

00524
63



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

EFFECTO DEL ÁCIDO INDOLACÉTICO, LA SEQUÍA
Y DISMINUCIÓN DE LA LUZ EN LA EXPRESIÓN
DE RUBISCO ACTIVASA EN PLANTAS DE MAÍZ
(*Zea mays*, L.).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
ITZHEL GARCÍA TORRES.



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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:

Profesores

Presidente

Estela Sánchez Quintanar.

Vocal

Beatriz Albina Medina Jiménez.

Secretario

Jesús Fernando Montiel Aguirre.

1er Suplente

Salvador Mejía Guerrero.

2do Suplente

Ma. Manuela Najera Martínez.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química, Departamento de Bioquímica. Edificio E, Laboratorio 103. UNAM.


Dra Estela Sánchez Quintanar
Asesor.


M. en C. Martín Vargas Suárez.
Supervisor Técnico.


Itzhel García Torres.
Sustentante.

"Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora. Tiempo de nacer, y tiempo de morir; tiempo de plantar, y tiempo de arrancar lo plantado; tiempo de llorar y tiempo de reir, tiempo de guerra y tiempo de paz". Ec. 3

Dedicado a:

- ☒ **Dios, gracias por dejarme llegar hasta aquí, y por ayudarme a ser mejor cada día.**
- ☒ **Papá y Mamá; gracias por su amor incondicional, por sus esfuerzos y desvelos junto conmigo. Esto es por ustedes y para ustedes.**
- ☒ **Sabdy y Yareth, gracias hermanas por los buenos momentos, por soportarme y por brindarme su ayuda siempre que lo necesité.**
- ☒ **Paco, gracias por estar siempre en el momento oportuno, por tu amor y comprensión, por ser mi cómplice y apoyarme en mis decisiones, sin ti nada sería fácil.**

Los amo.

Agradecimientos.

- ☒ **Dra. Estela Sánchez de Jiménez**, gracias por todo su apoyo, y enseñanzas que son la base de mi formación académica, y por que gracias a su experiencia puedo tomarla como un ejemplo a seguir.
- ☒ **M. en C. Martín Vargas Suárez**, gracias por que en cada experimento estubo tu apoyo presente, por guiarme y aconsejarme lo más adecuado en cada caso, y también por enseñarme que la paciencia y esfuerzo siempre dan resultado, porque a pesar de que siempre tienes mucho trabajo nunca recibí una contestación negativa de parte tuya, y además con tu buen humor armonizas hasta un mal resultado. Te deseo lo mejor.
- ☒ **M. en C. Raúl Aguilar**, gracias por su apoyo y asesoría a lo largo de mi estancia en el laboratorio.
- ☒ A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 103: **Jessica, Julia, Edgar, Angel, Gustavo, Hilda, Verónica** gracias por los buenos momentos, y de manera especial quiero agradecer a **Homero, Cristina, Cesy, y Ricardo** por la asesoría técnica y porque siempre hubo una respuesta acertada a mis preguntas y siempre con amable disposición. Gracias a todos porque con sus comentarios y sugerencias enriquecieron este trabajo.
- ☒ **Alfredo Ayala O.:** gracias amigo, por permitirme aprender muchas cosas de tí, por aconsejarme en los experimentos, y donde quiera que estás quiero que sepas que fuiste pieza vital en la realización de esta tesis.
- ☒ Gracias a **Luis Ibarra**, porque constantemente me ayudó en la siembra de las plántulas y estubo al pendiente del riego cada día.
- ☒ Gracias a la Señora **Andrea Vega**, por su grata compañía en el laboratorio y por alentarnos a seguir adelante.
- ☒ A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser la universidad más importante del país, y por permitirme estar dentro de sus filas y porque ahora es una parte esencial en mi vida.
- ☒ A la **Facultad de Química**, por permitirme vivir en ella los 5 años más importantes de mi vida.
- ☒ A todos mis **maestros** de los cuales pude aprender a ver la Ciencia como un estilo de vida.
- ☒ Al **Sistema Nacional de Investigadores** por otorgarme una beca durante el tiempo de realización de este trabajo.

Agradecimientos especiales:

- ☞ A todos mis amigos de la jardinera: **Maggy, Susana, Paty, Claudia, Ernesto, Oliver, Héctor y Shimizu**, gracias por las buenas quemas de batas y por todos los momentos que pasamos juntos, gracias por su amistad. Gracias al cuadrado a **Oliver y a Héctor** por las fotos de las plántulas.
- ☞ **Jeimy Ruiz**, gracias porque de una manera u otra me enseñaste a vivir al máximo el momento y aunque ya no estás aquí viviremos por ti todo lo que te faltó.
- ☞ **Issis Romero**, gracias porque desde hace más de cinco años vamos juntas en el camino, y gracias por escucharme siempre que fue necesario, perdóname por hablar demasiado.
- ☞ A mis amigos de toda la vida, **Alma, Jonathan y Hugo**, que aunque no los veo muy seguido siempre los tengo presentes.
- ☞ A mis abuelitos **Carlos y Antonia**, por enseñarme lo que es más importante en la vida.
- ☞ Gracias a las familias **Alfaro García, García Salazar y García Fuente** por todo su apoyo.
- ☞ **Tía Olga García**, gracias por ser un ejemplo en mi vida de paciencia y amor y gracias por apoyarme siempre.
- ☞ **Tía Elvia García**, gracias por llenar mi vida de detalles, por consentirnos tanto y por estar siempre en los momentos importantes.
- ☞ A todos mis primos: **Isai, Carlos, David, Vasti, Heth, Belinda, Damaris, Sabdiel, Josué, Cesia, Orpha, Leonel, Uriel, Keila, Jahaziel, Carlos, Maggy y Kevin**. Otra vez gracias a **Jahaziel y a Leonel**, por su asesoría técnica.
- ☞ A la **Sra. Ma Eugenia Martínez** y a sus hijos, por ofrecerme su casa para trabajar cuando fue necesario.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 Fotosíntesis.....	4
3.2 Características de Rubisco.....	6
3.3 Regulación de Rubisco.....	8
3.4 Rubisco activasa.....	9
3.5 Respuesta de Rubisco y Rubisco activasa ante estímulos exógenos y diferentes tipos de estrés.....	11
3.5.1. Estrés térmico.....	11
3.5.2 Estrés luminoso.....	13
3.5.3. Estrés hídrico.....	16
3.5.4. Estimulo exógeno con fitohormonas.....	20
3.6 Chaperonas moleculares.....	23
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo General.....	28
5.2 Objetivos Particulares.....	28
6. Materiales y Métodos.....	29
6.1 Material Biológico.....	29
6.2 Experimentos de estrés con plántulas.....	29
6.2.1 Lote Control.....	29
6.2.2 Lote de plántulas sometidas a estrés de luz.....	29
6.2.3 Lote de plántulas sometidas a estrés de agua.....	30
6.3 Tratamiento con auxinas.....	30
6.4 Métodos.....	32
6.4.1 Determinación del grado de sequía.....	32
6.4.2 Extracción de proteínas.....	32
6.4.3 Cuantificación de Proteínas.....	33
6.4.4 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante.....	34
6.4.5 Western Blot.....	34
6.4.6 Densitometría.....	35
6.4.7 Manejo de datos.....	35

7. RESULTADOS	36
7.1. Efecto de una baja intensidad luminosa y la sequía en la expresión de Rubisco Activasa	36
7.1.1 Lote de Plántulas Control	36
7.1.2 Plántulas crecidas en baja intensidad luminosa	42
7.1.3 Plántulas sometidas a Sequía	47
7.2 Efecto del Ácido Indolacético (AIA) en Plántulas de Maíz	55
8. DISCUSIÓN	60
8.1. Cambios en la expresión de Rubisco activasa debido a dos estreses de tipo ambiental: la disminución de la luz y la sequía	60
8.1.1 Lote de Plántulas Control	61
8.1.2 Plántulas crecidas a baja intensidad luminosa	62
8.1.3 Plántulas sometidas a Sequía	64
8.2. Cambios en la expresión de Rubisco activasa debido al estímulo exógeno con auxinas	67
8.3 Rubisco activasa como Chaperona Molecular	68
9. CONCLUSIONES	70
Apéndice	71
A.1 Introducción	71
A.2 Material Biológico	72
A.2.1 Lotes Control	73
A.2.2 Tratamiento AIA 200 µM	73
A.3. Métodos	73
A.4. Resultados	74
A.4.1. Población Z₁	74
A.4.1.1 Lote Control	74
A.4.1.2. Lote tratado con AIA 200 µM	77
A.4.2 Población Z₁₇	80
A.4.2.1 Lote control	80
A.4.2.2. Lote tratado con AIA 200 µM	83
A.5. Discusión	87
A.6. Conclusiones	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

ABREVIATURAS.

ADP: Adenosina difosfato

AIA: Ácido indolacético

ATP : Adenosina trifosfato

∅DNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

DTT: Ditioneitol

EDTA: Etilen diamino tetracético

GA₃: Ácido giberélico

Hsp: proteínas del choque térmico (Heat Shock Protein)

kDa: kilo daltones

mA: mili amperes

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

Odu/mm²: Unidad de Densidad óptica por milímetro cuadrado

PMSF: Fenil-metano sulfonyl fluoruro

RNA_m : Ácido ribonucleico mensajero

Rubisco: Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa

Rubisco activasa: Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa activasa

RuBP: Ribulosa 1,5, bifosfato

RWC : Contenido Relativo de Agua (Relative Water Content)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

3' UTR: región no traducible 3' (Untranslated Region)

1. RESUMEN.

Rubisco activasa es una proteína cloroplástica, que en el maíz está constituida por dos péptidos de 43 y 41 kDa, respectivamente. Se ha estudiado a Rubisco activasa como una proteína que es capaz de activar a Rubisco mediante la remoción de azúcares fosfatados como RuBP, para restaurar el sitio activo, además de llevar a cabo la hidrólisis del ATP. Se ha observado que esta proteína comparte importantes características con las chaperonas moleculares, ya que es capaz de regenerar a Rubisco desnaturalizada *in vivo*, y en condiciones de estrés térmico se asocia fuertemente a las membranas tilacoidales, probablemente para reestructurar otras proteínas ubicadas en ese compartimiento celular.

Con el fin de conocer más acerca de la función de Rubisco activasa como chaperona molecular, en el presente proyecto se sometieron a plantas de maíz a dos tipos de estrés ambiental: la sequía y una baja intensidad luminosa con el fin de determinar su efecto en la expresión de los dos péptidos de Rubisco activasa, de manera individual y en la relación entre ambos a lo largo del desarrollo de la plántula. Otros experimentos consistieron en someter a plántulas de maíz, a un estímulo exógeno con auxinas (ácido indolacético), durante las distintas etapas de su desarrollo. De igual manera que en los experimentos de estrés ambiental, se determinó el efecto de esta fitohormona a nivel de expresión de Rubisco activasa, partiendo del hecho que el RNA mensajero que codifica para Rubisco activasa de maíz presenta secuencias regulables por auxinas.

Se observó que tanto en el desarrollo como en la sequía, a medida que el tiempo avanza, o que el contenido relativo de agua disminuye (sequía), se presenta una inversión en la relación de las isoformas, favoreciendo a la isoforma de 41 kDa. De esta manera se postula que el mecanismo por el cual se da origen a la isoforma de 41 kDa, puede ser el mismo en ambas condiciones sólo que a distinta velocidad y se presenta en respuesta a los cambios que sufren las plantas tanto en el envejecimiento como en la sequía y que permite que Rubisco activasa cumpla su función como chaperona molecular protegiendo a Rubisco y probablemente también a otras proteínas.

En condiciones de baja intensidad luminosa se expresa mayoritariamente y a lo largo de todo el desarrollo, la isoforma de 43 kDa, lo que sugiere que la luz sea otro factor que influya en el origen de la isoforma de 41 kDa.

En el caso de las plantas tratadas con ácido indolacético, no se presentó un aumento en la cantidad de Rubisco activasa, como se esperaba, debido a la estabilización de los mensajes; sin embargo sí se pudo observar que esta auxina favorece al rápido desarrollo de las plantas. Estos experimentos realizados con auxinas llevan al planteamiento de nuevos experimentos en los que se prueben distintas concentraciones de AIA, para lograr estabilizar los mensajes y así mismo probar tales concentraciones no sólo a nivel de plántula, sino también en el estado adulto de las plantas de maíz.

2. INTRODUCCIÓN.

El maíz (*Zea mays*, L.) es uno de los cuatro cereales económicamente más importantes en el mundo. En México este cereal es uno de los productos básicos en la dieta de su población.

En varios estados de nuestro país se cultiva este cereal y en el transcurso del año ocurren cambios climáticos importantes. Los cultivos son susceptibles también a ataques por plagas características de la ecología de cada sitio de siembra, lo cual puede generar pérdidas importantes en las cosechas.

La fotosíntesis juega un papel importante en el desarrollo de las plantas, ya que sin este proceso, no se podría obtener la energía necesaria para llevar a cabo todos los procesos metabólicos que les permiten cumplir con sus ciclos vitales, además de contribuir con la oxigenación del planeta. En la fase oscura de la fotosíntesis se lleva a cabo la fijación del carbono a través del Ciclo de Calvin, en donde una de las principales enzimas que intervienen es la Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (E. C. 4.1.1.39) también conocida como Rubisco. Rubisco activasa es una proteína cloroplástica capaz de activar a Rubisco mediante la remoción de azúcares fosfatados como Ribulosa bifosfato (RuBP), para restaurar el sitio activo.

Desde 1995 (Sánchez de Jiménez, *et al.*) y en trabajos recientes (Rokka, *et al.* 2001) se ha estudiado a Rubisco activasa como una proteína que comparte importantes características con las chaperonas moleculares. En diversos estudios se ha sometido a esta proteína a condiciones de estrés, principalmente el choque térmico (Crafts-Brandner *et al.*, 1997; Echard & Portis, 1997; Salvucci, *et al.* 2001; Law., *et al.* 2001); así mismo se ha determinado la regulación de las isoformas de Rubisco activasa por efecto de la intensidad de luz (Zhang & Portis, 1999).

Por otro lado en nuestro laboratorio se han aislado varias clonas de Rubisco activasa (RCA) de una biblioteca de cDNA de hoja de maíz (Ayala Ochoa, *et al.* 1998). Aunque todas las clonas codifican para péptidos idénticos, muestran dos tipos diferentes de regiones 3'UTR (extremo 3' no traducibles), uno con cola corta y otro con cola larga. Tanto las clonas con región 3'UTR corta como las que tienen cola larga muestran elementos DST (elementos de desestabilización). Estos elementos han sido identificados como una región conservada en las regiones 3'UTR de los transcritos inestables SAUR (small auxin-up RNA), (Newman, *et al.* 1993). Estos transcritos pueden ser estabilizados por el efecto de auxinas.

Todo lo anterior ha alentado los estudios con respecto a la expresión de Rubisco activasa en respuesta a diversas condiciones de estrés y estímulos exógenos con auxinas.

De esta manera a lo largo de este trabajo de investigación se sometieron a plántulas de maíz a dos tipos de estrés ambiental: la sequía y la baja intensidad luminosa, así mismo se midió el efecto de una auxina natural a lo largo del desarrollo de las plántulas de maíz. En ambos experimentos el objetivo fue observar posibles cambios en la expresión de Rubisco activasa en respuesta a tales condiciones adversas y relacionarlos con su función de chaperona molecular.

3. ANTECEDENTES.

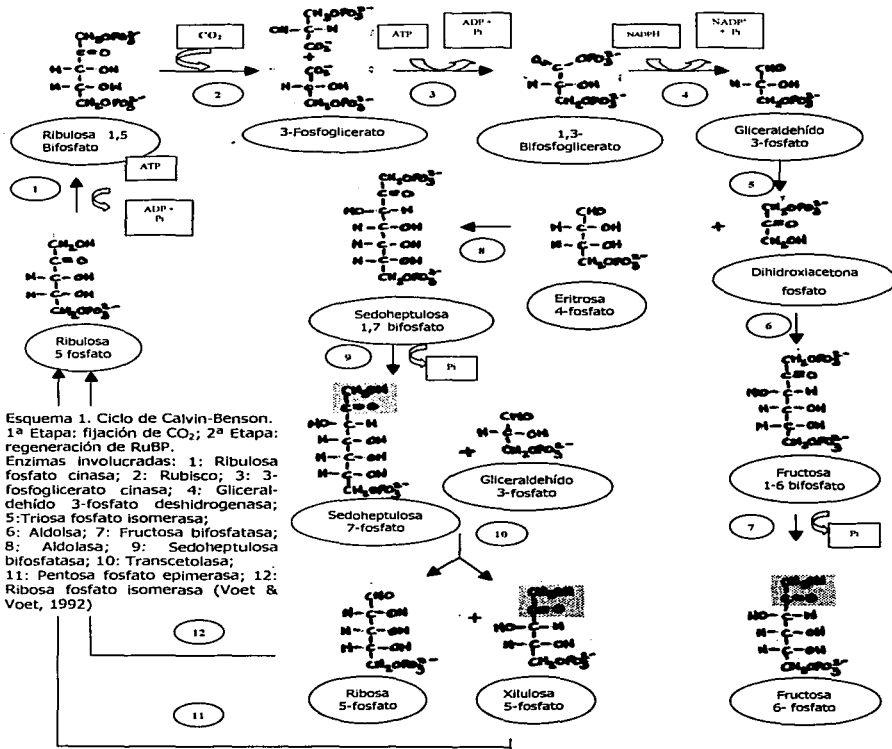
3.1 Fotosíntesis.

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual los organismos captan la energía solar y la convierten en energía química para la síntesis de compuestos orgánicos; es así que se pueden llevar a cabo todos los procesos metabólicos que conocemos.

Los organismos fotosintéticos atrapan la energía solar para formar ATP y NADPH, los cuales son usados posteriormente para la producción de carbohidratos y otros componentes orgánicos a partir de CO_2 y H_2O . La fotosíntesis abarca dos procesos fundamentales: las reacciones luminosas, las cuales ocurren solamente cuando las plantas se encuentran iluminadas y las reacciones de fijación de carbono o también llamadas reacciones de la fase oscura, las cuales pueden llevarse a cabo tanto en presencia de luz como de oscuridad. En las células eucarióticas fotosintéticas las reacciones luminosas y las de fijación se llevan a cabo en los cloroplastos. Las plantas verdes contienen en sus cloroplastos una maquinaria enzimática que cataliza la conversión de CO_2 en compuestos orgánicos simples, en un proceso conocido como fijación de CO_2 . Las plantas convierten estos productos simples de la fotosíntesis en biomoléculas más complejas que incluyen carbohidratos y algunos metabolitos derivados de ellos.

Las reacciones que resultan en la fijación de CO_2 se llevan a cabo por medio de una ruta cíclica donde los intermediarios constantemente son regenerados, conocida con el nombre de Ciclo de Calvin (Esquema 1). La primera etapa en la fijación de CO_2 es su condensación con un aceptor de cinco átomos de carbonos, ribulosa 1,5 bifosfato (RuBP), para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato, en la segunda fase el 3-fosfoglicerato es reducido a gliceraldehído-3-fosfato así 3 moléculas de CO_2 son fijadas a 3 moléculas de RuBP para formar seis moléculas de gliceraldehído-3-fosfato. Una molécula de triosa fosfato puede ser usada para la producción de energía vía glucólisis y

el ciclo del ácido cítrico, o bien ser condensada a hexosa fosfato para ser usada en la síntesis de almidón o sacarosa. En la tercera etapa cinco de las seis moléculas de gliceraldehído-3-fosfato son usadas para regenerar 3 moléculas de RuBP.



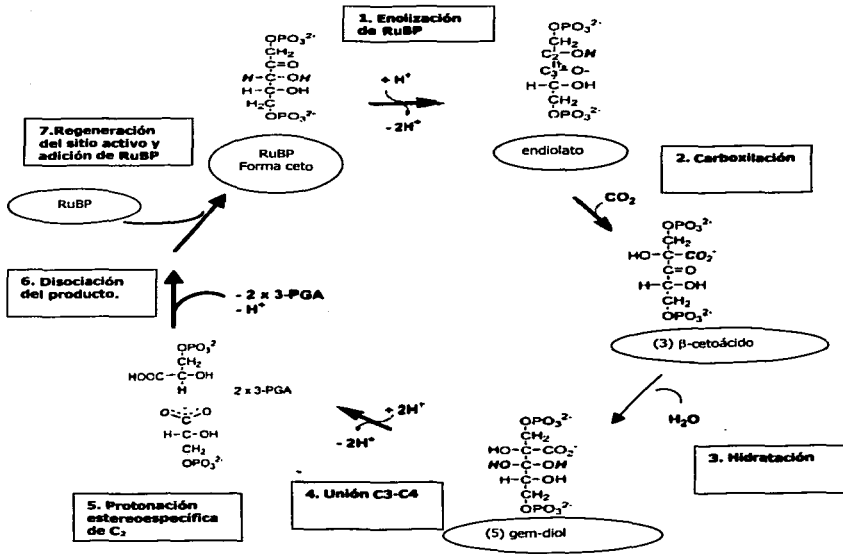
Esquema 1. Ciclo de Calvin-Benson. 1ª Etapa: fijación de CO₂; 2ª Etapa: regeneración de RuBP. Enzimas involucradas: 1: Ribulosa fosfato cinasa; 2: Rubisco; 3: 3-fosfoglicerato cinasa; 4: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; 5: Triosa fosfato isomerasa; 6: Aldosa; 7: Fructosa bifosfatasa; 8: Aldosa; 9: Sedoheptulosa bifosfatasa; 10: Transcetolasa; 11: Pentosa fosfato epimerasa; 12: Ribosa fosfato isomerasa (Voet & Voet, 1992)

3.2 Características de Rubisco.

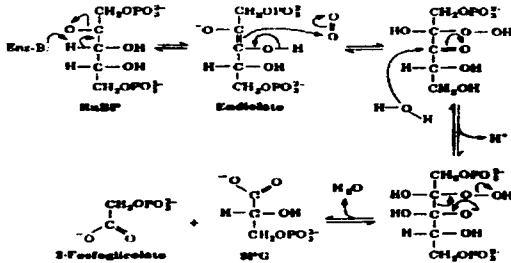
En las hojas de plantas verdes la enzima que cataliza la incorporación de CO_2 en la forma orgánica es la Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco E.C. 4.1.1.39). Como carboxilasa Rubisco cataliza la unión covalente del CO_2 a la pentosa Ribulosa-1,5-bisfosfato y la ruptura del intermediario inestable de seis átomos de carbono para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (Esquema 2), (Spreitzer, R.J.; Salvucci M.E. 2002).

Rubisco no es absolutamente específica para CO_2 como sustrato. El O_2 compite con el CO_2 por el sitio activo y Rubisco cataliza la condensación de O_2 con RuBP para formar una molécula de 3-fosfoglicerato y una de fosfoglicolato (Esquema 3).

Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (E.C. 4.1.1.39) es la proteína más abundante en la tierra. La Rubisco en plantas presenta una compleja estructura, es una gran enzima oligomérica (550 kDa), que se encuentra localizada en el estroma del cloroplasto y representa alrededor del 15% del total de la proteína cloroplástica. Está conformada por ocho subunidades grandes (LS, 53 kDa), que contienen cada una un sitio activo, y ocho subunidades pequeñas (SS, 14 kDa), cuya función hasta el momento no ha sido dilucidada. El péptido LS es codificado por el DNA cloroplástico y se asocia a una proteína denominada proteína de unión a la subunidad grande (LSbp), la cual previene su agregación antes de ensamblarse con las subunidades pequeñas (Spreitzer, R.J.; Salvucci M.E. 2002). Las subunidades pequeñas son codificadas por un gen nuclear.



Esquema 2. Reacción de carboxilación catalizada por Rubisco. (Mauser H., *et al.* 2001)



Esquema 3. Reacción de oxigenación de Rubisco. (Mizlorko & Lorimer; 1993)

3.3 Regulación de Rubisco.

Rubisco está sujeta a regulación por la adición covalente de una molécula de CO_2 al grupo amino de un residuo de Lisina en la subunidad grande para formar un carbamato. Este carbamato une Mg^{2+} antes de la unión con RuBP. El complejo resultante es esencial para la actividad e interviene directamente en la catálisis. A altos niveles de CO_2 la carbamilación ocurre de manera no enzimática, sin embargo, el sustrato de esta enzima, Ribulosa-1,5-bisfosfato inhibe la carbamilación, y este efecto es casi completo a concentraciones de CO_2 fisiológicas. (Cleland WW; *et al.* 1998)

Rubisco también es inhibida por 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (CAP1P) (Gutteridge *et al.*, 1986), un análogo que se presenta naturalmente en el estado de transición que presenta una estructura similar a la del intermediario β -cetoácido de la reacción que cataliza Rubisco. Este compuesto es sintetizado en la oscuridad por algunas plantas para inhibir la actividad de Rubisco y algunas veces es llamado el inhibidor nocturno; cuando

las plantas reciben una cantidad de luz adecuada por ejemplo durante el día, se estimula la actividad de una fosfatasa que inactiva al CAP1P y revierte su efecto. Esta regulación presenta mayor importancia en las plantas tipo C3 ya que se ha visto que en las plantas C4, como el maíz, el efecto de este compuesto sobre la actividad de Rubisco es poco importante (Sage & Seeman, 1993)

3.4. Rubisco activasa

Rubisco activasa es una proteína cloroplástica que ha sido encontrada frecuentemente como dos formas íntimamente relacionadas; en el maíz éstas son de pesos moleculares aproximados a 41 y 43 kDa respectivamente, el peso de cada polipéptido varía según la especie. En algunas estas isoformas son producto de un "splicing" alternativo de un transcrito primario común (Werneke *et al.*,1988). De la misma manera los genes que codifican para esta proteína, así como los mecanismos de regulación transcripcional pueden ser muy diferentes entre especies. Por ejemplo en el tabaco se ha reportado que hay 7 genes que codifican para Rubisco activasa (Qian J., Rodermerl SR.,1993). La expresión de la Rubisco activasa depende de diversos factores, entre los cuales se incluye el tipo de tejido, la edad fisiológica, las condiciones ambientales y variados tipos de estrés.

Se ha estudiado a la Rubisco activasa como una proteína que es capaz de activar a la Rubisco mediante la remoción de azúcares fosfatados, como RuBP, para restaurar el sitio activo. Experimentos realizados para entender la regulación de Rubisco por Rubisco activasa en el maíz demostraron que cuando la Rubisco está inhibida por RuBP, la activación con CO₂ y Mg²⁺ no es totalmente efectiva, pues aún cuando se utilizaron cantidades elevadas de CO₂, la actividad final fue apenas el 50% de la inicial. Sin embargo cuando se agregó Rubisco activasa, bastaron 10 mM de NaHCO₃ para que la recuperación de la actividad fuera total. (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1995)

La remoción de azúcares fosfatados por Rubisco activasa para restaurar el sitio activo, facilita la carbamilación y la unión subsecuente de Mg^{2+} . Así mismo Rubisco activasa hidroliza ATP durante el proceso de activación (Portis, 1995; Salvucci & Ogren, 1996). Rubisco activasa purificada de espinaca puede hidrolizar de 1.0-1.5 mmol de ATP/min/mg de proteína. El pH óptimo es de 8.0 a 8.5 y puede ser inhibida por p -hidroximercurio benzoato. La actividad de ATPasa al igual que la capacidad para activar los complejos Rubisco-RuBP es estrictamente dependiente de ATP, es decir, no puede utilizar otros nucleótidos y es fuertemente inhibida por ADP. También tiene alto requerimiento de Mg^{2+} que puede ser sustituido por otros cationes divalentes (Robinson & Portis 1989). De acuerdo a su función de ATPasa a Rubisco activasa se le ha incluido dentro del grupo de proteínas AAA⁺ (ATPasas parecidas a chaperonas asociadas con una gran variedad de funciones celulares) (Neuwald *et al.*, 1999). Muchos motivos conservados en las proteínas AAA⁺ fueron también encontrados en Rubisco activasa. Las proteínas de la clase AAA⁺ llevan a cabo funciones parecidas de las chaperonas moleculares que asisten en el ensamble o desensamble de complejos proteicos.

Se han realizado estudios en nuestro laboratorio para apoyar el hecho de que Rubisco activasa tiene la capacidad para actuar como chaperona molecular, es decir, que la estimulación de Rubisco por Rubisco activasa implica cierta capacidad por parte de Rubisco activasa para reestructurar a la Rubisco. Algunos de los resultados obtenidos, (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1995) demuestran que Rubisco activasa comparte características funcionales con las chaperonas moleculares, entre las cuales se encuentran:

- 1.- Rubisco activasa forma agregados de alto peso molecular (250 kDa), lo cual ha sido un prerrequisito para adquirir la estructura funcional.
- 2.-La reactivación por Rubisco activasa de la Rubisco inhibida por RuBP, es dependiente de ATP.
- 3.-La síntesis de Rubisco activasa es estimulada transitoriamente por temperaturas elevadas (44°C).

4.- Rubisco activasa forma complejos con la Rubisco desnaturalizada, los cuales son inestables cuando hay ATP en el medio.

5.-Rubisco activasa es capaz de inducir una reactivación significativa de preparaciones de Rubisco, que a causa de la incubación a 55°C en ausencia de iones, habían perdido aparentemente de manera irreversible poco más del 60% de su actividad original.

3.5 Respuesta de Rubisco y Rubisco activasa ante estímulos exógenos y diferentes tipos de estrés.

3.5.1. Estrés térmico.

Estudios recientes indican aspectos importantes acerca de la termoestabilidad y sensibilidad a las altas temperaturas de Rubisco y Rubisco activasa. De acuerdo con estudios realizados con la proteína purificada, Rubisco es una enzima muy termoestable por sí misma (Crafts-Brander *et al.*,1997), mientras que Rubisco activasa ha sido reportada como una proteína que presenta particular sensibilidad a la inactivación por elevadas temperaturas *in situ* (Robinson & Portis, 1989; Crafts-Brandner *et al.*, 1997; Echard & Portis, 1997). De esta manera la inactivación de Rubisco activasa probablemente sea la base de la falta de actividad de Rubisco a temperaturas elevadas en plantas intactas.

Experimentos similares realizados con Rubisco activasa obtenida de hojas de tabaco (Salvucci., *et al.* 2001) corroboraron los estudios anteriores. Se determinó si la pérdida de la función de Rubisco activasa en el estrés térmico se debía a la desnaturalización de la proteína, para lo cual se midió la estabilidad térmica de activasa *in vitro e in vivo* y se comparó con la estabilidad de otras dos proteínas cloroplásticas. Rubisco activasa presentó una temperatura óptima para la hidrólisis de ATP de 44°C comparada con la temperatura de 60° C o más en la que Rubisco puede llevar a cabo la carboxilación.

Estudios realizados con Rubisco activasa de trigo (Law., *et al.* 2001), que normalmente presenta dos isoformas de pesos aproximados a 46 y 42 kDa

respectivamente, presentan importantes hallazgos acerca del comportamiento de Rubisco activasa ante el estrés térmico. Así, se demostró que el estrés calórico de 38 °C, reduce significativamente los niveles de RNA_m totales de Rubisco activasa con respecto al control y que, después de 24 horas de recuperación, la transcripción de estos mensajes se recupera. El análisis de Western Blot indica que el estrés por calor aumenta la acumulación de la isoforma de 42 kDa e induce una nueva isoforma de 41 kDa que corresponde aproximadamente al 15% del total de Rubisco activasa.

Rokka y colaboradores (Rokka A., *et al.* 2001) demostraron que *in situ*, Rubisco activasa de espinaca es inactivada por calor, y no permanece soluble en el estroma, debido a los cambios estructurales que se llevan a cabo de tal manera que se asocia fuertemente a las membranas tilacoidales. En ausencia de tilacoides, Rubisco activasa tratada con calor permanece soluble en un extracto crudo de estromas o bien como una proteína purificada en solución. Esta asociación de Rubisco activasa con la membrana tilacoidal pareciera tener lugar en dos fases; una en la que el calor induce un cambio estructural en Rubisco activasa y otra subsecuente en donde se da una interacción específica con la membrana tilacoidal. De esta manera es posible que gracias a la asociación de Rubisco activasa al tilacoide recupere su actividad de ATPasa y manifieste una novedosa función de chaperona. El análisis de esta asociación reveló una interacción estable entre Rubisco activasa y algún complejo proteico en el tilacoide. Así estos investigadores sugieren que bajo condiciones de choque térmico, Rubisco activasa manifiesta un segundo papel metabólico como chaperona, ya sea ayudando como blanco de los complejos de ribosomas hacia la membrana tilacoidal o bien protegiendo a la maquinaria de traducción asociada al tilacoide en contra de la inactivación por calor; es decir Rubisco activasa presenta una doble función dependiente de temperatura. La primera se lleva a cabo a temperaturas óptimas y consiste en la liberación de azúcares fosfatados inhibitorios en el sitio activo de Rubisco y la segunda que se relaciona con la asociación de Rubisco activasa a la membrana tilacoidal probablemente para mantener la traducción de proteínas tilacoidales, esenciales para la función del cloroplasto.

3.5.2 Estrés luminoso.

Se han realizado diversos estudios de la regulación de las isoformas de Rubisco activasa por la intensidad de la luz. Experimentos realizados en *Arabidopsis thaliana*, (Zhang & Portis, 1999) muestran que la isoforma mayor de Rubisco activasa, que en esta especie posee un peso molecular de 46 kDa, presenta un papel importante en la regulación de Rubisco *in vitro*, debido a cambios redox. Así mismo que esta isoforma es inhibida por ADP con mayor facilidad que la isoforma de 43 kDa. Se utilizaron mutantes con una delección en el extremo carboxi-terminal, para demostrar que la remoción de los últimos siete residuos de la isoforma de 46 kDa que da lugar a la isoforma de 43 kDa, es suficiente para disminuir el efecto inhibitorio del ADP. También demostraron que la baja actividad de la isoforma de 46 kDa en presencia de ADP, puede ser satisfactoriamente aumentada mediante reducción con DTT a través de la vía de la tiorredoxina-f. La actividad de la isoforma de 43 kDa por sí misma, no se ve alterada por las reacciones de reducción/oxidación. Así, se demostró que la actividad de la isoforma mayor es suficiente para regular la actividad de las dos isoformas cuando las dos se encuentran presentes y que por lo tanto las dos isoformas presentes en *Arabidopsis thaliana* llevan a cabo funciones diferentes en la regulación de Rubisco.

A pesar de que las dos isoformas son capaces de activar Rubisco, sólo la isoforma mayor de 46 kDa se encuentra regulada por cambios redox en el estroma.

Se piensa que la regulación por cambios redox en Rubisco activasa es más dramática cuando la relación fisiológica entre ATP/ADP es igual a 0.33, que son los valores típicos que se presentan en períodos de luz normal, en comparación con el valor de ATP/ADP= 1 que se presenta en las plantas cuando se encuentran en oscuridad, en donde las dos isoformas presentan una actividad muy baja y el ATP se conserva debido a que la velocidad fotosintética disminuye. El mecanismo de la regulación por luz de Rubisco activasa permanece como un enigma ya que la relación entre ATP/ADP no varía

demasiado con la intensidad de luz y se ha visto que esta relación altera la actividad de Rubisco activasa. La regulación redox de Rubisco activasa nos permite entender el mecanismo de la modulación de la luz en el estroma en esta especie. Probablemente la regulación redox por la vía de la tiorredoxina sirve como una señal luz/oscuridad, la cual puede ser modulada por los niveles de sustrato u otros factores del estroma como el pH y la concentración de Mg^{2+} y que puede ser diferente para cada enzima en particular.

Estudios posteriores de estos mismos investigadores (Zhang, *et al.* 2002) presentaron importantes hallazgos acerca de la regulación de las isoformas de Rubisco activasa por la intensidad de la luz. En esta ocasión se utilizaron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Algunas sólo expresaban una de las dos isoformas (46 o 43 kDa) y otras presentaban ambas; así se analizó el papel de cada isoforma, tomando como referencia las plantas silvestres. En las plantas que sólo expresaban la isoforma menor (43 kDa), la actividad de Rubisco se mantuvo tan alta como en las plantas silvestres en condiciones de saturación de luz, así mismo se observó que la actividad no se encuentra regulada a intensidades de luz que limitan la fotosíntesis. En contraste, en las plantas que expresaban sólo la isoforma mayor de 46 kDa, la actividad de Rubisco se encontraba regulada en condiciones limitantes de luz, de tal manera que la actividad de Rubisco se mantuvo ligeramente baja y en condiciones saturantes de luz aumentó muy lentamente en comparación con las plantas silvestres. La principal consecuencia en las plantas que sólo poseen la isoforma de 43 kDa, después de un período largo de exposición a baja luz, se observa en los niveles de RuBP, los cuales no vuelven a ser tan altos como los que presentan las plantas silvestres que contienen las dos isoformas y que se mantuvieron en las mismas condiciones de baja intensidad de luz.

También se utilizaron plantas que sólo expresaban la isoforma de 46 kDa, pero con sustituciones en ciertos residuos de cisteína por alanina; por ejemplo se utilizaron plantas en las que la cisteína 411 fue sustituida por alanina y otras donde la cisteína 411 y la 392 también fueron cambiadas por alaninas. Cuando estas plantas

transformadas fueron expuestas a baja intensidad de luz, la actividad de Rubisco permaneció alta, en ambas transformantes, al igual que en las plantas que sólo expresaban la isoforma de 43 kDa. Con estos resultados se demostró que los dos residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal son cruciales para la modulación de la luz en la actividad de Rubisco. De esta manera se llegó a la conclusión que las plantas que no expresan la isoforma de 46 kDa o que contienen sustituciones cisteína – alanina en el extremo carboxilo terminal, particular de la isoforma de 46 kDa, pierden la capacidad de regular a Rubisco bajo condiciones de baja intensidad de luz y que la regulación redox de Rubisco activasa es necesaria para que ocurra tal fenómeno.

Con base en los resultados obtenidos *in vitro* se puede inferir que la regulación redox de la isoforma mayor (46 kDa) de Rubisco activasa en *Arabidopsis thaliana* es crítica para el estado de activación de Rubisco y su dependencia con la intensidad de la luz. Es evidentemente claro que las plantas que son incapaces de regular a Rubisco activasa mediante cambios redox son incapaces, por tanto, de regular a Rubisco en condiciones de baja luz; en consecuencia, en las plantas que sólo contienen la isoforma de 46 kDa, las moléculas de RuBP, no se mantienen en el sitio activo de Rubisco cuando la intensidad de luz es limitante, por lo que, la carboxilación se ve limitada debido a la concentración de RuBP y no a la cantidad de enzima activa disponible; de esta forma la reacción no se puede llevar a cabo de manera eficaz. Se ha propuesto que este tipo de regulación redox actúa principalmente como un switch de encendido y apagado que previene la inútil circulación de los intermediarios del ciclo de Calvin durante la oscuridad, lo cual desperdiciaría energía (Buchanan, 1991).

La regulación redox de Rubisco a través de Rubisco activasa no ocurre en todas las especies, por ejemplo en el tabaco no se han encontrado las dos isoformas, sino sólo una con un peso molecular de 43 kDa (Salvucci, *et al.* 1987). Otro caso particular es el maíz, en el cual, hasta el momento se ha encontrado que la intensidad de luz no regula la actividad de Rubisco (Sage & Seeman, 1993). La cuestión de cómo Rubisco puede ser

regulada por la luz en estas especies que sólo contienen la isoforma de 43 kDa, sigue siendo una enigma, sin embargo se puede suponer que la regulación redox puede ser mediada por otra proteína que contenga un dominio análogo al extremo carboxilo terminal de la isoforma mayor.

3.5.3. Estrés hídrico.

Durante el período de sequía, las plantas sufren cambios fisiológicos importantes como el cierre de los estomas que restringe la entrada de CO₂ en las hojas, lo que trae como consecuencia una disminución en la asimilación de CO₂, así como una disminución de agua en las hojas (Cornic, 1994).

El principal efecto de la disminución del contenido relativo de agua (RWC %) es la disminución de la síntesis de ATP por la enzima ATP sintetasa (Keck & Boyer, 1974; Tezara, *et al.*, 1999), debido en gran parte, pero no de manera exclusiva, a el aumento en la concentración de iones (especialmente Mg²⁺) en el cloroplasto cuando el RWC cae (Younis, *et al.*, 1979). La limitación metabólica que se observa en este tipo de estrés se relaciona directamente con la falta de ATP que comienza desde que se empieza a perder agua (Tezara, *et al.* 1999; Flexas & Medrano, 2002).

En un estudio reciente, Lawlor, (2002), encontró que a medida que el RWC disminuye, se pierde la actividad de Rubisco; sin embargo, otros investigadores han encontrado que la cantidad de Rubisco se ve poco afectada por un moderado o severo estrés (Flexas & Medrano, 2002), y que una posible reducción en la cantidad de Rubisco en condiciones de estrés puede estar relacionada con la estimulación del envejecimiento. La pérdida de la actividad de Rubisco probablemente se encuentra relacionada con la inhibición o no activación de los sitios activos de la enzima (Medrano *et al.*, 1997; Parry *et al.*, 2002). Como ya se ha mencionado antes, Rubisco activa a la proteína encargada de remover inhibidores del sitio activo de Rubisco, mediante una reacción que requiere ATP. Así se ha encontrado que de igual manera a la actividad de

Rubisco, la concentración de ATP también disminuye cuando el RWC decae (Parry *et al.*, 2002).

Por otro lado se ha reportado que cuando el RWC cae hasta valores bajos (40%) se presenta una disminución en el contenido de RuBP (Giménez, *et al.*, 1992; Gunasekera & Berkowits, 1993; Tezara, *et al.*, 1999). Existen dos razones principales que pueden llevar a la inhibición de la síntesis de RuBP: una falla en las enzimas del ciclo fotosintético de reducción de carbono (PCR, Photosynthetic Carbon Reduction); o bien una falla en el abastecimiento de ATP o NADPH al ciclo.

Varios estudios coinciden que cuando el RWC es bajo, el ciclo fotosintético de reducción de carbono (PCR) no se ve afectado, por lo que la limitación de RuBP se debe principalmente a la disminución en la síntesis de ATP y a las altas concentraciones que se acumulan de Mg^{2+} . El comportamiento del ATP en células y tejidos estresados por falta de agua ha sido estudiado por varios grupos de investigación. Boyer y colaboradores (Keck & Boyer, 1974; Boyer, *et al.*, 1987) han concluido a lo largo de dos décadas que la síntesis de ATP es la principal limitante de la velocidad fotosintética cuando los valores del RWC son bajos. La correlación entre la disminución del contenido de ATP y la caída del RWC es muy fuerte y aparentemente lineal (Tezara, *et al.*, 1999), sugiriendo una pérdida total de la síntesis de ATP cuando el RWC cae completamente.

Hay otras muchas consecuencias de la falta de ATP en condiciones de estrés, como la acumulación de ciertos metabolitos, denominados "metabolitos de estrés", entre los cuales se encuentran aminoácidos, como glicina, serina, glutamato y prolina (Samaras *et al.*, 1995; Lawlor & Cornic, 2002). Lo mismo ocurre con la citrulina que es un producto del metabolismo de la arginina, (Yokota, 2002). Sin embargo esta acumulación de aminoácidos, especialmente de prolina, tiene importantes ventajas, como la protección de membranas y proteínas en contra del aumento de concentración de iones cuando el RWC disminuye.

Así mismo se han reportado importantes cambios en la expresión de genes y síntesis de proteínas (Bray, 2002). Cuando los valores del RWC son bajos, la cantidad de muchas proteínas disminuye, probablemente debido a la represión de su síntesis o al aumento de la demanda de proteínas, causado por una condición adversa. En este fenómeno también tiene gran importancia el incremento de la concentración iónica. Esta disminución en la síntesis de algunas proteínas se debe en gran manera a la pérdida de la actividad de importantes enzimas en las condiciones de sequía, como la sacarosa-fosfato sintetasa (SPS) (Huber & Huber, 1996) y la nitrato reductasa (NR) (Kaiser y Foster, 1989). De manera contraria, en estas condiciones de estrés hídrico, muchos polipéptidos y proteínas se acumulan y en otras se induce su síntesis. Por ejemplo, las dehidrinas se acumulan para proteger algunas funciones metabólicas cuando el RWC es bajo (Close, *et al.*,1993). Las acuaporinas son proteínas integrales de membranas celulares que facilitan la difusión del agua y otras moléculas pequeñas hacia dentro de la célula y también se acumulan durante el estrés de agua. Algunas proteínas inducidas por valores bajos de RWC son también inducidas por el ácido abscísico (ABA) (Bray, 2002), por ejemplo RAB17, que forma parte del transporte de nucleoproteínas y ASR (s714) la cual tiene un papel importante en el mantenimiento de la estructura de ácidos nucleicos.

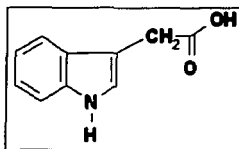
El hecho de que los valores bajos de RWC provoquen cambios en la estructura de las proteínas explica la importancia de las chaperonas moleculares, las cuales se acumulan en períodos de estrés, incluyendo la sequía. El ATP es sumamente importante en las funciones de las chaperonas moleculares. Lawlor en su último estudio (Lawlor, 2002) sugiere que la disminución del ATP a niveles bajos de RWC, desajusta la síntesis de proteínas, debido a la inadecuada aportación de energía, pero puede favorecer el aumento en la síntesis de algunas proteínas como las chaperonas moleculares. Los diversos cambios que se presentan en las proteínas bajo condiciones de estrés se

pueden relacionar con los efectos de las condiciones celulares alteradas que influyen en la transcripción, traducción y modificaciones post-traduccionales de las proteínas.

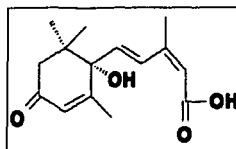
En este tipo de estrés se presenta gran actividad de cisteín- proteasas al igual que durante el envejecimiento. Algunos estudios corroboran que las proteasas que actúan durante el envejecimiento y durante la sequía, a pesar de pertenecer a la familia de cisteín-proteasas, no son específicamente las mismas (Khanna Chopra; *et al.*, 1999). Estudios realizados con chícharo durante el envejecimiento, utilizando anticuerpos contra papaína, detectaron proteasas de pesos moleculares de 57, 52 y 43 kDa respectivamente, mientras que en las hojas sometidas a sequía se encontraron péptidos con actividad de proteasa de 69 y 60 kDa respectivamente, que no se observan durante el período de envejecimiento; es decir estas proteasas son específicas del estrés de sequía.

3.5.4. Estímulo exógeno con fitohormonas.

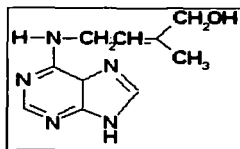
Entre las hormonas vegetales de mayor importancia se encuentran las auxinas. Auxina es un término genérico que representa una clase de compuestos los cuales se han caracterizado por su acción en numerosos eventos fisiológicos en los sistemas de las plantas. Algunos de los eventos en los que las auxinas se ven involucradas se enumeran a continuación: elongación celular, fototropismo, geotropismo, iniciación de las raíces, producción de etileno, desarrollo de los frutos entre otros. Las auxinas son sustancias ácidas con un núcleo insaturado y sus derivados. Entre las auxinas naturales más importantes se encuentran el ácido indolbutírico, el ácido indolacético y el ácido naftilacético. Otras sustancias que tienen efectos similares a las auxinas en las plantas son las giberelinas, las citoquininas, el etileno y el ácido abscísico (Esquema 4).



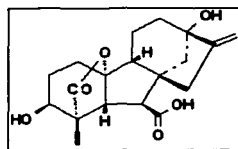
Auxinas



Ácido abscísico



Citoquininas



Giberelinas

Esquema 4. Estructura general de algunas hormonas vegetales.

Algunos estudios han cobrado importancia por el hecho de analizar el efecto de la aplicación de auxinas exógenas sobre la expresión y actividad de Rubisco y Rubisco activasa.

Como primer premisa de los estudios que involucran el efecto de las auxinas sobre la expresión de Rubisco activasa, en nuestro laboratorio se han aislado varias clonas de Rubisco activasa (RCA) de una biblioteca de cDNA de hoja de maíz (Ayala Ochoa, *et al.* 1998). Aunque todas las clonas codifican para péptidos idénticos, muestran dos tipos diferentes de regiones 3' UTR (extremo 3' no traducible). Algunas presentan regiones 3' UTR corta y otras extremos 3' UTR larga. Tanto las clonas con región 3' UTR corta como las que tienen cola larga muestran elementos DST (elementos de desestabilización). Estos elementos han sido identificados como una región conservada en las regiones 3' UTR de los transcritos inestables SAUR (small auxin-up RNA), (Newman, *et al.* 1993). De esta manera probablemente estos transcritos pueden ser estabilizados por el efecto de auxinas.

Otros estudios importantes se han realizado en arroz, para analizar el papel de el ácido giberélico y su relación con Rubisco y Rubisco activasa. Komatsu y colaboradores (Komatsu, *et al.* 1996), detectaron e identificaron a una proteína capaz de unirse a giberelinas marcadas con tritio ($[^3\text{H}] \text{GA}_1$) en extractos de hojas de arroz. Esta proteína posee un peso molecular relativo de 47 kDa y un punto isoeléctrico de 5.1.

Una vez que detectaron la proteína de unión a giberelinas, fue separada de las otras contenidas en el extracto mediante electroforesis de doble dimensión y transferidas a una membrana de PVDF, de donde mediante una degradación de Edman se obtuvo la secuencia de 22 aminoácidos del extremo aminoterminal, para después someterla a proteólisis utilizando *S. aureus* V8 proteasa con lo que se determinó la secuencia interna de aminoácidos, obteniendo en tal experimento una secuencia de 54 aminoácidos. Mediante una búsqueda de secuencias homólogas, se encontró que la proteína de unión

a giberelinas era homóloga a Rubisco activasa de cebada, espinaca, *Arabidopsis* y *Chlamydomonas*. Así mismo la proteína de unión a giberelinas fue detectada inmunológicamente, mediante una reacción con anticuerpos contra los dos polipéptidos de Rubisco activasa en espinaca. A pesar de que el péptido de 47 kDa es el que muestra específica unión a giberelinas, en los extractos de las hojas de arroz se detecta un segundo polipéptido de 43 kDa.

Más tarde Roh y colaboradores (Roh, K.S., *et al.*, 2001) realizaron algunos estudios en los que se involucraba la aplicación de giberelinas (GA_3) de manera exógena para analizar su efecto en la activación de Rubisco en hojas de soya. Primeramente se analizó el efecto de varias concentraciones de GA_3 en la actividad de Rubisco, resultando la concentración óptima de GA_3 de $0.1 \mu M$. La actividad de Rubisco en las hojas que fueron tratadas con giberelinas, se presentó satisfactoriamente aumentada con respecto a las plantas control, el contenido de Rubisco presentó el mismo comportamiento, ambas subunidades (LS y SS) aumentaron su expresión con respecto a las hojas control. Estos resultados sugieren que la cantidad de Rubisco está directamente relacionada con la actividad de la enzima (Downton, *et al.*, 1980), así mismo que la actividad y el contenido de esta enzima están directamente relacionadas con la concentración de GA_3 . De igual manera estos autores suponen que la activación e inducción de Rubisco probablemente sea causado por GA_3 . El control hormonal de los niveles de la enzima es regulado en cierta manera por la velocidad de transcripción de los genes. GA_3 puede controlar la actividad de la enzima y la inducción de la transcripción de los genes. Berry *et al.*, 1985 ha sugerido que la regulación transcripcional juega un papel importante en la expresión de los genes de las subunidades grande y pequeña de Rubisco. En este estudio los efectos de estimulación de la activación de Rubisco por GA_3 , parece estar causado por la expresión de los genes de Rubisco a nivel de la transcripción. Un aumento en la actividad de la enzima está precedido por un incremento en los RNA_m específicos (Beld, *et al.*, 1989). El hecho de

que GA_3 controle la síntesis de Rubisco es una evidencia directa de la acción de GA_3 en un nivel bioquímico.

Así mismo se asumió que los efectos de GA_3 en Rubisco estaban relacionados con Rubisco activasa, por lo que la purificaron y determinaron su actividad y contenido, en respuesta a la aplicación de GA_3 . De esta manera al medir la actividad de Rubisco activasa en función de su capacidad para producir ADP en presencia de ATP (Robinson & Portis, 1989), se obtuvo que después del tratamiento con GA_3 $0.1 \mu M$, la capacidad de ATP,asa de Rubisco activasa era mucho mayor con respecto a las hojas control, y lo mismo ocurría con el contenido total de la proteína. De esta manera se puede decir que el incremento en la cantidad y actividad de Rubisco, causado por GA_3 , puede ser debido al incremento en Rubisco activasa.

3. 6 Chaperonas moleculares.

En 1973 Anfinsen informó sobre la capacidad que tiene la ribonucleasa de renaturalizarse *in vitro*. Como consecuencia, se estableció una hipótesis que postula que la secuencia de aminoácidos contiene la información necesaria para que las proteínas se estructuren por sí mismas y alcancen la conformación funcional. Esto probablemente se cumpla con proteínas pequeñas, sin embargo, cuando las proteínas son más complejas, la (s) estructura(s) funcional(es) es sólo una de las muchas que puede adoptar una cadena de péptidos, de tal manera que también pueden producirse estructuras no funcionales. Han aparecido reportes (Ellis & van der Vies, 1991) donde se señala que la estructuración y ensamblaje de algunas proteínas se realiza con ayuda de un grupo muy particular de proteínas a las cuales se les ha denominado chaperonas moleculares.

El nombre de chaperonas moleculares fue propuesto por Laskey en 1978. Este investigador utilizó este término para describir las propiedades de la nucleoplasmina; una proteína nuclear ácida que se requiere para el correcto ensamble de los

nucleosomas en huevos de *Xenopus*. Posteriormente se utilizó dicho término para describir las propiedades de una proteína carboxilasa de la Rubisco.

El término de chaperona molecular es una definición funcional que se aplica a un grupo muy heterogéneo de proteínas que tienen la capacidad de unirse temporalmente a proteínas parcialmente estructuradas y evitan que se formen otras estructuras que pueden ser energéticamente más favorables, pero que carecen de actividad biológica. La temporalidad de la interacción que establecen las chaperonas radica en que no forman parte de la estructura funcional de las proteínas a las cuales se unen. La mayoría de las chaperonas moleculares se encuentran ampliamente distribuidas y en grandes cantidades en los organismos vivos (Ellis & van der Vies, 1991).

Como característica general, las cadenas polipeptídicas de las chaperonas moleculares presentan dos segmentos: uno con actividad ATPasa y otro con actividad de unión a péptidos. Por otra parte, no se conoce con exactitud el mecanismo que permite a las chaperonas moleculares llevar a cabo las funciones antes mencionadas. Sin embargo, al parecer, pueden reconocer ciertos dominios presentes en muchas proteínas, los cuales quedan expuestos cuando las proteínas son parcialmente desnaturalizadas y la unión de las chaperonas hace menos probables otras alternativas de ensamblaje.

Las chaperonas moleculares participan en procesos en los cuales es necesario que las proteínas adquieran o recuperen la estructura funcional; dichos procesos abarcan la síntesis y el transporte de las proteínas, la formación de complejos en la biogénesis de organelos y la tolerancia y / o recuperación de los daños causados por diferentes tipos de estrés. Algunas chaperonas moleculares se expresan constitutivamente, pero muchas de ellas son inducidas, como las proteínas del choque térmico (Hsp) (Sun, *et al.*, 2002). En los eucariotes existen diferentes clases de chaperonas moleculares, como las proteínas Hsp 100/Cip, Hsp90, Hsp70, Hsp60/chaperoninas, calnexina, nucleoplasmina,

y co-chaperonas como la Hsp40/ DnaJ, GrpE, y Cpn60, las cuales son proteínas accesorias que median la actividad de chaperonas específicas (Boston, *et al.*, 1996).

Se sabe que las chaperonas moleculares cumplen su función formando grandes complejos constituidos por dos o más tipos de subunidades (Sigler *et al.*, 1998) y que el mantenimiento de una relación adecuada entre los monómeros puede ser importante para su acción de chaperonas. Por ejemplo, las Hsps de plantas y otros organismos, están formadas por homo-oligómeros con 12 subunidades, con masas moleculares aparentes de 200 a 350 kDa (Sun, *et al.*, 2002), las chaperoninas, poseen una estructura general de un gran cilindro (800-1000 kDa), formado por dos anillos superpuestos, en particular, los anillos de la chaperonina citosólica eucariótica (CCT), están constituidos por ocho subunidades diferentes. Estos arreglos estructurales favorecen la unión e hidrólisis del ATP, para permitir importantes cambios conformacionales y reconstituir así, a las proteínas dañadas (Valpuesta, *et al.* 2002).

Se ha propuesto que las chaperonas no actúan solas. Langer et al. (1992) usando rodanasa de mitocondria de bovinos desnaturalizada observaron que el tratamiento con Dna k, Dna J, Grp E, Gro EL y Gro ES era capaz de inducir una recuperación importante de la actividad.

Se han realizado algunos experimentos *in vitro* para reconstituir a Rubisco desnaturalizada por algunas chaperonas como la groEl, hsp60 de mitocondria de levadura y la subunidad de unión a Rubisco de cloroplasto, junto con la chaperonina-10 de *E.coli* (groES), en donde se demostró que el mecanismo de las chaperonas, dependiente de ATP se lleva a cabo con la ayuda de las chaperoninas.

ANTECEDENTES

La reconstitución de la actividad de Rubisco facilitada por chaperoninas se lleva a cabo en dos pasos: un paso de plegamiento, seguido por el ensamble de dos monómeros catalíticamente inactivos para formar un dímero catalíticamente activo.

4. HIPÓTESIS.

Puesto que la Rubisco activasa es una chaperona molecular que coadyuva a proteger a Rubisco en las plantas, se postula que el contenido y/o la relación de los péptidos de Rubisco activasa en maíz son regulados por efectores hormonales y/o ambientales. Por tanto, al someter a las plantas a diferentes tipos de estrés o a estímulos hormonales, la expresión y/o contenido de uno o de los dos péptidos de Rubisco activasa pudiera presentar cambios notorios y reversibles.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Determinar el efecto de algunos factores bioquímicos y ambientales sobre la expresión de los péptidos de Rubisco activasa en plantas de maíz (*Zea mays*, L).

5.2 Objetivos Particulares.

- ❖ Observar el efecto sobre el contenido y relación de las dos isoformas que presenta Rubisco activasa al someterlas a dos tipos de estrés ambiental (disminución de la luz y sequía).
- ❖ Analizar el efecto del ácido indolacético (auxina) exógeno en los niveles de Rubisco activasa en las plántulas de maíz.
- ❖ Relacionar estos efectos con su posible relevancia en la función de Rubisco activasa como chaperona molecular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Material Biológico.

Los experimentos fueron realizados con plántulas de maíz (*Zea mays* L. Var. Chalqueño), sembradas en tierra en recipientes de plástico, cultivadas en el invernadero a una temperatura de 25° C +/- 2° y bajo un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. El análisis de las mismas consistió en seguir el desarrollo de la segunda, tercera y cuarta hoja en las etapas de desarrollo (etapa 4 a etapa 7), que se han definido en el laboratorio con anterioridad, de acuerdo al número de hojas expuestas, (Loza- Tavera, *et al.* 1990) y que se presentan en el esquema 5

Una vez que fueron colectadas las hojas de las plántulas, inmediatamente fueron congeladas con nitrógeno líquido y en el caso de no ser utilizadas de inmediato, fueron almacenadas a -70° C.

6.2 Experimentos de estrés con plántulas.

6.2.1. Lote Control.

Las plántulas control fueron cultivadas en el invernadero (temperatura 25° C +/- 2 °C, intensidad de luz: 120 μmol de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$) y regadas diariamente por las mañanas. Se tomó la 2ª, 3ª y 4ª hoja de cada etapa a lo largo del desarrollo de la plántula (Esquema 5).

6.2.2 Lote de plántulas sometidas a estrés de luz.

Las plántulas se mantuvieron en condiciones de agua y luz (120 μmol de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$), al igual que las plántulas control, desde el momento de la siembra y hasta que la mayoría alcanzó la etapa 4 (esquema 5), después fueron trasladadas a una zona dentro del mismo invernadero en donde la intensidad de luz se encontraba disminuida a razón de 2.85 μmol de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Aparato LI-COR Quantum/Radiometer/Photometer LI-

189). A medida que los días del estrés transcurrían, se tomaron muestras de la 2ª, 3ª, y 4ª hoja hasta llegar a la etapa 6 del desarrollo.

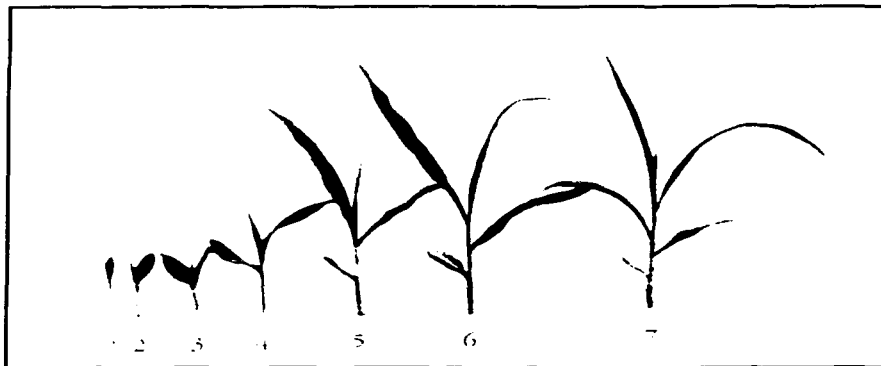
6.2.3. Lote de plántulas sometidas estrés de agua.

Las plántulas fueron regadas de igual manera que el lote de plántulas control desde el momento de la siembra hasta que la mayoría alcanzó la etapa 4 (esquema 5), después se suspendió el riego por completo y conforme transcurrían los días del estrés se tomaron muestras de la 2ª, 3ª y 4ª hoja hasta alcanzar los 10 días de estrés, tiempo en el que las plantas se observaban ya bastante marchitas.

6.3 Tratamiento con auxinas (ácido indolacético, AIA).

Lote de plántulas tratado con AIA 100 μM

Desde el momento en el que las semillas fueron sembradas, la tierra fue regada con una solución de ácido Indolacético 100 μM (Brock & Kaufman 1988). Cada tercer día se regaron los cultivos con dicha solución, una vez que las plántulas alcanzaron la etapa 2 (esquema 5), las hojas se asperjaron con la solución de AIA de manera simultánea al riego diario. Así se procedió a lo largo de todas las etapas de desarrollo y hasta que se obtuvieron todas las muestras requeridas.



Esquema 5. Etapas del desarrollo de las plántulas de maíz, usadas para el análisis de la expresión de Rubisco activasa, a lo largo de las etapas y en diferentes condiciones de estrés y estímulos exógenos. 1ª etapa: se observa la primera hoja, pero no tiene aún la ligula expuesta; la segunda hoja se encuentra enrollada. 2ª etapa: la primera hoja muestra la ligula, pero no se encuentra totalmente expuesta, la segunda hoja se encuentra enrollada en la base pero abierta en la punta. 3ª etapa: la primera hoja presenta la ligula expuesta, mientras que en la segunda hoja, la ligula se encuentra al nivel de la primera, pero no se encuentra expuesta; se puede observar la punta de la tercera hoja. 4ª etapa: la primera y la segunda hojas presentan la ligula expuesta, la tercera hoja se encuentra expandida casi a la mitad; se puede observar la punta de la cuarta hoja. 5ª etapa: la primera y la segunda hojas presentan la ligula expuesta, la tercera hoja se encuentra casi totalmente expandida, pero la ligula no se encuentra expuesta, la cuarta hoja se encuentra expandida a la mitad. 6ª etapa: la primera, segunda y tercera hojas muestran signos de envejecimiento en la punta. 7ª etapa: de la primera a la cuarta hojas presentan la ligula expuesta, la quinta hoja se encuentra expandida casi completamente, la sexta hoja muestra la punta; la primera hoja se encuentra totalmente seca, la segunda hoja muestra signos de envejecimiento en la punta. (Loza-Tavera *et al.*,1990)

6.4 Métodos.

6.4.1 Determinación del grado de sequía. (Ibarra C, *et al.* 1988; Barr, H.D. & Weatherley, P.E. 1962).

Transcurridos cinco días a partir de que las plantas dejaron de ser regadas, se colectaron tres plantas que se encontraban en la etapa seis y de cada una se tomó la 2ª, 3ª y 4ª hoja. Con unas tijeras se cortaron segmentos de 2 cm de largo (dos por cada hoja), a los cuales se les determinó peso fresco **PF**, posteriormente estos segmentos fueron colocados en viales con suficiente agua destilada de tal manera que quedaran completamente sumergidas y se mantuvieron en agitación durante 7 horas perfectamente bien cerrados y protegidos de la luz con papel aluminio, una vez transcurrido el tiempo indicado, las hojas se sacaron de los viales y se secaron superficialmente con un papel absorbente para después pesarse y obtener así el peso de saturación **P_{sat}**. Posteriormente las hojas se secaron en un horno de vacío a 60°C durante 36 horas o bien hasta obtener peso constante, este valor corresponde al peso seco **P_{seco}**; con los datos obtenidos y la siguiente fórmula se obtuvo el contenido relativo de agua **RWC**:

$$\text{RWC \%} = \left[\frac{\text{PF} - \text{P}_{\text{seco}}}{\text{P}_{\text{sat}} - \text{P}_{\text{seco}}} \right] \times 100$$

6.4.2 Extracción de proteínas.

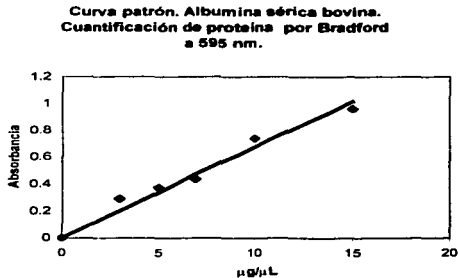
Se tomó 1g de tejido de cada muestra representativa, fueron maceradas perfectamente con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, inmediatamente se agregó amortiguador de extracción compuesto por: 100 mM Tricina-NaOH pH 8.1, 10mM MgCl₂·6H₂O, 10mM NaHCO₃, 5mM EDTA, 1mM benzamidina, 1mM PMSF, 10 mM DTT. Se utilizó una relación de 1.5 mL de amortiguador de extracción por gramo de tejido, se homogenizó muy bien el extracto para después someterlo a centrifugación a

14000 rpm durante 10 minutos para descartar todas las membranas y tejido no utilizable y aprovechar las proteínas suspendidas en el sobrenadante.

6.4.3 Cuantificación de Proteínas (Bradford, 1976).

El ensayo de cuantificación de proteínas está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El colorante se une primariamente a residuos de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y a residuos aromáticos. El ensayo es de gran utilidad para cuantificar proteínas y polipéptidos con masas moleculares mayores de 3000-5000, dependiendo de los grupos cargados. Muchos detergentes y soluciones amortiguadoras básicas pueden interferir en el ensayo. Las lecturas de la reacción colorimétrica se llevaron a cabo a 595 nm.

A partir del sobrenadante de los extractos crudos de cada muestra se tomó una alícuota de 4 μL que se hizo reaccionar con el reactivo de Bradford, la lectura de absorbancia fue extrapolada a una curva patrón realizada con BSA (albumina sérica bovina) que se muestra en el esquema 6 para así obtener los $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína total en cada extracto.



μL de BSA [1mg/mL]	Cantidad de proteína $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Absorbancia
3	3	0.2924
5	5	0.3748
7	7	0.4384
10	10	0.7405
15	15	0.9637

Esquema 6. Curva patrón. Albumina sérica bovina 1mg/mL.

6.4.4 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

El análisis de proteínas en geles de poliacrilamida es una técnica muy útil ya que permite observar las proteínas presentes en un extracto celular como bandas discretas separadas en un soporte sólido de acuerdo a su peso molecular. Este método se basa en las propiedades de las proteínas de poseer una carga y una masa y por tanto desplazarse a través de una corriente eléctrica. Esta técnica permite con base en la comparación de las bandas de proteína con marcadores de peso molecular conocido, determinar el tamaño aproximado de las proteínas de interés.

Para determinar los cambios en las concentraciones de Rubisco activasa en extractos crudos de las muestras de plántulas, se utilizaron 15 μg de proteína total determinada por el método de Bradford. Cada extracto fue sometido a electroforesis desnaturalizante en geles al 10% de acrilamida aplicando una corriente de 20 mA.

6.4.5 Western Blot.

Las muestras de proteína fueron transferidas en membranas de nitrocelulosa (Millipore) aplicando una corriente de 1.5 mA/cm² por 1.5 horas utilizando un aparato de transferencia semiseco (LKB, Bromma, Suecia). Una vez que las proteínas fueron transferidas, las membranas fueron procesadas de acuerdo a un método similar al reportado por Ferreira & Shaw (1989) y adaptado en nuestro laboratorio (Sánchez de Jiménez E. *et al.* 1995). Las membranas se probaron frente un anticuerpo contra Rubisco activasa de espinaca diluido 1:8000 (Anticuerpos obtenidos por el Dr. Eleazar Martínez Barajas, UNAM, Facultad de Química). Para el revelado se utilizó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:4000. La reacción fue visualizada por fluorescencia (Sistema ECL, Amersham).

6.4.6 Densitometría.

Una vez reveladas las placas de los correspondientes Western Blot, se realizó la densitometría de cada una de ellas en el programa Quantity one de Bio Rad ^{MR} para determinar por medio de unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (Odu/mm^2) la cantidad de cada isoforma de Rubisco activasa en todas las muestras de las plántulas.

6.4.7 Manejo de datos.

Es importante aclarar que las densitometrías fueron realizadas directamente de las películas reveladas y no de las imágenes que fueron escaneadas de las mismas.

Para cada lote se realizó una serie de gráficas par poder visualizar el comportamiento de Rubisco activasa en cada muestra. Primeramente una gráfica que representa los valores obtenidos en la densitometría para cada isoforma (43 y 41 kDa), expresados en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (Odu/mm^2), así se realizó con cada muestra que se obtuvo a lo largo del desarrollo de cada lote plantado. Una segunda gráfica representa los valores totales de Rubisco activasa, es decir se presentan los valores en Odu/mm^2 de la suma de las cantidades detectadas de ambas isoformas (43 + 41 kDa); por último, una gráfica donde se presentan los valores de la relación entre ambas isoformas (43 kDa / 41 kDa) para evaluar en que momento se da un cambio en la relación.

Las escalas de las gráficas para los lotes sometidos a los diferentes tipos de estrés y para el lote tratado con auxinas fueron ajustadas de acuerdo a los valores máximos obtenidos para el lote control, de tal manera que en el momento del análisis de los resultados las gráficas puedan ser perfectamente comparables, tomando como referencia el lote control.

7. RESULTADOS.

7.1. Efecto de una baja intensidad luminosa y la sequía en la expresión de Rubisco Activasa.

Los resultados que a continuación se presentan muestran el efecto a nivel de expresión de Rubisco activasa al someter a plantas de maíz a dos tipos de estreses ambientales: intensidad luminosa de $2.85 \mu\text{mol}$ de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y sequía o privación total de agua.

El efecto sobre la expresión de Rubisco activasa, fue medido en términos de densidad óptica que refleja la cantidad de proteína detectada por el anticuerpo contra Rubisco activasa de espinaca en cada muestra correspondiente a los diferentes estreses. Es importante conocer qué ocurre con la expresión de esta proteína mientras la planta se encuentra en condiciones de estrés para poder explicar como se regula la expresión de la proteína o bien saber la respuesta de la planta a tales condiciones adversas. De esta manera se hace especial énfasis en la cantidad de las dos isoformas presentes en cada muestra y la manera en la que va cambiando la relación entre éstas a lo largo del tiempo y conforme se intensifica el estrés. De la misma manera se señalarán los cambios físicos que presentan las plántulas a lo largo de cada estrés así como el aspecto de las plántulas de el lote control.

7.1.1 Lote de Plántulas Control

Estas plántulas desde el momento de la siembra y hasta la recolecta de la última muestra, se mantuvieron en condiciones normales de invernadero (temperatura $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, intensidad de luz: $120 \mu\text{mol}$ de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$) y fueron regadas diariamente. Conforme el tiempo transcurría y las plántulas crecían, se mantuvieron en perfectas

condiciones, erguidas y con una coloración verde durante todo el desarrollo. A medida que las plántulas se desarrollaban, la primera y segunda hoja, se comenzaron a observar secas, y al llegar a la etapa número 7, principalmente la primera hoja se encontraba completamente deshidratada; no obstante, la apariencia de las plantas era saludable como lo podemos apreciar en la figura No. 1.

En cuanto a los extractos y a la cantidad detectada de Rubisco activasa (figura 2 A) se puede observar que en todas las hojas analizadas a lo largo de las etapas se presenta el siguiente fenómeno: en etapas tempranas se aprecian las dos isoformas (43 y 41 kDa) y conforme las etapas avanzan se encuentra mayoritariamente la isoforma de 41 kDa, mientras que la isoforma mayor tiende a disminuir, pero no desaparece por completo. Por ejemplo en la etapa 4 de la hoja 2 se aprecian las dos isoformas y la diferencia entre ellas no es tan marcada, en cambio en la etapa 6 hoja 2 (15 días después de la siembra) la isoforma de 43 kDa se encuentra presente pero en cantidades mínimas con respecto a la isoforma de 41 kDa. Este fenómeno se observa más claramente en la hoja 2 a lo largo de las etapas, puesto que es la segunda hoja que emerge y por lo tanto es la que tiene mayor tiempo expuesta al llegar a las etapas mayores. No obstante en la gráfica de la densitometría (figura 2B) se puede observar el mismo efecto en las demás hojas, sólo que no tan marcado como en la segunda hoja. Esto se reafirma al observar la gráfica que ilustra la relación entre las isoformas (figura 3B), donde la relación entre éstas en la etapa 4 para las hojas 2 y 3 es mayor a 1, lo que quiere decir que predomina la isoforma de 43 kDa y a medida que las etapas avanzan este fenómeno se observa de manera semejante en cada hoja y la isoforma de 41 kDa incrementa su expresión y por tanto provoca que los valores de esta relación se inviertan y sean menores a 1 (0.6-0.8). Por otro lado en la etapa 5 en las tres hojas (2, 3 y 4) la isoforma de 43 kDa alcanza la mayor cantidad (figura 2B), y por lo consiguiente el valor de la relación es mayor (1-1.2; figura 3B). Sin embargo en etapas más avanzadas al alcanzar la etapa 6 en las mismas hojas, la isoforma de 43 kDa disminuye notablemente y la isoforma de 41 kDa incrementa su expresión y como ya se

dijo antes, esto es más notorio en la hoja 2, ya que en esa etapa la hoja 2 es la más vieja.

En cuanto a la cantidad total de Rubisco activasa (figura 3 A) en estas plántulas, es mayor conforme la hoja es más joven, es decir se alcanzan los máximos niveles (160 Odu/mm²) en la cuarta hoja en la etapa 6, en tanto que en las hojas tempranas (2 y 3), en la misma etapa, la cantidad de Rubisco Activasa sólo alcanza valores 100-130 Odu/mm². El mismo fenómeno se presenta a lo largo de las etapas es decir, en las primeras (Etapa 4), la cantidad total de Rubisco activasa es mayor que la que se detecta al final del muestreo en la 2^a, 3^a, 4^a hojas, en las última etapas, aunque cabe decir que esta disminución no es tan severa, ya que la disminución en la expresión de la isoforma de 43 kDa se ve compensada con el aumento de la isoforma de 41 kDa. (figura 3A y 3B). En resumen, la cantidad de proteína total de Rubisco activasa, así como la relación entre sus isoformas (43/41 kDa), cambia como consecuencia del desarrollo en las plantas de maíz.

Plántulas Control

Figura 1. Aspecto físico de las plántulas crecidas en condiciones control., en el invernadero, temperatura: 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ; intensidad de la luz: $120 \mu\text{mol}$ de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y riego diario. Al final del ensayo todas las plántulas alcanzaron la etapa 7, se encontraban perfectamente erguidas y con buena coloración.

Plántulas Control

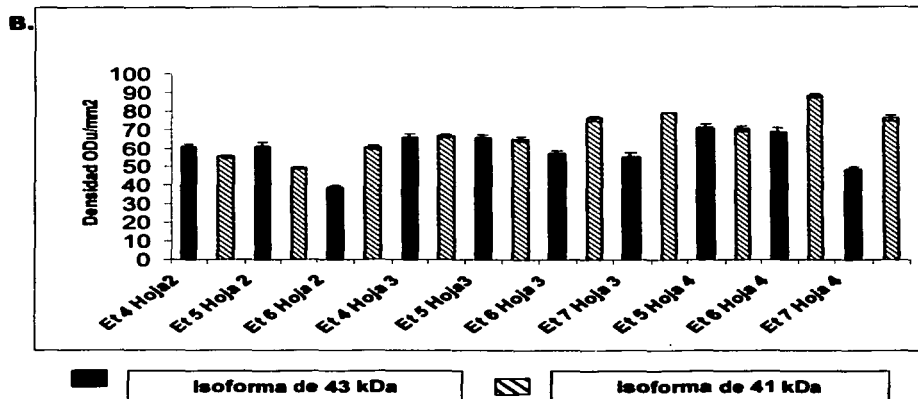
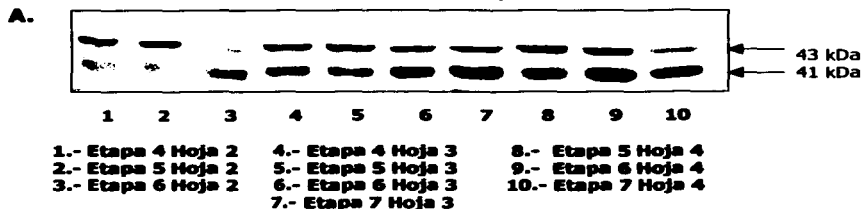
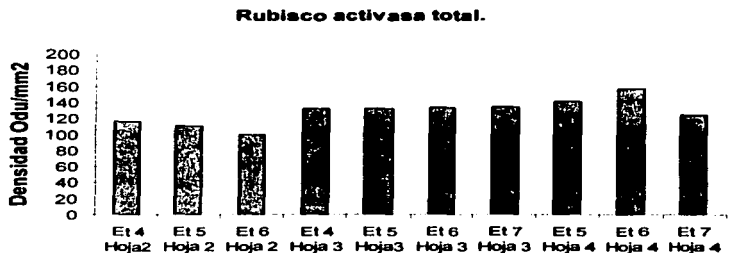


Figura 2. Plántulas crecidas en invernadero en condiciones control, muestras tomadas durante las etapas de desarrollo de la plántula (Etapa 4- Etapa 7; hojas 2,3 y 4). A) Western Blot de extractos proteicos de cada una de las muestras, 15 µg de proteína total en cada carril; B) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (isoformas 41 y 43 kDa) en cada muestra.

Plántulas Control.

Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 kDa

A.



B.

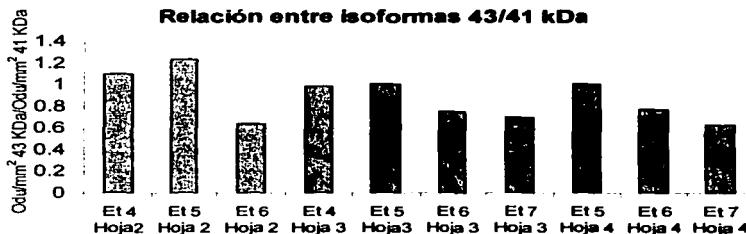


Figura 3. Plántulas crecidas en invernadero. Temperatura: 25°C (+/-2°C); Intensidad de Luz.: 120 μmol de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Lote Control A. Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. B. Relación entre Isoformas 43kDa/41 kDa

7.1.2 Plántulas crecidas en baja intensidad luminosa.

Desde el momento de la siembra y hasta que las plántulas alcanzaron la etapa 4, se mantuvieron en las mismas condiciones de riego, luz y temperatura que para las plántulas control; para después trasladar un lote de plántulas a un lugar dentro del invernadero en donde la intensidad de luz se hallaba disminuida a razón de $2.85 \mu\text{mol de fotón s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Físicamente las plántulas se observaban acloróticas debido a la poca luz recibida y conforme el tiempo pasaba las plántulas se observaban alargadas y en dirección hacia donde percibían un poco de luz. Al final del experimento la mayoría de las plantas se observaban completamente decaídas (figura 4). A pesar de que el riego para estas plántulas fue normal, al final del desarrollo no lograron alcanzar el tamaño de las plántulas control, de hecho, pocas plántulas llegaron a la etapa 7, es decir en muchas de ellas ya no hubo desarrollo y la 5ª hoja no emergió jamás y por lo tanto no se presentan datos de estas plántulas en la etapa 7.

En cuanto a la expresión de la proteína en el Western blot (figura 5 A), se aprecian cantidades iguales de cada isoforma a lo largo del desarrollo, presentándose en todo tiempo mayoritariamente la isoforma de 43 kDa; en general la cantidad total de Rubisco activasa se encuentra notablemente disminuida con respecto a las cantidades presentadas en las plántulas control (figura 5 A, y 6 A; Nota: a pesar de que en la fotografía se aprecian cantidades semejantes de Rubisco activasa en las plántulas control y en las que crecieron bajo la sombra; la densitometría se realizó directamente de las películas reveladas y no de las fotos de las mismas, de tal manera que en las películas reveladas se detectaron valores disminuidos de Rubisco activasa en estas muestras, con respecto a las muestras de las plántulas control).

En las plántulas crecidas en sombra sólo se alcanzan valores de 30-50 Odu/mm², en contraste con la cantidad detectada en las plántulas control que va desde 100 hasta 160 Odu/mm² (figura 6A; valores estandarizados con respecto a las plántulas control). En

las primeras muestras (Etapa 4, Hoja 2 y 3) es donde se presentan los niveles máximos de la isoforma de 41 kDa (figura 5B); ya que en el momento de la recolección de dichas muestras las plántulas llevaban pocos días de ser sometidas a las condiciones con poca luz. En la figura 6B se pueden apreciar que los valores de la relación entre las dos isoformas se mantienen muy por arriba de la unidad, lo que nos explica que en todo tiempo se encuentra mayoritariamente la isoforma de 43 kDa, tanto en etapas tempranas, como en las más avanzadas. En resumen podemos decir que cuando las plántulas de maíz crecen por un período prolongado en condiciones de baja intensidad luminosa, se expresa mayoritariamente, la isoforma de 43 kDa y no se favorece la aparición de la isoforma de 41 kDa.

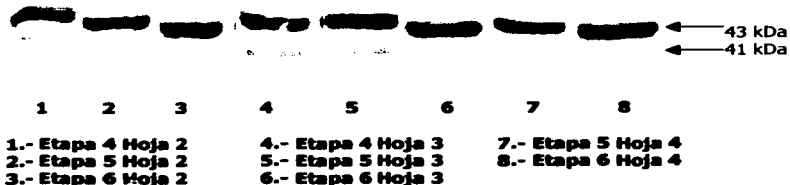
Plántulas crecidas en baja intensidad luminosa.

Figura 4. Aspecto físico de las plántulas crecidas en el invernadero en condiciones de baja intensidad de luz. Temperatura: 25°C (+/-2°C) ; intensidad de luz: 2.85 μmol de fotón $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y riego diario. Al final del ensayo las plántulas sólo alcanzaron la etapa 6, se observaban decaídas y presentaron una coloración acolorótica.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Plántulas crecidas en Baja intensidad luminosa.

A.



B.

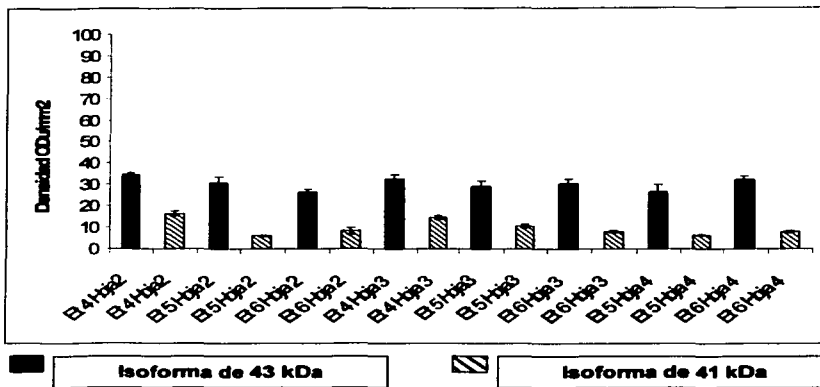
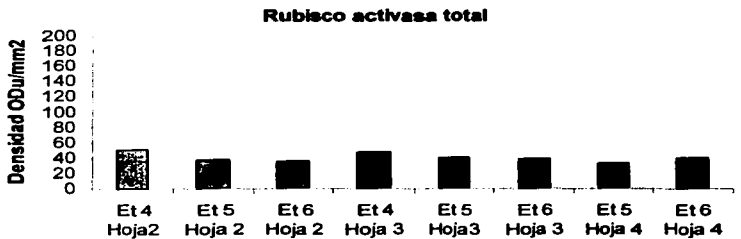


Figura 5. Plántulas crecidas en invernadero a baja intensidad de luz $2.85 \text{ mmol de fotón s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Muestras tomadas durante las etapas de desarrollo de la plántula (Etapa 4 - Etapa 6; hojas 2,3 y 4). A) Western Blot de extractos proteicos de cada una de las muestras, $15 \mu\text{g}$ de proteína total en cada carril; B) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (isoformas 41 y 43 kDa) en cada muestra.

**Plántulas Crecidas en baja intensidad luminosa.
Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 kDa**

A.



B.

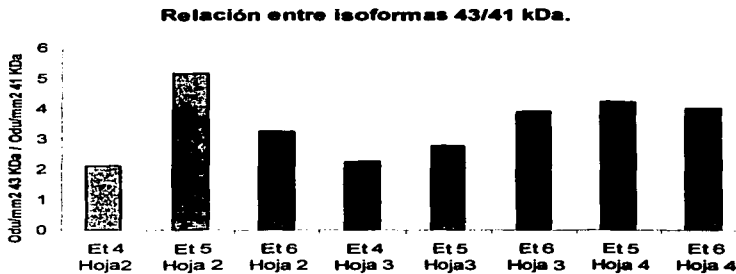


Figura 6. Plántulas crecidas en invernadero a baja intensidad de luz. Temperatura: 25°C (+-2°C); Intensidad de Luz: 2.85 $\mu\text{mol de fotón s}^{-1} \text{m}^{-2}$. **A.** Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. **B.** Relación entre isoformas 43kDa/41 kDa

7.1.3 Plántulas sometidas a Sequía.

Desde el momento de la siembra y hasta que las plántulas alcanzaron la etapa 4 fueron regadas diariamente. Más o menos 10 días después de la siembra (etapa 4) las plántulas fueron privadas definitivamente del agua.

Conforme el estrés transcurría se recolectaron muestras, aunque fueron pocas, debido a que sólo algunas siguieron creciendo y como el tejido se encontraba deshidratado, difícilmente se pudieron obtener cantidades suficientes de cada hoja para realizar extractos de todas las hojas en cada etapa.

A medida que avanzaba el tiempo del estrés, las plántulas iban perdiendo turgencia y coloración, primeramente las hojas 2 y 3 empezaron a observarse secas, y como ya se mencionó antes, las plántulas ya no siguieron creciendo y por lo tanto sólo alcanzaron las etapas 5 y 6 (figura 7). Al final del ensayo las hojas se apreciaban completamente deshidratadas y con una coloración verde seco.

Un fenómeno muy importante que se observó en estas plántulas sometidas a sequía extrema que podemos visualizar en el Western blot y la gráfica de la figura 8, fue que a medida que los días del estrés transcurrían, se iba incrementando la cantidad de la isoforma de 41 kDa, y por el contrario la señal para la isoforma de 43 kDa iba desapareciendo. Un caso extremo se observa en la muestra de la etapa 4 hoja 3, a los 8 días de sequía (figura 8 A) en la cual ya no se observa la isoforma de 43 kDa. El mismo fenómeno se observa cuando se analizan dos hojas en diferentes etapas, la hoja más joven mantiene las dos isoformas, mientras que la más vieja presenta mayoritariamente la isoforma de 41 kDa (Figura 8 A; Etapa 5 hojas 3 y 4; 7 y 12 días de estrés respectivamente). En términos generales puede decirse que a mayor período de exposición al estrés, la cantidad de la isoforma de 41 kDa es mayor en las hojas y la isoforma de 43 kDa casi desaparece por completo. La relación de las dos isoformas por

tanto, se hace menor a la unidad en la mayoría de las hojas que fueron sometidas al estrés (Figura 9 B) y sólo en las muestras de las etapas 6 y 7 hoja 4 se pueden apreciar valores cercanos a 1, es decir la cantidad de ambas isoformas es casi equivalente, esto se explica debido a que cuando se colectaron estas muestras, la hoja 4, no tenía muchos días de haber sido expuesta al estrés. En cuanto a la cantidad total de Rubisco activasa, a pesar de las condiciones de estrés no se ve disminuida notablemente (figura 9 A), pero no logra alcanzar los niveles de las plántulas control, sólo hasta 130 Odu/mm² en el mejor de los casos y como era de esperarse los valores menores de Rubisco activasa los presentan las muestras en donde la isoforma de 41 kDa se encuentra predominantemente y la isoforma mayor está por desaparecer.

Como es imposible saber en que etapa, hoja y días de estrés se empieza a presentar este fenómeno, y se sabe que más bien depende del contenido de agua que almacene la planta, paralelamente se realizaron mediciones del contenido relativo de agua (RWC) de las muestras en los diferentes tiempos conforme iba transcurriendo el estrés con el objetivo de establecer una relación entre el RWC y la expresión de Rubisco activasa. Se tenían dos lotes de plántulas que fueron sometidas a sequía, unas fueron analizadas por Western Blot y las otras se utilizaron para las mediciones del %RWC. Ambos lotes fueron regados diariamente hasta que alcanzaron la 4ª etapa, después fueron privadas del agua y se tomaron muestras a los 5 y 7 días de haber comenzado el estrés para hacer la determinación del contenido relativo de agua.

Las muestras fueron tomadas en la etapa 6 (hojas, 2, 3 y 4). Las plántulas control en los tres muestreos presentan valores del contenido relativo de agua (figuras, 10, 11), que oscilan entre 98-100%, lo que indican que se encontraban bien hidratadas a lo largo del muestreo, en tanto que las plántulas estresadas a los 5 días de transcurrido el estrés (figura 10 B) los valores del RWC van desde el 87% (Etapa 6 hoja 2) hasta el 94% (Etapa 6 hoja 4) y como se puede apreciar el menor contenido relativo de agua se presenta en la hoja más adulta es decir, la segunda y va aumentando conforme la hoja

es más joven, esto es porque en esta etapa la hoja 2 ya está envejeciendo en tanto que la cuarta hoja tiene pocos días de haber emergido. Conforme los días avanzan se aprecia una disminución notoria en el contenido de agua de las plántulas, ya que en las muestras tomadas a los 7 días de iniciado el estrés los valores del RWC decayeron hasta un 39% en la hoja 2 y un 55% en la hoja 4 (figura 11 B), estos valores corresponden a las muestras en el Western blot (figura 8 A) cuando se observa mayoritariamente la isoforma de 41 kDa, y la isoforma de 43 kDa ha desaparecido (Etapa 6 hoja 3 , 7 días de sequía, figura 8 A). En tanto en la hoja 2 en esta misma etapa, después de 7 días de estrés ya no se observa rastro de ninguna de las isoformas. En resumen, a medida que el % RWC disminuye, hay un aumento en la isoforma de 41 kDa, y la isoforma de 43 kDa disminuye, hasta desaparecer por completo. A pesar de que se presenta el mismo fenómeno que en el envejecimiento, en el estrés hídrico, la aparición gradual de la isoforma de 41 kDa se relaciona directamente con la disminución del %RWC.

Plántulas sometidas a Sequía extrema.



Figura 7. Aspecto físico de las plántulas sometidas a sequía extrema durante 10 días a partir de que alcanzaron la 4a etapa. Conforme los días del estrés transcurrían las plántulas se comenzaron a marchitar y empezando por la segunda y tercera hoja las plántulas se deshidrataron completamente.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Plántulas sometidas a Sequía.

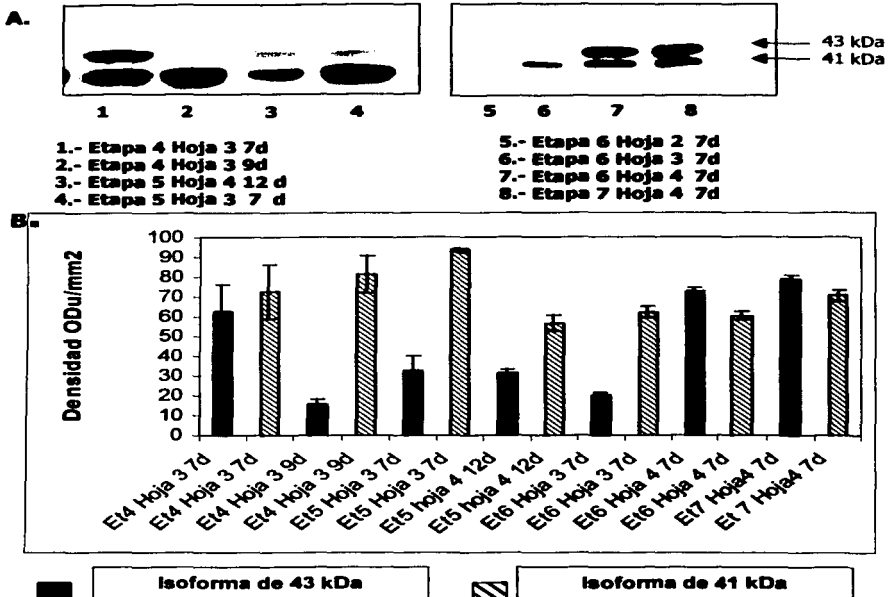
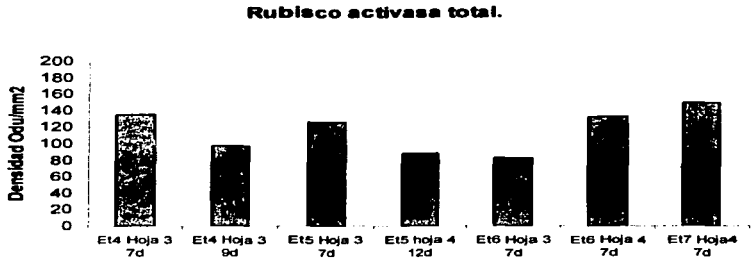


Figura 8. Plántulas sometidas a sequía. Las plántulas fueron regadas normalmente desde el momento de la siembra hasta que alcanzaron la etapa 4, después fueron privadas totalmente del agua. Se tomaron muestras de las etapas conforme transcurría el estrés. A. Western de los extractos proteicos de cada muestra, 15 µg de proteína total en cada carril. B. Densitometría de la cantidad detectada para Rubisco activasa (isoformas 43 y 41 kDa).

Plántulas sometidas a Sequía. Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 kDa

A.



B.

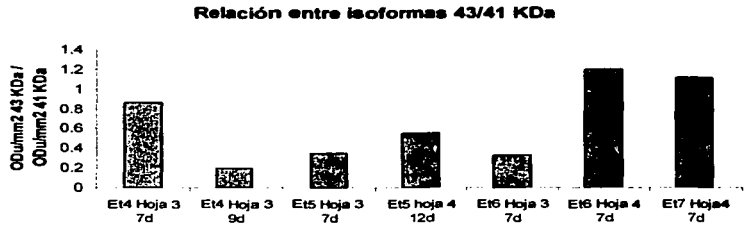


Figura 9. Plántulas crecidas en invernadero y sometidas a sequía extrema .
A. Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41 kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. **B.** Relación entre isoformas 43 kDa/ 41 kDa.

Determinación del grado de Sequía.

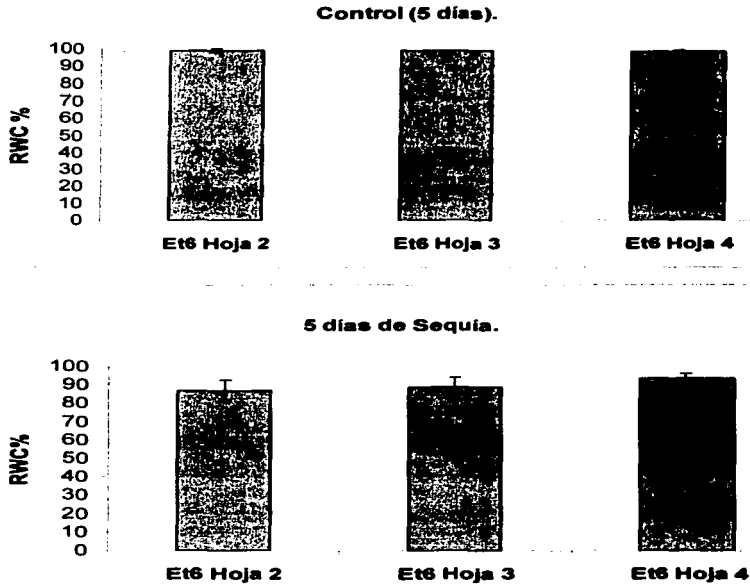


Figura 10. Grado de Sequía representado por el contenido relativo de agua (%RWC) en las hojas (2, 3 y 4) de plántulas en etapa 6 sometidas a sequía por 5 días con las respectivas mediciones del %RWC en hojas del lote control. Se grafica el promedio y la desviación estándar de dos mediciones independientes, para dos hojas diferentes de cada muestra.

Determinación del grado de Sequía.

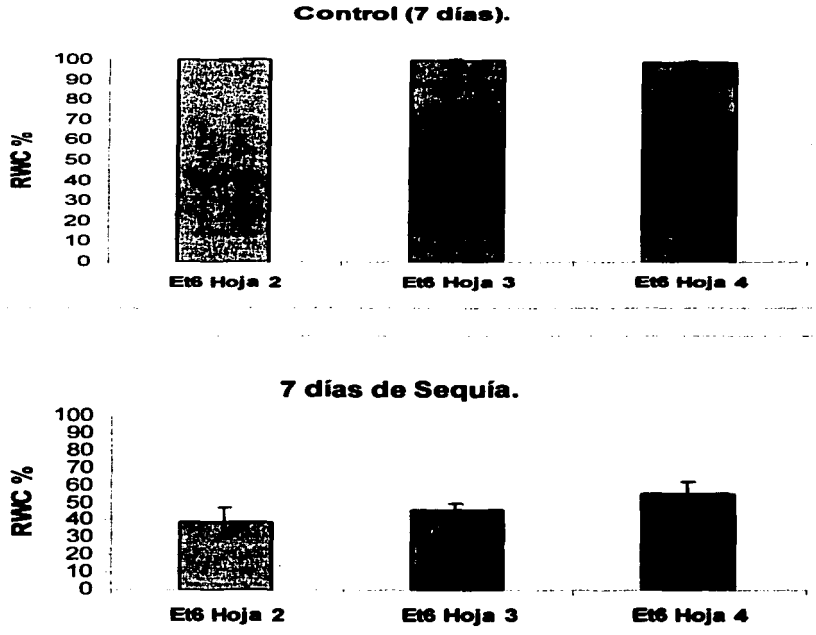


Figura 11. Grado de Sequía representado por el contenido relativo de agua (%RWC) en las hojas (2, 3 y 4) de plántulas en etapa 6 sometidas a sequía por 7 días con las respectivas mediciones del %RWC en hojas del lote control. Se grafica el promedio y la desviación estándar de dos mediciones independientes, para dos hojas diferentes de cada muestra.

7. 2. Efecto del Ácido Indolacético (AIA) en Plántulas de Maíz.

El ácido indolacético como auxina natural tiene diferentes efectos a lo largo del desarrollo de las plantas en eventos específicos. Para observar el efecto de esta fitohormona en la expresión de Rubisco activasa, se realizaron estudios con plántulas de maíz durante su desarrollo hasta alcanzar la etapa 7. De acuerdo a datos obtenidos anteriormente en el laboratorio (Ayala Ochoa; *et al.* 1998) y a trabajos de otros investigadores (Newman, *et al.* 1993) se ha sugerido que los genes que codifican a Rubisco activasa pueden estar altamente regulados por auxinas; de esta manera al analizar la expresión de esta proteína mediante Western blot podemos saber el efecto de una auxina natural, el ácido indolacético, en la expresión de Rubisco activasa.

Desde el momento de la siembra y durante todo el desarrollo, las plántulas fueron regadas con AIA 100 μ M. Una vez que las primeras hojas emergieron, además del riego, las hojas fueron también asperjadas diariamente con esta hormona.

Durante todo el desarrollo, las plántulas tratadas se encontraron en perfectas condiciones al igual que las plántulas control. Sin embargo, las plántulas que fueron tratadas con esta fitohormona, en general, todo su desarrollo fue más rápido, de tal manera que estas plántulas alcanzaron en menos días la etapa 7 y siempre se mantuvieron más grandes en comparación con las plántulas control. (figura 12).

Con respecto a la cantidad de Rubisco activasa se puede apreciar en el Western blot (figura 13) que se presenta un fenómeno similar a lo ocurrido en las plántulas control; a medida que avanza el crecimiento de la planta, la isoforma de 41 kDa incrementa su expresión. Un hecho relevante en estas plántulas tratadas es que desde un principio en la etapa 4 hoja 2 (figura 13 A) hay gran cantidad de la isoforma de 41 kDa, es decir el fenómeno se presenta de manera acelerada, tal es el caso que en la etapa 6 Hoja 4 ya

sólo se detecta señal para la isoforma menor, en cambio en el lote control en esa misma muestra (figura 2) todavía existe una cantidad considerable de la isoforma de 43 kDa.

La cantidad total de Rubisco activasa no se ve afectada por el ácido indolacético, los valores totales oscilan entre 90 y 145 Odu/mm² (Figura 14 A) y existe poca diferencia con respecto a los valores alcanzados en el lote control (100-160 Odu/mm²). El ácido indolacético favorece el rápido desarrollo en las plántulas de maíz, y de manera análoga a lo que ocurre en el envejecimiento, a medida que el tiempo pasa, la cantidad de la isoforma de 41 kDa, aumenta. Como en estas plántulas el crecimiento fue más rápido, la conversión de una isoforma a otra se da en menor tiempo.

Plántulas tratadas con Ácido Indolacético 100 μ M.

Figura 12. Aspecto físico de las plántulas tratadas con ácido indolacético (AIA) 100 μ M. A lo largo de todo el desarrollo se mantuvieron con buen aspecto, aunque su crecimiento fue mucho más rápido con respecto a las plántulas control, por lo que en menos días todas las plántulas alcanzaron la 7a etapa.

Plántulas tratadas con AIA 100 μ M

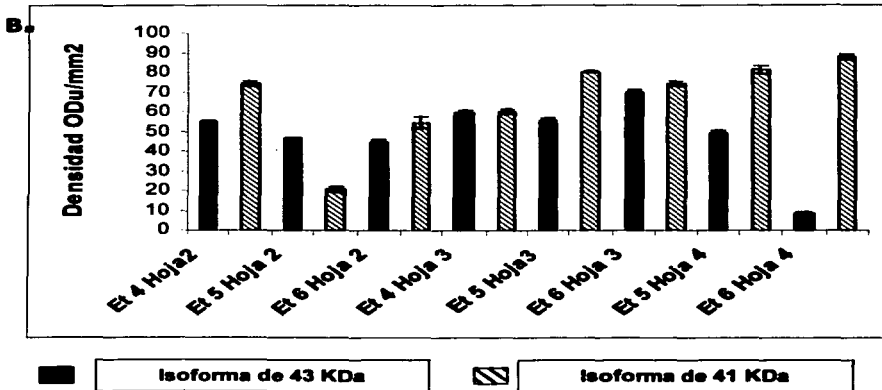
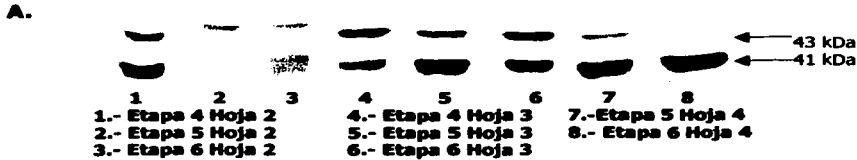
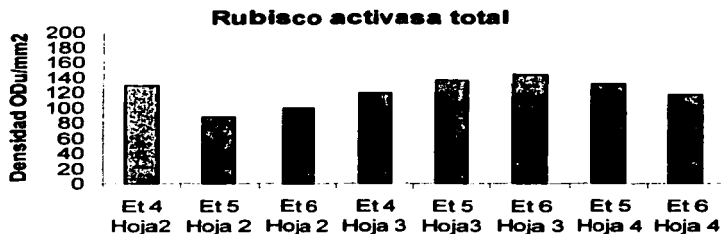


Figura 13. Plántulas crecidas en invernadero regadas y asperjadas desde el momento de la siembra con ácido indolacético (AIA) 100 μ M durante todo el desarrollo de la plántula, muestras de las etapas 4-6; hojas 2,3 y 4. A) Western Blot de extractos proteicos de cada una de las muestras, 15 μ g de proteína total en cada carril; B) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (isoformas 41 y 43 KDa) en cada muestra.

**Plántulas tratadas con AIA 100 μ M.
Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 kDa**

A.



B.

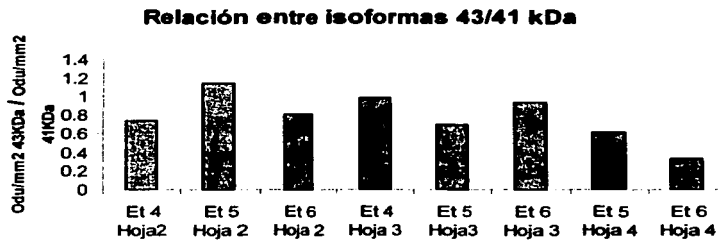


Figura 14. Plántulas crecidas en invernadero y tratadas con ácido indolacético (AIA) 100 μ M.

A. Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. **B.** Relación entre isoformas 43kDa/41 kDa

8. DISCUSIÓN.

El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto de dos tipos de estrés ambiental en la expresión de Rubisco activasa a nivel de plántulas, así mismo determinar el efecto de una auxina natural, el ácido indolacético, aplicado exógenamente a las plántulas de maíz.

De manera general todas las muestras fueron analizadas por Western Blot, detectando la señal para las dos isoformas de Rubisco activasa en maíz utilizando un anticuerpo contra Rubisco activasa de espinaca. La masa molecular de estas isoformas equivale a 43 y 41 kDa respectivamente.

8.1. Cambios en la expresión de Rubisco activasa debido a dos estreses de tipo ambiental: la disminución de la luz y la sequía.

Es importante mencionar que estudios en nuestro laboratorio han arrojado datos importantes que revelan que en maíz existen dos genes que codifican para Rubisco activasa, pero ambos codifican para un mismo polipéptido que corresponde a la isoforma de 43 kDa (Ayala-Ochoa; *et al*, 1998), con base en lo anterior se puede pensar que la aparición de la isoforma de 41 kDa y los cambios entre la relación de ambas isoformas probablemente se deban a cambios postraduccionales.

En lo que respecta a los estreses en las plántulas, en dos de los tres lotes analizados (control, y sequía) se observa un comportamiento similar en la expresión de las isoformas, sólo que en el lote control el efecto es debido al envejecimiento de la planta, y en el caso de las plántulas sometidas a sequía los cambios en la expresión de las isoformas se debe principalmente a los cambios que experimentan las plantas al ser privadas totalmente del agua.

8.1.1 Lote de Plántulas Control.

En el lote control el cambio en la expresión de las dos isoformas se debe principalmente a que la planta está envejeciendo, ya que a medida que las etapas avanzan en edad, la isoforma de 41 kDa aumenta, mientras que la isoforma mayor disminuye notablemente, sin desaparecer por completo. Se han reportado algunos eventos importantes que ocurren durante el envejecimiento de las plantas, que afecta de manera general la traducción de las proteínas y probablemente afecta también la expresión de Rubisco activasa.

La etapa de envejecimiento se considera la etapa final del desarrollo de las hojas, es un proceso activo que se lleva a cabo de manera ordenada y se encuentra regulado genéticamente. Entre los principales eventos que tienen lugar, se encuentra la movilización de nutrientes desde las hojas que están envejeciendo hacia otras partes de la planta, teniendo como consecuencia la muerte eventual de las hojas (Smart, 1994; Buchanan-Wollaston, 1997; Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997; Gan & Amasino, 1997; Nam, 1997; Weaver *et al.*, 1997, 1998; Lers *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998); así mismo la clorofila se ve disminuida, lo mismo ocurre con las proteínas y con la actividad fotosintética (Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997). Es bien sabido que la causa principal de la pérdida de proteína durante el período de envejecimiento es la gran actividad de cisteín-proteasas. En algunas especies como el trigo y el haba, entre las proteínas solubles totales que disminuyen consistentemente se encuentra Rubisco (Khanna-Chopra, *et al.*, 1999; Srivalli & Khanna-Chopra, 1998); así mismo se sabe que las cisteín-proteasas juegan un papel importante en la degradación de la subunidad grande de esta proteína (Bhalla & Dalling 1986, Mae; *et al.*, 1989). Otro fenómeno importante que tiene lugar en las plantas durante el envejecimiento es el estrés oxidativo originado por la acumulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pastori & del Río, 1997; Thompson, *et al.*, 1987). Debido a todos estos cambios que se llevan a cabo durante el envejecimiento de las plantas, es muy probable que para

contrarrestar este efecto, o para continuar con la función de activación de Rubisco activasa en Rubisco, se presente el cambio de relación entre una isoforma y otra. Sabemos que la actividad fotosintética disminuye lo que explicaría que conforme transcurre el tiempo, la cantidad total de Rubisco activasa disminuye (figura 3A), aunque esta disminución no es tan marcada ya que la disminución en la isoforma de 43 kDa es compensada con el aumento de la isoforma de 41 kDa. No sabemos si la isoforma de 41 kDa es capaz de activar por sí sola a Rubisco, pero si sabemos que el aspecto físico de estas plántulas control al final del muestreo, es normal en coloración y turgencia, tal y como lo estaban al inicio del desarrollo dónde se encontraba mayoritariamente la isoforma de 43 kDa. Con esto podemos suponer que el aumento en la isoforma de 41 kDa, se presenta como respuesta a los cambios de la planta a causa del envejecimiento y que de esta manera, a pesar de que la velocidad fotosintética se vea disminuida, la fijación de CO₂ por Rubisco se sigue llevando a cabo, gracias a los cambios presentados en Rubisco activasa.

8.1.2. Plántulas crecidas a baja intensidad luminosa.

En estas plántulas el efecto de las condiciones de baja intensidad luminosa se podía observar en su apariencia. Su desarrollo fue limitado, de tal manera que la mayoría de las plántulas no alcanzaron la etapa 7 como lo hicieron aquellas del lote control. Así mismo, las plantas se observaban acloróticas, debido a la poca luz recibida que no permite sintetizar adecuadamente los pigmentos fotosintéticos.

En cuanto a la expresión de Rubisco activasa, a lo largo del desarrollo de las plántulas y de manera constante, se observó mayoritariamente la isoforma de 43 kDa (figura 5 A), sin embargo, la cantidad total de Rubisco activasa en estas plántulas crecidas en la sombra, con respecto a las plántulas control, es mucho menor, en promedio tres veces menor a la cantidad detectada en las plántulas control. Se ha reportado que en condiciones de oscuridad (Zhang & Portis, 1999), tanto la actividad de las isoformas de

Rubisco activasa como la velocidad fotosintética disminuyen notablemente, lo cual es consistente con la baja cantidad de Rubisco activasa total observada en las plántulas de maíz crecidas en condiciones de baja intensidad luminosa.

Estudios realizados con el fin de esclarecer la regulación de las isoformas de Rubisco activasa debido a cambios en la intensidad de luz, han arrojado importantes hallazgos, entre los cuales se presentan los trabajos de Zhang & Portis, 1999 y Zhang, *et al.* 2002, donde se asegura que la isoforma de 46 kDa encontrada en *Arabidopsis thaliana*, es responsable de la regulación de las dos isoformas de Rubisco activasa (43 y 46 kDa respectivamente) debido a cambios redox. Además se encontró que dos residuos específicos de cisteína (Cys 411 y Cys 392) ubicados en el extremo carboxilo de la isoforma de 46 kDa se encuentran íntimamente relacionados en este tipo de regulación por cambios redox.

En los estudios realizados por Zhang & Portis, 1999; Zhang; *et al.* 2002, se ha afirmado que las especies que no poseen la isoforma de 46 kDa, no pueden ser capaces de ser reguladas por la luz, como por ejemplo el tabaco y la cebada, que sólo poseen la isoforma de 43 kDa o el maíz, que si bien posee dos isoformas, corresponden a pesos moleculares de 43 y 41 kDa y la isoforma de 46 kDa no se encuentra presente. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que existe algún mecanismo de regulación en esta especie, ya que el comportamiento de las dos isoformas a lo largo del desarrollo en las plántulas que crecen en condiciones de baja intensidad luminosa, es diferente comparada con la expresión de estas isoformas en condiciones normales de luz. La expresión de la isoforma de 43 kDa en las plántulas crecidas en baja luz, se mantiene sin un cambio aparente a lo largo del desarrollo y siempre en mayor cantidad con respecto a la isoforma de 41 kDa (figura 5 A). A diferencia del comportamiento observado en las plántulas control, en las cuales a medida que el tiempo transcurre, la cantidad de la isoforma de 41 kDa aumenta (figura 2 A). Con esto se puede decir que una baja intensidad luminosa no favorece el aumento

gradual de la isoforma menor a lo largo del tiempo, ni el cambio de relación entre una isoforma y otra, tal y como ocurre en las plantas control por el efecto del envejecimiento.

El hecho de que la cantidad de la isoforma de 43 kDa no presente cambios a lo largo del desarrollo, nos puede decir que la expresión de esta isoforma no se ve afectada por cambios en la intensidad luminosa. De la misma forma se puede decir que durante el día o bajo condiciones de intensidad de luz normales ($120 \mu\text{mol de fotón s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), se presentan las dos isoformas, es decir la luz promueve el cambio de una isoforma a otra, ya que cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de luminosidad baja ($2.85 \mu\text{mol de fotón s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), se presenta mayoritariamente la isoforma de 43 kDa, un hecho que refuerza lo antes mencionado, es que en las primeras muestras que fueron recolectadas (Etapa 4, hoja 2 y 3 (figura 5 A y B)), cuando habían pasado pocos días de haber comenzado el estrés, es donde se detectan los máximos valores para la isoforma de 41 kDa, en comparación con las demás muestras. A pesar de que en la literatura existen algunos trabajos que tratan de esclarecer la regulación de las isoformas de Rubisco activasa, por efecto de la luz, son trabajos realizados en especies C3, y el maíz es una planta que presenta metabolismo C4, por lo que los datos de la literatura no pueden ser considerados para el análisis de estos resultados.

8.1.3. Plántulas sometidas a Sequía.

En el caso de las plántulas que fueron sometidas a estrés de agua, se observó un fenómeno similar que el presentado en las plántulas control debido al envejecimiento, sólo que en estas plántulas el efecto fue más severo. En este caso la aparición de la isoforma de 41 kDa se relaciona directamente con la pérdida del contenido relativo de agua (% RWC) en las hojas; ya que cuando éste decae hasta un 39% (Etapa 6 Hoja 3, 7 días de estrés, figura 11), se aprecia mayoritariamente la isoforma de 41 kDa, y la isoforma de 43 kDa ha desaparecido por completo (figura 8 A). En tanto en la hoja 2, en esta misma etapa, a los 7 días de estrés y con un mismo valor de RWC de 39% ya

no se detecta señal para ninguna de las dos isoformas, días después las plantas mueren. El efecto de la sequía en la expresión de las dos isoformas de Rubisco activasa es más severo que el envejecimiento, aunque puede ser que el aumento en la isoforma de 41 kDa y la desaparición de la isoforma de 43 kDa se presenta en respuesta a mecanismos similares en ambos acontecimientos.

Durante el período de sequía, un cambio importante que se presenta, es el cierre de los estomas que restringe la entrada de CO₂ en las hojas, lo que trae como consecuencia una disminución en la asimilación de CO₂ (Cornic, 1994). Esto involucra directamente a la actividad de Rubisco y Rubisco activasa, y explicaría que tanto la cantidad como la actividad de Rubisco y Rubisco activasa disminuyan (Cornic, 1994).

A pesar de que no se pudieron obtener todas las muestras a lo largo del desarrollo, en las pocas muestras tomadas, la cantidad total de Rubisco activasa es menor, en comparación con las muestras análogas del lote control, debido a la desaparición completa de la isoforma de 43 kDa. El cambio tan drástico de una isoforma a otra puede ser explicado de varias maneras, por un lado, varios investigadores coinciden en el hecho de que uno de los principales efectos de la disminución del contenido relativo de agua (RWC %) es la disminución de la síntesis de ATP por la enzima ATP sintetasa (Keck & Boyer, 1974; Tezara, *et al.*, 1999; Boyer, *et al.*, 1987), lo que se debe, en gran parte pero no de manera exclusiva, a el aumento en la concentración de iones (especialmente Mg²⁺) en el cloroplasto cuando el RWC cae (Younis, *et al.*, 1979); y que la correlación entre la disminución del contenido de ATP y la caída del RWC es muy fuerte y aparentemente lineal (Tezara, *et al.*, 1999), sugiriendo una pérdida total de la síntesis de ATP cuando el RWC cae completamente. La disminución en la síntesis de ATP, trae como consecuencia una disminución en la velocidad fotosintética, ya que gran parte de las reacciones que se llevan a cabo en la fotosíntesis requieren de fuertes cantidades de ATP para obtener energía. Esta disminución de ATP afecta la síntesis de un múltiples proteínas (Bray, 2002; Lawlor, 2002), lo que explicaría la disminución en la

síntesis de novo de la isoforma de 43 kDa, quedando sólo la isoforma de 41 kDa que, como se mencionó anteriormente, muy probablemente proviene de un procesamiento de la isoforma de 43 kDa. Dentro de este procesamiento se puede incluir el efecto de alguna proteasa específica que corte a la isoforma de 43 kDa en el extremo aminoterminal, para dar origen a la isoforma de 41 kDa. De hecho evidencia en nuestro laboratorio indica que sólo se expresa en maíz, un mRNA para Rubisco activasa, el cual traducido *in vitro* produce sólo el precursor de la isoforma de 43 kDa. Más aún con anticuerpos contra los extremos de las dos isoformas, se sabe que comparten el mismo extremo carboxiterminal, pero no el amino, lo que hace suponer que una proteasa realice este procesamiento postraduccional (Vargas- Suárez, *et al.* No publicado). Los diversos cambios que se presentan en las proteínas bajo condiciones de estrés se pueden relacionar con los efectos de las condiciones celulares alteradas que influyen en la transcripción, traducción y modificaciones post-traduccionales de las proteínas. Datos en la literatura nos presentan que se han encontrado en chícharo péptidos de 60 y 69 kDa con actividad de proteasas específicas en el estrés hídrico, que no aparecen en la etapa del envejecimiento, incluidas dentro del grupo de las cisteín-proteasas (Khanna Chopra; *et al.*, 1999) son consistentes con esta posibilidad.

El hecho de que los valores bajos de RWC provoquen cambios en la estructura de las proteínas explica la importancia de las chaperonas moleculares, las cuales se acumulan en períodos de estrés, incluyendo la sequía (Lawlor, 2002). El ATP es sumamente importante en las funciones de las chaperonas moleculares. El mismo Lawlor, sugiere que la disminución del ATP a niveles bajos de RWC, desajusta la síntesis de proteínas, debido a la inadecuada aportación de energía, aunque puede favorecer el aumento en la síntesis de algunas proteínas como las chaperonas moleculares. Rubisco activasa ha sido estudiada como una posible chaperona molecular, y es probable que los cambios postraduccionales que sufre el péptido de 43 kDa durante el estrés hídrico, sea en respuesta a los cambios y necesidades que experimentan las plantas durante este tipo de estrés.

8.2. Cambios en la expresión de Rubisco activasa debido al estímulo exógeno con auxinas.

Las auxinas son hormonas particulares de las plantas (fitohormonas), compuestos que se han caracterizado por su acción en numerosos eventos fisiológicos en los sistemas vegetales. Entre las auxinas más importantes se encuentran el ácido indolbutírico y el ácido indolacético.

Los estudios acerca de la importancia de las auxinas en la expresión de proteínas han cobrado especial relevancia, de esta manera uno de los propósitos de este estudio fue analizar el efecto del ácido indolacético en la expresión de Rubisco activasa. Se ha encontrado que el RNAm de Rubisco activasa tiene secuencias en la zona 3' UTR que se relacionan con señales de desestabilización del RNAm, las cuales son reguladas por auxinas (Jonson, M.A., *et al.* 2000).

Desde los primeros días después de la siembra, se observó que el desarrollo de las plántulas tratadas con ácido indolacético 100 μ M, presentaron un crecimiento más rápido; en comparación con las plántulas control, las primeras hojas emergieron días antes y así durante todo el tiempo de muestreo, el desarrollo fue más rápido. Sabemos que en general todas las auxinas cumplen funciones específicas, en especial el ácido indolacético presenta un efecto positivo en la iniciación de las raíces y la elongación del coleoptilo y probablemente ésta sea la causa por la que estas plantas crecieron más rápido con respecto a las plántulas control y en general siempre se mantuvieron más grandes hasta llegar a la etapa 7.

Con respecto a la expresión de Rubisco activasa, a medida que el desarrollo de la planta avanzaba se presentó un cambio en la relación de las isoformas, de tal manera que la cantidad de la isoforma de 41 kDa aumenta, mientras que la isoforma de 43 kDa

disminuye, este fenómeno se presenta de manera acelerada en estas plántulas, probablemente debido a su rápido crecimiento, hasta el punto en que en las últimas etapas ya sólo se aprecia la isoforma de 41 kDa, en tanto que en la muestra correspondiente en el lote control (figura 2), aún se presenta la isoforma de 43 kDa.

Estudios realizados con hormonas de plantas para analizar su efecto en la expresión de Rubisco activasa (Komatsu, *et al.* 1996; Roh, K.S., *et al.* 2001), en los que se utilizó ácido giberélico, se ha encontrado que éste en concentraciones muy pequeñas (0.1 μM), provoca un aumento en las cantidades detectadas tanto para Rubisco como para Rubisco activasa, no así en nuestro estudio la cantidad total de Rubisco activasa en las plántulas tratadas con AIA presentan valores semejantes con respecto a la cantidad detectada de Rubisco activasa total en las plántulas control. Estos resultados sugieren que el ácido indolacético, en este nivel del desarrollo (plántula), y con esta concentración de AIA (100 μM), aparentemente no estabiliza los mensajes de Rubisco activasa, como se esperaba, ya que eso produciría mayor cantidad total de Rubisco activasa. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que el ácido indolacético regule los contenidos de Rubisco activasa, en otra etapa del desarrollo de la planta, como en las etapas finales, la espigación y el llenado del grano.

8.3 Rubisco activasa como Chaperona Molecular.

En dos de los tres lotes de plántulas de maíz analizados (control y sequía) en este estudio, se observó que conforme el tiempo transcurre la cantidad de la isoforma de 41 kDa aumenta consistentemente, ya sea debido al envejecimiento o a los cambios que se presentan en las plantas cuando el %RWC disminuye. Estudios en nuestro laboratorio (no publicados) señalan que probablemente la isoforma de 41 kDa se origina a partir de la isoforma de 43 kDa. Este cambio puede estar mediado por la acción de una proteasa específica, que cortara en un sitio determinado el péptido de 43 kDa en el extremo aminoterminal para dar origen a la isoforma de 41 kDa. Esto en base a que anticuerpos

formados contra el extremo carboxiterminal de la proteína reconocen a ambos péptidos de 43 y 41 kDa, no así los anticuerpos del extremo aminoterminal, que sólo reconocen al péptido de 43 kDa. Por otra parte, la especificidad de la proteasa se apoya en el hecho de que no se observa en los Western Blot que se lleve a cabo una hidrólisis inespecífica de las proteínas que resultaría en varias bandas. Por lo tanto, la proteasa, debe responder a señales bien definidas como las que se generan durante el envejecimiento de las plantas o por la disminución del %RWC en las hojas, o bien por otra forma de estrés ambiental. Dado que la aparición de la isoforma de 41 kDa en todos los casos estudiados aquí se observó cuando la planta se encuentra en condiciones adversas, coincide con el comportamiento característico de las chaperonas moleculares, las cuales pueden cambiar su conformación, o bien incrementar la síntesis de alguna de sus isoformas o péptidos asociados, en respuesta a condiciones desfavorables en el medio (Key, *et al.*,1981; Somers, *et al.*,1989).

Es importante mencionar que los cambios observados en Rubisco activasa, podrían no darse solamente para llevar a cabo su función de chaperona en Rubisco, sino que podría también proteger a otras proteínas que son afectadas en condiciones de estrés. Esto se encuentra fundamentado en el hecho de que se ha encontrado a Rubisco activasa en otros compartimentos celulares durante condiciones de estrés, como su asociación a las membranas tilacoidales en respuesta al estrés térmico (Rokka A., *et al.* 2001).

9. CONCLUSIONES.

El análisis de los resultados que se han presentado permite llegar a las siguientes conclusiones:

- a) La presencia de la isoforma de 41 kDa de Rubisco activasa en maíz se encuentra regulada por factores de estrés ambiental, como la sequía y la disminución de la luz; así también como por el efecto del envejecimiento en el desarrollo de las plántulas.
- b) El ácido indolacético a una concentración de 100 μM , no genera un aumento en la cantidad total de Rubisco activasa; sin embargo permite que las plántulas se desarrollen más rápidamente, originando la pronta aparición de la isoforma de 41 kDa.
- c) El cambio de una isoforma de Rubisco activasa a otra puede ser mediado por una proteasa específica que corta a la isoforma de 43 kDa, para dar origen a la de 41 kDa, en respuesta a diversas condiciones de estrés.
- d) Los cambios presentados en Rubisco activasa en respuesta a las diversas condiciones de estrés y al estímulo con auxinas es congruente con las características de Rubisco activasa como chaperona molecular, ya que el origen de la isoforma de 41 kDa pudiera presentarse para proteger no sólo a Rubisco sino a otras proteínas que sufren alteraciones debido a las condiciones adversas.

Apéndice

Efecto del ácido indolacético en la expresión de Rubisco activasa a nivel de plantas adultas.

A.1 Introducción.

El estado reproductivo del maíz incluye el período del llenado de grano, el cual ocurre días después que se ha llevado a cabo la espigación; este evento tiene especial importancia porque es el momento donde se requiere de una demanda fuerte de nutrientes para la formación de la mazorca; es así que en esta etapa de las plantas ha sido de vital importancia analizar el comportamiento de Rubisco y Rubisco activasa, ya que estas dos proteínas son importantes en la fotosíntesis y por lo tanto esenciales para la obtención de nutrientes y energía. Existen diferencias en la regulación del metabolismo de las plantas a lo largo del desarrollo; así, de forma paralela a los estudios con plántulas, en los que se analizó la expresión de Rubisco activasa en respuesta a diversas condiciones, se tuvo la oportunidad de llevar a cabo estudios con plantas adultas, en los que se analizó el efecto del ácido indolacético en este momento crucial del desarrollo de la planta.

Se sabe que durante el período de llenado de grano, la actividad de Rubisco, alcanza niveles muy altos (Loza Tavera, *et al.*, 1987) y que este fenómeno se debe a la capacidad de Rubisco activasa para activar a Rubisco, es decir se ha encontrado que tanto la cantidad como la actividad de Rubisco activasa es también es mayor durante el período de llenado de grano (Martínez Barajas, *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha relacionado a Rubisco activasa con la productividad, ya que en estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio con poblaciones mejoradas por ciclos de selección masal de la variedad Zacatecas 58 (Z_0 , Z_5 , Z_{10} , Z_{15} , Z_{20} , Z_{23}) mostraron que en la población mejorada de 23 ciclos agrícolas (Z_{23}) se presenta la

mayor actividad de Rubisco debido a que el contenido de Rubisco activasa es mayor (Morales A., *et al.*, 1999).

Tomando como premisa estos experimentos y otros estudios realizados en nuestro laboratorio (Ayala Ochoa, *et al.*, 1998), en donde se han encontrado dos tipos de clonas de Rubisco activasa las cuales difieren en las regiones 3'UTR por la presencia de elementos DST (elementos de desestabilización). Estos elementos han sido identificados como regiones conservadas en los 3'UTR de los transcritos inestables SAUR (small auxin-up RNA), (Newman, *et al.* 1993), que pueden ser estabilizados por el efecto de auxinas. Dados estos antecedentes se realizó un breve estudio acerca del efecto del ácido indolacético en la expresión de Rubisco activasa a nivel de plantas adultas en estado reproductivo que a continuación se presenta.

A.2 Material Biológico.

Estos experimentos en plantas en estado reproductivo, se realizaron con plantas de maíz (*Zea mays L.*), de las poblaciones Zacatecas 58 Original (Z₀) y el ciclo 17 (Z₁₇) de un programa de mejoramiento por selección masal para incrementar el rendimiento de grano, que amablemente fueron proporcionadas por el Dr. José Molina Galán del centro de Genética del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

Una vez llevada a cabo la espigación y dentro del período de llenado de grano, las plantas cultivadas en el campo experimental del Colegio de Postgraduados fueron sometidas a dos tratamientos por aspersión con ácido indolacético (AIA) 200 µM, con un período de quince días entre un tratamiento y otro; una semana después de cada tratamiento se tomaron tres hojas seleccionadas aleatoriamente del lote plantado, las cuales después de cortar los extremos se combinaron en un mismo paquete para poder constituir así una muestra representativa. Las hojas utilizadas fueron la inmediata superior a la mazorca, denominada hoja bandera y la segunda hoja superior, denominada en adelante hoja superior.

A.2.1 Lotes Control.

El lote control de cada población estaba constituido por 40 plantas, las cuales fueron regadas y cultivadas de manera normal en el campo experimental del Colegio de Postgraduados. Se encontraban ubicadas en lados opuestos de las plantas en tratamiento para evitar que por accidente fueran asperjadas con AIA. Las muestras fueron colectadas en los mismos tiempos que se colectaron las hojas de los lotes en tratamiento.

A.2.2 Tratamiento AIA 200 μM

De la misma manera que el lote control, los lotes tratados estaban constituidos por 40 plantas, que fueron asperjadas con AIA 200 μM . El primer tratamiento se aplicó días después de transcurrida la espigación, quince días después se aplicó un refuerzo de AIA a la misma concentración. Fueron tomadas muestras de tres hojas bandera, y tres hojas superiores una semana después del primer tratamiento y una semana después del refuerzo, los extremos de cada hoja fueron cortados y cada muestra de tres hojas fue homogenizada para conformar una muestra representativa y realizar los ensayos pertinentes.

A.3. Métodos.

Las muestras fueron procesadas de igual manera que en los experimentos de las plántulas (Ver capítulo 6), desde la homogenización de las muestras hasta las densitometrías, la expresión de Rubisco activasa fue analizada por Western blot, la única diferencia con respecto a la electroforesis SDS-PAGE, es que en el caso de los extractos de las plantas adultas, en los geles de acrilamida se cargaron 30 μg de proteína total cuantificada por el método de Bradford. En el Western Blot, las membranas de nitrocelulosa que contenían las proteínas de los extractos, se hicieron reaccionar con un primer anticuerpo, diluido 1:8000, dirigido en contra de las dos isoformas encontradas en espinaca, que por analogía reaccionan con las dos isoformas

correspondientes en maíz (43 y 41 kDa, respectivamente) y para el revelado se utilizó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:2000. La reacción fue visualizada por fluorescencia. (Sistema ECL, Amersham)

A.4. Resultados.

Se utilizaron dos poblaciones de la variedad Zacatecas 58, la población original (Z_0) y la población 17 (Z_{17}); esta última ha sido sometida a un proceso de 17 ciclos de selección masal a partir de la población original. Para cada población se tuvo un lote control y un lote tratado con ácido indolacético (AIA) 200 μ M. Con estos ensayos se evaluó el efecto de esta fitohormona en las plantas de maíz en este estadio del desarrollo

A.4.1. Población Z_0 .

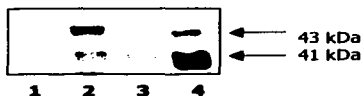
A.4.1.1 Lote Control.

Comparando las dos hojas a lo largo del tiempo del experimento, se puede apreciar a simple vista en el Western Blot y la gráfica de la figura A1, que la expresión de Rubisco activasa es mayor siempre en la hoja bandera con respecto a la hoja superior. Esto se corrobora también con la gráfica que representa los valores totales de Rubisco activasa (figura A2, (a)): al hacer la densitometría se observa que la hoja bandera alcanza un valor máximo de 1474 Odu/ mm^2 , mientras que la hoja superior en el segundo muestreo logra alcanzar tan sólo 926 Odu/ mm^2 .

La relación entre las isoformas (43 kDa /41 kDa) cambia entre el primer y el segundo muestreo en la hoja bandera; ya que en las muestras del segundo muestreo, la isoforma de 41 kDa ha incrementado de tal manera su expresión, que da lugar a que el valor de la relación entre las dos isoformas se invierta favoreciendo a la isoforma menor (figura A2, (b)). En la hoja superior se puede notar que conforme transcurre el tiempo la cantidad total de Rubisco activasa aumenta y por ello, a pesar de que la isoforma de 41 kDa también aumenta su expresión en el segundo muestreo, no genera un cambio tan drástico en la relación entre las isoformas, como en el caso de la hoja bandera.

Población Z0. Lote Control.

(a)



- 1.- Hoja Superior 1er muestreo.
- 2.- Hoja Bandera 1er muestreo.
- 3.- Hoja Superior 2do muestreo.
- 4.- Hoja Bandera 2do muestreo.

(b)

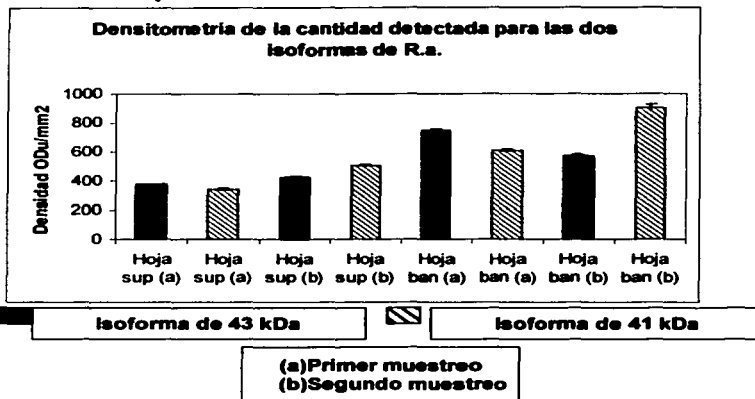
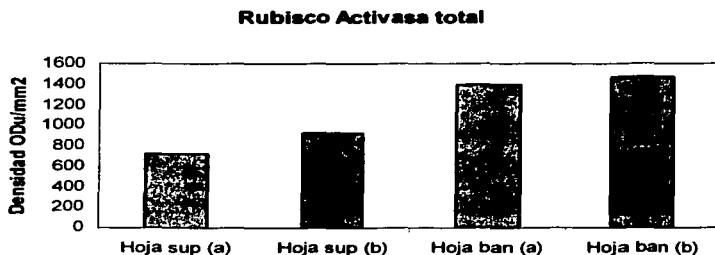


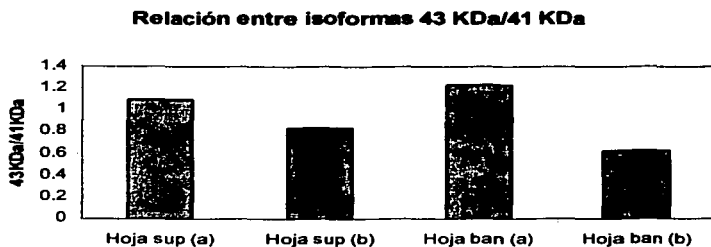
Figura A1. Plantas adultas. Población Zacatecas Original (Z0). Lote control. Las muestras fueron tomadas durante días después de la espigación y durante el período de llenado de grano. Las muestras corresponden a la hoja bandera y a la hoja superior de dos muestreos, entre los cuales transcurrieron 15 días. (a) Western Blot de los extractos proteicos de cada muestra, 30 μ g de proteína total en cada carril. (b) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (2 isoformas 43 y 41 kDa) en cada muestra.

Población Z0. Lote Control.
Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 KDa

(a)



(b)



(a) Primer muestreo
(b) Segundo muestreo

Figura A2. Plantas adultas. Población Zacatecas Original (Zo). Lote control.
 (a) Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41 kDa + 43 kDa)
 detectada en cada muestra. (b) Relación entre isoformas 43 kDa/41 kDa.

A.4.1.2. Lote tratado con AIA 200 μ M.

En este ensayo sólo se contaron con dos muestras que corresponden a las hojas bandera del primer y segundo muestreos (Figura A3). Las muestras de las hojas superiores se dañaron debido a la transportación y a las condiciones en las que se almacenaron las muestras desde el Colegio de Postgraduados hasta el laboratorio, de tal manera que no se recuperó tejido suficiente para realizar los extractos.

En la muestra de la hoja bandera, la cantidad total de Rubisco activasa (figura A4, (a)), presenta un valor de 1450 Odu/mm² en el primer muestreo, y en la muestra siguiente del segundo muestreo, disminuye su valor hasta 1088 Odu/mm², contrariamente a lo observado en las muestras control, donde en el segundo muestreo alcanzó el máximo detectado para Rubisco activasa (figura A2, (a)). Estas diferencias en las cantidades totales de Rubisco activasa se debieron a los cambios en la expresión de las isoformas que se presentaron en este lote tratado y que se representan en el Western Blot y la gráfica de la figura A3. En las muestras de la hoja bandera la cantidad total de Rubisco activasa se ve disminuida de la primera muestra a la segunda, debido a que en el segundo muestreo la isoforma de 43 kDa disminuye su expresión (de 750 Odu/mm² en el primer muestreo a 570 Odu/mm² en el segundo (figura A3, (b)) y la isoforma menor aumenta su expresión notablemente. Por el hecho de que la isoforma de 43 kDa disminuye de manera significativa con respecto al aumento de la expresión de la isoforma de 41 kDa, la relación entre las dos isoformas de un muestreo a otro se invierte a favor de la isoforma de 41 kDa (figura A4, (b)) alcanzando un valor de 0.55, que en el primer muestreo era cercano a la equivalencia entre las dos isoformas (0.92). Tanto en las hojas bandera del lote control y del lote tratado con AIA, la relación entre las isoformas (43 kDa/ 41 kDa) presentan el mismo comportamiento; es decir este valor disminuye en el segundo muestreo debido a el aumento en la isoforma de 41 kDa, aunque se presenta de manera más pronunciada en el lote control. La cantidad total de Rubisco activasa, en el lote tratado, en la hoja bandera, disminuyó de un muestreo a otro, mientras que en el control, la cantidad total de Rubisco activasa aumentó.

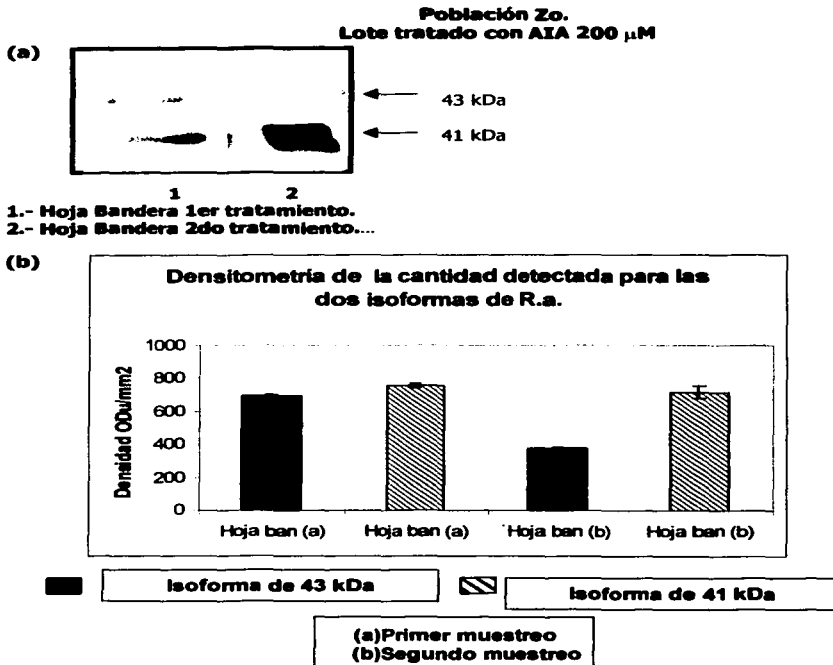


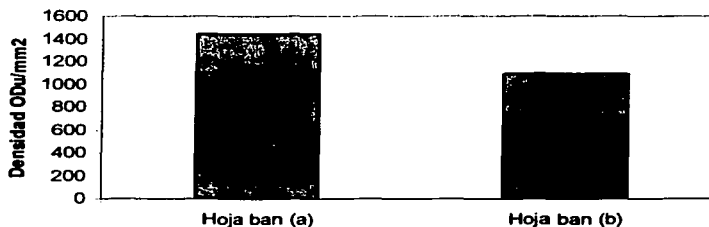
Figura A3. Plantas adultas. Población Zacatecas Original (Zo). Lote tratado con ácido indolacético (AIA) 200 μ M. Las muestras fueron tomadas muestras días después de la espigación y durante el periodo de llenado de grano. Las muestras corresponden a la hoja bandera y a la hoja superior de dos muestreos, realizados días después de aplicados dos tratamientos respectivamente.

(a) Western Blot de los extractos proteicos de cada muestra, 30 μ g de proteína total en cada carril. (b) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (2 isoformas 43 y 41 kDa) en cada muestra.

**Población ZO. Lote Tratado con AIA 200 μ M.
Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 KDa**

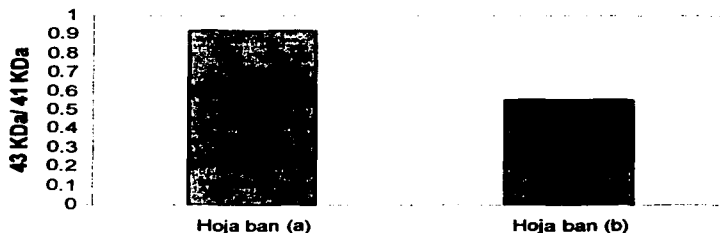
(a)

Rubisco activasa total.



(b)

Relación entre isoformas 43 KDa/41KDa



(a) Primer muestreo
(b) Segundo muestreo

Figura A4. Plantas adultas. Población Zacatecas Original (Zo). Lote tratado con ácido indolacético (AIA) 200 μ M.

(a) Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41 kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. (b) Relación entre isoformas 43 kDa/41 kDa.

79

A.4.2 Población Z17.

A.4.2.1 Lote control.

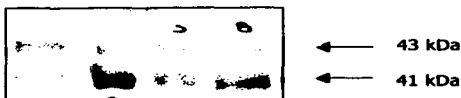
La cantidad total de Rubisco activasa detectada (figura A6, (a)) en ambas hojas disminuye conforme el tiempo transcurre y los máximos valores los presentan las muestras de las hojas bandera igual que en la población original.

De igual manera que en la población original, se analizó la expresión de Rubisco activasa, a lo largo del estudio, mediante Western blot, y con ayuda de las gráficas que representan los valores detectados en la densitometría para las dos isoformas (figura A5). En el primer muestreo en la hoja superior se puede apreciar que las dos isoformas se encuentran presentes en cantidades similares (431 Odu/mm² para la isoforma de 43 kDa, y 396 Odu/mm² para la de 41 kDa); en el segundo muestreo la cantidad de la isoforma menor aumenta un poco para alcanzar 411 Odu/mm² y por el contrario la isoforma mayor presenta menor cantidad con respecto al primer muestreo. Por tanto la relación entre éstas es menor que la unidad (0.7).Figura A6, (b).

En el caso de las muestras de la hoja bandera, en el primer muestreo, de manera excepcional se encuentra mayoritariamente la isoforma de 41 kDa con respecto a la isoforma mayor (figura A5, (a) y (b)) y una vez que transcurre el tiempo, la cantidad de la isoforma de 41 kDa disminuye, mientras que la isoforma de 43 kDa se mantiene más o menos igual. Dados estos valores, la relación entre las isoformas en ambas muestras favorece a la isoforma menor (0.47 y 0.56 para el primer y segundo muestreo respectivamente) (figura A6, b)

Población Z17. Lote Control.

(a)



- 1.- Hoja Superior 1er muestreo.
- 2.- Hoja Bandera 1er muestreo.
- 3.- Hoja Superior 2do muestreo.
- 4.- Hoja Bandera 2do muestreo.

(b)

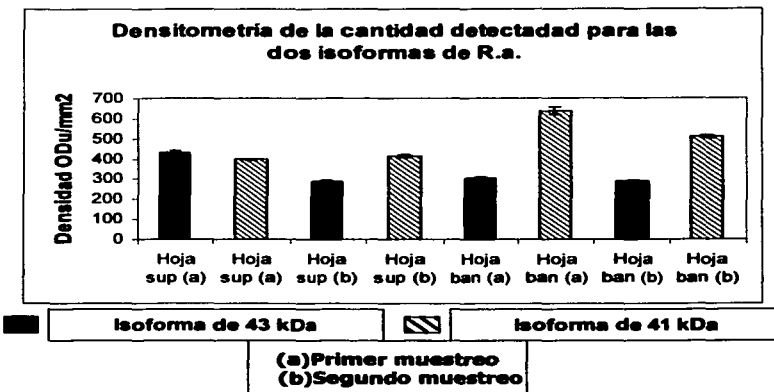
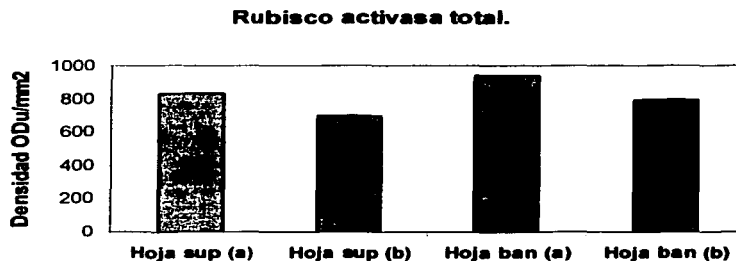


Figura A5. Plantas adultas. Población Zacatecas 17 (Z17). Lote control. Las muestras fueron tomadas muestras días después de la espigación y durante el período de llenado de grano. Las muestras corresponden a la hoja bandera y a la hoja superior de dos muestreos, entre los cuales transcurrieron 15 días.

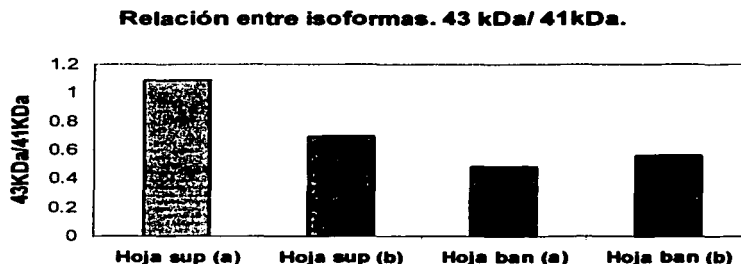
(a) Western Blot de los extractos proteicos de cada muestra, 30 µg de proteína total en cada carril. (b) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (2 isoformas 43 y 41 kDa) en cada muestra.

Población Z17. Lote Control.
Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 kDa

(a)



(b)



(a) Primer muestreo
 (b) Segundo muestreo

Figura A6. Plantas adultas. Población Zacatecas 17 (Z17). Lote control.
 (a) Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. (b) Relación entre isoformas 43kDa/41 kDa .

A.4.2.2. Lote tratado con AIA 200 μ M.

El efecto del ácido indolacético en estas muestras fue contundente a simple vista, a pesar de que las hojas físicamente se observaban igual que las plantas control, a nivel de expresión de Rubisco activasa si ocurrieron importantes alteraciones.

La proteína detectada mediante Western Blot de los extractos de estas muestras se representa en la figura A7, (a) y gráficamente los valores de la densitometría para cada isoforma en la figura A7, (b). En la primera muestra de la hoja superior después del primer tratamiento, sólo se aprecia la isoforma de 43 kDa y tan sólo una mínima señal para la isoforma de 41 kDa que alcanzó tan sólo valores de 80.20 Odu/mm². En tanto como ya vimos en el lote control para esta misma muestra se observan las dos isoformas casi en cantidades equivalentes (figura A5 (a) y (b)). En la siguiente muestra para esta misma hoja, una vez que la planta ya ha sido sometida a dos tratamientos con la auxina, se puede apreciar en el Western blot (figura A7, (a)) que prácticamente no se presenta señal para ninguna de las dos isoformas, y creemos que pudo ser que las hojas se encontraban muy dañadas debido a la transportación y al almacenamiento, como no fue posible reproducir estos experimentos, se decidió no tomar en cuenta este dato.

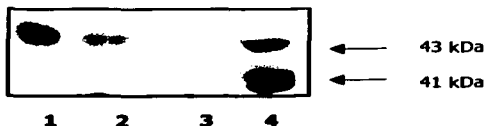
En el caso de las muestras de la hoja bandera, en el primer muestreo al igual que en la hoja superior se observa una señal muy marcada para la isoforma de 43 kDa que representa valores de densidad óptica de 380, mientras que para la isoforma de 41 kDa apenas se detectan 110 Odu/mm². En la muestra siguiente, cuando la planta ya ha sido sometida a dos tratamientos con AIA, sorpresivamente la cantidad total de Rubisco activasa aumenta con respecto a la muestra anterior de 492 Odu/mm² en el primer muestreo a 1195 Odu/mm² en el segundo muestreo (figura A8, (a)); esto se debe principalmente a que la expresión de las dos isoformas se ve aumentada y en mayor

proporción aparece la isoforma de 41 kDa, de tal manera que representa casi el doble de la cantidad de la isoforma de 43 kDa (relación entre isoformas en esta muestra: 0.64, 43 kDa/41 kDa, Figura A8 (b))

Con respecto a las muestras del lote control para la hoja bandera, las cantidades totales para Rubisco activasa en la primera muestra son menores al control de 941 Odu/mm² (figura A6, (a)) a 492 Odu/mm² con AIA (figura A8, (a)). En el segundo muestreo ocurre lo contrario, el lote control muestra 793 Odu/mm² (figura A6, (a)), mientras que en el lote tratado la cantidad total de Rubisco activasa en la hoja bandera alcanza un máximo de 1194 Odu/mm² (figura A8, (a)).

Población Z17 tratada con AIA 200 μ M

(a)



- 1.- Hoja Superior, 1er Tratamiento.
- 2.- Hoja Bandera, 1er Tratamiento.
- 3.- Hoja Superior, 2do Tratamiento.
- 4.- Hoja Bandera, 2do Tratamiento .

(b)

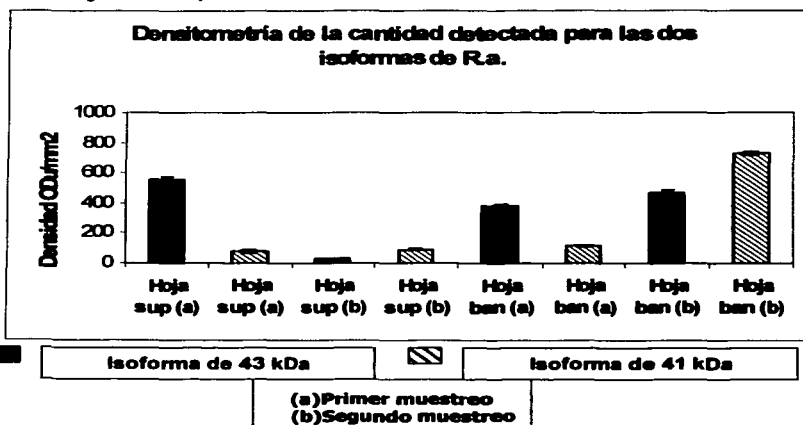
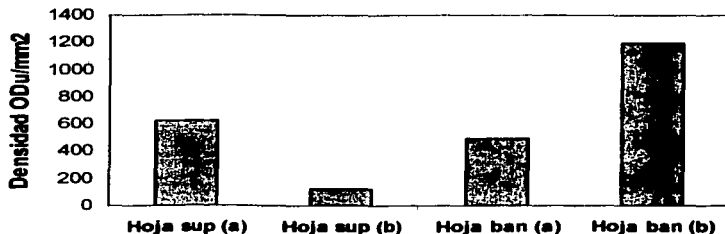


Figura A7. Plantas adultas. Población Zacatecas 17 (Z17). Lote tratado con ácido indolacético (AIA) 200 μ M. Las muestras fueron tomadas días después de la espigación y durante el período de llenado de grano. Las muestras corresponden a la hoja bandera y a la hoja superior de dos muestreos, realizados días después de aplicados dos tratamientos respectivamente. (a) Western Blot de los extractos proteícos de cada muestra, 30 mg de proteína total en cada carril. (b) Densitometría de la cantidad detectada de Rubisco activasa (2 isoformas 43 y 41 kDa) en cada muestra.

**Población Z17. Lote tratado con AIA 200 μ M.
Rubisco activasa total y Relación entre isoformas 43/41 kDa**

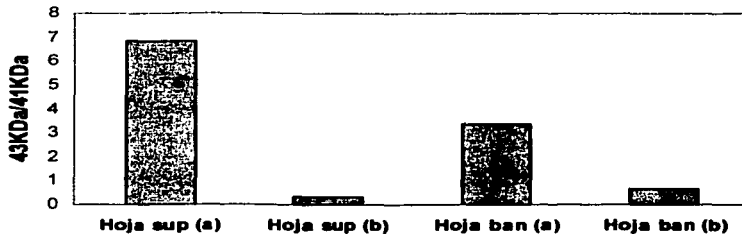
(a)

Rubisco activasa total.



(b)

Relación entre isoformas. 43 kDa/41 kDa



(a) Primer muestreo
(b) Segundo muestreo

Figura A8. Plantas adultas. Población Zacatecas 17 (Z17). Lote tratado con ácido indolacético (AIA) 200 μ M.

a) Densitometría de la cantidad total de Rubisco activasa (41 kDa + 43 kDa) detectada en cada muestra. (b) Relación entre isoformas 43 kDa / 41 kDa.

A.5. Discusión.

El comportamiento de las isoformas en el lote control de la población original (Z_0) es similar al presentado en las plántulas; conforme el tiempo transcurre, la cantidad de la isoforma de 41 kDa aumenta y la de 43 kDa disminuye. Este fenómeno se observa de manera más contundente en la hoja bandera, ya que se presenta una inversión en la relación entre las isoformas (figura A2, (b)). La hoja bandera es la hoja inmediata a la mazorca, y contribuye mayoritariamente al llenado de grano. Durante todo el estudio en el lote control de la población Z_0 , las cantidades detectadas de Rubisco activasa en las muestras de las hojas bandera siempre fueron mayores con respecto a las cantidades detectadas en las muestras de las hojas superiores.

El efecto del ácido indolacético en la población Z_0 provocó que la cantidad de Rubisco activasa en las muestras de las hoja bandera disminuyera conforme avanzó el estudio, y que en general la cantidad total de Rubisco activasa en la hoja bandera fueran siempre menores con respecto a los niveles detectados para la hoja superior; en ambos situaciones sucedió de manera contraria al comportamiento del lote control.

El efecto del AIA fue mayor en la hoja bandera, ya que la hoja superior no presenta cambios significativos con respecto a las muestras correspondientes en el lote control; en tanto en la hoja bandera desde la primera muestra tomada la cantidad de la isoforma de 41 kDa es similar a la cantidad de la de 43 kDa, así en la segunda muestra, a pesar de que el aumento de la isoforma de 41 kDa no es tan grande si hay una disminución en la isoforma de 43 kDa, esta es la principal causa de la disminución de la cantidad total de Rubisco activasa en la hoja bandera debido al efecto del AIA. Con base en lo anterior podemos decir que en la población original (Z_0), el ácido indolacético favorece el aumento de la isoforma de 41 kDa. A partir de la teoría que postula que esta isoforma proviene de la isoforma mayor (Datos no publicados, Martín Vargas Suárez), se explica la disminución en la expresión de la isoforma de 43 kDa que se presenta en la

segunda muestra de la hoja bandera, después de transcurridos dos tratamientos con AIA.

La población Z₁₇, que ha sido, sometida a 17 ciclos de mejoramiento, presenta mayor productividad con respecto a la población original y en general las plantas son más grandes y con un rendimiento de grano mayor, si se sostiene que el cambio de una isoforma a otra tiene que ver con los eventos del envejecimiento y del desarrollo como se postuló en el capítulo 7 para las plántulas, es posible que lo mismo ocurra a este nivel de las plantas y al ser poblaciones mejoradas, y tener un desarrollo acelerado o mejorado, se promueva la aparición de la isoforma de 41 kDa.

El caso de la hoja bandera en la población Z₁₇ tratada con AIA, presentó un comportamiento interesante: después de aplicados dos tratamientos, no sólo hay un aumento de la isoforma de 41 kDa, como en el lote control, sino que también hay un aumento considerable de la isoforma de 43 kDa, lo que da origen a un aumento en la cantidad total de Rubisco activasa. Esto quiere decir que a pesar de que parte de la isoforma de 43 kDa, se convierte en la isoforma de 41 kDa, el RNAm de Rubisco activasa probablemente fue estabilizado por el AIA, y así permitir síntesis *de novo* de la isoforma de 43 kDa, que permite que los niveles de esta isoforma se mantengan en cantidades considerables a pesar de que el tiempo ha transcurrido.

A.6. Conclusiones.

- a) El ácido indolacético afecta la expresión de Rubisco activasa; especialmente promoviendo la aparición de la isoforma de 41 kDa. Este efecto fue más evidente en la población Zo. Sin embargo en la población Z₁₇, además de presentarse un aumento en la isoforma de 41 kDa, también hay un aumento en la de 43 kDa, lo que da origen a un aumento en la cantidad total de Rubisco activasa en esta población.

- b) El aumento en la cantidad total de Rubisco activasa, después del tratamiento con AIA, en la población Z17, probablemente se deba a una estabilización del RNAm que codifica a Rubisco activasa, como se ha postulado en otros trabajos (Newman, et al. 1993; Jonson, 2000)
- c) En ambas poblaciones el efecto de esta auxina natural, fue más significativo en las muestras de la hojas bandera; ya que por ser la hoja inmediata superior a la mazorca, juega un papel importante en el período del llenado de grano de la planta.
- d) Estos resultados deben considerarse como preliminares, debido a que hace falta reproducirlos para confirmar el efecto del AIA en las plantas adultas. Sin embargo, son interesantes debido a la posibilidad que presentan de poder manipular la concentración y/o la relación de los péptidos de Rubisco activasa por medio de la aplicación de AIA a la planta, y con ello afectar la productividad de la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anfinsen, C.B., (1973). "Principles that govern the folding of protein chains". *Science*, 181:223-257
- Ayala-Ochoa A., Loza-Tavera H., Sánchez de Jiménez E., 1998. "A cDNA from maize encoding Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase". (Accession No. AF084478) (PGR98-207). *Plant Physiology* 118, 1535
- Bhalla, P.L., y Dalling, M.J. (1986). *Journal Plant Physiology*. 122: 289-302
- Barr, H.D. and Weatherley, P.E. (1962). "A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves". *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413-428
- Berry, J.O., Nikolau, B.J., Carr, J.P., Klessig, D.F., (1985). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons". *Molecular Cell Biology*, 5:2238-2246.
- Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A.R., Gerats, A. G. M. (1989). "Flavonoids synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes". *Plant Molecular Biology*. 13: 491-502.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G. (1995). "Adaptations to environmental stresses." *Plant Cell*, 7: 1099-1111
- Boyer, J.S., Ort, D.R., Ortiz-López, A. (1987) "Photophosphorylation at low water potentials". *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*. 6: 69-73

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M., (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Rev. Biochem.* 72:248-254
- Bray, E.A. (2002). "Classification of genes differentially expresses during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data". *Annals of Botany* 89: 803-811
- Brock, T.G., Kaufman, P.B., (1988). "Altered growth response to exogenous auxin and gibberellic acid by gravistimulation in pulvini of *Avena sativa*". *Plant Physiology*.87:130-3
- Buchanan, B.B. (1991). Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis : the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development.*Arch. Biochem. Biophys.* 288 (1) : 1-9.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997). "The molecular biology of leaf senescence". *J. Exp. Biol.* 307, 181-199.
- Buchanan-Wollaston, V., and Ainsworth, C. (1997). "Leaf senescence in *Brassica napus*: Cloning of senescence-related genes by subtractive hybridization". *Plant Mol. Biol.* 33, 821-834.
- Cleland WW, Andrews TJ, Gutteridge S, Hartman FC, Lorimer GH. (1998). "Mechanism of Rubisco: The Carbamate as General Base". *Chemical Review.* April 2;98(2):549-562
- Close, T.J., Festoon, R.D., Yang, A., Asghar, R., De Manson, D.A., Crone, D.E., Meyer, N.C., Moonan, F. (1993). Dehydrin: The protein. En: Close, T.J., Bray, E.A. *Plant responses to cellular dehydration during enviromental stress. Current topics in Plant Physiology.* 104-118.

Cornic, G. 1994. "Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis". *Photoinhibition of Photosynthesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 297-313.

Crafts-Brandner, S.J., van de Loo, F.J. and Salvucci, M.E. (1997). "The two forms of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase differ in sensitivity to elevated temperature. *Plant Physiology*. 114: 439-444

Downton, W.J.S., Bjorkman, O., Pike, C.S., (1980). "Consequences of increases atmospheric concentrations of carbon dioxide for growth and photosynthesis of higher plant", En GI Pearman, editorial, Carbon Dioxide and Climate: Australian Research, Australian Academy of Science, Canberra, p. 143-151

Echard, N.A. and Portis, A.R., Jr (1997). "Heat denaturation profiles of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and Rubisco activase and the inability of Rubisco activase to restore activity of heat-denatured Rubisco". *Plant Physiology*. 113:243-248

Ellis, R.J., and van der Vies S.M., (1991). "Molecular chaperones". *Annu. Rev. Biochem.* 60:321-347

Ferreira, B.R., and Shaw, M.N., (1989). "Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds." *Planta* 179:456-465

Flexas, J., Medrano, H.(2002). "Drought inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited". *Annals of Botany*. 89: 183-189

Gan, S., and Amasino, R.M. (1997). "Making sense of senescence". *Plant Physiology*. 113, 313-319.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Giménez, C., Mitchell, V.J., Lawlor, D.W., (1992). "Regulation of Photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress". *Plant Physiology* 98: 516-524.

Gunasekera, D.; Berkowitz, G.A., (1993). "Use of transgenic plants with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. *Plant Physiology*. 103: 629-635.

Gutteridge, S., Parry, M.A.J., Burton, S., Reys A.J., Mudd A., Feeney, J., Servaites, J., Pierce, J., (1986). "A nocturnal inhibitor of carboxylation in leaves". *Nature* 324:274-276

Huber, S.B., Huber, J.L., (1996). "Role and Regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:851-859.

Ibarra, C.J., Villanueva V.C., Molina G.J., Sánchez de J. E., (1988). "Proline Accumulation as a Symptom of Drought Stress in Maize: A Tissue Differentiation Requirement". *Journal of Experimental Botany*. 39 (204):889-897

Johnson, M.A., Pérez-Amador, M.A., Lidder, P., Green, P. (2000). "Mutants of Arabidopsis defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway". *Proc. Natl Acad Sci USA*. 97:13991-13996.

Kaiser, W.M., Foster, J. (1989). "Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiology* 91: 970-974.

Keck, R.W., Boyer, J.S., (1974). "Chloroplast response to low leaf water potentials. III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. *Plant Physiology* 53:474-479.

Khanna-Chopra, R., Srivalli, B. y Ahlawat, Y. S. (1999) "Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 255: 324-327.

Kim Jae-Yean., Mahé A., Brangeon J., Prioul J.L., (2000). "A Maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/Tissue specificity and diurnal modulation of expression". *Plant Physiology*, 124: 71-84

Komatsu, S., Masuda, T., Hiranó, H., (1996). "Rice gibberellin-binding phosphoprotein structurally related to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase". *FEBS letters*, 384: 167-171.

Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4." *Nature*, 227:680-685.

Law, D.R., Crafts-Brandner, S.J.,(2001). "High temperatures stresses increases the expresion of wheat leaf Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein". *Archieves of Biochemistry and Biophysics*. 386 (2): 261-267.

Lawlor, D.W. (2002). "Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP".*Annals of Botany* 89: 871-885.

Lawlor, D.W., Cornic, G., (2002). "Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants". *Plant, Cell and Environment*. 25: 275-294.

Lers, A., Khalchitski, A., Lomaniec, E., Burd, S., and Green, P.J.(1998). "Senescence-induced RNases in tomato". *Plant Molecular Biology*. 36, 439-449.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Loza, T. H., Martínez, B. E., Sánchez de Jiménez E., (1990). "Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase expresión in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations. *Plant Physiology* 93:541-548
- Mae, T., Kamei, C., Funaki, K., Miyadai, K., Makino, A., Ohira, K., y Ojima, K. (1989). *Plant Cell Physiology*. 30: 193-200
- Mausser H., King W.A., Gready J.E., Andrews T.J. (2001). "CO₂ Fixation by Rubisco: Computational Dissection of the Key Steps of Carboxylation, Hydration, and C-C Bond Cleavage". *J. Am. Chem. Soc.*, 123(44):10821-1082
- Medrano, H., Parry, M.A.J., Socias, X., Lawlor, D.W. (1997). "Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover". *Annals of Applied Biology*. 131:491-501
- Nam, H.G. (1997). "The molecular genetic analysis of leaf senescence". *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 200–207.
- Newman TC., Ohme-Takagi M., Taylor C.B., Green P.J., (1993). "DST sequences , highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant cell* , 5:701-714
- Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. (1999) "AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* 9: 27–43
- Park, J.H., Oh, S.A., Kim, Y.H., Woo, H.R., and Nam, H.G. (1998). "Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*". *Plant Molecular Biology*. 37, 445–454.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Parry, M.A.J., Androlojc, J.P., Khan, S., Lea, P.J., Keys, A.J.,(2002). "Rubisco activity: effects of drought stress". *Annals of Botany*. 89: 833-839.
- Pastori, G. M., and del Rio, L. A. (1997). "Natural senescence of pea leaves. An activated oxygen-mediated function for peroxisomes". *Plant Physiology*. 113, 411–418.
- Portis AR Jr (1995)."The regulation of Rubisco by Rubisco activase". *Journal of Experimental Botany*. 46:1285-1291.
- Qian J, Rodermeil SR. (1993)"Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase cDNAs from *Nicotiana tabacum*". *Plant Physiol*. Jun;102(2):683-4
- Robinson, S.P., Portis, A.R. Jr (1989). "Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase". *Arch. Biochem. Biophys*. 268: 93-99
- Roh, K.S., Im, E.J., Yeo, S.E., Oh, M.J., Song,J.S., Chung, H.S., & Song, S.D.(2001). "Exogenous GA3 increases Rubisco Activation in Soybean Leaves". *Journal of Plant Biology*, 44(1): 53-60.
- Rokka, A., Zhang, L., Aro, E.M., (2001). "Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function?. *The Plant Journal*. 25 (4), 463-471
- Sage, R.F., & Seemann, J.R., (1993). "Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in response to reduced light intensity in C4 plants. *Plant Physiology*. 102:21-28
- Salvucci, M.E., Ogren, W.L. (1996)."The mechanism of Rubisco activase: insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research* 47:1-11.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Salvucci, M.E., Osteryoung, K.W., Crafts-Brandner, S.J., Vierling, E. (2001) "Exceptional Sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo". *Plant Physiology*. 127:1053-1064
- Salvucci, M.E., Werneke, J.M., Ogren, W.L., & Portis, A.R., Jr. (1987). "Purification and species distribution of Rubisco activase". *Plant Physiology*. 84:930-936.
- Samaras, Y., Bressan, R.A., Csonka, L.N., García-Ríos, M.G., Paino D' Urzo, M., & Rodees, D. (1995). "Proline accumulation during drought and salinity". *Environment and plant metabolism*. Editorial Smirnov, Oxford: Bios Scientific Publishers, 161-187.
- Sánchez de Jiménez, E., Medrano L., & Martínez B.E., (1995) "Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family". *Biochemistry*, 34:2826-2831.
- Sigler, P.B., Xu, Z., Rye, H.S., Burston, G.S., Fenton, W.A., Horwich, A.L. (1998). "Structure and function in GroEL-mediated protein folding". *Annual Review of Biochemistry*. 67: 581-588.
- Smart, C.M. (1994). "Gene expression during leaf senescence". *Tansley Review No. 64. New Phytology*. 126, 419-448.
- Spreitzer R.J., & Salvucci M.E. (2002). "Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme". *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 53:449-475
- Srivalli, B., and Khanna-Chopra, R. (1998). " Flag leaf senescence in relation to reduced reproductive sink strength in wheat". *Ind. J. Exp. Biol.* 36: 1013-1019.

Sun, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N., (2002) "Small heat shock proteins and stress tolerance in plants". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577: 1-9.

Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D., Lawlor, D.W. (1999). "Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP". *Nature* 401: 914-917.

Thompson, J. E., Ledge, R. L., and Barber, R. F. (1987). "The role of free radicals in senescence and wounding". *New Phytology*. 105, 317-344.

Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C., Akashi, K. (2002). "Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon". *Annals of Botany*. 89:825-832.

Valpuesta, J.M., Martín-Benito, J., Gómez-Puertas P., Carrascosa, J.L., Willison, K.R. (2002). "Structure and function of a protein folding machine: the eucaryotic cytosolic chaperonin CCT". *FEBS letters*. 529:11-16

Weaver, L.M., Himelblau, E., and Amasino, R.M. (1997). "Leaf senescence: Gene expression and regulation". *In Genetic Engineering* (New York: Plenum Press), pp. 215-234.

Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B., and Amasino, R.M. (1998). "A comparison of the expression patterns of several senescence associated genes in response to stress and hormone treatment". *Plant Molecular Biology*. 37, 455-469.

Werneke, J.M., Zielinski, R.E., & Ogren, W.L. (1988). "Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase." *Proc. Natl.Acad Sci. U.S.A.*, 85: 787-791

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zhang, N., Portis, A.R., Jr. (1999). "Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thio-redoxin-f". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 9438-9443

Zhang, N., Kallis, R.P., Ewy, R.G., & Portis, A.R. Jr. (2002). "Light modulation of Rubisco in Arabidopsis requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:3330-3334

Zinselmeier, C., Schussler, J.R., Jone, R.J., & Westgate, M.E. (1995) "Low water potential disrupts carbohydrate metabolism (*Zea mays* L.) ovaries." *Plant Physiology*, 107: 385-391