



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" I Z T A C A L A "

EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA
ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBO-
XILASA EN HOJA DE MAIZ, DURANTE EL
PERIODO DE LLENADO DE GRANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

ANA LUZ BOUCHAN CALIX





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES :

LUCILA CALIX DE BOUCHAN

ROBERTO BOUCHAN REYES

A MIS ABUELOS :

ANA REYES DE BOUCHAN

ROBERTO BOUCHAN SANCHEZ (q.e.p.d)

EN RECONOCIMIENTO AL APOYO FIRME QUE SIEMPRE
ME HAN BRINDADO EN EL TRANSCURSO DE MI VIDA.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por haber dirigido esta tesis, por su apoyo y, principalmente por sus enseñanzas y esfuerzo en mi preparación.

Al Biol. Carlos Mújica Jiménez, por su ayuda y consejos para la terminación de este trabajo.

Al Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres, por su orientación al inicio del presente trabajo.

Al Biol. Agustín Vargas Vera, del Area de Matemáticas de la E.N.E.P - Iztacala, por su asesoría en algunos problemas estadísticos.

A Valente Salmerón Enríquez por su paciencia y estímulos para seguir adelante.

A DGAPA, por financiar este estudio.

A todas las personas que de alguna manera participaron en la elaboración de este trabajo.

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares. El proyecto fue apoyado por la DGAPA (Proyectos IN - 205389 y 24).

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
INTRODUCCION	1
I. ANTECEDENTES	3
1.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa	3
1.1.1 Reacción catalizada	3
1.1.2 Funciones metabólicas	4
1.1.3 Propiedades cinéticas	4
1.1.4 Características moleculares	5
1.1.5 Regulación fisiológica	6
1.2 La ruta C ₄ de asimilación del CO ₂	8
1.3 PEP carboxilasa y el mejoramiento de las plan <u>tas</u>	12
II. HIPOTESIS	13
III. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos particulares	13
IV. MATERIALES	14
4.1 Reactivos	14
4.2 Equipo	15
4.3 Material biológico	16
V. METODOS	16
5.1 Toma de muestras	16
5.2 Condiciones de luz	16
5.3 Extracción de la enzima PEPC	17

5.4 Determinación de la actividad de PEP carboxilasa	17
5.5 Determinación de proteínas	21
5.6 Obtención de anticuerpos anti-PEP carboxilasa	22
5.6.1. Preparación del antígeno	22
5.6.2. Inoculación	22
5.6.3. Obtención del suero inmune y no inmune	23
5.7 Determinación del título del anticuerpo anti-PEPC de hojas de maíz	23
5.7.1. Precipitación en capilares	23
5.7.2. Manchado puntual (DOT blot)	23
5.8 Cuantificación de PEPC por inmunotransferencia	26
5.8.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	26
5.8.2 Electrotransferencia de proteína a filtro de nitrocelulosa	28
5.9. Análisis estadístico de los resultados experimentales	31
VI. RESULTADOS	32
6.1 Actividad específica de PEP carboxilasa en hojas participantes en el llenado de grano de diferentes poblaciones de maíz	32
6.2 Contenido en proteína de hojas participantes en el llenado de grano de diferentes poblaciones de maíz	34

6.3 Propiedades regulatorias de PEPC en hojas par- ticipantes en el llenado de grano de diferentes poblaciones de maíz	36
6.3.1. Efecto del pH alcalino sobre la actividad de PEPC	36
6.3.2. Efecto de PEP libre sobre la actividad de PEPC	36
6.3.3. Efecto de glucosa 6-P sobre la actividad de PEPC	39
6.3.4. Efecto de malato sobre la actividad de PEPC ...	39
6.4 Cuantificación de la proteína PEPC en extrac- tos crudos de hojas participantes en el llenado de grano	41
VII. DISCUSION	46
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. BIBLIOGRAFIA	53

ABREVIATURAS

Anti-IgG	Anti-inmunoglobulinas G
ATP	Adenosín trifosfato
CAM	Metabolismo Acido Crasuláceo
cDNA	Acido desoxirribonucleico clonado
Da	Daltons
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
Glu-6-P	Glucosa-6-fosfato
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HClO ₄	Acido perclórico
HPO ₄ ⁻²	Fosfato monoácido de ...
kD	Kilodaltons
k _m	Constante de Michaelis-Menten
MDH	Málico deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido reducido
NAD ⁺	Nicotinamida adenin dinucleótido
OAA	Acido oxalacético
PBS	Solución salina de fosfatos
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P _i	Fósforo inorgánico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RUBISCO	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/ oxigenasa

SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-Page	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio
-SH	Grupo sulfhidrilo
TBS	Tampón base
TEA	Trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
Vmax	Velocidad máxima

RESUMEN

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31) es una enzima ampliamente distribuida en el reino vegetal. En las plantas con metabolismo C₄ y CAM, PEPC es una enzima clave que participa en la asimilación fotosintética del CO₂ atmosférico.

En el maíz, durante el periodo de llenado de grano, más del 90 % del peso de los granos se deriva de los fotosintatos producidos por las hojas ubicadas por encima de la mazorca. Puesto que el maíz es una planta C₄ resulta altamente interesante estudiar la participación de la enzima PEPC fotosintética de hoja en este proceso fisiológico del llenado de grano. Por otra parte, la composición entre los niveles de actividad de esta enzima en cultivos mejorados y no mejorados permitirá conocer si existen diferencias a este respecto, surgidas a consecuencia del proceso de mejoramiento. De ser así, los niveles de actividad de esta enzima podrían constituir un criterio bioquímico que permitirá una rápida selección de variedades de alta y baja productividad.

En el presente trabajo se midió la actividad de la enzima PEPC de hojas de maíz de cinco poblaciones, una original y cuatro mejoradas, de la variedad Zacatecas 58, durante el periodo de llenado de grano, para de esta forma establecer si existe una correlación entre la actividad de esta enzima y la productividad de un cultivo, medida como producción de grano.

Se observaron incrementos graduales de la actividad de la enzima durante las cuatro primeras semanas después de la antesis, seguidos de decrementos en esta actividad hasta el final del periodo de llenado de grano.

Los niveles de actividad determinados en las poblaciones mejoradas estuvieron casi siempre por encima de los niveles de la población original.

Las propiedades de regulación de la enzima, respuesta a pH, el inhibidor malato, el activador glucosa 6-P y las especies libres de PEP y Mg^{+2} , fueron las mismas para todas las poblaciones, lo que sugiere que no hay cambio en la calidad de la proteína, sino en la cantidad a consecuencia del mejoramiento. Esto fue corroborado por estudios de inmunoelectrotransferencia, en los que se obtuvo: a) que la cantidad de la enzima PEPC se incrementa durante la primera semana después de la antesis, disminuyendo con posterioridad y b) que la cantidad de la enzima es mayor en un cultivo mejorado que el original.

En base a los resultados descritos podemos concluir: 1° que la actividad y cantidad de PEPC se incrementa durante las primeras semanas del llenado de grano en respuesta probablemente a la demanda de fotosintatos por parte de la mazorca; y 2° que las diferencias observadas en cuanto a la actividad y cantidad de PEPC, entre la población original y las mejoradas pueden estar relacionadas con la característica de mayor productividad de estas últimas.

INTRODUCCION

La formación de la mazorca y el llenado de grano en una planta adulta de maíz requiere del suministro de una gran cantidad de fotosintatos por parte de las hojas implicadas en este proceso. Existen evidencias experimentales de que incrementos en el suministro de fotosintatos durante diferentes estadios del periodo de llenado de grano, tienen un efecto positivo y significativo sobre el rendimiento del proceso (Schoper et al., 1982). Se comprende fácilmente que aquellos factores que limiten el proceso fotosintético son factores limitantes de la productividad de la planta y que se necesita optimizar este proceso si queremos obtener el máximo rendimiento en un cultivo.

El maíz pertenece al grupo de plantas con fotosíntesis C_4 , caracterizadas por un alto nivel de productividad bajo condiciones de iluminación y temperaturas elevadas, y que además son capaces de sobrevivir en ambientes relativamente áridos. Estas propiedades de las plantas C_4 , se deben a la actuación integrada de dos rutas metabólicas: el ciclo de Calvin, responsable de la asimilación de CO_2 atmosférico en todos los organismos fotosintéticos, y el llamado ciclo C_4 , exclusivo de este tipo de plantas, que permite una eficiente asimilación fotosintética de CO_2 . La enzima clave de la ruta C_4 es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), ya que cataliza la fijación primaria de CO_2 atmosférico en compuestos orgánicos.

Por otra parte, trabajos recientes de selección masal sobre la variedad de maíz Zacatecas 58, realizados por el Dr. Molina Galán en el Colegio de Posgraduados de la Universidad Autónoma de

Chapingo, han producido notables mejoras en el rendimiento del cultivo bajo condiciones de sequía, rendimiento *in situ* y rendimiento rotativo (Vargas et al., 1982; Villanueva, 1988). Por lo que, resulta de sumo interés caracterizar bioquímicamente las diferencias entre los cultivos mejorados y los no mejorados, como medio de encontrar criterios bioquímicos que permitan la rápida selección de variedades de alta y baja productividad, bajo diversas condiciones ambientales.

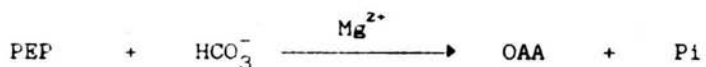
A este respecto, el estudio de la participación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en este proceso fisiológico de la planta, llenado de grano, en las poblaciones antes mencionadas, resulta altamente indicado y puede orientarnos en la tarea de obtener variedades agrícolas más convenientes.

I. ANTECEDENTES

1.1. Fosfoenolpiruvato carboxilasa

1.1.1. Reacción catalizada

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC - EC 4.1.1.31), cataliza la β -carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) para producir oxalacetato, de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta reacción es altamente exergónica (con un ΔG° de -6 kcal/mol) y prácticamente irreversible bajo condiciones celulares (O'Leary, 1982).

Esta actividad fue descubierta por Bandurski (1953) en tejidos de plantas, quien demostró que para la actividad catalítica es necesaria la presencia de Mg^{2+} .

Maruyama et al. (1966) demostraron que la carboxilación de PEP por la enzima extraída de cotiledones de cacahuete utiliza como sustrato bicarbonato (HCO_3^-) y no CO_2 , como ocurre en otras reacciones de carboxilación catalizadas enzimáticamente. Además los experimentos de Cooper and Wood (1971) y Mukerji (1977) indican que dicha enzima es la única carboxilasa que usa HCO_3^- como sustrato y no contiene biotina.

Estudios más recientes (Rodríguez-Sotres et al., 1990), muestran que, en contra de lo admitido por la mayoría de los investigadores hasta ese momento, el sustrato preferencial de la enzima a valores fisiológicos de pH no es PEP libre, sino el complejo PEP-Mg. PEP libre se comporta como un activador de la enzima.

1.1.2. Funciones metabólicas

Fosfoenolpiruvato carboxilasa está ampliamente distribuida en plantas, algas y bacterias, donde desempeña una gran variedad de funciones metabólicas, como son: 1) la fijación fotosintética de CO₂ en plantas de alta productividad, C₄ (Hatch, 1978), y de climas áridos y desérticos, CAM (Buchanan-Bolling and Kluge, 1981; Black, 1973); 2) la producción de oxalacetato alimentador del ciclo de Krebs (función anaplerótica) (Davies, 1979) y 3) regulación del pH intracelular (Latzko and Kelly, 1983; O'Leary, 1982; Iglesias et al., 1984).

1.1.3. Propiedades cinéticas

De acuerdo con Ting and Osmond (1973) las isoformas de PEP carboxilasa pueden clasificarse en tres grupos en base a la actividad específica de los extractos crudos y según su K_m (PEP): a) enzimas C₃ e isoformas anapleróticas con un bajo K_m y una baja actividad específica, b) enzimas CAM con un bajo K_m y una alta actividad específica y c) enzimas C₄ con un K_m elevado y una alta actividad específica. Estas diferencias están claramente relacionadas con el papel fisiológico que las enzimas juegan en los diferentes metabolismos de estas plantas (Melzer and O'Leary, 1987; O'Leary, 1982; Ting and Osmond, 1973).

La V_{max} de la enzima PEPC tipo C₄, objeto de este estudio, no se afecta por cambios de pH en un intervalo de 7.0 a 10.0, mientras que K_m (PEP) y K_m (Mg) disminuyen a medida que incrementa el pH (Iglesias and Andreo, 1983; O'Leary et al., 1981; Podestá and Andreo, 1989; Stiborová and Leblová, 1983).

1.1.4. Características moleculares

El peso molecular de la enzima nativa varía según la especie y el tejido del que se obtenga. La isoenzima fotosintética de maíz y de otras plantas C₄ tienen un peso molecular de 340,000 a 400,000 daltons (Ker and Robertson, 1971; Uedan and Sugiyama, 1976).

PEPC generalmente se ha descrito como un homotetrámero (O'Leary, 1982; Uedan and Sugiyama, 1976). Sin embargo, otros reportes (Wu and Wedding, 1985; Walker et al., 1986; Stiborová and Leblová, 1986; Wagner et al., 1987) muestran que la carboxilasa puede existir *in vivo* en diferentes formas oligoméricas.

Yanagisawa et al. (1988) dedujeron la secuencia de aminoácidos a partir de cDNA de hoja de maíz, encontrando que está compuesta por 970 restos de aminoácidos, con una masa molecular de 109,408 Da.

Estudios sobre la modificación química en la enzima de maíz, usando fenilglicoxal (Iglesias et al., 1984 b) y piridoxal-5-fosfato (Podestá et al., 1986) mostraron que dos residuos de arginina y cuatro de lisina, por cada tetrámero, son esenciales para la actividad y que ambos grupos pueden ser protegidos por PEP frente a la inactivación por reactivos específicos.

Además, varios autores (Manetas and Gavalas, 1982; Stiborová and Leblová, 1983; González et al., 1986) han reportado la participación de grupos tiol en la actividad de PEPC. Walker and Edwards (1986), demuestran que la modificación de estos grupos por p-cloromercuribenzoato (PCMB) y de histidinas, por dietilpirocarbonato (DEPC) causan disociación del tetrámero activo en dímeros y monómeros inactivos. Valores extremos del pH (inferiores a 6 y superiores a 8) pueden también disociar a la enzima en dichas subunidades (Stiborová and Leblová, 1986).

1.1.5. Regulación fisiológica

La PEPC de hoja de plantas C₄ es una enzima reguladora, para la que se han reportado diversos efectores. Entre los de posible significancia fisiológica hay que mencionar a glucosa (Wedding et al., 1969; Uedan and Sugiyama, 1976; Chou and Shi, 1984; Coomb et al., 1973; Huber and Edwards, 1977; Mares and Leblová, 1980; Wong and Davies, 1972) y glicina (Chou and Shi, 1984; Mares and Leblová, 1980), ambos activadores y L- malato, formado por reducción del oxalacetato mediante la enzima cloroplástica malato deshidrogenasa, dependiente de NADP, y el aspartato (Huber and Edwards, 1975; Iglesias et al., 1986), resultante de la transaminación del oxalacetato, como inhibidores.

La estimulación de la actividad de PEPC de hojas de plantas C₄ por iluminación de las hojas antes de la extracción, indica que la luz está también involucrada en la regulación a corto plazo de la actividad de esta enzima (Karabourniotis et al., 1983). Esta regulación consiste en fosforilación- desfosforilación del grupo hidroxilo de la Ser-15 de la enzima (Jiao and Chollet, 1989); lo

cual implica que existen dos formas de PEPC interconvertibles por modificación covalente postraducciona; la forma de día (que es la fosforilada) presenta una mayor afinidad por el sustrato PEP y una menor sensibilidad a inhibición por malato que la forma de noche (desfosforilada). Ello a su vez se traduce en una mayor actividad de la enzima durante el periodo de luz *in vivo* (Huber and Sugiyama, 1986; Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares, 1987; Rodríguez-Sotres et al., 1987).

El mecanismo molecular responsable de estos cambios en el comportamiento cinético de la enzima no es la oxidorreducción de grupos -SH como habían propuesto algunos autores (Iglesias and Andreo, 1984 a; Karabourniotis et al., 1983), sino más bien el cambio en el estado de fosforilación de restos seril de la enzima ya mencionados (Budde and Chollet, 1986; Jiao and Chollet, 1989).

Además, López-Pozos et al. (1990), mostraron que tanto la forma de día como la de noche presentan histéresis en extractos crudos desalados, siendo este fenómeno diferido por la disociación de los tetrámeros activos en dímeros menos activos o inactivos. Ambas formas difieren en cuanto a sus características histeréticas, lo que podría indicar que la proporción de dímeros y tetrámeros de esta enzima presente *in vivo* depende de las condiciones de iluminación a que la planta esté sometida o bien podría igualmente ser un reflejo de la diferente afinidad que poseen ambas formas por sus ligandos.

1.2 La ruta C₄ de asimilación del CO₂ atmosférico

Las llamadas plantas C₄, a las cuales pertenece el maíz, se caracterizan por tener una ruta de fijación de CO₂ que involucra a dos tipos de células diferentes: las más externas, cuya pared celular es delgada y que realizan el intercambio de los gases con la atmósfera, denominadas células del mesófilo y las células que se encuentran en la parte central de la hoja rodeando a los haces vasculares, llamadas células de la vaina vascular, que por tener una pared celular gruesa y suberificada, se localizan aisladas del intercambio de gases (FIG. 1). Estas células se comunican con las células de mesófilo a través de unos canales que atraviesan la gruesa capa de suberina llamados plasmodesmos. Los cloroplastos de las células de la vaina vascular contienen todas las enzimas del ciclo de Calvin y, por tanto se encargan de la asimilación del CO₂ en triosas fosfato y de la síntesis de almidón. Sin embargo, la cantidad de luz que llega hasta ellas es mínima y, parte del poder reductor requerido por sus cloroplastos en la síntesis de azúcares es importado de los cloroplastos del mesófilo en forma de compuestos reducidos (Edwards and Huber, 1981; Osmond et al., 1980; Welkie and Coldwell, 1988).

La figura 2 muestra un esquema de la vía C₄ como se ha propuesto que ocurre en las hojas de maíz. En el primer paso de asimilación de CO₂ se encuentra la reacción catalizada por PEP carboxilasa, que se localiza en el citoplasma de las células del mesófilo. El CO₂ asimilado en ácido oxaloacético, es introducido por un intercambiador de dicarboxilatos al cloroplasto donde es reducido a malato, con el consecuente consumo de NADPH por la

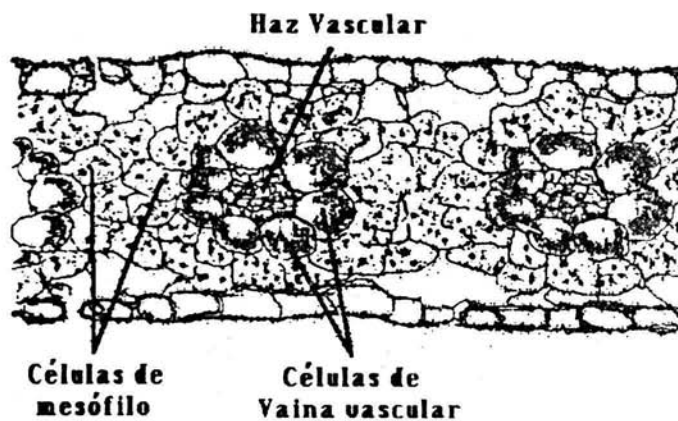


Fig. 1. Corte transversal de la hoja de una planta C_4 mostrando la típica anatomía KRAZ característica de este grupo de plantas superiores (Good and Bell, 1980; Laetsch, 1974).

enzima malato deshidrogenasa dependiente de NADP. El malato sale por medio del intercambiador de dicarboxilatos y difunde libremente hacia las células de vaina vascular, en donde es nuevamente transportado al interior del cloroplasto. Aquí el malato es descarboxilado por la enzima malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP. El CO₂ liberado por esta reacción es recapturado por la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RUBISCO) para alimentar el ciclo de Calvin, en donde es definitivamente fijado en compuestos reducidos. El piruvato resultante de la descarboxilación del malato regresa al cloroplasto del mesófilo en un proceso que involucra al menos un transportador activo a nivel de la membrana del cloroplasto del mesófilo. Este piruvato es utilizado para la síntesis de PEP gracias a la reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP así sintetizado es transportado al exterior del cloroplasto, en un intercambio con fosfatos, para servir de sustrato a la PEP carboxilasa completando el ciclo de intermediarios de la ruta C₄ (Coombs,1979; Edwards and Huber,1981; Good and Bell,1980; Hatch,1978; Ray and Black,1979).

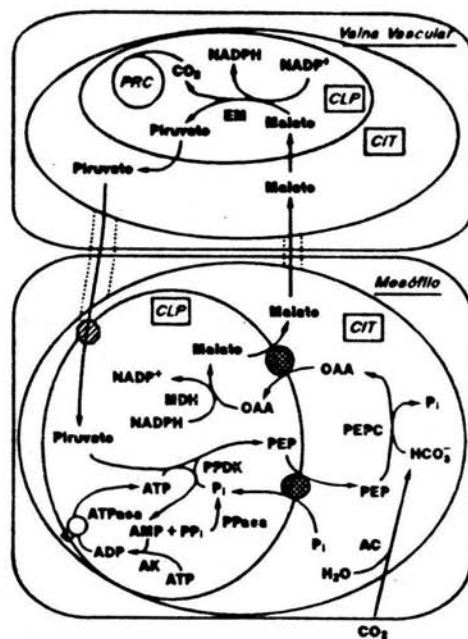


Fig. 2 Esquema del metabolismo fotosintético de las plantas C_4 del tipo EM-NADP (enzima málica dependiente de NADP). A este grupo de plantas pertenece el maíz (*Zea mays*). Existen variantes de este metabolismo que difieren en el tipo de ácidos C_4 que sirven para el transporte de CO_2 hacia el interior de las células de vaina vascular y en la enzima descarboxilante; el resto del metabolismo es igual en todas las plantas C_4 (Hatch, 1978; Hatch and Osmond, 1976; Laetsch, 1974 y Rathman, 1978). Abreviaturas: PRC, ciclo de Calvin; CLP, cloroplasto; CIT, citoplasma; AC, anhídrido carbónico; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; PPAsa, piruvato pirofosfatasa; ATPasa, ATP sintetasa cloroplástica; PPDK, piruvato ortofosfato dicinasa; MDH, malato deshidrogenasa (NADP); EM, enzima málica (NADP); P_i , fosfato inorgánico; PP_i , pirofosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxalacetato; ATP, ADP y AMP, nucleótidos de adenina; $NADP^+$ y NADPH, fosfatos de dinucleótido de adenina y nicotinamida.

1.3. PEPC y el mejoramiento de las plantas

Desde hace tiempo se conoce que la capacidad de crecimiento de todos los órganos de una planta está determinada por la eficiencia en la fijación de CO_2 y la forma en que se distribuyen los productos sintetizados (Gifford and Evans, 1981).

Craft-Brandner y Poneleit (1987), estudiando el comportamiento de la actividad fotosintética en diferentes poblaciones de maíz durante el periodo de llenado de grano encontraron que los perfiles de actividad de PEPC se mueven en paralelo a los perfiles de intercambio de CO_2 . Así mismo, Sugiyama et al. (1984), observaron correlaciones altamente positivas entre las actividades de PEPC y la producción de biomasa en maíz. Estos datos mostraron que el nivel de esta enzima en el sistema de captación de CO_2 en la fotosíntesis C_4 , es más crítico que el de la enzima carboxilante del ciclo de Calvin, Rubisco, y que por tanto PEPC es una enzima determinante de la productividad de biomasa en plantas de maíz.

II. HIPOTESIS

Se propone como hipótesis de trabajo que la actividad y/o cantidad de PEPC se incrementa en las hojas que participan en el llenado de grano y que la magnitud de estos incrementos podrá variar dependiendo de las características de productividad de la población estudiada.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

En base a los antecedentes expuestos, en el presente trabajo nos propusimos seguir la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hojas de maíz de las poblaciones original y mejoradas de la variedad Zacatecas 58, durante el periodo de llenado de grano.

De esta forma se pretendió establecer si existe una correlación entre la actividad de esta importante enzima fotosintética y la productividad de un cultivo de maíz, medida como producción de grano.

3.2. Objetivos particulares

i) Determinar la actividad específica de PEPC en hojas adultas de maíz, que participan en el llenado de grano, en poblaciones de diferente productividad: SM20, SM10 rotativa, SM10 *in situ*, SM10 seca y original.

ii) Determinar las propiedades regulatorias de esta enzima a lo largo del periodo de llenado de grano.

iii) Cuantificar las proteínas totales y realizar una estimación aproximada de la proteína PEPC en las hojas participantes del llenado de grano, de las poblaciones en estudio.

IV. MATERIALES

4.1. Reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales:

De Aldrich Chemical Company, Inc.: TEA, trietanolamina.

De American Can. Co.: parafilm oil.

De Baker: EDTA (ácido etilendiaminotetra-ácetico), etanol, ácido perclórico.

De Bio-Rad: TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina).

De GIBCO: 4-cloro-1 naftol, anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa, membranas de nitrocelulosa (0.22 μ).

De Merck: glicerol, ácido clorhídrico, persulfato de amonio, cloruro de sodio, agar-agar, metanol, polietilenglicol (PEG), cloruro de magnesio, tris(hidroximetil)-aminometano.

De Pharmacia Chemicals: Sephadex G-25.

De Productos Químicos Monterrey: ácido acético.

De Sigma Chemical Co.: 2-mercaptoetanol, polivinilpolipirrolidona (PVPP), nicotinamida adenina dinucleotido reducido (NADH), fosfoenolpiruvato (PEP), deshidrogenasa málica (MDH), acrilamida (grado electroforético), bisacrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS), pepsina, fosforilasa b, albúmina de huevo, albúmina bovina, azul brillante R (C.I. 42660), azul brillante G (C.I. 42655), trizma base, ácido ϵ -Amino-n-caproico, metanol, agua oxigenada, tween-20, rojo Ponceau S, triton X-100 (octil-fenoxi-poliatoxietanol).

4.2 Equipo

Para medir la actividad enzimática se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer 553 uv/vis con temperatura constante y registrador integrado.

En la determinación colorimétrica de proteínas se usó un espectrofotómetro Beckman DU-65 y el programa Quant II lineal de Beckman Instruments.

Las balanzas analíticas utilizadas para pesar los reactivos químicos fueron Sartorius handy modelo H-51 y Sartorius 2354, con capacidad de 100 ± 0.0001 grs. y 1000 ± 0.01 grs., respectivamente.

Para medir el pH se empleó un potenciómetro Conductronic modelo pH 20 con precisión de ± 0.01 .

Las microjeringas y pipetas automáticas empleadas fueron Hamilton y Rainin, respectivamente.

La centrifugación de pequeños volúmenes se hizo en una centrífuga para hematocrito Hawksley.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, se realizó en un aparato vertical Hoefer Scientific Instruments modelo Mighty Small II SE-250, con una fuente de poder regulada Nucleoelectrónica.

Las preparaciones químicas y soluciones en general, que necesitaban bajas temperaturas, fueron almacenadas en un refrigerador marca Bendix (4°C) o en un congelador marca Form Scientific (-70°C).

4.3 Material biológico

Se utilizaron plantas adultas de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad Zacatecas 58 original y poblaciones derivadas de la misma, obtenidas después de una selección masal para rendimiento de grano (SM10 rotativa, SM10 *in situ*, SM10 seca y SM20).

Las plantas fueron sembradas en los terrenos del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Estado de México por el Dr. Molina Galán, bajo condiciones de riego.

V. METODOS

5.1. Toma de muestras

Para el estudio de la actividad de PEPC y la cuantificación de proteínas totales y PEPC se realizaron muestreos semanales de la hoja inmediata superior a la mazorca en nueve plantas adultas elegidas al azar. Los muestreos se llevaron a cabo durante el periodo de llenado de grano, el cual se consideró desde el momento de la floración masculina, antesis, hasta que los granos alcanzaron la madurez fisiológica, -aproximadamente sesenta días después de la antesis.

5.2. Condiciones de luz

Las hojas fueron sometidas a dos horas de oscuridad con la finalidad de homogenizar las características de la enzima.

Las muestras de hoja (de aproximadamente 2 cm), se lavaron y enjuagaron con abundante agua destilada, quitándoseles la nervadura central. Posteriormente, fueron subdivididas en cuatro paquetes que se guardaron en el congelador a -70°C .

5.3 Extracción de la enzima PEPC.

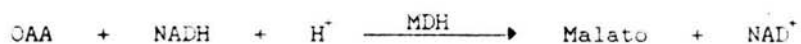
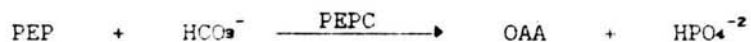
Los trozos de hoja se pesaron y homogenizaron en un mortero conteniendo un poco de arena de mar lavada y amortiguador de extracción (en una proporción 5 ml/ gr tejido fresco). Este amortiguador consiste en: TEA-HCl 100 mM, pH 7.0, EDTA 1mM, Cl₂Mg 3mM, polietilenglicol (PEG) 3% (p:v), malato 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM y polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP) 2% (p:v). Los dos últimos componentes se agregaban extemporáneamente.

El homogenado obtenido se filtró a través de cuatro capas de gasa, y se centrifugó durante 3 minutos a temperatura ambiente en microfuga. Con el fin de eliminar los componentes de bajo peso molecular (metabolitos) contenidos en el extracto crudo, y que pudieran influir en el ensayo, el sobrenadante obtenido se pasó por una columna de Sephadex G-25 (con un volumen de cama de 5 ml), preequilibrada previamente con amortiguador de extracción sin 2-mercaptoetanol ni PVPP. Después del volumen vacío, se colectaron de 1-3 ml del extracto desalado para la determinación inmediata de la actividad de PEPC.

5.4 Determinación de la actividad de PEP carboxilasa

La actividad de PEPC se determinó espectrofotométricamente utilizando un sistema acoplado a la enzima málico deshidrogenasa dependiente de NADH (E.C. 1.1.1.37) (Uedan and Sugiyama, 1976);

dense el oxalacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato gracias a la actividad de la enzima málico deshidrogenasa que paralelamente oxida NADH a NAD^+ según el siguiente esquema de reacciones:



La cantidad de oxalacetato producido durante el transcurso de la reacción puede así medirse siguiendo el descenso de la densidad óptica a 340 nm, causado por la conversión de NADH a NAD^+ .

El amortiguador empleado en la determinación de la actividad contenía TEA-HCl 100 mM y EDTA 1 mM a un pH 7.3 y 8.0. La composición del medio de reacción estándar fue la siguiente:

Reactivos	Volumen (μ l)	Concentraci3n final en el medio de ensayo (mM)
Amortiguador TEA 200mM. EDTA 2mM	500	100
NADH/NaHCO ₃ (20mM)	10	0.2/1
PEP 200 mM	10 6.5*	2 1.3
Cl ₂ Mg (1 M)	10 28*	10 28
MDH (200 u/ml)	25	5 u/ml
Glucosa 6-fos- fato (200 mM)	10**	2
Malato (500 mM)	10***	5
Agua	el volumen necesario para completar un mililitro.	
Volumen final	1.0 ml	

* Añadido sólo en los ensayos en que se midió la sensibilidad de la enzima a una baja concentraci3n de PEP libre.

** Añadido sólo en los ensayos en que se midió la sensibilidad a glucosa-6P.

*** Añadido sólo en los ensayos en que se midió la sensibilidad a malato.

Todas las muestras fueron incubadas durante 3 min., para que alcanzaran la temperatura a la que se llevaba a cabo la reacción (30°C). Esta reacción se inició añadiendo el volumen deseado de la preparación enzimática (10 y 5 μ l). La pendiente obtenida (cambio de densidad óptica/min.) se midió durante los primeros 3 minutos de la reacción, para así tener una linealidad adecuada de cambios de absorbancia frente a tiempo. Todas las determinaciones de actividad se hicieron por duplicado.

La actividad enzimática de PEPC fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$A = \frac{\Delta \text{ Abs}}{t \text{ (min)}} \times \frac{1}{E} \times \frac{1}{V \text{ (ml)}}$$

donde;

A = actividad

E = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6.22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$).

V = volumen de enzima usado en el ensayo

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de transformar un μ mol de fosfoenolpiruvato por minuto bajo las condiciones experimentales mencionadas. La actividad específica (unidades/mg proteína) se obtuvo dividiendo el valor de μ /ml por los mg de proteína que contuviera 1 ml de la preparación enzimática utilizada.

5.5 Determinación de proteínas

Se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976). Este método se basa en la formación de un complejo azul entre el reactivo azul de Coomassie (azul brillante G) y los residuos de arginina (Hammond and Kruger, 1988).

El reactivo azul de Coomassie, se preparó al 0.05 % (w:v) en una solución de HClO₄ 0.6 % (w:v). Se dejó agitar toda una noche a temperatura ambiente, tras lo cual se filtró a través de papel Whatman (0.45 μ m) en buchner y posteriormente en papel Millipore (0.22 μ m) para eliminar residuos no disueltos.

A 40 μ l del extracto de hoja obtenido para la medición de actividad, se le agregó 1 ml de azul de Coomassie, se mezcló perfectamente y fue leído a 595 nm frente a un blanco que había sido tratado de la misma manera y que contenía 40 μ l del amortiguador en que se había extraído la proteína. La curva patrón se construyó usando cantidades de albúmina comprendidas entre los 10 y 80 μ g, rango en el cual hay una buena proporcionalidad. Las determinaciones de la concentración de proteína en las muestras se hicieron por duplicado.

5.6. Obtención de anticuerpos anti-PEP carboxilasa

5.6.1. Preparación del antígeno

Como antígeno se utilizó PEP carboxilasa purificada de hoja verde de maíz con un grado de pureza del 99 %. Una preparación de PEPC de un grado de pureza de alrededor del 90 % se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, y la banda de proteína correspondiente a PEPC fue cortada del gel y triturada con nitrógeno líquido en un mortero. Posteriormente se dializó frente a PBS.

La suspensión obtenida se mezcló en condiciones de esterilidad en proporciones iguales con adyuvante de Freund, para ser aplicada a los conejos.

5.6.2. Inoculación. Se utilizaron dos conejos de la raza Nueva Zelanda de dos meses de edad.

Esquema utilizado para la obtención de anticuerpos

Días	Inoculación	Antígeno (μg)	Vía
0	Primera	300	Intramuscular
15	Segunda	100	Intramuscular
21	Tercera	100	Intramuscular
28	Primer sangrado de prueba: vena de la oreja, 3 ml por conejo.		
33	Cuarta	100	Intramuscular
43	Segundo sangrado de prueba		
45	Sangrado final: punción cardiaca		

5.6.3. Obtención del suero inmune y no inmune

Para la obtención del suero, la sangre de conejo no inmunizado e inmunizado se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo tras lo cual se incubó a 4° C durante 24 horas. Después se centrifugó a 5000 x g durante media hora. El sobrenadante (suero) fue decantado e incubado una hora a 37° C en baño maría para eliminar el complemento, guardándose en alícuotas de 1 ml a 70° C.

5.7. Determinación del título del anticuerpo anti-PEPC de hojas de maíz.

5.7.1. Precipitación en capilares

Esta prueba se usó para la detección inicial de los anticuerpos en el suero. Tubos capilares de 0.025 ml de capacidad se llenaron a la mitad de su volumen con diferentes diluciones del antígeno (PEPC purificada de hojas de maíz) y la otra mitad fue completada con el antisuero. En todos los tubos donde existían anticuerpos frente a este antígeno y la proporción de ambos era adecuada, se formó un precipitado blanco perfectamente visible después de 36 horas de incubación a 4° C.

5.7.2. Manchado puntual (DOT blot)

Este ensayo se realizó con el fin de conocer la dilución de suero más adecuada para la inmunodetección de proteína PEP carboxilasa.

Para dicho propósito se utilizaron cinco tiras (1 cm x 10 cm) de papel de nitrocelulosa, a las cuales se les aplicaron diluciones variables de la enzima purificada y de extracto crudo de hoja en un volumen de carga de 2 μ l de muestra, dejando entre cada problema un espacio de 0.5 cm (Fig. 3). Cada tira, después de ser secada a temperatura ambiente y marcada para su identificación fue procesada como se describe en el inciso (c) del punto 5.8.2. de Métodos e incubada con una dilución diferente de anticuerpo (1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:5000). El título así determinado fue de 1:500, elegido por formar un precipitado azul-violáceo sobre todas las manchas problema.

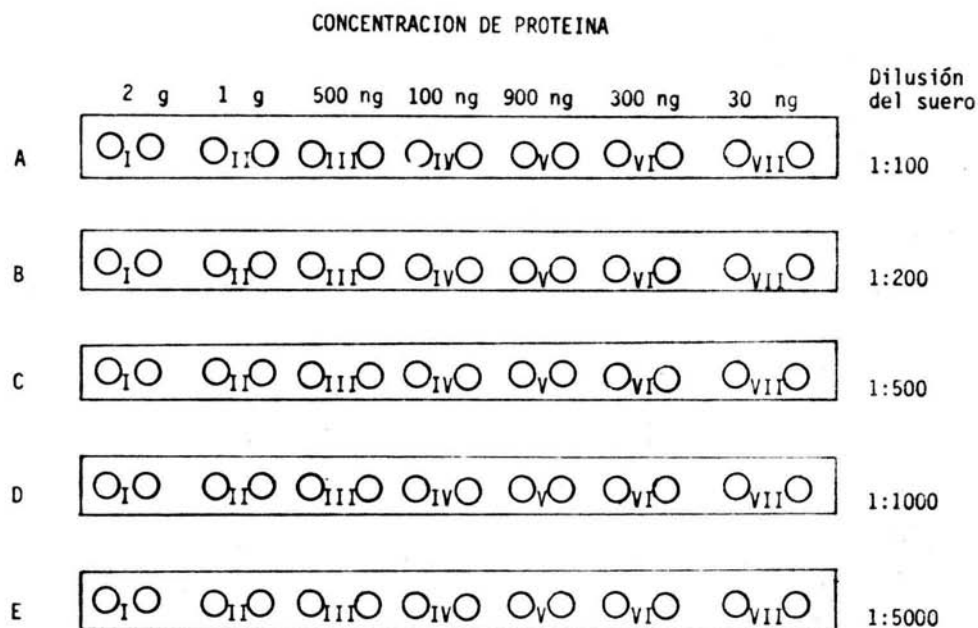


Fig. 3 Representación de la distribución y aplicación de muestras sobre el papel de nitrocelulosa para la realización del DOT. I-IV: Extracto crudo, V-VII: enzima pura.

5.8. Cuantificación de PEPC por inmunotransferencia

5.8.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis se llevó a cabo bajo condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS), mediante una modificación al método de Laemmli (1970) como se describe a continuación:

a) Preparación de los geles

Los geles empleados fueron dos: Primero un gel separador de 7.5 % T (porcentaje total monómeros acrilamida+bisacrilamida) de 5 cm de longitud, conteniendo Tris-Cl 1.5 M y SDS 0.1 % a pH 8.8. El segundo fue un gel apilador de 4 % T, colocado sobre el gel separador, compuesto de Tris-Cl 0.5 M a pH 6.8. Ambos geles fueron preparados mezclando las soluciones siguientes:

	7.5%T 2.7%C Gel separador	4 %T 2.7%C Apilador
Acrilamida-bisacrilamida (30 % T, 2.7 % C)	5 ml	1.34 ml
Amortiguador de separación	5 ml	
Amortiguador apilador		2.5 ml
SDS 10 %		100 µl
Agua	9.86 ml	6 ml
Persulfato de amonio	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Volumen final	20 ml	10 ml

Los dos últimos componentes se añadieron después de haber desgasado por un periodo de 10-15 minutos.

b) Preparación de la muestra

Todas las muestras aplicadas a electroforesis se tomaron de los extractos crudos obtenidos como se describió en Métodos (5.3) y fueron mezcladas a volúmenes iguales con el amortiguador de carga (Tris-Cl 0.25 M, glicerol 20 %, SDS 4 % y azul de bromofenol 4 mg/ml). Después se calentaron durante 10 minutos a 100°C.

c) Amortiguador de electrodos

Tris-Cl 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1 % a pH 8.3.

d) Condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron en un volumen de 30 μ l en cada carril para evitar en lo posible el ensanchamiento de las bandas de proteína durante la corrida electroforética. Esta se realizó a temperatura ambiente a 25 mA siendo su duración de 2 hrs y media. La electroforesis se dio por terminada cuando el indicador del frente electroforético (azul de bromofenol) llegaba a 0.5 cm del frente.

Las proteínas marcadoras usadas para determinar los pesos moleculares de las bandas de proteína obtenida se prepararon de la misma manera que las muestras problema, pero atendiendo a las especificaciones de la casa comercial en tanto a su contenido a usar. Los marcadores aplicados fueron los siguientes:

PROTEINAS	PESO MOLECULAR
Fosforilasa b	97,400 Daltons
Albumina bovina	66,000 "
Albumina de huevo	45,000 "
Pepsina	34,700 "

e) Revelado de los geles

Las bandas de proteína presentes en el gel, fueron fijadas incubando el gel durante una hora en una solución de ácido acético:agua:metanol en una proporción 5:1:5. Posteriormente el gel se tiñó por otra hora con azul de Coomassie R :0.125 % (p:v) en metanol 50 % (v:v) y acético 10 % (v:v) en agua.

El desteñido se realizó lavando el gel frecuentemente, primero en la solución de fijación y finalmente en una solución de acético al 5 % (v:v) y metanol al 10 % (v:v) en agua.

5.8.2. Electrotransferencia de proteína a filtro de nitrocelulosa (Western blot)

Una vez terminada la electroforesis para separar las proteínas del extracto crudo, se procedió a transferirlas a un papel de nitrocelulosa. Para ello se siguió el método de Torrent (1991) descrito a continuación:

a) Reactivos

Solución anódica 1:	Tris 0.3 M pH 10.4 Metanol 20 % (v:v)
Solución anódica 2:	Tris 25 mM pH 10.4 Metanol 20 % (v:v)
Solución catódica 3:	Acido ϵ -amino-n-caproi- co 10 mM pH 7.2 Metanol 20 %
Tampón base (TBS) :	Tris 50 mM pH 7.4 NaCl 0.15 M
TBS -NaCl 1 M	
Solución de saturación:	Tween 20 0.05 % (v:v) Leche descremada Sveltes 5 % (w:v) en TBS.
Solución reveladora :	11 mg 4-cloro-1-naftol 5.5 ml Metanol 16.5 ml de TBS 22 μ l agua oxigenada 30 %

b) Transferencia de proteína a filtro de nitrocelulosa

El gel de acrilamida se lavó brevemente en agua bidestilada y se colocó en medio de una cama de filtros en el orden siguiente:

- (-) 7 filtros papel Whatman común en solución anódica 1
- 2 filtros papel Whatman común en solución anódica 2
- 1 filtro papel Whatman 3MM en solución anódica 2
- Papel de nitrocelulosa en solución anódica 2

Gel

1 filtro papel Whatman 3MM en solución catódica 3

(+) 2 filtros papel Whatman común en solución catódica 3

Es importante que todos los componentes estén bien embebidos en las soluciones correspondientes y que no se formen burbujas entre ellos.

El sandwich se coloca en la cuba de transferencia y se deja transferir durante una hora a 50 voltios y temperatura ambiente.

c) Inmunodetección de proteína

Después de ser transferido el gel al filtro de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de saturación durante una hora. Posteriormente fue lavado dos veces con TBS normal durante 15 min. para entonces ser incubado con el primer anticuerpo (anti-PEPC de hoja verde de maíz) por dos horas a 37°C.

A continuación se lavó de nuevo el filtro dos veces en TBS, otra vez en TBS conteniendo NaCl 1 M, seguido de dos lavados más con TBS.

El filtro se incubó con inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa, por un periodo de dos horas, en la solución de saturación.

Finalmente, tras dos lavados consecutivos en TBS de 15 min. cada uno, el filtro fue revelado con el sustrato insoluble de la peroxidasa, sumergiéndose en la solución reveladora hasta la aparición de la banda de proteína. La reacción se detuvo entonces lavando con agua bidestilada.

El filtro se secó y guardó en oscuridad en un lugar fresco donde puede mantenerse por tiempo considerable.

5.9. Análisis estadístico de los resultados experimentales

Para el tratamiento estadístico de los datos de actividad específica obtenidos, así como los de proteína total, se utilizó un análisis de varianza para un diseño experimental con dos factores (Durán et al., 1989). El nivel de significancia fue $\alpha = 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 Actividad específica de PEP carboxilasa de hojas participantes en el llenado de grano de diferentes poblaciones de maíz.

La actividad de PEPC fue medida en extractos desalados de hojas adultas de maíz participantes en el llenado de grano de la población original Zacatecas 58 y de las poblaciones mejoradas derivadas de ella. Para extraer la actividad de PEPC se utilizó un amortiguador TEA-HCl pH 7.0 que garantizó un mayor rendimiento y estabilidad enzimática. Además, para proteger a la enzima de la acción de polifenoles y la oxidación de grupos -SH, se empleó PVPP y 2-mercaptoetanol, respectivamente (véase inciso 5.3 de Métodos).

Los valores de actividad específica de la enzima, es decir unidades enzimáticas por mg de proteína, obtenidos durante el periodo de llenado de grano se muestran en la Fig. 4.

La evolución de esta actividad fue muy similar en cuatro de las poblaciones, observándose un incremento desde la antesis hasta la tercera semana después de ella. La actividad desciende tras este máximo, rápidamente al principio y más lentamente después, hasta alcanzar niveles muy bajos, que corresponden con la aparición de signos de senescencia en las hojas objeto de estudio. La población SM20 no presentó el incremento inicial a la tercera semana de la antesis. La actividad de esta población decrece en forma prácticamente continua a partir de la antesis.

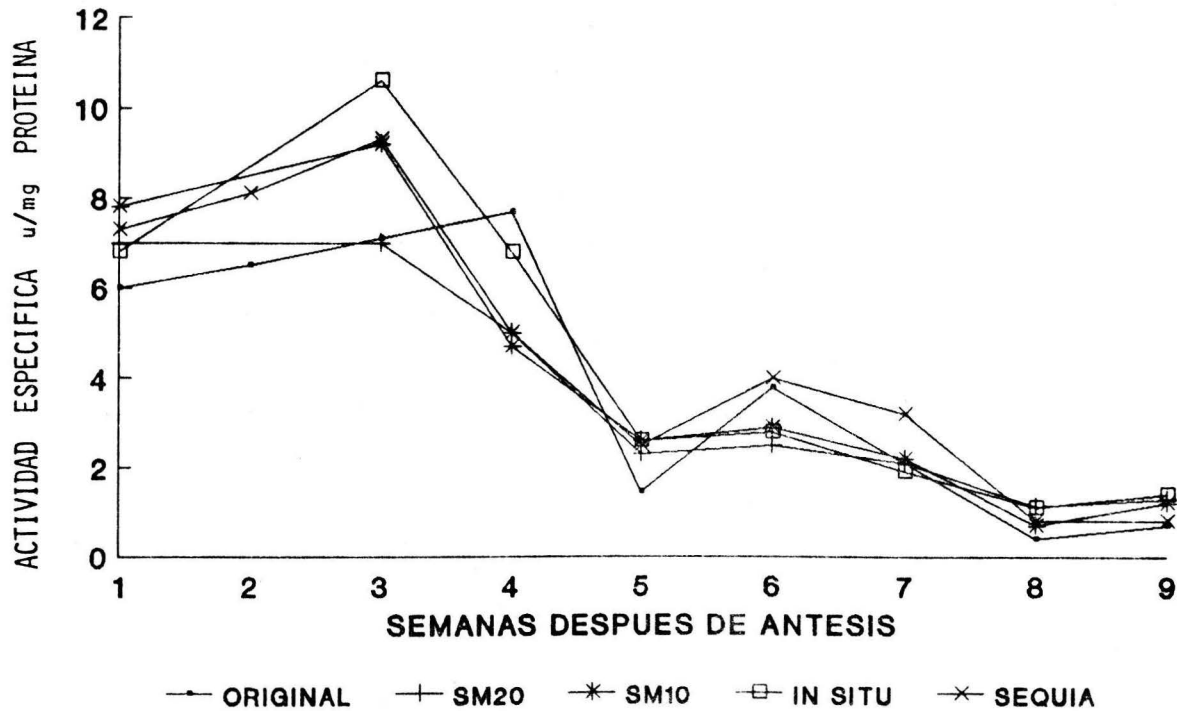


Fig. 4 Actividad específica de PEPC en extractos desalados de hojas participantes en el llenado de grano de maíz Zacatecas 58. La actividad se determinó a 30°C en un amortiguador TEA-HCl 100mM, pH 7.3, EDTA 1mM.

En la Fig. 4 se omitieron las desviaciones estándares de cada uno de los datos obtenidos experimentalmente por razones de claridad de esta figura. Las desviaciones no fueron en ningún caso superiores al 10 % del valor de actividad encontrado.

Puede apreciarse que la actividad encontrada en la población original fue casi siempre menor que la encontrada en las poblaciones mejoradas. El análisis de la varianza (ANOVA bifactorial) de los datos nos indicó que las diferencias encontradas entre la población original y las mejoradas si son significativas F calculada (F_c) = 20 (a un α = 0.05). Igualmente, las diferencias halladas a lo largo del periodo de llenado de grano dentro de una misma población son también significativas de acuerdo al mismo análisis estadístico, F_c = 623.85.

6.2. Contenido de proteína en hojas participantes en el llenado de grano de diferentes poblaciones de maíz.

El contenido de proteína total (mg/ml) se midió a los extractos obtenidos para medir actividad enzimática. Los valores encontrados en la población original nos muestran un máximo hacia la quinta semana después de la antesis y mínimos en la tercera y sexta semanas (Fig. 5).

Un comportamiento muy parecido encontramos en las poblaciones SM10 *in situ* y SM10 sequía. Mientras que las poblaciones restantes, SM10 y SM20, difieren claramente de las anteriores, ya que su tendencia normal es a disminuir el contenido de proteínas a medida que avanza el periodo de llenado de grano (Fig. 5).

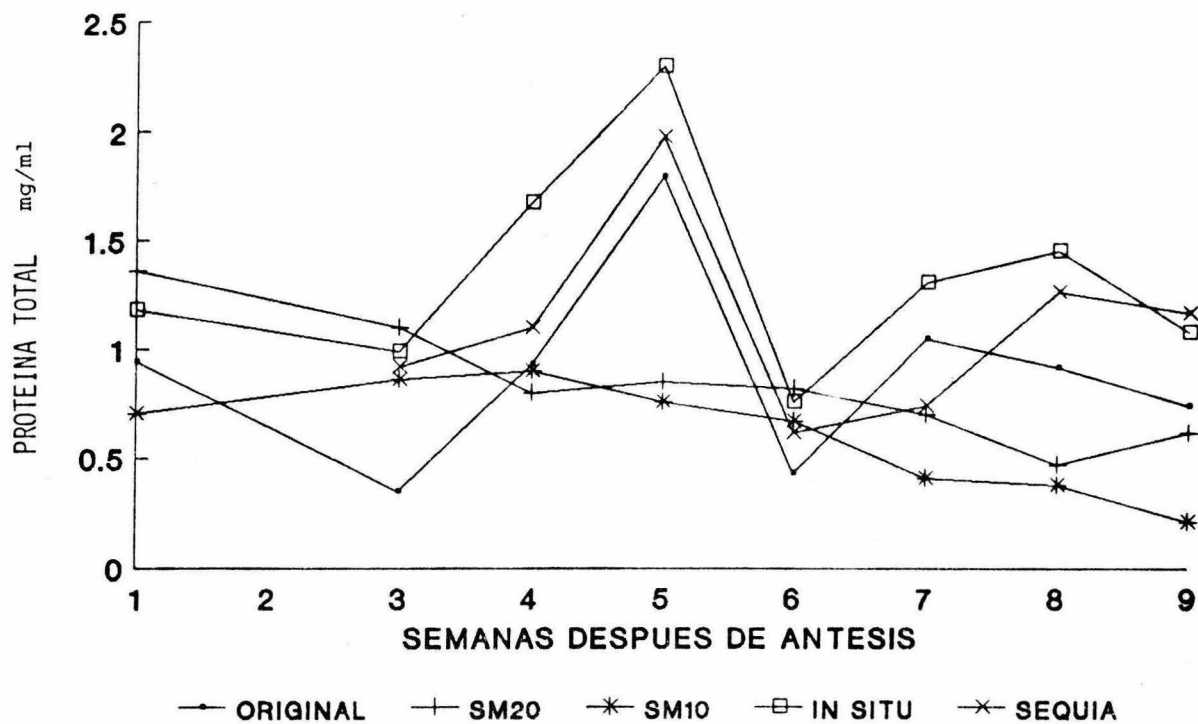


Fig. 5 Contenido en proteína total de hojas participantes en el llenado de grano de las poblaciones de maíz de la variedad Zacatecas 58.

6.3. Propiedades regulatorias de PEPC en hojas participantes en el llenado de grano de diferentes poblaciones de maíz.

Para establecer si las diferencias de actividad de PEPC encontradas a lo largo del periodo de llenado de grano eran exclusivamente cuantitativas, o además se acompañaban de diferencias cualitativas, determinamos las propiedades cinéticas y regulatorias para esta enzima. Para ello se midió la actividad a pH ligeramente alcalino, en presencia del inhibidor malato, del activador glucosa-6P y a diferentes concentraciones de PEP y libre.

6.3.1. Efecto del pH alcalino sobre la actividad de PEPC.

La actividad de la enzima medida a pH 8.0 fue siempre superior a la actividad medida a pH 7.3 bajo las mismas condiciones de concentración de sustratos y de temperatura. El incremento promedio desde la antesis hasta la sexta semana después de la antesis fue de 160 %. Sin embargo, a partir de este muestreo, se observó un mayor incremento en la actividad medida a pH 8.0 con respecto a la medida a pH 7.3. Esto fue observado por igual en las cinco poblaciones, mostrando que la respuesta de la enzima a pH si bien no presenta diferencias entre poblaciones, si las muestra entre los diferentes estadios del llenado de grano (Fig. 6).

6.3.2. Efecto de PEP libre sobre la actividad de PEPC.

En la Fig. 7 se muestra la respuesta de la enzima a la concentración de sus ligandos. La concentración de sustrato Mg-PEP

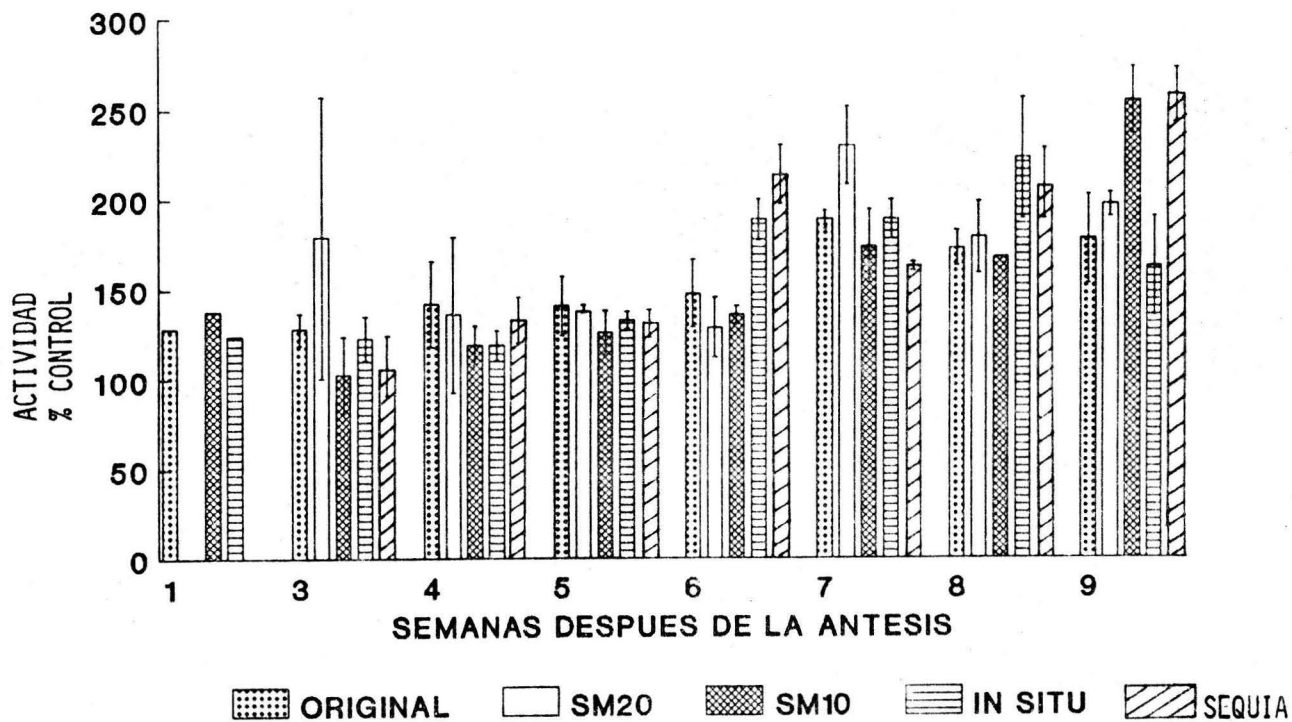


Fig. 6 Actividad de PEPC a pH 8.0 en hojas de maíz Zacatecas 58 con respecto a la actividad medida a pH 7.3 (control). Las incubaciones se hicieron en el amortiguador Trietanolamina-HCl 100mM conteniendo EDTA 1mM a 30°C.

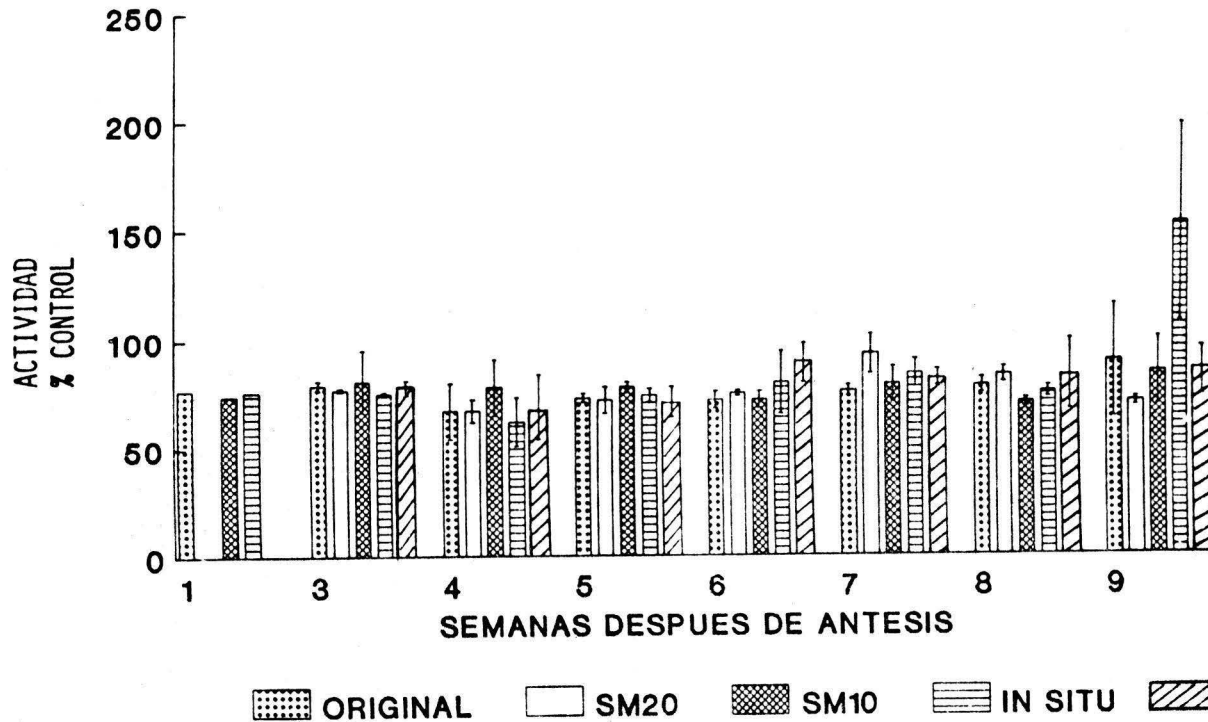


Fig. 7 Efecto de 0.23 mM PEP libre y 28 mM de Mg libre sobre la actividad de PEPC en hojas de maíz Zacatecas 58. Control: actividad determinada a 0.83 mM PEP libre y 7.76 mM de Mg libre.

empleada en estas determinaciones de actividad fue la misma que en la determinación control, pero se usaron concentraciones diferentes de PEP y Mg^{+2} libres. Concretamente para una concentración de Mg-PEP de 1.15 mM, se usó una concentración de 0.23 mM de PEP libre y 28 mM de Mg^{+2} libres a diferencia de los controles que se determinaron a la misma concentración de Mg-PEP, pero a 0.83 mM de PEP libre y 7.76 mM de Mg^{+2} libre.

Como puede observarse los valores de actividad encontrados con respecto al control fueron también los mismos para todas las poblaciones y muestreos.

6.3.3. Efecto de glucosa-6P sobre la actividad de PEPC.

El porcentaje de activación causado por glucosa-6P 2 mM en el medio de ensayo de la enzima con respecto al control, ensayado bajo las mismas condiciones pero en ausencia de este activador, fue prácticamente el mismo en todas las poblaciones para un mismo tiempo después de la antesis; pero en todas las poblaciones se observó que este porcentaje iba incrementándose a lo largo del periodo de llenado de grano (Fig. 8).

6.3.4. Efecto del malato sobre la actividad de la enzima.

Cuando se determinó la actividad de la enzima en presencia de 2.5 mM del inhibidor malato manteniendo el resto de las condiciones de ensayo idénticas a las del control, se encontró que tres de las poblaciones (original, *in situ* y sequia) eran

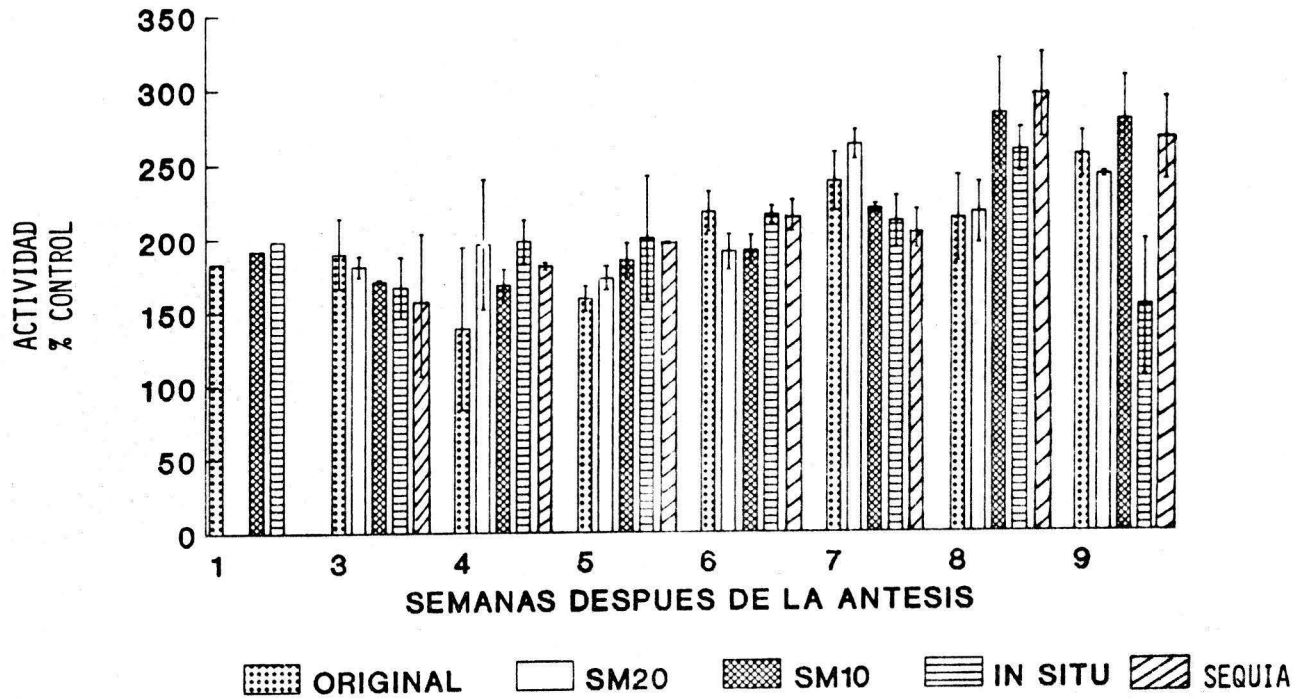


Fig. 8 Activación de PEPC por glucosa-6P 2mM en hoja de maíz Zacatecas 58. Control: actividad determinada en ausencia de glucosa-6P.

inhibidas totalmente a la sexta semana del periodo, mientras que las dos restantes (SM10 y SM20) se inhibían totalmente hacia la séptima semana (Fig. 9).

Conforme al análisis de varianza sí existen diferencias significativas en cuanto al grado de inhibición por malato a través del periodo de llenado de grano, pero no las hay entre las poblaciones de maíz.

6.4. Cuantificación de la proteína PEPC en extractos crudos de hojas participantes en el llenado de grano

El suero inmune empleado para estas determinaciones, mostró poseer anticuerpos anti-PEPC mediante la prueba de manchado, pudiéndose apreciar visiblemente el inmunoprecipitado formado sobre las muestras de enzima pura (Fig. 3). El suero no inmune fue incapaz de producir inmunoprecipitado al incubarse en el nuestro papel de nitrocelulosa, al que se habían transferido las proteínas del extracto crudo y la PEPC pura.

La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos para la población original mediante un "Western blot" de los extractos crudos obtenidos a los diferentes tiempos del periodo de llenado de grano en que se hicieron los muestreos. Se pudo observar un máximo en la cantidad de proteína PEPC en la tercera semana después de la antesis, la cual va disminuyendo hasta la sexta semana donde no es tan perceptible.

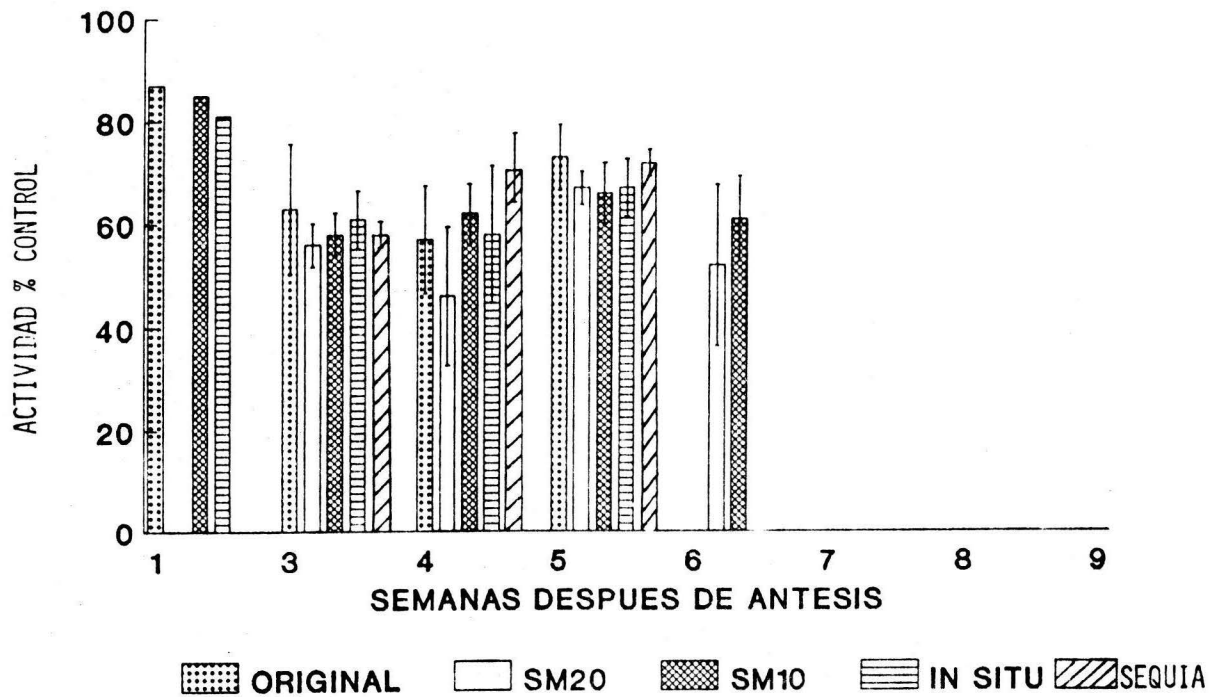


Fig. 9 Inhibición de PEPC por malato 2.5 mM en hojas de maíz Zacatecas 58. Control: actividad determinada en ausencia de malato.

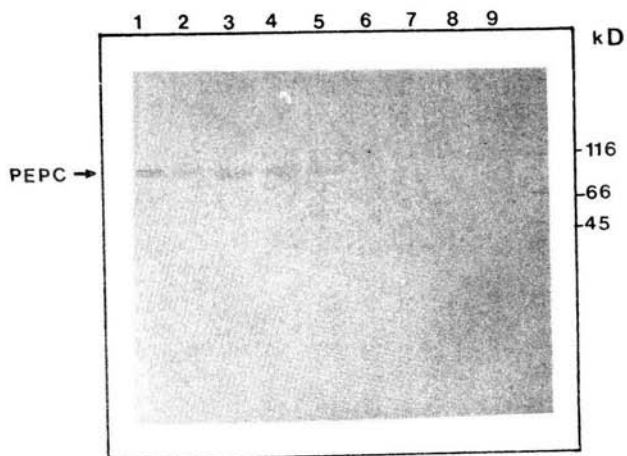


Fig. 10 Identificación inmunológica de PEPC en extractos crudos de hojas de maíz participantes del llenado de grano en la población original 1-9, semanas después de la antesis.

Para cada extracto de hoja, 4 μ g de proteína total fueron separados por SDS-Page y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con antisuero de conejo específico para PEPC. Los marcadores moleculares se indican en KD a la derecha.

En la Fig. 11 se muestra el resultado obtenido de la inmunotransferencia para la población *in situ*. Se aprecia la máxima cantidad de proteína PEPC en la primera y tercera semanas. Puede observarse que esta proteína va disminuyendo en cantidad a partir de la tercera semana.

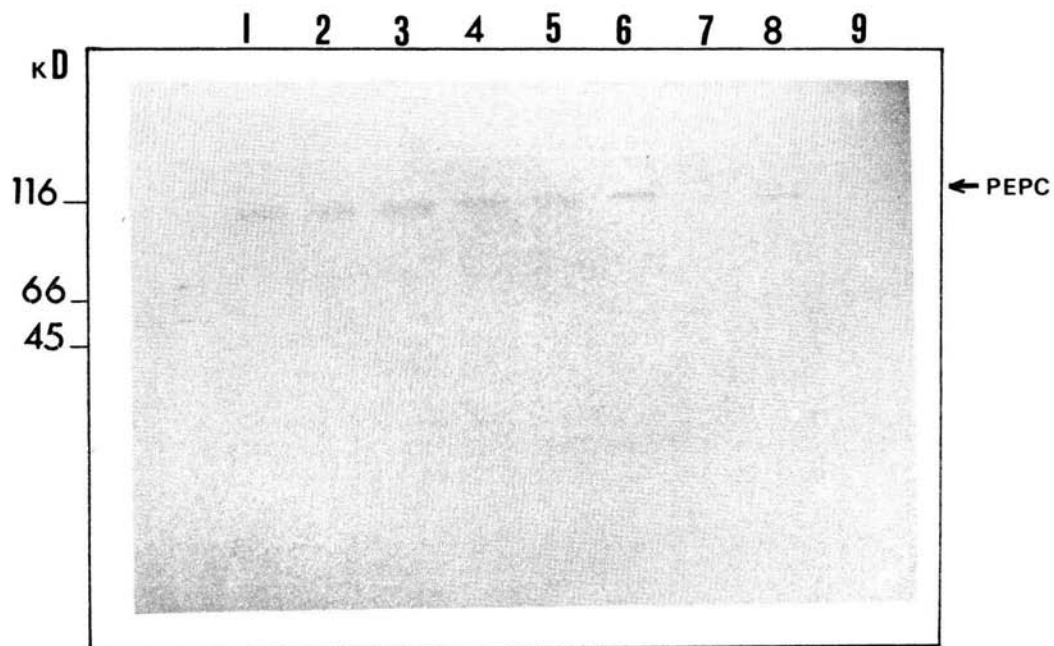


Fig. 11 Identificación inmumológica de PEPC en extractos crudos de hojas de maíz participantes del llenado de grano en la población SM10 in situ. 1-9 semanas después de la antesis. Para cada extracto de hoja, 4 μ g de proteína total fueron separados - por SDS-Page y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con anti-suero de conejo específico para PEPC. Los marcadores moleculares se indican en KD a la izquierda.

DISCUSION

La hipótesis planteada al inicio de este trabajo pudo confirmarse con los resultados obtenidos. Así, encontramos que la actividad de PEPC en las hojas participantes del llenado de grano responde al aumento en la demanda de fotosíntesis que este evento fisiológico conlleva, incrementándose durante las primeras semanas. Aparentemente las señales, probablemente hormonales, que conducen a este incremento inicial o dejan de operar a partir de la tercera semana o bien, cambian para actuar en sentido opuesto. lo que se traduce en una progresiva disminución de la actividad enzimática a partir de ese momento.

Parece lógico atribuir la disminución de la actividad durante las últimas semanas al proceso natural de envejecimiento de la hoja. Sin embargo, el incremento de las primeras semanas no es probable que esté causado por el también proceso natural de maduración, dado que cuando comienza la antesis y se realiza el primer muestreo, la hoja ya está totalmente formada y en completa madurez.

De hecho, se sabe que hacia el periodo de llenado de grano la planta ha finalizado su desarrollo vegetativo e inicia una etapa en la cual su actividad fotosintética aporta los fotosintatos necesarios para la formación de la mazorca. Esta capacidad de la hoja se mantendrá activa hasta el inicio de la senectud, momento en el que la fotosíntesis empieza a declinar irreversiblemente (Secor et al., 1983).

Es por ello que pensamos que existen señales específicas que causan incrementos igualmente específicos de aquellas actividades enzimáticas relevantes para la síntesis incrementada de fotosíntesis, actividades enzimáticas entre las que sin duda se encuentra PEPC, como lo muestran los resultados de este trabajo.

Esta conclusión está apoyada, además, por la evolución de la proteína total de la hoja, que no coincide proporcionalmente con la de la actividad de PEPC. Dicho de otra forma, los incrementos de actividad específica de PEPC no se corresponden con los incrementos en proteína total (Figs. 4 y 5).

En este estudio determinamos y expresamos la actividad de la enzima como actividad específica (unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína) precisamente para diferenciar en forma clara los incrementos de actividad que pudieran deberse a un incremento indiscriminado de proteína total de la hoja, de aquellas específicas para nuestra enzima.

Es interesante destacar que la evolución de la actividad de PEPC encontrada en este trabajo coincide con la reportada con otros autores en estudios de otras variedades de maíz (Crafts-Brandner and Poneleit, 1987). Sin embargo, otros autores no habían podido demostrar este patrón en estudios sobre la misma población original usada por nosotros, si bien se habían encontrado incrementos hacia el día 17 después de la anthesis en la población mejorada (Loza-Tavera et al., 1987). Cabe destacar que se repitieron las determinaciones de las poblaciones original y sequía durante el siguiente periodo de llenado de grano obteniéndose los mismos resultados de incrementos durante los

primeros días después de la antesis en ambas poblaciones, seguida de un descenso en la actividad.

Por otra parte, nuestros estudios estuvieron encaminados no sólo a investigar cambios en la actividad de la enzima, como fue el caso de los dos estudios mencionados, sino a aclarar la naturaleza de los cambios en la enzima.

Se sabe que PEPC de hoja de maíz es una enzima cuya actividad está sujeta a regulación a corto plazo por las condiciones ambientales a las que está sometida la planta. Concretamente, se encuentra regulada por las condiciones de luz, de manera que existen dos formas interconvertibles de la enzima por fosforilación-desfosforilación: una forma de día y otra forma de noche (Huber et al., 1986; Nimmo et al., 1986; Wu and Wedding, 1987) que difieren en sus características cinéticas y regulatorias (Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares, 1987 y 1990); Rodríguez-Sotres et al., 1987).

Por ello, las diferencias encontradas a lo largo del periodo de llenado de grano en actividad podrían deberse a: i) que la cantidad de proteína PEPC cambie, es decir, a que se alteren las velocidades de síntesis y/o degradación de esta proteína; ii) que la enzima preexistente sea modificada postraduccionalmente, ya sea por fosforilación-defosforilación u otro cualquier mecanismo de modificación covalente; iii) que ambos mecanismos operen.

De ser cierta la primera de las posibilidades expuestas, la enzima debe conservar sus propiedades cinéticas y de regulación, mientras que si son ciertas cualquiera de las otras dos, la

modificación covalente debe conllevar cambios en dichas propiedades. Por ello, se estudiaron éstas propiedades a lo largo del periodo de llenado de grano y se cuantificó la proteína PEPC para tratar de encontrar cual de los mecanismos es el operante *in vivo*.

Los resultados obtenidos con la técnica de "Western blot", si bien no son absolutamente cuantitativos, sí demuestran claramente que la cantidad de PEPC se modifica durante el periodo de llenado de grano en forma paralela a los cambios observados en la actividad. Dado que todas las poblaciones mostraron un patrón de evolución de la actividad semejante, nos pareció adecuado hacer este tipo de estudio con la población original y una de las poblaciones mejoradas (SM10 *in situ*).

Al inicio del periodo de llenado de grano, la hoja superior a la mazorca, ya ha alcanzado su máxima expansión y a partir de este momento su actividad fotosintética está encaminada a la producción de compuestos que serán translocados a la mazorca.

En el caso de la población mejorada (*in situ*) suponemos que la actividad y cantidad de la enzima PEPC al inicio del periodo de llenado de grano es mayor que la de la original porque ésta sea una característica que se ha seleccionado durante el proceso de mejoramiento, lo que implica que esta actividad esté positivamente correlacionada con el rendimiento del cultivo.

En base a los resultados discutidos, creemos que existe suficiente evidencia experimental para afirmar que el incremento en la actividad de PEPC que se produce en las hojas participantes

en el llenado de grano durante las primeras semanas se debe a un aumento en los niveles de esta enzima, probablemente originados por una alza en su síntesis. La disminución en la actividad en las últimas semanas podría ser causada por una síntesis disminuida y un incremento en la degradación.

Sin embargo, el estudio a fondo de los procesos celulares implicados en estos cambios en los niveles de PEPC escapan a los objetivos del presente trabajo y serán objeto de futuras investigaciones en nuestro laboratorio.

En cuanto a los cambios en las propiedades regulatorias de la enzima encontrados en las etapas finales del periodo de llenado del grano, pensamos que puedan deberse al proceso de degradación que aparentemente está sufriendo esta proteína, lo que motivaría la aparición cada vez mayor de especies moleculares parcialmente degradadas, pero aún con actividad y que respondan en forma diferente a los efectores o condiciones probadas por nosotros.

Los resultados descritos nos mostraron que los niveles de actividad de la enzima PEPC difieren significativamente entre la población original y las poblaciones mejoradas, lo que constituye un apoyo experimental de la segunda parte de la hipótesis de este trabajo. Dicho en otras palabras, parece ser que los niveles de actividad de PEPC en las hojas participantes del llenado de grano están positivamente correlacionados con los niveles de productividad de la planta, medida ésta como producción de grano.

Este resultado es muy interesante porque si bien es probable que este carácter (altos niveles de actividad de PEPC) no sea el único implicado en un aumento de productividad, representa un avance el contar ya con al menos un marcador bioquímico de la productividad.

CONCLUSIONES

1. El incremento en la actividad específica de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, al inicio del periodo de llenado de grano, el cual se hace patente en todas las poblaciones estudiadas, sugiere que la actividad de esta enzima es muy importante para proveer a la mazorca de fotosintatos.

2. Estos incrementos de actividad aparentemente se deben a una síntesis de *novo* de la proteína PEPC, y no a un proceso de activación de la enzima preexistente.

3. Las diferencias encontradas en los niveles de actividad de PEPC, entre la población original y las mejoradas, sugieren que dicha enzima está participando en el incremento de la producción de grano de estas últimas.

BIBLIOGRAFIA

1. Bandurski, R.S.; Greiner, C.M. and Bonner, J. 1953. The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 204:781-786.
2. Black, C.C. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24: 253-286.
3. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye, binding. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
4. Buchanan-Bolling, I.C. and Kluge, M. 1981. Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Kalanchoe daigremontiana*: Temperature response of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase in relation to allosteric effectors. *Planta.* 152: 181-188.
5. Budde, R.J.A. and Chollet, R. 1986. *In vitro* phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant. Physiol.* 82: 1107-1114.
6. Chou, Q. and Shi, J.N. 1984. Structural features of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Chinese J. Biochem. Biophys.* 20 (1): 47-56.
7. Coombs, J.; Baldry, C.W. and Bucke, C. 1973. The C₄ pathway in *Pennisetum purpureum*. The allosteric nature of PEP carboxylase. *Planta.* 110: 95-107.

8. Coombs, J. 1979. Enzymes of C₄ metabolism. En: Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series. Ed. M. Gibbs and E. Latzko. Springer, New York. 6: 251-262.

9. Cooper, T.G. and Wood, H.G. 1971. The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active species "CO₂" utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 246: 5488-5494.

10. Crafts-Brandner, S.J. and Poneleit, C.G. 1987. Carbon dioxide exchange rates, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities, and kernel growth characteristics of maize. Plant. Physiol. 84: 255-260.

11. Davies, D.D. 1979. The central role of PEP in plant metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 61: 131-158.

12. Durán, A.; Cisneros, C.A.; Fernández, A.M.; Gersenowies, R.J.; Meraz, M.S. y Vargas, V.A. 1986. Manual de técnicas estadísticas. ENEP- Iztacala, UNAM. Los Reyes Iztacala, Edo. de México: 140 p.p

13. Edwards, G.E. and Huber, S.C. 1981. The C₄ pathway. En: The biochemistry of plants. Ed. M.D. Hatch and N.K. Boardman. Academic Press. New York. 8: 237-281.

14. Gifford, R.H. and Evans, L.T. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32: 385-509.

15. González, D.M.; Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. 1986. Active-site-directed inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by bromopyruvate. Arch. Biochem. Biophys. 245: 179-186.

16. Good, M.E. and Bell, D.H. 1980. Photosynthesis, plant productivity and crop yield. En: The biology of crop productivity. Ed. P.S. Carlson. Academic Press, New York: 3-51.

17. Hammond, J.B.W. and Kruger, N.J. 1988. The Bradford method for protein quantitation. En: New Protein Techniques. Ed. John M. Walker. Vol. 3. Serie Methods in Molecular Biology. Humana Press, Clifton, New Jersey: 25-32.

18. Hatch, M.D. and Osmond, C.B. 1976. Compartmentation and transport in C₄ photosynthesis. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. Ed. M. Gibbs y E. Latzko. Springer, New York. 3: 144-184.

19. Hatch, M.D. 1978. Regulation of enzymes of C₄ metabolism. En: Current topics in cellular regulation. Academic Press, U.S.A. 14: 1-27.

20. Huber, S.C. and Edwards, G.E. 1975. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. Can. J. Bot. 53: 1925-1933.

21. Huber, S.C. and Edwards, G.E. 1977. Transport in C₄ mesophyll chloroplasts: evidence for an exchange of inorganic phosphate and phosphoenolpyruvate. Biochim. Biophys. Acta. 462: 603-612.

22. Huber, S.C. and Sugiyama, T. 1986. Changes in sensitivity to effectors of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transitions. *Plant. Physiol.* 81: 674-677.

23. Huber, S.C.; Sugiyama, T. and Akasawa, T. 1986. Light modulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant. Physiol.* 82: 550-554.

24. Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. 1983. The presence of essential histidine residues in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 749: 9-17.

25. Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. 1984 a. On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant. Physiol.* 75: 983-987.

26. Iglesias, A.A.; González, D.H. and Andreo, C.S. 1984. Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase by modification with phenylglyoxal. *Biochim. Biophys. Acta.* 788: 41-47.

27. Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. 1984 b. Involvement of the thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosyn. Res.* 5: 215-226.

28. Iglesias, A.A.; González, D.H. and Andreo, C.S. 1986. Purification and kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Amaranthus veridis* L. leaves. *Planta.* 168: 239-244.

29. Jiao, J.A. and Chollet, R. 1989. Regulatory seryl-phosphorylation of a C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase by soluble protein kinase from maize leaves. Arch. Biochem. Biophys. 269 (2): 526-535.

30. Karabourniotis, G.; Manetas, Y. and Gavalas, N.A. 1983. Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. Plant. Physiol. 73: 735-739.

31. Ker, M.W. and Robertson, A. 1971. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize leaves. Biochem. J. 125: 34.

32. Laemmli, U.K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. Nature. 227: 680.

33. Laetsch, W.M. 1974. The C₄ syndrome: A structural analysis. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 27-52.

34. Latzko, E. and Kelly, G.J. 1983. The many faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ plants. Physiol. Veg. 21 (5): 805-815.

35. López-Pozos, R.; Rodríguez-Sotres, R. and Muñoz-Clares, R. 1990. Hysteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in crude desalted extracts. Effect of metabolites and light. J. Plant. Physiol. 136: 451-457.

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

37. Manetas, Y. and Gavalas, N.A. 1982. Evidence essential sulfhydryl group (s) in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: Protection by substrate metal-substrate and glucose-6 phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. *Photosynthetica*. 16 (1): 59-66.

38. Mares, J. and Leblová, S. 1980. Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica*. 14 (1): 25-31.

39. Maruyama, H.; Easterday, R.L.; Chang, H.C. and Lane, M.D. 1966. *J. Biol. Chem.* 241: 2405-2412.

40. Melzer, E. and O'Leary, M.H. 1987. Anapleurotic CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Plant. Physiol.* 84: 58-60.

41. Mukerji, S.K. 1977. Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase and inhibition of carbon-14 dioxide fixation by sulphite ions and activation by glucose-6-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 350-365.

42. Nimmo, G.A.; Nimmo, H.G.; Hamilton, I.D.; Fewson, C.A. and Wilkings, M.B. 1986. Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Eragrostis tedeschiana*. *Biochem. J.* 239: 213-230.

43. O'Leary, M.H.; Rife, J.E. and Slater, J.D. 1981. Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem.* 20: 7308-7314.

44. O'Leary, M.H. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 297-315.

45. Osmond, C.B.; Björkman, O. and Anderson, D.J. 1980. Productivity and environment. *En: Physiological process in Plant Ecology. Toward a synthesis with *Striptex**. Springer-Verlag, New York: 379-459.

46. Podestá, F.E.; Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. 1986. Modification of and essential amino groups of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal phosphate and by pyridoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* **246** (2): 546-553.

47. Podestá, F.E. and Andreo, C.S. 1989. Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Oligomeric state and activity in the presence of glicerol. *Plant. Physiol.* **90**: 427-433.

48. Rathman, C.K.M. 1978. C₄ photosynthesis: The pathway of carbon in bundle sheath cells. *Sci. Prog. Oxf.* **65**: 409-435.

49. Ray, T.B. and Black, C.C. 1979. The C₄ pathway and its regulation. *En: Encyclopaedia of Plant. Physiology. New Series. Ed. M. Gibbs and E. Latzko. Springer, New York.* **6**: 77-99.

50. Rodríguez-Sotres, R. and Muñoz-Clares, R. 1987. Short term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant. Physiol.* **128**: 361-369.

51. Rodríguez-Sotres, R.; López-Pozos, R. and Muñoz-Clares, R. 1987. Further studies of the short term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant. Physiol.* **129**: 191-199.

52. Rodríguez-Sotres, R. and Muñoz-Clares, R. 1990. Kinetic evidence of existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Arch. Biochem. Biophys. 276 (1): 180-190.

53. Schoper, J.B.; Johnson, R.R. and Lambert, R.J. 1982. Maize yield response to increased assimilate supply. Crop. Sci. 22: 1184-1189.

54. Secor, J.; Shibles, R. and Stewart, C.R. 1983. Metabolic changes in senescing soybean leaves of similar plant ontogeny. Crop. Sci. 23: 106-110.

55. Stiborová, M. and Leblová, S. 1983. The role of cystein groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. Physiol. Veg. 21 (5): 935-942.

56. Stiborová, M. and Leblová, S. 1986. Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. FEBS. Lett. 205 (1): 32-34.

57. Sugiyama, T.; Mizuno, M. and Hayashi, M. 1984. Partitioning of nitrogen among ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and pyruvate orthophosphate dikinase as related to biomass productivity in maize seedlings. Plant. Physiol. 75: 665-669.

58. Ting, I.P. and Osmond, C.B. 1973. Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. Plant. Physiol. 51: 448-453.

59. Torrent, Q.M. 1991. Mecanismos de acción de fitorreguladores en el desarrollo y germinación de semillas. Folleto. Facultad de Química, UNAM.

60. Uedan, K. and Sugiyama, T. 1976. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant. Physiol.* 57: 906-910.

61. Vargas, S.; Molina, J.D. y Cervantes, S.T. 1982. Selección masal y parámetros genéticos en la variedad de maíz Zacatecas 58. *Agrociencia.* 48: 93-105.

62. Villanueva, V.C. 1988. Respuesta a la selección masal visual estratificada rotativa e *in situ* en la variedad de maíz Zacatecas 58. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Edo. de México: 102 p.p.

63. Wagner, R.; González, D.H.; Podestá, F.E. and Andreo, C.S. 1987. Changes in the quaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affect its catalytic activity. *J. Biochem.* 164: 661-666.

64. Walker, G.H. and Edwards, G.E. 1986. Purification of phosphoenolpyruvate carboxylase and characterization of changes in oligomerization using HPLC. *J. Chromatogr.* 2 (4): 861-874.

65. Walker, G.H.; Ku, M.S.B. and Edwards, G.E. 1986. *Plant. Physiol.* 80: 848-855.

66. Wedding, R.T.; Black, M.K. and Meyer, C.R. 1989. Malate inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. *Plant. Physiol.* 82: 985-990.

67. Welkie, G.W. and Codwell, M. 1988. Leaf anatomy of species in some dicotyledonian families as related to the C₃ or C₄ pathways of carbon fixation. Can. J. Bot. 48: 2135-2146.

68. Wong, K.F. and Davies, D.D. 1972. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* by metabolites. Biochem. J. 131: 451-458.

69. Wu, M.X. and Wedding, R.T. 1985. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by interconversion of oligomeric forms. Arch. Biochem. Biophys. 240: 655-662.

70. Wu, M.X. and Wedding, R.T. 1985. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula* by interconversion of oligomeric forms. Arch. Biochem. Biophys. 240: 655-662.

71. Wu, M.X. and Wedding, R.T. 1987. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. Further evidence on the dimer-tetramer interconversion. Plant. Physiol. 84: 1080-1083.

72. Yanagisawa, S.; Izui, K.; Yamaguchi, Y.; Katsuya, S. and Katsuki, H. 1988. Further analysis of cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. FEBS Lett. 229 (1): 107-110.