

Teneur en ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygénase des feuilles de luzerne (*Medicago sativa* L). Facteurs de variation génétiques et agronomiques

R Douillard ^{1*}, A Porcheron ², M Lila ², P Guy ², G Genier ²

avec la collaboration technique de F Allard ¹ et JP Compoint ¹

¹ INRA, laboratoire de biochimie et de technologie des protéines, BP 527, 44026 Nantes Cedex 03

² INRA, station d'amélioration des plantes fourragères, 86600 Lusignan, France

(Reçu le 10 mai 1989 ; accepté le 13 février 1990)

Résumé — On a déterminé, par des dosages immunochimiques, la teneur en ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (rubisco) de feuilles situées sur la tige principale de plantes ayant atteint le stade «liseré violet». En partant du haut de la tige, cette teneur augmente jusqu'à la feuille à l'aisselle de laquelle est située la première inflorescence au stade «liseré violet» (rang 0) puis décroît régulièrement jusque vers la base de la tige. La teneur en rubisco de la feuille de rang 0 a été déterminée, aux époques de récolte, sur 11 génotypes. Elle ne semble pas corrélée aux teneurs en matière sèche ou en azote de cette feuille mais varie entre 5 et 15% de la teneur en matière sèche selon le cycle de récolte et le génotype. La teneur en rubisco augmente nettement entre le 1^{er} et le 2^e cycle puis reste sensiblement constante du 2^e au 4^e pour les types méditerranéens. Dans le cas des types flamands, on observe une teneur maximale marquée au 2^e ou au 3^e cycle.

cycle de récolte / *Medicago sativa* L / ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygénase / génotype flamand / génotype méditerranéen / teneur en azote / dosage immunochimique

Summary — Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content of alfalfa (*Medicago sativa* L) leaves. Effects of genotype and cutting stage. The content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) has been determined in leaves on the main stem of plants at the late budding stage by an immunochemical method. Starting from the stem top, the content of rubisco increases up to the leaf where the 1st inflorescence at the late budding stage is located (0 level) and then decreases towards the oldest part of the main stem (table I). Rubisco content of the 0 level leaf has been determined at the cutting (late budding) stages in 11 populations of alfalfa (table II, fig 1). Rubisco content varies much more than dry matter or nitrogen, and varies more between cutting stages than between populations (table III). Rubisco content does not seem to be correlated with dry matter or nitrogen content of the 0 level leaf (table IV), but ranges between 5 and 15% of the dry weight, depending on the population and on the cutting stage. The content of rubisco clearly increases from the first to the second cutting stage and remains nearly constant from the second to the fourth cutting stage in mediterranean type populations. With Flemish type populations, a maximum content is noted at the 2nd or 3rd cutting stage (fig 1). There is no simple correlation between these trends and the variations in climatic data (temperature, period of sunshine or radiation energy). Insofar as these results can be extended from a single leaf to the whole crop, they should have general consequences on the structure of plant nitrogen and on the way alfalfa is used for animal feeding, for dehydration or leaf protein extraction.

cutting stage / *Medicago sativa* L / ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase / Flemish type / Mediterranean type / nitrogen content / immunochemical assay

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

La ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (EC 4.1.1.39 de la classification internationale des enzymes) ou rubisco est la protéine la plus abondante de notre planète (Ellis, 1979; Douillard, 1984); elle représente approximativement 50% des protéines foliaires des plantes en C₃. Elle est l'enzyme d'une des étapes limitantes du cycle de fixation photosynthétique du dioxyde de carbone, du fait de sa faible activité molaire. Sa place dans les productions végétales, de type métabolique C₃, est essentielle, puisqu'elle est le catalyseur limitant la formation de la biomasse. La valeur alimentaire des plantes herbacées de type C₃ dépend à la fois des sources disponibles d'énergie (glucides principalement) et d'azote assimilable (protéines dont la rubisco représente la fraction majeure).

Les facteurs de variation de la teneur en rubisco des feuilles sont nombreux, liés au génotype (Singer *et al*, 1952; Gutek *et al*, 1974; Pheloung et Brady, 1979; Dean et Leech, 1982), au stade de développement (Nivison et Stocking, 1983; Makino *et al*, 1983 et 1984; Yamashita et Fujino, 1986), à la nutrition azotée (Grima-Pettenati *et al*, 1987; Makino *et al*, 1983), à l'éclairement (Bennett *et al*, 1984; Prioul et Reyss, 1987; 1988), à la température de développement (Kobza et Edwards, 1987) ou à l'état sanitaire de la plante (Ranty *et al*, 1987). Dans le cas des luzernes (genre *Medicago* au sens large, espèce *Medicago sativa* au sens restreint), des données éparses indiquent, sans équivoque, une variabilité génétique de la teneur en rubisco (Heinrichs et Miltimore, 1970; Miltimore *et al*, 1974; Meyers *et al*, 1982; Pell et Pearson, 1983). Toutefois, ces résultats ont été obtenus dans des conditions qui ne tiennent pas compte des modalités d'exploitation de la plante au cours de la saison.

L'évaluation des facteurs de cette variabilité, puis leur maîtrise (dans la mesure où cela est possible), devraient aboutir à préciser les conditions d'obtention de luzernières ayant les teneurs en protéines et en rubisco correspondant le mieux aux exigences des diverses spéculations qui les valorisent : pâturages, fourrages, ensilages (ruminants essentiellement), déshydratation et extraction de protéines (monogastriques principalement) (Journet *et al*, 1976; Guy, 1981).

Nous avons entrepris une étude exploratoire de la variabilité de la teneur en rubisco de feuilles de luzerne au cours d'1 année complète d'exploitation comportant 4 cycles de récolte.

Cette étude réalisée au champ, dans des conditions proches de la pratique agricole courante, essaie de mettre en évidence la variabilité de la teneur en rubisco, en fonction des génotypes et du cycle de récolte, ainsi que les caractères auxquels cette teneur peut être reliée. Nous n'abordons pas l'analyse des mécanismes responsables des variations de teneur en rubisco ni celle de l'impact éventuel de cette teneur sur la productivité, la qualité technologique et la valeur alimentaire du fourrage produit.

Ce travail a été effectué en conditions de photo- et thermo-période croissantes (1^{er} et 2^e cycles), approximativement stables (3^e cycle) et décroissantes (4^e cycle). Le 1^{er} cycle intègre, de plus, les arrière-effets d'un démarrage en végétation après la dormance hivernale. L'expérimentation a pris en compte un lot d'écotypes ou de populations d'origines géographiques, de potentiel de production, et de rythme de croissance très différents. En préliminaire, nous avons analysé la variabilité de la teneur en rubisco des feuilles en étudiant l'effet du niveau d'insertion foliaire sur la tige principale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les semences utilisées proviennent des collections de la station d'amélioration des plantes fourragères de Lusignan. On peut distinguer 3 types correspondant à des origines climatiques différentes.

Matériel de type méditerranéen

Gabès, écotype sud-tunisien; Pool provence, synthétique à base large; Crau, population du delta du Rhône; Totana, population espagnole.

Matériel semi-méditerranéen

Demnat x P, population synthétique franco-marocaine; Mielga, population des hauts plateaux de l'Espagne centrale; Crioula, variété mexicaine; Pop G3 et Prot 2, matériels en cours de sélection à Montpellier; Mendoza, population argentine; Equipe, variété nord-italienne; Siriver, variété australienne.

Matériel de type flamand

Szarvasi et Saponex, variétés hongroises; Krusewacka, variété yougoslave; Europe, (témoin) et Lutèce, variétés françaises; Natsuwakaba, variété japonaise;

Miekowska, variété polonaise; Fressines, population charentaise.

La culture implantée à Nantes (parcelle de 150 m² sans répétition) a été semée en pleine terre le 20 avril 1984 et a reçu des apports de 150 kg de P₂O₅ et 200 kg de K₂O par ha et par an. Les cultures implantées à Lusignan (essai bloc à 4 répétitions, parcelles élémentaires de 3,6 m²) ont été semées en pleine terre en avril 1984 et 1985 et ont reçu des apports de 150 kg de P₂O₅ et 250 kg de K₂O par ha et par an.

Organes prélevés

Les prélèvements ont été effectués à Nantes les 30 et 31 juillet 1985 sur la variété Europe et à Lusignan, sur l'ensemble du matériel, les 4 juin et 16 octobre 1986 (1^{er} et 4^e cycles, implantation 1984) et les 21 mai, 8 juillet, 20 août et 5 octobre 1987 (1^{er} à 4^e cycle, implantation 1985). La prise d'un échantillon est constituée de plusieurs dizaines de plantes par génotype, à un stade aussi proche que possible du stade «liseré violet» préconisé pour l'exploitation de la plante (Guy *et al.*, 1969; Genier et Guy, 1975). Les limbes foliaires récoltés, ont été ceux de feuilles situées sur la tige principale. La feuille de rang 0 est celle à l'aisselle de laquelle est implantée la première inflorescence ayant atteint le stade «liseré violet». Les feuilles situées au-dessus ont des rangs positifs et celles situées au-dessous, des rangs négatifs (tableau I). Dans toutes les comparaisons entre génotypes, les limbes foliaires prélevés étaient ceux de la feuille de rang 0. Lorsque


le stade de développement était légèrement différent, la feuille prélevée était celle située à environ 10 cm du sommet de la tige principale.

Dosages

Tous les dosages ont été répétés sur 6 lots de chaque échantillon. La quantité de matière sèche a été déterminée (en % de la matière fraîche), sur des lots d'environ 1 g de limbes frais, après séchage pendant 24 h à l'étuve ventilée à 80 °C. La quantité totale d'azote a été évaluée par la méthode de Kjeldahl, après minéralisation de lots d'environ 500 mg de limbes frais.

La teneur en rubisco a été déterminée par immuno-électro-diffusion des surnageants de broyage des limbes foliaires selon la méthode de Laurell (1966). Des lots d'environ 500 mg de limbes ont été broyés au mortier avec 4 ml du tampon de broyage préconisé par Ranty et Cavalié (1982) : Tris (hydroxyméthyle) aminométhane/HCl 100 mM, pH 7,5 renfermant de l'acide éthylènediaminetétra-acétique 1 mM, 0,2% de β-mercaptoéthanol, 2,5% de polyvinylpyrrolidone activée et 0,5% de polyéthylène glycol 6 000. Après une centrifugation de 10 min à 3 000 g, le surnageant a été dilué au demi par du glycérol à 87% et conservé à -20 °C avant analyse. La gamme étalon (entre 0,05 et 0,6 µg par puits) a été réalisée avec de la rubisco purifiée à partir de la population Europe par tamisage moléculaire et chromatographie d'échange d'ions (Douillard, 1986). Le coefficient E_{1 cm}^{1%}, à 280 nm, dé-

Tableau I. Teneurs en matière sèche, en azote et en rubisco de limbes de feuilles insérées sur la tige principale de luzerne. Les plantes de la population Europe ont été récoltées au stade «liseré violet» les 30 et 31 juillet 1985. L'étage foliaire est défini par rapport à la feuille à l'aisselle de laquelle est insérée la première inflorescence (étage 0). L'azote de la rubisco représente 16,86% de la masse de la protéine d'après les compositions en acides aminés des sous unités de la rubisco de tabac (Müller *et al.*, 1983; Amiri *et al.*, 1984). Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir de six mesures indépendantes. MF : matière fraîche; MS : matière sèche; N : azote total; NR : azote de la rubisco.

	Etage foliaire	M S		N		Rubisco		
		% M F	% M F	% M S	% M F	% M S	NR % N	
	2	27 ± 2	1,3 ± 0,2	4,8	1,7 ± 0,3	6,3	22	
	1	26 ± 2	1,1 ± 0,2	4,2	2,1 ± 0,6	8,1	32	
	0	26 ± 3	1,2 ± 0,4	4,6	2,4 ± 0,5	9,2	34	
	-1	26 ± 2	1,0 ± 0,2	3,8	2,0 ± 0,6	7,7	34	
	-2	25 ± 1	1,0 ± 0,2	4,0	1,4 ± 0,4	5,6	23	
	-4	24 ± 2	0,8 ± 0,1	3,3	1,3 ± 0,4	5,4	27	
	-6	22 ± 2	0,8 ± 0,1	3,6	1,0 ± 0,4	4,5	21	
	-8	21 ± 4	0,65 ± 0,06	3,1	1,1 ± 0,5	5,2	29	
	Moyennes	25 ± 2	1,0 ± 0,2	3,9 ± 0,6	1,6 ± 0,5	6,5 ± 2	27 ± 5	

terminé au laboratoire par spectroscopie et pesée est égal à 17. Les sérums renfermant les anticorps polyclonaux de lapins ont été préparés après des injections sous-cutanées répétées de rubisco purifiée de la population Europe mélangée à de l'adjuvant de Freund complet puis incomplet. L'électro-immunodiffusion a été conduite pendant 5 h dans une chambre à 4 °C sous une tension de 8 V/cm dans un gel préparé dans du tampon tris (hydroxyméthyle) aminométhane 37 mM, glycolle 100 mM, pH 8,6. La teneur en rubisco de chaque lot a été calculée comme la moyenne de 4 dosages effectués sur des gammes de dilution de la solution conservée à -20 °C dans du glycérol à 50% (Makino *et al*, 1984).

Données climatiques

Le rayonnement global, la durée d'insolation et la température moyenne ont été mesurés, par la Météorologie Nationale, à la station INRA de Lusignan.

Calculs statistiques

L'étude des paramètres mesurés (matière sèche, azote, et teneur en rubisco) ou de leurs rapports repose sur la comparaison des moyennes et des écarts types, ainsi que sur l'examen des analyses de variance et des corrélations multicausales.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Teneur en rubisco des feuilles insérées sur la tige principale de la variété Europe

Les teneurs en matière sèche, azote et rubisco des limbes des feuilles insérées sur la tige principale de plantes de la population Europe, cultivée à Nantes, ont été déterminées à partir de plantes au stade de développement «liseré violet» (tableau I). L'âge des feuilles augmente du sommet vers la base des tiges. Parallèlement, l'énergie lumineuse reçue par les feuilles diminue du sommet vers la base des tiges. On constate une tendance régulière, selon ce gradient, à l'abaissement du taux de matière sèche et de la teneur en azote lorsque l'âge des feuilles augmente et que leur éclaircissement diminue. Dans le cas de la rubisco, la teneur augmente de la feuille 2 à la feuille 0 puis diminue régulièrement de celle-ci jusqu'aux feuilles de la base (les plus âgées). Il existe donc un stade de développement optimal pour lequel la teneur en rubisco est la plus élevée par rapport à la quantité de matière fraîche,

de matière sèche ou d'azote total. Dans le cas présent, la rubisco représente jusqu'à 9% de la matière sèche et 34% de l'azote total dans la feuille de rang 0 alors que ces proportions descendent respectivement à 6,3% et 22% pour les feuilles les plus jeunes (rang + 2) ou environ 5% et 26% pour les feuilles les plus âgées (rangs -4 à -8).

Ces gradients de teneur en azote et en rubisco semblent liés — d'une part à la mise en place de l'appareil photosynthétique (teneurs croissantes des feuilles de rang + 2 aux feuilles de rang 0), ce qui a déjà été montré dans le cas d'autres espèces (Nivison et Stocking, 1983; Makino *et al*, 1983 et 1984; Yamashita et Fujino, 1986), — et d'autre part à la dégradation progressive des structures chloroplastiques associée à un recyclage de l'azote des feuilles les plus âgées, et en même temps les plus ombrées, vers les feuilles les plus jeunes (Charles-Edwards *et al*, 1987).

La feuille de rang 0 a ainsi la teneur en rubisco la plus élevée de toutes les feuilles de la tige principale. Elle est, par ailleurs, située suffisamment près de l'apex pour que l'ombrage pouvant provenir du reste du couvert soit négligeable. Pour éviter, dans les comparaisons entre situations agronomiques ou génétiques, tout biais lié à des niveaux d'éclaircissement variables dans le couvert végétal (Charles-Edwards *et al*, 1987), nous avons choisi cette feuille comme matériel d'étude. Le bien-fondé de ce choix est renforcé par le fait que les teneurs en rubisco des feuilles des rangs + 1, 0 et -1 ne sont pas significativement différentes.

Teneur en rubisco de la feuille de rang 0 de différents génotypes aux différents cycles de récolte

Les teneurs en matière sèche, en azote et en rubisco des limbes de la feuille de rang 0 ont été déterminées pendant la saison 1986 aux époques correspondant aux stades de récolte (liseré violet) de la 1^{re} (4 juin) et de la 4^e (16 octobre) coupes ainsi qu'en 1987 aux périodes de récolte correspondant aux 1^{re} (21 mai), 2^e (8 juillet), 3^e (20 août) et 4^e coupes (5 octobre). Tous les génotypes ont été prélevés le même jour pour éviter des biais liés aux variations des conditions climatiques. Les moyennes des observations correspondant à chaque coupe, tous génotypes confondus, sont regroupées tableau II.

Tableau II. Moyennes, tous géotypes confondus, des teneurs en matière sèche, en azote et en rubisco de la feuille de rang 0 aux époques de coupe au cours des années 1986 et 1987; données climatiques de l'année 1987. Les données climatiques de l'année 1987 (températures moyennes, nombre d'heures d'ensoleillement et rayonnement incident) concernent les 5 j et les 10 j précédant la récolte. Abréviations : voir légende du tableau I.

Date et coupe	M S		N		Rubisco		
	% M F	% M F	% M S	% M F	% M S	NR	% N
04/06/86 1 ^{re} coupe	28 ± 1	1,25 ± 0,05	4,47 ± 0,08	1,7 ± 0,1	6,0 ± 0,5		23 ± 2
16/10/86 4 ^{me} coupe	23,9 ± 0,4	0,81 ± 0,01	3,41 ± 0,02	2,7 ± 0,1	11,2 ± 0,6		56 ± 3
21/05/87 1 ^{re} coupe	34,3 ± 0,5	1,23 ± 0,02	3,6 ± 0,1	2,17 ± 0,08	6,3 ± 0,3		30 ± 1
08/07/87 2 ^{me} coupe	32,0 ± 0,3	1,37 ± 0,02	4,30 ± 0,02	3,8 ± 0,2	11,9 ± 0,7		47 ± 3
20/08/87 3 ^{me} coupe	32,1 ± 0,3	1,21 ± 0,03	3,78 ± 0,03	4,0 ± 0,2	12,2 ± 0,5		55 ± 2
05/10/87 4 ^{me} coupe	27,3 ± 0,3	1,21 ± 0,02	4,42 ± 0,02	2,7 ± 0,1	10,1 ± 0,6		38 ± 2

Date et coupe	Température moyenne (°C)		Durée d'insolation (h)		Rayonnement global (MJ/m ²)	
	5 J	10 J	5 J	10 J	5 J	10 J
04/06/86 1 ^{re} coupe						
16/10/86 4 ^{me} coupe						
21/05/87 1 ^{re} coupe	9,6	9,9	37,8	68,8	117	219
08/07/87 2 ^{me} coupe	21,9	21,9	55,7	112,3	156	305
20/08/87 3 ^{me} coupe	21,6	20,9	40,4	88,9	111	243
05/10/87 4 ^{me} coupe	13,9	12,6	18,4	49,7	56,4	128

Remarque sur les teneurs en matière sèche

Les teneurs moyennes en matière sèche, par rapport à la matière fraîche, des feuilles des 3 premières coupes de 1987 sont supérieures à 30% alors que les autres valeurs et celles couramment observées (Genier, données non publiées) sont de l'ordre de 25% (tableau II). Le mode de récolte, par séparation au champ de

lots de environ 30 g de feuilles à analyser, peut entraîner, aux dates où ces opérations ont été effectuées, une certaine déperdition en eau pendant un séjour de 10 à 15 min dans un sac en papier entre l'instant du prélèvement et la pesée de la matière fraîche. L'expression des résultats en terme de masse surfacique (Smith et Struckmeyer, 1974) permettrait de limiter les biais éventuels liés aux opérations de récolte.

Variations relatives des différents caractères

L'analyse des résultats obtenus au cours des campagnes 1986 et 1987 a porté sur 6 caractères qui sont les teneurs en matière sèche, en azote total et en rubisco rapportées à la matière fraîche ou bien les teneurs en azote et en rubisco rapportées à la matière sèche ou encore la teneur en rubisco rapportée à l'azote. L'analyse, en fonction des génotypes ou en fonction des cycles de récolte, de la variation de ces caractères autour des moyennes annuelles montre que (tableau III) :

- tous les caractères varient significativement, en fonction du cycle ou en fonction du génotype;
- le caractère teneur en rubisco est toujours plus variable que les caractères teneur en ma-

tière sèche ou azote, qu'il soit exprimé par rapport à la matière fraîche, par rapport à la matière sèche ou par rapport à l'azote, ou que l'analyse soit conduite en fonction du cycle de récolte ou en fonction du génotype;

— les variations du caractère rubisco, autour des moyennes annuelles, sont toujours beaucoup plus marquées lorsque les comparaisons sont effectuées en fonction des coupes que lorsqu'elles le sont en fonction des génotypes, quel que soit le mode d'expression de la teneur en rubisco;

— les variations de la teneur en rubisco, en fonction des coupes, semblent plus marquées lorsque celle-ci est exprimée par rapport à la matière sèche, ou encore plus par rapport à l'azote, plutôt que par rapport à la matière fraîche.

Tableau III. Moyennes annuelles, plus petites différences significatives et écarts maximaux entre les valeurs des caractères analysés. On a calculé les écarts maximaux entre les valeurs des caractères analysés; ces écarts ont été exprimés en % de la valeur moyenne du caractère; les plus petites différences significatives (ppds) ont été calculées au seuil de probabilité de 0,95 : a) en fonction des dates de coupe (tous génotypes confondus à chaque cycle de récolte); b) en fonction des génotypes (toutes coupes d'une même année confondues pour chaque génotype). Abréviations : voir légende du tableau I.

	MS	N		Rubisco		
	% MF	% MF	% MS	% MF	%MS	NR%N
1986 (deux coupes)						
=====						
Moyennes générales						
	26,1	1,03	4,0	2,16	8,55	38,9
Ecart maximums						
a) entre coupes	4,4	0,44	1,06	0,97	5,2	32,5
ppds	0,6	0,03	0,32	0,11	0,5	2,1
% des moyennes	17%	43%	27%	45%	61%	84%
b) entre génotypes	4,6	0,11	0,25	0,81	3,6	17
ppds	1,5	0,07	0,15	0,25	1,1	5
% des moyennes	18%	11%	6%	38%	43%	44%
1987 (quatre coupes)						
=====						
Moyennes générales						
	31,4	1,25	4,0	3,16	10,1	42,4
Ecart maximums						
a) entre coupes	7,0	0,16	0,81	1,8	5,89	25
ppds	0,3	0,02	0,11	0,1	0,4	2
(% des moyennes)	22%	13%	20%	56%	58%	60%
b) entre génotypes	6,1	0,21	0,74	0,86	1,9	10
ppds	0,5	0,03	0,11	0,2	0,7	3
(% des moyennes)	19%	17%	19%	27%	19%	24%

En conclusion, il apparaît donc que la teneur en rubisco de la feuille de rang 0 dépend, à un stade d'exploitation donné, du génotype de la plante mais que cette teneur varie encore plus en fonction du cycle d'exploitation. Par ailleurs, la variabilité des teneurs en rubisco est, dans tous les cas, plus grande lorsque ces teneurs sont exprimées par rapport à l'azote que par rapport à la matière sèche et, dans 3 cas sur 4, plus grande lorsque la teneur est exprimée par rapport à la matière sèche plutôt que par rapport à la matière fraîche. Il semble donc exister des corrélations différentes entre la teneur en rubisco et les caractères quantité de matière fraîche, teneur en matière sèche et teneur en azote. La mise en évidence, éventuelle, de corrélations élevées entre caractères pourrait éclairer la suite de l'analyse. Nous allons donc évaluer l'étendue et la signification des corrélations entre caractères avant d'entreprendre l'étude des effets liés à la date de récolte ou au génotype.

Corrélations entre caractères

Les matrices de corrélations entre les caractères analysés sur 11 génotypes aux différentes coupes (teneurs en matière sèche, en azote et en rubisco par rapport à la quantité de matière fraîche, teneurs en azote et en rubisco par rapport à la matière sèche et teneur en rubisco par rapport à la teneur en azote) ont été déterminées pour l'ensemble des résultats de chaque année et pour les observations effectuées à chaque coupe (tableau IV). Ces données suggèrent plusieurs remarques.

La 1^{re} est que la teneur en azote de la matière sèche est toujours corrélée négativement avec la teneur en matière sèche (significativement dans 6 cas sur 8). On note cependant que, sauf à l'automne (4^e coupe), les teneurs en azote et en matière sèche par rapport à la matière fraîche sont corrélées positivement et de façon significative.

La 2^e est que tous les caractères faisant intervenir la rubisco sont fortement corrélés entre eux. Ceci provient du fait, déjà mentionné, que les variations relatives des teneurs en rubisco sont plus importantes que celles des autres caractères.

La 3^e est que les corrélations faisant intervenir au moins 1 caractère autre que la rubisco, hormis celle déjà indiquée entre la teneur en azote de la matière sèche et la teneur en matière sèche, ne sont pas toujours les mêmes entre les cycles successifs d'1 année ou entre ces cycles

et la moyenne annuelle. Ceci met en évidence des changements de comportement des génotypes, les uns par rapport aux autres, au cours de la campagne. Il faut noter que la dernière coupe de chaque campagne présente un tableau assez caractéristique où peu de corrélations sont significatives, hormis celles entre caractères faisant intervenir la rubisco. Dans les autres cas, la teneur en rubisco et la teneur en azote par rapport à la matière fraîche ainsi que le rapport rubisco sur azote sont corrélés positivement à la teneur en matière sèche.

La 4^e est que, sur les 6 coupes, le caractère rubisco (par rapport à la matière fraîche) n'est corrélé significativement que 2 fois au caractère azote (par rapport à la matière fraîche). De plus, la part de l'azote retrouvée sous forme de rubisco est liée 2 fois par une corrélation négative très significative à la teneur en azote de la matière sèche. D'autres corrélations, apparaissant une seule fois sur les 6 coupes, sont plus délicates à interpréter pour le moment. Il semble donc que la teneur en rubisco soit une variable sensiblement indépendante des autres paramètres que nous avons déterminés.

La 5^e est que la part de l'azote retrouvée sous forme de rubisco est corrélée significativement à la teneur en matière sèche de la feuille, sauf en automne, à la 4^e coupe. Cette dernière observation pourrait être le reflet de la liaison de l'activité photosynthétique, productrice de matière sèche, à la proportion de rubisco dans l'azote total de la feuille.

En conclusion, nous pouvons retenir que le caractère rubisco est, dans la feuille de rang 0, plus variable que les caractères teneur en azote ou en matière sèche et que ses variations ne sont pas, sauf exception, corrélées à celles des autres caractères. Par ailleurs, l'allure particulière de la matrice de corrélation pour la 4^e coupe suggère des changements de comportement nombreux des génotypes les uns par rapport aux autres à l'époque de cette coupe.

Effets des dates de récolte et des génotypes sur la teneur en rubisco

L'ensemble des résultats obtenus aux 6 coupes des 2 années successives sur les différents génotypes ont été représentés figure 1. Il apparaît que les teneurs en rubisco (par rapport à la matière sèche) dépendent, comme nous l'avons déjà indiqué, principalement de la date de récolte. Notons que les valeurs correspondant aux

Tableau IV. Matrices des coefficients de corrélations, au travers des génotypes, entre caractères. Les coefficients de corrélation ont été calculés pour : a) l'ensemble des données provenant de chacune des deux campagnes; b) les données collectées à chaque cycle de récolte. Les corrélations sont significatives au seuil de 0,05 à partir d'une valeur de 0,60 correspondant à neuf degrés de liberté. Abréviations : voir légende du tableau I.

a) Corrélations par années

=====

1986					1987						
=====					=====						
	MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS		MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS
N/MF	0,55					N/MF	0,57				
N/MS	-0,88	-0,10				N/MS	-0,66	0,24			
R/MF	0,34	0,35	-0,27			R/MF	0,88	0,48	-0,61		
R/MS	-0,19	0,13	0,10	0,88		R/MS	0,44	0,22	-0,32	0,80	
NR/N	0,15	0,17	-0,15	0,97	0,94	NR/N	0,67	-0,03	-0,81	0,86	0,79

b) Corrélations par coupe

=====

Année 1986

=====

1ère coupe					4ème coupe						
=====					=====						
	MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS		MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS
N/MF	0,57					N/MF	0,14				
N/MS	-0,95	-0,13				N/MS	-0,93	0,21			
R/MF	0,73	0,38	-0,25			R/MF	-0,02	0,00	0,04		
R/MS	0,15	0,03	-0,21	0,79		R/MS	-0,39	-0,07	0,38	0,92	
NR/N	0,59	0,10	-0,68	0,96	0,86	NR/N	-0,05	-0,13	0,02	0,99	0,93

Année 1987

=====

1ère coupe					2ème coupe						
=====					=====						
	MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS		MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS
N/MF	0,59					N/MF	0,56				
N/MS	-0,67	0,19				N/MS	-0,78	0,08			
R/MF	0,75	0,66	-0,33			R/MF	0,78	0,13	-0,84		
R/MS	0,24	0,48	0,12	0,82		R/MS	0,56	-0,08	-0,75	0,95	
NR/N	0,62	0,26	-0,54	0,90	0,77	NR/N	0,64	-0,08	-0,86	0,97	0,98

3ème coupe					4ème coupe						
=====					=====						
	MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS		MS/MF	N/MF	N/MS	R/MF	R/MS
N/MF	0,60					N/MF	0,28				
N/MS	-0,51	0,39				N/MS	-0,41	0,76			
R/MF	0,73	0,61	-0,18			R/MF	-0,28	0,04	0,22		
R/MS	0,37	0,46	0,06	0,91		R/MS	-0,55	-0,04	0,33	0,95	
NR/N	0,59	0,20	-0,46	0,90	0,85	NR/N	-0,38	-0,45	-0,17	0,88	0,87

11 génotypes, qui ne sont pas les mêmes chaque année hormis Europe et Saponex, se répartissent pratiquement dans la même plage de teneur à la 1^{re} et à la 4^e coupe (seuls Equipe et Prot2 ont des teneurs exceptionnellement élevées à la 4^e coupe de 1986). Cette observation

indique, de façon préliminaire, une bonne reproductibilité de la teneur en rubisco à un stade d'exploitation donné et confirme que l'effet cycle est globalement plus important que l'effet génotype. Au cours d'une campagne (année 1987), on observe donc, en confondant tous les géno-

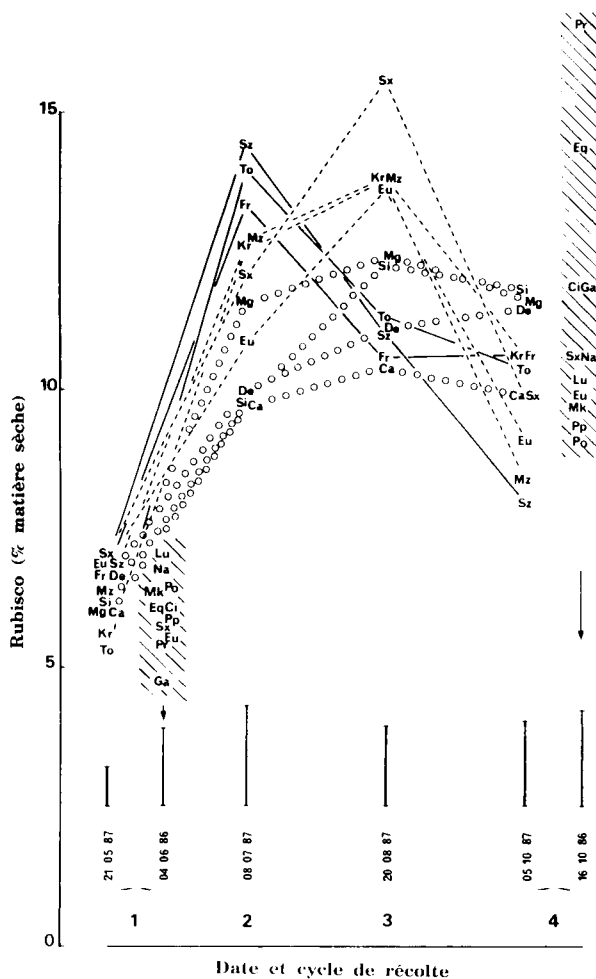


Fig 1. Teneurs en rubisco (par rapport à la matière sèche) des onze génotypes aux quatre coupes de la campagne 1987. A titre de comparaison, on a également indiqué les teneurs en rubisco des 11 génotypes récoltés aux 2 coupes de 1986 (zones hachurées). Les barres verticales correspondent aux ppds déterminés pour chaque coupe. Ca, Crau; Ci, Crioula; De, Demnat x P; Eq, Equipe; Eu, Europe; Fr, Fressines; Ga, Gabès; Kr, Krusewacka; Lu, Lutèce; Mg, Mielga; Mk, Miekowska; Mz, Mendoza; Na, Natsuwakaba; Po, Pop G3; Pp, Pool provence; Pr, Prot 2; Si, Siriver; Sx, Saponex; Sz, Szarvasi; To, Totana.

types, approximativement un doublement de la teneur en rubisco entre la 1^{re} et la 2^e coupe puis des valeurs sensiblement égales entre 2^e et 3^e coupe et enfin, une légère baisse à la dernière coupe (tableau II). Ces variations sont les mêmes, que la teneur en rubisco soit exprimée par rapport à la matière fraîche ou par rapport à l'azote foliaire.

Ces observations générales sur l'effet cycle doivent cependant être sensiblement tempérées par les effets liés aux génotypes. Nos observations portant sur 1 seule année, semblent en effet mettre en évidence 3 types de comportements :

— les populations Szarvasi, Fressines et Totana ont leurs teneurs les plus élevées à la 2^e coupe puis une baisse de teneur importante entre les 2^e et 3^e coupes;

— les populations Europe, Saponex, Krusewacka et Mendoza ont leurs teneurs les plus élevées à la 3^e coupe et une baisse de teneur très nette à la 4^e coupe;

— Demnat x P, Siriver, Mielga et Crau ont un comportement plus stable, avec un maximum de teneur peu marqué vers la 3^e, ou même, la 4^e coupe.

A l'intérieur de chacun de ces 3 groupes, les différences entre génotypes sont encore importantes, mais le nombre restreint d'observations ne portant que sur une campagne, ne permet pas de détailler davantage les comportements. La distinction entre les 2 premiers groupes peut paraître surprenante car les populations qu'ils renferment sont toutes de type flamand. Il est possible que le seul critère significatif soit le passage par un maximum puis une baisse importante de la teneur avant la fin de la campagne.

Les populations du 3^e groupe ont un caractère méditerranéen marqué. Leurs teneurs en rubisco à l'automne sont nettement plus élevées que celles des autres populations (du moins pour Demnat x P, Siriver et Mielga). Cette observation semble confirmée par les données fragmentaires de 1986 où les 4 génotypes ayant des teneurs les plus élevées à la 4^e coupe sont Prot2 et Equipe puis, à un degré moindre, Crioula et Gabès.

Origine de la variabilité de la teneur en rubisco des feuilles

Dans les discussions qui suivent, nous avons assimilé la teneur en rubisco du feuillage à celle de la feuille de rang 0. Cette généralisation demanderait, bien entendu, à être confirmée, pour les différents génotypes, aux 4 périodes de récolte considérées.

Comme nous l'avons rappelé, la teneur en rubisco des feuilles dépend de nombreux facteurs, génétiques, climatiques, sanitaires, etc. Les travaux mentionnés n'ont, cependant, pris en compte, ni l'incidence de la variation des paramètres climatiques sur le développement de la plante ni le rythme d'exploitation au cours de l'année. Par ailleurs, les approches génétiques ne semblent pas avoir tenu compte des interactions entre génotypes et variations des conditions climatiques. Nos observations indiquent

cependant certains effets liés à ces facteurs et à leurs interactions. Il est prématuré d'interpréter l'ensemble de ces résultats mais plusieurs remarques s'imposent.

Les variations des températures moyennes, des durées d'insolation ou du rayonnement global pendant les jours précédant la récolte (tableau II) indiquent que tous ces paramètres climatiques augmentent le plus entre le 1^{er} et le 2^e cycle, sont sensiblement constants entre le 2^e et le 3^e cycle puis décroissent nettement entre les 2 derniers cycles. Ces variations sont qualitativement analogues à celles des teneurs moyennes en rubisco des 11 géotypes (tableau II). Notons, de plus, que les variations de teneur moyenne en rubisco suivent plus fidèlement les variations de température que celles de l'ensoleillement ou du rayonnement des jours précédant la récolte. Il semble ainsi exister un certain parallèle entre teneur en rubisco et température de croissance des végétaux.

L'analyse, géotype par géotype, des variations de teneurs en rubisco (fig 1) indique cependant que cette corrélation n'apparaît clairement que pour les géotypes du 1^{er} type (Szarvasi, Fressines et Totana) alors que pour ceux du 2^e et, à plus forte raison, du 3^e type, la corrélation est moins nette, voire inexistante. On note plus particulièrement que les populations de type méditerranéen se distinguent des types flamands par l'absence de baisse de teneur en rubisco entre les cycles d'été et celui d'automne. Les mécanismes de régulation de la teneur en rubisco semblent donc marqués par le géotype.

Les mécanismes d'accumulation et de mobilisation des réserves racinaires (Pearce *et al*, 1969; Gosse *et al*, 1982) pourraient se répercuter, au niveau foliaire, par un développement plus ou moins marqué de l'appareil photosynthétique. En effet, un modèle simple de la physiologie de la plante entière, applicable au cas de la luzerne (Baysdorfer et Bassham, 1985; Cralle et Heichel, 1985), est celui de sources et de puits de métabolites. L'assimilation photosynthétique serait alors limitée par le flux de métabolites provenant des sources ou par celui pouvant être reçu par les puits. La rubisco semble être le facteur limitant de la photosynthèse (Walker *et al*, 1986) et sa teneur dans les feuilles pourrait quantifier, en première approximation, l'importance de la source photosynthétique foliaire de métabolites; elle permettrait d'ajuster les flux entre sources et puits de la plante entière. L'intensité et la direction des flux, contrôlées par l'in-

formation génétique, dépendraient essentiellement des paramètres climatiques (température, longueur du jour, rayonnement) et agronomiques (récolte des parties aériennes).

Ces hypothèses, où les mécanismes d'accumulation des métabolites et de mobilisation des réserves seraient caractéristiques des différents géotypes, pourraient être soumises à l'expérience par des mesures simultanées de teneur en rubisco et de flux métabolique au cours du développement de la plante et aux périodes de récolte.

Teneur en rubisco et valorisation de la luzerne

On considère classiquement que les protéines des feuilles représentent 75% de l'azote foliaire (Fauconneau, 1960) indépendamment du géotype et de la période de récolte. Nos résultats indiquent cependant que la rubisco peut représenter de 17 à 77% de l'azote total de la feuille de rang 0. Ces observations suggèrent que la structure de l'azote foliaire peut varier considérablement d'une situation à une autre. Nous n'avons, cependant, pas de données sur la nature du reste de l'azote foliaire dans ces différentes situations. Quoi qu'il en soit, nos observations soulèvent certaines remarques selon le type de valorisation auquel est destiné le couvert végétal de luzerne.

Utilisation en vert

La cinétique d'hydrolyse des protéines dans le rumen dépend de leur nature (Nugent *et al*, 1983). L'utilisation digestive de la luzerne devrait donc être liée à sa teneur en rubisco et à la nature des autres formes d'azote de la plante. La teneur en rubisco a été mentionnée, en particulier, parmi les facteurs responsables de la météorisation (Gutek *et al*, 1974). Nos résultats montrent que dans cette dernière hypothèse, il faudrait tenir compte à la fois du géotype et du cycle de repousse plutôt que du seul géotype comme l'ont fait Miltimore *et al* (1974).

Déshydratation

Comme dans le cas de l'utilisation en vert, la teneur en azote et la composition de cette fraction azotée pourraient intervenir sur les paramètres de la conservation et surtout de la valeur alimentaire dans le cas des monogastriques comme dans celui des polygastriques.

Production de protéines foliaires purifiées

Les protéines extraites de feuilles de luzerne sont actuellement des concentrats de type «PX» (Gastineau et de Mathan, 1981) constitués de lamelles chloroplastiques, mais aussi de rubisco (Douillard, 1985). Il semble que les variations de composition de la matière première pourraient se répercuter sur le processus de fabrication, sur les rendements de préparation et sur la composition du produit fini.

Dans les perspectives actuelles de production de protéines de feuilles destinées à l'alimentation humaine (Edwards *et al*, 1975; Bourque, 1982; Knuckles et Kohler, 1982; Sheen et Sheen, 1985), il s'avère que les procédés mis en œuvre aboutissent, pratiquement, à l'obtention de concentrats ou d'isolats très enrichis en rubisco (Burghoffer *et al*, 1987). Les variations de composition des feuilles devraient être encore plus importantes puisque les teneurs en rubisco s'échelonnent pratiquement entre 5 et 17% par rapport à la matière sèche, selon le génotype et le cycle de récolte. D'une façon générale, il semble que la mise en œuvre d'un processus technologique doit tenir compte de ces variations de teneur et s'y adapter.

CONCLUSIONS

Ce travail apporte quelques éléments permettant de quantifier la variabilité de la teneur en rubisco de la feuille de rang 0 entre génotypes, d'une part, et au cours d'une année d'exploitation, d'autre part. L'analyse des mécanismes responsables de cette variabilité reste à faire. La question qui se pose maintenant est de savoir dans quelle mesure cette variabilité est transposable à l'ensemble du feuillage. Ces données devraient cependant être prises en compte, à l'avenir :

- dans l'évaluation de la «qualité» de la plante, selon le type d'utilisation considéré;
- dans la modélisation de la croissance et de la production;
- dans la destination préférentielle à une spéculation donnée des différentes coupes; ceci pouvant concerner aussi bien la conduite des troupeaux que la valorisation industrielle;
- et donc, aussi, dans la sélection en vue d'un usage déterminé de la luzerne.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide de E Cardou, JF Coutin, B Maertens, N Mondain et plus particulièrement de Y Hébert pour les calculs biométriques.

RÉFÉRENCES

- Amiri I, Salnikow J, Vater J (1984) Amino-acid sequence of the large subunit of D-ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from *Nicotiana tabacum*. *Biochim Biophys Acta* 784, 116-123
- Baysdorfer C, Bassham JA (1985) Photosynthate supply and utilization in alfalfa. A developmental shift from a source to a sink limitation of photosynthesis. *Plant Physiol* 77, 313-317
- Bennett J, Jenkins GI, Hartley MR (1984) Differential regulation of the accumulation of light-harvesting chlorophyll a/b complex and ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in greening pea leaves. *J Cell Biochem* 25, 1-13
- Bourque DP (1982) Purification of protein extracted from leaves. Brevet US 190233, 33 pp
- Burghoffer C, Costes C, Rambourg JC, Gastineau I, de Mathan O (1987) Amélioration du procédé industriel d'extraction de la protéine blanche de luzerne. *Sci Aliments* 7, 111-134
- Charles-Edwards DA, Stutzel H, Ferraris R, Beech DF (1987) An analysis of spatial variation in the nitrogen content of leaves from different horizons within a canopy. *Ann Bot* 60, 421-426
- Cralle HT, Heichel GH (1985) Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa. *Plant Physiol* 79, 381-385
- Dean C, Leech RM (1982) Genome expression during normal leaf development. 2. Direct correlation between ribulose biphosphate carboxylase content and nuclear ploidy in a polyploid series of wheat. *Plant Physiol* 70, 1605-1608
- Douillard R (1984) Tentative estimation of chloroplast and non chloroplast proteins of the leaves of a plant biomass. In: *Advances in photosynthesis research IV* (C Sybesma, ed). Martinus Nijhoff/Dr W Junk La Haye, 165-168
- Douillard R (1985) Propriétés biochimiques et physico-chimiques des protéines des feuilles. In: *Protéines végétales* (B Godon, ed). Technique et documentation, Lavoisier, Paris, 211-244
- Douillard R (1986) Purification et caractérisation électrophorétique de la ribulose-biphosphate carboxylase de luzerne. *Sci Aliments* 6, 81-89
- Edwards RH, Miller RE, de Fremery D, Knuckles BE, Bickoff EM, Kohler GO (1975) Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. *J Agric Food Chem* 23, 620-626
- Ellis RJ (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem Sci* 4, 241-244

- Fauconneau G (1960) Les fractions azotées et les acides organiques des graminées et des légumineuses. *Proc 8th Int Grassland Congr*, Reading, 617-620
- Gastineau I, de Mathan O (1981) La préparation industrielle de la protéine verte de luzerne. In: *Protéines foliaires et alimentation* (C Costes, ed). Gauthier-Villars, Paris, 159-182
- Genier G, Guy P (1975) Critères de rendement et de qualité chez la luzerne. *Fourrages* 562, 35-39
- Gosse G, Chartier M, Lemaire G, Guy P (1982) Influence des facteurs climatiques sur la production de la luzerne. *Fourrages* 90, 113-135
- Grima-Pettenati J, Piquernal M, Latche JC (1987) Proteolytic activities and ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase degradation in leaves of soybean (*Glycine max* L Merrill) with different nitrogen status. *Photosynth Res* 14, 179-189
- Gutek LH, Goplen BP, Howarth RE, McArthur JM (1974) Variation of soluble proteins in alfalfa, sainfoin and birdsfoot trefoil. *Crop Sci* 14, 495-499
- Guy P (1981) La sélection végétale et la production agronomique de protéines foliaires. In: *Protéines foliaires et alimentation* (Costes C, ed). Gauthier-Villars, Paris, 121-147
- Guy P, Genier G, Porcheron A (1969) Relation between quality and yield in lucern. Report of the meeting of Eucarpia Fodder Crops Section WPBS, Aberystwyth, April 15-17, 51-55
- Heinrichs DH, Miltimore JE (1970) Variation of fraction 1 protein content in alfalfa. *Can J Plant Sci* 50, 537-539
- Journet M, Bertin G, Guy P, Huguet L (1976) La luzerne : ses modes d'emploi. *Élevage* 51, 41-47
- Knuckles BE, Kohler GO (1982) Functional properties of edible protein concentrates from alfalfa. *J Agric Food Chem* 30, 748-752
- Kobza J, Edwards GE (1987) Influence of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat. *Plant Physiol* 83, 69-74
- Laurell CB (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 15, 45-52
- Makino A, Mae T, Ohira K (1983) Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. Changes in photosynthesis and enzymes involved in carbon assimilation from leaf development through senescence. *Plant Physiol* 73, 1002-1007
- Makino A, Mae T, Ohira K (1984) Changes in photosynthetic capacity in rice leaves from emergence through senescence. Analysis from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, and leaf conductance. *Plant Cell Physiol* 25, 511-521
- Meyers SP, Nichols SL, Baer GR, Molin WT, Schrader LE (1982) Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa. I. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, soluble protein, chlorophyll, and DNA in leaves. *Plant Physiol* 70, 1704-1709
- Multimore JE, McArthur JM, Goplen BP, Majak W, Howarth RE (1974) Variability of fraction 1 protein and heritability estimates for fraction 1 protein and total phenolic constituents in alfalfa. *Agron J* 66, 384-386
- Müller KD, Salnikov J, Vater J (1983) Amino acid sequence of the small subunit of D-ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Nicotiana tabacum*. *Biochim Biophys Acta* 742, 78-83
- Nivison HT, Stocking CR (1983) Ribulose bisphosphate carboxylase synthesis in barley leaves. A developmental approach to the question of coordinated subunit synthesis. *Plant Physiol* 73, 906-911
- Nugent JHA, Jones WT, Jordand J, Mangan JL (1983) Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein, fraction I (18S) leaf protein, bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. *Br J Nutr* 50, 357-368
- Pearce RB, Fissel G, Carlson GE (1969) Carbon uptake and distribution before and after defoliation of alfalfa. *Crop Sci* 9, 756-759
- Pell E, Pearson NS (1983) Ozone-induced reduction in quantity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in alfalfa foliage. *Plant Physiol* 73, 185-187
- Pheloung P, Brady CJ (1979) Soluble and fraction 1 protein in leaves of C₃ and C₄ grasses. *J Sci Food Agric* 30, 246-250
- Prioul JL, Reyss A (1987) Acclimation of ribulose bisphosphate carboxylase and mRNAs to changing irradiance in adult tobacco leaves. *Plant Physiol* 84, 1238-1243
- Prioul JL, Reyss A (1988) Rapid variations in the content of the RNA of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of mature tobacco leaves in response to localized changes in light quantity. Relationships between the activity and quantity of the enzyme. *Planta* 174, 488-494
- Ranty B, Cavalie G (1982) Purification and properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from sunflower leaves. *Planta* 155, 388-391
- Ranty B, Roby D, Cavalie G, Esquerre-Tugaye MT (1987) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in melon infected with *Colletotrichum lagenarium*. Activity, content and rate of synthesis. *Planta* 170, 386-391
- Sheen SJ, Sheen VL (1985) Functional properties of fraction 1 protein from tobacco leaf. *J Agric Food Chem* 33, 79-83
- Singer SJ, Eggman L, Campbell JM, Wildman SG (1952) The proteins of green leaves. IV. A high molecular weight protein comprising a large part of the cytoplasmic proteins. *J Biol Chem* 97, 233-239
- Smith D, Struckmeyer BE (1974) Gross morphology and starch accumulation in leaves of alfalfa plants grown at high and low temperatures. *Crop Sci* 14, 433-436
- Walker DA, Leegood RC, Sivak MN (1986) Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase: its role in photosynthesis. *Phil Trans R Soc Lond B* 313, 305-324
- Yamashita T, Fujino A (1986) Effects of pruning of young and old shoots on ribulose bisphosphate carboxylase and other constituents in leaves of the mulberry tree (*Morus alba* L.). *J Exp Bot* 37, 1836-1841