje Random primer extension (Du Pont/NEN) dejando que la reacción se llevara a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente. Las actividades específicas logradas estuvieron entre 1.44 x 10⁸ y 1.75 x 10⁸ cpm/ μ g de DNA. Las sondas marcadas fueron purificadas empleando el procedimiento de columna centrifugada (Maniatis *et al.* 1982) y calentadas en agua hirviendo durante 10 min antes de emplearse en la hibridación.

5. Experimentos de síntesis y degradación de la RUBISCO en la segunda hoja de plántulas.

Estos experimentos fueron diseñados para determinar cuanta síntesis y degradación de RUBISCO existía en dos diferentes estadios de desarrollo de la segunda hoja en plántulas de maíz: el segundo y el quinto estadios. Estos estadios fueron seleccionados debido a que se había observado que los niveles de RNA mensajeros para la subunidad grande y pequeña de la RUBISCO eran diferentes entre ellos. En el

segundo estadio los niveles de los dos mensajes de la RUBISCO iban incrementándose paralelamente durante el desarrollo de la segunda hoja, en cambio en el quinto estadio los niveles de RNA mensajero de la subunidad chica casi habían desaparecido mientras que los de la subunidad grande estaban presentes en cantidades claramente detectables. Puesto que los resultados correspondientes a los niveles de RNAs mensajeros fueron iguales en las dos poblaciones, estos experimentos se realizaron sólo con la población SM-18.

Para este estudio se planteó la siguiente ruta metodológica:

- a. alimentación del tejido foliar con metionina radiactiva (pulso)
- b. enfriamiento de la poza con metionina no radiactiva
- c. toma de alícuotas a diferentes tiempos (seguimiento)
- d. obtención de extractos de tejidos radiactivos
- e. purificación de RUBISCO por gradientes de sacarosa
- f. electroforesis desnaturante de las fracciones que contienen a la RUBISCO
- g. comprobación de la naturaleza de las bandas empleando inmunoidentificación con anticuerpos contra RUBISCO (Western blot)
- h. estimación densitométrica de la cantidad de proteína de cada una de las subunidades en las bandas de los geles desnaturantes
- i. cuantificación de la radiactividad presente en las bandas de las subunidades grande y chica separadas por geles desnaturantes
- j. fluorografía y autorradiografía

5.1. Estadios estudiados y obtención del tejido.

Los estadios estudiados fueron el segundo estadio definido cuando la primera hoja muestra la ligula aunque no completamente expuesta mientras que la segunda hoja está enrollada en la base pero abierta en la punta (aproximadamente 7 días después de la siembra); y en el quinto estadio definido cuando la primera y segunda hojas tienen la ligula expuesta, la tercera hoja está casi completamente expandida pero la ligula no está expuesta y la cuarta hoja está a la mitad de su expansión (12 días después de la siembra). Ver Fig. 1 del artículo

anexo.

5.2. Alimentación del tejido con metionina marcada con ^{35}S (pulso y seguimiento)

Fragmentos centrales de hojas del quinto estadio y hojitas completas del segundo estadio, con un peso de 0.2 g fueron cortados bajo agua después de lo cual sus bordes inferiores fueron sumergidos en pequeños tubos de ensayo que contenían 100 μl de una solución de metionina con 10 μCi del isótopo radiactivo ^{35}S azufre (Amersham Actividad específica 9.38 mCi/ml; concentración 8.3 nmoles/ml). Los tubos con las hojas se colocaron en una habitación iluminada con luz fluorescente, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y aereación aumentada provocada por un ventilador pequeño colocado frente a los tubos. Con esto se promovía la transpiración y por lo tanto el consumo de la solución con la metionina radiactiva.

Durante todo el tiempo que duró el experimento, se cuidó que las muestras no quedaran sin líquido para lo cual se agregaban pequeñas cantidades de agua según las necesidades de cada muestra. Después de 4 horas en la solución radiactiva todas las muestras con excepción de una (0 horas de seguimiento), fueron colocadas en una solución con metionina no radiactiva, 200 veces más concentrada que la solución radioactiva.

Posteriormente se tomaron muestras a las 2, 4, 8, 16 y 24 horas después del pulso con el objeto de estimar la velocidad de degradación de la RUBISCO. Las muestras tomadas fueron congeladas en N_2 líquido hasta su análisis.

5.3. Extracción.

Las muestras de hojas que habían sido alimentadas con ^{35}S -metionina, fueron molidas en un mortero frío utilizando N_2 líquido, hasta conseguir que quedaran como un polvo fino. A cada muestra se le agregó 0.6 ml de amortiguador de extracción (Tris 100 mM [pH 7.8], EDTA 0.25 mM, Ac. dietilditiocarbámico 0.35 mM, ditiotreitól 5 mM, MgCl_2 5mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 2 mM) y el macerado se filtró por 4 capas de manta de cielo. Se centrifugó en una microcentrifuga durante 5 min y se tomó el sobrenadante. De este sobrenadante se tomaron alicuotas para medir proteína por el método de Peterson (1977).

5.4. Cuantificación de la radiactividad tomada por el tejido.

La radiactividad tomada por el tejido fue cuantificada tomando alícuotas de 5 μ l del sobrenadante. La radiactividad incorporada a proteína total se cuantificó tomando una alícuota de 5 μ l del sobrenadante, precipitando con TCA al 10%, lavando varias veces con TCA y después con alcohol absoluto frío. Esta solución se pasó por un filtro que fue secado y contado posteriormente en un contador de centelleo líquido empleando una solución de centelleo a base de tolueno (PPO 5g, POPOP 0.1g, aforar a 1l con tolueno).

5.5. Purificación de RUBISCO empleando gradientes de sacarosa.

Se tomaron 0.5 ml del extracto de hojas y se colocaron en tubos de centrifuga que contenían un gradiente de 7 a 24% de sacarosa preparado en el mismo amortiguador de extracción. La corrida se llevó a cabo en una ultracentrífuga a 270,000g durante 16 horas. Al terminar, los gradientes se fraccionaron en alícuotas de 1.5 ml. La RUBISCO aparece muy cerca del fondo del gradiente (perfil de absorbencia a 260 nm, Fig. 8, Goldthwaite y Bogorad, 1971).

Por análisis realizados previamente en los cuales las fracciones de un gradiente fueron corridas en un gel de electroforesis desnaturizante, se demostró que el pico que se suponía era RUBISCO en las fracciones 8, 9 y 10, sí correspondía a esa proteína ya que en el gel aparecían dos bandas de proteína, una de 55 y la otra de 14 kD, pesos que corresponden a la subunidad grande y pequeña de la RUBISCO respectivamente (Fig 9). En estas fracciones además de las bandas correspondientes a la RUBISCO, aparecían dos bandas de alto peso molecular (APM), entre 140 y 180 kD aproximadamente y otra de peso molecular ligeramente mayor que la subunidad grande, entre 64 y 70 kD (MPM).

5.6. Análisis de las fracciones en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

Las fracciones del gradiente que tenían el pico de la RUBISCO de cada uno de los extractos radiactivos se juntaron y se precipitaron con 10 volúmenes de acetona, se dejaron a -20°C durante dos horas, se centrifugaron a 10,000g por 30 min y se secaron en una campana para evaporar los restos de acetona. Cada precipitado se disolvió en 200 μ l de amortiguador de extracción y se llevó a 700 μ l con el mismo

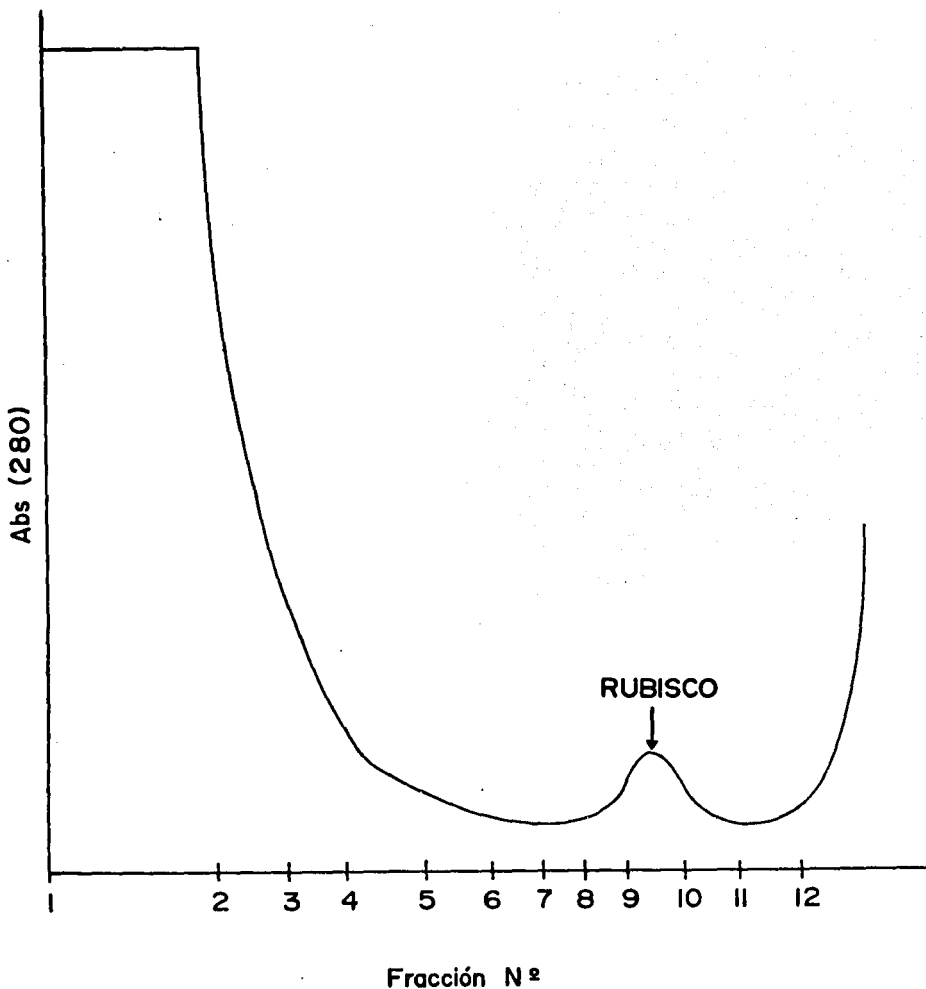


Figura 8. Perfil de absorción del gradiente de sacarosa empleado en la purificación de RUBISCO de maíz. Una alícuota del extracto crudo de hojas de maíz fue colocada en un gradiente de 7 a 24% de sacarosa y centrifugada a 270,000 g durante 16 horas. El gradiente fue fraccionado en alícuotas de 1.5 ml y leída su absorbancia a 280 nm. El pico de proteína-RUBISCO se localiza entre las fracciones 8 y 11 del gradiente.

FRACCIONES

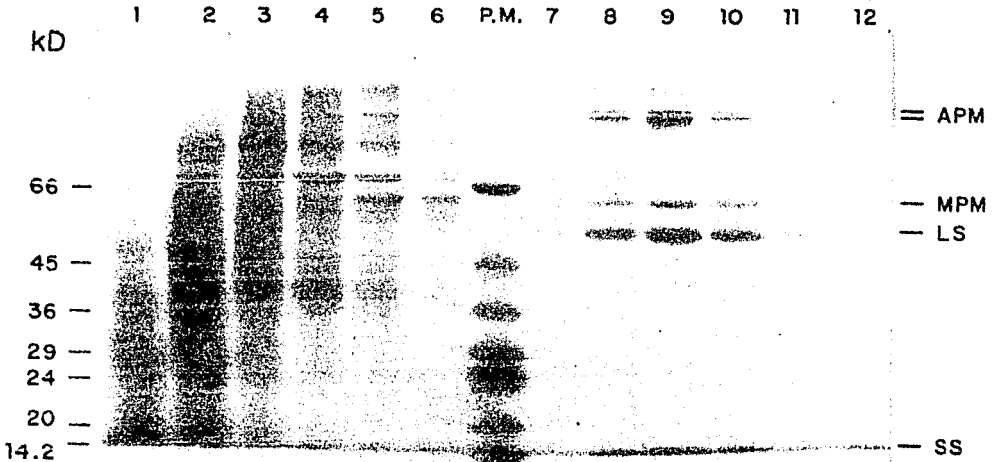


Figura 9. Gel desnaturalizante de las fracciones del gradiente de sacarosa en el que se purificó la RUBISCO de maíz. Las fracciones del gradiente de sacarosa presentadas en la Fig. 8 fueron corridas en un gel desnaturalizante para analizar los polipéptidos que las componen. Las fracciones 8-11 presentan los dos polipéptidos de la RUBISCO: la subunidad grande (LS) de 55,000 de peso molecular y la subunidad pequeña (SS) de 14,000 de peso molecular. A la izquierda se señalan los pesos moleculares correspondientes a los marcadores colocados en el carril central (P.M.). A la derecha se señala la localización de las subunidades así como de las bandas de alto peso molecular (APM) y las de mediano peso molecular (MPM) que aparecen como un componente constante en las fracciones conteniendo a la RUBISCO.

amortiguador.

Volúmenes iguales de cada una de estas soluciones fueron cargados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970) en los cuales también se corrieron como estándar varios carriles con cantidades conocidas de RUBISCO de espinaca (SIGMA) que variaban entre 0.5 y 5 μg . Las corridas fueron realizadas a 25 V durante toda la noche (aproximadamente 12 hrs) a temperatura ambiente y empleando como refrigerante agua corriente. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.1% durante 2 horas y destefidos con metanol y ac. acético hasta que las bandas de proteína se observaban nitidamente. La intensidad de las bandas presentes en cada carril fue estimada por densitometría. Previamente se determinó si era posible efectuar una curva estándar para medir cantidades de proteína por densitometría en un gel.

En la Fig. 10 se presenta un gel típico empleado para cuantificar la proteína de cada subunidad de RUBISCO. Los primeros seis carriles muestran la curva estándar de concentraciones de RUBISCO de espinaca (SIGMA), con las siguientes cantidades por carril: 5, 4, 3, 2, 1 y 0.5 μg . En ellos se puede observar los dos polipéptidos que componen la RUBISCO con pesos moleculares aproximados de 55 y 14 kD. Los marcadores de pesos moleculares están en el carril central y corresponden a 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14.2 kD. Los siguientes carriles presentan las muestras problema. En todos los carriles problema aparecen como se señaló anteriormente (Fig. 9), además de las dos bandas esperadas (con pesos moleculares de alrededor de 55 y 14 kD), dos bandas de alto peso molecular estimadas entre 140 y 180 kD y otra de entre 64 y 70 kD.

5.7. Cuantificación densitométrica de proteína en las bandas correspondientes a las subunidades de RUBISCO producidas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Previamente a la cuantificación densitométrica de las bandas problema se realizaron varias curvas estándar para estimar a que concentraciones de proteína era posible tener linealidad en la medición. Las curvas estándar se hicieron corriendo varias electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida usando diferentes cantidades de RUBISCO de espinaca (SIGMA). De esta manera los dos polipéptidos constituyentes de la RUBISCO se separaban en

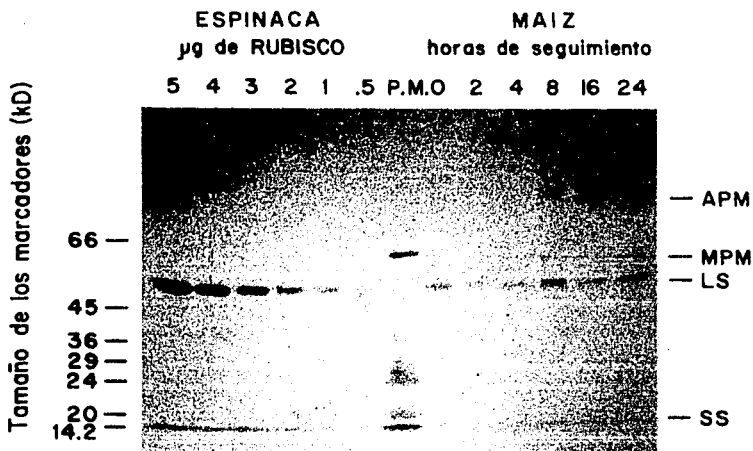


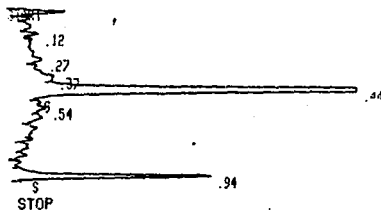
Figura 10. Gel desnaturalizante empleado para cuantificar las subunidades de la RUBISCO en los experimentos de pulso y seguimiento en plántulas. Los primeros seis carriles contienen cantidades decrecientes de RUBISCO de espinaca (5, 4, 3, 2, 1 y 0.5 µg). El carril central presenta las proteínas marcadoras (P.M.) cuyos pesos moleculares están señalados a la izquierda. Los siguientes seis carriles presentan las muestras problema. Segmentos de la segunda hoja de plántulas de maíz fueron alimentados con metionina-³⁵S durante cuatro horas después de las cuales se extrajeron muestras en los tiempos señalados como horas de seguimiento. APM bandas de alto peso molecular; MPM banda de mediano peso molecular; LS subunidad grande; SS subunidad pequeña. Las bandas APM y MPM sólo se observaron en los extractos de maíz.

bandas discretas.

La determinación del área de cada carril se hizo repitiendo la densitometría de 4 a 6 veces en un mismo gel. Estas mediciones se hicieron empleando un densitómetro de barrido GS 300 (Hoeffer Scientific Instruments) y un integrador de área LKB 2200. Un perfil típico de análisis de la RUBISCO de espinaca se presenta en la Fig. 11. En ella pueden observarse a 0.44 y 0.94 unidades de distancia (RT), los dos picos más prominentes correspondientes a la subunidad grande y a la pequeña de la RUBISCO. Sin embargo, la aparición de otros picos en la densitometría indica que no son los únicos polipéptidos presentes en la preparación.

Debido a la presencia en los perfiles densitométricos, de cierta cantidad de proteína que no correspondía a la RUBISCO, fue necesario hacer una serie de cálculos que llevaran a estimar la cantidad relativa de cada una de las subunidades en una cantidad conocida de RUBISCO total de espinaca (SIGMA). Esto se hizo considerando el porcentaje de área que representaba cada una de las subunidades con respecto al área total en cada carril. De tal modo fue posible construir una curva estándar para cada una de las subunidades (Fig. 12 a y b) empleando valores estimados de la cantidad de proteína de las subunidades.

Como puede observarse en la Fig 12 los resultados de las mediciones son líneas rectas por lo cual se considera que este método permite estimar la cantidad de proteína en una banda con base al valor de área que presente al efectuar la densitometría. En estas figuras cada línea corresponde a dos curvas estándar y es el resultado de promediar los valores de área de dos electroforesis y cuatro densitometrías por carril, las barras representan los errores estándar (s/\sqrt{n}). Las cantidades de subunidades graficadas corresponden al nivel de área en el que se encontraron los valores de las muestras problema. Para más detalle, los valores de área en los problemas estuvieron entre 2.5 y 6.0×10^6 para la subunidad grande y entre 0.3 y 0.9×10^6 para la subunidad chica. Esto correspondió a concentraciones de RUBISCO total de espinaca de entre 1 y $6 \mu\text{g}$. La transformación de área a μg de proteína de subunidad por banda en las muestras problema, fue realizada empleando la ecuación de la línea recta calculada a partir de las curvas estándar descritas anteriormente (Fig. 12).



RUN # 88

AREA%	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA
0.12	108070	D VV	0.020	1.056
0.27	544690	VV	0.077	5.390
0.37	798090	VH	0.067	7.717
0.44	6895600	SHB	0.028	67.354
0.54	283240	BV	0.041	1.905
0.94	1696200	+SPB	0.023	16.563

TOTAL AREA= 1.0230E+07
MUL FACTOR= 1.0000E+00

Figura 11. Perfil densitométrico de un gel desnaturalizante mostrando los picos correspondientes a las subunidades de RUBISCO de espinaca. El pico localizado en la posición .44 corresponde a la subunidad grande de la RUBISCO y el localizado en la posición .94 corresponde a la subunidad pequeña. Como puede observarse existen pequeñas cantidades de otras proteínas que son detectadas en la densitometría.

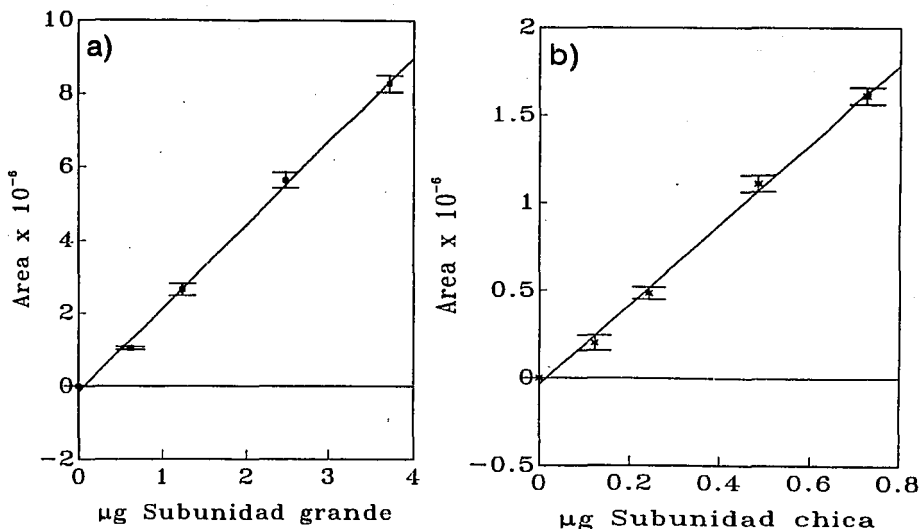


Figura 12. Curvas estándar de las densitometrias para cuantificar las subunidades de la RUBISCO. Diferentes cantidades de RUBISCO de espinaca fueron corridas en geles desnaturalizantes y teñidas con azul de Coomassie. Cada carril fue analizado densitométricamente obteniéndose los valores de área correspondientes a las bandas de la subunidad grande y pequeña de la RUBISCO (Ver también Figs. 10 y 11). Estos valores corresponden a un porcentaje del área total la cual es una cantidad conocida de RUBISCO. A partir de estas relaciones es posible calcular la cantidad de a) subunidad grande y b) subunidad pequeña y su equivalencia en área de la banda en el gel teñido con Coomassie. Cada punto en cada una de las líneas corresponde al promedio de dos electroforesis cuyos carriles fueron analizados densitométricamente cuatro veces. Las barras representan los errores estándar (s/\sqrt{n}).

5.8. Digestión de bandas de proteína obtenidas de geles de poliacrilamida y cuantificación de radiactividad en las bandas.

Las bandas correspondientes a las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO (55 y 14 kD) de cada uno de los tratamientos y estadios estudiados fueron cortadas del gel y colocadas en un frasco con 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% (v:v). Se incubaron a 50°C hasta que el gel se licuó. Posteriormente se les agregó 4.5 ml de cocktail de centelleo miscible en agua (Tritón X-100:cocktail de centelleo de tolueno 1:2) (Hanes y Rickwood, 1981). La radiactividad presente en las bandas fue cuantificada en un contador de centelleo líquido con apertura de canal de 5 a 168.

5.9. Fluorografía y autorradiografía.

Al mismo tiempo, se corrieron otras electroforesis con las mismas muestras cargadas con volúmenes iguales y se sometieron a un tratamiento de fluorografía que consistió en pasar el gel por las siguientes soluciones: 30 min en DMSO, 30 min en DMSO (limpio), 3 hrs en PPO al 27.5% (p:v) en DMSO, 3 hrs mínimo en agua. Posteriormente el gel se colocaba en un papel filtro y se secaba al vacío con calor. Los geles ya secos se colocaron en una cassette con película para autorradiografía y se dejó a -70°C para revelarse cuando aparecieran las señales producidas por el azufre radiactivo incorporado a las proteínas (Laskey, 1980).

6. Identificación inmunológica de los polipéptidos de la RUBISCO transferidos a soporte sólido (Western blot).

Aunque el empleo del método de gradientes de sacarosa para purificar a la RUBISCO y la posterior separación de sus polipéptidos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida permite identificar a esta enzima de una manera bastante confiable, en este trabajo también se utilizó la técnica de Western blot para confirmar que los polipéptidos en las bandas analizadas realmente correspondían a las dos subunidades de la RUBISCO.

El método de Western blot se basa en reacciones antígeno-anticuerpo. Una proteína presente en un soporte sólido es identificada por un anticuerpo que fue producido en contra de ella (primer anticuerpo). Este primer anticuerpo a su vez es reconocido por otro anticuerpo (segundo anticuerpo) que está unido a una peroxidasa.

La reacción de la peroxidasa se revela por 4 cloro-1-naftol, produciendo una mancha morada oscura en el sitio donde se encuentra unido este anticuerpo. De esta manera, la posición de la proteína identificada por el primer anticuerpo queda señalada (Towbin, *et al.* 1979; Harlow y Lane, 1988).

6.1. Purificación de RUBISCO de espinaca.

La preparación de la proteína para usarla como antígeno fue realizada purificando RUBISCO de espinaca empleando los métodos de Hall y Tolbert (1978) y Weidner y Fehling (1985) combinados. Hojas de espinaca adquiridas en el mercado fueron lavadas con jabón y enjuagadas perfectamente con agua. Se les cortó las nervaduras más gruesas y se congelaron en nitrógeno líquido. Estas hojas (25 g) fueron molidas con N₂ líquido hasta obtener un polvo muy fino. Se les agregó 50 ml de amortiguador de molienda (Bicine 50 mM [pH 8], EDTA-Na₂ 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) y el extracto se filtró por 4 capas de gasa. Esta suspensión se centrifugó a 40,000g por 30 min a 4 °C en una ultracentrífuga IEC rotor 494.

El sobrenadante fue colectado y se le agregó polietilenglicol (PEG) 4000 al 60% (p:v) para tener una concentración final de 18% (p:v). La adición de la solución de PEG se hizo con agitación rápida y en el cuarto frío. La solución se mantuvo en agitación rápida durante 30 min. Se centrifugó a 40,000g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue colectado y se le agregó la cantidad necesaria de una solución de MgCl₂ 2M para tener 20 mM. Esta solución se mantuvo en agitación rápida en el cuarto frío durante 30 min. Se centrifugó nuevamente y el precipitado fue disuelto en amortiguador de molienda y centrifugado a 100,000g por 60 min a 4 °C para quitar impurezas no disueltas. Después de eliminar las impurezas al sobrenadante se le agregó solución saturada de sulfato de amonio para que quedara al 50%. Se dejó 30 min con agitación en el cuarto frío y posteriormente se centrifugó a 40,000g por 15 min a 4 °C. En el precipitado se encontraba la RUBISCO. En cada paso se tomaron alícuotas para medir proteína y actividad enzimática.

Se realizó una electroforesis desnaturalizante del precipitado que contenía a la RUBISCO para determinar la pureza de la preparación. Aunque en esta fracción no estaba la RUBISCO totalmente pura, una gran cantidad de otras proteínas había sido eliminada.

6.2. Preparación de la holoenzima y de los polipéptidos que la componen para ser empleados como inóculos.

Debido a que en la fracción de RUBISCO purificada por el método descrito anteriormente se encontraban otras proteínas, fue necesario efectuar una electroforesis no desnaturizante, cortar la banda que contenía la RUBISCO, electroeluir la e inyectarla a los conejos para producir los anticuerpos contra la holoenzima.

Para el caso de la producción de las proteínas de las subunidades, la fracción que contenía la RUBISCO fue sujeta a una electroforesis desnaturizante (con SDS) en la cual los dos polipéptidos se presentaron como dos bandas de 55 y 14 kD. Las bandas correspondientes fueron molidas en un mortero con N₂ líquido, se les agregó solución salina isotónica (0.85% (p:v) NaCl) produciéndose una suspensión con grumos de poliacrilamida. Esta suspensión se pasó varias veces por una jeringa con aguja gruesa para disgregar los grumos y se empleó para inyectar a conejos para la producción de anticuerpos.

En algunos casos se empleó RUBISCO de espinaca comprada de SIGMA Chemical Co. como inóculo. Sin embargo debido a que este producto no tiene la pureza adecuada para ser empleada como inóculo, se realizaron los mismos pasos de purificación por gel de acrilamida descritos anteriormente.

6.3. Electroelución.

Sólo las dos primeras inyecciones fueron realizadas empleando las bandas del gel de acrilamida como inóculo. Posteriormente las bandas que contenían las proteínas de interés fueron electroeluidas y esta solución fue empleada como inóculo. La electroelución se llevó a cabo en un Extraphor Electrophoretic Concentrator LKB 2014. El amortiguador de elución para el gel nativo fue Tris 50 mM [pH 8.9], glicina 50 mM. La solución de alta concentración de sales que forma la barrera contenía NaCl 3M en el amortiguador anteriormente señalado.

Para el caso de la recuperación de proteínas de geles desnaturizantes con SDS, se empleó el mismo amortiguador conteniendo además 0.1% de SDS y la barrera de sales contenía NaCl 1 M en este amortiguador. Se siguieron las instrucciones de uso del aparato y se aplicaron 100 V durante 2 horas para realizar las electroeluciones.

6.4. Esquema de inmunización.

Anticuerpos contra la holoenzima y cada una de las subunidades de la RUBISCO fueron producidos en conejos Nueva Zelanda. Todas las inoculaciones fueron subcutáneas inyectadas en la espalda, la primera se realizó con RUBISCO de espinaca purificada en el laboratorio empleando el método descrito en la sección 6.1. y purificando los polipéptidos de acuerdo al procedimiento descrito en 6.2. El primer inóculo fue de aproximadamente 0.5 mg de cada una de las proteínas. Esta suspensión fue mezclada en proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund. Para formar una emulsión, los constituyentes fueron bombeados dentro y fuera de una jeringa con aguja del No. 19 hasta que se formó una espesa emulsión blanca.

Las inoculaciones posteriores fueron realizadas empleando RUBISCO de espinaca de SIGMA purificada de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2. En la segunda inoculación se inyectó 1 mg de proteína y se llevó a cabo 28 días después. La preparación de la emulsión para inyectar se efectuó de la misma manera que la primera vez pero empleando adyuvante incompleto de Freund. Otras dos inyecciones de 1 mg fueron dadas a los conejos con intervalos aproximados de tres semanas. Muestras de sangre de los conejos inyectados con las proteínas, fueron tomadas regularmente y el suero fue titulado para estimar la reacción antigénica. Cuando se observó que el título era alto, se extrajo una mayor cantidad de sangre (50 ml) y se colectó en un tubo de vidrio. El coágulo que se formó fue agitado suavemente para evitar que se adhiriera a la pared del tubo, se dejó luego en el refrigerador y al día siguiente se tomó el suero del coágulo y se centrifugó 20 min a 1,500 g a 4°C.

6.5. Purificación de los anticuerpos.

Al sobrenadante obtenido de la centrifugación anterior se le agregó una solución de sulfato de amonio saturada a pH 7.0 (122 ml de solución por 100 ml de suero). Se dejó precipitando durante 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. El precipitado se disolvió en un volumen mínimo de amortiguador (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, NaH₂PO₄ 0.2 g/l, [pH 7.2]) y se dializó en contra de este mismo amortiguador. El dializado se puso en alícuotas pequeñas y se guardó a -70°C (Hudson y Hay, 1980).

6.6. Titulación de los anticuerpos.

La titulación de los anticuerpos se realizó empleando la técnica de Western blot descrita adelante en las secciones 6.7 y 6.8, empleando cantidades decrecientes del anticuerpo purificado.

Debido al bajo título que presentaron los sueros para la subunidad grande y pequeña, solamente se empleó el suero producido en contra de la holoenzima para identificar los polipéptidos en los experimentos de pulso y seguimiento. Sin embargo se analizó un filtro conteniendo RUBISCO de maíz y de espinaca con el antisuero en contra de la subunidad grande, con el objeto de definir si esta proteína estaba presente en las bandas de alto y mediano peso molecular que aparecían en las fracciones del gradiente de sacarosa que contenía RUBISCO. La titulación se efectuó empleando filtros que contenía RUBISCO de espinaca y maíz analizando diferentes diluciones. Los resultados fueron los siguientes:

Dilución	Bandas observadas
1:3200	claramente LS de espinaca poca LS de maíz poca SS de espinaca nada SS de maíz
1:1600	claramente LS y SS de espinaca bien LS de maíz muy poca SS de maíz
1:800	muy teñido LS y SS de espinaca muy teñido LS de maíz poca SS de maíz
1:400	aparecen muchas bandas en los carriles de espinaca muy teñido LS de maíz poca SS de maíz

Con base en la titulación anterior las diluciones empleadas fueron 1:1600 para identificar la subunidad grande de maíz y 1:100 para identificar la subunidad pequeña de maíz.

6.7. Transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa.

Los precipitados acetónicos de las fracciones que contenían a la

RUBISCO obtenidas por gradientes de sacarosa (sección 5.5) de los diferentes tratamientos de marcaje radiactivo fueron corridos en una electroforesis desnaturalizante. Las proteínas separadas por este método fueron electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.2 μm , empleando un amortiguador Tris-glicina-metanol (Tris-base 15 g, glicina 56 g, llevar a 4 l con agua y agregar un l de metanol, ajustar pH a 8.3 con HCl). La transferencia se llevó a cabo durante una h a 100 mA y después 4 h a 200 mA con corriente constante.

6.8. Análisis inmunológico de los filtros.

Debido a que no se usaron los antisueros específicos para la subunidad grande y la pequeña, sino el antisuero contra la holoenzima, los filtros a los que se les habían transferido las subunidades de RUBISCO fueron cortados transversalmente para que la parte superior se revelara con la dilución correspondiente a la subunidad grande y la parte inferior con la dilución para la subunidad pequeña.

El filtro a revelar fue bloqueado con leche descremada al 8% (p:v) en TBS (Tris 20 mM [pH 7.5], NaCl 0.5 M) durante 2 hrs a 37°C con agitación lenta. Después del bloqueo se incubó con el primer anticuerpo diluido en TBS a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se lavó abundantemente con TBS y se bloqueó nuevamente con leche descremada al 2% (p:v) incubándose a 37°C por 30 min. Se lavó ligeramente con TBS y se le puso el segundo anticuerpo (Anti rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate; antibody developed in goat IgG fraction of antiserum. Producto No. 9169 SIGMA Chemical Co.) incubándose durante 2 h a 37°C. El filtro se lavó con TBS y 0.05% (v:v) de Tween 20 (4 veces), después se lavó con TBS solo (4 veces). Para revelar el filtro se agregó la solución de revelado conteniendo el peróxido de hidrógeno (3.3 ml metanol; 10 mg de 4-cloro-1-naftol; 17 ml de agua y 20 μl de peróxido de hidrógeno al 30%). El filtro se dejó en esta solución hasta observar las bandas esperadas (entre 5 y 8 min). Cuando aparecieron las bandas se desechó la solución y se lavó el filtro abundantemente con agua destilada (Towbin *et al.* 1979).

7. Síntesis de RUBISCO en hojas de plantas adultas durante el período de llenado de grano.

Al hacer el análisis de las cantidades de RNAs de la RUBISCO en plantas adultas durante el llenado de grano, el RNA mensajero para la subunidad pequeña no fue detectado, mientras que el de la subunidad grande sí se detectó claramente. De ahí surgió el interés por determinar si durante ese período de desarrollo del maíz había síntesis de la RUBISCO. Para definir este punto se llevaron a cabo dos experimentos complementarios. En el primero se midió la cantidad de incorporación de metionina radiactiva a la RUBISCO holoenzima y en el segundo se determinó por autorradiografía, si las dos proteínas que componen la holoenzima estaban marcadas radiactivamente. Debido a que en el análisis de los RNAs mensajeros no se observaron diferencias importantes entre poblaciones, estos estudios se realizaron en las dos poblaciones indistintamente.

7.1. Estadios estudiados en plantas adultas.

Plantas completas de la variedad Zacatecas 58 fueron colectadas temprano por la mañana (entre 7 y 8 A.M.) y llevadas del campo experimental del Colegio de Posgraduados en Montecillo, Edo. de México, a la Facultad de Química de la UNAM. Allí la hoja superior a la mazorca fue cortada y sumergida en agua.

Para el experimento de incorporación de metionina a la RUBISCO holoenzima (experimento I) se usaron plantas de la población SM18 tomadas en el momento de la floración. Para determinar si las dos subunidades de la RUBISCO estaban marcadas (experimento II), las poblaciones muestreadas fueron la Original, aproximadamente en la fecha de floración y la SM18, seis semanas más tarde, casi al final del período de llenado de grano.

7.2. Alimentación del tejido con metionina marcada con ^{35}S (pulso y seguimiento).

La alimentación del tejido con metionina ^{35}S se hizo el mismo día en que se colectaron las plantas. De cada planta se tomó la hoja superior a la mazorca y del tercio intermedio de ella, un segmento de aproximadamente 1-2 x 5-7 cm con peso de 0.4 g fue cortado y colocado en tubitos de plástico transparente conteniendo 100 μl de solución con 10 μCi de met ^{35}S (Amersham. Actividad específica de 9.38 mCi/ml; concentración 8.3 nmoles/ml). El borde inferior de las muestras (se

mantuvo la polaridad del tejido), fue sumergido en el líquido. Los tubitos se colocaron en el estante superior del cuarto de cultivo donde recibían mayor cantidad de luz (tipo fluorescente) y aire de la ventilación. Constantemente según fuera necesario, se agregaba agua destilada o solución de medio Murashige y Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS 1/2) sin hormonas, para evitar que el tejido se secase, pero sin que la cantidad de líquido en donde estaba sumergido el tejido aumentara demasiado.

Los segmentos de hoja se mantuvieron en esas condiciones durante 4 y 3 h para el primero y segundo experimento respectivamente (pulso). Al final de ese tiempo, se tomaba una muestra que correspondía al tiempo 0 y las otras muestras se pasaron a otros tubitos semejantes que contenían 100 µl de una solución de metionina no-radiactiva (fría), 200 veces más concentrada que la solución radiactiva (3.154×10^{-3} µmoles/tubo) (seguimiento). Cuando las muestras casi consumían la solución, se les agregaba la cantidad de agua o sol MS 1/2 necesaria para que no se secaran.

Los tiempos de seguimiento empleados para las plantas del Experimento I fueron 4, 12 y 24 horas y para las plantas del Experimento II 4, 12 y 24 horas para la población original (en la floración) y 5, 12 y 26 horas para la población SM18 (6 semanas después de floración).

7.3. Extracción.

Las muestras de 0.4 g fueron maceradas con nitrógeno líquido en un mortero frío. Cuando el tejido estaba totalmente molido se le agregó 1.2 ml de amortiguador de extracción (descrito en sección 5.3). Cada molienda se pasó por manta de cielo que se exprimió y se colectó en tubos ependorff. De cada muestra se tomaron alícuotas de 5 µl para medir la radiactividad incorporada a extracto crudo. A estas muestras se les agregó 5 ml de líquido de Bray (PPO 2g, POPOP 0.1g, naftaleno 30g, etilen glicol 10ml, metanol 50 ml, aforar a 500 ml con 1,4-dioxano) y se llevaron a contador de centelleo donde se midieron en el canal con apertura de 5-168. Los extractos se centrifugaron 10 min en la microcentrifuga y del sobrenadante se tomaron alícuotas para medición de proteínas y de radiactividad incorporada en proteína.

7.4. Experimento I. Electroforesis en geles de poliacrilamida no-desnaturalizantes.

En el experimento I, en donde se determinó la cantidad de radiactividad incorporada a la RUBISCO holoenzima, después de hacer el extracto de cada muestra, se tomaron alícuotas para hacer una electroforesis en geles de poliacrilamida no-desnaturalizante al 5%. De cada uno de los carriles se cortó la banda correspondiente a RUBISCO (holoenzima), se digirió con peróxido de hidrógeno y se cuantificó la radiactividad de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en la sección 5.7.

7.5. Experimento II.

Para determinar si las dos subunidades de la RUBISCO incorporaban marca radiactiva durante el pulso aplicado a los segmentos de hojas de plantas adultas, se tomaron alícuotas de los extractos crudos y se pusieron en gradientes de sacarosa procesándose de acuerdo a lo descrito en la sección 5.5. Una alícuota de las fracciones reunidas que contenían el pico de RUBISCO fueron cargadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y sometidas a fluorografía y autorradiografía, empleando los métodos descritos en las secciones 5.6 y 5.8.

VII. RESULTADOS

1. Análisis de RNAs mensajeros de la RUBISCO en plántulas.

Los resultados del análisis de los RNAs mensajeros que codifican las dos subunidades de la RUBISCO en plántulas, están presentados en el artículo: "Regulation of Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase Expression in Second Leaves of Maize Seedlings from Low and High Yield Populations" publicado en 1990 en la revista *Plant Physiology* (93:541-548). Los datos correspondientes a actividad de la enzima y contenido de proteína RUBISCO en plántulas, presentados en ese artículo corresponden a la tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica) de E. Martínez Barajas (1989).

La Fig. 6 del artículo presenta los resultados obtenidos al realizar las hibridaciones de RNA total de los estadios estudiados en plántulas, con las sondas de los genes que codifican para la subunidad grande (*rbcL*) y pequeña (*rbcS*) de la RUBISCO de maíz. La sección a) muestra las manchas autorradiográficas; las secciones b) y c), los niveles porcentuales relativos de los mensajes presentados en a). En estas figuras puede observarse que los mensajes de la subunidad grande (Sección b) presentan su máxima expresión en el tercer estadio, para luego disminuir gradualmente hasta el final del estudio en las dos poblaciones estudiadas. En el caso de la subunidad chica (Sección c), la mayor cantidad de mensaje se presenta en el tercero y cuarto estadios, para la población mejorada y original respectivamente. A partir de esos puntos la cantidad de mensaje disminuye abruptamente en el quinto estadio y desaparece casi totalmente en el sexto estadio y por completo en el séptimo estadio, mientras que el de la subunidad grande todavía es claramente detectable.

Los resultados correspondientes a la actividad y proteína RUBISCO (Figs. 4 y 5 del artículo) en estos estadios muestran que en ambos hubo un aumento del primero al tercer estadio. Posteriormente en la proteína RUBISCO se observa una disminución en la velocidad de acumulación (reflejado por la pendiente de la gráfica) hasta el quinto estadio; para después estabilizarse desde ese estadio hasta el final del estudio. Mientras tanto a partir del cuarto estadio la actividad presenta aumentos y disminuciones sin una tendencia definida.

Los datos presentados muestran que los niveles de actividad de la

RUBISCO y su proteína están acoplados mientras que los de los RNAs mensajeros que codifican la subunidad grande y la pequeña sólo lo están al inicio del desarrollo de la hoja. Estos resultados indican que existen diferentes niveles de regulación metabólica para la expresión de esta enzima.

2. Análisis de RNAs mensajeros de la RUBISCO en plantas adultas.

Los resultados del estudio para estimar las cantidades de RNAs mensajeros de los dos genes de la RUBISCO en las población Zac 58 SM-18 (mejorada) se presentan en la Fig. 13. En la parte a) se presenta una sección del gel que contenía RNA total de plantas adultas de maíz teñido con bromuro de etidio y observado en luz ultravioleta. En ella pueden verse las cuatro bandas de RNA ribosomal características de células eucarióticas: RNA 27S, 18S, 16S y parte del 23S. En esta sección se observa que los carriles fueron cargados aproximadamente con la misma cantidad de RNA total. Sin embargo, para realizar las estimaciones de una manera más precisa, todas las mediciones de RNA mensajero fueron normalizadas considerando la cantidad de RNA total puesta en cada carril determinada por densitometría. En las Secciones b) y c) se presentan las autorradiografías de las hibridaciones con las sondas para la subunidad grande y pequeña respectivamente, el primer carril corresponde a RNA total de plántulas (S) empleado como control y los siguientes carriles presentan RNA total de adultas extraídos en diferentes momentos después de la antesis. En la autorradiografía para el gen de la subunidad grande (Fig. 13b), se observan claramente dos mensajes que van disminuyendo en cantidad hasta aparecer degradados en el último muestreo. Sin embargo en el caso de la autorradiografía para la subunidad chica (Fig. 13c), no fue posible detectar mensajes en hojas adultas (comparar con el primer carril correspondiente a RNA de plántulas). Repeticiones de este experimento incluyendo extracción de RNA produjeron los mismos resultados. El mismo filtro hibridado con la sonda para la subunidad pequeña se sobreexpuso por tiempos 60 a 70 veces más largos. La sección d) de la Fig. 13 muestra los resultados obtenidos. En ella se puede observar que aparecen unas manchas ligeras en los carriles que contienen RNA de hojas adultas, mientras que en el caso del RNA de plántulas aparece una mancha característica de sobreexposición.

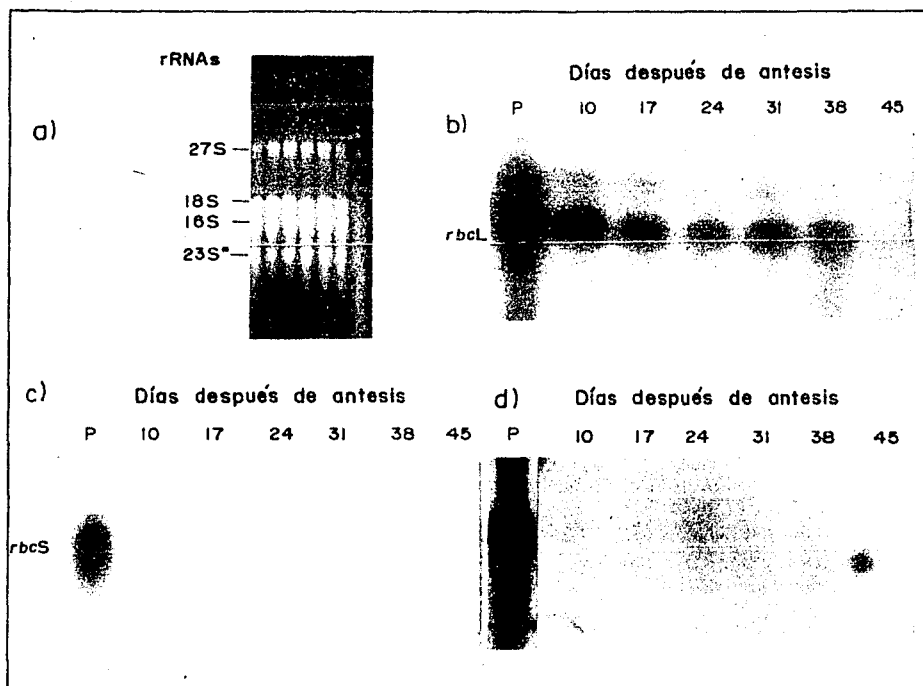


Figura 13. RNAs mensajeros de la RUBISCO en plantas adultas de maíz en la población mejorada durante el llenado de grano. a) Fotografía del gel conteniendo el RNA total de plantas adultas de maíz. Los valores a la izquierda indican los tamaños de los RNAs ribosomales presentes en las preparaciones; (*) el RNA ribosomal 23S es un fragmento. b) Autorradiografía de los filtros con RNA total hibridados con la sonda de la subunidad grande de la RUBISCO (*rbcL*). c) Autorradiografía de los filtros con RNA hibridados con la sonda de la subunidad pequeña de la RUBISCO (*rbcS*). d) Autorradiografía sobreexpuesta del filtro en c).

La subunidad pequeña de la RUBISCO está codificada en maíz por una familia multigénica constituida al menos por 4 miembros (Sheen and Bogorad, 1986). Aunque existe gran homología entre los miembros de esta familia, las hibridaciones de RNA de adultas con el gen *rbcS* fueron repetidas bajo condiciones menos rigurosas (42°C), para asegurar que cualquier miembro de la familia génica pudiera ser detectado. Estas nuevas condiciones no produjeron ninguna diferencia en los resultados obtenidos. En conclusión, estos resultados indican que existe mensaje de la subunidad grande en cantidades claramente detectables, cuando la subunidad chica muestra cantidades escasas. Lo cual es semejante a lo observado a partir del quinto estadio en plántulas (Fig. 6 artículo).

La Fig. 14 muestra la autorradiografía de las hibridaciones tanto en la población original (Zac 58 Ori), como en la mejorada (Zac 58 SM-18). En la figura 15 se presentan los resultados de las densitometrías de los mRNAs de las subunidades de la RUBISCO en las dos poblaciones estudiadas. En ella puede verse que la cantidad de mensajes de la subunidad grande disminuye a través del estudio hasta quedar con aproximadamente 10% del valor más alto alcanzado. Aunque los niveles del mRNA para la subunidad grande presentan tendencias semejantes en las dos poblaciones estudiadas, es interesante señalar que hubo mayor cantidad de este mRNA en la población original que en la mejorada. En esta figura también se grafican los valores de la subunidad pequeña. En este caso la misma línea corresponde a las dos poblaciones. El comportamiento de los mRNAs de la subunidad grande se asemeja al presentado por la proteína RUBISCO en estas mismas poblaciones (Fig. 7a), aunque la actividad de la enzima presentó una evolución diferente (Fig. 6). (Los datos de las figuras 6 y 7 fueron tomados de la tesis de Martínez-Barajas, 1989)

3. Resultados de los experimentos de pulso y seguimiento en plántulas.

3.1. Captación e incorporación de radiactividad a proteína en extractos.

En la Fig. 16 se presentan los datos de la cantidad de radiactividad captada por el tejido foliar. Puede observarse que en todos los casos la radiactividad captada por los tejidos del quinto estadio fue mayor que la captada por los del segundo estadio. En promedio las hojas del segundo estadio tomaron 19.95×10^6 cpm/g P.F.

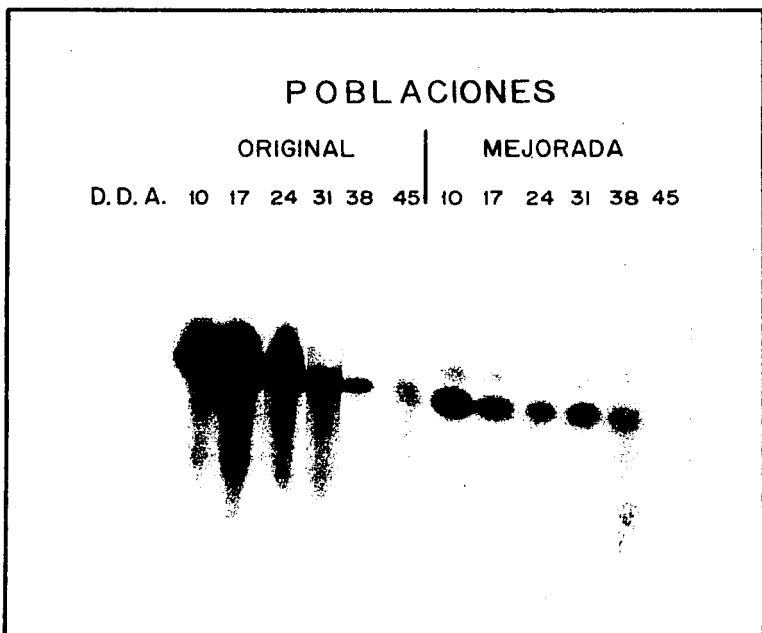


Figura 14. Autorradiografía de los mensajes de la subunidad grande de la RUBISCO en plantas adultas de las dos poblaciones de maíz estudiadas durante el llenado de grano. El RNA total de la hoja superior a la mazorca de plantas adultas de maíz colectadas a diferentes momentos durante el desarrollo de la mazorca fueron transferidos a una membrana de nylon e hibridados con la sonda radiactiva para la subunidad grande de la RUBISCO (*rbcL*). Los filtros fueron lavados y expuestos a una película fotográfica. D.D.A. días después de antesis.

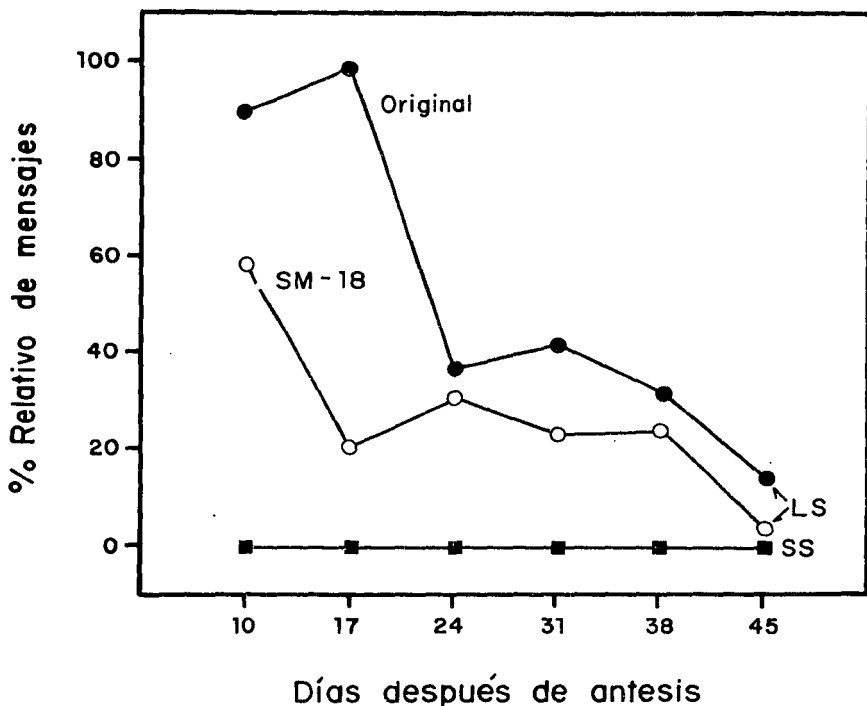


Figura 15. Contenido relativo de mensajes de las dos subunidades de la RUBISCO en plantas adultas de maíz durante el llenado de grano. RNA total de la hoja superior a la mazorca colectada semanalmente a partir de la floración masculina fue hibridado con las sondas de la subunidad grande y pequeña de la RUBISCO y las autorradiografías resultantes fueron analizadas densitométricamente. La mancha con mayor intensidad representa el 100% y las otras manchas se ajustan en relación a este valor. LS subunidad grande; SS subunidad pequeña; Original población original; SM-18 población mejorada. La curva SS corresponde a las dos poblaciones.

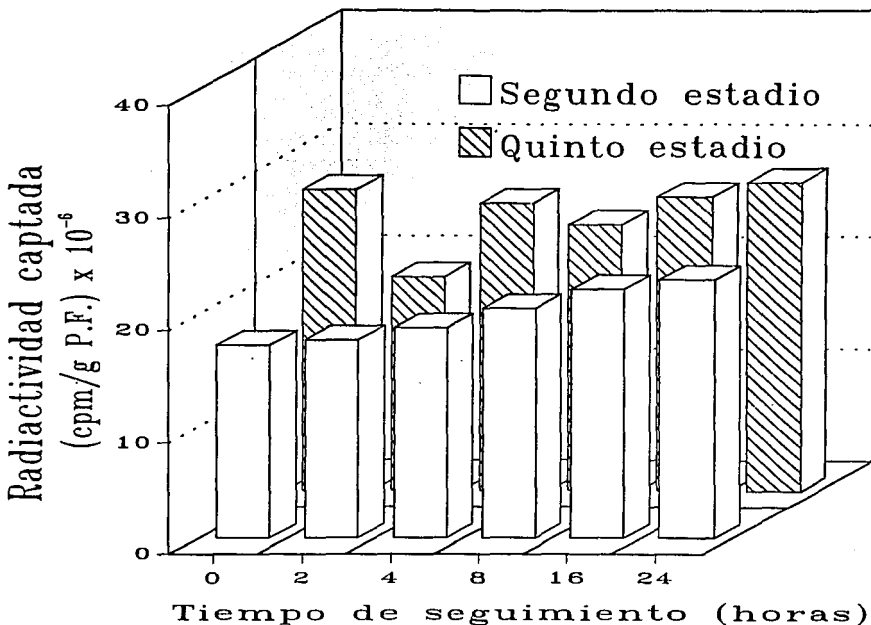


Figura 16. Radiactividad total captada en los tejidos. Segmentos de la segunda hoja del segundo y quinto estadios de plántulas de maíz fueron alimentados con metionina-³⁵S durante cuatro horas, después de lo cual se colocaron en una solución de metionina no radiactiva. Diferentes muestras de las hojas fueron tomadas a las 0, 2, 4, 8, 16 y 24 horas después del pulso y analizadas. Alicuotas de 5 μ l de extractos crudos de las hojas estudiadas fueron medidas en el contador de centelleo líquido con el fin de determinar la radiactividad presente en cada una de ellas. Los resultados son expresados como cuentas por minuto por gramo de peso fresco del tejido (cpm/g P.F.).

(cuentas por minuto por gramo de peso fresco) mientras que las hojas del quinto estadio tomaron 24.88×10^6 cpm/g P.F. Esta diferencia sin embargo, no repercute en la cantidad de radiactividad incorporada a materiales precipitables por TCA al 10%, pues existe una mayor incorporación de radiactividad a proteína en el segundo estadio que en el quinto (Fig. 17a). Esto es más claramente presentado al graficar eficiencia de incorporación en material precipitable expresada como porcentaje del total de radiactividad captada (Fig. 17b). El porcentaje de radiactividad total incorporada a producto precipitable varió entre un 60 y 34% para el segundo estadio y entre un 40 y 15% para el quinto estadio con promedios de 46% y 22% respectivamente. Estos resultados indican que a pesar de que la cantidad de metionina que penetró en los tejidos foliares del 5o. estadio fue mayor que la que penetró en los tejidos del 2o. estadio, la radiactividad incorporada en proteína fue mayor en el 2o. estadio, lo cual probablemente significa que la síntesis de proteínas es más activa en el estadio más joven.

En la Fig. 18 se presentan los contenidos de proteína soluble total en las hojas estudiadas. Se observa una tendencia a que la cantidad de proteína se incremente durante la incubación posterior a la administración de la metionina radiactiva, lo cual es sorprendente. Los promedios del contenido de proteína fueron 5.2705 mg/g P.F. \pm 1.3561 para el segundo estadio y 5.2871 mg/g P.F. \pm 1.4615 para el quinto estadio.

La Fig. 19 presenta la radiactividad específica de los tratamientos estudiados expresada con base en la cantidad de proteína soluble del tejido foliar. El tiempo 0 de seguimiento corresponde a la muestra tomada después de incubar el tejido durante cuatro horas con metionina radiactiva. En este punto puede observarse que la radiactividad específica en el segundo estadio es un poco más del doble de lo que existe en el quinto estadio. Esto indica que el estadio más joven incorporó más metionina radiactiva a sus proteínas. A partir del inicio del seguimiento, la radiactividad específica en el segundo estadio disminuyó, aunque a las 16 hrs se observó un ligero aumento. Los resultados del quinto estadio muestran que a las dos horas después del pulso de metionina radiactiva hubo un ligero incremento en la incorporación mientras que los siguientes muestreos la incorporación disminuyó manteniéndose baja hasta 24 horas después.

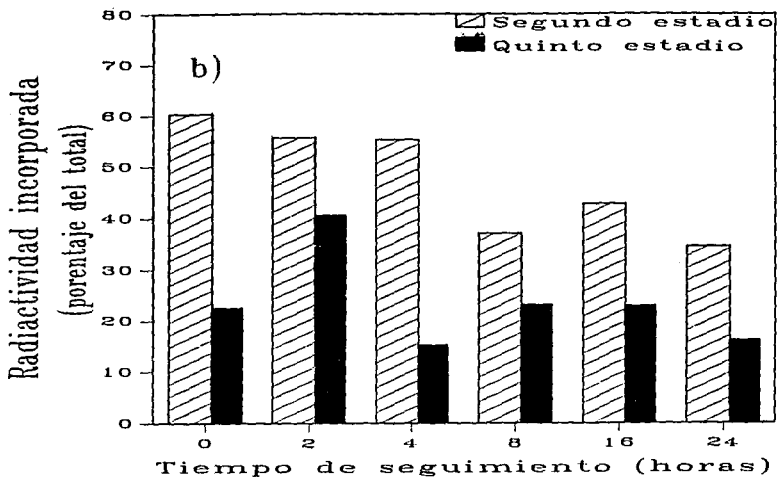
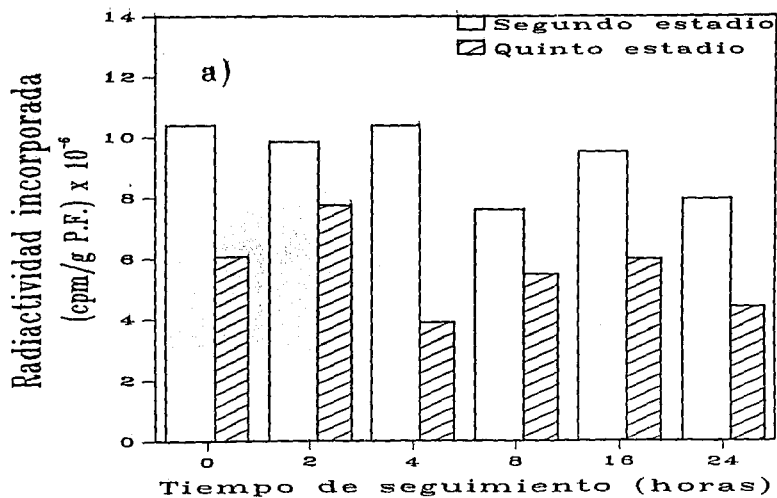


Figura 17. Radiactividad incorporada a material precipitable. Alícuotas de extractos crudos de la segunda hoja de plántulas de maíz alimentadas con metionina-³⁵S fueron precipitadas con TCA al 10 %. La radiactividad se presenta como a) cuentas por minuto por gramo de peso fresco (cpm/g P.F.) y b) porcentaje de la radiactividad total captada por los tejidos.

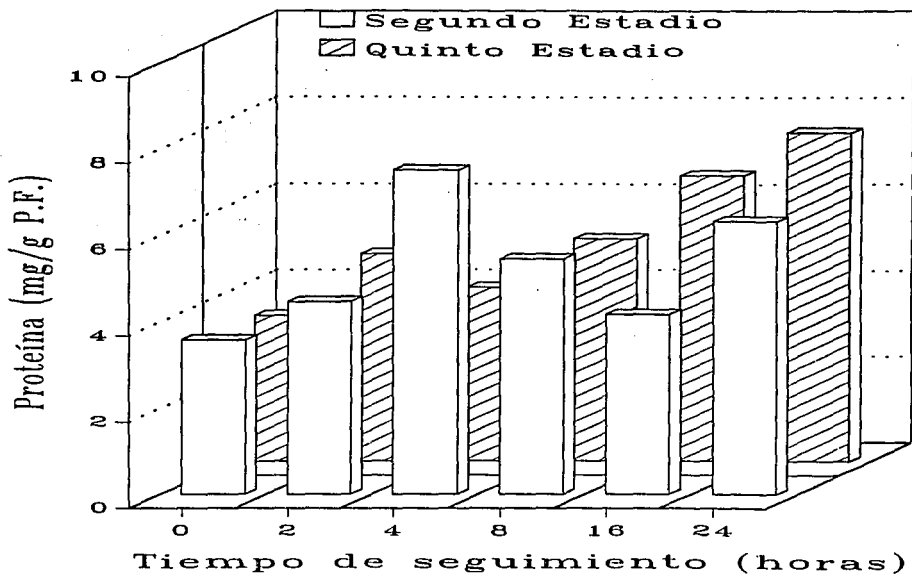


Figura 18. Proteína soluble total presente en la segunda hoja de plántulas de maíz. Las cantidades de proteína soluble presentes en la segunda hoja de plántulas de maíz del segundo y quinto estadio, durante los experimentos de pulso y seguimiento fueron determinadas por el método de Peterson (1977) en alícuotas de 20 μ l de extractos crudos centrifugados. Los resultados son presentados por gramo de peso fresco de tejido (g P.F.).

3.2. Análisis cualitativo de las electroforesis de RUBISCO.

En la Fig. 10 se mostró un gel típico de las electroforesis con las muestras problema de maíz obtenidas de la fracción que contenía la RUBISCO purificada por gradientes de sacarosa. En la descripción de la figura se hizo notar que aparecían más bandas de las correspondientes a las dos subunidades de la RUBISCO. En las Figs. 20a y 20b se presentan los perfiles densitométricos de los carriles de las electroforesis para

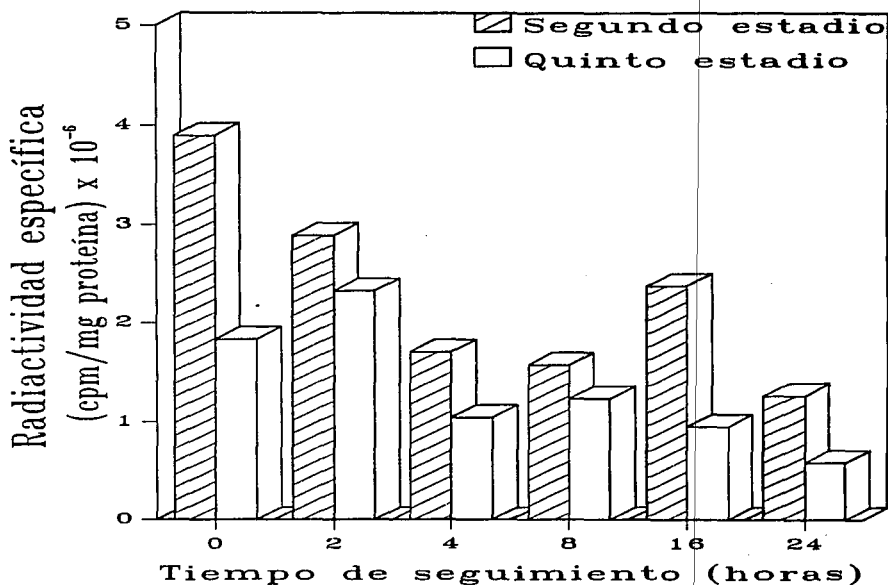
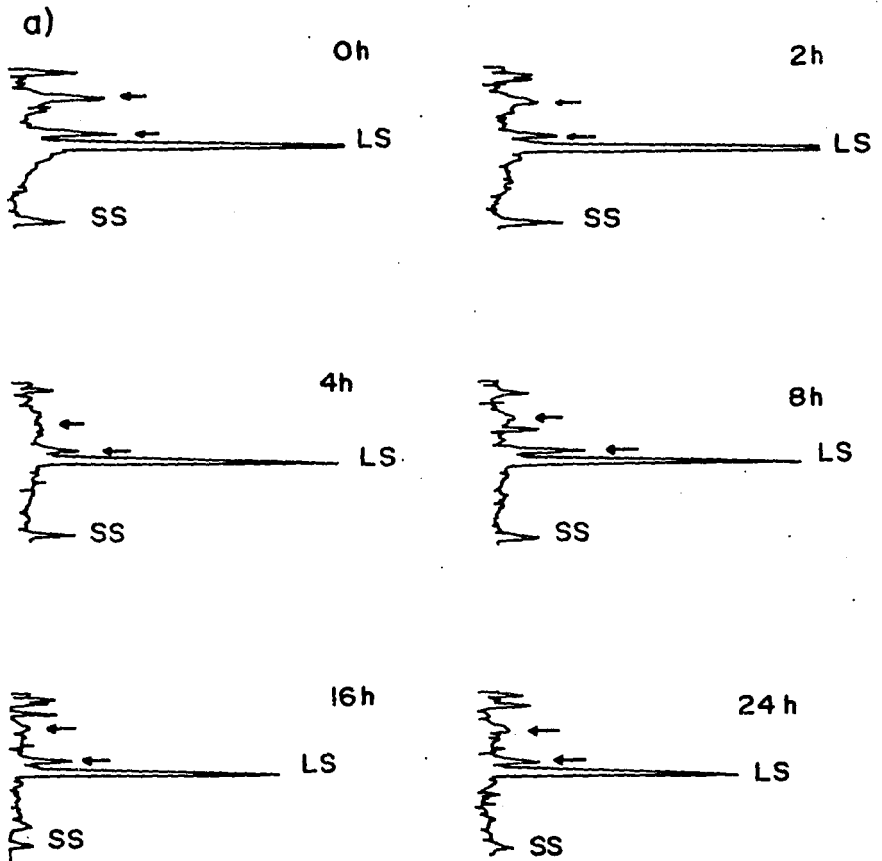


Figura 19. Radiactividad específica de los tratamientos estudiados. Las cantidades de radiactividad incorporadas a material precipitable por TCA al 10% fueron determinadas en los extractos crudos de la segunda hoja de plántulas de maíz del segundo y quinto estadios de desarrollo, en los experimentos de pulso y seguimiento. Los datos son presentados con base en la cantidad de proteína soluble en esos tejidos (cuentas por minuto por miligramo de proteína).

el segundo y quinto estadio respectivamente, en función de los diferentes tiempos de seguimiento. En cada uno de ellos puede observarse que poco después de iniciada la corrida densitométrica, se presenta un pico que corresponde a varias bandas localizadas aproximadamente entre los pesos moleculares de 140 y 180 kD (flecha superior); posteriormente, un poco antes de que apareciera la banda de la subunidad grande de la RUBISCO, se localizó otro pico bien definido con un peso molecular aproximado de entre 64 a 70 kD (flecha inferior). Estos picos se presentan en composición variable en los diferentes tiempos de seguimiento. Los picos de la subunidad grande de la RUBISCO (LS) aparecen entre 0.45 y 0.47 unidades de distancia en la densitometría y la subunidad pequeña (SS) se presenta entre 0.98 y 1.03, correspondiendo aproximadamente a los pesos moleculares descritos de 55 y 14 kD respectivamente (Fig. 20).

3.3. Identificación de RUBISCO por Western blot.

Al realizar el análisis por Western blot de las electroforesis con las muestras problema, se observaron bandas teñidas en los pesos moleculares de la subunidad chica y grande de la RUBISCO con lo cual se comprueba que esos polipéptidos sí corresponden a esa proteína. Sin embargo, las bandas de alto peso molecular (APM) que aparecían en las electroforesis aproximadamente entre 140 y 180 kD y las de mediano peso molecular (MPM) entre 65 y 70 kD también inmunorreaccionaron con el antisuero para la holoenzima completa (Fig. 21a). Al realizar un Western blot empleando antisuero en contra de la subunidad grande se observó que las bandas de alto y mediano peso molecular se teñían de igual manera que la banda correspondiente a la subunidad grande, (Fig. 21b). De esto se establece que las bandas de alto y mediano peso molecular contenían subunidades grandes. Desafortunadamente el no haber obtenido antisuero en contra de la subunidad pequeña impidió determinar si las bandas de alto y mediano peso molecular contenían ese polipéptido. Con estos resultados es posible sugerir que las bandas de alto y mediano peso molecular son conglomerados de subunidades grandes (aunque no se puede saber si en asociación con subunidades chicas) que no se separaron durante la electroforesis desnaturizante lo que apoya la posibilidad de la existencia de enlaces covalentes entre ellas.



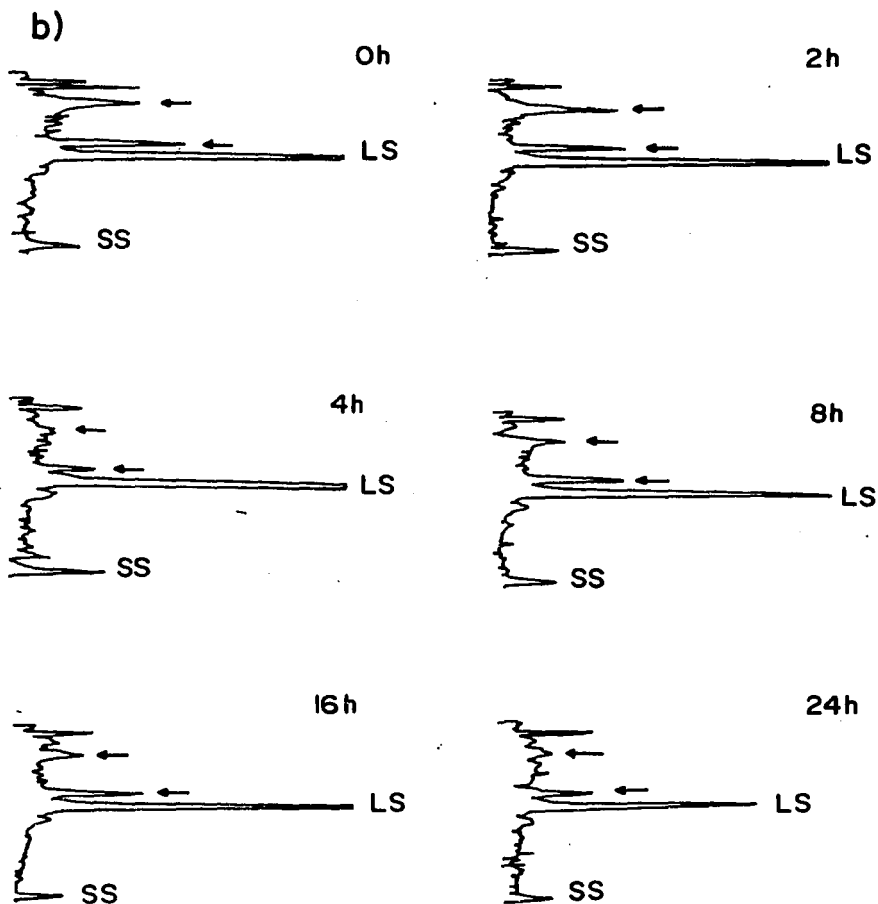


Figura 20. Perfiles densitométricos de los carriles con RUBISCO extraída de la segunda hoja de plántulas de maíz. Cada densitometría corresponde a uno de los tiempos en los que se tomó una muestra para analizarla durante el seguimiento. a) Perfiles densitométricos del segundo estadio. b) Perfiles densitométricos del quinto estadio. LS subunidad grande; SS subunidad pequeña; flecha superior bandas alto peso molecular; flecha inferior banda mediano peso molecular.

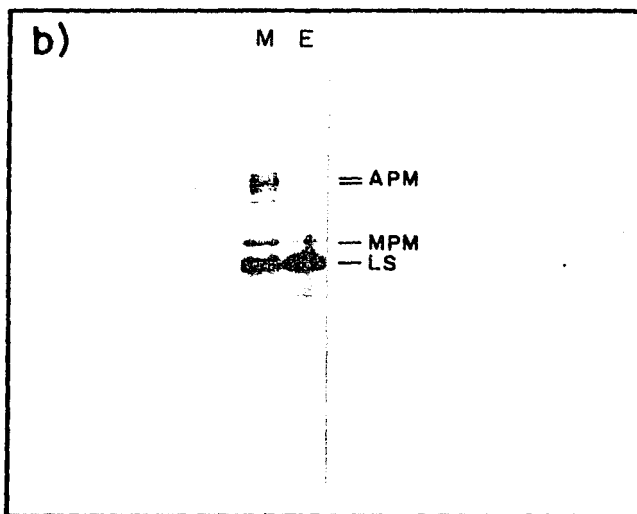
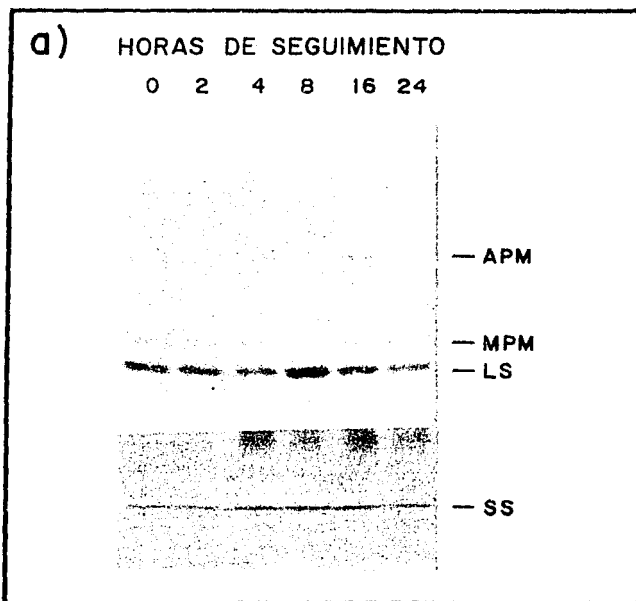


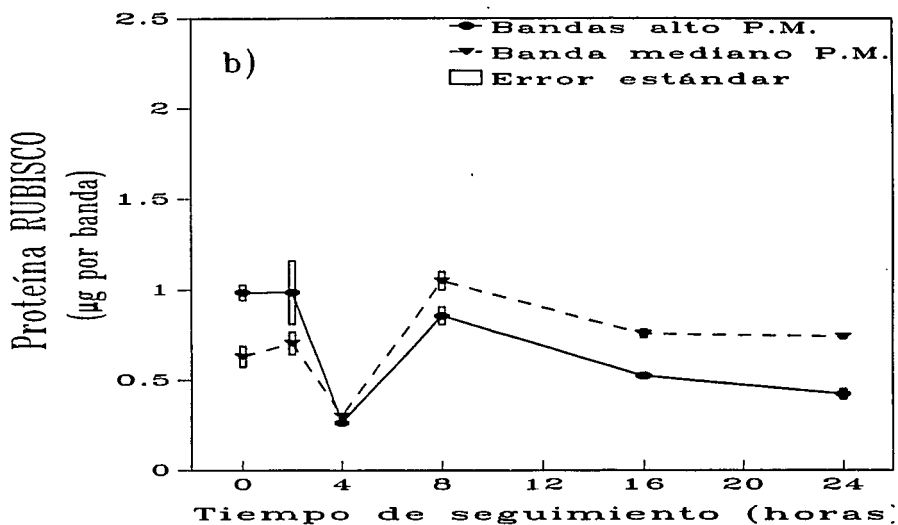
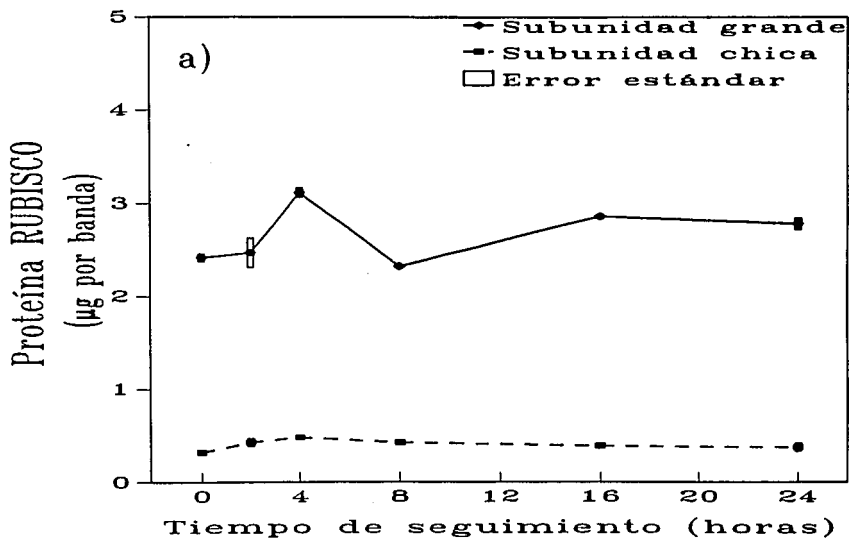
Figura 21. Western blots de extractos de la segunda hoja de plántulas de maíz. a) Experimento de pulso y seguimiento. Un filtro con alicuotas de la fracción que contenía RUBISCO del gradiente de sacarosa fue revelado con anticuerpos en contra de la holoenzima-RUBISCO. Para identificar la subunidad grande (parte superior del filtro) se empleó una dilución 1:1600 mientras que la subunidad pequeña (parte inferior del filtro) se empleó una dilución 1:100 del anticuerpo. El procedimiento para el revelado de los filtros está descrito en la sección 6.8 de Métodos. **b) Filtro conteniendo RUBISCO de maíz (M) y de espinaca (E)** revelados con anticuerpos en contra de la subunidad grande de la RUBISCO. En maíz las bandas de alto y mediano peso molecular también son reveladas con los anticuerpos en contra de la subunidad grande. APM bandas de alto peso molecular; MPM banda de mediano peso molecular; LS subunidad grande; SS subunidad pequeña.

En esa misma figura (21b) es posible observar que la región de bandas de alto peso molecular está constituido por varias banditas delgadas (2 ó 3) que no aparecen en el patrón obtenido de RUBISCO de espinaca. Esto sugiere que la estructura y/o la capacidad de interacción entre las subunidades de la RUBISCO de maíz es diferente a la RUBISCO de espinaca.

3.4. Cuantificación de proteína y radiactividad en las bandas electroforéticas correspondientes a las subunidades de la RUBISCO.

En la Fig. 22 se presentan las cantidades de proteína RUBISCO expresadas en microgramos por banda, en los estadios estudiados. En los geles cada carril fue cargado aproximadamente con la misma cantidad de proteína (ver métodos sección 5.6), después de lo cual se efectuó la corrida electroforética. Al finalizar la corrida, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y leídos por densitometría. Para obtener mayor exactitud en la cuantificación de la proteína correspondiente a cada subunidad y poder hacer comparaciones entre las muestras, los valores de área de las subunidades fueron corregidos con base en la cantidad de proteína presente en cada carril de la electroforesis, la cual fue determinada considerando el total de área del carril medida por densitometría. Este valor se comparó con los datos de la curva estándar correspondiente (Fig. 12), calculando de esa manera los microgramos de proteína por banda.

La Figura 22a presenta los resultados de las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO para el segundo estadio. En ella se observa que las cantidades de ambas subunidades aumentaron ligeramente después del



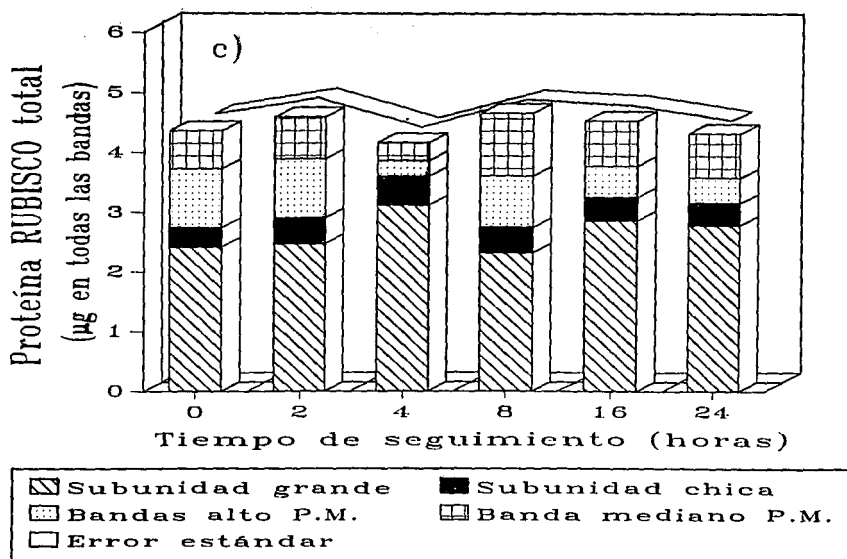
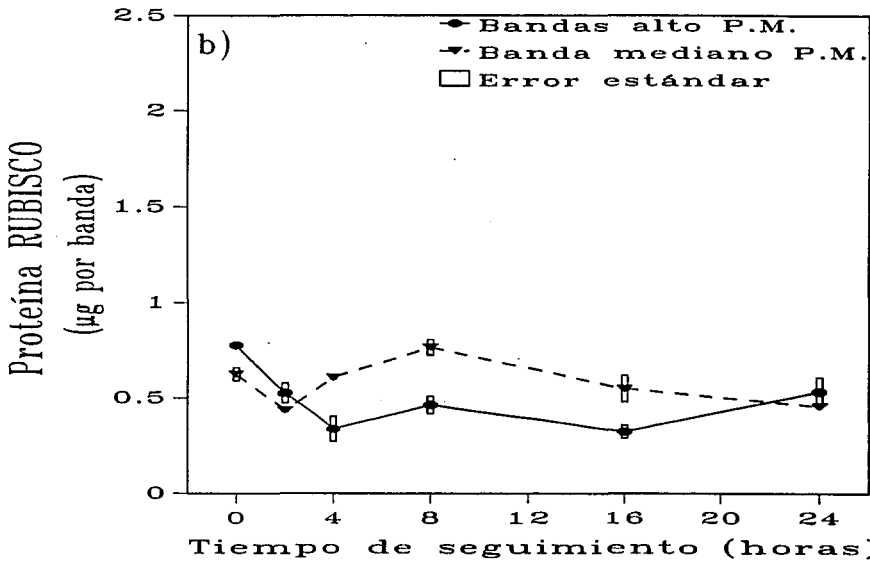
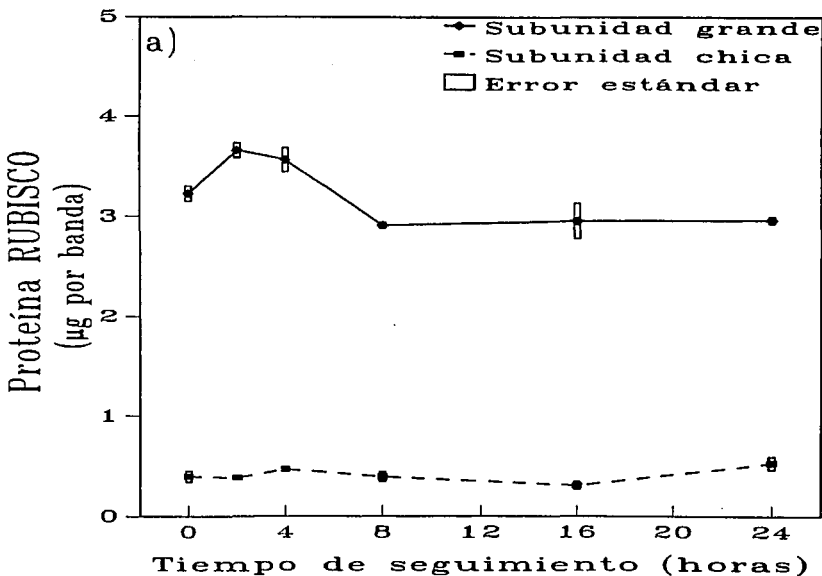


Figura 22. Cantidad de proteína RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz del segundo estadio de desarrollo. La cantidad de proteína fue estimada densitométricamente de acuerdo a lo descrito en la sección 5.7 de Métodos y Fig. 12, en las bandas teñidas con azul de Coomassie que fueron obtenidas al realizar una electroforesis desnaturalizante de las fracciones del gradiente de sacarosa que contenían el pico de RUBISCO, en cada uno de los tratamientos estudiados. a) Cantidad de proteína presente en las dos subunidades de la RUBISCO b) Cantidad de proteína presente en las bandas de alto y mediano peso molecular (P.M.) inmunoidentificadas como RUBISCO c) Suma de todas las bandas que contenían proteína RUBISCO. Las barras representan el error estándar.

pulso y luego permanecieron casi al mismo nivel. La Figura 22b muestra la cantidad de proteína presente en las bandas de alto y mediano peso molecular del segundo estadio. Se observa que a las cuatro horas de seguimiento la cantidad de proteína disminuye abruptamente en ambas bandas y aumenta nuevamente a las 8 horas de seguimiento para luego disminuir ligeramente. Aunque los cambios que sufren estas proteínas en el transcurso del seguimiento no parecen presentar una tendencia definida cuando se analizan independientemente, la suma de todas ellas se mantiene constante a través del estudio (Fig. 22c). Esto indica que la cantidad de RUBISCO no cambia durante 24 horas que duró el estudio. Estos resultados analizados en relación con lo observado en el Western blot indican que las subunidades de la RUBISCO no se separan únicamente en grande y pequeña sino que también permanecen unidas formando conglomerados que no se disgregan totalmente por acción del agente desnaturante (dodecil sulfato de sodio) presente en la electroforesis, lo cual implica la existencia de enlaces covalentes entre las subunidades.

En la Figura 23 se representan las cantidades de proteína en bandas del quinto estadio. La sección a) muestra las cantidades para las subunidades grande y chica y la sección b) para las otras bandas inmunoidentificadas como RUBISCO (bandas de alto y mediano peso molecular). En forma general, el comportamiento de estos pares de proteínas es recíproco. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el segundo estadio en donde la suma de estas cuatro bandas permanece constante a través del estudio, en el quinto estadio, a partir de las 8 horas de seguimiento la tendencia en el comportamiento de las bandas sumadas es a disminuir (Fig. 23c). Estos resultados parecen indicar que en el segundo estadio la velocidad de síntesis y de degradación de la RUBISCO están en equilibrio durante el tiempo que duró el experimento. En cambio parece ser que en el quinto estadio la velocidad de degradación es ligeramente mayor que la de síntesis (Figs. 22c y 23c).

Las cantidades calculadas de subunidad chica son semejantes en ambos estadios (Figs. 22a y 23a). En cambio, se observa una ligeramente mayor cantidad de subunidad grande en el quinto estadio que en el segundo. Sin embargo, ocurre lo contrario en el caso de las bandas de alto y mediano peso molecular (Figs. 22b y 23b), las cuales se observan en ligeramente mayor cantidad en el segundo estadio que en el quinto.



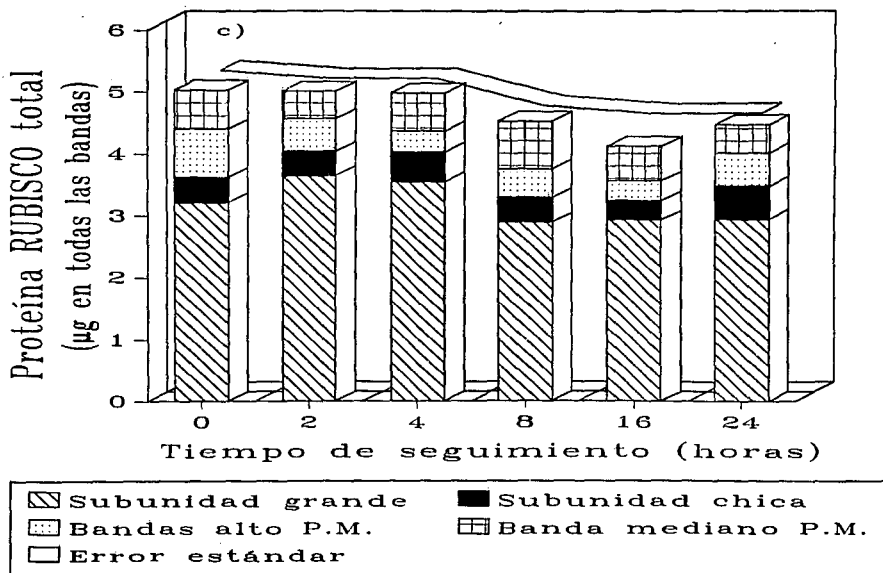
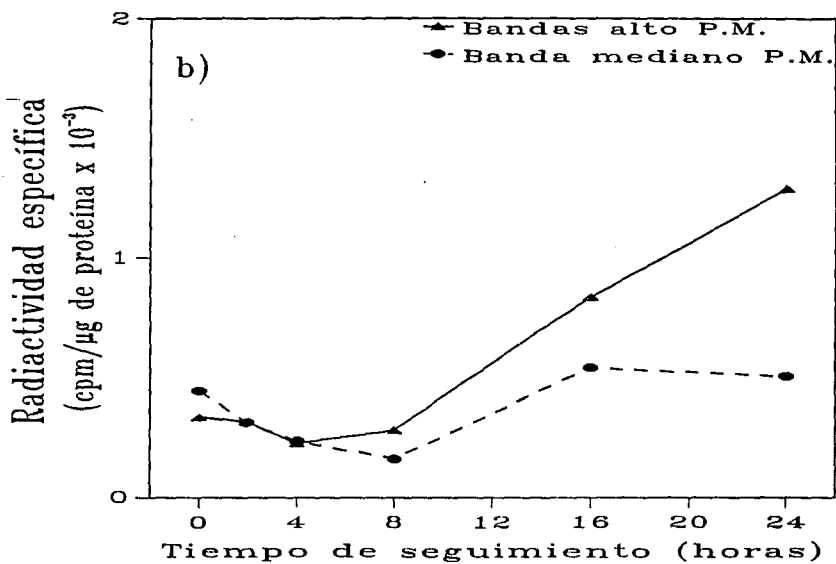
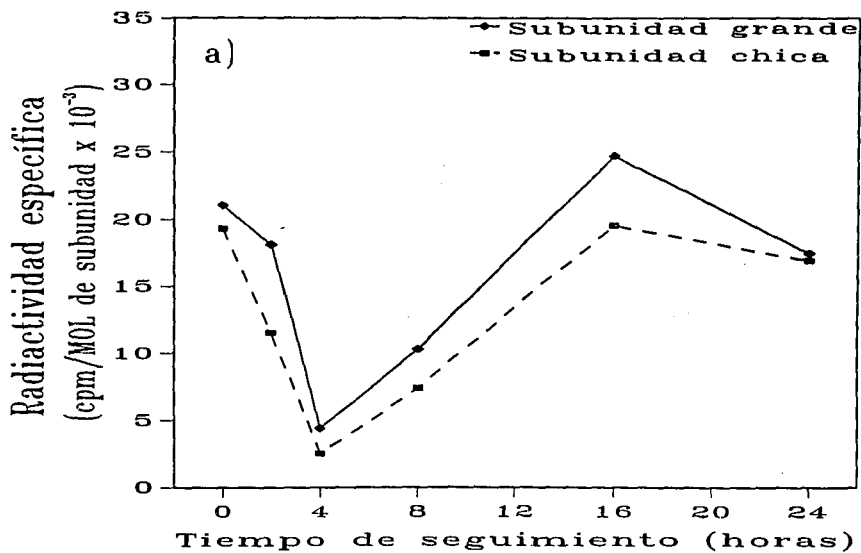


Figura 23. Cantidad de proteína RUBISCO en la segunda hoja de plántulas de maíz del quinto estado de desarrollo. La cantidad de proteína fue estimada densitométricamente de acuerdo a lo descrito en la sección 5.7 de Métodos y Fig. 12, en las bandas teñidas con azul de Coomassie que fueron obtenidas al realizar una electroforesis desnaturalizante de las fracciones del gradiente de sacarosa que contenían el pico de RUBISCO, en cada uno de los tratamientos estudiados. a) Cantidad de proteína presente en las dos subunidades de la RUBISCO b) Cantidad de proteína presente en las bandas de alto y mediano peso molecular (P.M.) inmunoidentificadas como RUBISCO c) Suma de todas las bandas que contenían proteína RUBISCO. Las barras representan el error estándar.

Esto podría significar que en el segundo estadio la subunidad grande se encuentra ligada entre sí más fuertemente que en el quinto estadio por lo que permanece en conglomerados durante la electroforesis. En cambio, en el quinto estadio estas subunidades se liberan más fácilmente por lo que hay mayor cantidad de proteína en la banda correspondiente a la subunidad grande.

Al medir las cantidades de subunidad grande y pequeña de la RUBISCO en cada una de las muestras y calcular su relación, se observa que no concuerda con la que se esperaría a partir de los pesos moleculares de las subunidades. La relación esperada se encuentra entre 2.9 y 4.3, considerando que la subunidad grande tiene un peso molecular de 52 kD y la pequeña un peso entre 12 y 18 kD. Una posible explicación a esta discordancia se encuentra en el hecho de que la medición realizada por densitometría estima la intensidad de la coloración de las bandas de proteína teñidas con Coomassie. Este colorante se asocia a los aminoácidos aromáticos tiñendo las proteínas de un color azul, por lo que dependiendo de la cantidad de aminoácidos aromáticos la tinción será más o menos fuerte. Analizando la cantidad de aminoácidos aromáticos que contienen las dos subunidades de RUBISCO en chícharo, se observa que existe una relación de 2.42 entre subunidad grande y chica (Kobayashi y Akazawa, 1982). Si el área de la subunidad chica en las muestras problema es multiplicada por este factor y la relación subunidad grande/subunidad chica es recalculada, los nuevos datos se encuentran en el nivel esperado.

En la Fig. 24a se presentan la radiactividad específica en proteína RUBISCO de las subunidades expresados en radiactividad incorporada por mol de subunidad encontrada en el segundo estadio y corregidos por la cantidad de aminoácidos aromáticos y metioninas por subunidad. En esta figura se puede observar que sí hubo incorporación de radiactividad en ambas subunidades de la RUBISCO durante el pulso. En lo que respecta al seguimiento se observa que la radiactividad en la proteína empieza a decaer en el momento en que termina el pulso hasta 4 horas después, para luego aumentar y llegar a su máximo a las 16 hrs y volver a disminuir ligeramente a las 24 hrs, observándose además que estos cambios están coordinados entre las subunidades. La Fig. 24b muestra la radiactividad por proteína en las bandas inmunoidentificadas como RUBISCO del segundo estadio. En ella se observa un aumento hacia el



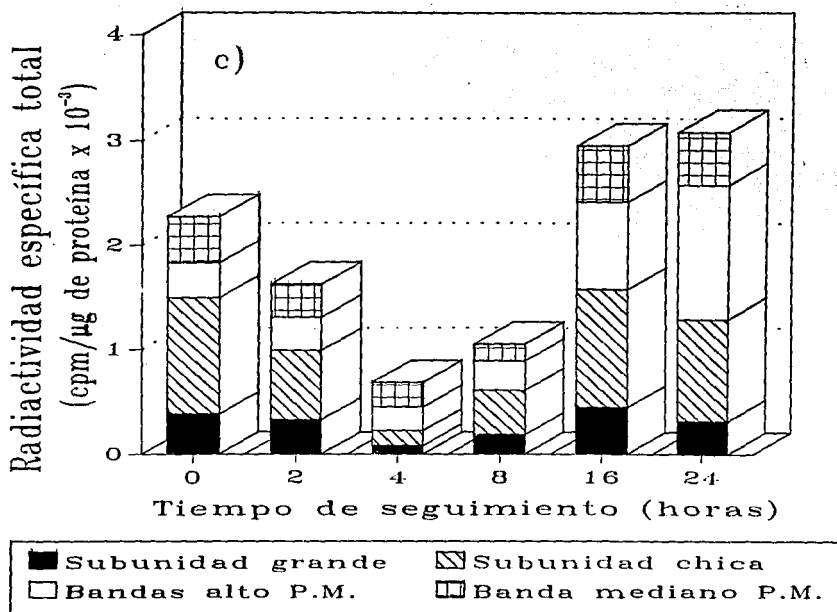


Figura 24. Radiactividad específica de la RUBISCO en la segunda hoja del segundo estadio de desarrollo de plántulas de maíz encontrada en los experimentos de pulso y seguimiento. La radiactividad presente en los polipéptidos correspondientes a la RUBISCO separados en los geles desnaturalizantes fue medida cortando las bandas de poliacrilamida y digiriéndolas con peróxido de hidrógeno de acuerdo a lo descrito en la sección 5.8 de Métodos. a) Radiactividad en las bandas correspondientes a las subunidades de RUBISCO (grande y pequeña). b) Radiactividad en las bandas inmunoidentificadas como RUBISCO (bandas de alto y mediano peso molecular) c) Suma de la radiactividad en todas las bandas que mostraron reacción inmunológica con anticuerpos contra RUBISCO. Los valores de cuentas por minuto (cpm) son expresados con base en a) Moles de subunidad (Mol) b) y c) microgramos de proteína (μg). Todos los datos fueron normalizados por la eficiencia de incorporación de metionina-³⁵S de cada muestra y por la cantidad total de proteína puesta en cada carril de la electroforesis, determinada por densitometría. En los datos presentados en la sección a) se consideró el número de metioninas y aminoácidos aromáticos presentes en las subunidades de la RUBISCO.

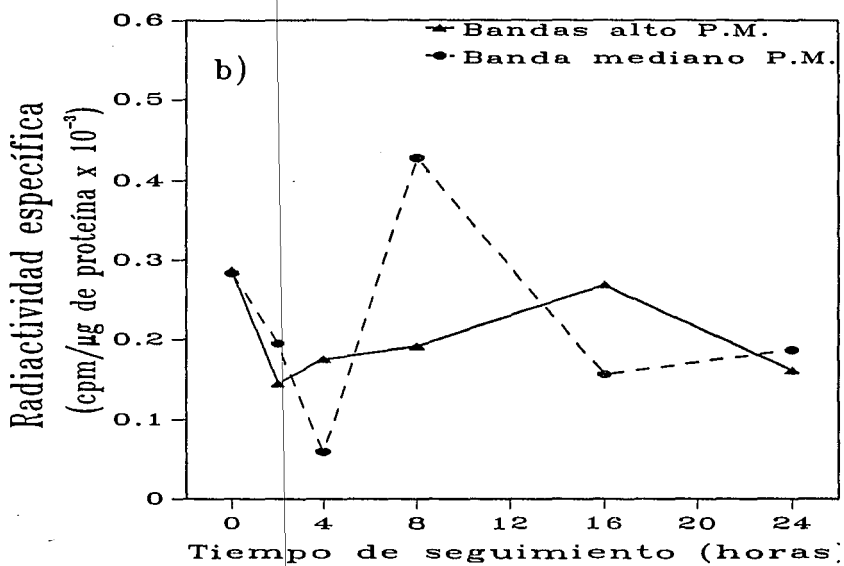
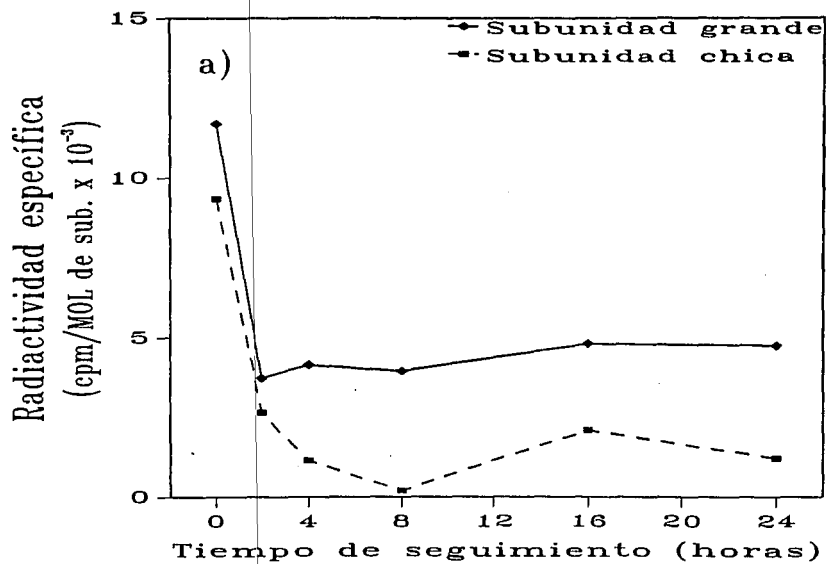
final del seguimiento. La Fig. 24c presenta la suma de la radiactividad incorporada a proteína RUBISCO en todas las bandas que inmunoreaccionaron con el antisuero contra la RUBISCO, en ella se observa que los niveles de radiactividad específica presentados en las subunidades no son debidos a una mayor incorporación de radiactividad en las bandas de alto y mediano peso molecular, en detrimento de lo encontrado en las subunidades.

La incorporación de radiactividad a las subunidades de RUBISCO en el quinto estadio expresadas como cpm/mol de subunidad y corregido por contenido de aminoácidos aromáticos y metioninas por subunidad (Kobayashi y Akazawa, 1982), se presenta en la Fig. 25a. Al inicio del seguimiento la radiactividad específica es alta y luego decrece abruptamente dos horas después y se mantiene en niveles bajos. También en este estadio se observa coordinación entre las dos subunidades. La Fig. 25b muestra la radiactividad en las bandas de alto y mediano peso molecular que reaccionan con anticuerpos de RUBISCO. Estas bandas presentan una tendencia de aumentar ligeramente a través del estudio. La suma de la radiactividad específica de todas las bandas se presenta en la figura 25c en ella puede observarse un comportamiento como el descrito anteriormente para las subunidades.

Al comparar la suma de la incorporación de radiactividad a proteína RUBISCO en todas las bandas en los estadios estudiados (Fig 26), se observa que en el segundo estadio existe mayor incorporación que en el quinto durante todo el tiempo de seguimiento. En ambos estadios durante las primeras cuatro horas de seguimiento se observó una caída en la velocidad de incorporación de metionina debida a la dilución de la poza causada por la adición de la metionina fría (200 veces más que la radiactiva). Después de esas cuatro horas se observa una gran diferencia en el comportamiento de los dos estadios. Mientras que en el segundo estadio la velocidad de recambio aumenta hasta sobrepasar la cantidad inicial a las 16 horas, en el quinto estadio la incorporación se mantiene constante a un nivel bajo. Estos resultados indican que existen diferencias en los sistemas de control de síntesis y degradación de RUBISCO entre los estadios estudiados.

A partir de estos resultados se pueden señalar los siguientes puntos importantes:

1. Hubo mayor captación de metionina radiactiva por peso fresco en las



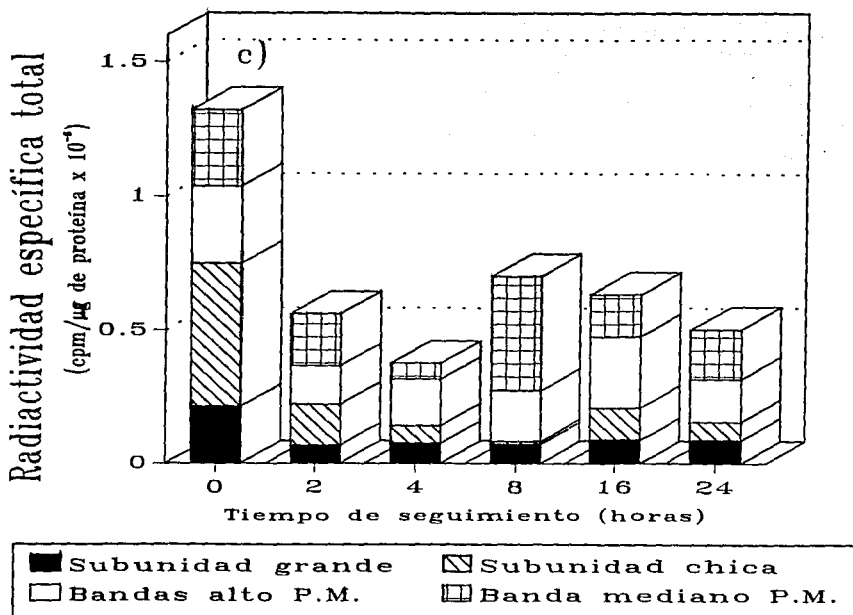


Figura 25. Radiactividad específica de la RUBISCO en la segunda hoja del quinto estadio de desarrollo de plántulas de maíz encontrada en los experimentos de pulso y seguimiento. La radiactividad presente en los polipéptidos correspondientes a la RUBISCO separados en los geles desnaturizantes fue medida cortando las bandas de poliacrilamida y digiriéndolas con peróxido de hidrógeno de acuerdo a lo descrito en la sección 5.8 de Métodos. a) Radiactividad en las bandas correspondientes a las subunidades de RUBISCO (grande y pequeña). b) Radiactividad en las bandas inmunoidentificadas como RUBISCO (bandas de alto y mediano peso molecular) c) Suma de la radiactividad en todas las bandas que mostraron reacción inmunológica con anticuerpos contra RUBISCO. Los valores de cuentas por minuto (cpm) son expresados con base en a) Moles de subunidad (Mol) b) y c) microgramos de proteína (μg). Todos los datos fueron normalizados por la eficiencia de incorporación de metionina- ^{35}S de cada muestra y por la cantidad total de proteína puesta en cada carril de la electroforesis, determinada por densitometría. En los datos presentados en la sección a) se consideró el número de metioninas y aminoácidos aromáticos presentes en las subunidades de la RUBISCO.

▨ Segundo estadio ■ Quinto estadio

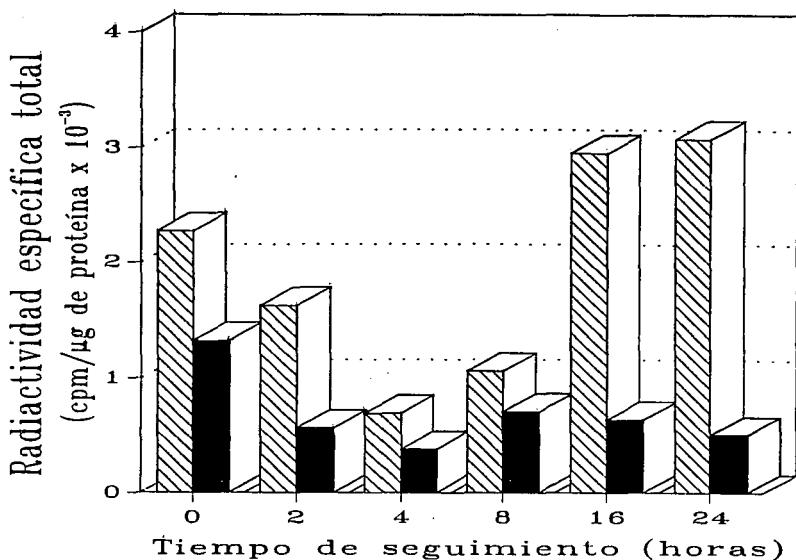


Figura 26. Radiactividad específica de todas las bandas que contenían RUBISCO en la segunda hoja del segundo y quinto estadio de plántulas de maíz durante los experimentos de pulso y seguimiento. Las bandas del gel de poliácridamida correspondientes a las que fueron detectadas como reaccionantes con el anticuerpo en contra de la holoenzima RUBISCO fueron digeridas para determinar su radiactividad. Los valores están expresados como cuentas por minuto por microgramo de proteína en las bandas.

- hojas del quinto estadio que en las del segundo. Manteniéndose niveles semejantes a través del estudio (24 h).
2. A pesar de lo anterior, hubo más incorporación de radiactividad a producto precipitable por TCA al 10%, en el segundo estadio que en el quinto, lo cual indica mayor síntesis protéica en el estadio más joven. Se observa además que en ambos estadios este parámetro presenta una ligera tendencia a disminuir durante el seguimiento.
 3. La cantidad de proteína por peso fresco es semejante en ambos estadios y presenta una tendencia a aumentar en el transcurso del experimento.
 4. La radiactividad incorporada en la proteína soluble total tiende a disminuir a lo largo del experimento. Sin embargo, el segundo estadio a las 16 horas de seguimiento, presenta un incremento considerable. Durante todo el experimento se observa mayor radiactividad incorporada a proteína soluble total en el segundo estadio.
 5. Por Western blot se identificó que la holoenzima RUBISCO no se separó en la electroforesis desnaturalizante únicamente en subunidades grande y pequeña, sino que formó dos grupos de conglomerados de pesos moleculares altos (65-70 y 140-180 kD aproximadamente). Fue posible además determinar que en ambos conglomerados existía subunidad grande.
 6. La suma de la cantidad de proteína encontrada en las subunidades de RUBISCO y los conglomerados durante el experimento (24 hrs.) muestran tendencias distintas en los estadios estudiados. En el segundo estadio la tendencia es a mantenerse constante o a aumentar ligeramente; en cambio en el quinto estadio, la tendencia es a disminuir.
 7. Sí hubo incorporación de metionina radiactiva durante el tiempo de pulso en los dos estadios estudiados y en las dos subunidades de la RUBISCO. Sin embargo, la cantidad incorporada fue menor en el quinto estadio que en el segundo lo cual es un indicio de mayor capacidad de síntesis de proteínas en el segundo estadio.
 8. La forma en que la metionina radiactiva fue desplazada por metionina fría en las subunidades de la RUBISCO ocurrió de manera diferente entre los dos estadios, pero siguió un patrón semejante en las subunidades de un mismo estadio.

9. El segundo estadio presentó un incremento en la radiactividad específica de las subunidades de la RUBISCO después de cuatro horas de seguimiento lo cual no se presentó en el quinto estadio.

3.5. Resultados de las autorradiografías.

La Fig. 27 muestra los resultados de las fluorografías de los geles de poliacrilamida realizadas con muestras de extractos de plántulas. Cada carril contiene cantidades iguales de concentrados de las fracciones de los gradientes de sacarosa que mostraban el pico de la RUBISCO de cada tratamiento. La sección a) muestra los resultados del segundo estadio y la sección b) los del quinto estadio. En el análisis del segundo estadio puede verse claramente que aparecen además de las dos bandas correspondientes a las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO, otras cuatro bandas radiactivas. Dos de ellas corresponden a las bandas de alto y mediano peso molecular que se observan en los geles teñidos con Coomassie y que inmunorreaccionan con los anticuerpos para RUBISCO. Las otras dos son una de mayor peso molecular que la banda de mediano peso molecular y otra de menor peso que la subunidad grande de la RUBISCO, las cuales se observan muy tenuemente en los geles y no fueron identificadas como RUBISCO ni por los anticuerpos en contra de la holoenzima ni en contra de la subunidad grande. En el quinto estadio también se observan estas bandas aunque en menor cantidad.

La intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO en las fluorografías son muy semejantes a los valores obtenidos por cuantificación de las bandas en los geles de poliacrilamida en ambos estadios (Figs. 24 y 25), por lo que se considera como apoyo a lo descrito previamente.

Asimismo, las manchas correspondientes a la subunidad chica en el tiempo 0 de la fluorografía del quinto estadio son prueba de que sí hubo incorporación de metionina radioactiva en esa subunidad durante ese estadio, aunque en menor proporción que la que se observó en el segundo estadio.

Todos los análisis experimentales fueron realizados por segunda vez empleando los mismos extractos radiactivos. Los resultados encontrados fueron muy semejantes.

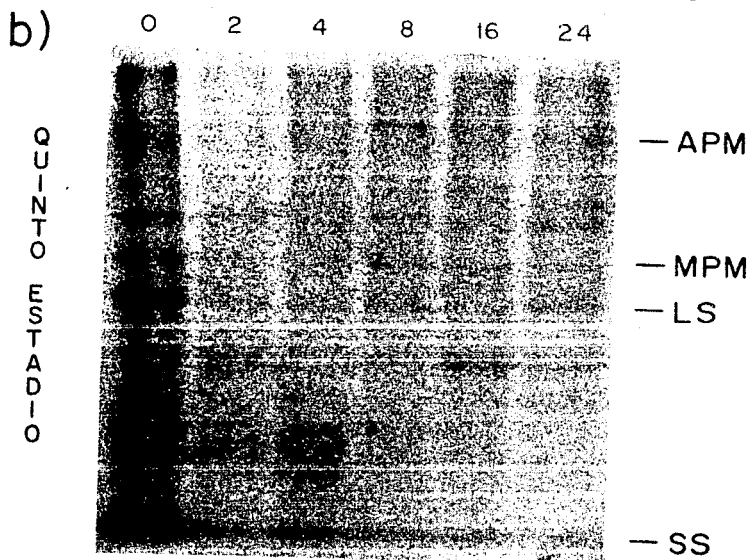
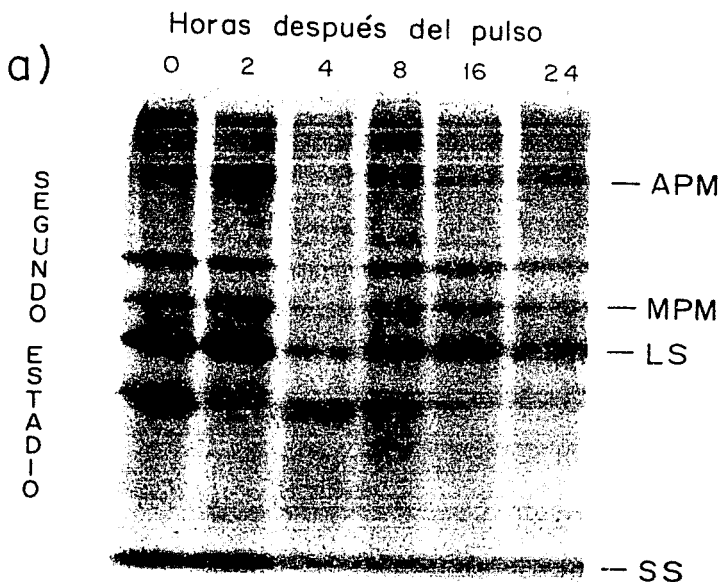


Figura 27. Fluorografías de los geles que contenían a la RUBISCO en el segundo y quinto estadios de desarrollo de plántulas de maíz en los experimentos de pulso y seguimiento. Los geles con las muestras tomadas durante el seguimiento fueron secados y tratados con reactivos fluorescentes y puestos en contacto con películas fotográficas. Cada carril presenta las muestras correspondientes a las horas de seguimiento analizadas. a) Segundo estadio. b) Quinto estadio. APM bandas alto peso molecular; MPM banda mediano peso molecular; LS subunidad grande; SS subunidad pequeña.

4. Resultados de los experimentos de pulso y seguimiento en adultas.

4.1. Experimento I.

El experimento I fue diseñado como una primera aproximación en el de la síntesis y degradación de la RUBISCO de plantas adultas. Se empleó una planta de maíz que se encontraba en floración. Los resultados mostrados en la Fig. 28 presentan la incorporación a holoenzima RUBISCO y a una banda de proteína usada como control. En esta figura puede observarse que sí hubo incorporación de metionina radiactiva después del pulso en la banda de RUBISCO, aunque la cantidad es menor que para la banda control. Así, también puede observarse que a las 4 horas de seguimiento hay un aumento en la incorporación de metionina radiactiva y posteriormente la tendencia es a decrecer hasta las 24 horas de seguimiento. Se observa que tanto la pendiente de aumento como la de pérdida de radiactividad es más lenta en la RUBISCO que en la proteína control, lo que señala velocidades de incorporación de metionina radiactiva diferentes entre ellas: la de la RUBISCO es menor que la de la otra proteína.

4.2. Experimento II.

En este experimento se compararon extractos de plantas adultas en etapa de floración y en estado avanzado de llenado de grano, tratados como se describe en la sección 7.5 de Materiales y Métodos. El gel fue cargado con cantidades iguales de radiactividad para lo cual los carriles con extractos de hojas más viejas fueron cargados con mayor cantidad de muestra (8 a 10 veces más).

En la Fig. 29a, se presenta la fluorografía resultante del experimento descrito anteriormente; los tres primeros carriles corresponden a extractos de plantas jóvenes a las 0, 4, y 12 horas de

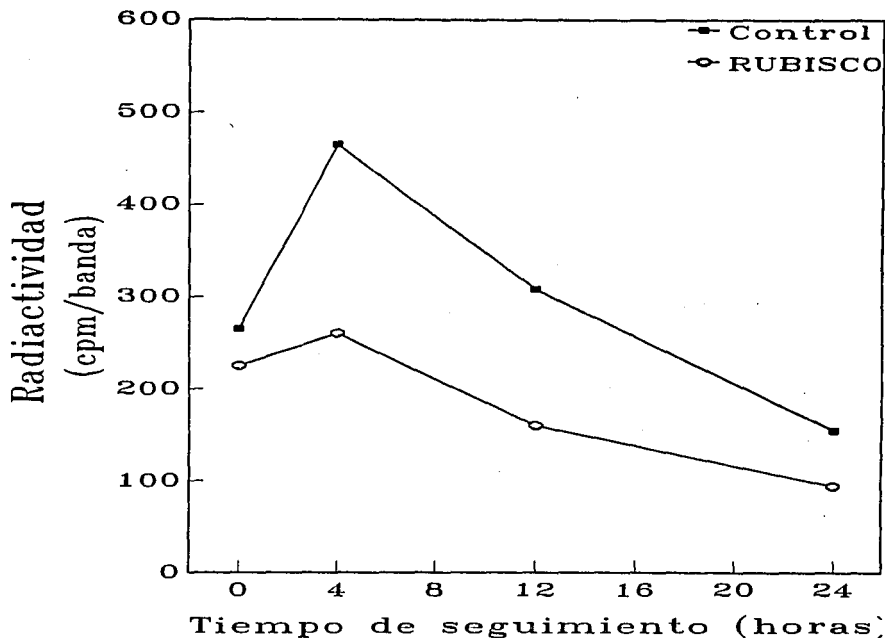


Figura 28. Radiactividad en holoenzima RUBISCO encontrada en plantas adultas. Segmentos de la hoja superior a la mazorca de plantas adultas de maíz de la población mejorada (SM-18) fueron tomadas al momento de la floración y alimentadas con metionina-³⁵S durante cuatro horas y pasadas posteriormente a una solución de metionina no radiactiva. A partir de ese momento se tomaron muestras a las 0, 4, 12 y 24 horas después del pulso. Alicuotas de los extractos de esas muestras con las mismas cantidades de proteína fueron cargados y corridos en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes y la banda correspondiente a la holoenzima-RUBISCO fue seccionada y digerida con peróxido de hidrógeno para determinar la radiactividad presente.

seguimiento y los siguientes cinco, a planta de edad más avanzada a las 0 (los dos primeros carriles), 5, 12 y 26 horas de seguimiento. En ellos puede observarse que, a pesar de que fueron cargados con la misma cantidad de radiactividad, la distribución de ésta entre las bandas fue diferente. La planta joven presenta mayor cantidad en la banda de la subunidad chica, mientras que la planta vieja presenta esta banda en menor intensidad. Para el caso de la subunidad grande se observa lo contrario. En la figura 29b se presenta la electroforesis desnaturalizante tratada para producir la fluorografía. En ella es posible mostrar que la cantidad de proteína empleada para cargar los geles fue mayor en todos los tratamientos de hojas viejas mientras que para las hojas jóvenes la proteína en las bandas apenas se observó. Esta es una indicación de que hubo menor incorporación de metionina radiactiva a la RUBISCO en hojas de edad avanzada que en hojas jóvenes, lo cual es a su vez resultado de una menor síntesis de esta enzima.

En esta misma figura es posible observar, al compararla con las fluorografías de estadios más jóvenes (Fig 27), que a pesar de que la proteína fue preparada de la misma manera de extractos de hojas de plántulas que de hojas adultas, las bandas marcadas radiactivamente en la preparación de plantas adultas no son todas las mismas. En el caso de adultas sólo se presenta una banda de peso molecular menor a la subunidad grande. En cambio en plántulas se presentaban diferentes bandas. Esto señala que existe diferencia en el tipo de asociación entre subunidades o estructura de la RUBISCO en los diferentes estadios o que la estabilidad de la proteína es diferente y se degrada en forma distinta.

De estos estudios puede concluirse que sí existe síntesis de subunidad chica de RUBISCO en plantas adultas tanto en floración como en plantas con 45 días después de anthesis masculina. Sin embargo, parece ser que las velocidades de síntesis son diferentes en ambos estadios, siendo mayor en el estadio más joven.

En el caso del seguimiento, en las hojas tomadas en el momento de floración es posible observar una captación de radiactividad posterior a la administración de la metionina fría (Fig. 30), igual que ocurrió en plántulas en el segundo estadio de desarrollo. En el caso de la hoja vieja no se observó esa reincorporación posterior al enfriamiento de la poza, lo cual asemeja lo observado en plántulas en el quinto estadio en

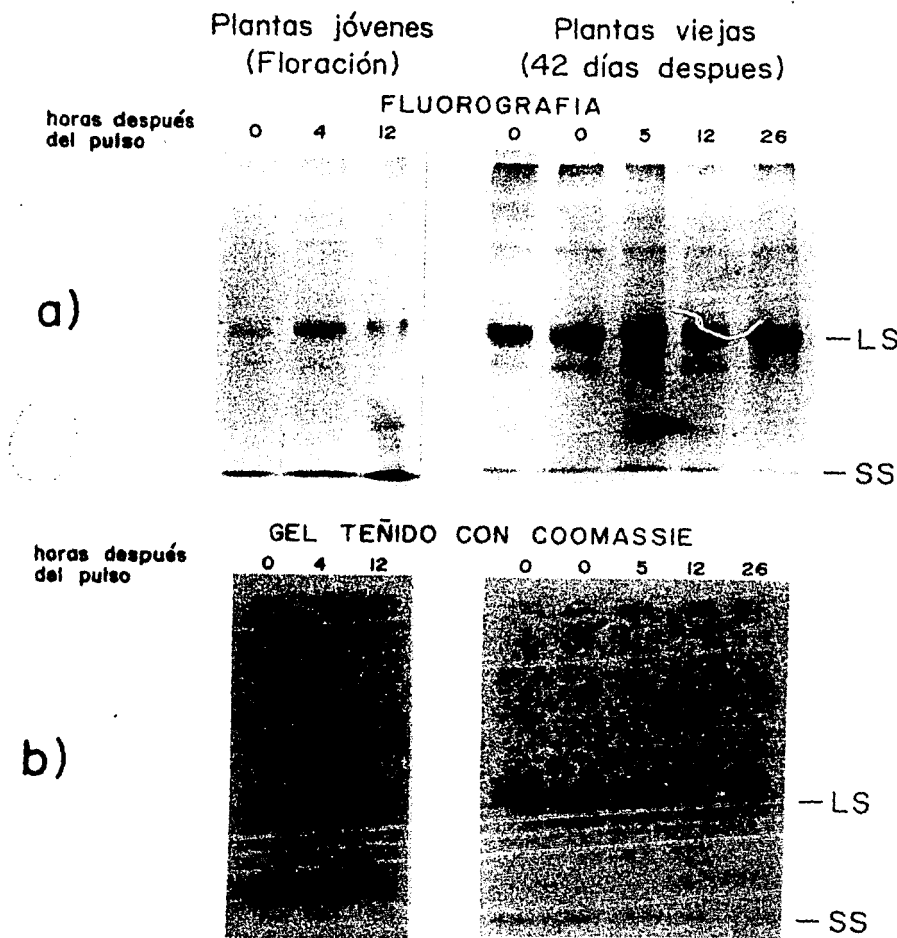


Figura 29. Fluorografías de los geles que contenían a la RUBISCO en plantas adultas jóvenes y viejas. Extractos de la hoja superior a la mazorca de plantas adultas durante la floración y 42 días después fueron preparados de acuerdo a lo descrito en la sección 7.5 de métodos a partir de tejido alimentado con metionina-³⁵S durante 4 horas y tomando muestras en los tiempos señalados en horas de seguimiento. a) Fluorografía. b) Gel teñido con Coomassie. LS subunidad grande, SS subunidad pequeña.

donde la velocidad de síntesis de proteínas disminuyó en relación a la observada en el segundo estadio.

5. Corolario.

Un resumen de los mecanismos de regulación de la actividad de la RUBISCO que están funcionando en hojas de maíz es el siguiente:

1. Durante el desarrollo de la segunda hoja de plántulas de maíz, la regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO ocurre a diferentes niveles:
 - a. Al inicio de la emergencia de la hoja, la regulación es a nivel transcripcional, con aumento de proteína RUBISCO y de actividad enzimática paralelos al aumento en las cantidades de mensajes de las subunidades.
 - b. Poco antes de que la hoja alcance su máxima expansión los mensajes y la velocidad de acumulación de la RUBISCO también disminuye, aunque no con la misma velocidad y sin disminución neta de la proteína, lo que señala la posibilidad de que un control de la expresión de los genes de la RUBISCO a nivel post-transcripcional entre en juego.
 - c. Después de que la hoja alcanza su máxima expansión, los mensajes de la subunidad chica desaparecen casi totalmente y los de la subunidad grande siguen disminuyendo, la velocidad de síntesis de las subunidades disminuye un 50% en relación al momento en que se encuentra en máximo crecimiento y la cantidad de proteína RUBISCO se mantiene constante; en este período podría señalarse que la regulación ocurre a nivel post-traduccional.
2. En el caso de la regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO en la hoja superior a la mazorca en plantas adultas durante el período de llenado de grano, puede concluirse lo siguiente:
 - a. Existe una falta de coordinación notable entre los RNAs mensajeros de las dos subunidades de RUBISCO: el de la subunidad grande es claramente observable mientras que el de la subunidad pequeña se detecta en muy escasas cantidades.
 - b. La cantidad de proteína RUBISCO disminuye a lo largo del estudio reflejando la disminución en el RNA mensajero de la subunidad grande.
 - c. La actividad de RUBISCO muestra regulación a nivel de la enzima

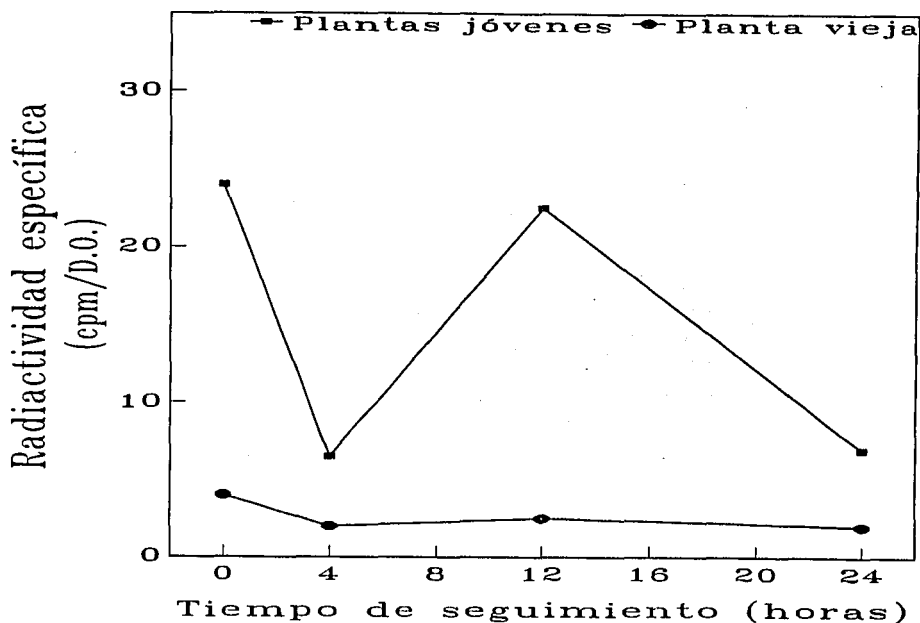


Figura 30. Radiactividad específica de la holoenzima RUBISCO encontrada en plantas adultas jóvenes y viejas. Segmentos de la hoja superior a la mazorca en plantas adultas fueron alimentadas con ^{35}S -metionina durante cuatro horas y muestras fueron tomadas a las 4, 12 y 24 horas después del pulso. Extractos de esas muestras fueron pasados por un gradiente de sacarosa para obtener la RUBISCO y corridas en geles nativos de poliacrilamida. La radiactividad presente en las bandas correspondientes a la holoenzima RUBISCO fue determinada digiriendo dichas bandas con peróxido de hidrógeno de acuerdo a lo descrito en la sección 5.8 de métodos y expresada por densidades ópticas de proteína determinadas a 280 nm. Se grafican los datos para dos hojas jóvenes tomadas durante la floración masculina y una hoja madura tomada a 42 días después de la floración.

ya sintetizada (Martínez Barajas, 1989)

- d. Se observó incorporación de metionina radiactiva a la holoenzima RUBISCO y se detectaron bandas de la subunidad pequeña marcadas radiactivamente, lo que indica que aunque presente en pequeñas cantidades, el mensaje para la subunidad chica en adultas si se está traduciendo.
- e. La velocidad de síntesis de RUBISCO descendió aproximadamente 5 veces a los 40 días después de la floración en relación al momento de la floración.

6. Articulo.

**Regulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Expression in
Second Leaves of Maize Seedlings from Low and High Yield
Populations**

1990

Plant Physiology 93:541-548

Regulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Expression in Second Leaves of Maize Seedlings from Low and High Yield Populations¹

Herminia Loza-Tavera, Eleazar Martínez-Barajas, and Estela Sánchez-de-Jiménez*

Biochemistry Department, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510

ABSTRACT

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (EC 4.1.1.39) (Rubisco) activity, Rubisco-protein, and Rubisco large and small subunit gene (*rbcl* and *rbcs*) transcripts were measured at seven stages of development in the second leaf of maize (*Zea mays* L.) seedlings belonging to low and high yield populations. During the three early stages of development, when the leaf has not yet expanded, it was determined that increments in Rubisco-activity were caused by increases in Rubisco-protein and its mRNAs. Afterward, the *rbcs* level decreased sharply down to nondetectable levels at the seventh stage, when the leaf was at the beginning of senescence. As a contrast, *rbcl* transcript decreased slowly and Rubisco-protein accumulated up to the fifth stage, when the leaf reached its maximum expansion. A slight decrease in Rubisco-protein was then observed. These results suggest that at early stages of development Rubisco-activity and Rubisco-protein are regulated mainly at the transcriptional level. At the later phase the regulation seems to be at other biochemical levels. Neither Rubisco activity nor Rubisco-protein showed correlation with yield for both maize populations at this stage of development. Slightly higher levels of both transcripts were observed in the high yield population.

Rubisco,² the first enzyme in the Calvin-Benson cycle, carboxylates RuBP to produce two 3-PGA molecules. This is one of the most abundant and best studied plant proteins. It is a chloroplastic enzyme that in higher plants is made of eight chains each of two kinds of polypeptides (12): the small subunit (mol wt 14kD) codified in the nuclear genome by a multigene family (*rbcs* genes) and the large subunit (mol wt 55 kD) codified as one copy per chloroplast genome (*rbcl* gene). The number of genes per cell is between 3 and 10 for *rbcs* and between 100 and 2000 or even more for *rbcl* depending on the species (2). The small subunit is synthesized in cytoplasmic ribosomes as a precursor that is transported to

the chloroplast. There, the precursor is processed before being assembled to the large subunit synthesized in the chloroplastic ribosomes (12).

This complex mechanism has raised questions regarding the possible coordination between Rubisco activity, Rubisco-protein and its levels of mRNAs, during leaf development or in response to light changes. Prioul and Reys (23) found rapid changes in total activity and in *rbcs*-mRNA content without significant modification of the contents of Rubisco-protein or *rbcl* mRNA in tobacco leaves transferred from low to high light conditions in adults and seedlings. In the same way, Nelson *et al.* (15) found high levels of *rbcs* mRNA are not related to small subunit polypeptide amounts in the second leaf of light-grown maize seedlings sampled 3 to 7 DAS.

Several regulation levels have been proposed to account for changes in Rubisco activity at different stages of development. Transcriptional control has been proposed as the main regulatory level for *rbcs* gene expression (11). Although gene dosage and transcriptional regulation are determinant in the first expression of *rbcl* gene (26), posttranscriptional mechanisms have been invoked to control the rapid changes observed when leaves are exposed to different light environments (16). Furthermore, some metabolites such as 2-carboxyarabinitol 1-phosphate (CAIP) or RuBP (5) and Rubisco activase (22) have been found to regulate Rubisco activity without changes in Rubisco protein.

Within this frame of reference, we are interested in analyzing whether Rubisco activity, Rubisco-protein, and its mRNA levels change coordinately during the development of the second leaf in maize (*Zea mays* L.) seedlings from two populations: the original one and a selected high-yield population. This study is relevant because in the high-yield population, Rubisco activity was previously found to be higher during the grain filling period (8). A similar correlation has been observed between Rubisco activity and high yield in several *C₃* species such as *Hordeum vulgare* (3), *Triticum aestivum* (14), and *Vigna radiata* (6). Therefore, it has been suggested that Rubisco activity could be used as a biochemical marker for high yield plant selection (3, 6, 14). This would be of great advantage if differences in Rubisco activity could be observed between high and low yield plants at early stages of development.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Groups of 50 seedlings of maize (*Zea mays* L.) var Zacatecas 58 original (*Z₀*) and the improved population for higher

¹ This work was partially supported by CONACYT grant No. PVT/Al/NAL/85/3073 and The Organization of American States (OAS) project: Promotion and support for training of human resources in plant biochemistry.

² Abbreviations: Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (EC 4.1.1.39)); RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate; 3-PGA, 3-phosphoglyceric acid; *rbcl*, Rubisco large subunit gene; *rbcs*, Rubisco small subunit gene; *Z₀*, Zacatecas 58, original population; *Z₁₆*, Zacatecas 58 SM-18, high yield population; DAS, days after sowing; kbp, kilobase pairs.

grain yield obtained after 18 cycles of stratified mass selection (Z_{18}) were grown in soil pots under greenhouse conditions in Mexico City. The seeds were provided by Dr. José Molina-Galán, (Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México). The second leaves from 7 to 12 developing seedlings belonging to both populations were harvested at seven different stages of development ranging from rolled leaf (stage 1 = 6 DAS) to fully expanded leaf, when signs of senescence can be observed (stage 7 = 17 DAS) (Fig. 1). For mRNA analysis a previous stage was taken (stage 0). Since duration for achieving a stage of development varies as a function of temperature and sunlight exposure, the description of results and discussion are based on stages instead of days after sowing. The samples were collected approximately at the same hour in the morning to avoid fluctuations in enzyme levels due to diurnal activation of Rubisco.

All determinations except transcript assessment were made in individual leaves. For dry weight determination, leaves were put in an oven at 60°C until constant weight was achieved. For transcript determinations, leaves were pooled, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until use.

Chl was measured by the Bruinsma method (1). The samples weighed between 0.1 to 0.2 g. Protein was measured by the Peterson method (19).

Leaf Extraction

Leaf samples (0.2–0.4 g) were ground in a mortar with 1 mL of extraction buffer (0.1 M Hepes-NaOH [pH 7.8], 0.25 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 0.1 M sodium ascorbate, 0.35 mM sodium diethyldithiocarbamate), and centrifuged 6 min at 12,000g at 0°C in a Beckman microfuge (21). The super-

natant was used for Rubisco-carboxylase activity assay, total protein and Rubisco-protein determinations.

Rubisco Assay

Rubisco-carboxylase activity was measured by the ¹⁴C₂ fixation method (21). Five μ L of crude leaf extract were used as the source of enzyme. The assay system contained 38 mM of [¹⁴C]NaH-CO₂ (100 μ Ci/mmol, Amersham), 1.53 mM of ribulose 1,5 biphosphate-tetrasodium salt in a final volume of 65 μ L of assay buffer (0.1 M Hepes-NaOH [pH 8.2], 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT). Previous activation of the enzyme extract by 10 mM MgCl₂ and 15 mM NaHCO₃ was performed at 30°C for 9.5 min as reported by Randall *et al.* (24). The radioactivity incorporated in acid stable products was measured using 5 mL of Bray's scintillation liquid in a Packard scintillation counter (Mimaxi β series 400).

Immunoelectrophoretic Quantification of Rubisco-protein

Rubisco was purified from spinach leaves according to the method of Wishnick and Lane (30). The enzyme purity was tested by electrophoresis. One band (at 500 kD) and two bands (at 55 and 14 kD) were observed in native and denatured gel stained with Coomassie blue, respectively. This protein preparation was used to induce antibodies against the holoenzyme by standard techniques in 1.5 kg young rabbits. The serum was prepared from whole blood by allowing the latter to stand at 4°C overnight. This serum was used as source of Rubisco antibodies for the immunoassay (7). Rocket immunoelectrophoresis gels were made by dissolving agarose (5% weight/volume) in buffer (Tris-HCl 30 mM, glycine 15

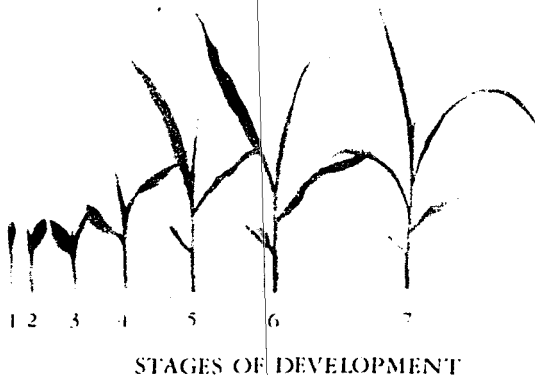


Figure 1. Stages of development used for screening Rubisco-activity, Rubisco-protein, and its mRNAs in the second leaf of maize seedlings. First stage: the first leaf does not have the ligula exposed; second leaf is rolled. Approximately 6 DAS. Second stage: the first leaf shows the ligula but it is not fully exposed; second leaf is rolled at the base but opened at the tip. Approximately 7 DAS. Third stage: the first leaf has the exposed ligula while in the second leaf, the ligula is at the level of the first one but it is not exposed; tip of the third leaf can be observed. Approximately 8 DAS. Fourth stage: first and second leaves have exposed ligulae; third leaf is expanded up to the middle; tip of the fourth leaf is observed. Approximately 10 DAS. Fifth stage: first and second leaves have exposed ligulae; third leaf has almost completely expanded but the ligula is not exposed; fourth leaf is half-way expanded. Approximately 12 DAS. Sixth stage: first, second, and third leaves have exposed ligulae; fourth leaf is almost completely expanded; fifth leaf shows tip; first leaf shows signs of senescence at the tip. Approximately 15 DAS. Seventh stage: first to fourth leaves have exposed ligulae; fifth leaf is almost fully expanded; sixth leaf shows tip; first leaf is complete senescent; second leaf shows signs of senescence at the tip. Approximately 17 DAS.

mm [pH 9.0] and serum from Rubisco immunized rabbits at 50°C. Five μ L of each maize leaf extract were applied to the gels for assay in a horizontal LKB immunoelectrophoresis apparatus (2117 Multiphor) and run overnight (4°C:80 V:5 mA). Standards were made with Rubisco spinach as controls. A linear correlation was found between the amount of Rubisco and rocket length in the 1 to 5 μ g of Rubisco-protein range. Two standards were used for each run.

RNA Extraction

One and a half grams of frozen tissue were ground in a mortar, 4.5 mL of buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.6], 25 mM EDTA, 25 mM EGTA, 4 M guanidium thiocyanate, 2% (w/v) Sarkosyl, 100 mM β -mercaptoethanol), and 2.25 mL of STE (10 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) saturated phenol were added. The slurry was shaken vigorously for 5 min, then 2.25 mL of chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v) were added and shaken again. The mixture was centrifuged to separate the aqueous phase which was then repeatedly extracted until there was no protein in the interphase. The nucleic acids were precipitated from the recovered aqueous phase by adding 0.6 volume of isopropanol and freezing at -20°C overnight (27).

To remove polysaccharides, RNA pellets were rinsed twice with 70% ethanol, vacuum dried, and resuspended in 0.9 mL of 0.1 M sodium acetate (pH 8.0) at 0°C. The polysaccharides were precipitated by adding ethanol up to 10% and keeping the sample at 0°C for 10 min. After centrifugation at 10,000g for 15 min at 0°C, the supernatant was transferred to a clean tube. There, the nucleic acids were precipitated by adding one volume isopropanol and freezing at -20°C for 2 h. The pellets were rinsed twice with 70% ethanol, vacuum dried, resuspended in sterile deionized distilled water, and stored at -70°C (Herrera-Estrella, 1987 personal communication). $A_{260} = 1$ was taken as 40 μ g/mL RNA.

RNA Electrophoresis and Northern Blot Analysis

Thirty micrograms of total RNA were denatured in 50% (v/v) formamide, 2.2 M formaldehyde, 1 \times phosphate buffer (10 \times = 100 mM sodium phosphate [pH 7.0] and 10 mM EDTA [pH 8.0]) at 65°C for 10 min and applied to a 1.2% (w/v) agarose gel with 2.6 M formaldehyde. The running was 1 \times phosphate buffer in a horizontal electrophoresis apparatus. The gels were stained with 10 μ g/mL ethidium bromide for 1 min and destained in distilled water until visualization of RNA was achieved. Densitometry of enlarged negatives of gel photographs was used to confirm the RNA content per lane. A GS 300 transmittance/reflectance scanning densitometer (Hofer Scientific Instruments) and a LKB 2200 recording integrator were used. The fractionated RNA was blotted onto Nytram membranes (Schleicher and Shuell) and fixed to the filter by UV treatment using a model TM 36 Chromato-vue shortwave transilluminator (U.V.P. Inc.) during 7.5 min. The membranes were soaked at 65°C for 15 min in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, and 0.1% (w/v) SDS to remove unbound RNA.

The membranes were prehybridized for 2 h at 65°C in a sealed bag with 0.15 mL of prehybridization solution (0.5 M sodium phosphate buffer pH 7.2, 1% (w/v) BSA, 1% (w/v)

SDS, and 100 μ g/mL heat denatured salmon sperm DNA) per cm² of membrane, with slow constant shaking. ³²P-Labeled DNA probes were heat denatured in boiling water for 10 min and added to the bag containing membranes. After hybridization for 24 h at 65°C, the membranes were washed as follows: (a) 5 min at room temperature with 2 \times SSC (1 \times SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate [pH 7.0]), (b) 30 min at 65°C with 2 \times SSC, 1% (w/v) SDS, and (c) 30 min at room temperature with 0.1 \times SSC. They were then dried and exposed to x-ray films (X-Omat S, Kodak) with intensifying screens (DuPont) at -70°C. Spot intensities in autoradiograms were estimated by densitometry and normalized based in total RNA applied on each lane. The exposure time of the autoradiograms was optimized to avoid underestimation of the strongest hybridization signals.

Hybridization Probes

The plasmid pZmc460 contains the maize chloroplast DNA fragment Bam 9 of 4.9 kbp inserted into the Bam HI site of pBR322. The Bam 9 fragment contains the gene for the large subunit of Rubisco (*rbcL*) (1.6 kbp) and the 5' end of the divergent transcript encoding β and ϵ subunits of CF₁. This plasmid was used to transform *Escherichia coli* SF8 strain (10). The plasmid SS37 was constructed in pUC13; it contains a 0.7 kbp insert encoding the small subunit of Rubisco (*rbcS*) from maize. Both plasmids were kindly provided by Dr. Jean Lukens of the Laboratory of Biological Sciences, Harvard University. The cloned insert with the *rbcL* gene was isolated by digesting pZmc460 with Bam HI and Sma I to produce a 3.48 kbp DNA fragment from which most of the CF₁ genes were absent (the remainder was less than 0.4 kbp). The coding *rbcS* insert was isolated by digesting SS37 with Bam HI and Eco RI. The DNA fragments were separated by gel electrophoresis in TBE buffer (89 mM Tris-base, 89 mM boric acid, and 2 mM EDTA) and 1% (w/v) of a low-melting-temperature agarose gel. The fragments were isolated by cutting the bands and placing the gel slices in a boiling water bath for 7 min. The inserts were labeled with [α -³²P]dCTP (180–230 TBq mmol⁻¹, DuPont/NEN) by using a random-primer extension labelling system (DuPont/NEN). The specific activities reached were between 1.44 \times 10⁸ and 1.75 \times 10⁸ cpm/ μ g DNA. The labeled probes were purified by the spin-column procedure (10) and heated in a boiling water bath for 10 min prior to hybridization.

Statistical Analysis

All the parameters except transcripts were analyzed by the *t*-test.

RESULTS

Specific stages of development were defined for the two populations of maize seedlings (Z_0 and Z_{18}). All the measurements were performed in the second leaf at the stated stages of development (Fig. 1). Fresh and dry weight reached a maximum at the fifth stage in the Z_{18} population and at the sixth in the Z_0 population. Afterward, the Z_{18} population kept a constant weight, whereas the Z_0 population showed a large

weight decrease in the last stage. The increases in fresh weight and dry weight were around 5 times and 4 times the initial values, respectively. At the end of the period Z_{18} had larger leaves than the Z_0 population (Fig. 2, a and b). Statistical analysis confirmed the significance of these differences between the two populations ($P < 0.05$).

Chl levels behave similarly to dry weight: it increased during the leaf development reaching the maximum value between the fifth and sixth stage and decreased slowly at the end of development (Fig. 3a). Increases of 8 to 9 times the initial values were observed at the maximum development. However, no differences were observed between the populations.

Protein per fresh weight, on the other hand, displayed a continuous decrease from the first to the third stage, remaining approximately constant thereafter (Fig. 3b). Although there were no differences between populations, it is interesting to point out that the Z_{18} population showed lower amounts of protein than Z_0 during almost the whole period studied.

Rubisco-protein per g of fresh weight increased to a maxi-

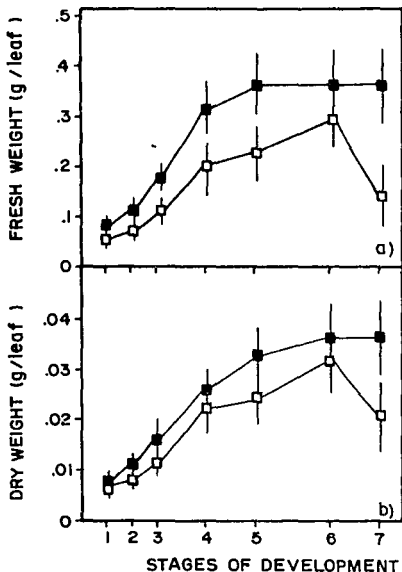


Figure 2. Fresh weight (a) and dry weight (b) of the second leaf of maize seedlings. Seven to 12 leaves from each population were weighed individually. The mean values are shown. Bars represent standard deviations. Dry weight was obtained by heating the leaves at 60°C in an oven until constant weight was reached. (□), Z_0 original population; (■), Z_{18} high-yield population.

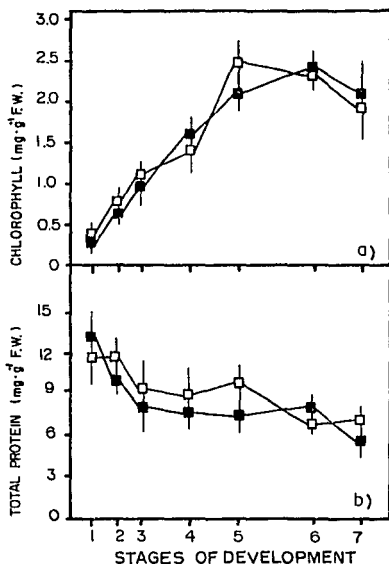


Figure 3. Chl (a) and total protein per g of fresh weight (b). Points are the mean values of 7 to 12 measurements; bars represent standard deviations. Chl was measured by the Bruinsma method (1) and total protein by the Peterson method (19). (□), Z_0 original population; (■), Z_{18} high-yield population.

imum around the fifth stage, where 5 to 6 times the initial values were found. Subsequently, it decreased slowly and at the last three stages, the Z_0 population showed 28 to 32% more Rubisco-protein than Z_{18} (Fig. 4a). In spite of these differences, the amounts of Rubisco-protein per total protein were very similar for both populations (Fig. 4b). Rubisco-protein comprised 3 to 7% of total protein at the first stage of leaf development and reached between 47 and 55% at the maximum growth stage. Three phases with different rates in the accumulation of Rubisco-protein could be observed during the development of the second leaf: from the first to the third stage, from the third to the fifth stage, and from the fifth to the seventh stage. The accumulation rates were approximately 12.5, 3.8, and 0.6% of Rubisco-protein accumulated per day of development for each phase (Fig. 4b).

Rubisco activity also increased drastically from the beginning until the fourth stage of the second leaf development (Fig. 5). Afterward, the activity fluctuated around the maximal value up to the last stage. At the last two developmental stages, the Z_{18} population showed higher activity than Z_0 , even though it possesses lower Rubisco-protein contents (Fig. 4b).

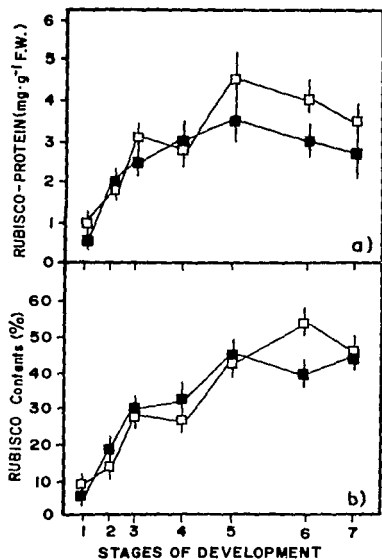


Figure 4. Rubisco-protein expressed either per gram of fresh weight (a) or per total protein (b). Measurements were done throughout the development of the second leaf of maize seedlings. Rubisco-protein was quantified by rocket immunoelectrophoresis against the holoenzyme antibody. Spinach Rubisco-protein was used as a standard. Each point represents the mean value of five determinations; bars are standard deviations. Rubisco contents (b) represent Rubisco-protein/total protein $\times 100$. (\square), Z_0 original population; (\blacksquare), Z_{18} high-yield population.

The specific activities per mg of Rubisco-protein are presented in Table I. There was not a constant value for this parameter throughout the leaf development, nor were constant differences between the two populations. The mean specific activity for Z_{18} ($257 \text{ nmol CO}_2 \text{ fixed}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of Rubisco) however, was higher than for Z_0 ($191 \text{ nmol CO}_2 \text{ fixed}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of Rubisco).

The maximum values of Rubisco-carboxylase specific activity are in the same order of magnitude as those reported for maize seedlings: $0.22 \text{ }\mu\text{mol CO}_2 \text{ fixed}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, assayed in crude extracts (25).

Northern hybridization analyses were made with *rbcS* and *rbcL* probes to assess the amounts of transcript in the samples at each stage of development. The *rbcL* transcripts increased fivefold with respect to the initial values, reaching a maximum at the third stage of development in the two populations. They then decreased, reaching in the seventh stage, 5 and

22% of the maximum level in Z_0 and Z_{18} , respectively. Except for the first stage, the amounts of *Z_{18}* *rbcL* transcripts were higher than for Z_0 , throughout the studied period, although the maximum value was almost the same (Fig. 6, a and b). In each autoradiogram lane two hybridization bands were observed, probably corresponding to the two *rbcL* transcripts reported for maize (13) (Fig. 6a, top). The *rbcS* transcripts increased up to 20- and 14-fold the initial values for Z_{18} and Z_0 , respectively. The maximum levels reached were at the third and fourth stage of development in each case. The *rbcS* transcripts decreased sharply at the fifth stage, becoming almost undetectable at the sixth and absent at the seventh stage. The maximum amounts of *rbcS* transcripts were slightly higher for Z_{18} than for Z_0 population (Fig. 6, a and c).

DISCUSSION

Several biochemical and physiological parameters were measured during the development of the second leaf of seedlings from two populations of the same maize variety (Zacatecas 58) with different grain yield capacity: low grain producer (Zacatecas 58 Original, Z_0) and high-yield producer (Zacatecas 58 SM-18, Z_{18}). We were interested in determining whether Rubisco carboxylase activity, Rubisco-protein and its mRNAs were changing in a concerted fashion during the early leaf development in these populations. The knowledge of this matter is important since it has been proposed, in several C_3 species, that Rubisco activity might be a biochemical marker for detecting high yield plants (3, 6, 14). It has also been shown that during the grain filling period the high yield population (Z_{18}) has a higher Rubisco activity than the low yield producer (Z_0) (8).

Regulation of Rubisco Genes Expression during the Second Leaf Development

Changes in Rubisco activity roughly correlated with changes in Rubisco-protein. The variations observed in specific activity based on Rubisco-protein throughout leaf development (Table I) showed that the activation state of the enzyme was not the same during the whole life of the leaf. Similar results have been reported when chloroplast senescence and degradation of Rubisco in wheat have been studied (18). A wide range of Rubisco specific activity ($0.12\text{--}0.25 \text{ }\mu\text{mol CO}_2 \text{ fixed}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of Rubisco) close to our values was detected.

The amount of Rubisco-protein found in the present study (55% of the total soluble protein (Fig. 4b)) is similar to that reported by Makino *et al.* (9) in rice varieties using a different approach.

As to the coordination between Rubisco-protein and its levels of *rbcL* and *rbcS* transcripts, we found that the Rubisco-protein increments observed at the first three stages of development were supported by the fast increases in the levels of *rbcL* and *rbcS* transcripts. Beyond the third stage, however, the fast decrease in *rbcS* mRNA and even the slow decrease in *rbcL* mRNA, did not mirror the accumulation in Rubisco-protein observed from the third to the fifth stage. From these data we suggest that the rate of Rubisco-protein synthesis is different before and after the third stage of leaf development,

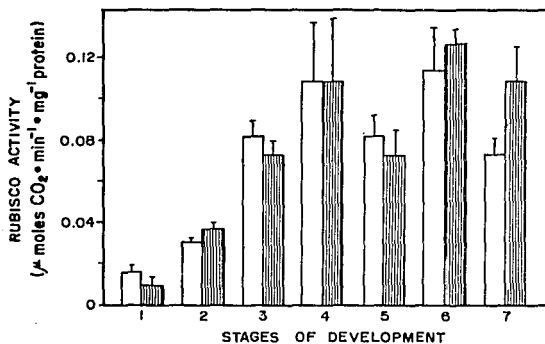


Figure 5. Rubisco-carboxylase activity per total protein (specific activity). Rubisco-carboxylase activity was measured in a crude extract by the $^{14}\text{CO}_2$ fixation method (21). The enzyme was incubated before the assay with 10 mM MgCl_2 and 15 mM NaHCO_3 during 9.5 min at 30° C. The incubated enzyme was added to the reaction mixtures and the reactions were stopped 30, 60, and 90 s later. (□), Z_0 original population; (▨), Z_{18} high-yield population. Vertical bars represent standard deviations.

Table 1. Rubisco Specific Activity Based on Rubisco-Protein for the Original Population (Z_0) and the High Yield Population (Z_{18}) of Maize, during the Development of the Second Leaf

Stages of Leaf Development	Specific Activity	
	Z_0 (average \pm s.e.)	Z_{18} (average \pm s.e.)
	<i>nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ Rubisco</i>	
1	215 \pm 15	367 \pm 83
2	190 \pm 10	194 \pm 96
3	265 \pm 50	243 \pm 16
4	380 \pm 120	269 \pm 39
5	185 \pm 15	157 \pm 16
6	205 \pm 30	333 \pm 31
7	160 \pm 30	234 \pm 24
Mean values	191 \pm 104	257 \pm 74

since abundance of Rubisco mRNAs changes. However, this assumes that the Rubisco-protein degradation velocity is the same throughout the leaf development. This is also consistent with the different Rubisco-protein accumulation slopes observed in the study (Fig. 4b).

If we assume that after the fifth stage little or no Rubisco-protein is synthesized, because there are low amounts or no *rbcS* mRNAs, the high stability of Rubisco-protein must account for the amounts observed at the last stages of leaf development (Figs. 4b and 6, a and c). A previous report (4) has shown that the Rubisco-protein half-life in maize leaves measured by $^3\text{H}_2\text{O}$ method is approximately 6.21 d. Although we did not measure the turnover of Rubisco-protein, estimations from our results agree with this value, since slight decreases in Rubisco-protein were observed during the last three stages, lasting approximately 5 d (from the fifth to the seventh stage, Fig. 4b).

Changes in *rbcL* and *rbcS* transcript levels were roughly coordinated. Both transcripts increased simultaneously until their maxima were reached at the third stage (the Z_0 population had its *rbcS* maximum at the fourth stage). Subsequently,

both mRNAs decreased differently: *rbcS* declines more sharply than *rbcL*. In the last stage no *rbcS* transcripts were found, while *rbcL* transcripts are still detected. This behavior also has been observed in the pericarp of tomato fruit after pollination, where the levels of both transcripts increased during 15 d and then decreased. At the ripe fruit stage, *rbcS* was not detectable, while low levels in *rbcL* transcripts were still observed (20). Furthermore, from the data in Figure 6 it is clear that *rbcS* transcripts showed more extensive changes in level than the *rbcL* transcripts (1.4- and 20-fold for *rbcS* transcripts and fivefold for *rbcL* transcripts) (Fig. 6, b and c). Increases in *rbcL* and *rbcS* transcripts have been reported for tomato (29), mustard (17), and maize (15, 28) during the greening. In those cases, the increases also were greater for *rbcS* transcripts. The differences in the behavior of *rbcS* and *rbcL* transcripts suggest that *rbcS* gene expression could be the limiting factor for Rubisco accumulation, since the levels of its transcripts are more extensively controlled.

Overall, during early leaf development there is a strong correlation between Rubisco activity, Rubisco-protein, and Rubisco transcripts. This suggests that the Rubisco increases observed were the result of transcriptional regulation mechanisms. The presence of almost constant amounts of Rubisco protein, not coincidental with reduction in the levels of *rbcS* and *rbcL* transcripts, suggests that during the last stages of development, Rubisco activity depends on the large stability of Rubisco-protein (4), as well as on the internal pools of CO_2 , Mg^{2+} , RuBP (5), and/or Rubisco activase (22).

Differences between Z_0 and Z_{18} Populations

Although we expected that Rubisco could be a biochemical marker for yield selection at the seedling stage, most of the parameters studied showed similar values for both maize populations. It is interesting, however, that the mean value for specific activity (activity per mg of Rubisco-protein) was 39% higher for Z_{18} population than for Z_0 (Table 1). In addition, higher amounts of *rbcL* and *rbcS* transcripts were also found in Z_{18} populations. Although there might be several

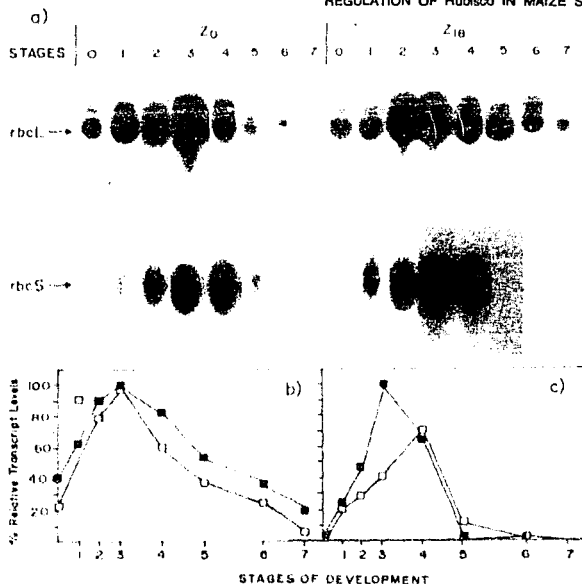


Figure 8. Northern hybridizations of *rbcL* and *rbcS* transcripts during the second leaf development of maize seedlings. (a), Autoradiograms show spots for *rbcL* and *rbcS* transcripts for both populations. Overexposed autoradiograms are presented to display the lightest spots. (b), Densitometric quantification of *rbcL* transcripts; (c), densitometric quantification of *rbcS* transcripts. The quantifications were made in properly exposed autoradiograms. Spots were scanned by a densitometer and normalized against the total RNA measured in enlarged negatives of the gel photographs. Estimation was made taking as 100% the darker spot in each autoradiogram. Stage 0: coleoptile is still covering the leaves. (□), Z_0 original population; (■), Z_{18} high-yield population.

explanations, the results suggest that the Z_{18} population could have larger rates of Rubisco-protein turnover and this positively relates to higher integrity of the protein. A higher specific activity per Rubisco-protein might then be expected. Experiments concerning the stability of the enzyme are presently underway in our laboratory. No clear differences in Rubisco activity were found between Z_0 and Z_{18} populations at the seedling stage, as opposed to the differences found during the grain filling period (8). This might be due to modifications on the signals regulating photosynthate demand and/or partitioning that are associated with plant development (e.g. seedling growth versus grain filling). From the data presented here, it can then be concluded that Rubisco activity by itself is not a suitable biochemical marker for selecting maize plants of high grain yield at the seedling stage. A combination of several parameters might be required to perform precise selection at this stage of plant development.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to acknowledge Dr. Fernando Montiel and Dra. Irma Bernal-Lugo for their support in establishing the DNA and RNA methodologies; to Dr. José Molina-Galán for providing the plant seeds; to Dr. Jean Lukens for providing the *rbcL* and *rbcS* probes; and to Dr. Gustavo A. Fuentes for his critical revision of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Bruinsma J (1963) The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Phytochem* 2: 241-249
2. Dean C, Pichersky E, Dunsmeir P (1989) Structure, evolution and regulation of *RbcS* genes in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 40: 415-439
3. Frey NM, Moss DN (1976) Variation in RuDPCase activity in barley. *Crop Sci* 16: 209-213
4. Humphrey TJ, Davies DD (1976) A sensitive method for measuring protein turnover based on the measurement of $2\text{-}^3\text{H}$ -labeled aminoacids in protein. *Biochem J* 156: 561-568
5. Kohza J, Seeman JR (1989) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to diurnal changes in irradiance. *Plant Physiol* 89: 918-924
6. Kuo CG, Hsu FH, Tsay JS, Park HG (1980) Variation in specific leaf weight and RuDPCase activity in mungbean. *Can J Plant Sci* 60: 1059-1062
7. Laurell CB (1972) Electroimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 29: Suppl 124: 71-82
8. Loza-Tavera H, Serrano B, Molina JD, Ortega-Delgado ML, Sánchez-de-Jiménez E (1987) CO_2 -fixation enzymes in maize (*Zea mays*) and grain yield. *Can J Bot* 65: 607-611
9. Makino A, Mae T, Ohira K (1987) Variations in the contents and kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among rice species. *Plant Cell Physiol* 28: 799-804
10. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, pp 466-467
11. Manzara T, Gruissem W (1988) Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosynth Res* 16: 117-139

12. Mizioro HM, Lorimer GH (1983) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu Rev Biochem* 52: 507-535
13. Mullet JE, Orozco EM, Chua NH (1985) Multiple transcripts for higher plant *rbcL* and *atpB* genes and localization of the transcription initiation site of the *rbcL* gene. *Plant Mol Biol* 4: 39-54
14. Murthy KK, Singh M (1979) Photosynthesis, chlorophyll content and ribulose diphosphate carboxylase activity in relation to yield in wheat genotypes. *J Agric Sci Camb* 93: 7-11
15. Nelson T, Hargster MH, Mayfield SP, Taylor WC (1984) Light-regulated gene expression during maize leaf development. *J Biol Cell* 98: 558-564
16. Nikolau BJ, Klesning DF (1987) Coordinate, organ-specific and developmental regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in *Amaranthus hypochondriacus*. *Plant Physiol* 85: 167-173
17. Oelmüller R, Dietrich G, Link G, Mohr H (1986) Regulatory factors involved in gene expression (subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Planta* 169: 260-266
18. Peoples MB, Bellizzi VC, Waters SP, Simpson RJ, Dalling MJ (1980) Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Planta* 149: 241-251
19. Peterson GLA (1977) Simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356
20. Piechulla B, Pichersky E, Cashmore A, Gruissem W (1986) Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening. *Plant Mol Biol* 7: 367-376
21. Pike CS (1987) Ribulose bisphosphate carboxylase assay. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists. St. Louis, MO, July 19-23
22. Portis AR, Salvucci ME, Ogren WL (1986) Activation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO₂ and ribulose bisphosphate concentrations by rubisco activase. *Plant Physiol* 82: 967-971
23. Prioul JL, Reyss A (1988) Rapid variations in the content of the RNA of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of mature tobacco leaves in response to localized changes in light quantity. Relationships between the activity and quantity of the enzyme. *Planta* 174: 488-499
24. Randall DD, Nelson CJ, Asay KH (1977) Ribulose bisphosphate carboxylase. Altered genetic expression in tall fescue. *Plant Physiol* 59: 38-41
25. Reger BJ, Ku MSB, Potter JW, Evans JJ (1983) Purification and characterization of maize ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Phytochemistry* 22: 1127-1132
26. Sasaki Y, Nakamura Y, Matsuno R (1987) Regulation of gene expression of ribulose bisphosphate carboxylase in greening pea leaves. *Plant Mol Biol* 8: 375-382
27. Sheen JY, Bogorad L (1985) Differential expression of the ribulose bisphosphate carboxylase large subunit gene in bundle sheath and mesophyll cells of developing maize leaves is influenced by light. *Plant Physiol* 79: 1072-1076
28. Sheen JY, Bogorad L (1986) Expression of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene and three small subunit genes in two cell types of maize leaves. *EMBO J* 5: 3417-3422
29. Sugita M, Gruissem W (1987) Developmental, organ-specific and light-dependent expression of the tomato ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene family. *PNAS USA* 84: 7104-7108
30. Wishnick M, Lane DM (1971) Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. *Methods Enzymol* 23: 570-577

VIII. DISCUSION

1. Regulación de la expresión de la RUBISCO durante el desarrollo de la segunda hoja en plántulas.

Durante el desarrollo de la segunda hoja de maíz, la RUBISCO presenta diferentes niveles de regulación en la expresión de sus genes. En los tres primeros estadios del desarrollo, desde que la hoja emerge del coleóptilo hasta antes de su máxima expansión, se observa que el incremento en la actividad de la RUBISCO es sustentado por un aumento en la cantidad de proteína RUBISCO y de sus correspondientes mRNAs (Figs. 4 a 6 del artículo). Esto indica que el incremento en la actividad de RUBISCO es el resultado principalmente de mecanismos de regulación a nivel transcripcional. Aumentos en las cantidades de subunidades de la RUBISCO en coordinación con los niveles de sus mRNAs han sido observados durante el desarrollo de la primera hoja de maíz cultivado en luz continua durante 8 días (Nelson *et al.* 1984), así como también en hojas de amaranto durante las fases iniciales de su desarrollo (Nikolau y Klessig, 1987), lo que sugiere que este mecanismo de regulación es común en el inicio de la formación de las hojas en plantas superiores.

Otro período en el desarrollo de la hoja en el cual se observan cambios en los niveles de regulación de la RUBISCO se presenta entre el tercero y quinto estadio, momento de máxima expansión de la hoja (Figs 4 a 6 del artículo). Durante este lapso, la actividad de la RUBISCO presentó cierta variabilidad; la velocidad de acumulación de la holoenzima disminuyó de 12.5% por día en la etapa del primero al tercer estadio, a 3.8% de acumulación por día en este período, aunque la cantidad total siguió aumentando hasta el quinto estadio. Asimismo, los mRNAs comenzaron a disminuir, lentamente para el caso de los mensajes de la subunidad grande (pérdida del 60% de los mensajes en ese período), y rápidamente para los mensajes de la subunidad pequeña (pérdida del 80 al 90%). Con base en estos datos se puede sugerir que la velocidad de acumulación de la RUBISCO disminuyó principalmente como consecuencia de la reducción en la velocidad de síntesis resultante del decremento de los mensajes de esa proteína. Esto es apoyado con los datos obtenidos en los experimentos de pulso y seguimiento. Inmediatamente después de alimentar con metionina-³⁵S a fragmentos de

la segunda hoja en el segundo y quinto estadios de desarrollo se observa que en el quinto estadio la velocidad de síntesis disminuyó un 50% en relación con el segundo estadio para las dos subunidades (Figs 24a y 25a). En estos datos es posible observar que la pérdida de mensajes de la subunidad grande presentada en el quinto estadio es reflejada por la disminución en la velocidad de síntesis del polipéptido LS en ese estadio. Sin embargo, la gran pérdida de mensaje de la subunidad pequeña en ese mismo estadio no es reflejada por una gran disminución del polipéptido correspondiente lo cual implica la existencia de algún mecanismo de regulación a nivel traduccional. Existen datos en la literatura que sostienen esta propuesta. En la segunda hoja de trigo a edad madura (días posteriores a su expansión máxima), Brady (1981) observó que la velocidad de síntesis de la RUBISCO cayó rápidamente en relación a la velocidad de síntesis promedio de todas las proteínas, mientras que en el momento de la máxima expansión foliar, la velocidad de síntesis de la enzima es cercana a la velocidad promedio para todas las proteínas. Asimismo, se observó (Spiers y Brady, 1981) en hojas de trigo de edades avanzadas, que los mRNAs traducibles de ambas subunidades de la RUBISCO decrecieron en abundancia en relación a la mayoría de los otros mensajeros siendo ese decremento coordinado y reflejando rigurosamente la caída en la síntesis de las subunidades observada *in vivo*. En amaranto (Nikolau y Klessig, 1987) se encontró que la disminución de 30 veces la velocidad en la síntesis de los dos polipéptidos de la RUBISCO observada durante los últimos estadios de desarrollo de las hojas podría ser explicada sólo parcialmente por la reducción en sus mRNAs (entre 4-8 veces); mientras que ni la traducibilidad de los mRNAs ni la estabilidad de los polipéptidos fueron alterados, lo cual implica que el control fue ejercido a nivel traduccional. Aunque lo observado por estos autores fue el fenómeno opuesto (gran disminución de polipéptidos y poca disminución de los mensajes) a lo encontrado en este trabajo (gran disminución de mensajes, nula disminución de polipéptidos), la regulación de la expresión génica ocurrió al mismo nivel, lo cual es un apoyo para sugerir que este punto de regulación está funcionando en plántulas.

La disminución en la acumulación de mensajes tanto de LS como de SS en el período del tercero al quinto estadio observada en este

trabajo, pudo ser debida a un aumento en la velocidad de degradación de los transcritos, a una disminución en la velocidad de su síntesis o a ambas causas. Trabajos realizados por Deng y Grussem (1987 y 1988) mostraron que la velocidad de síntesis de mRNA de LS no cambia substancialmente durante el desarrollo de las hojas de espinaca. Por otro lado se encontró también en hojas de espinaca que el mRNA de LS decaía con una vida media relativa semejante en hojas jóvenes y en hojas maduras, 4.5 y 5.2 h respectivamente (Klaff y Grussem, 1991). En cambio, la vida media del transcrito correspondiente al gen *psbA* (codifica para la proteína D1 del fotosistema II) se incrementó más de dos veces en hojas maduras comparadas con las jóvenes (4.7 y 10 h). Estos autores demostraron por mediciones directas *in vivo*, que esta observación puede ser explicada por estabilidad diferencial de los mRNAs. Por otro lado, mecanismos selectivos de degradación rápida de RNAs mensajeros de SS han sido encontrados en plantas de papa colocadas en la oscuridad; más aún, un análisis detallado mostró que los transcritos originados a partir de diferentes miembros de la familia génica *rbcS* fueron degradados diferencialmente (Fritz *et al.* 1991). Aunque estos datos no pueden ser extrapolados directamente al sistema estudiado en este trabajo, sirven como modelo para sugerir que la pérdida de los mRNAs de las subunidades de la RUBISCO en las hojas expandidas, es debida básicamente a degradación acelerada de ellos. Esto señala que existe un tipo de control post-transcripcional para la expresión de los genes *rbcL* y *rbcS* a nivel de degradación de sus mensajes.

A partir de su máxima expansión (quinto estadio), la hoja alcanza su edad madura e inicia el proceso de envejecimiento. Durante este período la actividad de la RUBISCO presenta variaciones no significativas (Fig. 5 del artículo) mientras que la proteína RUBISCO se mantuvo sin variación (Fig. 4 del artículo), lo cual sugiere que el recambio de la proteína está en equilibrio dinámico (síntesis igual a degradación). Mientras tanto, la tendencia que presenta el RNA mensajero de la subunidad grande a seguir disminuyendo, indica que su proceso degradativo iniciado en el período anterior continúa, quizá con una ligera disminución en la velocidad de degradación pues la pendiente en este período disminuye ligeramente (Fig. 6b del artículo). En el caso del mensaje de la subunidad chica es evidente que tanto la

síntesis como la degradación tienden a detenerse, ya que este transcrito no es detectable al final del estudio. Los resultados del experimento de pulso realizado en el quinto estadio indicaron que la síntesis de los dos polipéptidos que constituyen la RUBISCO se redujo casi en un 50% en comparación con la observada en el segundo estadio (ver tiempo 0 en la Fig 26); datos semejantes fueron encontrados por Nikolau y Klessig (1987) quienes observaron que cambios en la velocidad de síntesis y no en el recambio podían explicar el decremento en la acumulación de RUBISCO observada en cotiledones y hojas de amaranto. Vidas medias muy largas han sido determinadas para la RUBISCO. Simpson y colaboradores (1981) encontraron en la segunda hoja de plántulas de maíz cultivadas en fotoperíodo de 14 h luz y 10 h oscuridad, una vida media de 5.6 días para la holoenzima RUBISCO empleando anhídrido acético-³H para marcar las proteínas ya sintetizadas en la hoja. En trabajos realizados en cebada (Peterson *et al.*, 1973) y en *Lemma* (Ferreira y Davies, 1986) también se ha encontrado que la RUBISCO presenta degradación lenta en comparación con otras proteínas de la hoja. Huffaker y Miller (1978) observaron que durante la síntesis inicial o después de que alcanzaba una concentración máxima la RUBISCO no se degradaba en hojas de cebada intactas; pero cuando la hoja envejecía debido a edad o factores ambientales limitantes, esta enzima parecía ser la principal proteína que se degradaba. En base a lo encontrado en este trabajo se puede sugerir que durante el período de desarrollo de la segunda hoja de maíz que comprende del quinto al séptimo estadio, la regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO a nivel post-traducciona es predominante ya que la RUBISCO permanece durante todo este período sin alterarse.

Uno de los aportes importantes de este trabajo, es que muestra un panorama amplio de los diferentes mecanismos de regulación de la expresión de la RUBISCO durante la ontogenia de la segunda hoja de maíz. En este sentido es único ya que múltiples trabajos han sido realizados en momentos precisos de desarrollo de algún tejido o en respuesta a la luz u otros factores ambientales, pero pocos abarcan todo el desarrollo de una hoja. Como conclusión general para esta parte del trabajo es posible señalar que la regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO se lleva a cabo a diferentes niveles durante el desarrollo de una hoja, para permitir que la proteína funcione

adecuadamente cumpliendo con los requerimientos impuestos por la diferenciación y el crecimiento de la hoja en plántulas.

2. Regulación de la expresión de RUBISCO en la hoja superior a la mazorca de plantas adultas durante el llenado de grano.

Durante el período de llenado de grano en maíz las hojas realizan funciones muy diferentes a las que se efectúan durante el desarrollo de la plántula. En este período la planta ha finalizado su desarrollo vegetativo y se encuentra en la etapa reproductiva. Las hojas han alcanzado su máxima expansión y su actividad fotosintética está encaminada a la producción de compuestos que serán translocados a la mazorca a fin de producir las estructuras de preservación de la especie: las semillas. Esta función de la hoja se mantendrá activa hasta el inicio de la senectud, momento en el cual la fotosíntesis empieza a declinar irreversiblemente señalando el fin de la hoja como órgano autotrófico exportador de carbono (Secor *et al.*, 1983). La RUBISCO es la proteína más abundante de la hoja y juega un papel fundamental en la economía del nitrógeno en la planta, ya que el contenido de proteína en la semilla en desarrollo en la mayoría de las plantas anuales se deriva de la degradación de proteína de los órganos vegetativos. Esta doble función de la RUBISCO pone en conflicto a la planta, ya que la proteína necesaria para mantener la fotosíntesis también es degradada en la hoja para suplementar aminoácidos para las semillas en desarrollo (Huffaker y Miller, 1978; Peoples *et al.*, 1980). Muy poca información existe en relación a como se regula la expresión de los genes de la RUBISCO en este importante período de vida de la planta. En este trabajo se realizó este análisis.

En los estudios que se llevaron a cabo en plantas adultas durante el llenado de grano, desde la antesis masculina hasta 45 días después, se determinaron en las hojas respectivas la actividad, la cantidad de proteína RUBISCO (Fig 6 y 7 reproducidas de Martínez-Barajas, 1989) y los niveles relativos de sus RNAs mensajeros (Figs. 14 y 15) en dos poblaciones de maíz: Original y seleccionada para mayor rendimiento de grano (SM-18). Los resultados mostraron que el aumento en actividad de la enzima presentado en el primer tercio del período, no concordaba con las disminuciones en la cantidad de proteína RUBISCO y del mRNA para la

subunidad grande observadas a través de todo el periodo, ya que ambos disminuyeron de una manera concertada y no acordes con el mRNA de SS el cual no se encontró en niveles claramente detectables por el método empleado en este trabajo. Además los experimentos de pulso y seguimiento realizados en hojas al momento de la floración y hojas tomadas 42 días después de iniciado el proceso, mostraron que la velocidad de síntesis de la holoenzima RUBISCO disminuyó aproximadamente entre cuatro y seis veces en el último muestreo comparado con el realizado al momento de floración (Figs. 29 y 30).

El hecho de que no se observaran mRNAs de la subunidad chica de RUBISCO en hojas de plantas adultas sugería la posibilidad de que no hubiera síntesis de ese polipéptido durante ese periodo. Sin embargo, al analizar las fluorografías obtenidas en los experimentos de pulso y seguimiento y observar los patrones producidos por las bandas radiactivas correspondientes a esa subunidad (Fig. 29), las cuales aparecen tanto en el momento de floración como al final del periodo de llenado de grano, la posibilidad anteriormente citada fue desechada. La explicación posible a este hecho es que quizá haya una pequeña cantidad de mensaje (no detectable claramente con el método empleado), que permite sostener la síntesis de este polipéptido en hojas adultas.

De estos resultados es posible señalar que en hojas de plantas adultas durante el periodo de llenado de grano la regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO está ocurriendo primordialmente a nivel traduccional, ya que a pesar de que los mensajes de la subunidad pequeña se detectan en muy escasas cantidades, la traducción debe estar ocurriendo a una velocidad que permita sintetizar cantidades de subunidad chica comparables a los de la subunidad grande de la cual se encuentra más mensaje. Por otro lado, otra observación importante es que la actividad enzimática de la RUBISCO es regulada a nivel de activación de la enzima ya sintetizada pues se observan incrementos en la actividad de la enzima sin incrementos en la proteína RUBISCO. Para un análisis detallado de este punto revisar la tesis de Martínez Barajas, (1989) y Martínez Barajas y Sánchez de Jiménez (1991) en donde se discute la participación de la RUBISCO-activasa en este mecanismo.

Resultados semejantes a los observados en este trabajo no han sido encontrados en otros cultivos estudiados. Por ejemplo Friederich y Huffaker (1980) observaron en hojas de cebada durante el llenado de

grano que la actividad de la RUBISCO disminuía paralelamente a la cantidad de RUBISCO proteína. Patterson y colaboradores (1980) encontraron que la actividad de la RUBISCO en trigo cultivado en el campo era más alta antes de la antesis y disminuyó por el resto del periodo post-antesis. Sin embargo, las plantas estudiadas en los trabajos descritos anteriormente eran de metabolismo fotosintético tipo C₃, mientras que el maíz presenta fotosíntesis tipo C₄, por lo que podrían tener otro tipo de regulación génica.

3. Diferencias en los mecanismos de regulación de la RUBISCO entre plántulas y plantas adultas.

Al comparar los cambios que presentan los RNAs mensajeros en las hojas de los estadios estudiados, es posible indicar que lo observado en adultas se asemeja al último periodo de desarrollo de la segunda hoja de plántulas (del quinto al séptimo estadio). En ese lapso, el RNA mensajero de la subunidad grande fue claramente detectable mostrando un decremento paulatino, mientras que el de la subunidad chica se detectó en escasa o nula cantidad (Fig. 6 del artículo), lo cual fue semejante al caso de adultas (Fig. 15). Esto sugiere que la regulación de la RUBISCO en hojas adultas podría estar basada en mecanismos semejantes a los que rigen ese momento de desarrollo de la hoja en plántula. Esto podría estar asociado al alargamiento de la vida fotosintética activa de la hoja adulta, no llegando tan rápidamente como ocurre con la plántula, al envejecimiento y la muerte.

La regulación de la actividad en hojas adultas es claramente ejercida a nivel post-traducciona es decir, por factores a nivel de la enzima ya sintetizada, probablemente activadores enzimáticos o RUBISCO-activasa. Estos mecanismos, ejercidos en respuesta a alguna señal (probablemente la demanda) generada durante el llenado de grano, ejercen un aumento en la activación de la RUBISCO lo que conduce a un aumento en la producción de fotosintatos (fuente). La existencia de RUBISCO activasa en hojas adultas de maíz ya ha sido demostrada (Martínez-Barajas, 1991), mas aún se ha observado que los niveles de RUBISCO activasa en hojas adultas de maíz cambian concordantemente a la actividad de RUBISCO durante el periodo de llenado de grano (Martínez-Barajas y Sánchez de Jiménez, 1991), lo cual apoya grandemente la posibilidad de que esta enzima sea la responsable de las

Barajas, 1989).

3. La proporción de RUBISCO en relación a proteína total se mantuvo constante durante la primera mitad del estudio siendo ligeramente mayor en la población mejorada. Posteriormente en la población mejorada hubo una degradación preferencial de la RUBISCO en relación a las otras proteínas foliares. (Fig. 7, reproducida de Martínez Barajas, 1989).
4. La cantidad de RNA mensajero para la subunidad grande fue mayor en la población original que en la mejorada (Fig 15).

De estos resultados es interesante resaltar que aunque hubo más cantidad de proteína RUBISCO durante los tres últimos estadios de desarrollo de la segunda hoja en plántulas en la población original la actividad específica en ese lapso fue mayor para la población mejorada. Se ha visto que mientras más tiempo permanezca verde una hoja, tiene más tiempo para seguir funcionando como donadora de fotosintatos para otros tejidos en desarrollo por lo que quizá esta situación en la plántula de maíz de la población mejorada le dé ventaja sobre la población original.

La observación de que en la población mejorada durante el llenado de grano la proteína RUBISCO se perdió rápidamente en la segunda mitad del estudio es semejante a lo encontrado por Peoples y colaboradores (1980) en plantas de trigo también durante el crecimiento del grano. Ellos observaron que durante el período temprano de movilización de proteínas la RUBISCO se degradaba a la misma velocidad que otras proteínas, pero después de que se perdía un 30% de proteína soluble total la velocidad de degradación de la RUBISCO se incrementaba rápidamente en relación a la proteína soluble. Resultados semejantes encontró Wittenbach (1979) en la hoja bandera de trigo. En esa hoja RUBISCO constituye un 40 a 45% de la proteína soluble total y permanece sin cambio hasta la senectud cuando es perdida a una velocidad más rápida que la de la proteína soluble total. Como se mencionó en párrafos anteriores la RUBISCO es una proteína que funciona también como almacén de nitrógeno (Huffaker y Miller, 1978), esto conduce a pensar que su degradación en la segunda mitad del período de llenado de grano en la población mejorada podría estar relacionada con la translocación de los componentes de la RUBISCO reestructurados, hacia la mazorca. El hecho de que este fenómeno se observara solamente en la

población mejorada podría ser una característica que le diera mayor capacidad de producción de grano a esa población.

5. Coordinación entre el contenido de mensajes y de subunidades de la RUBISCO.

Debido al origen heterólogo de los polipéptidos que constituyen a la RUBISCO, el tema de la coordinación en la síntesis de las dos subunidades así como de sus mensajes ha sido abordado ampliamente con muy diferentes métodos, en diferentes especies y a distintas edades fisiológicas de las hojas encontrando resultados contradictorios. En algunos casos se ha observado una anticipación en la síntesis de la subunidad grande en cotiledones de amaranto (Berry *et al.*, 1985), pero en otros una estrecha correlación en la síntesis de ambos polipéptidos ha sido observada (Nivison y Stocking, 1983; Iwanij *et al.*, 1975; Schmidt y Mishkind, 1983). Se han identificado diferentes niveles de regulación génica involucrados en la producción de cantidades estequiométricas de las subunidades peptídicas. Dean y Leech (1982) encontraron al analizar hojas de trigo de siete días de edad que la síntesis de LS y SS estaban coordinadas y que los cambios en la traducción eran dados por cambios en los RNAs mensajeros de estas subunidades. En un interesante estudio realizado por Radetzky y Zetsche (1987), en el que emplearon inhibidores de síntesis de proteínas en experimentos de pulso y seguimiento en el alga *Chlorogonium*, pudieron detectar que la coordinación fina de ambas subunidades de la RUBISCO es lograda por la degradación del exceso de subunidades chicas, mientras que el nivel de LS es adaptado a la concentración de SS probablemente por ajuste en la traducción del mRNA de LS. Aunque debido al método de purificación de la RUBISCO empleado en este trabajo (por gradientes de sacarosa), no se excluye la posibilidad de la existencia de subunidades libres en extractos de la segunda hoja en plántulas de maíz, es posible señalar que la cantidad de subunidades radiactivas incorporadas a la holoenzima purificada fue estequiométrica.

En el caso de los mensajes, en este trabajo se observó que la coordinación entre sus niveles es menos estrecha, pruebas de ello son las siguientes observaciones: 1) en el estadio 0 de desarrollo de la plántula existe RNA mensajero de la subunidad grande fácilmente detectado, mientras que el de la subunidad chica es muy escaso (Fig 6

del artículo); ii) los cambios en los niveles de mensaje de la subunidad chica son mayores que los de la subunidad grande; iii) al final del estudio en plántulas no fue detectado mensaje de la subunidad pequeña mientras que el de la grande continuaba presente (Fig 6 del artículo) y iv) en plantas adultas no fue detectado el mensaje de la subunidad pequeña mientras que el de la grande estaba presente claramente (Fig. 13). Resultados de este tipo ya han sido observados en otros vegetales. El RNA mensajero para la subunidad grande ha sido detectado en grandes cantidades en oscuridad cuando el de la subunidad chica es escaso (Berry *et al.*, 1985). Por otro lado, durante el enverdecimiento de hojas, aumentos notables en las cantidades de estos mensajes fueron observadas en tomate (Sugita y Gruissem, 1987), mostaza (Oelmüller *et al.*, 1986) y maíz (Nelson *et al.*, 1984; Sheen y Bogorad, 1985). En todos estos casos, el aumento de mensaje de la subunidad chica fue mayor que el de la subunidad grande. También se ha observado que durante la maduración del fruto de tomate, el mensaje de la subunidad chica desaparece mientras que el de la subunidad grande se mantiene (Piechulla *et al.*, 1986). Aunque en este estudio no se manejaron sistemas con enverdecimiento artificial, el hecho de que la segunda hoja esté cubierta por el coleóptilo al inicio temprano de su desarrollo (estadio 0) y posteriormente salga de él y quede expuesta completamente a la luz, asemeja el proceso de enverdecimiento. Por eso es interesante señalar que los RNAs mensajeros presentaron un comportamiento semejante a lo descrito anteriormente para el enverdecimiento.

6. Análisis de los experimentos de pulso y seguimiento.

La presencia de radiactividad en las dos subunidades de la RUBISCO después del pulso en todos los estadios estudiados indica que la síntesis de la enzima está llevándose a cabo aunque a velocidades distintas, ya que en hojas de plántulas del segundo estadio y hoja adulta joven la incorporación fue mayor que en hojas del quinto estadio y hoja adulta vieja.

No fue posible calcular la vida media de la RUBISCO debido a que en algunos experimentos hubo reincorporación de radiactividad en ésta proteína después de diluir la poza de metionina radiactiva, lo cual produjo resultados imposibles de analizar en ese sentido. Sin embargo,

con base en esos resultados es posible sugerir la existencia de algunos fenómenos que parecen estar ocurriendo en los diferentes estadios estudiados. Primeramente el hecho de que en el segundo estadio y en hojas adultas jóvenes haya ocurrido un repunte en la incorporación de marca radiactiva a las 16 y 12 horas de seguimiento respectivamente indica que la síntesis de RUBISCO está activa. El mecanismo por el cual ocurre este fenómeno no fue dilucidado; aparentemente existe una reincorporación selectiva de la metionina radiactiva ya que después de haber diluido 200 veces la poza con metionina no radiactiva, lo cual es evidente a las 4 horas de seguimiento, la marca es recuperada. Este fenómeno no está asociado a la síntesis de las subunidades en algún compartimento celular, ya que se observó tanto en la síntesis de subunidades chicas, la cual ocurre en ribosomas citoplásmicos, como de subunidades grandes que son sintetizadas en ribosomas cloroplásticos. Una posibilidad es que esté ocurriendo degradación rápida de otras proteínas, lo cual conduciría al recalentamiento de la poza de metionina y si la síntesis de la RUBISCO es muy activa, al consumo por esta proteína de la metionina radiactiva.

Por otro lado la incorporación de metionina radiactiva en la RUBISCO de plántulas del quinto estadio y en plantas adultas de edad avanzada detectada después del pulso sugiere que sí ocurrió síntesis de esta enzima. Sin embargo, el hecho de que después de la dilución de la poza no ocurriera ningún repunte en la incorporación de la marca, como ocurrió en plántulas del segundo estadio y plantas jóvenes, sugiere que la síntesis de la enzima es baja y que las vías metabólicas involucradas en la síntesis y degradación de las proteínas son distintas a las observadas en el segundo estadio. Esto podría ser debido a que los aminoácidos provenientes de la degradación de las otras proteínas no estuvieron disponibles para la síntesis de nuevas moléculas de RUBISCO.

En lo que respecta a los análisis por Western blot de las subunidades de la RUBISCO realizado en plántulas es posible señalar que los conglomerados de alto y mediano peso molecular identificados como RUBISCO por medio de anticuerpos desarrollados contra la holoenzima y contra la subunidad grande, muy posiblemente constituyan asociaciones de subunidades grandes. Barraclough y Ellis (1980) encontraron que en cloroplastos aislados la subunidad grande es recobrada en forma de

agregados de 7S o 29S no asociados a subunidad pequeña. Por otro lado los pesos moleculares de los conglomerados no permite sugerir el número de subunidades que están asociadas. Recientemente Ramty *et al.* (1991) encontraron un puente disulfuro entre pares de subunidades grandes de la RUBISCO localizado en el residuo cys 247, formando un puente intersubunidad. Como información relacionada a lo anterior es interesante señalar que en la cuantificación de la proteína RUBISCO en el segundo estadio (Fig. 22) los conglomerados de alto y mediano peso molecular varían aproximadamente en forma recíproca a como cambia la cantidad de subunidad grande, mientras que las cantidades de subunidad pequeña se mantienen más o menos constantes.

IX. CONCLUSIONES

A partir de lo observado en este trabajo y en el que se determinó actividad y proteína RUBISCO (Martínez-Barajas, 1989) se deduce que existen diferentes niveles de regulación de la expresión de los genes de la RUBISCO, que actúan en los distintos momentos de desarrollo de las hojas. Cuando la hoja inicia su desarrollo es necesario que ocurra síntesis *de novo* de la enzima por lo que la síntesis de los RNAs mensajeros de los dos genes es obligada. Es en este momento cuando la regulación a nivel transcripcional juega un papel fundamental. Posteriormente, cuando la enzima empieza a alcanzar cantidades suficientes para el adecuado funcionamiento de la hoja, la disminución en la síntesis de proteínas indica que la regulación a nivel traduccional es la que prevalece.

Cuando la planta entra en la etapa reproductiva, sus hojas ya han alcanzado su mayor expansión. En ellas la RUBISCO ya se ha sintetizado y ha alcanzado niveles adecuados para el funcionamiento de la hoja madura. En estos momentos la necesidad de mayor actividad es sostenida por incrementos en la actividad enzimática, sin aumentos en el contenido de proteína RUBISCO, de lo que se deduce que la regulación postraduccional es la predominante.

La existencia de niveles no-paralelos de RNAs mensajeros de las dos subunidades de la RUBISCO en diferentes momentos de desarrollo de la hoja, aunado a la síntesis coordinada de subunidades polipeptídicas y ocurriendo a distintas velocidades, muestran que en esas etapas de desarrollo existe una coordinación gruesa a nivel transcripcional, mientras que el control fino ocurre a nivel traduccional.

X. LITERATURA CONSULTADA.

- Aldrich, J., B. Cherney, E. Merlin and J. Palmer. 1986. Sequence of the *rbcl* gene for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase from petunia. *Nucleic Acids Res.* 14:9535.
- Andrews, T.J. and B. Ballment. 1983. The function of the small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Biol. Chem.* 258:7514-7518.
- Barraclough, R. and R.J. Ellis. 1980. Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 608:19-31.
- Benson, A. A., J.A. Bassham, M. Calvin, T.C. Goodale, V.A. Haas and W. Stepka. 1950. The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. *J. Am. Chem. Soc.* 72:1710-1718.
- Berry, J.O., B.J. Nikolau, J.P. Carr and D.F. Klessig. 1985. Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase gene expression in light- and dark- grown amaranth cotyledons. *Molec. and Cell. Biol.* 5:2238-2246.
- Berry, J.O., B.J. Nikolau, J.P. Carr and D.F. Klessig. 1986. Translational regulation of light induced ribulose-1,5-biphosphate carboxylase gene expression in amaranth. *Molec and Cell Biol* 6:2347-2353.
- Berry-Lowe, S.L., T.D. Mc Knight, D.M. Shah and R.B. Meagher. 1982. The nucleotide sequence, expression and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in soybean. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:483-498.
- Blair, G.E. and R.J. Ellis. 1973. Protein synthesis in chloroplasts I. Light-driven synthesis of large subunit of fraction I protein by isolated pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 319:223-234.
- Brady, C.J. 1981. A coordinated decline in the synthesis of subunits of ribulosebiphosphate carboxylase in aging wheat leaves. I. Analyses of isolated protein, subunits and ribosomes. *Aust. J. Plant Physiol.* 8:591-602.

- Brogliè, R., G. Coruzzi, G. Lamppa, B. Keith and N.H. Chua. 1983. Structural analysis of nuclear genes coding for the precursor to the small subunit of wheat ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Biotechnology* 1:55-61
- Buzby, J.S., T. Yamada and E.M. Tobin. 1990. A light-regulated DNA-binding activity interacts with a conserved region of a *Lemna gibba* *rbcS* promoter. *The Plant Cell* 2:805-814.
- Cannon, S., P. Wang and H. Roy. 1986. Inhibition of ribulose bisphosphate carboxylase assembly by antibody to a binding protein. *J. Cell Biol.* 103:1327-1335.
- Chan, P.H. and S.G. Wildman. 1972. Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large subunit of fraction I protein. *Biochim. Biophys. Acta* 277:677-680.
- Clewell, D.B. and D.R. Helinski. 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular form. *PNAS* 62:1159-1166.
- Coruzzi, G., R. Brogliè, A. Cashmore and N.H. Chua. 1983. Nucleotide sequences of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the major chlorophyll a/b-binding thylakoid polypeptide. *J. Biol. Chem.* 258:1399-1402.
- Coruzzi, G., R. Brogliè, C. Edwards and N.H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3:1671-1679.
- Crossland, L.D., S.R. Rodermel and L. Bogorad. 1984. Single gene for the large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase in maize yields two differentially regulated mRNAs. *PNAS* 81:4060-4064.
- Dean, C. and R.M. Leech. 1982. The co-ordinated synthesis of the large and small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase during early cellular development within a seven day wheat leaf. *FEBS Let.* 140:113-116.
- Dean, C., P. van den Elzen, S. Tamaki, P. Dunsmuir and J. Bedbrook. 1985. Differential expression of the eight genes of the petunia ribulose bisphosphate carboxylase small subunit multi-gene family. *EMBO J.* 4:3055-3061.
- Dean, C., M. Favreau, D. Bond-Nutter, John Bedbrook and P. Dunsmuir. 1989. Sequences downstream of translation start regulate

- quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *The Plant Cell* 1:201-208.
- Deng, X.-W. and W. Gruissem. 1987. Control of plastid gene expression during development: Limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49:379-287.
- Dunsmuir, P., S. Smith and J. Bedbrook. 1983. A number of different nuclear genes for the small subunit of RuBPCase are transcribed in petunia. *Nucleic Acids Res.* 11:4177-4183.
- Ferreira, R.B. and D.D. Davies. 1986. Is protein degradation correlated with either the charge or size of *Lemna* proteins? *Planta* 169:278-288
- Flhur, R., P. Moses, G. Morelli, G. Coruzzi and N.H. Chua. 1986a. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts *EMBO J.* 5:2063-2071.
- Fluhr, R., C. Kuhlemeyer, F. Nagy and N.H. Chua. 1986b. Organ-specific and light induced expression of plant genes. *Science* 232:1106-1112.
- Flores, S. and E.M. Tobin. 1986. Benziladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: apparent post-transcriptional regulation. *Planta* 168:340-349.
- Fondy, B.R. and D.R. Geiger. 1981. Regulation of export by integration of sink and source activity. *What's New in Plant Physiol.* 12:33-36.
- Friedrich, J.W. and R.C. Huffaker. 1980. Photosynthesis, leaf resistances, and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 65:1103-1107.
- Fritz, C.C., T. Herget, F.P. Wolter, J. Schell and P.H. Schreier. 1991. Reduced steady-state levels of *rbcS* mRNA in plants kept in the dark are due to differential regulation. *PNAS* 88:4458-4462.
- Gatenby, A.A. and R.J. Ellis. 1990. Chaperone function: the assembly of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:125-149.
- Gilmartin, P.M., L. Sarokin, J. Memelink and N.H. Chua. 1990. Molecular light switches for plant genes. *The Plant Cell* 2:369-378.
- Giuliano, G., E. Pichersky, V.S. Malik, M.P. Timko, P.A. Scolnik and

- A.R. Cashmore. 1988. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *PNAS* 85:7089-7093.
- Goldthwaite, J.J. and L. Bogorad. 1971. A one-step method for the isolation and determination of leaf ribulose-1,5- diphosphate carboxylase. *Anal. Biochem.* 41:57-66
- Green, P.J., S.A. Kay and N.H. Chua. 1987. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.* 6:2543-2549.
- Gruissem, W. and G. Zurawski. 1985a. Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpB* and *psbA* genes. *EMBO J.* 4:3375-3383.
- Gruissem, W. and G. Zurawski. 1985b. Identification and mutational analysis of the promoter for a spinach chloroplast transfer RNA gene. *EMBO J.* 4:1637-1644.
- Hageman, R.H., E.R. Leng and J.W. Dudley. 1967. A biochemical approach to corn breeding. *Adv. Agron.* 19:45-86.
- Hall, N.P. and N.E. Tolbert. 1978. A rapid procedure for the isolation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from spinach leaves. *FEBS Lett.* 96:167-169.
- Hanes, B.D. and D. Rickwood. 1981. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL. Press. Oxford. pp 56-59.
- Hanley-Bowdoin, L. and N.H. Chua. 1987. Chloroplast promoters. *TIBS.* 12:67-70.
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A. pp 506.
- Hatch, M.D. and C.R. Slack. 1970. Photosynthetic CO₂-fixation pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21:141-162.
- Hudson, C. and F.C. Hay. 1980. Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications.
- Huffaker, R.C. and B.L. Miller. 1978. Reutilization of ribulose bisphosphate carboxylase. In: Photosynthetic carbon assimilation. Eds. H.W. Siegelman and G. Hind. Plenum Publishing Corp. pp 139-152.
- Inamine, G., B. Nash, H. Weissbach and N. Brot. 1985. Light regulation of the synthesis of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in peas: evidence for

- translational control. PNAS 82:5690-5694.
- Iwanij, V., N.H. Chua and P. Siekevitz. 1975. Synthesis and turnover of ribulose biphosphate carboxylase and of its subunits during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Biol. 64:572-585.
- Jensen, R.G. and J.T. Bahr. 1977. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. Annu. Rev. Plant Physiol 28:379-400.
- Jolly, S.O., L. McIntosh, G. Link, and L. Bogorad. 1981. Differential transcription *in vivo* and *in vitro* of two adjacent maize chloroplast genes. PNAS 78:6821-6825.
- Kawashima, N. and S.G. Wildman. 1972. Studies on fraction I protein. IV. Mode of inheritance of primary structure in relation to whether chloroplast or nuclear DNA contains the code for a chloroplast protein. Biochim. Biophys Acta 262:42-49.
- Klaff, P. and W. Gruissem. 1991. Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. The Plant Cell 3:517-529.
- Kobayashi, H. and T. Akazawa. 1982. Biosynthetic mechanism of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in purple photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. II. Biosynthesis of constituent subunits. Arch. Biochem. Biophys. 214:540-549.
- Kuhlemeier, C., P.J. Green and N.H. Chua. 1987. Regulation of gene expression in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 38:221-257.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
- Larimer, F.W., E.H. Lee, R.J. Mural, T.S. Soper and F.C. Hartman. 1987. Intersubunit location of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase as determined by *in vivo* hybridization of site-directed mutants. J. Biol. Chem. 262:15327-15329.
- Laskey, R.A. 1980. The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. Meth. Enzymol. 65:363-371.
- Lebrun, M., G. Waksman and G. Freyssinet. 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding corn ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase small subunit (*rbcS*). Nucleic Acids Res. 15:4360.
- Lorimer, G.H. and H.M. Mizioroko. 1980. Carbamate formation on the

epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulosebiphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry* 19:5321-5328.

Lorimer, G.H. 1981. The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: The primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:349-383.

Lorimer, G.H. and T.J. Andrews. 1981. The C₂ chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle. In: *The Biochemistry of Plants. Vol. 8 Photosynthesis.* Eds. M.D. Hatch and N.K. Boardman. Academic Press. New York. pp. 330-374.

Loza Tavera, H. 1984. Estudio de la ribulosa bifosfato carboxilasa en dos poblaciones de maíz de alto y bajo rendimiento. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Méx.

Loza-Tavera, H., B. Serrano, J.D. Molina, M.L. Ortega-Delgado and E. Sánchez-de-Jiménez. 1987. CO₂-fixation enzymes in maize (*Zea mays* L.) and grain yield. *Can. J. Bot.* 65:607-611.

Lundquist, T. 1990. Inhibitor binding to RUBISCO studied by chrystalography. *Conferencias Gordon: CO₂ fixation in plants.* New Hampshire, N.H. U.S.A.

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook (eds). 1982. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.

Manzara, T. and W. Gruissem. 1988. Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosynthesis Research* 16:117-139.

Martínez Barajas, J.E. 1989. Análisis de la regulación de la actividad de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa en maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Fac. de Química. UNAM.

Martínez Barajas, J.E. y E. Sánchez de Jiménez. 1991. La Rubisco-activasa y su relación con la regulación de la actividad de la Rubisco. Quinta Reunión Nacional de Bioquímica de Plantas. Saltillo, Coah. México.

Martínez-Barajas, E., C. Villanueva-Verduzco, J. Molina-Galán, H. Loza-Tavera and E. Sánchez de Jiménez. 1992. Relation of Rubisco to grain yield improvement: effect of water restriction. *Crop Sci.* En prensa.

Miziorko, H.M. and G.H. Lorimer. 1983. Ribulose-1,5- bisphosphate

- carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 52:507-35.
- Mullet, J.E., E.M. Orozco and N.H. Chua. 1985. Multiple transcripts for higher plant *rbcL* and *atpB* genes and localization of the transcription initiation site of the *rbcL* gene. *Plant Mol. Biol.* 4:39-54.
- Nelson, T., M.H. Harpster, S.P. Mayfield and W.C. Taylor. 1984. Light-regulated gene expression during maize leaf development. *J. Cell Biol.* 98:558-564.
- Nikolau, B.J. and D.F. Klessig. 1987. Coordinate, organ-specific and developmental regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in *Amaranthus hypochondriacus*. *Plant Physiol.* 85:167-173.
- Nivison, H.T. and C.R. Stocking. 1983. Ribulose bisphosphate carboxylase synthesis in barley leaves. A developmental approach to the question of coordinated subunit synthesis. *Plant Physiol.* 73:906-911.
- Oelmüller, R., G. Dietrich, G. Link and H. Mohr. 1986. Regulatory factors involved in gene expression (subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Planta* 169:260-266
- Ogren, W.L. 1984. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:415-442.
- Palmer, J.D., H. Edwards, R.A. Jorgensen and W.F. Thompson. 1982. Novel evolutionary variation in transcription and location of two chloroplast genes. *Nucleic Acids Res.* 10:6819-6832.
- Patterson, T.G., D.N. Moss and W.A. Brun. 1980. Enzymatic changes during the senescence of field-grown wheat. *Crop Sci.* 20:15-18.
- Peoples M.B., V.C. Beilharz, S.P. Waters, R.J. Simpson and M.J. Dalling. 1980. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Planta* 149:241-251.
- 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.
- Peterson, L.W., G.E. Kleinkopf and R.C. Huffaker. 1973. Evidence for lack of turnover of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in

- barley leaves. *Plant Physiol.* 51:1042-1045.
- Plechulla, B., E. Pichersky, A.R. Cashmore and W. Grussem. 1986. Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening. *Plant Mol. Biol.* 7:367-376.
- Polans, N.O., N.F. Weeden and W.F. Thompson. 1985. Inheritance, organization, and mapping of *rbcS* and *cab* multigene families in pea. *PNAS* 82:5083-5087.
- Poulsen, C. 1984. Two mRNA species differing by 258 nucleotides at 5' end are formed from the barley chloroplast *rbcL* gene. *Carlsberg Res. Commun.* 49:89-104.
- Ramty, B., G. Lorimer and S. Gutteridge. 1991. An intra-dimeric crosslink of large subunits of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is formed by oxidation of cystein 247. *Eur. J. Biochem.* 200:353-358.
- Radetzky, R. and K. Zetsche. 1987. Effects of specific inhibitors on the coordination of the concentrations of ribulose-bisphosphate-carboxylase subunits and their corresponding mRNAs in the alga *Chlorogonium*. *Planta* 172:38-46.
- Rodermel, S.R. and L. Bogorad. 1985. Maize plastid photogenes: mapping and photoregulation of transcript levels during light-induced development. *J. Cell Biol.* 100:463-476
- Roy, H., M. Blomm, P. Milos and M. Monroe. 1982. Studies on the assembly of large subunits of ribulose bisphosphate carboxylase in isolated pea chloroplasts. *J. Cell Biol.* 94:20-27.
- Roy, H. 1989. Rubisco assembly: a model system for studying the mechanism of chaperonin action. *The Plant Cell* 1:1035-1042.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1978. *Plant Physiology*. Second Edition. Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont Cal. U.S.A.
- Salvucci, M. 1989. Regulation of Rubisco activity *in vivo*. *Physiologia Plantarum* 77:164-171.
- Sasaki, Y., Y. Nakamura and R. Matsuno. 1987. Regulation of gene expression of ribulose bisphosphate carboxylase in greening pea leaves. *Plant Mol. Biol.* 8:375-382.
- Schmidt, G.W. and M.L. Mishkind. 1983. Rapid degradation of unassembled ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunits in chloroplasts. *PNAS* 80:2632-2636.

- Secor, J., R. Shibles and C.R. Stewart. 1983. Metabolic changes in senescing soybean leaves of similar plant ontogeny. *Crop Sci.* 23:106-110
- Sheen, J.Y. and L. Bogorad. 1985. Differential expression of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene in bundle sheath and mesophyll cells of developing maize leaves is influenced by light. *Plant Physiol.* 79:1072-1076.
- Sheen, J.Y. and L. Bogorad. 1986. Expression of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene and three small subunit genes in two cell types of maize leaves. *EMBO J.* 5:3417-3422.
- Simpson, E., R.J. Cooke and D.D. Davies. 1981. Measurement of protein degradation in leaves of *Zea mays* using [³H]acetic anhydride and tritiated water. *Plant Physiol* 67:1214-1219.
- Smith, S.M. and R.J. Ellis. 1979. Processing of small subunit precursor of ribulose bisphosphate carboxylase and its assembly into whole enzyme are stromal events. *Nature* 278:662-664.
- Speirs, J. and C.J. Brady. 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.
- Sugita, M. and W. Gruissem. 1987. Developmental, organ-specific and light-dependent expression of the tomato ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene family. *PNAS* 84:7104-7108.
- Sugita, M., T. Manzara, E. Pichersky, A. Cashmore and W. Gruissem. 1987. Genomic organization, sequence analysis and expression of all five genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tomato. *Mol. Gen. Genet.* 209:247-256.
- Tanaka, A. y J. Yamaguchi. 1977. Producción de materia seca, componentes del rendimiento y rendimiento de grano en maíz. Versión en español traducida por J. Kohashi S. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México. 124 pp.
- Thompson, W.F., M. Everett, N.O. Polans, R.A. Jorgensen and J.D. Palmer. 1983. Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves. *Planta* 158:487-500.

- Timko, M.P., A.P. Kausch, A.P. Hand, A.J. Cashmore, L. Herrera-Estrella, G. van den Breeck, M. van Montagu. 1985. Structure and expression of nuclear genes encoding polypeptides of the photosynthetic apparatus. In: Steinbeck, K.E., S. Bonitz, C.J. Arntzen and L. Bogorad (eds). Molecular biology of the photosynthetic apparatus. pp 381-396. N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tobin, E. and J. Siverthorne. 1985. Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:569-593.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *PNAS.* 70:4350-4354.
- Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:119-38.
- Vallejos, C.E., S.D. Tanksley, and R. Bernatzky. 1986. Localization in the tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45S), the mayor chlorophyll a/b binding polypeptide and the ribulose bisphosphate carboxylase genes. *Genetics* 112: 93-105.
- Weidner, M. and E. Fehling. 1985. Heat modification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by temperature pretreatment of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Planta* 166:117-127.
- Wittenbach, V.A. 1979. Ribulose bisphosphate carboxylase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. *Plant Physiol.* 64:884-887.
- Zurawski, G., B. Perrot, W. Bottomley and P.R. Whitfeld. 1981. The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res.* 9:3251-3270.
- Zurawski, G. and M.T. Clegg. 1987. Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:391-418.