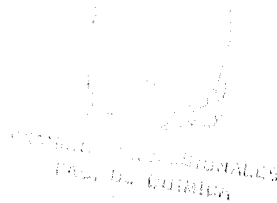


77
Zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



"ANALISIS DE LA RESPUESTA A ESTRES HIDRICO
DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA DE MAIZ A NIVEL DE
EXPRESION DEL GEN"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A:

GABRIELA TOLEDO ORTIZ



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO

Vocal: Prof. HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

Secretario: Prof. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

1º. Suplente: Prof. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

2º. Suplente: Prof. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto E
Departamento de Bioquímica, Laboratorios 101 y 102

Asesor del Tema:


DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

Supervisor Técnico:


DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

Sustentante:


GABRIELA TOLEDO ORTIZ

A mi madre Yolanda Ortiz quien me hubiera gustado que estuviera a mi lado durante la realización de este trabajo, con todo mi cariño.

A mi padre Alejandro Toledo por su apoyo incondicional en todo momento, es gracias a ti que he logrado llegar hasta este punto.

A mi hermano Francisco y a Chesi por su compañía y apoyo.

A mi tío Epi con muchísimo afecto.

AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mi sincero agradecimiento a las personas que contribuyeron para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares y al Dr. Javier Plasencia por la dirección de esta tesis, por su tiempo y sus valiosas enseñanzas.

A la Dra. Herminia Loza quien fue la que me inició en este campo y ha sido una persona muy importante en mi formación.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica y de la Facultad.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
I. ANTECEDENTES	6
II.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa	6
II.1.1. Reacción catalizada por la PEPC	
II.1.2. Isoformas de PEPC	7
II.1.3. Participación de la PEPC en la Ruta C₄ de asimilación de CO₂ atmosférico	8
II.1.4 Características moleculares de PEPC	14
II.1.5 Regulación fisiológica de PEPC en plantas C₄	14
II.1.6. PEPC de maíz	15
II.1.7. Genes que codifican para la PEPC de maíz	18
II.2. Respuestas metabólicas de las plantas a deficiencia de agua	21
II.2.1. Metabolismo involucrado en el ajuste osmótico y durante el estrés hídrico	24
II.2.2. Respuestas moleculares al déficit de agua	27
II.2.3. Estrés salino	28
II.2.4. El papel del ácido abscísico en la respuesta al estrés hídrico y salino en plantas	30
II.2.5. Acumulación de prolina	31
II.2.6. Respuesta de la enzima PEPC de maíz al déficit de agua	35
II.3. Fundamentos teóricos de las técnicas usadas	38
II.3.1. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
II.3.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	40
II.3.3. Clonación del producto de PCR	41
III OBJETIVOS	44
IV MATERIALES Y MÉTODOS	45
IV.1. Material biológico	45
IV.2. Síntesis y caracterización de oligonucleótidos	45
IV.3. Cuantificación espectrofotométrica de los oligonucleótidos sintetizados	47
IV.4. Reacción de amplificación por PCR	48
IV.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	49
IV.6. Clonación del producto de PCR	50
IV.7. Extracción de ADN plasmídico	52
IV.8. Extracción de ADN genómico de maíz	53
IV.9. Cuantificación de ADN	54

IV.10 Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa	55
IV.11. Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción	56
IV.12. Hibridación ADN-ARN (tipo Southern)	57
IV.13. Inducción del estrés hídrico y salino en discos de hojas de maíz	62
IV.14. Extracción de ARN de hojas de maíz	63
IV.15. Hibridación ADN-ARN o Northern blot	64
V. RESULTADOS	68
V.1. Síntesis y caracterización de los oligonucleótidos para la forma C ₃ de la PEPC	68
V.2. Amplificación del fragmento del gen de PEPC C ₃ por PCR	69
V.3. Clonación del producto de PCR en el vector pCR II	70
V.4. Hibridación ADN-ARN	73
V.5. Inducción del estrés hídrico y salino	74
V.6. Extracción de ARN	75
V.7. Hibridación ADN-ARN	77
VI. DISCUSIÓN	81
VI.1. Sensibilidad y validez del método de PCR y obtención de una sonda homóloga y específica para PEPC-C ₃	81
VI.2. Verificación de la sonda por hibridación tipo Southern	82
VI.3. Inducción del estrés hídrico en discos de hoja de maíz	82
VI.4. Extracción de ARN y experimentos de hibridación ADN-ARN	83
VI.5. PEPC C ₃ en discos de hoja de maíz sometidos a estrés hídrico y salino	84
VI.6. PEPC C ₃ de discos de hoja de maíz tratados con ABA exógeno	86
VII. CONCLUSIONES	89
VIII. REFERENCIAS	90

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ABA	Acido abscísico.
Arg	Arginina.
ATC	Acidos tricarbóxicos
BSA	Albúmina de suero bovino.
C ₃	Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO ₂ es un compuesto de tres carbonos (3-fosfoglicerato).
C ₄	Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO ₂ es un compuesto de cuatro carbonos (ácido málico o aspártico).
CAM	Plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas.
CLP	Cloroplasto.
CIT	Citoplasma.
DEPC	Dietil pirocarbonato.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
D.O.	Densidad óptica.
EDTA	Acido etilén diamino tetra acético.
EM	Enzima málica.
Gly	Glicina.
His	Histidina.
Ile	Isoleucina.
IPTG	Isopropil tio β-D-galactosido
α-KG	α-Cetoglutarato.
LB	Medio Luria-Bertoni.
MDH	Malato deshidrogenasa.
Mpa	Mega pascales.
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico.
OAA	Oxaloacetato.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PEG	Polietilenglicol.
Phe	Fenilalanina.
Pi	Fósforo inorgánico.
PPDK	Ortofosfato diquinasa.
PRC	Ciclo de Calvin
Pro	Prolina.
PVP	Polivinil pirrolidina.
rpm	Revoluciones por minuto.
Rubisco	Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.

Ser	Serina.
SSC	Solución de sales de sodio citrato.
STE	Amortiguador de Tris-HCl, NaCl y EDTA.
TAE	Solución de Tris-Acetatos.
Taq DNA polimerasa	ADN polimerasa purificada de la bacteria termofílica <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Solución de Tris-EDTA.
TSS	Solución de PEG, DMSO y Mg Cl ₂ pH 6.5
u	Unidades de actividad enzimática.
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosa

RESUMEN

Se sabe que el maíz acumula prolina en el citoplasma de sus células en respuesta al déficit de agua. Este incremento debe requerir de un aumento en las actividades enzimáticas directa o indirectamente relacionadas con su síntesis, bajo esta hipótesis, el presente trabajo se enfocó al estudio a nivel de transcripción del gen en plantas sometidas a estrés hídrico y salino de la isoforma C₃ de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz (PEPC-C₃) que cataliza la principal reacción anaplerótica en plantas C₄.

Además, se analizó también el efecto de la fitohormona ABA que está asociada con los cambios metabólicos relacionados con las modificaciones necesarias para proveer de cierta tolerancia a la falta de agua.

Para ello se obtuvo por la técnica de PCR un fragmento de 209 pb de la región 3' no traducida (que es la única donde las diferencias con el gen de la isoforma fotosintética son importantes) del gen PEPC-C₃, que se usó como sonda radiactiva diferencial en experimentos de hibridación ARN-ADN con los que se estudió la expresión del mensaje para esta isoforma en preparaciones de ARN total obtenidas de hojas control y sometidas a déficit de agua, estrés salino y aplicación de ABA exógeno.

Los resultados obtenidos demuestran que el estrés hídrico y salino inducen la transcripción del gen de la PEPC-C₃ en discos de hoja de maíz lo que concuerda con la participación de esta isoforma de la enzima, bajo situaciones de estrés, en el abastecimiento al ciclo de Krebs de los intermediarios que están siendo utilizados para la síntesis de precursores del osmolito compatible prolina. El fitorregulador ABA puede también mediar la respuesta al estrés osmótico del gen de PEPC-C₃ ya que se encontró igualmente un aumento en los niveles del transcrito.

Dado que en México el 66% del territorio nacional es árido o semiárido y que el maíz es uno de los cultivos básicos en la alimentación de la población que se produce en gran parte bajo un régimen de temporal, es muy importante profundizar en las bases moleculares de las respuestas metabólicas de adaptación a condiciones de sequía con el objetivo final de determinar aquellos caracteres que puedan conferir resistencia a esta condición adversa.

I. INTRODUCCIÓN

En algún momento de su ciclo vital las plantas mesófitas están expuestas en forma inevitable a cierto déficit interno de agua, por lo que su capacidad de adaptación metabólica a esta situación es una condición esencial para su supervivencia. En México, donde la mayor parte del territorio es árido o semiárido, y se tiene además el problema creciente de la salinización de los suelos, se ha vuelto prioritario el estudio de los mecanismos que permiten a las plantas defenderse del estrés osmótico o salino.

El fitomejoramiento tradicional no ha podido proveer de muchas variedades resistentes a déficit de agua, de ahí la importancia de realizar estudios de fisiología vegetal, bioquímicos y de biología molecular que nos lleven a comprender los mecanismos por medio de los cuales ciertas especies son capaces de sobrevivir e incluso ser productivas en ambientes con poca disponibilidad de agua.

El maíz es uno de los cultivos de mayor interés económico en México, tan sólo basta decir que para 1990, el 58.5% del territorio cultivable del país (más de 7 millones de hectáreas) era sembrado con maíz y en general se cultiva bajo un régimen de temporal (más de 6 millones de hectáreas lo que equivale al 85% de la superficie sembrada) (Censo Agrícola, Ganadero y Ejidal 1990 SARH, 1995), de aquí la fundamental importancia de profundizar en las bases moleculares de las respuestas metabólicas de adaptación a estrés hídrico con el objetivo final de determinar los caracteres que le puedan conferir resistencia a sequía.

Entre las primeras respuestas de las plantas al estrés hídrico se encuentra la de evitar en lo posible la pérdida de agua de sus tejidos, para lo que se han establecido dos estrategias principales: el ajuste del potencial osmótico intracelular (dado por la acumulación de solutos compatibles que evitan la deshidratación) y el cierre de estomas (Ludlow, 1989).

En particular, se sabe que el maíz acumula prolina en el citoplasma de sus células como una respuesta a la falta de agua, y ello se debe a que se incrementa la síntesis de este aminoácido. Para lograr este aumento, deben tenerse aumentadas las actividades

enzimáticas directa o indirectamente involucradas en su síntesis (Wrench et al., 1980 Hanson y Hitz, 1982).

Nuestro interés se ha enfocado en el estudio de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31) que es una enzima citoplasmática que juega un papel clave en la asimilación fotosintética del CO₂ atmosférico en plantas con metabolismo C₄ (tal es el caso de maíz) y con metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (Hatch, 1978). La PEPC cataliza la carboxilación de fosfoenolpiruvato produciendo oxaloacetato y fósforo inorgánico, es una enzima común a todas las plantas y presenta además una función anaplerótica suministrando oxaloacetato al ciclo de Krebs cuando sus intermediarios están siendo usados, por ejemplo, para síntesis de proteínas (Meltzer y O'Leary, 1987).

Si bien en hojas de plantas sometidas a déficit de agua en general la fotosíntesis y algunas actividades enzimáticas fotosintéticas se encuentran disminuidas (Boyer et al., 1976; Wilson et al., 1980), se propone que la actividad de PEPC en hoja de maíz debe incrementarse dado que se sabe que hay acumulación de prolina en el citoplasma de las células en respuesta a falta de agua y para la síntesis de este aminoácido se requiere de glutamato como precursor, lo que implica la necesidad de una reacción anaplerótica.

Experimentos realizados en el laboratorio de la Dra. Rosario.A. Muñoz Clares han establecido que la actividad máxima extraíble de PEPC de hoja de maíz es mayor cuando la planta ha sido sometida a estrés hídrico y que este cambio cuantitativo se acompaña de un cambio cualitativo. En base a lo anterior en este trabajo nos propusimos enfocarnos en determinar el nivel de los transcritos (ARNm) de la forma C₃ anaplerótica de la PEPC de maíz, con el fin de determinar si esta isoforma es inducida por déficit de agua y si la inducción se lleva a cabo a nivel transcripcional.

II. ANTECEDENTES

II.1. FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC.E.C. 4.1.1.31) es una enzima ampliamente distribuida en las células vegetales fotosintéticas o no (Smith, 1968; Kludge, 1983). Esta extensa distribución se debe a las muy diversas funciones que la enzima realiza en los tejidos vegetales (Blufert et al., 1983; Latzko y Kelly, 1983). Su actividad se ha relacionado con: mecanismos de regulación de pH citoplasmático (Latzko y Kelly, 1983; Guern et al., 1983), crecimiento estimulado por auxinas (Hatscke y Luttge, 1975), reacciones anapleróticas de relleno del ciclo de Krebs (Latzko y Kelly, 1983; Brulfert et al., 1983), apertura y cierre de estomas (Willmer, 1983; Harris y Outlaw 1991), en las rutas fotosintéticas de asimilación del CO₂ atmosférico en plantas C₄ (cuyo primer producto de fijación del CO₂ es un compuesto de cuatro carbonos) (Hatch y Osmond, 1976; Hatch, 1978; Coombs, 1979; Ray y Black, 1979; O'Leary, 1982; Kludge, 1983; Brulfert et al., 1983) y con metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (Osmond, 1978; Osmond y Haltum, 1981; Brulfert y Gluclu, 1983; Kludge, 1983; Ting, 1985) y en la fijación del nitrógeno en nódulos de leguminosas (Haschke y Luttge, 1975; Latzko y Kelly, 1983).

El interés por el estudio de esta enzima en plantas C₄ se debe a la trascendencia a nivel agrícola y biotecnológico que podría tener, dado que las plantas con metabolismo C₄ presentan una productividad mayor que las plantas C₃ bajo condiciones de temperatura elevada y son capaces de sobrevivir en ambientes relativamente áridos.

II.1.1. REACCIÓN CATALIZADA POR LA PEPC

La enzima fosfoenol piruvato carboxilasa cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) produciendo oxaloacetato y Pi, de acuerdo a la siguiente reacción:

activadores), localización celular o subcelular y regulación de su síntesis y degradación (Muñoz Clares, 1986).

Hasta el momento son conocidas tres isoenzimas de PEPC en plantas superiores:

- 1) la isoenzima fotosintética de hoja de plantas C_4 que cataliza la fijación de CO_2 en la primera reacción de la llamada ruta C_4 ; 2) la isoenzima CAM con una función también de tipo fotosintético y que está presente en hojas de plantas de clima desértico en donde la fijación de CO_2 ocurre solamente durante la noche, cuando la planta abre sus estomas, evitando así la pérdida de agua (Osmond y Hatch, 1978; Hatch, 1978; Hatch et al., 1987). El malato producido a partir del oxaloacetato, que es a su vez producto de la actividad de PEPC, es utilizado como un donador de carbono durante la fotosíntesis que ocurre durante el subsecuente periodo luminoso. La tercera isoforma de PEPC es no autotrófica de tipo anaplerótico y desempeña un papel muy importante en el abastecimiento de compuestos de cuatro carbonos al ciclo de Krebs, que pasan a formar parte de los aminoácidos (O'Leary, 1982; Andreo et al., 1987). Estas isoformas pueden ser distinguibles por sus propiedades cinéticas, inmunológicas y cromatográficas.

En hojas de sorgo se presentan dos isoformas de PEPC, una forma que ocurre en hojas etioladas y presenta características C_3 y otra forma presente en hojas verdes y que presenta propiedades cinéticas y regulatorias de tipo C_4 . No existe interconversión entre estas dos isoformas, lo que indica que son codificadas por genes diferentes (Hudspeth y Guala, 1989). La presencia de múltiples formas de PEPC sugiere que uno de los eventos más importantes durante la evolución de las plantas C_4 fue el desarrollo de un mecanismo regulatorio para una expresión diferencial específica de los genes de PEPC.

II.1.3. PARTICIPACIÓN DE LA PEPC EN LA RUTA C_4 DE ASIMILACIÓN DE CO_2 ATMOSFÉRICO

Como se ha mencionado con anterioridad, PEPC cumple un papel muy importante en el metabolismo fotosintético de asimilación de CO_2 en las plantas C_4 y CAM.

El maíz, al igual que las demás plantas C_4 presenta dos tipos de células diferenciadas que participan en el metabolismo fotosintético de la hoja. La diferenciación celular asociada a la ruta C_4 se manifiesta desde el punto de vista anatómico en una estructura de la hoja que ha sido denominada tipo Kranz (Fig. 1). Las células del mesófilo se encuentran cerca de la superficie externa de la hoja y toman el CO_2 atmosférico para asimilarlo en forma de OAA a través de la carboxilación del PEP mediante la enzima PEPC. El OAA se transporta al interior del cloroplasto en donde se convierte en malato mediante la reacción catalizada por la enzima málico deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP). El malato, en intercambio con el oxaloacetato que se está produciendo, es transportado al citoplasma para posteriormente ser llevado a las células de vaina vascular las cuales se localizan en la periferia de los haces vasculares en donde se encuentran bastante aisladas del intercambio directo de gases con la atmósfera. En las células de vaina vascular, el malato se descarboxila mediante la enzima málico deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP, el CO_2 así producido se utiliza para la síntesis de carbohidratos a través del ciclo de Calvin que tiene lugar en estas células. El piruvato producto de la descarboxilación, regresa a las células del mesófilo y es transportado al interior del cloroplasto en donde se produce PEP en una reacción catalizada por la enzima ortofosfato diquinasa (PPDK), consumiendo dos equivalentes de ATP. El PEP resultante se transporta al citoplasma en intercambio con fosfato para seguir alimentando esta ruta (Hatch, 1978; Rathman, 1978; Day y Hatch, 1981; Edwards y Huber, 1981). Las plantas C_4 presentan mayores velocidades de fotosíntesis que las plantas C_3 (plantas cuyo primer producto estable de fijación de CO_2 es un compuesto de tres carbonos), en especial a temperaturas e intensidades luminosas elevadas. Además, presentan una aparente falta de fotorrespiración, un proceso que consume energía y que resulta en la pérdida de carbono vía el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Edwards et al., 1985; Muñoz-Clares, 1986).

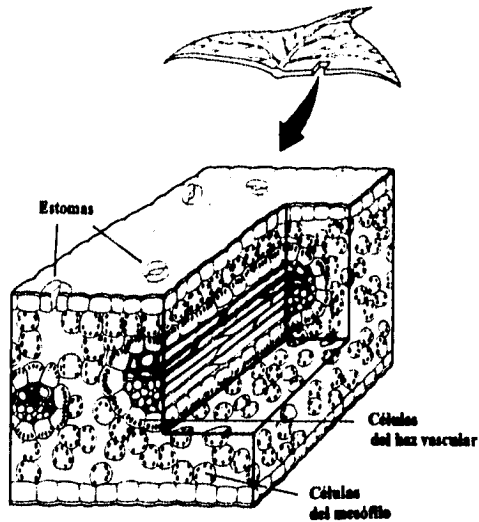


Fig. 1. Modelo tridimensional de una hoja C₄ donde se muestra la típica anatomía Kranz característica de este grupo de plantas.

En la Fig.2 se muestra un esquema de la ruta C₄ tal y como se ha propuesto que ocurre en maíz.

El CO₂ atmosférico es inicialmente fijado por la PEPC para formar un ácido de cuatro átomos de carbono que es reducido y transportado a las células de la vaina vascular donde es descarboxilado para proveer de CO₂ para la refijación que lleva a cabo la ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) (Hatch, 1978; Slack et al., 1969).

Debido a la baja *K_m* para HCO₃⁻ de la PEPC y el subsecuente flujo de ácidos orgánicos de cuatro carbonos hacia las células de la vaina vascular, esta enzima actúa como una "bomba de CO₂" para incrementar la relación de CO₂:O₂ en las células de la vaina vascular de modo que el ciclo de las pentosas reductoras opera más eficientemente al eliminarse la fotorrespiración (Hatch y Osmond, 1976).

En plantas con metabolismo C_3 que es el más común, el CO_2 atmosférico es fijado directamente por la Rubisco. Una forma no predominante de PEPC fija el CO_2 como malato como producto final (Ting y Osmond, 1973). Se ha sugerido que el malato generado en esta reacción forma parte del mecanismo de osmorregulación de las células (Whilmer et al. 1973), se trata de una reacción menor comparada con la producción de malato como intermediario fotosintético en las plantas C_4 .

Las plantas que poseen la ruta C_4 usan parte de la energía solar captada para mantener esta ruta extra, pero a pesar de ello su eficiencia energética es mayor a la de las plantas con metabolismo C_3 . Se trata de un sistema fotosintético que además puede operar con pérdidas de agua menores que en el caso de las plantas C_3 , debido a que la afinidad que tienen las plantas C_4 por el CO_2 es muy superior, por lo que les es posible mantener altas velocidades de fijación de carbono con limitada apertura de los estomas lo que permite una fotosíntesis activa en condiciones de relativa aridez y con bajas concentraciones de CO_2 (Hatch, 1987). Esta última condición es frecuente cuando las plantas presentan una fotosíntesis activa, ya que consumen rápidamente el CO_2 de las capas cercanas de la atmósfera. Por otra parte, debido a la mayor eficiencia que presentan en la asimilación de CO_2 , son capaces de aprovechar mayor cantidad de energía luminosa y por tanto son bastante productivas, de modo siendo estas candidatas para lograr incrementar la productividad en ambientes desfavorables como son los climas áridos.

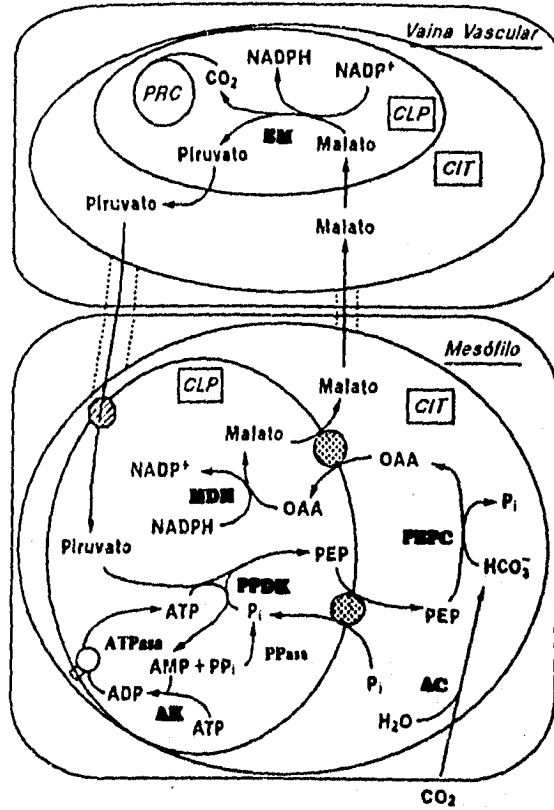


Fig. 2. Esquema del metabolismo fotosintético de las plantas C_4 del tipo EM-NADP (enzima málica dependiente de NADP). A este grupo de plantas pertenece el maíz (*Zea mays*). Existen variantes de este metabolismo que difieren en el tipo de ácidos C_4 que sirven para el transporte de CO_2 hacia el interior de las células de vaina vascular y en la enzima descarboxilante; el resto del metabolismo es igual en todas las plantas C_4 . Abreviaturas: PRC ciclo de Calvin; CLP cloroplasto; CIT citoplasma; AC anhidrasa carbónica; PEPCK fosfoenolpiruvato carboxilasa; Ppasa ortofosfato dicinasa; ATPasa ATP sintetasa cloroplástica; PFDK piruvato ortofosfato dicinasa; MDH malato deshidrogenasa (NADP); EM enzima málica (NADP); P_i fosfato inorgánico; PP_i pirofosfato; PEP fosfoenolpiruvato; OAA oxalacetato; ATP, ADP, AMP nucleótidos de adenina; NADP^+ y NADPH fosfo dinucleótido de adenina y nicotinaamida.

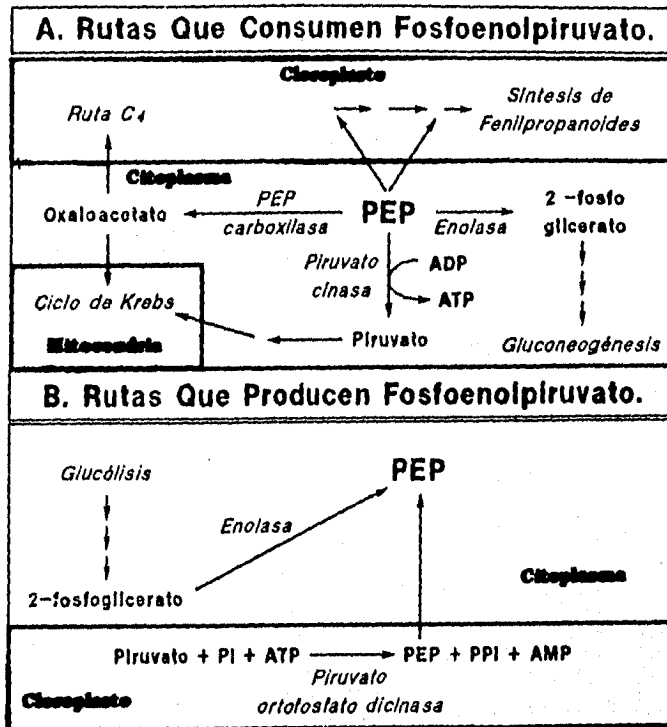


Fig. 3. Esquema de las rutas metabólicas que producen (A) y consumen (B) PEP en las células vegetales. Nótese que la poza de PEP más importante es la del citoplasma.

II.1.4. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA PEPC

PEPC ha sido aislada de diversas fuentes y se ha observado en todos los casos como una estructura tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de aproximadamente 400,000 daltons (Maruyama et al., 1966; Mizorko et al., 1974; Marés y Leblová, 1980; O'Leary, 1982; Manetas et al., 1986; Stivorová y Lebová, 1983; Walker, 1986). El análisis de aminoácidos revela un contenido de al menos ocho cisteínas por subunidad (Stivorová y Lebová, 1986) de las cuales cuatro se hallan formando puentes disulfuro en la enzima nativa y las cuatro restantes se hallan como-SH libres (Stivorová y Lebová, 1983; Iglesias y Andreo, 1984; Stivorová y Lebová, 1986).

Se han identificado así mismo varios grupos esenciales para la actividad de PEPC: cisteína(s) (Smith, 1968; Manetas y Gavalas, 1982; Iglesias y Andreo, 1984; González et al., 1986), histidina(s) (Iglesias y Andreo, 1983; Walker et al., 1986), argininas (Iglesias et al., 1984; Mayer, et al., 1989; Rustin et al., 1988; Wu et al., 1981), y lisinas (Wagner et al., 1988; Podesta et al., 1986; Andreo et al., 1986). La dependencia de pH ha permitido identificar sólo un grupo (probablemente histidina) que participa en la unión de Mg^{2+} y PEP, pero no en la catálisis (Maruyama et al., 1966; González et al., 1986; O'Leary, 1982).

Las secuencias de las proteínas con actividad de PEPC obtenidas hasta ahora revelan un considerable grado de homología. Se ha identificado además, una región altamente conservada en PEPC de varias fuentes ($^{606}Phe-His-Gly-Arg-Gly-Gly-Ser-Ile-Gly-Arg-Gly-Gly-Ala-^{516}Pro$) que posiblemente está implicada en la unión del sustrato PEP.

II.1.5. REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE PEPC EN PLANTAS C_4

La PEPC en plantas C_4 se activa por glucosa-6-fosfato, uno de los productos finales de la fijación de CO_2 . Este compuesto produce un incremento en V_{max} y en la

afinidad por PEP (Coombs et al., 1973; González et al., 1984; Rodríguez Sortres y Muñoz Clares, 1987).

Otro metabolito, el L-malato, que es un producto de la reacción de carboxilación, es un inhibidor de la carboxilasa (Huber y Edwards, 1975). La glucosa-6-fosfato produce un decremento en el efecto inhibitorio de malato (González et al., 1984; Huber y Edwards, 1975). El aspartato, otro producto importante de la carboxilación en algunas plantas C₄, también inhibe a la enzima (Huber y Edwards, 1975). Las variaciones en el pH citoplasmático, también pueden operar como un mecanismo de control fino sobre la actividad de la PEPC (Iglesias y Andreo, 1983).

Finalmente, la actividad de PEPC es mayor cuando se le extrae de hojas que han sido previamente iluminadas (Karabourniotis et al. 1983; Iglesias y Andreo, 1984; Rodríguez Sortres, 1991).

II.1.6. PEPC DE MAÍZ

La enzima de maíz está compuesta por 970 residuos de aminoácidos y tiene una masa molecular de 109, 408 Da. (Matsuoka y Hata, 1987).

Estudios previos sugieren que las diferentes funciones de la PEPC son catalizadas por diferentes isoformas. Estudios cinéticos y cromatográficos de enzimas aisladas a partir de hojas de maíz crecido en la obscuridad, con luz y a partir de raíz han demostrado ser diferentes (Mukerji, 1977; Sugiyama y Hatch, 1981). Dos diferentes picos cromatográficos de actividad de PEPC se han obtenido a partir de hojas en diferentes estados de desarrollo, uno de ellos puede atribuirse a una forma no autotrófica debido a que presenta una K_m para PEP semejante a la que presenta la enzima aislada a partir de raíz. En otros estudios en los que se analizaron las isoformas de PEPC en hojas de maíz en las primeras etapas de desarrollo se encontró que la PEPC de raíz y de embriones recién germinados tenían perfiles de elución semejantes (Harpster y Taylor, 1986). La actividad de estas PEPCs no se inhibían por la adición de anticuerpos

para PEPC de hojas en concentraciones que producían la inhibición al 50% de la actividad enzimática en extractos de hoja.

Todos los datos anteriores demostraron que el maíz tiene tres formas isoenzimáticas de PEPC, una de las cuales es una forma fotosintética que participa en la fijación de CO_2 .

La PEPC de maíz está codificada en el núcleo por una pequeña familia de genes y varios datos experimentales sugieren que la isoenzima involucrada en la fotosíntesis está codificada por un solo miembro de la familia (Grua y Hudspeth, 1987).

La comparación de las secuencias de la PEPC- C_3 y C_4 de maíz se muestra en la Fig. 4.

	PheThrAlaAlaThrLeuGluHisGlyMetHisProProAnAlaProLysProGluTrpArgAlaLeuLeuAspTyrMetAla	717
C3	TTCCAGGCTACTACCTGGAGCATGGCATGCCACCCCAAATGCACCAAGCCGAPATGGAGCCCTTTGATGATGATG	7251
C4	C C G C G G G T C C C G C A A G C A G C G	
	ValSer Lys Met	
	ValValAlaThrGluGluTyrArgSerIleValPheLysGluProArgPheValGluTyrPheArgLeuAlaThrProIleThr	745
C3	GGTGTGGCAACTGAGAAATATATGTTCCATGTTCTTCAAAGAGCCAGGCTTGTGAGTATTTCGCTTGAACCCCTTAACA	2135
C4	C C G G C C C G G C G G G C C A A T G C T A G G C	
	Val Val Ser	
	GluTyrGlyArgMetAsnIleGlySerArgProSerLysArgLysProSerGlyGlyIleAspSerLeuArgAlaIleProTrp	773
C3	SATATGGTAGGATGACATCAAGCAAGCCATCCAAAGAAAGCCGAGCTGATGACTCACTCGAGCAATCCGCTG	2419
C4	C G C C C G G G C C C C A A T G C T A G G C	
	Ala Arg Gly ThrThr	
	IlePheAlaTrpThrGlnThrArgPheHisLeuProValTrpLeuGlyPheGlyAlaAlaPheLysAsnValLeuGlnLysAsp	801
C3	ATCTTTTGTGGACACAAACCGGCTCCACTCCCGTCTGGCTAGCATTTGGAGCTGCATTCAAGAATGCTCTCCGAAAGAC	2503
C4	CT G T G C A T C G G C C C T T C C A G C	
	Ser Val PheAlaIleAsp	
	IleArgAsnLeuHisMetLeuGlnGluMetTyrAsnGluTrpProPhePheArgValThrIleAspLeuValGluMetValPhe	829
C3	ATCAGAACTCCACAGCTCCCAAGAAATGACAAATGAGTGGCCATTTTCAGGGTGAATTATGATCTGGAGATGATGTTTC	2587
C4	G T G C A A G C C C C C C C C C C T	
	Val PheGlnVal Lys Leu Leu	
	AlaLysGlyAsnProGlyIleAlaAlaLeuTyrAspLysLeuLeuValSerGluGluLeuHisProLeuGlyGluLysLeuArg	857
C3	GCCAGGGTAATCTGGCATTGCCCACTGTATGACAACTCTCTTTTCAGAGGAACTGCACTCCATGGGTGAGAGCTGAGG	2671
C4	A G C C G T G G G A C A G C T G A C C	
	Asp Gly Glu Ala Lys Phe LysGln	
	AlaAsnTyrGluGluThrGlnLysLeuLeuGlnValAlaGlyHisArgAspLeuLeuGlyAspLeuTyrLeuLysGln	885
C3	GCCAATATGAGAAACCCAGAGCTTACTTCCAGTTCCTGGCCACAGGATCTTTGGAGGTGACCTTACCTGAGGCG	2755
C4	A A C T G A C C A C A A T C T C A T	
	AspLys Val Gln Ile Lys Ile ProPhe	
	ArgLeuArgLeuArgAspAlaTyrIleThrThrLeuAsnValCysGlnAlaTyrThrLeuLysArgIleArgAspProAspTyr	913
C3	GGCTCCGCTGCTGGATGCTACATCACCACCTGAACTCTGCAAGCCTACACCTGAAAGCGGATCCGCTGACCCGACTAC	2839
C4	G G G T C A C C C G T A A G C A T	
	Gly Val AsnPro Phe G AsnPhe	
	HisValAlaLeuArgProHisLeuSerLysGluIleMetAspSerThrLysAlaAlaAlaAspValLysLeuAsnProGly	941
C3	CACCTCCGCTGCTGCTCCCACTCTCCCAAGAGATCAGGACTCGACCAAGGCTGCGAGGACTGGTGAAGCTGAACCTGGC	2923
C4	A G G A C C A G G C G T G C C G A A C C C G A C C	
	Lys ThrProGln PheAla GluAsn Pro GlyLeu Ala	
	SerGluCysAlaProGlyLeuIleAspThrLeuIleLeuThrMetLysGlyIleAlaAlaGlyLeuGlnAsnThrGly***	967
C3	AGCTAATACGACCGGCTTGGAGGACACCTCTACCTGACCATGAGGCGATGACACCGCTCCGACACCGGTTAAACC	3007
C4	G C G C C A G C C C G A G T C G G C	
	Pro Arg Met ***	
	ACGAGAGGGGATCTTTTCTCTCTGATCATGGCTCTAGCTCTCTGATTTTCCGGATGTAACCTCGGACCTCTCT	3091
C4	G T T C T T C A C C A C G A G G A C C G A A A T C G A T G T G G C T T T T G C A T T T G A T G A A G C	
	TACACCGTGGAGAACTAATGGTGTTCCTGCAAAAGTGGTGAATAAAGGGCGACAACATATCTTTTTCATAGTAACCT	3175
C4	G A T G C C T T C G T T T T C C A G A T A A T T T T C G C C T T A C T T C A C T C T T G T G A A G C A G G A A A	
	ATAACTTACATGCGATAATGAAACATGCTTCCTT-----	3213
C4	CTTGC CAT ACACAT T T AATAAACAATGACATCTGATGCTGTTTGTAAATAATTAATATATCCAGCCC	
C3	-----	
C4	ATTGGATGGACTGTGTT	

Fig. 4. Comparación de las secuencias de cDNA y de aminoácidos de las formas C₃ y C₄ de la PEPC. Los guiones en la región 5' no traducida y la región codificadora indican espacios de un par de bases introducidos para lograr el mejor alineamiento dentro de la región codificadora. Los codones de terminación se indican con un asterisco (Tomada de Kawamura et al., 1992)

II.1.7. GENES QUE CODIFICAN PARA LA PEPC: ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN

La naturaleza del gen de PEPC ha sido ampliamente estudiada, en particular en tres especies C_4 : *Zea mays*, *Sorghum spp.* y *Flaveria trinervia*. La expresión y regulación diferencial del gen de PEPC en plantas C_4 ha sido ampliamente reportado (Hudspeth y Grula, 1989; Izui et al., 1986; Sheen, 1991; Schaffner y Sheen, 1992). Aunque las plantas C_3 poseen una PEPC estructuralmente muy similar a la enzima C_4 (Matsuoka y Hata, 1987), la expresión genética en estas especies es muy diferente (Schaffner y Sheen, 1992).

El hecho de que existan diferentes isoformas de PEPC que participan en procesos metabólicos diversos y que son reguladas por diferentes efectores ha conducido a sugerir la existencia de varios genes que las codifican. En estudios realizados en maíz se ha demostrado la existencia de una familia multigénica constituida por al menos cinco miembros hasta ahora identificados (Hudspeth y Grula, 1989) que codifican para las tres diferentes isoformas conocidas de PEPC de esta planta: la forma C_4 predominante en hojas verdes e involucrada en la fotosíntesis (codificada por un gen), la forma C_3 presente en hojas etioladas y cuya función es anaplerótica (se ha identificado un gen) y la forma de raíz (se han detectado 3 genes que codifican para esta forma) (Loza Tavera y Muñoz Clares, 1994). Otra clona obtenida de una biblioteca de cDNA de raíz de maíz cuya región 3' no codificadora no presenta homología con un cDNA de PEPC de la forma C_4 , se empleó para hacer un análisis del DNA genómico de maíz observándose que este gen se presenta una sola copia. En este análisis por hibridación RNA-DNA se detectó que este gen fue expresado fuertemente en raíz, en menor cantidad en hojas verdes, pero no en hojas etioladas (Kawamura et al., 1990), lo cual es una prueba de que la clona corresponde a la del gen de PEPC de raíz.

En maíz, los genes para las diferentes isoformas de PEPC se encuentran separados en cromosomas diferentes: la forma C_4 se localiza en el cromosoma nueve, la forma C_3 en el siete y la forma de raíz en el cromosoma cuatro o cinco (Izui et al., 1992).

Todos los miembros de la familia de genes C_4 de PEPC poseen los componentes típicos de los genes: exones/intrones, marcos de lectura abiertos, regiones 5' no traducibles, secuencias 3' poliadeniladas, secuencias 5' regulatorias y factores de iniciación/terminación de la transcripción (Rajagopalan et al., 1994).

En lo que respecta al gen de PEPC- C_4 de plantas se ha establecido que existe una sola copia (Hudspeth y Grula, 1989; Matsuoka y Minami, 1989). La secuencia clonada del gen es de 6,781 pb de longitud y consta de 10 exones cuyos tamaños varían desde 85 hasta 999 pares de bases y nueve intrones cuyas longitudes van de 97 a 872 pares de bases. Las típicas cajas TATA o CATT, comunes en genes eucarióticos, no se encuentran en la región 5' de la secuencia de sorgo y maíz (Hudspeth y Grula, 1989; Matsuoka y Minami, 1989; Crétin et al., 1991). En su lugar se encuentran secuencias ligeramente modificadas TATTT así como elementos CCAAT, no sabiéndose aún si son funcionales. En el extremo 5' también se encontraron secuencias repetidas cortas con características similares a los elementos importantes en la regulación por luz de los genes de chícharo que codifican para la subunidad pequeña de la Rubisco. El gen *ppc* de maíz no contiene motivos o cajas regulatorias que se encuentran usualmente en genes que codifican enzimas fotosintéticas como Rubisco (*rbcS*). Por otro lado contiene motivos RS1-3 en la región 5', los cuales interactúan con factores nucleares (Yaganisawa e Izui, 1990; Yaganisawa e Izui, 1992).

Las enzimas C_4 se localizan exclusivamente en el citoplasma de las células del mesófilo y en muy bajos niveles se encuentran en las células del haz vascular (Coombs, 1979; Day y Hatch, 1981). En contraste, la isoforma tipo C_3 se expresa no sólo en células del mesófilo, sino también en otros tejidos como epidermis, raíz y células guarda (Ting, 1968; Hatch y Osmond, 1976; Edwards y Huber, 1981). El patrón de la diferente localización se controla a nivel transcripcional (Harpster y Taylor, 1986; Izui et al., 1992).

La forma C_3 no fotosintética del gen de PEPC ha sido clonada a partir de plantas CAM (Cushman et al., 1989), de sorgo (C_4) (Crétin et al., 1991), de tabaco (Koizumi et al., 1991), soya (Sugimoto et al., 1992), y maíz (Gruza y Hudspeth, 1987; Kawamura et al., 1992).

El análisis de la secuencia de aminoácidos, predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la isoforma C_3 de soya, ha demostrado que existe un 87.6% de similitud con la isoforma obtenida de células en cultivo de tabaco, 86.9% con la forma no fotosintética de *Mesembrianthemum crystallinum*, y 87.1% con la forma C_3 de sorgo. Mientras que con las isoformas C_4 de maíz y sorgo, y la forma CAM de *M. crystallinum* muestra similitud del 78.8, 71.6 y 81.9% respectivamente. El aminoácido más conservado es una lisina alrededor del residuo 600 y sus secuencias flanqueadoras (Koizumi et al., 1991). Este aminoácido había sido detectado como un residuo esencial del sitio activo de la isoforma fotosintética de maíz por estudios de modificación química de la proteína con reactivos específicos del grupo lisina (Rajagopalan, 1994).

El análisis de las clonas de cDNA de PEPC que han sido aisladas hasta el momento indica que la mayoría de las secuencias conservadas se encuentran en la región C-terminal, sugiriendo que esta zona comprende parte del sitio catalítico. Las regiones amino terminal que son conservadas pueden estar involucradas en la regulación alostérica de la enzima (Matsuoka y Minami, 1989).

Un estudio detallado de la familia de genes en sorgo y una evaluación con respecto a sus relaciones filogenéticas con otras plantas indica que una característica distintiva de la forma C_4 de PEPC es que posee un nivel de expresión genética importante en cuanto a estructura primaria se refiere (Lepiniec et al., 1993). La expresión de PEPC no depende sólo del órgano, estado de desarrollo o iluminación, sino que se ha propuesto que la expresión diferencial del gen puede deberse a factores nucleares especializados, metilación de DNA o a la existencia de distintos promotores (Kano-Murakami y Matsuoka, 1992; Nelson y Langdale, 1992; Schaffner y Sheen, 1992).

La fotosíntesis C_4 es el resultado de actividades metabólicas integradas de dos diferentes tipos de células: las del mesófilo y las de vaina del haz vascular (Hatch, 1987). La especialización de estas células se lleva a cabo por una expresión celular selectiva de

los genes que codifican a las enzimas de la vía metabólica C_4 a través de regulación transcripcional y/o traduccional (Nelson y Langdale, 1992). Un modo de expresión tejido específico es a través de regulación transcripcional por factores nucleares que interactúan con regiones promotoras. Esto ocurre por ejemplo en maíz, regulando la expresión del gen *ppc* (Yaganisawa e Izui, 1990, 1992). Otro modo de lograr la expresión selectiva es mediante la metilación de DNA en vaina. Esta modificación impide la unión de proteínas activadoras nucleares, restringiendo así la expresión del gen. La metilación de *ppc* ocurre particularmente en las células de vaina del haz vascular (Yaganisawa e Izui, 1990).

Schaffner y Sheen (1992) sugieren que la regulación de la expresión del gen de *ppc* es resultado de la adquisición de secuencias regulatorias y de promotores únicos ocurrida durante la evolución de la fotosíntesis C_4 , probablemente debidos a un rearrreglo genómico.

II.2. RESPUESTAS METABÓLICAS DE LAS PLANTAS A DEFICIENCIA DE AGUA

El agua es el componente mayoritario de las plantas. Constituye cerca del 90% del peso fresco en la mayoría de los órganos de plantas herbáceas. El agua afecta de manera importante, ya sea directa o indirectamente, todos los procesos fisiológicos de las plantas. Una deshidratación de los tejidos vegetales por debajo de ciertos niveles críticos, se acompaña de cambios irreversibles en la estructura celular y culmina con la muerte. La importancia del agua en los organismos vivos resulta de sus propiedades físicas y químicas que son únicas (Turner y Kramer, 1980; Taiz y Zeiger, 1991), lo que también determina su papel en la fisiología vegetal: el agua es el componente mayoritario del protoplasma, actúa como solvente para muchas sustancias sólidas y gaseosas, constituyendo una fase líquida continua a través de la planta; toma parte en muchas y muy importantes reacciones fisiológicas y entre muchas otras funciones mantiene la turgencia celular.

Desde un punto de vista biológico, podemos definir la palabra "estrés" como cualquier factor que altera el funcionamiento normal de un organismo (Turner y Kramer, 1980).

La sequía es un estrés ambiental de suficiente duración como para producir alteraciones en la planta por falta de agua, lo que afecta de manera importante los procesos fisiológicos y la productividad de la planta. El déficit de agua induce varios tipos de respuestas en los vegetales que se reflejan a niveles anatómico, morfológico y fisiológico. El grado de estrés producido en la planta, dependerá del grado en que el potencial hídrico y el turgor de las células sea reducido con respecto a los valores óptimos. Se presentan comúnmente dos tipos de respuestas en los vegetales ante la falta de agua:

a) Respuestas de escape. Esta es una característica de sólo unas pocas especies vegetales, tales como las epímeras desérticas y otras que crecen en zonas donde se tiene una temporada húmeda y una seca bien definidas. Estas plantas completan su ciclo de vida, o al menos la fase reproductiva, antes de que comience la temporada de sequía, por lo que no resiente el estrés de manera tan severa.

b) Respuestas de tolerancia. Es imposible para las plantas de climas húmedos-templados, escapar de temporadas de baja precipitación lluviosa, y algunas especies poseen ciertas adaptaciones que incrementan su resistencia al déficit de agua. Estas respuestas se pueden clasificar como: aquellas que posponen la deshidratación y las que incrementan la tolerancia a ella.

1) Aplazo de la deshidratación. Se presenta como consecuencia de modificaciones fisiológicas que reducen la transpiración o incrementan la absorción. Entre estas se encuentran: sistemas de raíces largas, cutícula gruesa, enrollamiento de la hoja y respuestas a nivel de estomas. Como ejemplo tenemos los vegetales con metabolismo CAM, que mientras el clima sea caluroso y sin lluvia son capaces de mantener sus estomas cerrados (Ludlow, 1989).

2) Incremento de la tolerancia a déficit de agua. Se trata de respuestas a nivel molecular, principalmente a nivel de estructuras de membranas y actividades enzimáticas. Así, las plantas que siguen esta estrategia tienen tejidos que pueden soportar cierta deshidratación. Es una respuesta común en los pastos tropicales con metabolismo C₄, muchas legumbres

de tipo C₃, y algunos cultivos como el trigo, algodón y cacahuate (Bray, 1993). También se presenta dentro de este tipo de estrategia, un acondicionamiento del potencial osmótico, que puede ir desde moderado hasta fundamental, ello ayuda a mantener la turgencia celular lo que a su vez permite mantener las rutas de asimilación de carbono al dejar que los estomas se abran, y se mantenga la fotosíntesis y expansión de las hojas.

Podemos decir que las plantas que poseen la habilidad de evadir la deficiencia de agua en sus tejidos tiene un rango de supervivencia a corto plazo bastante bueno, en tanto que las que presentan la estrategia de tolerancia son capaces de fijar carbono en periodos de baja cantidad de agua, lo que lleva a una pérdida inevitable de agua. Un resumen de las características de las respuestas de las plantas a déficit de agua se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5
Características de las diferentes estrategias
que siguen las plantas ante el estrés hídrico

	Respuesta y características	Consecuencias
ESCAPE	<ul style="list-style-type: none"> • Corta fenología • Plasticidad desarrollada • En especies nativas: insensibilidad al fotoperiodo. • Fotoperiodo sensible en cultivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta supervivencia
EVASION	<ul style="list-style-type: none"> • Tejidos sensibles a deshidratación • Toma de agua máxima por raíces profundas • Minimización de la pérdida de agua • Minimización de pérdida de agua por tamaño de hoja reducido y control estomático • Ajuste osmótico. • Ajuste fotosintético. 	<ul style="list-style-type: none"> • Si hay toma de agua y posibilidad de crecimiento • Supervivencia a largo plazo reducida y buena a corto plazo
TOLERANCIA	<ul style="list-style-type: none"> • Los tejidos resisten una severa deshidratación • Ajuste osmótico. • Evitan de forma moderada a importante la deshidratación 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de toma de carbono y crecimiento durante el estrés • Supervivencia a largo plazo elevada.

II.2.1. METABOLISMO INVOLUCRADO EN EL AJUSTE OSMÓTICO Y DURANTE EL ESTRÉS HÍDRICO

Como se mencionó anteriormente, las respuestas adaptativas a estrés ambiental se reflejan en la modificación de actividades enzimáticas o en la expresión genética. Las actividades enzimáticas son función de las interacciones de las enzimas con sus moduladores, del efecto de variables físicas y fisicoquímicas (como temperatura, potencial hídrico, presión, etc) sobre la actividad enzimática, y de la disponibilidad de sustratos y cofactores, en tanto que la expresión genética determinará el tipo y la cantidad de enzimas presentes vía procesos de transcripción del DNA y procesamiento

del mARN. En principio, el cambio en las actividades enzimáticas es instantáneo, en tanto que los ajustes en la expresión de los genes se presenta en cuestión de horas o días.

El ajuste osmótico se basa en cambios metabólicos celulares asociados con la acumulación de solutos orgánicos y con el mantenimiento de los gradientes iónicos así como con la translocación de solutos. Generalmente son varios los solutos que se acumulan durante el ajuste osmótico tanto en los tejidos ya completamente desarrollados como en los que se encuentran en crecimiento. Dichos solutos pueden incluir: iones inorgánicos (K^+ , Cl^- , NO_3^-), aniones orgánicos, carbohidratos solubles, aminoácidos y compuestos de amonio cuaternarios (Smith y Griffiths, 1968; Raven et al., 1979; Wyn, 1979 Jones et al., 1980).

El tipo de compuestos que participan en el ajuste osmótico es el mismo en condiciones de estrés que en condiciones normales. Aun así, su acumulación representa la poca asimilación que se presenta en hojas o la importación de precursores de crecimiento que no es posible que sean utilizados bajo esas condiciones. Se ha observado que en algunas plantas salinizadas, se acumula preferentemente betaina en el citoplasma, donde actúa como osmolito no tóxico (Wyn et al., 1979; Leigh et al., 1981).

El ajuste osmótico contribuye a la capacidad de muchas plantas mesófitas de funcionar metabólicamente a los bajos valores de potencial hídrico que se presentan cuando el decremento de la cantidad de agua disponible es gradual.

El estrés hídrico altera la conductancia estomática en las células del mesófilo. Así, el metabolismo fotosintético durante el estrés hídrico se verá regulado por la física del intercambio de agua y CO_2 : la conductancia estomática determina las velocidades a las que el agua se pierde y se asimila el CO_2 , por lo que el conservar el agua llevará a una pérdida en la toma de CO_2 . Así mismo hay reportes de que se produce inhibición en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, y se pierde la capacidad de fotorreducción en los cloroplastos (Boyer, 1976). También hay alteraciones en la fase oscura de la fotosíntesis y alteraciones en la carboxilación por reducción de la actividad o de los niveles de enzimas cloroplásticas (O'Toole et al., 1976; Jones et al., 1980). Se ha propuesto que ocurre una fotoinhibición a las bajas concentraciones de CO_2 causadas por cierre de estomas (Cornie, 1978; Osmond et al., 1980). La interrupción de la fotosíntesis corta el

suministro de energía a la planta, se incrementa la hidrólisis de proteínas y se reduce su síntesis, ya que se para el suministro de compuestos carbonados que por transaminación son convertidos a aminoácidos. La síntesis proteica puede verse afectada por el déficit de agua de diversas maneras: se disminuye (i) la absorción y reducción del nitrógeno del suelo, (ii) la producción fotosintética de precursores de aminoácidos, (iii) el ensamblaje de las proteínas y (iv) la síntesis de ácidos nucleicos.

La deficiencia de carbono que se presenta en las hojas como consecuencia del cierre de estomas, rápidamente se manifiesta en otros órganos, debido a alteraciones en el intercambio de sustratos vía el floema o el xilema. Se altera también de manera importante el flujo de NO_2^- . El aumento en la temperatura interna de la planta y las reducciones en el abastecimiento de carbono y nitrógeno conllevan efectos metabólicos importantes. Para que las células mantengan su viabilidad durante las condiciones de estrés, se deben satisfacer las demandas de energía (Moldau et al., 1980; Wilson et al., 1980), por tanto, la disponibilidad de carbono para el crecimiento es casi nula (Wilson et al., 1980). Las concentraciones de nitrógeno, en forma de NH_3 , NO_2^- o NO_3^- se mantienen a niveles bajos y no tóxicos; es común que la actividad de la nitrato reductasa decline a la par de la baja en la disponibilidad de agua (Morilla, et al., 1973; Rajalopan et al., 1977; Hauer, 1979), mientras que la actividad de la nitrito reductasa no se ve alterada de manera importante (Hauer et al., 1979). En hojas bajo un estrés hídrico moderado, las enzimas reponsables de la asimilación de amonio se mantienen en niveles altos, el reciclamiento del NH_3 que es parte integral de la fotorrespiración, se mantiene en las plantas C_3 (Osmond et al., 1980).

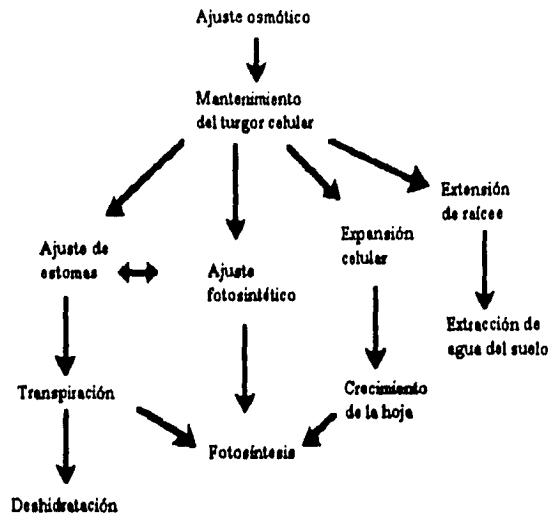


Fig. 6. Algunos de los eventos principales que se llevan a cabo durante el ajuste osmótico (tomado de Ludlow, 1980).

II.2.2 RESPUESTAS MOLECULARES AL DÉFICIT DE AGUA

La deficiencia de agua da como resultado una serie de respuestas complejas en las células vegetales que se inicia con la percepción del estrés, seguido de transducción de la señal, lo que desencadena cambios a niveles celular, fisiológico y de desarrollo.

Como se ha mencionado anteriormente, modificaciones en la expresión génica son fundamentales dentro de las respuestas que se presentan en condiciones de estrés. Los genes que se expresan en su mayoría son aquellos que darán a la célula mayor tolerancia a las condiciones adversas, desempeñando funciones de protección en el citoplasma, promoviendo la toma de agua, controlando la acumulación de iones y regulando la expresión de otros genes. Así las funciones principales que deben cubrirse son: secuestro de iones, protección de membranas, síntesis de osmolitos, inhibición o liberación de proteasas, ubiquitinación de proteínas que han sido denaturalizadas por la

pérdida de agua, y regulación de la transducción de señales (proteínas cinasas, proteínas nucleares, factores de transcripción y proteínas de unión a ARN) (Bray, 1993).

II.2.3. ESTRÉS SALINO

El estrés salino puede ser provocado por diferentes tipos de sales, siendo la más importante el cloruro de sodio (NaCl). Existe una relación estrecha entre el estrés hídrico y el salino, ya que el añadir sales al agua produce una disminución del potencial osmótico. Así, cuando una planta es transferida de un medio con pocas sales a uno cuya concentración es mayor, inmediatamente sufre deshidratación por ósmosis (Adams et al., 1992). Esta deshidratación provoca cambios semejantes a los observados en régimen de estrés hídrico. Las sales pueden provocar daños directos en las células, por ejemplo: ocasionan pérdida de agua, cierre estomático y reducción de la transpiración. sin embargo, si las sales entran a las células guarda, pueden provocar una reversión del gradiente osmótico que conlleva la apertura de estomas e incremento en la transpiración. (Taiz y Zeigler, 1991; Adams et al., 1992). Un esquema de las lesiones provocadas por el estrés salino se muestra en la Fig. 7.

La exposición de una planta a NaCl provoca una clara disminución en el crecimiento de las hojas, causada por la competencia que se genera con los iones nutrientes. Se provocan lesiones directas en las células como alteraciones en las membranas y daños en los sistemas bioquímicos y genéticos. También hay reducción de la fotosíntesis, síntesis de carbohidratos y producción de energía, aunque la fosforilación no se ve afectada. El NaCl disminuye la síntesis proteica e incrementa la hidrólisis de proteínas, aunque se ha visto que provoca también el incremento en la síntesis de enzimas y proteínas relacionadas con respuestas a estrés como la síntesis de osmolitos compatibles y proteínas encargadas del secuestro de iones (Ragamopal, 1987; Cushman et al., 1989).

En cuanto a las alteraciones a nivel de ácidos nucleicos, un exceso de sales los desestabiliza, si bien hay un incremento en los ARNm de proteínas que se sintetizan en respuesta a estrés (Cushman et al., 1989).

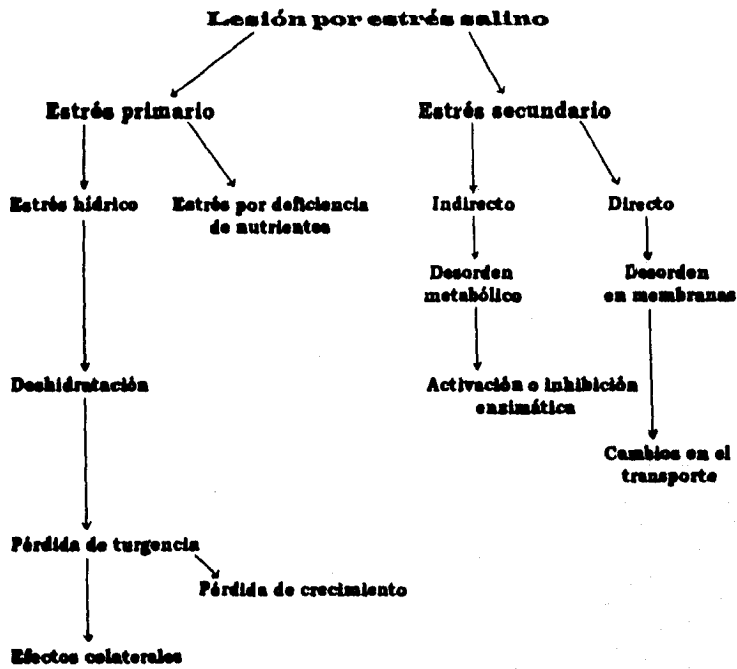


Fig. 7. Posibles lesiones provocadas por el estrés salino en plantas (Levitt, 1980).

II.2.4. EL PAPEL DEL ÁCIDO ABCSÍICO (ABA) EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS

El ABA es una fitohormona que se encuentra en todas las plantas superiores y se le ha relacionado con el control de una amplia variedad de procesos fisiológicos que incluyen el desarrollo de la semilla y la adaptación al estrés osmótico. Se trata de un sesquiterpenoide cuyo precursor es el ácido mevalónico que en la mayoría de las plantas es sintetizado a partir de xantofilas (Tal, 1973; Li y Walton, 1987; Zeevart y Creelman, 1988; Michele et al., 1993).

ABA se acumula como una respuesta al fenómeno físico de pérdida de agua, y la elevación del nivel endógeno de ABA se sabe que produce la expresión de genes inducibles por el déficit de agua (Skriver y Mundy, 1990). Por tanto se ha propuesto que la acumulación de ABA es el primer paso en las rutas de transducción de señales que llevan a la inducción de genes por el estrés hídrico (Singh et al., 1987; Zeevart y Creelman, 1988; Cohen y Bray, 1990; Guerrero y Mullet, 1990; Guerrero et al., 1990; Plant et al., 1991; Dure, 1993; Parry, 1993; Giraudat et al., 1994). Sin embargo, los procesos de transcripción y traducción son necesarios para la biosíntesis de ABA (Guerrero y Mullet, 1990; Iturriaga et al., 1992), lo que indica que las enzimas biosintéticas de ABA y otras proteínas relacionadas deben ser sintetizadas antes de que los niveles de ABA puedan elevarse y antes de que aquellos genes cuya expresión se encuentra bajo el control de esta hormona puedan expresarse. Así mismo, la sensibilidad a ABA de las células blanco se altera por el potencial osmótico de las células: hay incremento en la sensibilidad con el aumento del estrés osmótico (Guerrero y Mullet, 1990; Parry, 1993). También se sabe que la respuesta a ABA es dependiente de Ca^{2+} , por lo que es probable que este catión forme parte de la cascada de transducción de señales (Napier et al., 1989; Schroeder y Hedrich, 1989; Schroeder y Hagiwara, 1989).

Los modelos actuales sugieren que el estrés osmótico se percibe primero como alteraciones en el plasmalema debido a la pérdida de turgencia, seguido de un incremento en la concentración de ABA citosólico y apoplástico causado por síntesis *de novo* y/o liberación de la hormona acumulada en los organelos (Zeevart y Creelman, 1988). Las

plantas glicofitas responden cambiando la composición de los polisacáridos y las proteínas de sus paredes celulares (Ikari et al., 1989) y acumulando proteínas RAB (Ramagopal, 1987) y osmoprotectores como prolina (Davies y Jones, 1991). Aún no es del todo claro el papel que juega ABA en la regulación de los niveles de osmoprotectores como la prolina, aunque se sabe que al aplicar ABA se induce la acumulación de este aminoácido (Stewart, 1980).

En experimentos en los que se aplica a las hojas una cantidad de ABA exógeno, se ha visto que se producen las respuestas fisiológicas y morfológicas correspondientes a un estrés hídrico (Zeevart y Creelman, 1988; Mansfield, 1988; Trewavas y Jones, 1991; Davies et al., 1994). En particular se cree que ABA es el responsable del cierre de estomas en condiciones de estrés osmótico (Quarrie, 1982; Koornneef et al., 1982; Neill y Horgan, 1985; Mansfield, 1988; Harris y Outlaw, 1991; Mac Robbie, 1991; Mc Ainish et al., 1991; Parry et al., 1991).

En experimentos realizados en maíz (*Zea mays* cv. Iochief), con plantas que se crecieron en tierra de hoja hasta 24 días después de la germinación y a ese tiempo el suministro de agua disminuyó y el potencial hídrico de -4 bars que tenían las plantas con buen suministro de agua se redujo hasta -18 bars en los 8 días que se sometieron a estrés, se observó que hay acumulación de ABA total (Aspinall, 1980).

II.2.5. ACUMULACIÓN DE PROLINA

Como se ha mencionado con anterioridad, el maíz acumula prolina en respuesta a la falta de agua.

Los mecanismos por los cuales se acumula prolina en respuesta al déficit de agua pueden ser:

a) **Síntesis estimulada a partir de glutamato.** La estimulación de la conversión de glutamato a prolina refleja la pérdida de la regulación de su síntesis por retro-inhibición (Bogges et al., 1976). Las rutas hacia intermediarios de 5 carbonos a partir de arginina

u ornitina no contribuyen aparentemente en forma importante según han revelado estudios realizados en trigo (Bogges et al., 1976; Jones et al., 1980).

b) Bajos niveles de oxidación de prolina. Esto se debe al descenso en la capacidad de la oxidación en mitocondria (Iwai et al., 1979; Bogges et al., 1976; Wrench et al., 1980).

c) Decremento en la incorporación de prolina a las proteínas (Stewart, 1972; Stewart et al., 1977).

Estudios efectuados en cebada han llevado a proponer que el ácido abscisico (ABA) es un efector *in vivo* de algunos eventos metabólicos que llevan a la acumulación de prolina. En hojas de plantas no estresadas, la aplicación de ABA en dosis razonables puede estimular la acumulación de prolina (Rajalopan y Andersen, 1978; Stewart, 1980) e incrementar la conversión de ^{14}C - glutamato a prolina (Wrench et al., 1977; Stewart, 1980).

Así mismo se ha observado que los niveles endógenos de ABA libre aumentan antes de que se inicie la acumulación de prolina (Aspinall, 1980).

Tabla 8

Algunas de las funciones propuestas para la acumulación de prolina en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico

Possible significancia adaptativa

Relaciones con el agua.

- 1) Substancia osmótica durante el estrés hídrico.
- 2) Protege de la desecación.

Metabolismo de nitrógeno.

- 3) Almacén de nitrógeno en una forma no tóxica y disponible.
- 4) Forma translocada del nitrógeno reducido durante el estrés hídrico.
- 5) Detoxicación del NH_3 durante el estrés hídrico.

Metabolismo de la energía.

- 6) Fuente de poder reductor y/o esqueletos carbonados para uso una vez finalizado el estrés.
- 7) Sumidero de exceso de poder reductor durante el estrés hídrico.

Se sabe que prolina se sintetiza a partir de glutamato (Fig. 9), que a su vez procede de α -cetoglutarato y la síntesis de éste requiere de la actividad de la enzima PEPC (Fig. 10).

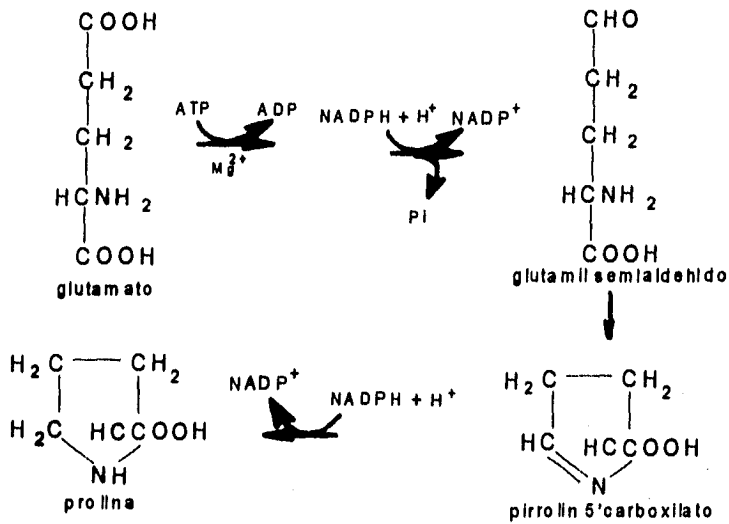


Fig. 10. Secuencia de reacciones en la ruta biosintética de prolina a partir de glutamato.

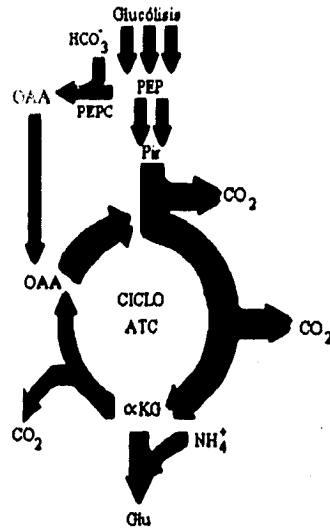


Fig. 11. Participación de la PEPC en la síntesis de glutamato.

II.2.6. RESPUESTA DE LA ENZIMA PEPC DE MAÍZ AL DÉFICIT DE AGUA

El incremento en la síntesis de solutos compatibles en respuesta a déficit de agua debe requerir de un aumento de las actividades enzimáticas que están directa o indirectamente involucradas en esta síntesis. Estos cambios, como ya se ha mencionado con anterioridad, pueden ocurrir por modificaciones en la concentración de enzimas, lo que por lo general implica diferencias en la expresión de los genes que las codifican o por cambios en los estados de activación de las enzimas preexistentes (Jones, 1973; Stivorová et al., 1987).

Como se sabe, el cierre de estomas bajo condiciones de estrés hídrico, conlleva la disminución total o parcial de la captura de CO₂. Esto afecta seriamente los procesos de asimilación de nitrógeno y de carbono. El esqueleto carbonado de la prolina sólo puede

provenir de la asimilación fotosintética o de los productos de reserva como el almidón o la sacarosa, ya que se ha comprobado que el aumento de aminoácidos libres que se produce en respuesta a déficit de agua por una proteólisis incrementada no justifica la síntesis de la prolina (Hanson y Hitz, 1982; Jensen et al., 1994). En cualquier caso, la síntesis de la prolina requiere de una reacción anaplerótica que en las plantas es la catalizada por la PEPC (Rajagopal y Andersen, 1978; Jensen et al., 1994).

De acuerdo con esto, en el laboratorio de la Dra. Rosario Muñoz Clares se ha encontrado que la actividad de PEPC de hoja de maíz se incrementa en respuesta al déficit de agua. Esto es interesante teniendo en cuenta que la PEPC en este tejido es una enzima fundamentalmente fotosintética y contrasta con lo encontrado para la Rubisco. Es de esperar que bajo estas condiciones exista una estrecha relación entre la ruta C_4 de asimilación de CO_2 y el ciclo de Calvin, como ocurre en condiciones normales (Muñoz Clares, 1984). Si esto es así, dado que la actividad de Rubisco se reduce, la ruta C_4 podría no estar funcionando o estarlo haciendo en forma limitada, lo que supondría por un lado un descenso en los niveles citoplasmáticos de PEP, que ahora provendría de la glucólisis y no de la actividad de la ortofosfato piruvato dicinasa y por otro lado un incremento en los niveles de malato que no estaría siendo descarboxilado. Así la función de PEPC podría estar aprovechando de la mejor manera una situación desfavorable ya que podría estar reflejando el CO_2 producido internamente por la fotorrespiración y la respiración, que se sabe están aumentadas bajo esas condiciones de estrés y estomas cerrados (Muñoz Clares, 1994).

En hojas de maíz incubadas con polietilenglicol (PEG) se ha observado un aumento relativo de la cantidad de PEPC, así como un incremento en V_{max} y una reducción en K_m (Mg PEP). El estado de agregación de la enzima (tetrámero) no se ve afectado por el déficit de agua, pero se observa una variante de un punto isoeléctrico diferente (pI 6.5) (Rodríguez Penagos y Muñoz Clares, resultados por publicar).

Igualmente, estudios realizados en la planta completa sometida a estrés hídrico muestran una mayor actividad de PEP cuando se determina a concentraciones saturantes

y no saturantes del sustrato Mg PEP, lo que sugiere que tanto K_m como V_{max} se ven modificadas.

Los incrementos observados en V_{max} y en la afinidad de PEPC por su sustrato sugieren: (i) una modificación post-transcripcional de la proteína preexistente o (ii) que una nueva isoenzima ha sido sintetizada. Sin embargo, los incrementos en V_{max} pueden explicarse por un aumento en la expresión de PEPC- C_4 o por una disminución en la degradación del producto de este gen. Por medio de Western blot se ha demostrado que la cantidad de PEPC en extractos crudos de hojas de maíz sometidas a déficit de agua aumenta hasta en un 50% con respecto al control. Estos estudios mostraron una sola banda de PEPC cercana a 106 kDa, lo que indica que el peso molecular de las subunidades de PEPC no se ve afectado por el estrés. Sin embargo, como las diferentes isoformas de PEPC tiene una masa molecular muy semejante, se determinó por isoelectroenfoque la presencia de la isoforma C_4 de PEPC (de pI 5.3 a- 5.5) y además otra variante de pI 6.5- 6.7. Ambas bandas dan señal en inmuno transferencias (Western blot) con anticuerpos anti-PEPC- C_4 (Rodríguez Penagos y Muñoz Clares, por publicar). Aún no se sabe si esta variante alcalina de PEPC observada en maíz es el resultado de una modificación post-transcripcional o el resultado de la síntesis "de novo" de una nueva isoenzima. A este respecto, es interesante hacer notar que la inducción por estrés hídrico de una isoforma de la PEPC de pI 6.5 precede a la aparición del metabolismo CAM en *M. crystallinum*, que es una planta CAM facultativa (Lüttge, 1993).

Se sabe que en hojas de maíz existen al menos 2 genes para PEPC: uno que codifica para la isoforma C_4 y el otro para la isoforma anaplerótica C_3 (Kawamura, 1992), pero no se conoce si este último se expresa o no.

Los datos experimentales obtenidos hasta el momento son muy interesantes dado que es la primera vez que se encuentran cambios en la actividad y a nivel proteína de PEPC en una planta C_4 similares a los que se llevan a cabo en las plantas CAM facultativas. En este tipo de plantas, se ha reportado, así mismo, que los niveles endógenos de ABA se incrementan previo al aumento de PEPC y la aplicación exógena de esta fitohormona reproduce los efectos de un estrés hídrico e incrementa la cantidad de transcritos de PEPC. Estos resultados experimentales sugieren que la síntesis de

PEPC podría estar bajo el control del ABA ya que hay un incremento en sus niveles endógenos en paralelo a los incrementos detectados del transcrito de la PEPC (Taybi et al., 1995).

II.3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS USADAS EN ESTE PROYECTO

II.3.1 TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR)

Dentro del desarrollo experimental de este proyecto, la técnica más importante que permitió abordar el problema planteado sin necesidad de clonar el gen de PEPC-C₃ para poder obtener la sonda requerida en los experimentos de Northern blot fue la de Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa, cuyos principios teóricos se describen a continuación

Principio del método

La técnica relativamente reciente de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una idea original de Karin Mullis desarrollada en 1986 y por la cual recibió el premio Nobel. Nuevas metodologías y aplicaciones basadas en esta técnica se están descubriendo por lo que PCR se ha convertido en una herramienta muy poderosa utilizada en biología molecular que ha cambiado en gran medida la manera en que se realizan una amplia variedad de experimentos.

La técnica de PCR es un método enzimático de síntesis de múltiples copias de un segmento específico de ADN preseleccionado que se encuentra entre regiones de secuencia conocida (Fig. 12). Una amplificación de esta magnitud, facilita enormemente la obtención de sondas específicas. La reacción de amplificación se lleva a cabo empleando dos oligonucleótidos que son utilizados como iniciadores para una serie de

reacciones sintéticas que son catalizadas por una ADN polimerasa termoestable. Estos oligonucleótidos son dos diferentes secuencias complementarias a secuencias que: 1) se sitúan en cadenas opuestas del ADN utilizado como molde y 2) flanquean el segmento de ADN que va a ser amplificado.

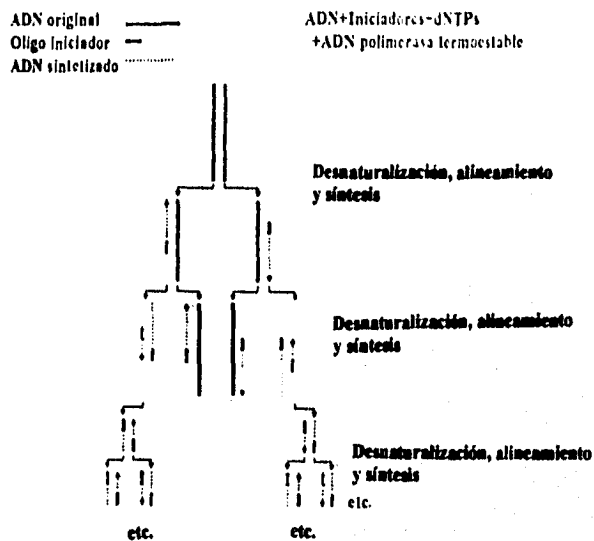


Fig. 12. Amplificación de ADN por PCR. El ADN para ser amplificado es desnaturalizado en presencia de una ADN polimerasa termoestable, un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos y oligonucleótidos que se unen específicamente a una secuencia conocida iniciando la síntesis. El producto es acumulado en forma exponencial en cada ciclo de amplificación (tomado de Mullis, 1990).

El ADN utilizado como molde es primeramente desnaturalizado en presencia de concentraciones muy altas de cada uno de los oligonucleótidos y los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos A, C, G y T. Posteriormente la reacción se lleva a una temperatura en la que los oligonucleótidos iniciadores se unen a su correspondiente cadena complementaria. Los iniciadores son orientados con terminaciones 3' de tal modo

que la síntesis por la ADN polimerasa se extienda a través de la región del ADN molde entre los iniciadores. El principal producto de esta reacción exponencial es un segmento de doble cadena de ADN en donde la terminación de la síntesis está definida por los extremos 5' de los iniciadores y su tamaño está en función de la distancia entre estos. El hecho de que cada iniciador sea complementario a una de las nuevas cadenas sintetizadas permite que cada nueva cadena pueda participar como molde en ciclos subsecuentes de extensión iniciadora de amplificación del segmento. De este modo, cada ciclo de desnaturalización, iniciación de la amplificación y extensión enzimática duplica la cantidad de ADN del ciclo previo (Sambrook et al., 1989).

Otra de las técnicas de las que se hizo amplio uso dentro de este trabajo fue la electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

II.3.2. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Este es el método más comúnmente usado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Cuando una molécula es colocada en un campo eléctrico, migrará al electrodo apropiado a una velocidad, o movilidad electroforética, proporcional a la fuerza de la corriente eléctrica y la carga neta de la molécula. Ya que se utiliza un medio no reactivo y estable, la movilidad electroforética es inversamente proporcional al coeficiente de fricción de la molécula (que es una función del tamaño y forma de la molécula, así como de la viscosidad del medio). Así, una gran mezcla de diferentes moléculas se puede separar por electroforesis en base a:

- a) Tamaño de la molécula, que en el caso de ADN se refiere a la masa o longitud.
- b) Forma o conformación de la molécula.
- c) Magnitud de la carga neta de la molécula.

Cuando se coloca el ADN en un campo eléctrico se resuelve en forma de bandas que migran a diferentes velocidades. En condiciones fisiológicas, los grupos fosfato del

enlace fósforo-azúcar de los ácidos nucleicos, se encuentran ionizados. Cadenas polinucleotídicas de ADN o ARN son "polianiones" y migrarán hacia el electrodo positivo (ánodo) al ser colocados en un campo eléctrico. La viscosidad del soporte, que en este caso es un gel de agarosa, se determina ajustando el grado de entrecruzamiento de la matriz porosa. Ya que los ácidos nucleicos se mueven entre los poros de la matriz conforme son atraídos hacia el ánodo, su velocidad se ve influenciada en gran medida por el tamaño de la molécula y el poro (Rodríguez y Tait, 1983).

El colorante bromuro de etidio fluoresce cuando es irradiado con luz UV de 300 nm. Este colorante se intercala entre las bases del ADN o ARN, por lo que se le utiliza como un medio para visualizar los ácidos nucleicos en geles de agarosa o poliacrilamida. Las moléculas de los ácidos nucleicos se observan como bandas al ser irradiado el gel con luz UV, ya que el bromuro de etidio no se une a la agarosa. (Rodríguez y Tait, 1983).

II.3.3. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Los plásmidos son moléculas de ADN circular relativamente pequeñas que existen en forma independiente de los cromosomas de su hospedero. Se trata de "parásitos" moleculares presentes en diferentes de bacterias y levaduras. Por lo general los usados para clonación confieren resistencia a un antibiótico (Sofer, 1991).

El kit TA Cloning PCR II provee de una estrategia de clonación en un paso para inserción directa de productos de PCR en un plásmido. Entre las ventajas principales que presenta este sistema están la de eliminar cualquier posibilidad de modificaciones enzimáticas del producto de PCR y de no requerir de iniciadores para PCR que contengan sitios específicos de restricción.

Este sistema funciona en base a la actividad no dependiente del molde que añade una deoxiadenosina (A) al extremo 3' del producto de PCR. El vector linearizado del kit posee a su vez una deoxitimidina (T) en el extremo 3'. Esto permite a los insertos de PCR una ligación eficiente con el vector.

El esquema siguiente muestra el concepto del método:



Experimentalmente se debe generar primero el producto de PCR a clonar en el pCR II. El producto es ligado al vector y transformado en células competentes INV α F' y los plásmidos recombinantes seleccionados por resistencia a ampicilina y coloración por tratamiento con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosidasa (X-gal) e isopropil tio β -D-galactosido (Invitrogen, 1995).

La etapa principal del experimento de clonación es la generación e identificación de clones recombinantes por la introducción de las moléculas de ADN sintetizadas dentro de la célula huésped. La identificación se fundamenta en la complementación (Sambrook et al., 1989). El vector de clonación posee una secuencia que codifica para la β -galactosidasa (*lac Z*). En esta región codificadora se encuentra un sitio de clonación que no interrumpe el marco de lectura. Este tipo de vectores son utilizados en células huésped que codifican para la porción C-terminal de β -galactosidasa.

La complementación se lleva a cabo ya que la delección del segmento operador proximal del gen *lac Z* es complementado por mutantes β -galactosidasa negativos que tienen la región operadora proximal intacta. Las bacterias Lac⁺ que son el resultado de la complementación se reconocen porque las colonias son de color azul en presencia del sustrato X-gal. Ahora bien, la inserción de un fragmento de ADN dentro del sitio de clonación del plásmido da como resultado la producción de un fragmento N-terminal que no es capaz de realizar la complementación. La bacteria que contenga plásmidos recombinantes por esta razón formará colonias blancas Lac⁻ (Sofer, 1991; Sambrook et al., 1989).

Para la reacción de ligación se emplea la ligasa de ADN purificada a partir del bacteriófago T4 que funciona muy bien cuando se tienen extremos 'pegajosos', es decir regiones de cadena sencilla complementarias que se encuentran en los extremos de algunas moléculas de ADN. En este caso el vector se corta con Eco RI lo que produce un plásmido linearizado con dos extremos cohesivos, el producto de PCR puede insertarse en estos sitios regenerando el círculo. Una vez que esto se ha logrado, la esencia de la clonación se ha completado.

III OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los posibles cambios en los niveles relativos de los transcritos (ARNm) de la isoforma de PEPC-C₃ en hoja de maíz provocados por estrés hídrico y salino y por aplicación de ABA exógeno.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) A partir de la secuencia de ADN de la isoforma C₃ de la PEPC de maíz, diseñar y sintetizar oligonucleótidos diferenciales

2) Amplificar por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADN que pueda ser usado como sonda radiactiva específica para detectar el mensaje (ARNm) de la isoforma de PEPC-C₃ presente en hojas de maíz tratadas y control.

3) Comprobar por medio de experimentos de hibridación ADN-ADN (Southern blot) que el fragmento amplificado por PCR corresponde al gen de PEPC.

4) Clonar el producto de PCR en el vector pCR II.

5) Realizar experimentos de hibridación ARN-ADN (Northern blot) para estudiar la expresión del mensaje para la isoforma C₃ de la PEPC de maíz en preparaciones de ARN total obtenidas de hojas control y sometidas a los diferentes tratamientos (déficit de agua, estrés salino y aplicación de ABA exógeno).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la extracción del ADN genómico se utilizaron ejes embrionarios de maíz (*Zea mays*, variedad Chalqueño) extraídos manualmente de semillas secas.

Para la extracción del ARN total se emplearon discos de hojas de maíz de plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 16 h de luz natural y 8 de obscuridad a una temperatura de 25-30 °C, sembradas en macetas de 5 L en invernadero. Se utilizaron plantas con siete u ocho hojas totales, tomándose la sexta hoja de siete o la séptima de ocho. Las hojas se cortaron sumergidas en agua para evitar el cierre de los conductos del haz vascular. Cada disco utilizado tuvo un peso aproximado de 200 mg y un diámetro de 2 cm.

IV.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

El diseño de los oligonucleótidos diferenciales para la isoforma C₃ de la PEPC de maíz se basó en la secuencia reportada por Kawamura et al., 1992. De acuerdo con los datos reportados, se tiene que las formas C₄ y C₃ de PEPC de maíz tienen una similitud de 71% con respecto a nucleótidos y del 77% en aminoácidos. Sin embargo, estas diferencias entre las isoformas son claras en la región 3' no traducida (Fig. 1).

Para la síntesis de oligonucleótidos, el método más comúnmente usado es el de fosforamiditas y la química de los fosfitos triéster en fase sólida. Para la síntesis, los monómeros deben ser protegidos químicamente de modo que la única reacción sea una adición secuencial. Debido a la reactividad inherente de las bases del ADN y los azúcares, todos los centros reactivos deben ser protegidos por grupos que puedan ser luego eliminados por amonólisis. La química de la síntesis automatizada de ADN puede entenderse en términos de una adición y eliminación consecutiva de grupos protectores de azúcares y aminos en fase sólida.

Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados por el método anterior en el aparato Gene Assembler Special (Pharmacia LKB) son las siguientes:

Oligo sentido (Forward) 5' - ACCACGAAGA GGGGATC - 3'

Oligo complementario (Reverse) 5' - AACGCAAGCC ATGTTC - 3'

Una vez sintetizados, se procede a separar el oligonucleótido de la fase sólida y a eliminar los grupos protectores utilizando el siguiente protocolo (Pharmacia LKB Biotechnology AB, 1992):

1) Se coloca el cassette en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga por 1 min a 200 rpm para eliminar el exceso de acetonitrilo.

3) Se transfiere el cassette a un tubo eppendorf limpio y se agrega 1 ml de hidróxido de amonio al 30% .

4) Se tapa el tubo y se centrifuga 1 min a 2000 rpm para que la solución de hidróxido de amonio pase a través del cassette.

5) Después se coloca el tubo dentro de un frasco que contenga 1ml de hidróxido de amonio, se tapa y se sella.

6) Se incuba a 55 °C durante toda la noche.

7) Terminada la incubación, se saca del baño y deja enfriar antes de abrir el frasco.

8) Se saca el tubo eppendorf, y el cassette se pasa a un tubo limpio.

9) Se centrifuga 1 min a 2000 rpm para coleccionar la solución de hidróxido de amonio que contiene un alto porcentaje de oligonucleótidos.

La solución cruda de oligonucleótidos contiene sales de amonio, moléculas provenientes de los grupos protectores y oligonucleótidos más cortos. Para eliminar estas impurezas, se purifican los oligonucleótidos por cromatografía de exclusión molecular en una columna empacada con Sephadex G-25. Para cada ml de solución de hidróxido de amonio es necesario empacar tres columnas de Sephadex G-25 equilibradas con TE pH 8 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM) en jeringas de plástico de 1 ml. Para ello:

- 1) Se tapa la jeringa de 1 ml con fibra de vidrio siliconizada estéril.
 - 2) Se coloca la jeringa en un tubo cónico de 15 ml.
 - 3) Se empaca la columna con 1 ml de la suspensión de Sephadex G-25 y centrifugar 3 min a 2500 rpm.
 - 4) Se repite el paso (3) hasta que el nivel de resina llegue a 1 ml.
 - 5) Se equilibra con 200 μ l de TE pH 8.
 - 6) Se centrifuga por 3 min a 2500 rpm.
 - 7) Se aplican unos 300 μ l de la muestra por columna y se centrifuga 3 min a 2500 rpm.
 - 8) Se colecta en un tubo limpio de 1.5 ml y se almacena en el congelador de -20 °C.
- (Ausubel et al. 1992).

IV.3 CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS SINTETIZADOS

Para medir la cantidad de ácidos nucleicos en una preparación cuando la muestra es lo suficientemente pura, es decir, sin cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa u otro ácido nucleico, la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación absorbida por las bases es lo más adecuado. Las lecturas deben tomarse a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La lectura de 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra. Como los oligonucleótidos sintetizados son ADN de cadena sencilla y de alta pureza, se leyó únicamente la absorbancia a 260 nm. El coeficiente de extinción molar (ξ) de un oligonucleótido a 260 nm se calcula por la siguiente fórmula (Freifelder, 1982):

$$a(16000) + b(12000) + c(17000) + d(9600) = \xi$$

En donde: a, b, c y d son el número de adeninas, guaninas, citosinas y timinas respectivamente y 16000, 12000, 17000 y 9600 son los respectivos coeficientes de extinción molar.

Con el coeficiente de extinción molar fue posible calcular la concentración de los oligonucleótidos por medición de absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro Ultrospec LKB Pharmacia a partir de una dilución 1:100 de la solución original.

Una vez calculada la concentración, las muestras se dividieron en alícuotas de 200 μ l y se prepararon diluciones de concentración final 20 μ M que se guardaron a -20 °C.

IV.4. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN POR PCR

Una vez que se contó con los oligonucleótidos sentido y complementario para PEPC-C₃ fue posible montar las primeras reacciones con el fin de amplificar un fragmento del gen PEPC-C₃ que consistiría de 209 bases.

Para las reacciones de PCR se utilizó el termociclador modelo DNA Thermal cycler 480, Perkin Elmer.

Para calcular la temperatura de fusión aproximada de los oligonucleótidos se consideró que para romper una unión G-C se necesitan 4 °C y para A-T 2 °C.

El procedimiento seguido fue el que a continuación se describe:

1) En un tubo eppendorf de 0.5 ml se preparó la mezcla maestra de reacción de la siguiente manera: se añadió por cada tubo de reacción 32 μ l de agua desionizada estéril, 5 μ l de amortiguador de amplificación (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y KCl 500 mM), 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 4 μ l de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato 2.5 mM, 2 μ M de oligos forward y reverse, 60 ng de ADN molde (en un volumen de 1-3 μ l) y por último una unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). Es conveniente realizar la mezcla en hielo para evitar aparamiento entre ambos cebadores.

2) Se mezcló y se agregaron unos 30 µl de aceite mineral (Sigma M-3516) para evitar la evaporación de la muestra durante los repetidos ciclos de calentamiento y enfriamiento.

3) Se incubó la muestra en el ciclador térmico (DNA Thermal cycler, 480 Perkin Elmer) por 5 min a 94 °C para desnaturalizar completamente el ADN.

4) Cada ciclo de la reacción de amplificación consistió en:

a) Desnaturalización a 94 °C por un minuto.

b) Complementación de los iniciadores a 52 °C por 45 segundos.

c) Elongación a 72 °C por 30 segundos.

Se repitió esta serie 35 veces y para la elongación final se incubó por 10 min a 72 °C. Finalmente, se analizaron los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando los marcadores de peso molecular adecuados como se describe a continuación.

IV.5. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

1) Se prepara un gel al 2% fundiendo completamente la cantidad necesaria de agarosa en amortiguador TAE 1X (a partir de una solución 50X: 242g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 37.2 g de EDTA, agua estéril para ajustar volumen a 1L) en horno de microondas. El volumen no debe superar el 50% del recipiente utilizado. La concentración del gel depende del tamaño de las moléculas de ADN o ARN y del grado de separación que se desee.

2) Se agrega bromuro de etidio (a partir de una solución stock de 0.5 mg/ml) a una concentración final de 0.5 µg/ml.

3) Se vacía la solución en el molde evitando la formación de burbujas. El gel debe tener un grosor de 3-5 mm.

4) Se deja solidificar por unos 30 min a temperatura ambiente, se retira el peine y las cuñas del aparato de electroforesis (Horizon 58, Gibco BRL). Se utiliza TAE 1X como amortiguador de corrida (200 ml) cubriendo completamente el gel.

5) Se mezclan las muestras de ADN con amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, 50% glicerol, 0.2M de EDTA pH 8.3) y se depositan en los pozos formados en el gel.

6) Se corre el gel a 60 volts.

7) Se examina el gel en un transiluminador de luz UV.

IV.6. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

El procedimiento incluye tres etapas principales:

a) Generación de células competentes

Se empleó el método utilizado por Sambrook, et al. (1989).

1) Se crecen las células INV α F' hasta fase exponencial.

2) Se transfieren a un tubo de centrifugación estéril y se centrifuga a 3500 rpm por 10 min a 4 °C.

3) Se resuspende mezclando suavemente en 1/10 del volumen original de solución TSS (10 % de PEG, 5 % de DMSO y 35 mM de Mg Cl₂, pH 6.5) fría.

4) Se preparan alícuotas de 100 μ l en tubos eppendorf de 1.5 ml y se guardan a -70 °C.

b) Ligación.

Para esta etapa, se siguieron las recomendaciones señaladas y el procedimiento descrito en manual que acompaña al kit PCR II (Invitrogen) que es el que se detalla a continuación:

1) Se centrifuga uno de los viales de pCR II para coleccionar todo el líquido en el fondo del vial.

2) Se calcula por la siguiente fórmula, la cantidad de producto de PCR necesario para ligar 50 ng de vector pCR II:

X ng de producto de PCR - $(Y \text{ pb del producto de PCR}) / (50 \text{ ng de vector pCR II})$
 Tamaño en pb del vector pCR II = 3900

3) Se corta el vector pCR II con Eco RI.

4) Se monta la reacción de ligación de la manera siguiente:

Producto de PCR	X μ l
Amortiguador de ligación 10 X	1 μ l
Vector pCR II cortado con Eco RI (25 ng / μ l)	2 μ l
Agua estéril cbp	9 μ l
T4 ADN ligasa (4 unidades Weiss)	1 μ l

4) Se incuba la reacción a 14 °C por un mínimo de 4 h y preferentemente durante toda la noche.

5) Si no es posible transformar en el momento, se guarda a -20 °C.

En nuestro caso se utilizaron 2 μ l del producto de PCR fresco.

Es importante considerar que no es conveniente utilizar más de 3 μ l del producto de PCR recién amplificado ya que las sales presentes en la mezcla de reacción de PCR pueden inhibir a la ligasa de ADN. Así mismo, ligaciones a temperaturas mayores a 14 °C son menos eficientes.

c) Transformación

La metodología seguida fue la que se describe a continuación:

1) Se centrifuga el vial que contiene la reacción de ligación y se coloca en hielo.

2) Se descongela el tubo eppendorf de células competentes y se agregan 2 μ l de β -mercapto etanol 0.5 M.

3) Se mezcla suavemente con la punta de la pipeta.

4) Se agregan 2 μ l de la reacción de ligación y se mezcla suavemente con la punta de la pipeta.

5) Se da un choque térmico a 42 °C por 30 s. y se coloca en tubo en hielo por 2 min.

6) Se agregan 450 μ l de medio Luria-Bertoni (LB) y se incuba por 1 hora a 37 °C.

7) Se plaquea en cajas con ampicilina (50 µg ampicilina/ml de medio), X-gal (50µg/ml) e IPTG (1 mM) que se incuban por al menos 18 h a 37 °C. Para permitir el mejor desarrollo del color, se refrigeran las cajas petri después del tiempo de incubación a 37 °C y se seleccionan las colonias recombinantes que son de color blanco.

IV.7. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

La técnica empleada fue la siguiente (Sambrook, et al., 1989):

1) Se inoculan 5 ml de medio LB que contiene 50 µg/ml antibiótico (en este caso ampicilina) con una sola colonia de bacterias. Se incuba durante toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa.

2) Se colocan 1.5 ml de este cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga a 12000xg por 1 min.

3) Se retira el sobrenadante y se deja la pastilla bacteriana tan seca como sea posible.

4) Se resuspende la pastilla por agitación en vortex en 100 µl de amortiguador de lisis frío (Tris-HCl 25 mM, pH 8, SDS al 1% y NaOH 0.2 M).

5) Se incuba en hielo por 5 min.

6) Se adicionan 200 µl de una solución recién preparada que contenga NaOH 0.2 M y SDS al 1%. Se mezcla suavemente por inversión y se incuba en hielo por 5 min.

7) Se centrifuga a 12000xg por 5 min.

8) Se añade ribonucleasa a una concentración final de 20 µg/ml.

9) Se incuba a 37 °c por 20 min.

10) Se adiciona un volumen de TE-cloroformo/fenol saturado. Se agita en el vortex por 1 min y se centrifuga a 12000xg por 2 min.

11) Se transfiere la fase acuosa (fase superior) a un tubo eppendorf limpio y se adiciona un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se agita con el vortex por 1 min y se centrifuga por 2 min a 12000xg.

12) Se transfiere nuevamente la fase acuosa a un tubo limpio y se adicionan 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcla bien y se deja precipitar por incubación a - 70 °C durante 20 min.

13) Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifuga a 12000xg por 5 min.

14) Se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con 1ml de etanol al 70 % frío.

15) Se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones y se retira el etanol.

16) Se deja secar la pastilla y se disuelve n 10-20 µl de agua desionizada estéril o TE pH 8.

IV.8. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE MAÍZ

Se extrajo ADN genómico de maíz a partir de ejes embrionarios con el fin de realizar una hibridación del fragmento amplificado por PCR y verificar que se tratara de una parte del gen buscado y no de un artefacto de la reacción de amplificación.

Dentro de los métodos para extraer ADN de tejidos vegetales, el primer paso es romper las células del tejido vegetal para liberar el ADN, y en una segunda etapa, el ADN se separa de otros componentes celulares como proteínas, membranas, carbohidratos y pared celular. La purificación del ADN genómico, se lleva a cabo por el tratamiento con un detergente que posee cargas positivas que interactúan con la carga negativa del ácido nucleico en altas concentraciones de sales, formando un complejo soluble. En etapas subsecuentes, un decremento en la concentración de sales causa la precipitación del ADN separándolo de otros componentes como polisacáridos en solución (Taylor et al. 1993).

La metodología empleada es la descrita por De la Porta et al. (1983).

1) Se pesan 300 mg de ejes embrionarios de maíz y se trituran con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino.

2) Se transfiere a un tubo que contenga 15 ml de amortiguador de extracción (100 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercapto etanol) y 1 ml de SDS al 20%.

3) Se incuba a 65 °C por 10 min y después se agregan 5 ml de acetato de potasio 5 M. Se mezclan y se coloca en hielo por 30 min.

4) Se centrifuga en frío a 18000 rpm por 20 min.

5) Se vierte el sobrenadante a través de cuatro capas de gasa a un tubo que contenga 20 ml de isopropanol frío. Se mezcla suavemente por inversión y se mete al congelador de -20 °C por una hora.

6) Se observará un precipitado fibroso de ADN que se colecta con una pipeta pasteur doblada en forma de gancho. Se transfiere a un tubo nuevo que contiene 700 µl de TE pH 8.

7) Se añaden 4 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incuba a 37 °C por 30 min.

8) Se agregan 75 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2, y 500 µl de isopropanol frío. Se mete al congelador de -20 °C por 3 horas.

9) Se colecta el ADN con la pipeta pasteur en forma de gancho, se pasa a un tubo limpio y se enjuaga con etanol al 75%.

10) Se disuelve en 200 µl de TE, pH 8.

11) Para determinar la concentración y pureza del ADN se realiza la medición de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

IV.9 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Una vez que la preparación de ADN se ha liberado de macromoléculas contaminantes, la concentración de ADN en solución puede determinarse por espectroscopía de absorción UV. Las bases nitrogenadas del ADN de doble cadena exhiben un máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas tienen su máximo de absorción a 280 nm. Una A_{260} de 1.00 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para ADN de doble cadena. Preparaciones puras de ADN poseen valores de 1.8 a 2 del cociente A_{260}/A_{280} (Sambrook et al., 1989).

IV.10 PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Cuando se hace necesario el purificar un fragmento de ADN de un gel de agarosa puede seguirse la metodología que a continuación se describe (Sambrook et al., 1989):

- 1) Se carga la muestra en un gel de agarosa la 0.8% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y se somete a electroforesis.
- 2) Con ayuda del transiluminador de luz UV y una espátula estéril, se corta la banda de ADN deseada lo más rápidamente posible.
- 3) Se eluye con 150 μ l de TE pH 8 y se incuba durante toda la noche a 37 °C.
- 4) Se pasa por una columna empacada con fibra de vidrio para eliminar la agarosa.
- 5) Al eluido se le agregan dos volúmenes de etanol absoluto y se deja precipitar el ADN por incubación a -20 °C durante 30 min.
- 6) Después se centrifuga durante 5 min a 14000 rpm.
- 7) Se lava dos veces con etanol al 70% y se deja secar durante 5 min cerca del mechero y se eluye en agua desionizada estéril.

IV.11. DIGESTIÓN DE ADN GENÓMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas conocidas como endonucleasas de restricción han jugado un papel fundamental en el desarrollo de la Biología Molecular. Estas enzimas han sido localizadas en casi todos los organismos y catalizan el corte de ADN de doble cadena en secuencias específicas, para dar fragmentos de restricción. En general, se sigue el procedimiento que a continuación se describe para digerir ADN con enzimas de restricción:

1) Se toman 15 µg de ADN (44 µl en nuestro caso) se incuban con 30 u (3 µl) de enzima de restricción. Se adiciona el amortiguador de reacción (10X) adecuado para la enzima de acuerdo con la marca que se esté utilizando (en este caso se emplearon enzimas de Gibco BRL) a una concentración final 1X.

2) Se incuba toda la noche a 37 °C.

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron Hind III y Sal I

Estas dos enzimas reconocen y cortan las siguientes secuencias:

Sal I 5'- GTCGAC -3'
 3'- CTTAAG -5'

Hind III 5'- AAGCTT -3'
 3'- TTCGAA -5'

* Indica en sitio de corte.

El gen de PEPC-C₃ presenta respectivamente uno y dos sitios de restricción.

La composición de los amortiguadores de reacción que requieren estas enzimas es:

Sal I: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 10 mM DTE, 50% de glicerol pH 7.5.

Hind III: 10 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTE y 50% de glicerol pH 7.4.

IV.12. HIBRIDACIÓN ADN-ADN (TIPO SOUTHERN)

a) Transferencia por capilaridad del ADN a membrana de nitrocelulosa.

El análisis del ADN por hibridación tipo Southern blot se realiza por la transferencia del ADN desnaturalizado *in situ* y transferido del gel a un soporte sólido, generalmente membrana de nylon o nitrocelulosa. La posición relativa del ADN se conserva durante la transferencia al soporte y de esta manera el ADN ya unido al filtro puede ser hibridado con ADN marcado radiactivamente (Sambrook et al., 1989).

El procedimiento seguido fue el descrito por Sambrook et al. (1989) y es el que se detalla a continuación:

1) Se corren en un gel de agarosa al 0.7 % las muestras del ADN genómico cortado con enzimas de restricción y en nuestro caso, se incluyó también una muestra del fragmento amplificado por PCR a manera de control. Dado que el tamaño del fragmento de PCR es mucho menor, se dejan correr las otras muestras hasta un poco más de la mitad del gel antes de cargar esta muestra.

2) Se corta la membrana de nitrocelulosa (Gibco-BRL) 3 mm más corta de cada lado que el gel y se humedece en agua por 5 min.

3) Se equilibra la membrana con SSC 10X (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3 M).

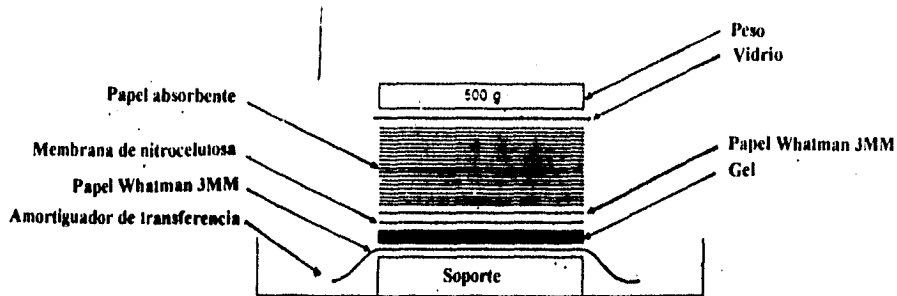
4) Se coloca el gel en HCl 0.2 M por 10 min con agitación constante.

5) Se lava con agua estéril varias veces para eliminar el exceso de HCl.

6) Se añade la solución desnaturalizante 2X (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) y se mantiene en agitación por 15 min.

7) Se cambia la solución anterior por solución de neutralización (Tris HCl 0.5M, NaCl 3 M, pH 8) y se agita por 30 min.

8) Finalmente, se monta la transferencia de acuerdo al esquema siguiente:



En la movilización por capilaridad del ADN del gel de agarosa al soporte sólido, se utilizó como solución de transferencia SSC 20X. La solución se coloca en el reservorio inferior pasando a través del gel hasta una pila de papel absorbente. El ADN se eluye del gel por la corriente en movimiento de la solución y así es llevado a la membrana de nitrocelulosa. Un peso aplicado encima de la pila de papel absorbente ayuda a asegurar la conexión estrecha entre las capas de material usado para la transferencia.

9) Una vez que la transferencia se ha completado (unas 24 h), se retira la membrana del gel y se lava con SSC 2X para eliminar los restos de agarosa.

10) Se deja secar la membrana sobre un papel filtro y se fijan los ácidos nucleicos con luz UV (UV Crosslinker, Hoefer Scientific Ins) por 2 min a 12000 microjules por cm^2 . (Sambrook et al., 1989).

b) Marcaje y preparación de la sonda

Los oligonucleótidos pueden servir como iniciadores para la síntesis de ADN en moldes de cadena sencilla por la acción de ADN polimerasas. El ADN sintetizado es marcado radiactivamente con una alta actividad específica utilizando $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dNTPs como precursores (Sambrook et al., 1989).

Para marcar se utilizó el kit Random Primer Extension System (DuPont) y los pasos a seguir fueron:

1) Para poder marcarse el ADN debe estar linearizado y desnaturalizado. La cantidad de ADN que se utilice por reacción debe ser de 50-100 ng, en un volumen que no supere los 12 μ l. En este trabajo se utilizaron aproximadamente 100 ng de ADN en un volumen de 3 μ l.

El ADN se desnaturaliza por calentamiento a 100 °C durante 5 min.

Transcurrido este tiempo se coloca inmediatamente en hielo.

2) Se adicionan 4 μ l de amortiguador 5X de Random Primer Extension (5X hexanucleótidos al azar en Tris pH 7.6, $MgCl_2$ 0.1 M, 1% de BSA y 0.5% de 2-mercaptoetanol) y 4 μ l de una mezcla 5X de desoxinucleótidos trifosfatos al tubo de reacción.

3) Se adicionan 2 μ l de dCTP ^{32}P (actividad específica 3000-6000 Ci/mmol, con una concentración de 20 mCi/ml) y la cantidad de agua desionizada requerida considerando un volumen final de reacción de 30 μ l.

4) Se inicia la reacción adicionando 1 μ l del fragmento Klenow de la ADN polimerasa (2.5 u).

7) Se mezcla bien y se incuba por 2 h a 37 °C o toda la noche a temperatura ambiente.

8) Para detener la reacción se adicionan 3 μ l de EDTA 0.5 M.

9) Se añaden 167 μ l de STE (10 mM Tris-HCl, pH7.5; 10 mM NaCl; 1mM EDTA).

10) Para medir incorporación de la marca se toma 1 μ l.

11) Se purifica la sonda (con el fin de separar el ADN marcado de los nucleótidos no incorporados) por columna de Sephadex G-25, utilizando una jeringa de 1ml con fibra de vidrio estéril compactada en su parte inferior. Se centrifuga a 700xg por 3 min.

12) Para medir incorporación de la marca se toma 1 μ l.

13) Se desnaturaliza la sonda calentando a 100 °C por 5 min antes de mezclarla con la solución de hibridación.

c) Hibridación

Una vez que ya se tiene la membrana de nitrocelulosa con los ácidos nucleicos fijados a ella y la sonda radiactiva listas, la última parte del procedimiento se realiza de acuerdo al protocolo siguiente:

1) Se prepara una solución de hibridación que contenga: SSC 6X, reactivo de Denhardt 5X (2% p/v BSA, 2% p/v PVP, 2% p/v Ficoll), SDS 0.5% y DNA de esperma de salmón (100 µg/ml).

2) Se equilibra la membrana con SSC 20X y se introduce a un tubo de hibridación. Se incuba por 10 min a 50 °C dentro del horno de hibridación (Hybridization Oven/ Shaker S1 20H, Stuart Scientific).

3) Se retira el SSC y se agrega la solución de hibridación.

4) Se deja incubando por 16 h a 50 °C y después se agrega la sonda. Ya con ésta se deja incubando por 20 h a 3.5 rpm.

5) Una vez que ha terminado el tiempo de hibridación se realizan los siguientes lavados:

SSC 2X, 0.1% SDS, 5 min a temperatura ambiente.

SSC 0.1X, 0.1% SDS, 1 h a 37 °C.

SSC 0.1X, SDS 0.1%, 1 h a 62 °C.

6) Terminados los lavados se deja secar la membrana y se expone con una película de rayos X.

IV.13. INDUCCIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN DISCOS DE HOJAS DE MAÍZ

Los tratamientos y tiempos utilizados fueron:

- * Ácido abscísico (ABA) 50 μ M, 45 min en oscuridad y 5 h de incubación bajo iluminación intensa con luz blanca.
- * Polietilenglicol (PEG 6000) al 25%, 6 h de incubación bajo iluminación intensa con luz blanca.
- * Solución de NaCl 0.5 M, 8 h de incubación bajo iluminación intensa con luz blanca.

Estos tratamientos fueron determinados en base a curvas de actividad de PEPC-
Contra diferentes tiempos de incubación. Se eligieron aquellos en los que se obtuvo la máxima diferencia en actividad entre la enzima extraída de la hoja tratada y el control respectivo. Las concentraciones de las soluciones son las mismas que se han empleado en otros estudios de inducción de estrés hídrico en hojas en nuestro laboratorio. La concentración de PEG empleada posee un potencial osmótico de 1.2 Mpa.

1) Se colocan los discos de hoja de maíz en cajas petri con suficiente cantidad de medio para que el tejido quede completamente sumergido. Se incluye para cada tiempo de incubación un disco control que será sometido a las mismas condiciones de iluminación intensa con luz blanca y con agua desionizada en lugar del medio de inducción de estrés.

2) En el caso de ABA, que es sensible a la luz, se prepara la solución pesando la mínima cantidad posible en un tubo eppendorf de 1.5 ml cubierto con papel aluminio. Se agregan unos 200 μ l de etanol absoluto, se disuelve y se transfiere a un vaso también cubierto con papel aluminio que contenga la cantidad adecuada de agua desionizada para tener una solución 50 μ M. Se agrega dicha solución a la caja petri con la muestra y se mantiene en oscuridad por 45 min antes de colocar a iluminación intensa.

3) En los demás casos, se colocan las muestras en la caja petri con el tratamiento correspondiente y se mantienen bajo iluminación por el tiempo adecuado.

4) Concluido el tiempo de incubación se hace la extracción del ARN.

IV.14. EXTRACCIÓN DE ARN DE HOJAS DE MAÍZ

Se utilizó la técnica de extracción por Trizol (Gibco-BRL). Este reactivo es una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del ARN durante la homogenización, al mismo tiempo que lisa las células y disuelve los componentes celulares. Con la adición posterior de cloroformo, se logran dos fases que son separadas por centrifugación. El ARN se mantiene en la fase acuosa. Una precipitación posterior con etanol, termina de eliminar el ADN contaminante y por adición de isopropanol se recupera el ARN. Esta técnica funciona muy bien para cantidades pequeñas de tejido y en poco tiempo se obtiene ARN libre de proteínas y de ADN que puede ser usado para experimentos de hibridación.

Al trabajar con ARN se deben tener cuidados especiales ya que es una molécula muy lábil y susceptible a degradación. La mayor fuente de problemas al aislar ARN proviene de las ribonucleasas que son enzimas muy estables y que no requieren de cofactores. Para evitar problemas de contaminación, todas las soluciones usadas deben tratarse con dietilpirocarbonato (DEPC) que inactiva la ribonucleasas. El material de plástico debe esterilizarse por al menos 30 min y el material de vidrio homearse a 300 °C por al menos 4 h (Strommer et al., 1993).

La metodología empleada se detalla a continuación:

- 1) Después de la incubación del disco en el tratamiento correspondiente, se coloca en un mortero estéril y se congela con nitrógeno líquido.
- 2) Se adiciona 1 ml de Trizol por cada 300 mg de tejido y se homogeniza con ayuda del pistilo.
- 3) Se transfiere la muestra a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se incuba por 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de las nucleoproteínas.
- 4) Se añaden 0.2 ml de cloroformo por ml de Trizol utilizado. Se agita vigorosamente por 15 segundos y se incuba por 2 min a temperatura ambiente.
- 5) Se centrifuga en frío a no más de 12000 xg por 10 min.

6) La mezcla se separará en dos fases, una inferior color café que contiene el fenol y el cloroformo, una interfase, y una fase superior acuosa, el ARN se mantiene en esta última. Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio cuidando de no tocar la interfase.

7) Se precipita el ARN de la fase acuosa mezclando con isopropanol. Se añaden 0.5 ml de isopropanol por ml de Trizol usado. Se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente por 15 min. Terminada la incubación se centrifuga en frío a no más de 12000xg.

8) Se elimina el sobrenadante, se lava 2 veces con 1 ml de etanol al 70%, y se centrifuga en frío por 5 min.

9) La pastilla de ARN se deja secar por unos 5 min cerca del mechero y se resuspende en 50 μ l de agua tratada con DEPC.

10) Se toman 1 ó 2 μ l de la muestra en un tubo estéril y se lleva a 100 μ l con agua tratada con DEPC para cuantificar por A_{260} . Medir también A_{280} y A_{330} para analizar la pureza de la preparación por cuantificación de proteínas y carbohidratos contaminantes.

Para la cuantificación del ARN considerar que una absorbancia a 260 nm de 1.00 corresponde aproximadamente a 40 μ g de ARN total.

En caso de ser necesario, para incrementar los rendimientos de la extracción es posible realizar una segunda extracción con 500 μ l de Trizol y 100 μ l de cloroformo antes de precipitar con isopropanol.

IV.15. HIBRIDACIÓN ADN-ARN O NORTHERN BLOT

La razón más común para el aislamiento de ARN es la necesidad de evaluar el tamaño, la especificidad del tejido y la cantidad relativa de transcrito. Toda esta información puede obtenerse de un Northern blot. En esta técnica, el ARN es separado en un gel de agarosa desnaturalizante, transferido a una membrana de nitrocelulosa e hibridado con una sonda específica marcada radioactivamente.

El procedimiento a seguir se describe a continuación:

a) Preparación del gel desnaturalizante de agarosa

1) Se prepara un gel de agarosa al 1.5% (de un ancho de 0.8 mm, para lo que se requiere en el caso del aparato Horizon 11-14 Life Technologies, de un volumen final de 150 ml) en ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico(MOPS) 1X (preparado mediante la dilución de una solución 10X que contiene: 0.2 M MOPS, 80 mM de acetato de sodio, 10 mM de EDTA, pH 8). Para un gel de 150 ml, se añaden 110 ml de agua tratada con DEPC y se funde en horno de microondas. Se deja enfriar un poco y se adicionan 15 ml de MOPS 10X.

2) Se coloca en un baño de agua a 55 °C. Cuando la agarosa haya llegado a esta temperatura, se agregan 37 ml de formaldehído al 37% (25% del volumen final).

3) Se mezcla bien y se vacía al molde del aparato de electroforesis (Horizon 11-14 Life Technologies). Se deja solidificar por unos 45 min.

5) Como amortiguador de corrida se utiliza MOPS 1X preparado con agua tratada con DEPC.

b) Preparación de las muestras

Una vez que el gel se tiene listo, se procede a preparar las muestras de ARN que se cargarán en él de la siguiente manera:

Se deben cargar en el gel de 10-30 µg de ARN total. En este caso, después de varios ensayos, se determinó que 10 µg eran suficientes para detectar el mensaje buscado.

1) Se colocan 10 µg de ARN en un tubo, se añade un 10% de MOPS 5X, 10% de formaldehído al 37% y 20% de formamida.

2) Se desnaturaliza la muestra por calentamiento a 60-65 °C durante 10 min.

3) Se coloca inmediatamente en hielo y se agrega la cantidad de amortiguador de carga (56% de formamida desionizada, 17% de formaldehído al 37%, 11% de MOPS

5X, 15% de glicerol al 50% y azul de bromofenol) necesaria como para mantener al menos una relación en volúmenes amortiguador:muestra de 3:1.

4) Una vez que se ha corrido el gel, puede teñirse con una solución de bromuro de etidio 0.5 mg/ml durante 5 min. Si se decide teñir, es preferible desteñir completamente por lavados con agua tratada con DEPC antes de montar la transferencia, ya que el bromuro de etidio interfiere con la movilización del ARN al soporte sólido.

c) Transferencia

Se monta de manera semejante al Southern blot, pero el gel sólo se lava con agua estéril tratada con DEPC para eliminar el exceso de formaldehído y MOPS.

La solución de transferencia utilizada es SSC 20X.

Se deja transfiriendo por unas 48 h, se desmonta y el gel se tiñe con bromuro de etidio para verificar la eficiencia. Se lava con SSC 2X y se fija en el UV Crosslinker de la misma manera como se hizo en el Southern blot.

d) Prehibridación e hibridación

La solución de hibridación contiene: albúmina bovina fracción V 1%, SDS 7%, EDTA 1 mM y amortiguador de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.5 M.

Se prehibrida por al menos 2 h con 6 ml por tubo de la solución anterior.

La sonda se marca como se describió anteriormente y se desnaturaliza por calentamiento a 100°C durante 5 min antes de añadirla al tubo. Se hibrida en el horno (Hibridisation Oven Shaker SI20H Stuart Scientific) por 24 h. En el caso de este trabajo, se estableció que la temperatura de hibridación adecuada fue de 60 °C.

Una vez terminada la hibridación se procede a lavar la membrana. El número de lavados es variable, y para determinar si es necesario realizar otro más se va verificando la señal con el contador Geiger.

Para las hibridaciones efectuadas, los lavados que se realizaron fueron los siguientes:

* Dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X, SDS 0.1% por 15 min cada uno.

* Lavado a 37 °C con SSC 1X, SDS 0.1% por 45 min.

* Lavado a 60 °C con SSC 1X, SDS 0.1%. por 45 min.

Una vez lavada la membrana, y cuando ya no se detecta mucha señal inespecifica se expone con una pelicula de rayos X en un cassette y se guarda a -70 °C. Se revela cuando haya transcurrido un tiempo de exposición razonable (de 24 a 72 h).

V. RESULTADOS

V.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA FORMA C₃ DE LA PEPC

El primer objetivo práctico del presente trabajo fue la obtención por amplificación selectiva de un segmento de ADN correspondiente al gen de la PEPC-C₃ que pudiera utilizarse posteriormente como sonda radiactiva para analizar, independientemente de la forma C₄, el mensaje de esta isoenzima en hojas de maíz control y sometidas a estrés hídrico.

Para la obtención de dicho fragmento, se sintetizaron dos oligonucleótidos a partir de la secuencia reportada por Kawamura et al (1992). Se escogió la región 3' no codificadora debido a que es en esta zona en donde difieren completamente PEPC-C₃ y C₄, lo que permitiría analizar el mensaje de la primera sin interferencia del correspondiente a la otra isoenzima que es la más abundante en hojas de maíz.

Los oligonucleótidos ya purificados se sometieron a electroforesis en un minigel de agarosa para corroborar la síntesis, se calculó su coeficiente de extinción molar (ϵ) y su concentración a partir de la lectura de A_{260} obtenida y tomando en consideración el factor de dilución correspondiente. Las preparaciones de oligonucleótidos se dividieron en alícuotas de 200 μ l y se prepararon diluciones de concentración final 20 μ M.

Las características de los oligonucleótidos sintetizados se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1
Características de los oligonucleótidos sintetizados para la forma C₃ de la PEPC

	Oligo Forward	Oligo Reverse
Secuencia	ACCACGAAGAGGG	AACGCAAGCCATG
Longitud	17 nucleótidos	16 nucleótidos
Temperatura de fusión	44 °C	38 °C
ϵ	205,600 M ⁻¹ cm ⁻¹	179,800 M ⁻¹ cm ⁻¹
Concentración	162.97 μ M	135.15 μ M

Fue importante el cálculo de la temperatura de fusión de cada oligonucleótido dado que es uno de los factores a considerar durante la determinación de las temperaturas de alineamiento en las reacciones de PCR.

V.2. AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN DE PEPC-C, POR PCR

En la etapa siguiente se establecieron las condiciones para la amplificación específica del fragmento buscado por la técnica de PCR. Primero se tuvieron que probar diferentes concentraciones de desoxinucleótidos y diferentes tiempos de desnaturalización, complementación y extensión enzimática del ADN. En el primer experimento realizado, se utilizaron las concentraciones de reactivos y los tiempos sugeridos en los protocolos estandarizados (Sambrook et al., 1989) y 60 ng de ADN genómico de maíz. La única variante introducida fue la temperatura de alineamiento, que se recomienda no rebase por más de 10 °C a la temperatura de fusión de los oligonucleótido. En un primer experimento se fijó en 48°C, obteniéndose poco producto de amplificación en los 35 ciclos de PCR realizados y muchos subproductos inespecíficos. Con este primer intento, se fijaron las concentraciones de magnesio, *Taq* DNA polimerasa, iniciadores y ADN genómico. Para reducir la inespecificidad de la amplificación y aumentar la cantidad de producto de PCR, se aumentó el tiempo de desnaturalización de 30s a 1 min, se elevó la temperatura de alineamiento en 2 °C, el tiempo de complementación 30 s a 45 s y la concentración de dNTPs al doble. Con estas modificaciones, aunque tampoco fue posible lograr especificidad en la amplificación se tuvieron resultados positivos ya que se obtuvo cuantitativamente un producto de reacción y ya no fue necesario modificar en los intentos subsecuentes los tiempos ni las concentraciones de reactivos. Por tanto, se continuó modificando sólo la temperatura del periodo de complementación hasta lograr un producto casi único. Se observó que a pesar de modificar ligeramente los tiempos y las temperaturas, no se lograba la amplificación de un solo fragmento. En el mejor de los casos se tenían dos productos de PCR: uno del

peso molecular esperado y otro un poco mayor (esto cuando se probó una temperatura de complementación de 54 °C). Así se procedió a introducir la última modificación que consistió en purificar a partir de un gel de agarosa la banda del tamaño esperado y emplearla como molde en lugar del ADN genómico. El ADN purificado y precipitado se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril y se utilizaron para la nueva reacción de PCR aproximadamente 30 ng de este ADN.

Con el fin de verificar que el producto que se obtenía en las reacciones de PCR no se tratara de ADN de cadena sencilla o de un artificio de la reacción, durante los últimos ensayos se manejaron tres controles: una reacción sin ADN, otra con ADN genómico y sólo el iniciador complementario y una tercera con sólo el iniciador sentido.

Las condiciones óptimas de reacción encontradas con las que se logró la amplificación del fragmento de 209 pb del gen de la isoforma de PEPC-C₃, se muestran en la **Tabla 2**.

V.3. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR EN EL VECTOR pCR II

Se obtuvieron varias colonias blancas algunas de las cuales fueron seleccionadas y crecidas hasta fase exponencial para la extracción del ADN plasmídico. Una vez que éste se obtuvo, las preparaciones se checkaron por electroforesis y se cortaron 5 µl de cada una con Eco RI que es la enzima que libera el inserto en pCR II.

Se obtuvieron varias colonias en las que se observó en el gel de agarosa el inserto de 209 pb por lo que la ligación fue exitosa y se cuenta ya con este fragmento del gen de PEPC-C₃ clonado.

Tabla 2
Componentes de la reacción de PCR y
optimización de la metodología básica

<i>Condiciones de reacción</i>	
1) Periodo de desnaturalización	
Temperatura	94 °C
Tiempo	5 min
No. de ciclos	1
2) Periodo de complementación	
a) Desnaturalización	
Temperatura	94 °C
Tiempo	1 min
b) Alineamiento	
Temperatura	54 °C
Tiempo	45 s
c) Elongación	
Temperatura	72 °C
Tiempo	30 s
No. de ciclos	35
3) Elongación final	
Temperatura	72 °C
Tiempo	10 min
No. de ciclos	1
Concentraciones finales de reactivos	
Amortiguador de reacción	1X
dNTPs	200 μM
Taq DNA polimerasa	0.025 u/μl
MgCl ₂	1.5 mM
ADN molde	100 ng
Iniciadores	1 μM
Volumen final de reacción	30 μl

Sombreados se destacan los aspectos que fue necesario modificar a lo largo de varias reacciones hasta llegar a estas condiciones de amplificación.

Una vez terminados los ciclos de amplificación, se sometió una muestra de 5 μ l de la reacción de amplificación e igual cantidad de cada control a electroforesis en un gel de agarosa al 3%. En la Fig.1 se muestra el gel de agarosa correspondiente.

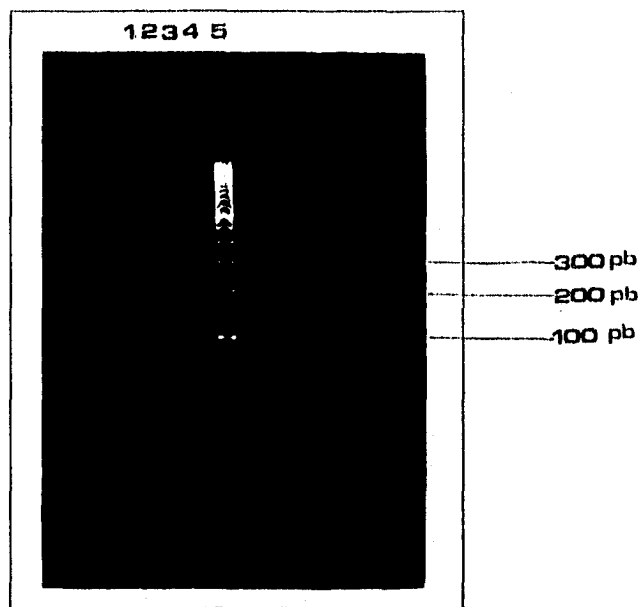


Fig. 1 Gel de agarosa al 3% teñido con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio del producto de PCR correspondiente al fragmento del gen de PEPC-C₃ de 209 pb. Carriles: 1) control con sólo el oligo reverse, 2) control con el oligo forward, 3) control sin ADN, 4) reacción de amplificación completa y 5) marcador de peso molecular de 100 pb. A cada carril se aplicaron 10 μ l de los 50 μ l que se obtuvieron de reacción de amplificación.

V.4. HIBRIDACIÓN ADN-ADN (TIPO SOUTHERN)

Una vez sintetizado el fragmento de ADN de PEPC-C₃ se procedió a probarlo en una hibridación tipo Southern. Para ello el ADN extraído de ejes embrionarios secos de maíz se digirió con Sal I y Hind III, se separó en un gel de agarosa al 0.8 % y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. El fragmento amplificado por PCR se marcó usando el kit Random Primer Extension System (Du Pont).

Para este experimento se empleó como control positivo una muestra del mismo fragmento del gen PEPC-C₃ amplificado por PCR. A partir de 300 mg de ejes se obtuvieron 32 µg de ADN total disuelto a una concentración de 600 µg/ml. El cociente D.O. 260/ D.O. 280 fue de 1.72, mostrando que la preparación de ADN era aceptablemente pura.

Se digirieron por separado 10 µg de ADN genómico con Hind III y Sal I (Gibco-BRL) en un volumen final de 20 µl, empleándose 10 u de enzima. Para verificar que la digestión se llevó a cabo, se tomaron 2 µl del ensayo y se corrieron en un gel de agarosa al 1% observándose los fragmentos de restricción como un barrido continuo de ADN. Para la hibridación ADN-ADN, se tomaron los 18 µl restantes del ensayo de restricción y se corrieron en gel de agarosa al 0.7%. Dado que el ADN del control positivo (el fragmento de 209 pb del gen de la isoenzima C₃ obtenido por PCR) es de mucho menor tamaño, se cargó cuando las demás muestras habían migrado a poco más de la mitad del gel.

La transferencia del ADN a la membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo por 48 h y la hibridación se efectuó por 22 h a 60 °C, dejándose exponer la película de rayos X por 2 días.

Los resultados de este Southern (Fig. 2) demostraron que en efecto, el fragmento amplificado por PCR corresponde a un gen de maíz. Concluimos por ello que habíamos obtenido la sonda para realizar los experimentos de hibridación tipo Northern.

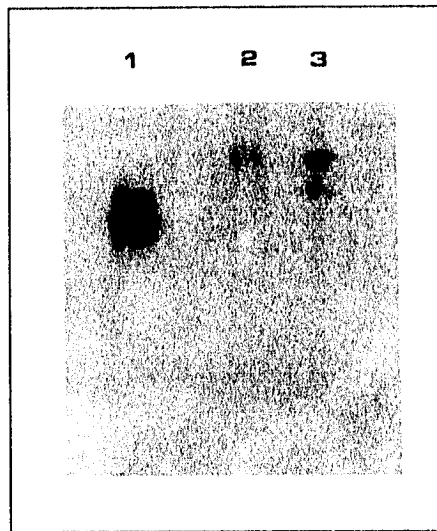


Fig. 2. Hibridación tipo Southern con el fragmento de 209 pb amplificado por PCR como sonda radiactiva. Carril 1) muestra del fragmento amplificado por PCR utilizado a modo de control positivo, 2) ADN genómico de maíz cortado con Sal I y 3) ADN genómico de maíz cortado con Hind III.

V.5. INDUCCIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN LOS DISCOS DE HOJA DE MAÍZ

A partir de los discos de hoja de maíz sometidos a los tratamientos que se describen en métodos, se hizo la extracción del ARN. Todos los tratamientos y controles se manejaron por duplicado, eligiéndose al final las muestras cuyo ARN estuviera más íntegro y puro. El peso fresco de los discos se registró antes y después de los tratamientos. Se observó que por el efecto del déficit de agua y por el estrés salino inducidos, hubo una pérdida de aproximadamente 30% del peso fresco en cada disco, en

tanto que los controles resultan ligeramente hidratados (Tabla 3). En los experimentos realizados, los controles 1 y 2 correspondieron respectivamente a los discos incubados en agua desionizada y sometidos a iluminación con luz blanca por 6 h y 8 h.

Tabla 3
Pesos frescos de los discos de hoja de maíz estresados y control antes y después del tratamiento correspondiente

Tratamiento	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	% Cambio
Control 1	190.3	194.5	+ 2.23
ABA 50 μ M	184.7	156.4	- 15.29
PEG 25%	183.8	124.7	- 32.13
Control 2	213.1	218.7	+ 1.65
NaCl 0.5 M	225.0	161.2	- 28.35

V.6. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se realizó primero a partir de ejes embrionarios de maíz, con el fin de probar la técnica. Una vez que se comprobó que utilizando Trizol (Gibco BRL) se obtiene buen rendimiento y ARN de alta integridad, se procedió a la obtención de ARN de las muestras control y tratadas de hoja de maíz.

La extracción se realizó de acuerdo con la técnica descrita en materiales y métodos, empleando 1.5 ml de Trizol, y ajustando las cantidades de los demás reactivos. La integridad de las muestras obtenidas se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se procedió a cuantificar la cantidad de ARN obtenida por lecturas de absorbancia a 260 nm. Se midieron también las absorbancias a 280 nm y a 330 nm para determinar si había contaminación importante por proteínas y carbohidratos. Las lecturas obtenidas en cada caso (Tabla 4) mostraron que el ARN obtenido estaba bastante puro. En base a esta cuantificación se cargó un gel de agarosa pequeño desnaturante con 2 μ g de cada muestra de ARN con el fin de verificar si en efecto se observaba la misma cantidad de ARN en todos los casos, ya que dada la facilidad con que el ARN se degrada, la cuantificación por medición de absorbancia no es totalmente confiable y antes de realizar la electroforesis del gel que se vaya a transferir debe comprobarse que se

carga la misma cantidad de cada muestra de ARN y que en efecto las preparaciones de ARN son puras e íntegras. Debido a que sí se encontraron ciertas diferencias se ajustaron los volúmenes de las soluciones de ARN, para tener cantidades equivalentes en todas las muestras. En todas las preparaciones realizadas se obtuvieron cantidades diferentes de ARN para cada tratamiento y fue reproducible el hecho de que la mayor cantidad de ARN se obtuvo de las muestras control (hasta un 50 % más) y la menor de la tratada con NaCl 0.5 M (Tabla 5). Para calcular los μg totales de ARN obtenidos se consideró que una A_{260} de 1 corresponde aproximadamente a 40 μg de ARN y se consideró el factor de dilución.

No se varió la relación muestra:amortiguador de carga, ya que se observó que con la relación 1:3 fue suficiente para la desnaturalización de las muestras (Fig. 3).

Tabla 4

Lecturas de absorbancia obtenidas para las muestras de ARN de discos de hoja de maíz controles y estresados

Muestra	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}
Control 1	0.793	0.403	1.967	0.291
Control 2	0.682	0.308	2.214	0.256
PEG 25%	0.481	0.258	1.860	0.178
NaCl 0.5 M	0.396	0.208	1.773	0.044
ABA 50 μM	0.421	0.205	2.053	0.166

Tabla 5

Cantidades de ARN obtenidas de discos de maíz control y tratados

Tratamiento	μg absoluto de ARN
Control 1	79.3
Control 2	62.8
ABA 50 μM	42.1
NaCl 0.5 M	36.9
PEG 25%	48.1

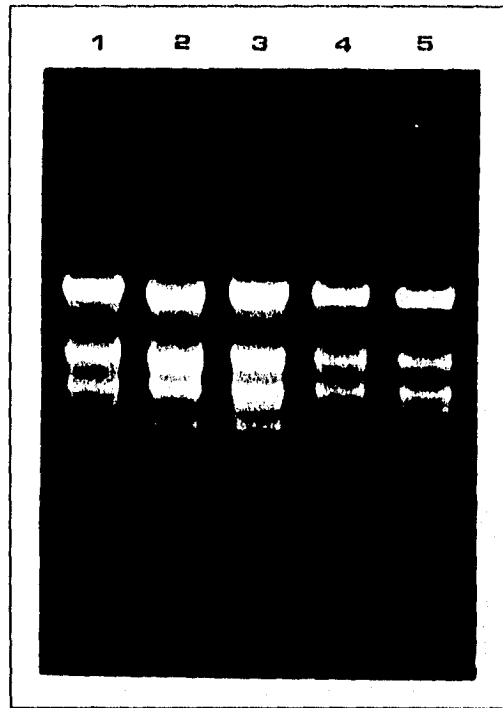


Fig. 3. Gel de agarosa desnaturalizante al 1.5 % en el que se cargaron 2 µg de ARN de cada muestra. Carriles: 1) ARN obtenido del disco control de 6 h, 2) ARN del disco incubado en PEG 25%, 3) ARN del disco incubado en ABA 50 µM, 4) ARN del control de 8h y 5) ARN del disco incubado con NaCl 0.5 M.

V.7: HIBRIDACIÓN ADN-ARN (TIPO NORTHERN)

La sonda utilizada fue el producto de PCR que ya se había probado en Southern. Para este experimento se marcaron con ^{32}P , como se describe en métodos, 4 µl del producto de PCR que corresponden aproximadamente a 50 ng de ADN.

Se corrieron 10 µg de ARN de cada muestra en un gel de desnaturalizante de agarosa al 1.5 %. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para corroborar que

las muestras estuvieran en buen estado y se tuviera igual cantidad de cada una y se destiñó perfectamente mediante lavados con agua estéril tratada con DEPC, antes de montar la transferencia que se llevó a cabo por 48 h. La hibridación se realizó por 24 h a 53 °C y los lavados hubo que ajustarlos a la cantidad de señal detectable en la membrana por medio del contador Geiger. Dichos lavados fueron los siguientes:

- 1) Dos lavados con SSC 1X, SDS 0.1% a temperatura ambiente por 15 min.
- 2) Un lavado con la misma solución a 37 °C por 45 min. y
- 3) Un lavado a 60 °C por 45 min.

Una vez terminado este último lavado, con el contador Geiger se detectó poca señal de fondo y una señal más intensa en una zona de la membrana, por lo que se decidió exponer la membrana con una película de rayos X. La exposición duró un día y al revelar se observaba una señal intensa en los carriles en los que se habían cargado las muestras de ARN provenientes de los discos de hojas tratadas con ABA, PEG y NaCl. En los correspondientes controles, dicha señal se alcanzaba a ver pero en menor intensidad. Sin embargo, aún se tenía marca de fondo por lo que hubo que volver a lavar la membrana, en esta ocasión a 67 °C con la misma solución por un tiempo de 45 min. Nuevamente se expuso una película de rayos X por 12 h. Con este último lavado se logró eliminar mucha marca de fondo y obtener resultados más claros, comprobándose que en efecto, como ya se había observado en la película anteriormente revelada, hay diferencias en la cantidad de mensaje de PEPC-C₃ presente en cada una de las muestras analizadas. En el caso del tratamiento con ABA se observaron dos señales de bastante intensidad una por arriba de 28S y la otra entre 28S y 18S. En el caso de la muestra de ARN proveniente de la hoja a la que se le indujo estrés salino, también estaba presente la señal localizada entre 28S y 18S que es incluso un poco más intensa que en el caso de ABA. En la muestra a la que se le indujo estrés hídrico por tratamiento con PEG se observó la misma señal que en los otros casos entre 28S y 18S y una señal menor que la presente en la muestra incubada con ABA por arriba de 28S. En cuanto a los controles, después del último lavado, la señal detectable por la sonda ha desaparecido. El carril donde se cargó el ARN de la muestra de 8 h de incubación está particularmente limpio. Puesto que se empleó en estos experimentos una sonda 100% homóloga y las

condiciones de hibridación y de lavado de la membrana fueron de alta severidad, se puede descartar que las señales detectadas se traten de falsos positivos resultado de una hibridación inespecífica. La fotografía del filtro correspondiente a este experimento se muestra en la Fig. 4.

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que el estrés hídrico y el salino están provocando un incremento en la producción de ARNm de la forma anaplerótica de PEPC y que también ocurren cambios en la transcripción del mensaje de este gen inducidos por la presencia de ABA exógeno.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

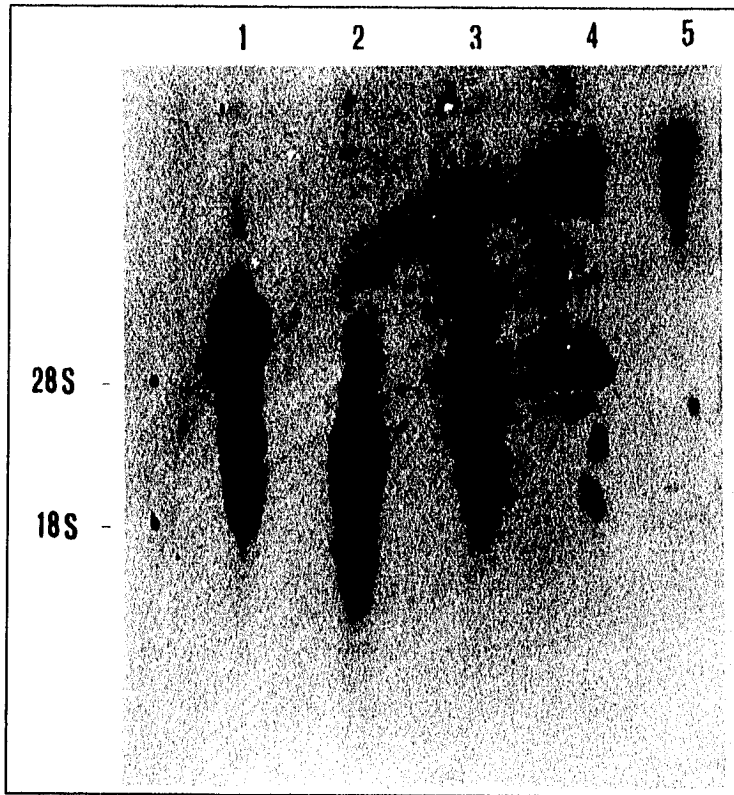


Fig. 4. Northern blot de los niveles de ARNm de PEPC-C₃ de maíz. Los discos de hoja de maíz fueron incubados en presencia de ABA 50 μ M (carril 1), 25% PEG (carril 2), 0.5 M NaCl (carril 3). En el carril 4 y 5 se colocaron los controles de 8 y 6 h respectivamente. La hibridación se realizó a 62 °C en 0.5 M NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ por 24 h. La membrana se lavo con SSC 0.1X, SDS 0.1% a 67°C.

VI. DISCUSION

VI.1 SENSIBILIDAD Y VALIDEZ DEL MÉTODO DE PCR Y OBTENCIÓN DE UNA SONTA HOMÓLOGA Y ESPECÍFICA PARA PEPC-C₃

La posibilidad de amplificar exponencialmente el ADN por PCR ha venido a desarrollar significativamente a la Biología Molecular, incrementando la velocidad y precisión de muchos métodos.

En este trabajo se obtuvo un fragmento del gen de PEPC-C₃ de 209 pb perteneciente a la región 3' no traducida que es la única secuencia donde difieren notablemente las isoformas C₃ y C₄ de PEPC de maíz de acuerdo con los datos publicados por Kawamura et al (1992). Aunque se trata de un fragmento pequeño, tiene el tamaño suficiente como para ser usado como sonda radiactiva 100% homóloga para el gen PEPC-C₃. El que la secuencia elegida no se encuentre presente en el gen de PEPC-C₄, permite el análisis de la expresión del mensaje correspondiente a la isoforma anaplerótica de la enzima, que es menos abundante que la isoforma fotosintética en plantas no sometidas a estrés.

El haber podido obtener por este método el fragmento del gen buscado simplificó considerablemente el trabajo experimental ya que sólo se requirió contar con los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia ya reportada. Además, representó un importante ahorro de tiempo con respecto a otros métodos a los que se hubiera podido recurrir.

La etapa crítica fue definir y establecer en sucesivas series de reacciones las condiciones para lograr la especificidad de la síntesis ya que la amplificación de fragmentos inespecíficos es un resultado factible y difícil controlar las variables contra esta posibilidad. Esto se complica más por el hecho de que el mismo producto inespecífico puede producir un gran número de moléculas amplificables que sirvan como molde para la ADN polimerasa termoestable.

Sin embargo, una vez que se obtuvo la banda de tamaño esperado, a pesar de no ser la única, fue posible purificarla de un gel de agarosa y, al utilizarla como molde para

una nueva reacción de PCR con las condiciones previamente ensayadas, se logró la amplificación única del fragmento buscado.

Finalmente, considerando que la reacción puede generar ADN de cadena sencilla amplificado a partir del molde con uno solo de los oligonucleótidos para PEPC-C₃, se incluyeron los controles sin ADN molde y con los componentes completos de la reacción pero tan sólo con uno de los dos oligonucleótidos de modo que fue posible verificar que el producto obtenido no se trataba de un artefacto y que no era ADN de cadena sencilla amplificado a partir del ADN molde con uno solo de los oligonucleótidos para la PEPC-C₃.

VI.2. VERIFICACIÓN DE LA SONDA POR HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN

Obtenida la amplificación única del fragmento de 209 pb por PCR, y que las condiciones elegidas dieron resultados reproducibles, se probó esta sonda contra ADN genómico de maíz cortado con diferentes enzimas de restricción en un experimento de hibridación tipo Southern.

Dado que se estaba probando una sonda 100% homóloga las condiciones de hibridación fueron de alta astringencia. En este experimento se obtuvieron señales de hibridación específicas, sin la presencia de marca de fondo, lo que además, permitió corroborar que el producto de PCR obtenido corresponde a un gen de maíz y el número de señales al número de fragmentos de restricción presentes en el gen de PEPC-C₃ reportado por Kawamura et al. (1992).

VI.3. INDUCCIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO EN DISCOS DE HOJA DE MAÍZ

Dado que los tratamientos usados han sido ya reportados en estudios sobre estrés hídrico y ampliamente probados en experimentos a nivel de la proteína realizados en el

laboratorio de la Dra. Rosario A Muñoz Clares por la M en C Mireya Rodríguez Penagos, no fue necesario establecer nuevas condiciones para el estudio de los niveles de transcripción de PEPC-C₃.

En cuanto a los tiempos de cada tratamiento fueron varios los experimentos que se realizaron para determinar el momento en que las diferencias en cuanto a la actividad de la enzima del disco estresado y control fueran máximas. Aunque las mediciones de la actividad de la enzima varían de un experimento a otro, lo que no se altera es el punto en el que las diferencias son más apreciables (Rodríguez Penagos, Tesis de Doctorado en proceso).

En los experimentos realizados en este trabajo, las condiciones de estrés no fueron extremas ya que se mantuvo el turgor de los discos de hoja de maíz y se perdió no más de un 30% del peso fresco.

VI. 4. EXTRACCIÓN DE ARN Y EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN ADN-ARN

El método utilizado para la extracción de ARN (Trizol) demostró ser seguro y rápido para la obtención de muestras puras e íntegras. No obstante, los rendimientos obtenidos variaron de una muestra a otra, lo que tal vez se deba a efectos del medio en que se incubaron los discos.

Para poder efectuar el análisis de los cambios en los niveles relativos de los transcritos, es muy importante asegurarse de que se carga la misma cantidad de ARN en cada carril del gel, de manera que sea posible atribuir las diferencias detectadas únicamente al efecto del tratamiento aplicado al disco de hoja de maíz. Por ello, además de contar con la estimación de la cantidad de ARN por lecturas de absorbancia, se realizaron varios geles de calibración buscando reducir al mínimo el error por diferencias en el cargado.

La cantidad de ARN necesaria para el análisis del mensaje se determinó por ensayo y error, ya que se recomienda para este tipo de experimentos utilizar de 10 a 30

μg de ARN total de acuerdo a la abundancia del mensaje. En este caso, en base a la hipótesis de trabajo, se esperaba encontrar diferencias a nivel transcripcional entre los tejidos estresados y control, pero no se sabía con certeza que cantidad de mensaje estaría presente, dado que la isoforma C₃ de PEPC no es la más abundante en maíz.

Con 30 μg de ARN total, se obtuvo una señal muy intensa que hizo difícil el análisis de los resultados al presentarse interferencias por solapamiento de un carril a otro. Esto demostró que el mensaje buscado si se encontraba presente y abundantemente representado por lo que se disminuyó la cantidad de ARN cargado a 10 μg y se mantuvieron condiciones de alta astringencia utilizadas en hibridación y lavado a fin de eliminar señales inespecíficas en los experimentos de Northern.

VI.5. PEPC-C₃ EN DISCOS DE HOJA DE MAÍZ SOMETIDOS A ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO

La falta de agua provoca una serie de respuestas metabólicas complejas en las plantas que se inician con la percepción del estrés y se manifiestan a nivel molecular, celular y tisular.

Una de las primeras reacciones de las plantas sometidas a déficit de agua consiste en evitar en lo posible la pérdida de la misma en sus tejidos, conservando el volumen y la turgencia celular, para lo que siguen principalmente dos estrategias: cierre de estomas y ajuste del potencial osmótico (Ludlow, 1989), siendo éste último el aspecto relacionado con el presente estudio. El ajuste osmótico permite que el potencial hídrico decrezca sin que se pierda al mismo tiempo el turgor de la célula, y en gran parte se lleva a cabo por la acumulación de solutos compatibles que evitan el daño celular por deshidratación al equilibrar la fuerza osmótica del citoplasma con la del medio ambiente, además de que ayudan a la estabilización de la estructura nativa de proteínas y evitan la inhibición enzimática por aumento en las concentraciones relativas de sales inorgánicas (Boyer, 1976; Jones et al., 1980).

En el caso del maíz se sabe que hay una acumulación de prolina en el citoplasma de sus células en respuesta a un estrés hídrico. Este fenómeno se concibe como una respuesta adaptativa destinada a incrementar la supervivencia, ya que no sólo protege de la desecación, sino que sirve como almacén de nitrógeno para su utilización una vez terminado el estrés, además detoxifica al utilizar el NH_3 producido y es una fuente de esqueletos carbonados y poder reductor que permite que la planta recupere el crecimiento una vez superado el déficit de agua (Stewart et al., 1980). La acumulación de este aminoácido se debe a un incremento en su síntesis y es en esta vía donde pensamos que interviene la PEPC- C_3 , puesto que la síntesis de la prolina a partir del glutamato requiere de una reacción anaplerótica y la isoforma C_3 de la PEPC cataliza la principal reacción de este tipo en células vegetales.

En estudios realizados en el laboratorio de la Dra. Muñoz Clares por la M en C Mireya Rodríguez Penagos se observó que bajo estrés osmótico o salino hay un aumento en la actividad máxima de PEPC de hoja de maíz, además de que es mayor la afinidad por su sustrato lo que eleva su eficiencia catalítica y hay un incremento en la cantidad de proteína con respecto a las hojas control.

Con estos antecedentes, se buscó investigar en este estudio si bajo estrés salino u osmótico existía un control a nivel de transcripción del gen. Esta posibilidad se planteó en base a que se sabe que en plantas con metabolismo CAM facultativo, el estrés osmótico induce una forma de PEPC de pI 6.5 que podría tratarse de una isoforma inducible por déficit interno de agua, relacionada con las respuestas adaptativas de la planta a esta condición adversa (Taybi et al., 1995). Para el caso de maíz que es una planta C_4 , esta función podría estar siendo desempeñada por la isoforma C_3 cuyo papel principal es el de reponer intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Concretamente, durante el estrés hídrico la reacción catalizada por PEPC- C_3 produciría OAA y/o malato (producto de la reducción de OAA) que al entrar a ciclo de Krebs produciría α -cetoglutarato mismo que al pasar a glutamato puede ser empleado para la síntesis de la prolina. Es decir, la reacción anaplerótica catalizada por PEPC permitiría la obtención de los esqueletos carbonados necesarios para la síntesis de ciertas proteínas e intermediarios durante situaciones de estrés. Se sabe asimismo que en estas condiciones aumenta la

glucólisis y por tanto el PEP sustrato de la PEPC provendría de esta ruta metabólica, más que de la ruta fotosintética C_4 que debe estar reprimida.

Por otro lado, el maíz es un cultivo muy sensible a la salinidad del suelo, una moderada concentración de sales provoca inactivación de muchas enzimas, inhibición de la síntesis proteica y también se afecta la fotosíntesis conforme el Na^+ o el Cl^- se acumulan en el cloroplasto (Jensen et al., 1995). Para hacer frente a la salinización se recurre nuevamente al ajuste osmótico por acumulación de prolina, de ahí que en los tejidos sometidos a exceso de sal se esperaba encontrar una respuesta similar a la presentada por deshidratación por PEG en el supuesto de que estuviera presente el control de la cantidad de la isoforma C_3 de la PEPC a nivel genético como respuesta adaptativa relacionada con la capacidad de la planta de sobreponerse a condiciones adversas para su desarrollo.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman plenamente esta hipótesis, ya que se observan niveles apreciables del ARNm correspondiente a la isoforma PEPC- C_3 en las hojas sometidas a estrés osmótico, mientras que no se detectaron en las hojas controles.

Podemos decir por tanto que la isoforma C_3 de la PEPC en hoja de maíz se encuentra entre los genes expresados durante situaciones de estrés lo que es consistente con su papel en la síntesis del osmolito compatible destinado a proteger el funcionamiento celular mediante la reducción al máximo del daño a proteínas y otras macromoléculas causado por el déficit de agua.

Queda por determinarse si este transcrito es traducido y se incrementan los niveles de PEPC- C_3 en hoja en respuesta al estrés osmótico.

VI.6. PEPC- C_3 DE DISCOS DE HOJA DE MAÍZ TRATADOS CON ABA EXÓGENO

El ABA es una fitohormona cuya concentración en las células llega a ser de hasta 15 μM ; se acumula en respuesta al fenómeno físico de pérdida de agua y la elevación de

sus niveles endógenos provoca la expresión de genes inducibles por el déficit de agua. Por tanto, la acumulación del ABA es en muchos casos el primer paso en la transducción de señales que lleva a la expresión génica durante el estrés hídrico (Skriver y Mundy, 1990). También se ha observado que la exposición al ABA induce la síntesis de proteínas relacionadas con el aumento de la tolerancia a sales como el NaCl (Giraudat et al., 1994).

En maíz, la acumulación del ABA está asociada a los cambios metabólicos destinados a proveer de cierta tolerancia a la falta de agua (Davies y Jones, 1991). De la cantidad de ABA acumulada, sólo una pequeña parte se asocia con el cierre de estomas (Taybi et al., 1994), por lo que el resto es posible relacionarlo con los procesos ya mencionados de inducción de genes y acumulación de osmolitos.

En base a estos antecedentes, al someter un disco de hoja de maíz al ABA exógeno se buscó determinar si la expresión del gen de PEPC-C₃ cuyo nivel de transcripción se detectó incrementado en tejido con estrés osmótico o salino, responde a esta hormona vegetal. Nuestros resultados muestran que el ABA promueve la producción de ARNm de la isoforma C₃, por lo que se puede proponer a esta fitohormona como un regulador a nivel transcripcional de esta isoforma en hoja de maíz.

Estos resultados están totalmente de acuerdo con lo encontrado en plantas con metabolismo CAM facultativo como *Kalanchoe blossfeldiana* PEPC es una enzima inducible por falta de agua y que una elevación en los niveles endógenos de ABA precede al incremento en la concentración de PEPC en hojas (Taybi et al., 1995). Si en el caso de maíz, la isoenzima C₃ es la responsable de dar una respuesta equivalente a la que da la isoforma de plantas CAM facultativas, podría ser que el aumento en la transcripción del gen esté precedido por el incremento en la cantidad endógena de ABA que se presenta por el estrés hídrico o salino, es decir, que la respuesta en hoja de maíz a estrés osmótico este mediada, al menos en parte, por esta fitohormona.

La respuesta de PEPC-C₃ al ABA a nivel transcripcional es además consistente con el hecho de que esta hormona vegetal puede funcionar como un efector *in vivo* de eventos metabólicos que llevan a la acumulación de la prolina. Por ejemplo, en cebada la aplicación de ABA a plantas no estresadas estimula la acumulación del aminoácido.

Aunque el mecanismo por el que ABA induce la síntesis de la prolina aún no es totalmente claro (Bogges et al., 1976).

Finalmente, es interesante destacar el hecho de que a pesar de la astringencia de los lavados se detectan dos mensajes de diferente tamaño por Northern blot, lo que podría deberse a que se encuentra tanto un ARNm maduro como otro al que le falta procesamiento. Esto podría implicar que hay además un control a nivel post-transcripcional, al igual que en el caso de un estrés salino en el que se detectan también dos mensajes abundantes. Otra posibilidad sería que la secuencia que se utilizó como sonda pueda parecerse a alguna presente en otro(s) genes que se induzcan por los mismos efectores y no hayan sido aún reportados en plantas, ya que se comparó la secuencia de la sonda utilizada con las secuencias de todos los genes reportados hasta el momento y resultó que sólo aparece en las PEPC-C₃ de diferentes especies.

VII. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en este trabajo son:

1) Es posible utilizar la información de la secuencia de la región 3' no traducida del gen de PEPC-C₃ para sintetizar por PCR una sonda diferencial para analizar su mensaje de forma separada al de la isoforma C₄ que es la más abundante en hoja de maíz.

2) Como lo indica el hecho de que tanto el déficit de agua como el estrés salino provocan el aumento del transcrito para la PEPC-C₃ en discos de hoja de maíz, la función anaplerótica de la isoforma PEPC-C₃ parece ser necesaria en situaciones de estrés osmótico para reabastecer al ciclo de Krebs de los intermediarios que están siendo utilizados para la síntesis de precursores del osmolito compatible prolina.

3) El fitorregulador ABA puede mediar la respuesta a estrés osmótico del gen de PEPC-C₃ a semejanza con las plantas CAM facultativas. Es de destacar que es la primera vez que este tipo de regulación de la enzima PEPC por estrés osmótico se reporta para una planta C₄.

4) Los mensajes presentes en hoja de maíz a la que se le indujo un estrés salino o se les dio un tratamiento con ABA exógeno parecen estar sujetos a un control post-transcripcional ya que se detectan en Northern blot dos mensajes de diferente tamaño.

5) Dado que el 70% del territorio nacional padece de problemas vinculados a la sequía, este tipo de estudios pueden llevar a desarrollar especies más resistentes o capaces de manejar mejor condiciones de estrés osmótico o salino.

VIII. REFERENCIAS

- Acevedo E, Ferres E, Hsiao TC y Henderson DW** (1979) Diurnal growth trends, water potential and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. *Plant Physiol.* 64: 476-480.
- Adams P, Thomas J, Vernon DM y Bohert HJ** (1992) Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* 33(8): 1215-1223.
- Andreo CS, Iglesias AA, Podestá E, y Wagner R.** (1986) Chemical modification of the Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves and its conformation in isotropic solution. *biochem. Biophys. Acta* 870: 292-301.
- Andreo CS, González DH e Iglesias AA** (1987) Higher plants phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213(1) 1-8.
- Aspinall D** (1980) Role of abscisic acid and other hormones in adaption to water stress. En: *Adaptation of plants to water and high temperature stress.* Turner NC y Kramer PJ ed pp. 155-172. John Wiley and Sons. NY.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Strul R** (eds) (1992) *Short Protocols in Molecular Biology.* Segunda Edición. Greene Publishing Associates y John Wiley and Sons. NY.
- Ayala Ochoa A** (1995) Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM.
- Banduraki RS, y Greiner CM** (1953) Enzymic-synthesis of oxaloacetate from phosphoryl-enolpyruvate and CO₂. *J. Biol. Chem.* 204: 721-724.
- Bogges SF, Aspinall D y Paleg L** (1976) Stress metabolism IX. The significance of end products inhibition of proline synthesis and compartmentalization in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust J. Plant Physiol.* 3: 513-525.
- Bogges SF, Stewart CR, Aspinall D y Paleg LG** (1976) Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol.* 58: 398-401.
- Boyer JS** (1976) Photosynthesis at low water potentials. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 273: 501-512.
- Bray EA** (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Brulfert J y Gluclu S** (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a key -enzyme in plants. *Physiol. Veg.* 21 (5): 803-804.
- Brulfert J, Kluge M y Queiroz O** (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a key enzyme in plants. *Physiol. Veg.* 21(5): 803-804.
- Cohen A y Bray EA** (1990) Characterization of three mRNA that accumulate in wilted tomato leaves in response to elevated levels of endogenous abscisic acid. *Planta* 182: 27-33.
- Coombs J, Baldry CW y Bucke C** (1973) C₄ pathway in *Pennisetum purpureum*. Allosteric nature of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta* 110: 95-107.
- Coombs J** (1979) Enzymes of C₄ metabolism. En: *Encyclopedia of plant physiology.* New Series. Gibbs M y Latzko E. ed. 6: 251-262. Springer, New York.
- Cooper TG y Wood AG** (1971) The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246: 5488-5490.

- Crétin C, Barkim N, Keryer E, Sant S, Lepiniec L, Vidal J y Gadal P (1991)** The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of *Sorghum*. Promoter structures, aminoacid sequences and expression of genes. *Gene* 99: 87-94.
- Cushman JC, Mayer G, Michalowsky CB, Scmitt JM y Buhnert HJ (1989)** Salt stress leads to a differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell*. 1:715-725.
- Day DA y Hatch MD (1981)** Transport of phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate and inorganic phosphate in maize mesophyll chloroplasts and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production. *Arch. Biochem. Biophys.* 211 (2): 743-749.
- Davies WJ y Jones HG (editores) (1991)** Abscisic acid. Physiology and biochemistry. BIOS Scientific Publishers, United Kingdom.
- Davies WJ, Tardieu F y Trejo CL (1994)** How do chemical signals work in plants that grow in drying soil?. *Plant Physiol.* 104: 309-314.
- De la Porta SL, Wood JA y Hicks JB (1983)** A plant DNA miniprep preparation version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Dure L III (1993)** Structural motifs in Lea proteins en: Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Close, TJ., Bray, EA, eds. *Current Topics in Plant Physiology*, Vol. 10 American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 91-103.
- Edwards GE y Huber SC (1981)**. The C₄ pathway. En: *The biochemistry of plants*. Hatch, M.D. y Boardman, N.K eds. Academic Press, N.Y. 8: 237-281.
- Edwards GE, Nakamoto H, Burnell JN y Hatch MD (1985)** Pyruvate, Pi, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis: properties and mechanism of light/ dark regulation. *Annu. Rev. Plan Physiol.* 36: 255-286.
- Freifelder D (1982)** *Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology*. W.H. Freeman and Company, CA. pp 494-536.
- Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris P, Bouvier-Durand M y Vartanian N (1994)** Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol. Biol.* 26: 1557-1577.
- González DH, Iglesias AA y Andreo CS (1984)** On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activities from maize leaves by L-malate. Effect of pH. *J. Plant Physiol.* 116: 425-434.
- González DH, Iglesias AA y Andreo CS (1986)** Active site directed inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by bromopyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 245(1) : 179- 186.
- Gruza JW y Hudspeth RL (1987)** The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in maize. *Plant Gene Sys. and Their Biol.* 207- 216.
- Guerra J, Mathiew Y y Kurkdijan A (1983)** Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. Veg.* 21(5): 855-866.
- Guerrero FD, Jones JT y Mullet JE (1990)** Turgor responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant. Mol. Biol.* 15: 11-26.

- Hanson AD y Hitz WD** (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 163-203.
- Harris MJ, Outlaw Jr WH** (1991) Rapid adjustment of guard cells abscisic acid nad levels to current leaf water status. *Plant Physiol* 97: 171-173.
- Hatch MD y Osmond CB** (1976) Compartamentation and transport in C₄ photosynthesis. En : *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series.* Gibbs M y Latzko E eds. Springer, New York. 3: 144-184.
- Hatch MD** (1978) Regulation of enzymes of C₄ metabolism. En: *Current topics in cellular regulation.* Academic Press, USA 14: 1-17.
- Hatch MD** (1987) C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem. Biophys. Acta* 895: 81-106.
- Hatch MD y Burrell JN** (1983) Regulation of C₄ photosynthesis: stability and other characteristics of the ATP-ADP-dependent inactivation of pyruvate, Pi, dikinase in maize chloroplast extracts. *Aust. J. Plant Physiol.* 10: 179-186.
- Harpster MH y Taylor WC** (1986) Maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 261: 13: 6132-6136.
- Haschke HP y Lutttge J** (1975). Stechiometric correlation of malate accumulation with auxin dependent K⁺-H⁺ exchange and growth in avena coleoptile segments. *Plant Physiol.* 56: 696-698.
- Hauer B** (1979) Nitrate and nitrite reduction in wheat leaves as affected by different types of water stress. *Physiol. Plant.* 46: 318-323.
- Huber SC y Edwards GE** (1975) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase of C₄ plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53: 1925-1933.
- Hudspeth RL, Glacking CA, Bonner J y Gula W** (1986) Genomic and cDNA clones from phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate orthophosphatedikinase: expression of different gene family members in leaves and roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2884-2888.
- Hudspeth RL y Gula JW** (1989) Structure of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C₄ photosynthesis. *Plant. Mol. Biol.* 12: 579-589.
- Iglesias AA y Andreo CS** (1983) The presence of essential histidine residues in phosphoenolpyruvate carboxylase form maize leaves. *Biochem. Biophys. Acta* 748: 9-17.
- Iglesias AA y Andreo CS** (1984) Involvement of the thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* 75: 983-987.
- Iglesias AA y Andreo CS** (1984) On molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase by thiol compounds. *Plant Cell Physiol.* 30 (3): 399-405.
- Invitrogen products for gene expression and analysis** (1995) Original TA cloning kit. Instruction Manual. Invitrogen, CA.
- Iturriaga G, Schneider K, Salamlai F y Bartels D.** (1992) Expression of dissection-related proteins from resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant. Mol. Biol* 20: 555-558.
- Iwai S, Kawashima N, Matsuyama S** (1979) Effect of water stress on proline catabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry* 18: 1155-1157.

- Izui K, Ishijima S, Yamaguchi Y, Katagiri F, Murata T, Shigesada K, Sugiyama T y Katsuki H** (1986) Cloning and sequence of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C₄ pathway from maize. *Nuc. Acid. Research* 14: 1615-1628.
- Izui K, Kawamura T, Okumura, S y Toh H** (1992) Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase for C₄ photosynthesis in maize. Kluwer Academic Publishers, Dordrech. Vol III: 827-870.
- Jensen WA, Armstrong J McD, De Giorgio J, Hearn M** (1994) Stability Studies on Maize Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase: The Effect of Salts. *Biochemistry* 34: 472-480.
- Jones HG** (1973) Moderate term water stresses and associated changes in some photosynthetic parameters in cotton. *New Phytol.* 72: 1095-1105.
- Jones MM, Osmond CB y Turnes NC** (1980) Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol.* 7: 193-205.
- Karabourniotis G y Manetas Y** (1983) Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. *Plant Physiol.* 73: 735- 739.
- Kawamura T, Shigesada K, Yaganisawa S e Izui K** (1990) Phosphoenolpyruvate carboxylase prevalent in maize roots: Isolation of a cDNA clone and its use for analyses of the gene and gene expression. *J. Biochem.* 107: 165 -168.
- Kawamura T, Shigesada K, Toh H , Okumura S, Yaganisawa S e Izui K** (1992) Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase for C₄ photosynthesis in maize: comparison of its cDNA sequence with newly isolated cDNA encoding an isozyme involved in the anaplerotic function. *J. Biochem.* 112: 147-154.
- Kano-Murakami Y y Matsuoka M** (1992) Gene expression of PEP carboxylase gene. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol III: 843-846.
- Kludge M** (1983) The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5): 817-825.
- Koorneef M, Jorna ML Brinkhorst-van der Swan DCL y Karszen CM** (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberelin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90: 463-469.
- Latzko E y Kelly GJ** (1983) The many faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol. Veg.* 21(5): 805-815.
- Leigh PA, Ahmand N y Wyn Jones RG** (1981) Assessment of glycine betaine and proline compartmentation by analysis of isolated beet vacuoles. *Planta* 153: 34-41.
- Lepiniec L, Kerier E, Phillippe H, Gadal P y Cretin C** (1993) *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: Structure, function and molecular evolution. *Plant Mol. Biol.* 21: 487-502.
- Li Y y Walton DC** (1987) Xanthophylls and abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean leaves. *Plant Physiol.* 85: 910-915.
- Ludlow, ML** (1989) Strategies of response to water stress. En: Structural and functional responses to environmental stresses. Kreeb KH y Hinckley TM eds. SPB Academic Publishing by the Hauge The Netherlands pp. 269-281.
- Lüttge U** (1993) The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytol.* 125: 59-71.

Loza Tavera H y Muñoz Clares RA (1994) Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas: regulación de la expresión génica. En: Cuadernos de Posgrado Bioquímica Vegetal. Vazquez RJ ed. 34: 15-29.

Mac Robbie EAC (1991) Effect of ABA on ion transport and stomatal regulation. En: Abscisic acid physiology and biochemistry. Davies WG y Jones HG eds. BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp 153-168.

Manetas Y y Gavallas NA (1982) Evidence for essential sulphhydryl groups in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: protection by substrate, metal substrate and glucose-6-phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. *Photosynthetica*. 16(1): 59-66.

Manetas Y, Petropoulou Y y Karabourniotis G (1986) Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄-halophytes. *Plant Cell and Env.* 9: 145-151.

Mansfield TA (1988) Hormones as regulators of water balance. En: Plant hormones and their role in plant growth and development. Davies RD ed. Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp 411-430.

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

Market CL y Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 45,753-763.

Maruyama H, Easterday RL, Chang HC y Lane MD (1966) The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 241(10): 2405-2412.

Matsuoka M y Hata S. (1987) Comparative studies of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur. J. Biochem.* 181: 593-598.

Matsuoka M. y Minami E. (1989) Complete structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of maize. *J. Biochem.* 181: 593-598.

Mc Ainish MR, Brownlee C y Heterington AM (1991) Partial inhibition of ABA induced stomatal closure by calcium channel blockers. *Proc. R. Soc. Series B.* 243: 195-201.

Meltzer E y O' Leary MH (1987) Anaplerotic CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Plant Physiol.* 84: 58-60.

Michel D, Salamini F, Bartels D, Dale P, Baga M y Szalay A (1993) Analysis of a dissection and ABA responsive promoter from resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *PlantJ* 4: 29-40.

Mizorko HM, Nowak T y Mildavan AS (1974) Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: purification, properties and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 163: 378-389.

Moldau KA, Syber YK y Rakhi MO (1980) Components of dark respiration in bean under conditions of water deficit. *Sov. Plant Physiol.* 27: 1-6.

Morilla C, Boyer JS y Hageman H (1973) Nitrate reductase and polyribosomal content of corn having low water potentials. *Plant Physiol* 51: 812-820.

Mukerji SK (1974) Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activation by magnesium ions. *Plant. Sci. Lett.* 2: 243-248.

- Mukerji SK** (1977) Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase inhibition of CO₂ fixation by SO₂ and activation by glucose-6-phosphate. Arch. Biochem. Biophys. 182: 360-365.
- Mukerji SK** (1977) Corn Leaf phosphoenolpyruvate carboxylases. Purification and properties of two isozymes. Arch. Biochem. Biophys. 182: 343-351.
- Mukerji SK** (1977) Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylases. The effects of divalent cations on activity. Arch. Biochem. Biophys. 182: 352-359.
- Mullis KB** (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Amer. April
- Muñoz Clares RA** (1986) Función de las isoenzimas en la regulación metabólica. En Cuadernos de Posgrado Bioquímica Vegetal II, Conacyt-UNAM Facultad de Química, Departamento de Bioquímica Vegetal, México. 19: 53-81.
- Muñoz Clares RA** (1994) Respuestas enzimáticas en hojas de plantas sometidas a déficit de agua. En: Cuadernos de Posgrado Bioquímica Vegetal. Vázquez RJ ed. 34: 92-105.
- Napier JA, Chapman JM y Black M** (1989) Calcium dependent induction of novel proteins by abscisic acids in wheat aleurone tissue of different developmental stages. Planta 1179: 156-164.
- Neill SJ y Horgan R** (1985) Abscisic acid production and water relations in wilted tomato mutants subjected to water deficiency. J. Exp. Bot. 36: 1222-1231.
- Nelson T y Langdale JA** (1992) Developmental genetics of C₄ photosynthesis. Plant. Mol. Biol. 43: 25-47.
- O'Leary MH** (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologists view. Annu. Rev. Plant. Physiol. 33: 297-315.
- Osmond CB** (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 379-414.
- Osmond CB, Winter K y Powles SB** (1980) Adaptive significance of carbon dioxide cycling during photosynthesis in water stressed plants. En: Adaptation of plants to water and high temperature stress. Turner NC y Kramer PJ eds. Wiley New York pp. 155-172.
- O'Toole JC y Crookston RK** (1976) Mesophyll resistance and carboxylase activity. A comparison under water stress conditions. Plant Physiol. 57: 465-468.
- Parry AD, Blonstein AD, Babiano MJ, King PJ y Horgan R** (1991) Abscisic acid metabolism in a wilted mutant of *Nicotiana glauca*. Planta 183: 237-243.
- Parry AD** (1993) Abscisic Acid Metabolism. Methods Plant Biochem. 9: 381-402.
- Plant AL, Cohen A y Bray EA** (1991) Nucleotide sequence and spatial expression pattern of drought and ABA induced gene of tomato. Plant Physiol. 97: 900-906.
- Pharmacia LKB** (1992) Biotechnology AB, Gene Assambler Special/ 4 Primers Users Manual pp. 6.18.
- Podestá E Iglesias AA y Andreo CS** (1986) Modification of an essential amino group of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal phosphate and by pyridoxal phosphate-sensitized photooxidation. Arch. Biochem. Biophys. 246: 546-553.
- Powles SB y Osmond CB** (1978) Inhibition of the capacity and efficiency of photosynthesis in bean leaflets illuminated in CO₂ free atmosphere at low oxygen: a possible role of photorespiration. Aus. J. Plant Physiol. 5: 619-629.
- Quarrie S** (1982) Droopy: a wilted mutant of potato deficient in abscisic acid. Plant Cell Environ. 5:23-26.

- Ragamopal S** (1987) Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 1153-1157.
- Rajagopal V y Andersen AS** (1978) Does abscisic acid influence proline accumulation in stressed leaves?. *Planta* 143: 85-88.
- Rajagopalan AV, Tirumala D y Raghavendra AS** (1994) Molecular biology of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and genetic engineering. *Photos. Res.* 39: 115-134.
- Rathman CK** (1978). C_4 photosynthesis: the pathway of carbon in bundle sheat cells. *Sci. Pro. Oxf.* 65: 409-435.
- Raven JA, Smith FA y Smith SE** (1979) Ions and osmoregulation. En: *Genetic engineering of osmoregulation*. Rains DW, Valentine RC y Hollander A eds. Plenum, New York. pp 101-118.
- Ray TB y Black CC** (1979). The C_4 pathway and its regulation. En : *Encyclopedia of plant physiology*. New Series. Gibbs M y Latzko E eds. Springer, New York. 6: 77-79
- Rodríguez-Penagos M y Muñoz Clares RA.** (1996) Response of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Maize Leaves to Short- Term Water Deficits.(Somatida)
- Rodriguez RI. y Tait RC** (1983) Recombinant DNA techniques: an introduction. Benjamin Cummings Publishing, USA.
- Rodríguez Sortres R y Muñoz Clares RA.** (1987) Short term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* 128: 361-369.
- Rodríguez Sotres R** (1991) Tesis de doctorado. Fac. Química UNAM
- Rubio V** (1986) Enzymatic HCO_3^- fixation: a common mechanism for all enzymes involved?. *Biosci. Rep.* 6(4): 335-347.
- Rustin P, Mayer CR y Wedding RT** (1988) Identification of substrate and effector binding sites of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassulea argentea* *J. Biol. Chem.* 263(33): 17611-17614.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- SARH** (1995) *Censo Agrícola Ganadero y Ejidal* 1990.
- Schaffner AR y Sheen J** (1992) Maize C_4 photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* 2: 221-232.
- Schroeder JI y Heldrich R** (1989) Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends Biochem. Sci.* 14: 187-192.
- Schroeder J y Hagiwara S** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427-430.
- Sheen JY** (1991) Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize PPKK genes. *Plant Cell* 3: 225-245.
- Simpson GM (ed)** (1991) *Water Stress in Plants*. Praeger Scientific, USA.
- Singh NK, La Rosa PC, Handa AK, Hasegawa PM y Bressan RA** (1987) Hormonal regulation of proline synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 85: 739-743.
- Shriver K y Mundy J** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503- 512.

- Slack CR, Hatch MD y Goodchild DC** (1969) Distribution of enzymes in maize leaves in relation to the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J.* 114: 489-498.
- Smith TE** (1968) Partial purification and characterization of potato phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 178-188.
- Smith OAC y Griffiths H (ed)** (1993) Water deficits. Plant responses from all community. BIOS Scientific Publishers, United Kingdom.
- Sofer WH** (1991) Introduction to genetic engineering. Butterworth-Heinemann, MA. pp. 45-50, 72-78.
- Stewart CR** (1972) The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* 61: 775-78.
- Stewart CR, Bogges SF y Aspinall D** (1977) Inhibition of proline accumulation by water stress. *Plant Physiol.* 59: 930-932.
- Stewart CR** (1980) The mechanism of abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaves. *Plant Physiol.* 66: 230-233.
- Stewart CR y Voetberg G** (1987) Abscisic acid accumulation is not required for proline accumulation in wilted leaves. *Plant Physiol.* 83: 747-749.
- Stivorová M y Leblová S** (1983) Isolation and partial characterization of two phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Photosynthetica* 17(3): 379-385.
- Stivorová M y Leblová S** (1983) The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. *Physiol. Veg.* 21(5): 935-942.
- Stivorová M y Leblová S** (1986) Activation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine. Effects of pH and Mg²⁺. *Photosynthetica* 19(2): 32-34.
- Stivorová M, Ksinská S y Breznová A** (1987) Effect of NaCl on the growth and biochemical characterization of photosynthesis in barley and maize. *Photosynthetica* 21(3): 320-328.
- Strommer J, Gregerson R y Vayda M** (1993) Isolation and characterization of plant mRNAEn: Methods in plant molecular biology and biotechnology. Glick BR y Thompson JE (eds). CRC Press, Florida.
- Sugimoto T, Kawasaki T, Kato T, Whitter RF, Shibata D y Kawamura T** (1992) cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of soy bean. *Plant. Mol. Biol.* 20: 743-747.
- Sugiyama T y Hatch MD** (1981) Regulation of C₄ photosynthesis: inactivation of pyruvate. Pi. dikinase in leaf and chloroplast extracts in relation to dark-light regulation in vivo. *Plant Cell Physiol.* 22(1): 115-126.
- Taiz L y Zeiger E** (1991) *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, CA. pp. 237 y 346-365.
- Tal M y Nervo Y.** (1973) Abnormal stomatal behavior and root resistance and hormonal imbalance in three wilty mutants of tomato. *Biochem. Genet.* 8: 291-300.
- Taybi T, Sotta B , Gherig H, Güçlü M y Brulfert J** (1995) Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase and CAM operation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Bot. Acta.* 108: 240-246.

- Taylor BH, Manhart JR y Amasino RM (1993)** Isolation and characterization of plant DNAs. En: *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Glick BR y Thompson JE (eds). CRC Press, Florida.
- Ting IP y Osmond CB (1973)** Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. *Plant Physiol.* 51: 448-453.
- Ting IP (1985)** Crassulacean Acid Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 595-622.
- Treyas AJ y Jones HG (1991)** An assesment of the role of ABA in plant development . En: *Abscisic acid: physiology and biochemistry*. Davies WJ y Jones HG (eds). BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp. 169-188.
- Turner NC y Kramer PJ (eds) (1980)** *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. John Wiley & Sons, NY.
- Wagner R, González DH, Podestá E y Andreo CS (1988)** Proximity between fluorescent probes attached to four essential lysin residues in phosphoenolpyruvate carboxylase. A resonance energy transfer study. *Eur. J. Biochem.* 173: 561-568.
- Walker GF, Ku MSB y Edwards GE (1986)** Catalytic activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to oligomerization. *Plant Physiol.* 80: 848-855.
- Wang T, Donkin M y Martin E (1984)** The physiology of a wilted pea: abscisic acid production under water stress. *J. Exp. Bot.* 35: 1222-1232.
- Willmer CM (1983)** Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation, *Physiol. Veg.* 21(5): 943-953.
- Wilson DR, Van Bavel CH y Mc Cree KJ (1980)** Carbon balance of water deficient grain sorghum plants. *Crop Sci.* 20: 153-159.
- Wrench P, Brady CJ y Hinde RW (1980)** Interaction of slicing and water stress on proline metabolism in Jerusalem artichoke tuber tissue. *Aust. J. Plant. Physiol.* 4: 703-711.
- Wrench P, Wright L, Brady CJ y Hinde RW (1977)** The source of carbone for proline synthesis in osmotically stressed artichoke tuber slices. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 701-703.
- Wu MX, Zha JJ y Shi JN (1981)** Studies on plants phosphoenolpyruvate carboxylase. Modification of functional arginine residues in PEP carboxylase of sorghum leaves with butanedione. *Acta Phytophysiol. Sin.* 7(1): 33-41.
- Wyn Jones RG (1979)** An assesment of quaternary ammonium and related compounds as osmotic effectors in crop plants. En: *Genetic engineering of osmoregulation*. Rains DW, Valentine RC y Hollander A (eds). Plenum, New York. pp.155-70.
- Yaganisawa S, Izui K, Yamaguchi Y, Shigesada K y Katsuki H (1988)** Further analysis of cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. *FEBS Lett.* 229: 1: 107-110.
- Yaganisawa S e Izui K (1990)** Multiple interaction between tissue-specific nuclear proteins and the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene for C₄ photosynthesis in *Zea mays*. *Mol. Gen. Genet.* 224: 325-332.
- Yaganisawa S e Izui K (1992)** Maize nuclear factors interacting with the C₄ photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase gene promoter. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol III: 839-842.*

Zeevart JAD y Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 439- 473.