



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EXPRESION DE RUBISCO ACTIVASA Y SU RELACION CON
LA PRODUCTIVIDAD DEL GRANO DE MAIZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ERIKA VICTORIA ALMERAYA DEL VALLE



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m350894



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

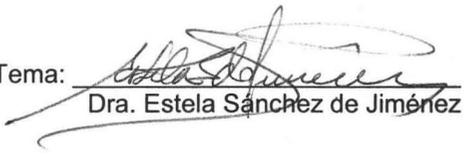
Presidente: Prof. Estela Sánchez Quintanar
Vocal: Prof. Ruth Elizabeth Román Palacios
Secretario: Prof. Raúl Aguilar Caballero

1er. Suplente: Prof. Raquel Ortega Muñoz
2do. Suplente: Prof. Criselda Mendoza Milla.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 103. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema: 
Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Supervisor Técnico: 
M. en C. Raúl Aguilar Caballero

Sustentante: 
Erika Victoria Almeraya del Valle

*Este trabajo está dedicado
con mucho cariño y respeto a mis padres:
Alfonso y Victoria
por su apoyo incondicional
y por su ejemplo de trabajo, amor y lucha.*

*A mis hermanos:
Tere, David, Joel y Alfonso
porque la vida tiene sentido con ustedes*

y a ti Eric por estar siempre a mi lado

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Estela Sánchez por su asesoría, paciencia y ejemplo de disciplina, pero sobre todo porque siempre está dispuesta a compartir su conocimiento.

Al M. en C. Raúl Aguilar porque muy gentilmente siempre estuvo dispuesto a ayudarme.

Al Dr. José Molina Galán del Colegio de Postgraduados porque proporcionó el material biológico que se utilizó en éste trabajo y porque siempre que lo solicité me brindó parte de su tiempo para contestar amablemente todas mis preguntas.

A los profesores que han contribuido a enriquecer mi aprendizaje, especialmente a la profesora Guillermina Salazar Vela quien siempre tuvo para mí palabras de apoyo.

A la profesora Ruth Román Palacios por sus valiosos comentarios para mejorar éste trabajo.

A todas las personas del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, que de alguna u otra forma contribuyeron para que llegase a buen término éste trabajo: Al Dr. Eleazar por su asesoría durante la primera etapa de ésta Tesis, a Mayte y Francisco Barba quienes me ayudaron con el análisis estadístico.

A Pilo, Dairo, Ernesto, Laura Julieta, Alejandra, Viri, Alex, Miguelito Shingú, y Agustín, por su bonita amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio con quienes compartí día con día cada logro: Homero, Hilda, Jess, Lourdes, Luis, Miriam, Ricardo, Sra. Andrea, César, Augusto, Julissa, Katy, Cesy, y Carlos.

Porque lo que empieza bien, termina mejor, gracias Norma y Esme por su amistad y solidaridad, sin ustedes no habría sido tan divertido, Rebe llegaste a tiempo gracias por ser un amistoso y buen saltamontes, a Martín por su apoyo y amistad mil gracias.

Desde luego deseo agradecer de todo corazón a mis amigos: Mao, José Luis, Vicente, y Omar porque he compartido con ellos mi estancia en ésta facultad de principio a fin!!!! a Pancho, porque aparece justo en los momentos más desesperados, a Eric por toda la paciencia y buena onda que demostraste cuando borré mi tesis, gracias por volver a escribir gran parte de la misma, a Karlita, Miguelito, Emilio, Carlitos, Valeria, Myrna, Mario Vela, Pedrito (por poco te olvido), Quique, Mario Neri, Fernando, Vero, Ginori, Alejandro, Vane, y Juan porque no hay lugar de ésta facultad que no traiga a mi memoria un recuerdo divertido en el que estén uno, algunos o TODOS!! ustedes.

...a mis amigas de toda la vida Jessica, Liliana y Teresa por estar siempre en los momentos más importantes.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	8
El maíz como cultivo.....	8
Mejoramiento genético y actividad de Rubisco.....	10
Rubisco activasa como reguladora de la actividad de Rubisco.....	13
Características de Rubisco activasa	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Material biológico	16
Purificación de Rubisco activasa de hojas de espinaca	19
Obtención de anticuerpos	20
Título de los anticuerpos	21
Extracción de proteínas	21
Determinación de proteína soluble	22
Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante	23
Western-blot	24

Densitometría	24
Manejo de datos	25
Evaluación del rendimiento	25
Selección de maíz por contenido de Rubisco activasa	26
RESULTADOS	27
Purificación de Rubisco activasa de hojas de espinaca.....	27
Obtención de anticuerpos	32
Título de los anticuerpos	32
Cuantificación de Rubisco activasa de maíz.....	34
Distribución de frecuencia de los valores de Rubisco activasa..... en las poblaciones Alta RA y Baja RA	37
Evaluación del rendimiento	39
Selección de maíz por contenido de Rubisco activasa	47
DISCUSIÓN	50
Purificación de Rubisco activasa	50
Contenido de Rubisco activasa como característica de selección.....	51
Efecto de la selección por contenido de Rubisco activasa..... en el rendimiento del maíz	52
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.	Estructura de las hojas de las plantas C ₄	11
Figura 2.	Reacción catalizada por Rubisco.....	11
Tabla 1.	Contenido de Rubisco activasa de las plantas seleccionadas a partir de la población original Z ₀	16
Figura 3.	Estrategia experimental realizada durante éste trabajo.....	18
Tabla 2.	Esquema de inmunización.....	20
Figura 4.	Curva de calibración para la cuantificación de proteína total.....	22
Tabla 3.	Marcador de pesos moleculares.....	23
Tabla 4.	Monitoreo del proceso de purificación de Rubisco activasa de espinaca.....	27
Figura 5.	Absorbancia de fracciones que eluyeron de la columna Sephadex G-25.....	29
Figura 6.	Absorbancia de las fracciones eluidas con el gradiente de KCl.....	30
Figura 7.	Resultado del proceso de purificación. Tinción con rojo de Ponceau.....	31
Figura 8.	Análisis del título de los anticuerpos; Técnica Elisa – Dot.....	32
Figura 9.	Análisis por Western – blot del título de los anticuerpos.....	33
Figura 10.	Análisis por Western – blot del contenido de Rubisco activasa en el Ciclo agrícola 2003.....	35
Figura 11.	Análisis por Western – blot del contenido de Rubisco activasa en el Ciclo agrícola 2004.....	35
Tabla 5.	Promedios y desviación estándar de los lotes Alta RA y Baja RA en los ciclos agrícolas 2003 y 2004.....	36

Figura 12.	Distribución de frecuencia del contenido de.....	38
	Rubisco activasa en los lotes Alta y Baja RA (Población Z1) de los ciclos agrícolas 2003 y 2004	
Figura 13.	Frecuencia absoluta acumulada del.....	42
	rendimiento de los lotes Alta RA y Baja RA en el ciclo agrícola 2004	
Tabla 6.	Altura y peso promedio por mazorca.....	42
	de los lotes Alta RA y Baja RA	
Tabla 7.	Altura y cantidad relativa de Rubisco activasa.....	43
	de 23 plantas seleccionadas aleatoriamente del lote Alta RA, ciclo agrícola 2004	
Tabla 8.	Altura y cantidad relativa de Rubisco activasa.....	44
	de 23 plantas seleccionadas aleatoriamente del lote Baja RA, ciclo agrícola 2004	
Figura 14.	Contenido relativo de Rubisco activasa.....	45
	y altura promedio de plantas seleccionadas aleatoriamente (ciclo agrícola 2004)	
Figura 15.	Distribución de la altura de una muestra aleatoria.....	46
	de los lotes Alta RA y Baja RA, ciclo agrícola 2004	
Figura 16.	Distribución de frecuencia de contenido.....	46
	de Rubisco activasa en una muestra aleatoria de cada lote del ciclo agrícola 2004	
Tabla 9.	Grupo de plantas seleccionadas por su alto.....	48
	contenido de Rubisco activasa, a partir del lote Alta RA (ciclo agrícola 2004)	
Tabla 10.	Grupo de plantas seleccionadas por su bajo.....	48
	contenido de Rubisco activasa, a partir del lote Baja RA (ciclo agrícola 2004)	
Figura 17.	Distribución de frecuencia del peso.....	49
	de mazorca de los lotes Alta RA y Baja RA, ciclo agrícola 2004	

ABREVIATURAS

AAA ⁺	ATPasas asociadas a una variedad de actividades celulares
ADP	Adenosín difosfato
Alta RA	Lote de plantas de maíz obtenido a partir de la selección de plantas con alto contenido de Rubisco activasa
ATP	Adenosín trifosfato
Baja RA	Lote de plantas de maíz obtenido a partir de la selección de plantas con bajo contenido de Rubisco activasa
BSA	Albúmina sérica bovina
DTT	Ditiotreitol
kDa	kilo daltones
mA	miliamper
msnm	metros sobre el nivel del mar
nm	nanometros
N	Norte
ODU	Unidades de densidad óptica
PEG	Polietilenglicol
PEPcasa	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PVDF	Difluoruro de polivinildieno
RA	Rubisco activasa

Rubisco	Ribulosa 1,5- bifosfato carboxilasa/oxigenasa
RUBP	Ribulosa bifosfato
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecildisulfato de sodio
UTR	Región no traducible
W	Oeste
Z ₀	Población de maíz sin ningún ciclo de selección
Z ₁	Población de maíz con un ciclo de selección

RESUMEN

El maíz es una planta cultural en el sentido más profundo del término, porque existe debido a la intervención inteligente y oportuna del hombre, quien lo domesticó hace más de cinco mil años. En México (cuna del maíz) el maíz es claramente el cultivo más importante, sin embargo las crecientes importaciones del grano han despertado interés por conservar y mejorar los maíces nativos.

En éste contexto, los esfuerzos han sido diversos por entender los mecanismos de mejoramiento del cultivo de maíz.

Éste trabajo expone los resultados de la aplicación de un método de selección basado en el contenido de Rubisco activasa (chaperona molecular encargada de activar a Rubisco) en maíz que permite obtener en forma muy eficiente plantas con alta capacidad de expresión de Rubisco activasa tomando como base de partida los resultados que con anterioridad se obtuvieron en éste laboratorio y que demuestran que en plantas mejoradas de maíz por el método de Selección Masal Visual Estratificada; la cantidad de Rubisco (la enzima clave de la fotosíntesis) permanece constante, mientras que la cantidad de Rubisco Activasa aumenta significativamente.

La estrategia de investigación fue partir de la variedad de maíz Zacatecas 58 original (Z_0) en la cual se hizo selección masal para alto contenido de Rubisco Activasa (**Alta RA**) y bajo contenido de Rubisco Activasa (**Baja RA**).

Como su nombre lo indica, la selección para Alta RA consistió en seleccionar los granos de maíz de plantas con un elevado contenido de Rubisco activasa; y el lote Baja RA se obtuvo de seleccionar los granos de plantas de maíz con bajo contenido de Rubisco activasa.

Los resultados obtenidos indican que en maíz, la característica de selección por Rubisco activasa se mantuvo de un ciclo de mejoramiento a otro y además el incremento de Rubisco activasa se relacionó positivamente con la longitud de las plantas.

INTRODUCCIÓN

Las diversas formas de uso del maíz y su amplia capacidad de adaptación, hacen de ésta planta uno de los cultivos de mayor importancia económica y cultural para la humanidad, en especial para países como México, en donde el maíz ocupa un lugar privilegiado por ser la base de la alimentación de su población. Por éste motivo la búsqueda del mejoramiento en la productividad de la planta es un tema de gran interés.

Se sabe que la selección masal y visual, que consiste en seleccionar año con año las mejores mazorcas en cuanto a peso y apariencia; ha sido un sistema de mejoramiento efectivo comúnmente usado por los agricultores para obtener variedades con alta capacidad de rendimiento, sin embargo algunas modificaciones sustanciales al método tradicional han hecho posible mejorar en forma muy considerable su eficiencia y por tanto el avance genético del maíz. (Molina-Galán, 1983)

Trabajos de investigación previos realizados en plantas adultas mostraron que a medida que una variedad de maíz es mejorada en cuanto a la eficiencia de su rendimiento, su contenido de Rubisco activasa aumenta en la hoja superior a la mazorca (Morales A. *et. al.* 1999); surgiendo de aquí la idea de seleccionar el maíz por su contenido de Rubisco activasa.

Por tanto se puede considerar que al seleccionar maíz por contenido de Rubisco activasa se obtendrían plantas con mayor expresión del gen que codifica para dicha proteína y por tanto plantas con mayor rendimiento en grano.

La relación entre mejoramiento de maíz y Rubisco activasa, se explica a partir del hecho de que el aumento de la cantidad de Rubisco activasa en las hojas de maíz corresponde al incremento de la actividad de Rubisco (Martínez-Barajas *et al.* 1997) enzima que cataliza la fijación fotosintética del CO₂. Al proporcionar a la planta mayor capacidad para asimilar el CO₂ se espera que el rendimiento de la planta sea mejor, porque el rendimiento final de los cereales está determinado por factores como la

disponibilidad y la habilidad de acumular nutrientes, así como la translocación de los mismos (Daie, 1985).

Los resultados de éste trabajo exponen el efecto de un modelo de selección por Rubisco activasa en maíz que permita lograr más eficientemente la obtención de plantas con mayor capacidad de expresión de Rubisco activasa.

Para este efecto el diseño experimental incluyó la obtención de dos lotes de maíz *autofecundados, con un ciclo de selección (Z_1) realizado en base al contenido de Rubisco activasa.

Éstos lotes, que a lo largo del trabajo se designaron como Alta RA (alta Rubisco activasa) y Baja RA (baja Rubisco activasa), se generaron a partir de una variedad original de maíz Z_0 y difieren en la característica de su selección. Como su nombre lo indica el lote Alta RA es producto de la siembra de granos de maíz de plantas que se seleccionaron por su elevado contenido de Rubisco activasa; y el lote Baja RA se obtuvo al sembrar granos de plantas de maíz con bajo contenido de Rubisco activasa.

Con éste trabajo se pretende aportar conocimiento para obtener un método de selección, en base a parámetros bioquímicos que puede utilizarse en la búsqueda de semillas con mayor capacidad de producción.

*Autofecundación significa que el polen de una planta se depositó en los estilos de la misma planta.

Z_0 , Z_1 El subíndice indica el número de ciclos de selección

ANTECEDENTES

El maíz como cultivo.

Desde su domesticación en tierras mesoamericanas, el maíz se asentó en diferentes partes del mundo y en la actualidad es el tercer producto agrícola en el mundo después del arroz y el trigo, considerando la superficie cultivada.

Según datos del Foreign Agricultural Service (Servicio de Agricultura Exterior), publicados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante el ciclo octubre 2003 - septiembre 2004, la producción mundial de maíz fue de 706.4 millones de toneladas, de las cuales México aportó un 3.1 % muy por debajo de la producción de Estados Unidos, China, Unión Europea y Brasil. Resulta increíble que México, cuna del maíz, dependa ahora de las importaciones del grano para satisfacer las demandas del país. Tan sólo del 1° de enero al 31 de diciembre del 2003 se importaron 5,724.8 toneladas de maíz procedente de Estados Unidos y en la primera mitad del 2004 se importaron 2,532.7 toneladas. (Fuente: SAGARPA Boletín semanal, 29 de marzo del 2005, consultado en Internet).

No obstante, el maíz es el cultivo más importante de México, tanto por sus enormes vínculos con la cultura del país, como por su consumo alimentario e industrial (Sin maíz no hay país, 2003).

En éste contexto es de suma importancia buscar métodos que estén encaminados hacia la obtención de variedades de maíz más productivas que satisfagan tanto al sector alimentario como al sector industrial, y así mismo que se apoyen en los conocimientos milenarios adquiridos por los campesinos en la adaptación evolutiva de ésta especie y en la ciencia moderna desarrollada en nuestro país.

Ésta problemática ha sido abordada en diferentes formas. A mediados del siglo XX se impulsó un movimiento que se conocería después como Revolución verde, y que consistió en la introducción de variedades autóctonas de México en países del tercer mundo, así como maquinaria y agroquímicos para aumentar el rendimiento de los cultivos. El resultado fue bueno por un tiempo, pero después trajo

consigo la disminución de la producción por erosión, pérdida de fertilidad o contaminación del suelo. (Singh R.B., 2000).

Actualmente existen grupos y comunidades que están orientando sus esfuerzos hacia la agricultura orgánica y el policultivo, los resultados son lentos después de años de fertilización química y de erosión del ambiente. Se trata de una labor de largo plazo que implica una gran inversión en fuerza de trabajo, dificultando su aplicación en grandes extensiones.

En las dos últimas décadas del siglo XX los avances de la ingeniería genética han abierto una nueva era agrícola: la Revolución Biotecnológica, la cual ofrece un conjunto de técnicas que permiten modificar la herencia de los seres vivos y producir nuevos organismos con combinaciones novedosas de material genético. Sin embargo la incertidumbre acerca de los efectos a largo plazo que éstas innovaciones puedan tener ha despertado inquietudes y malestar en algunos sectores de la población mundial, que ha dificultado su estudio objetivo.

En 1983 Molina Galán reportó un método de selección masal visual estratificada (Molina-Galán, 1983), que se basa en el método de selección tradicionalmente usado por los campesinos, pero con algunas modificaciones que permiten disminuir el tiempo de mejoramiento del rendimiento de maíz. Básicamente consiste en sembrar granos seleccionados masal y visualmente en lotes aislados en tiempo o espacio y divididos en sublotés, aplicando una presión de selección del 5% por cada 6000 plantas, con el fin de disminuir la variabilidad fenotípica y lograr un mayor avance genético por ciclo de selección. A través de éste método de selección los incrementos en el rendimiento se han sostenido en 3.9 % por ciclo de selección.

Mejoramiento genético y actividad de Rubisco.

La fotosíntesis es un proceso que realiza un grupo diversificado de organismos que incluye cianobacterias, algas verdes y plantas, para transformar la energía luminosa en energía química mediante la participación de muchas proteínas y moléculas pequeñas, que constituyen el aparato fotosintético. (Mathis P. and Paillotin G., 1981).

Dentro de la fotosíntesis, la fijación del CO₂ es un factor muy importante para las plantas porque representa la fuente de los carbohidratos de los que dispondrá para su desarrollo (Lorimer, U. K., 1981). En términos del mejoramiento de cultivos de interés alimentario y comercial, la eficiencia en la fijación del CO₂ es también una etapa muy importante porque junto con la distribución de los fotosintatos, representan las bases fisiológicas para aumentar la capacidad de rendimiento de las plantas (Gifford and Evans, 1983).

En el maíz la fijación del CO₂ se lleva a cabo mediante la vía fotosintética tipo C₄ (Edwards G. E. and Huber S. C., 1981) con la participación de dos enzimas fundamentales: la PEPcase (fosfoenol piruvato carboxilasa) y la Rubisco (Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa).

La vía fotosintética C₄ en términos generales consiste en dos fases importantes que se llevan a cabo en diferentes tipos de células: la carboxilación por la PEPcase en las células mesofílicas y, en el haz de las células en vaina la descarboxilación, que trae consigo la liberación de CO₂ que vuelve a ser fijado por la reacción de la Rubisco para incorporarse al ciclo de reducción de las pentosas fosfato (Edwards G. E. and Huber S. C., 1981), (Horton, H. R. 1995).

Corte de hoja C₄

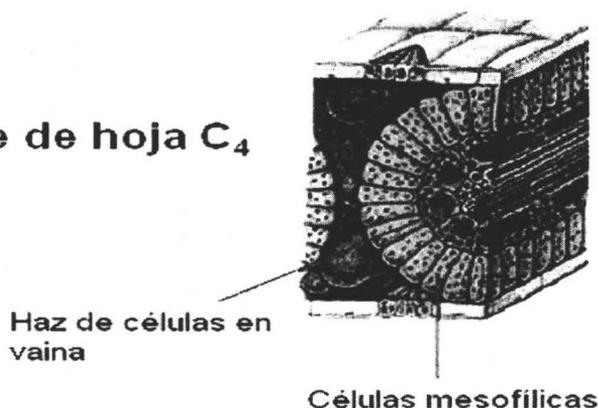


Figura 1. Ilustración de la estructura de las hojas de las plantas C₄. El haz de células en vaina de las plantas C₄ contienen cloroplastos y están rodeadas por completo de células mesofilas. La fijación de CO₂ catalizada por la Rubisco se lleva a cabo en las células en vaina.

La reacción catalítica de la Rubisco consiste en la condensación del CO₂ con ribulosa-1,5-bisfosfato para formar un compuesto de transición de seis carbonos que se hidroliza rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

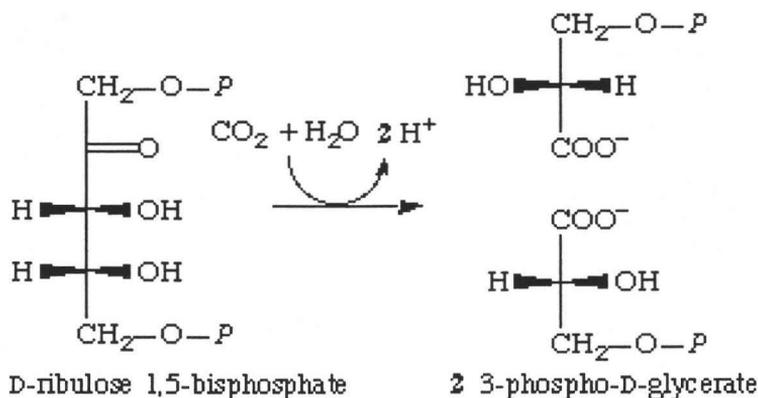


Figura 2. Reacción catalizada por la Rubisco (Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa). Comprende la condensación de CO₂ con una molécula de ribulosa 1,5-bisfosfato.

La enzima Rubisco está regulada tan estrictamente que la disminución de su actividad puede limitar la velocidad de asimilación del CO₂. Dentro de la gran cantidad de factores que regulan la actividad de Rubisco se encuentra la luz, el estado metabólico, las condiciones ambientales, la disponibilidad de CO₂ y la presencia de agentes oxidantes. Además en el caso particular del maíz, la actividad de Rubisco es también regulada por la velocidad de síntesis de la proteína durante el desarrollo temprano de plántulas (Loza-Tavera, 1992).

En 1994 se reportó que los cambios en la actividad de Rubisco en plantas de maíz, durante el periodo de llenado de grano y en la recuperación de su actividad después de haber sido desnaturalizada por calor, correlaciona con la cantidad de una proteína llamada Rubisco activasa (Martínez-Barajas, 1994).

Rubisco activasa, como su nombre lo indica es capaz de activar a la Rubisco, esto se confirmó en estudios donde se midió directamente la fotosíntesis y la actividad de la enzima Rubisco en cinco poblaciones de maíz mejoradas a lo largo de 23 años de acuerdo a los criterios de selección masal visual estratificada. En dichos estudios se observó que la actividad de Rubisco se incrementa gradualmente observando un máximo de su actividad y de la fotosíntesis neta de la planta, en la población con 23 años de mejoramiento. Empero, el incremento de la actividad de Rubisco no se explicó en términos de su concentración, pues en todas las poblaciones que se estudiaron se observó que la cantidad de Rubisco permaneció constante y en exceso debido a que una parte considerable de ella es inactiva; por otra parte la cantidad de la proteína Rubisco activasa se incrementó proporcionalmente con el grado de mejoramiento de cada población (Morales A. *et.al.* 1999).

Rubisco activasa como reguladora de la actividad de Rubisco.

Rubisco activasa es una proteína que desde 1982 se reportó como un elemento importante en la activación de la enzima Rubisco (Somerville *et al.*, 1982). Pero fue hasta 1985 cuando se identificó en plantas de *Arabidopsis thaliana* con deficiencia en la actividad de Rubisco, que dicha deficiencia estaba relacionada con la ausencia de dos proteínas con masa molecular aproximada de 47 y 50 KDa (Salvucci and Ogren, 1985).

La falta de éstas proteínas no permitía que la Rubisco se activara cuando las plantas se pasaban de oscuridad a luz; problema que fue superado cuando los extractos de plantas mutantes se complementaron con una fracción desprovista de Rubisco que se obtuvo a partir de plantas de espinaca o de *Arabidopsis* (Salvucci and Ogren, 1985).

Poco después se estableció que la activación de Rubisco mediada por Rubisco activasa, es un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP (Streusand and Portis, 1987).

Posteriormente, se demostró que en una población de maíz genéticamente mejorada, el incremento de la actividad de la enzima Rubisco correlacionaba directamente con la cantidad de Rubisco activasa, sin embargo éstas observaciones por sí mismas no indicaban el papel que desempeñaba Rubisco activasa como mediadora de la actividad de Rubisco.

No fue sino hasta 1995 cuando un trabajo publicado por éste laboratorio reportó que Rubisco activasa actúa como chaperona molecular de Rubisco, al facilitar a través de la inducción de cambios conformacionales, la liberación de la enzima de un complejo inactivo con Ribulosa 1-5, bifosfato (RuBP) (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1995).

El nombre de chaperonas moleculares se aplica a un grupo heterogéneo de proteínas que tienen la capacidad de unirse reversiblemente a proteínas parcialmente estructuradas evitando la formación de estructuras que aunque pueden ser energéticamente más favorables, no llevan a cabo su función biológica. Ésta familia de proteínas posee características comunes, entre las cuales se reportan: la

formación de agregados de alto peso molecular, la actividad ATPasa dependiente, su síntesis estimulada transitoriamente por temperaturas elevadas y su capacidad para inducir la recuperación de la actividad de su blanco cuando éste se ha sometido a condiciones normalmente desnaturalizantes (Ellis and van der Vies, 1991).

Características de Rubisco activasa

Rubisco activasa es una proteína cloroplástica con actividad de chaperona molecular, constituida por dos polipéptidos de masa molecular aproximada de 41 y 45 kDa dependiendo de la especie; en espinaca las masas moleculares de sus subunidades son 41 y 45 KDa (Robinson *et al.*, 1988), mientras que en maíz son de 41 y 43 KDa (Martínez-Barajas *et al.*, 1997).

La actividad de ATPasa al igual que la capacidad de activar los complejos Rubisco-RuBP es estrictamente dependiente de ATP y es inhibida por ADP, además tiene un alto requerimiento de Mg^{2+} que puede ser parcialmente sustituido por otros cationes divalentes (Robinson and Portis, 1989).

Rubisco activasa es una proteína que de acuerdo a su secuencia ha sido clasificada dentro del grupo de las proteínas AAA⁺ (ATPasas asociadas a una variedad de actividades celulares), las cuales comparten la característica de poseer dominios de ATPasas conocidos como módulos AAA⁺, éste tipo de proteínas constituyen un nuevo grupo de chaperonas moleculares capaces de inducir un cambio conformacional en estructuras moleculares o macromoleculares (Hanson P. and Whiteheart S. 2005).

Rubisco activasa de maíz es codificada por dos genes: *Zmrca1* y *Zmrca2*, con diferencias en el tamaño de la región no traducible del extremo 3' (3' UTR).

Sin embargo, los dos transcritos de Rubisco activasa, cada uno expresado a partir de su gen correspondiente, poseen la misma región codificadora o marco de lectura abierto idéntico y no muestran posibles sitios de empalme en sus regiones 3', éste marco de lectura abierto codifica solamente al polipéptido maduro de 43 KDa (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Recientemente se propuso que el polipéptido de 41 KDa en maíz es el resultado de un procesamiento postraduccional para regular la actividad de Rubisco activasa (Vargas-Suárez *et al.*, 2004).

HIPÓTESIS

Dados los antecedentes presentados acerca de la correlación entre el incremento en la producción de las plantas de maíz seleccionadas y el aumento en la cantidad de Rubisco activasa, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

“Las plantas de maíz seleccionadas por alto contenido de Rubisco activasa mantienen su característica de selección y además son más productivas que las plantas seleccionadas por bajo contenido de Rubisco activasa”.

OBJETIVOS

En base a la hipótesis se plantean los siguientes objetivos para el desarrollo de la presente investigación:

Objetivo general.

Conocer si es posible seleccionar plantas de maíz por su alto contenido de Rubisco activasa que correspondan con una mayor capacidad de incrementar su rendimiento en grano.

Objetivos particulares.

- ✓ Establecer las condiciones experimentales apropiadas para identificar y analizar semi-cuantitativamente Rubisco activasa de maíz.
- ✓ Comparar el rendimiento de lotes de plantas que difieren en su selección por contenido de Rubisco activasa.
- ✓ Evaluar el efecto que ocasiona la selección por Rubisco activasa sobre el rendimiento y la expresión de Rubisco activasa en la hoja bandera de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.

Inicialmente, de la variedad Zacatecas 58 original (Z_0) se tomó en cada una de 100 plantas, proporcionadas por el Dr. José Molina Galán del Colegio de Postgraduados; una fracción de la hoja inmediata superior al jilote de la planta y se analizó el contenido de Rubisco activasa en cada una de ellas.

A partir de dicho análisis fueron seleccionadas las 10 plantas con el contenido más alto de Rubisco activasa, así como las 10 plantas con el contenido más bajo de Rubisco activasa.

(Trabajo realizado en el año 2002 por la tesista Jessica Lozano Franco).

Tabla 1. Contenido de Rubisco activasa de las plantas seleccionadas a partir de la población original Z_0

Grupo de plantas seleccionadas Alto contenido de Rubisco activasa		Grupo de plantas seleccionadas Bajo contenido de Rubisco activasa	
Número de muestra	Cantidad de Rubisco activasa (Unidades de densidad óptica/mm ²)	Número de muestra	Cantidad de Rubisco activasa (Unidades de densidad óptica/mm ²)
66	2315.81	71	12.22
61	1893.46	83	34.79
59	1714.41	81	61.18
99	1693.77	23	89.03
95	1653.35	33	170.29
97	1465.12	6	243.80
96	1401.29	8	309.89
65	1356.92	3	364.01
40	1022.37	69	388.60
70	1095.50	42	469.84

*Nota.- Análisis densitométrico de geles revelados para Western-Blot

El trabajo de campo se realizó en el campo experimental de Montecillo del Colegio de Postgraduados localizado a 19°53'N y 98°53'W a 2245 msnm, y el análisis de la Rubisco activasa en el Laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la UNAM.

Con los granos de las 10 plantas con más alta RA se formó un compuesto balanceado con igual número de granos de cada planta, y otro con igual número de granos de las plantas con más baja RA, en los ciclos agrícolas 2003 y 2004.

Las plantas que resultaron de la siembra de cada grupo constituyeron el material biológico de la presente tesis y a lo largo del escrito se designaron como lote **Alta RA** y **Baja RA** dependiendo de si corresponden a las plantas seleccionadas por alto o bajo contenido de Rubisco activasa.

En la figura 3 se representan los pasos que se realizaron a partir de la variedad original (Z_0) y después a partir de los lotes Alta RA y Baja RA del año 2004; éstas últimas se describen detalladamente más adelante.

Las muestras de hoja se tomaron 24 días después de la floración masculina o antesis entre las 7:00 y las 8:00 AM en cada ciclo agrícola. El estudio se hizo específicamente en la hoja que se indica porque se sabe que es una de las que participan más activamente durante la etapa de llenado de grano (Loza-Tavera *et al.*, 1990).

En total se muestrearon 68 y 65 hojas en el lote Alta RA y Baja RA, respectivamente en el ciclo agrícola 2003 y en el caso del ciclo agrícola 2004 se muestrearon 82 hojas en el lote alta RA y 49 en el lote Baja RA.

* Z_n , el subíndice indica el número de ciclos de selección.

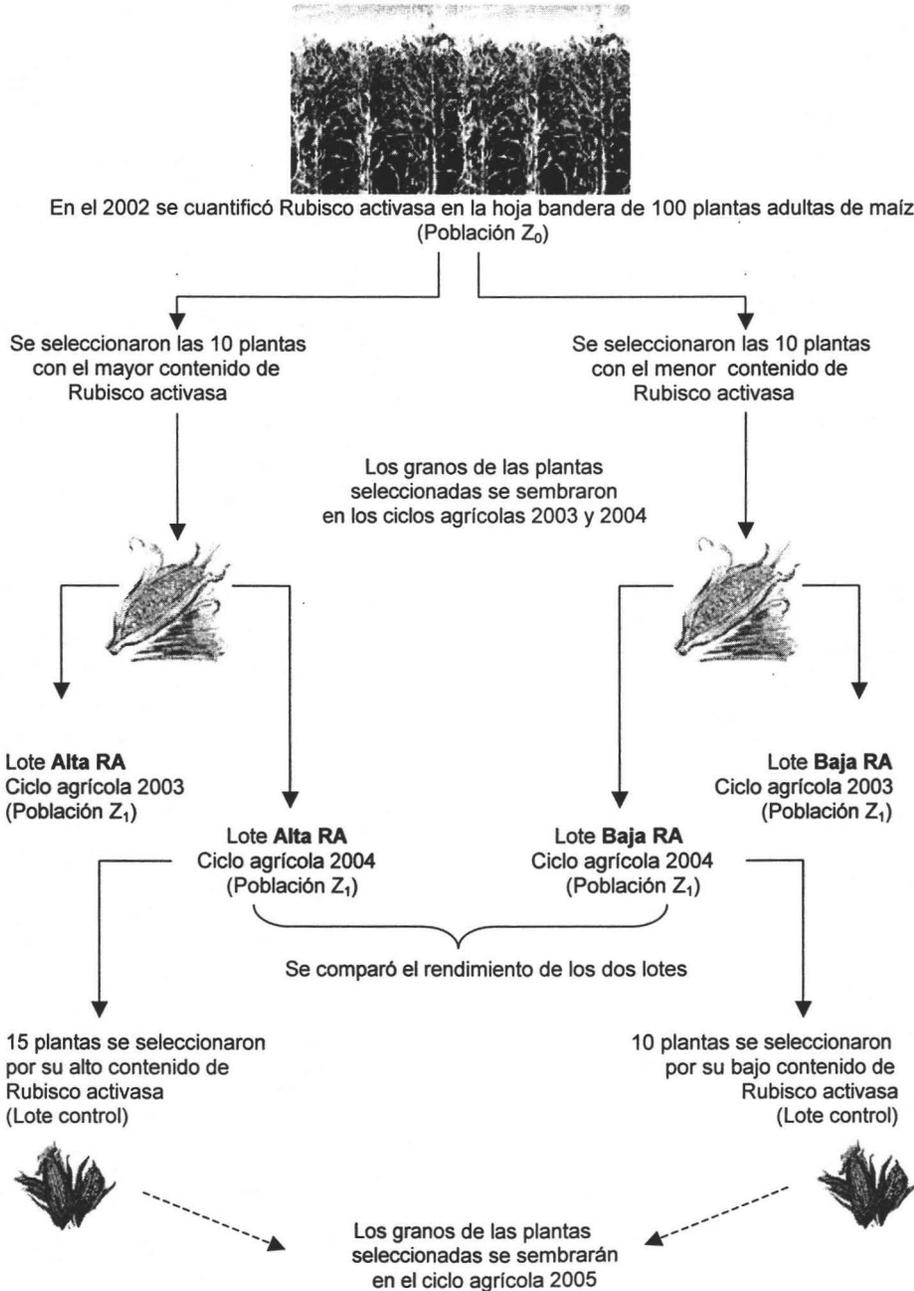


Figura 3. Estrategia experimental realizada durante éste trabajo

Purificación de Rubisco activasa de hojas de espinaca.

Se aisló Rubisco activasa a partir de hojas de espinaca, para generar anticuerpos específicos contra Rubisco activasa. El proceso se realizó según el método descrito por Robinson *et al.* (1988).

Cien gramos de hojas de espinaca se trituraron con N₂ líquido y se añadieron 200 ml de buffer de extracción (Tricina-NaOH pH 8.1 160 mM, MgCl₂·6H₂O 7.7 mM, NaHCO₃ 16.6 mM, EDTA 5 mM, Benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, y β-mercaptoetanol 10 mM), de ésta forma se mantuvo con agitación magnética durante 25 minutos a 4 °C y transcurrido el tiempo de agitación se filtró con 2 capas de Miracloth, posteriormente se centrifugó (Rotor SS – 34, centrífuga Sorvall RC-5B) a 15,000 rpm por 30 minutos para separar el sobrenadante, al cual se le agregó (NH₄)₂SO₄ saturado hasta 35% de saturación. En seguida se centrifugó (Rotor SS – 34, centrífuga Sorvall RC-5B) a 9,000 rpm durante 15 minutos y la pastilla se resuspendió en el mínimo de buffer A (KCl 100 mM, Bis – Tris –propano 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.2 mM, pH 7).

El resuspendido se pasó por una columna Sephadex G – 25, (50 cm x 1.5 cm) y en cada fracción eluida se leyó absorbancia a 280 nm, las lecturas se graficaron y la primer fracción que mostró la gráfica se concentró usando un equipo de vacío (Speed Vack). Posteriormente se diluyó en un volumen igual de buffer Y (Bis–Tris–propano 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.2 mM, pH 7) y se ultracentrifugó (Rotor 75 Ti, Beckman XL-100) a 30,000 rpm por 1 hora, el sobrenadante se fraccionó con una columna Q – Sepharosa (9 cm x 1 cm) usando un gradiente lineal de KCl 500 mM, sabiendo de antemano que Rubisco activasa es la proteína mayoritaria cuando la elución se efectúa en el intervalo de 200 a 250 mM de KCl (Robinson *et al.* 1988). Se juntaron las fracciones que fluyeron en dicho intervalo y se dializaron para eliminar por completo el KCl, posteriormente se concentraron a 4° C usando PEG (Polietilenglicol).

Para analizar el resultado del proceso de purificación se realizó una electroforesis (Laemmli 1970) con 8.5% de acrilamida y 0.2% de bis acrilamida en la que se incluyó un marcador de pesos moleculares con un rango de 14 kDa a 66 kDa; el gel se transfirió utilizando un equipo de transferencia semiseco (LKB, 2117 Multiphor II, Suecia) a una membrana hidrófoba de difluoruro de polivinildieno (PVDF), con poros de 0.45 μm que se tiñó con rojo de Ponceau.

Obtención de anticuerpos.

Con la proteína purificada se obtuvieron anticuerpos contra la Rubisco activasa de espinaca siguiendo el esquema de inmunización que a continuación se describe:

Tabla 2. Esquema de inmunización

Semana	* Proteína en buffer Y (0.35 mg/ml)	+	adyuvante (Gibco BRL®)	Inyección
Primera	1.4 ml	+	1.4 ml	subcutánea
Segunda	1.4 ml	+	1.4 ml	Intramuscular
Tercera	1.4 ml	+	1.4 ml	Intramuscular
Cuarta	DESCANSO			
Quinta	SANGRIA DE PRUEBA			
▶ refuerzo	2.8 ml	+	2.8 ml	intraperitoneal
Sexta	SANGRIA DE PRUEBA			
▶ siguiente día	SANGRIA DE COSECHA			

* La composición del Buffer Y se describe en la sección "Purificación de Rubisco activasa de hojas de espinaca"

La inmunización se llevó a cabo en un conejo tipo Nueva Zelanda, sexo masculino, de 3 kg de peso.

Título de los anticuerpos.

Con la finalidad de conocer la dilución adecuada de los anticuerpos, se realizó un análisis de Elisa – Dot que consistió en incubar el extracto de Rubisco activasa con distintas diluciones del anticuerpo en membranas de Nitrocelulosa (Pharmacia), tamaño de poro 0.45 μm previamente saturadas con albúmina al 1% en PBS (NaCl 13.6 mM, KCl 0.2 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.2 mM, KH_2PO_4 0.13 mM, CaCl_2 0.9 mM) durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente cada membrana se incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Zymed) a dilución 1:1000 por dos horas a temperatura ambiente. Entre cada etapa del análisis se efectuaron 3 lavados con Tween 20 al 0.05% en PBS. La inmunodetección se visualizó al agregar 4 – cloro -1- naftol sobre la membrana hasta que se observó la formación de color y se detuvo la reacción con H_2O destilada.

Por último, se realizaron análisis por Western – Blot (Towbin *et al.* 1979) con diluciones mayores a las que indicó el análisis Elisa – Dot para conocer la dilución óptima del anticuerpo, obteniendo un título de 1:10,000.

Extracción de proteínas.

De cada una de las hojas de maíz recolectadas se eliminaron cuando fue posible los extremos y se tomó 1g de tejido de la parte central, el cual fue triturado perfectamente con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino, inmediatamente después se agregó 1.5 ml de amortiguador de extracción compuesto por: Tricina-NaOH (pH 8.1) 100 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, NaHCO_3 10 mM, EDTA 5 mM, Benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, y DTT 10 mM. La mezcla tejido-amortiguador, se maceró perfectamente hasta homogeneizarla y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se extrajeron las proteínas directamente al tomar alícuotas que se usaron para cuantificar proteína soluble y para realizar electroforesis en gel de poliacrilamida tal como se describe más adelante.

Determinación de proteína soluble.

La determinación de proteína soluble se llevó a cabo empleando la técnica descrita por Bradford (1976). A partir del sobrenadante de los extractos de cada muestra se tomó una alícuota de 2 μl que se diluyó en 798 μl de H_2O destilada y se hicieron reaccionar con 200 μl de reactivo de Bradford. La lectura de la reacción colorimétrica se realizó a 595 nm.

El valor de absorbancia obtenido se extrapoló en una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA), para obtener la concentración de proteína total expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cada extracto. A continuación se muestra la curva de calibración utilizada en las cuantificaciones:

BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Absorbancia
0	0
5	0.167
10	0.473
15	0.664
20	0.848
25	0.993
30	1.107
35	1.251
40	1.266

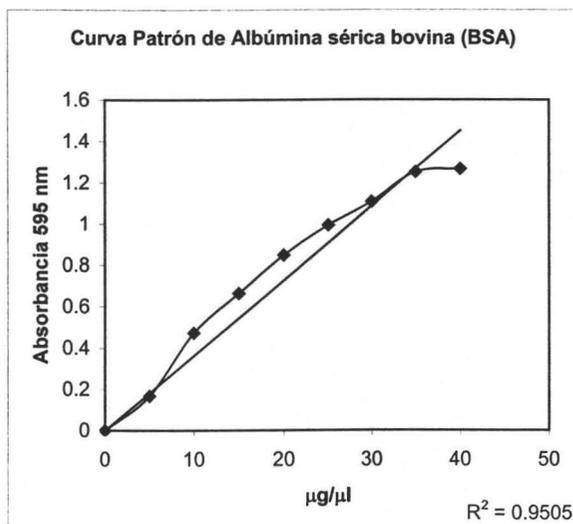


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación de proteína total. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina, para extrapolar en ella las lecturas de absorbancia de cada muestra de acuerdo al método de Bradford (1976)

Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). De cada extracto crudo de las hojas colectadas se tomaron 20 μg (en el ciclo agrícola 2003) u 8 μg (en el ciclo agrícola 2004) de proteína total, a los cuales se les añadió SDS en proporción suficiente para impartir una carga negativa que enmascarase la carga intrínseca de todas las proteínas presentes en el extracto.

A cada extracto con SDS se le agregó H_2O (c.b.p. 30 μl) y se sometieron a un proceso de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 8%, aplicando una corriente de 25 mA; para separar las proteínas del extracto crudo de acuerdo a sus masas moleculares.

En cada gel se añadió como control positivo 20 μg (en el ciclo agrícola 2003) o 5 μg (en el ciclo agrícola 2004) de Rubisco activasa de espinaca y el marcador de pesos moleculares que se describe a continuación:

Tabla 3. Marcador de masas moleculares

Proteínas	Masa Molecular (Da)
Albumin bovine	66000
Albumin egg	45000
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase rabbit muscle	36000
Carbonic anhydrase bovine	29000
Trypsinogen bovine pancreas	24000
Trypsin inhibitor soybean	20100
β -lactalbumin bovine milk	14200

El equipo de electroforesis que se utilizó fue: Mighty Small II SE 250 con un peine para formar 10 pocillos en cada gel.

Western Blot.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Towbin *et al.* (1979) Para detectar específicamente a Rubisco activasa; las proteínas de cada gel fueron transferidas electroforéticamente a una membrana hidrofóbica de difluoruro de polivinildieno (PVDF), de poro de 0.45 μm .

Para la transferencia se aplicó una corriente de 1.5 mA/cm² por 1.5 horas, utilizando un aparato de transferencia semiseco (LKB, 2117 Multiphor II, Suecia).

Una vez que las proteínas fueron transferidas, cada membrana ("blot") se incubó a 37°C por 2 horas, con anticuerpo contra Rubisco activasa de espinaca diluido 1:10,000. Inmediatamente después cada membrana o "blot" se sometió a 2 lavados de 15 minutos cada uno, con TBS-T 0.15M (NaCl 0.15 M, Tris 0.05 M y Tween 20 al 0.1%).

Al concluir la etapa de lavados, cada "blot" se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa: Goat anti Rabbit IgG (H + L) diluido 1:2000 (Zymed). Las membranas fueron nuevamente lavadas y las bandas inmunoreactivas se visualizaron utilizando un sistema de quimioluminiscencia (Amersham ECL) en películas radiográficas (Kodak X – OMAT K).

El tiempo de exposición de las películas radiográficas con el sistema de quimioluminiscencia fue de 20 segundos para todas las membranas.

Densitometría.

La densidad óptica relativa de las bandas obtenidas en cada película fotográfica fue cuantificada mediante análisis densitométrico, usando el equipo Fluor – STM Multimager (Bio Rad^{MR}) y el programa de computadora Quantity One de Bio Rad^{MR}.

Las medidas de densidad óptica se reportan en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (Odu/mm²).

Manejo de datos.

La lectura de densidad óptica de cada una de las muestras se comparó con la lectura densitométrica de su control positivo (20 µg de extracto de Rubisco activasa de espinaca en el ciclo agrícola 2003 o 5 µg en el ciclo agrícola 2004), de tal forma que el valor del control se tomó como 100.

Los datos que se obtuvieron de dicha relación se analizaron en gráficas de frecuencia, en las que se establecieron intervalos de contenido relativo de Rubisco activasa vs. número de plantas que corresponden a dicho intervalo y se compararon los promedios y las desviaciones estándar del contenido de Rubisco activasa en las dos poblaciones de cada ciclo agrícola.

Evaluación del rendimiento.

Para conocer el efecto que sobre el rendimiento de los lotes **Alta RA** y **Baja RA** tuvo la selección por contenido de Rubisco activasa, se compararon sus rendimientos en el ciclo agrícola 2004 empleando curvas de frecuencia absoluta acumulada de cada uno de los parámetros de rendimiento excepto para "Altura de las plantas" y "Peso de mazorcas por lote". El rendimiento se midió en términos de los siguientes parámetros:

- **Peso de la mazorca:** Peso seco de la mazorca, reportado en gramos □ **Peso de grano:** Peso seco de todos los granos de una mazorca, reportado en gramos
- **% de grano:** Relación peso de grano/peso de mazorca * 100
- **Peso de olote:** Peso seco del olote reportado en gramos
- **% de olote:** Relación peso de olote/peso de mazorca * 100
- **Longitud de la mazorca:** Distancia en cm desde la base hasta la punta de la mazorca
- **Diámetro de la mazorca:** Definido como el segmento en cm que une dos puntos de la circunferencia a la mitad de la mazorca
- **Número de hileras:** Cantidad de hileras de granos de maíz por mazorca

- Granos por hilera: Número de granos por hilera
- Altura promedio: Medida en cm desde la base de la planta hasta la base de la espiga, de una muestra aleatoria de 23 plantas por lote
- Peso promedio por mazorca: Promedio del peso seco reportado en gramos, de todas las mazorcas de cada lote

Selección de maíz por contenido de Rubisco activasa.

A partir de la determinación de Rubisco activasa en el ciclo agrícola 2004, se seleccionaron las 15 plantas del lote **Alta RA** que mostraron mayor contenido de Rubisco activasa y las 10 plantas que tuvieron la menor cantidad de Rubisco activasa del lote **Baja RA**. Éste nuevo grupo seleccionado se utilizó como grupo control, para determinar si la selección por contenido de Rubisco activasa, corresponde con el rendimiento esperado y además fue sembrado en el ciclo agrícola 2005 para obtener nuevas plantas, las cuales serán analizadas posteriormente.

RESULTADOS

Purificación de Rubisco activasa de hojas de espinaca.

La purificación se realizó siguiendo el método de Robinson *et al.* (1988) en tres ocasiones, hasta que se obtuvo cantidad suficiente (mínimo 2.5 mg) de Rubisco activasa de espinaca con la pureza requerida para inmunizar un conejo.

En éste trabajo se muestran los resultados de la purificación cuyo aislado cumplió con dichas características. La Tabla 4 describe la evolución de dicho proceso indicando el volumen, cantidad de proteínas y el rendimiento de la muestra a través de las diferentes etapas.

Tabla 4. Monitoreo del proceso de purificación de Rubisco activasa de espinaca

Etapas	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Recuperación (%)
Extracto crudo	174	393.2	100
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8	111.4	28.3
Sephadex G-25	30	114.7	29
Concentración (Speed Vaccum)	11	51.7	13
Ultracentrifugación	19	28.6	7
Q-Sepharosa	16	<i>Indeterminada</i>	<i>Indeterminada</i>
Diálisis y concentración (PEG)	7.5	2.9	0.7

A partir de cien gramos de hojas de espinaca y según indica la Tabla 4, se generaron 174 ml de extracto crudo que contenían 393.2 mg de proteínas solubles las cuales fueron sometidas a un proceso de precipitación para separar principalmente a la enzima Rubisco; después de ésta etapa el precipitado se resuspendió en un volumen de 8 ml, en el que la cantidad de proteína total disminuyó hasta aproximadamente 28% de la cantidad original.

Dicho resuspendido se sometió a un proceso de desalinización a través de la movilización por una columna Sephadex G-25.

La figura 5 muestra las lecturas de absorbancia de cada fracción que se obtuvo al pasar el extracto de proteínas, por la columna Sephadex G-25, en ella se observan claramente dos regiones: la región de interés es la primera porque eluyen en primer lugar las proteínas mayores a 25 kDa (tamaño del poro) y la proteína de interés tiene una masa molecular 45 y 41 kDa; la segunda región que se visualiza corresponde a las proteínas menores a 25 kDa, por tanto las fracciones que se colectaron en la primer región continuaron el proceso de separación. Es importante observar de acuerdo a lo que se reporta en la Tabla 4 que la pérdida de proteínas en el proceso de elución a través de la columna Sephadex G-25, no es significativa, por lo que podría suponerse que éste paso no es un factor crítico en el aislamiento de Rubisco activa, sin embargo ésta etapa fue crucial para la desalinización del extracto que se obtuvo después de la precipitación con sulfato de amonio.

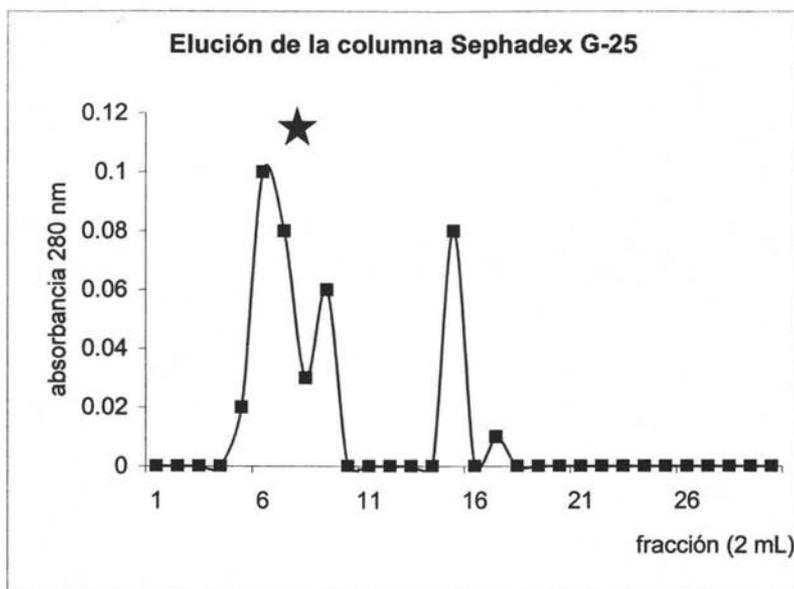


Fig.5. Absorbancia de fracciones que eluyeron de la columna Sephadex G-25. Proteínas de extracto crudo de hoja de espinaca, se sometieron a precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el precipitado que se obtuvo se resuspendió en buffer: KCl 100 mM, Bis - Tris - propano 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.2 mM, pH 7. El resuspendido se fraccionó a través del paso por la columna Sephadex G-25 para eliminar sales remanentes y proteínas menores a 25 kDa.

NOTA: El pico que se señala se tomó para el siguiente paso de la purificación: fracciones 1-13.

Las fracciones 1 a la 13 provenientes de la columna Sephadex G-25 (ver figura 5) se colectaron, para someterse a procesos de concentración y ultracentrifugación, después de los cuales la cantidad de proteínas representaba sólo el 7% de la cantidad original, dichas proteínas se pasaron por la columna de intercambio iónico Q-Sepharosa, midiendo la absorbancia de cada fracción eluida (figura 6) con la finalidad de separar Rubisco activasa, pues de acuerdo a lo que reporta Robinson *et al.* (1988) Rubisco activasa es el constituyente mayoritario después de la precipitación con sulfato de amonio.

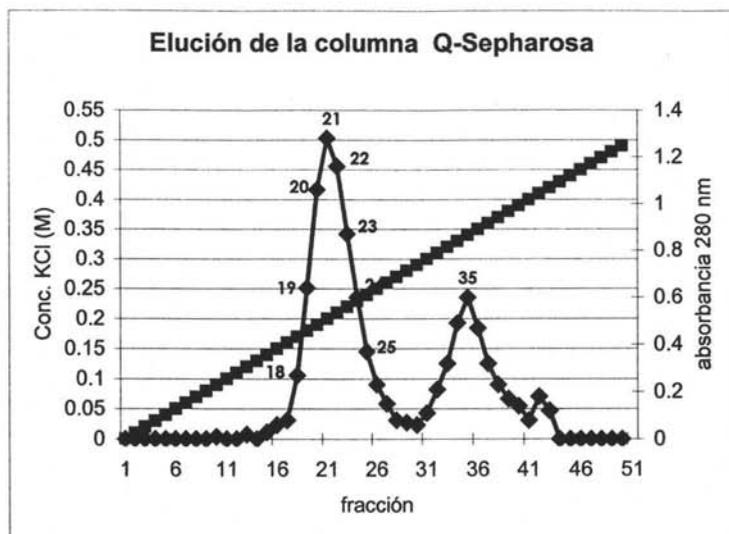


Fig.6. Absorbancia de las fracciones eluidas con el gradiente de KCl. Se separó Rubisco activasa de espinaca utilizando cromatografía de intercambio iónico con columna Q – Sepharosa y gradiente lineal de KCl 500 mM a partir de las fracciones que se colectaron con la columna Sephadex G-25, y que se sometieron a un proceso de concentración y ultracentrifugación con buffer: Bis – tris – propano 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.2 mM, pH 7. En el intervalo 200 - 250 mM de KCl (fracciones 18 - 25) la proteína mayoritaria es Rubisco activasa. (Robinson *et al* 1988)

A partir de los resultados representados en la figura 6 se separaron las fracciones que corresponden a los puntos 18-25, comprendidos entre 0.2 M y 0.25 M de KCl.

Cabe destacar que el máximo de absorción se obtuvo justo en ese intervalo de KCl, lo cual indica que de el total de proteínas presentes en ésta etapa del aislamiento, la mayoría correspondía a Rubisco activasa de espinaca, hecho tal que concuerda con el avance del proceso de purificación.

De las fracciones 18 – 25 se tomaron alícuotas de 25 μ l que se emplearon, junto con un marcador de masa molecular para hacer la electroforesis en gel de acrilamida, dicho gel se transfirió a una membrana que se tiñó con rojo de Ponceau (ver figura 7) para verificar el correcto aislamiento de la proteína de interés, utilizando su masa molecular: 45 y 41 KDa, como parámetro de identificación. (Robinson *et al.* 1988)

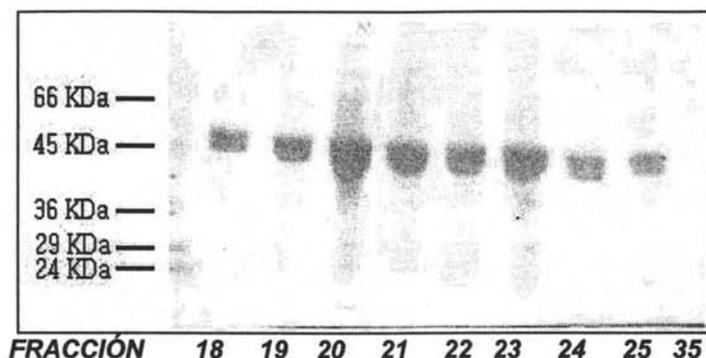


Fig.7. Resultado del proceso de purificación; Tinción con rojo de Ponceau. Se analizaron en un gel de acrilamida que se transfirió a una membrana hidrófoba de polivinildieno, alícuotas de las fracciones 18 -25 que según la gráfica de la cromatografía por intercambio iónico, corresponden a la zona de elución de Rubisco activasa. Se incluyó también la fracción 35 como control negativo. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau y de acuerdo con el marcador de pesos moleculares se estableció que las fracciones 18 - 25 corresponden a Rubisco activasa de espinaca (masa molecular: 45 y 41 kDa).

Una vez localizada la proteína de interés, las fracciones 18-25 se reunieron, dializaron y concentraron hasta obtener un volumen adecuado para el proceso de inmunización, debido a que el conejo no tolera más de 3 ml en cada inyección.

De acuerdo a lo que se reporta en la Tabla 4, en total se purificaron 2.9 mg de Rubisco activasa de espinaca, a partir de cien gramos de hojas de espinaca, lo que representa un rendimiento final de 0.0029%; de acuerdo a lo que reporta Robinson *et al.* (1988) mediante éste método es posible purificar 18 mg de Rubisco activasa a partir de cien gramos de hojas (0.018 %) es decir que se recuperó 16.1% de la máxima cantidad que puede purificarse con éste método.

No obstante, la cantidad y la calidad que se obtuvieron fueron suficientes para la inmunización del conejo.

Obtención de anticuerpos.

Después de realizar el proceso de inmunización descrito en el capítulo MATERIALES Y MÉTODOS, se realizó la sangría de cosecha y se obtuvieron 100 ml de sangre, de los cuales se extrajeron un total de 32 ml de antisero que se alicuotaron y almacenaron a -70°C

Título de los anticuerpos.

Se probaron diversas diluciones del anticuerpo para establecer las condiciones óptimas de identificación de Rubisco activasa de maíz, primero con la técnica Elisa – Dot y después por Western – blot. Figuras 8 y 9 respectivamente.

Con el análisis Elisa –Dot se obtuvieron resultados que indicaron que la detección de Rubisco activasa se puede llevar a cabo con una dilución de hasta 1:8,000 y probablemente con diluciones mayores, por lo cual se buscó de manera más precisa la dilución óptima con la técnica Western-blot.

El resultado fue el que se esperaba debido a que se logró la inmunodetección de Rubisco activasa con diluciones superiores a 1:8,000 (1:10,000 y 1:12,000).

En éste caso la dilución que ofreció mayor claridad en la identificación de Rubisco activasa fue 1:10,000.

Cabe destacar que en ésta etapa del trabajo de investigación se incluyeron muestras de hojas adultas de maíz con objeto de investigar si mediante técnicas de inmunodetección es posible cuantificar Rubisco activasa de maíz, utilizando los anticuerpos generados contra Rubisco activasa de espinaca.

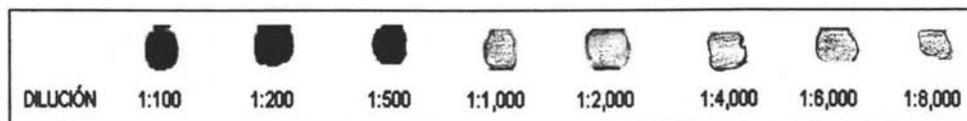
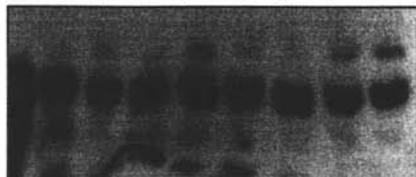
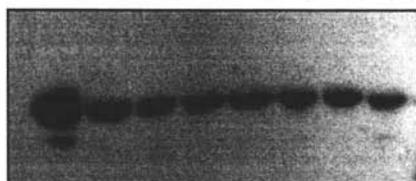


Fig.8. Análisis del título de los anticuerpos; Técnica Elisa – Dot. Extracto de Rubisco activasa de espinaca, fue incubado con distintas diluciones de anticuerpo como se indica en Materiales y Métodos. Todas las diluciones probadas con ésta técnica resultaron positivas en la identificación de Rubisco activasa.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 Carril

*Dilución: 1:8,000*

1 2 3 4 5 6 7 8 Carril

*Dilución: 1:10,000*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 Carril

*Dilución: 1:12,000*

Fig.9. Análisis por Western – blot. Se evaluaron diferentes diluciones del anticuerpo a partir de la última dilución probada con la técnica Elisa – Dot. Se analizaron 20 µg de extracto de Rubisco activasa de espinaca como control positivo (carriles 1 en cada caso) y de extracto crudo de hoja adulta de maíz (carriles 2 en adelante para cada caso).

De acuerdo a los resultados observados se decidió que la inmunodetección de Rubisco activasa de maíz se llevaría a cabo usando anticuerpos específicos contra Rubisco activasa de espinaca diluidos 1:10,000.

Cuantificación de Rubisco activasa de maíz

(Western – blot)

Aproximadamente 2 g de la zona central de la hoja bandera de todas las hojas de maíz que constituían los lotes **Alta RA** y **Baja RA** de los ciclos agrícolas 2003 y 2004 fueron usados para hacer los análisis de Rubisco activasa por electroforesis desnaturizante e inmunodetección.

Las figuras 10 y 11 muestran como ejemplo una de las placas obtenidas para cada lote de los diferentes ciclos agrícolas.

La observación más importante de éstos resultados es que aún cuando se trata de diferentes ciclos agrícolas, la cantidad de Rubisco activasa en los lotes seleccionados por alto contenido de Rubisco activasa resultó ser mayor respecto a los lotes **Baja RA**.

Cabe resaltar también que el análisis de cada ciclo agrícola difiere del otro en la cantidad de extracto protéico que se usó para la inmunodetección, advirtiendo la ventaja de que disminuyendo la cantidad de extracto crudo se disminuye también la detección de otras proteínas que pueden dificultar la cuantificación de Rubisco activasa cuando se hace el análisis densitométrico.

Pero lo que es más importante aún, es que incluyendo esos cambios en el trabajo experimental, la diferencia de contenido de Rubisco activasa guarda la misma relación, mostrándose siempre mayor cantidad de Rubisco activasa en los lotes **Alta RA**.

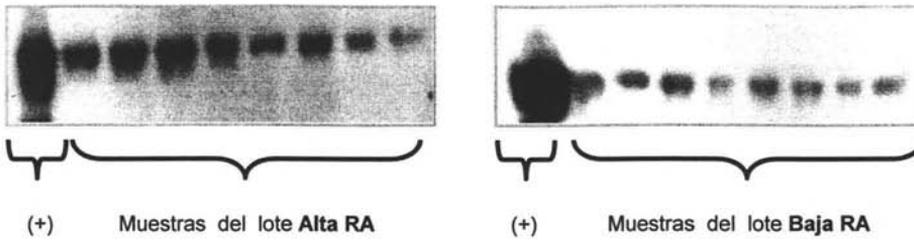


Fig.10. Análisis por Western – blot del contenido de Rubisco activasa en el Ciclo agrícola 2003. Se analizó el contenido de Rubisco activasa en los lotes Alta Ra y Baja RA del ciclo agrícola 2003, usando como control positivo 20 μg de extracto de Rubisco activasa de espinaca y 20 μg de cada muestra. Se observa un ejemplo del análisis de diferentes muestras en cada lote. Las bandas del lote Baja RA son menos intensas que las del lote Alta RA, aún cuando tienen la misma cantidad de proteína total.

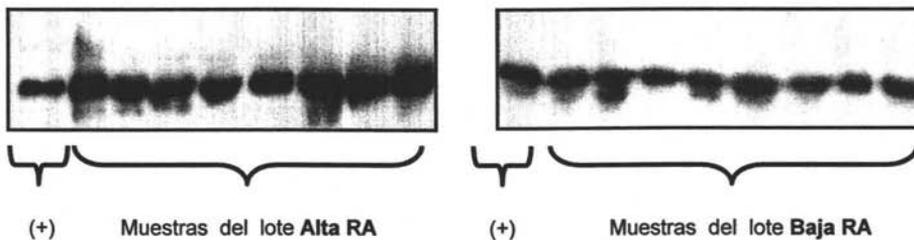


Fig.11. Análisis por Western – blot del contenido de Rubisco activasa en el Ciclo agrícola 2004. Se analizó el contenido de Rubisco activasa en los lotes Alta Ra y Baja RA del ciclo agrícola 2004, usando como control positivo 5 μg de extracto de Rubisco activasa de espinaca y 8 μg de cada muestra. Se observa un ejemplo del análisis de diferentes muestras en cada lote. Igual que en el ciclo 2003, las bandas del lote Baja RA se observan menos intensas que las del lote Alta RA.

Con objeto de examinar los resultados, se realizó el análisis densitométrico de cada banda en las películas fotográficas, éste análisis permitió establecer parámetros cuantitativos para saber si existe diferencia significativa del contenido de Rubisco activasa entre los dos lotes analizados de cada ciclo agrícola. Para ello se comparó la intensidad de la banda de cada muestra con su control positivo tal como se describe en el capítulo MATERIALES Y MÉTODOS, se obtuvieron los promedios y se calcularon las desviaciones estándar de cada grupo. Los resultados de éste análisis se muestran en la Tabla 5, en ella se observa que los promedios de contenido de Rubisco activasa de los lotes Alta RA en los dos ciclos agrícolas son superiores a los promedios de los lotes Baja RA, sin embargo los resultados de desviación estándar tan elevados en todos los casos, no permiten afirmar que existe diferencia significativa entre lotes de un mismo ciclo agrícola.

Los resultados aquí mostrados sugieren que aunque no existe diferencia significativa entre lotes de un mismo ciclo agrícola, sí es posible visualizar una tendencia de los lotes Alta RA a expresar cantidades mayores de la proteína Rubisco activasa, especialmente en los lotes del ciclo agrícola 2004. Ésto se ve respaldado en las gráficas de distribución de frecuencia de Rubisco activasa (figura 12)

Tabla 5. Promedios y desviación estándar de los lotes Alta RA y Baja RA en los ciclos agrícolas 2003 y 2004

Ciclo agrícola	Lote	Número de muestras	Promedio	Desviación estándar
2003	Alta RA	68	126.8	37.6
	Baja RA	65	94.5	37.1
2004	Alta RA	82	139.4	31.6
	Baja RA	49	111.3	40.0

Distribución de frecuencia de los valores de Rubisco activasa en las poblaciones Alta RA y Baja RA.

Los resultados de cada determinación de Rubisco activasa se ordenaron de forma ascendente en intervalos de 20 odu/mm² para analizarlos de acuerdo a la frecuencia de distribución de su contenido relativo de Rubisco activasa en cada población. Éste análisis se realizó tanto para el ciclo agrícola 2003 como para el 2004.

La figura 12 indica gráficamente para cada ciclo agrícola la observación que se había hecho desde la etapa de inmunodetección, en la que se resaltó que las poblaciones de maíz **Alta RA** mostraban más intensidad en sus bandas respecto a la población **Baja RA**.

Con éstas gráficas se visualiza de forma contundente que independientemente del ciclo agrícola y de la cantidad de extracto protéico analizado, los lotes **Alta RA** poseen sus máximos de contenido de RA en intervalos mayores que las poblaciones **Baja RA**.

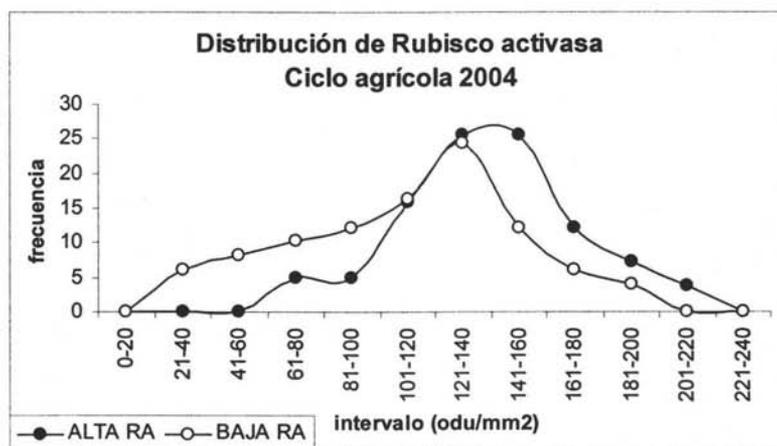
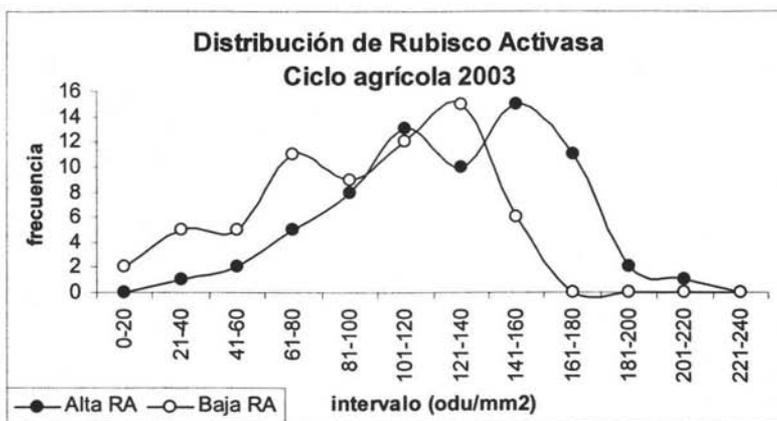


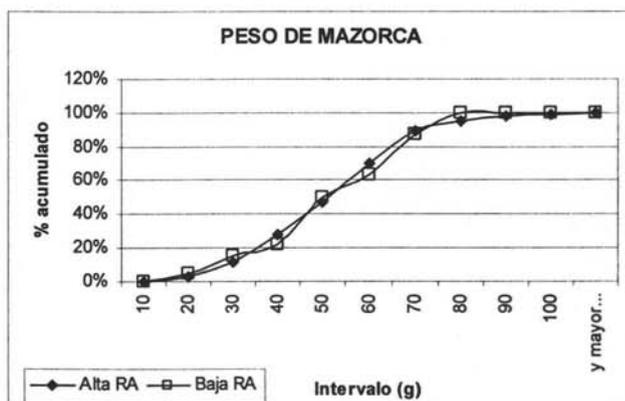
Fig.12. Distribución de frecuencia del contenido de Rubisco activasa en los lotes Alta y Baja RA (Población Z₁) de los ciclos agrícolas 2003 y 2004. Se analizó la distribución de frecuencia de contenido de Rubisco activasa en dos poblaciones de dos ciclos agrícolas mediante técnicas de Western-blot y densitometría. En las dos gráficas se observa que aún cuando se trata de diferentes años el contenido de Rubisco activasa reportado en unidades de densidad óptica por mm² (odu/mm²) es mayor en los lotes Alta RA.

Evaluación del Rendimiento.

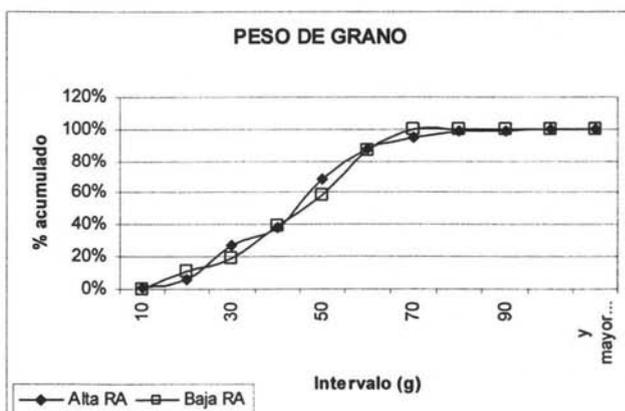
Se analizaron diversos parámetros de rendimiento en los lotes **Alta RA** y **Baja RA** del ciclo agrícola 2004 (Ver MATERIALES Y MÉTODOS), con objeto de establecer si existe diferencia en el rendimiento entre parcelas por efecto de la selección por contenido de Rubisco activasa.

Para ello se ordenaron en forma ascendente los resultados de cada parámetro y se realizaron curvas de frecuencia absoluta acumulada que se obtienen de sumar a la frecuencia de aparición de un dato (frecuencia absoluta) todas las frecuencias de aparición de los valores menores a ese dato. Dichas gráficas (figura 13) ayudan a visualizar si existe diferencia de distribución de frecuencias en poblaciones con distinto número de muestras e indican en el eje "y" el porcentaje de plantas con valor igual o menor al intervalo que se lee en el eje "x"

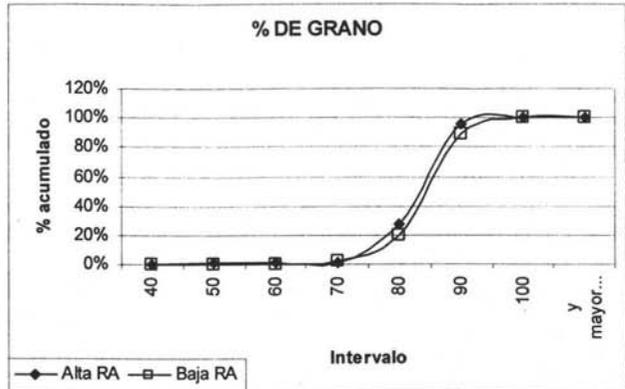
a)



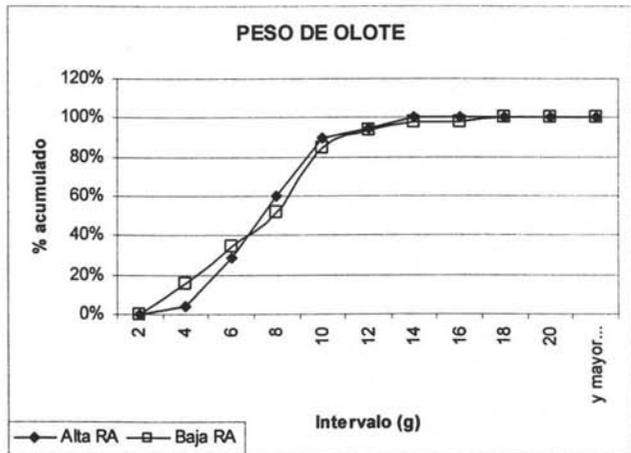
b)



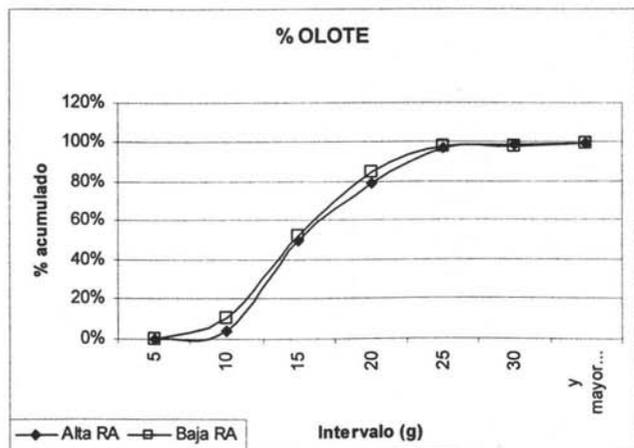
c)



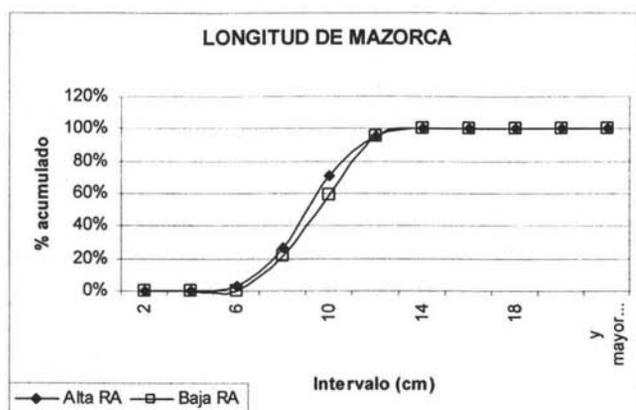
d)



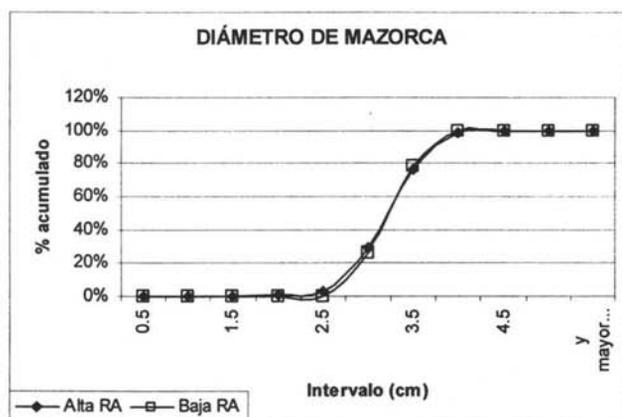
e)



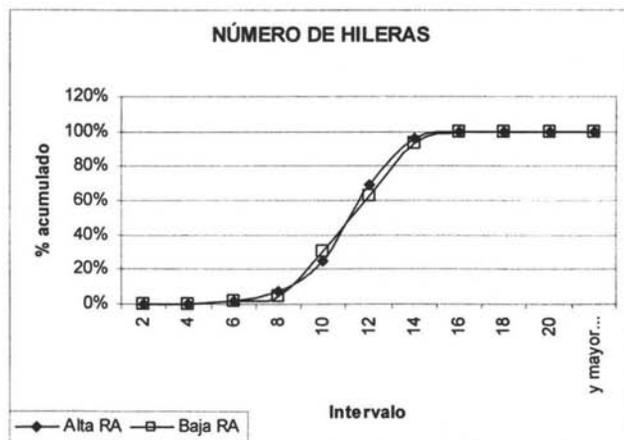
f)



g)



h)



i)

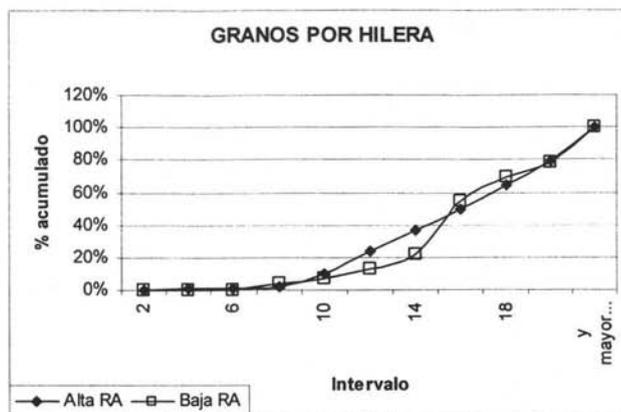


Fig.13. Frecuencia absoluta acumulada del rendimiento de los lotes Alta RA y Baja RA en el ciclo agrícola 2004. Se determinó: *a)* peso de mazorca, *b)* peso de grano, *c)* % de grano, *d)* peso de olote, *e)* % de olote, *f)* longitud de mazorca, *g)* diámetro de mazorca, *h)* número de hileras de grano por mazorca y *i)* granos por hilera de cada mazorca de los lotes Alta RA y Baja RA del ciclo agrícola 2004. Los resultados de cada una de éstas determinaciones se ordenaron en gráficas de frecuencia absoluta acumulada para determinar si existe diferencia de rendimiento entre lotes. Nótese que las gráficas de cada parámetro independientemente del lote de selección, prácticamente son iguales.

Lo que resulta importante de la observación de éstas gráficas, es que en todos y cada uno de los parámetros que se evaluaron, las gráficas de los lotes **Alta RA** y **Baja RA** son semejantes, entendiéndose que la diferencia de contenido de Rubisco activasa entre lotes no provocó cambios en el rendimiento final del grano de maíz, sin embargo cuando se determinó la altura promedio de 23 plantas tomadas al azar y el peso promedio por mazorca de cada parcela (ver Tabla 6) se observaron datos que proponen principalmente que el lote Alta RA ganó altura respecto a las plantas del lote Baja RA.

Tabla 6. Altura y peso promedio por mazorca de los lotes Alta RA y Baja RA

Lote	Peso promedio por mazorca (g)	Altura promedio (cm)
Alta RA	53.3	136.0
Baja RA	49.3	127.0

Al examinar detalladamente la altura de las 23 plantas junto con su contenido de Rubisco activasa (Ver Tablas 7 y 8) se encontró que los promedios de ambas medidas son superiores en el caso del lote Alta RA y según indican los valores de desviación estándar existe aún gran variabilidad entre muestras de un mismo lote. Dichos resultados se resumieron gráficamente en la figura 14.

Tabla 7. Altura y cantidad relativa de Rubisco activasa de 23 plantas seleccionadas aleatoriamente del lote Alta RA, ciclo agrícola 2004

Número de planta	Contenido de Rubisco Activasa (odu/mm ²)	Altura de la planta (cm)
2	138	134
7	174	145
10	119	145
17	178	115
22	170	142
25	130	147
27	149	147
28	168	138
42	122	135
46	113	146
49	148	135
60	129	152
62	150	125
66	132	155
69	137	140
74	80	135
78	162	120
79	175	130
85	189	138
88	92	120
90	133	110
93	173	147
99	141	130
Promedio	144	136
Desviación estándar	28	12

Tabla 8. Altura y cantidad relativa de Rubisco activasa de 23 plantas seleccionadas aleatoriamente del lote Baja RA, ciclo agrícola 2004

Número de planta	Contenido de Rubisco activasa (odu/mm ²)	Altura de la planta (cm)
1	157	102
3	129	116
6	127	112
10	190	135
12	114	145
14	92	139
16	81	120
19	78	154
21	124	145
22	101	130
24	174	135
25	150	115
27	165	152
30	131	122
32	115	137
35	66	104
37	39	153
39	57	105
41	83	136
43	96	133
45	129	124
48	141	106
50	139	108
Promedio	116	127
Desviación estándar	39	117

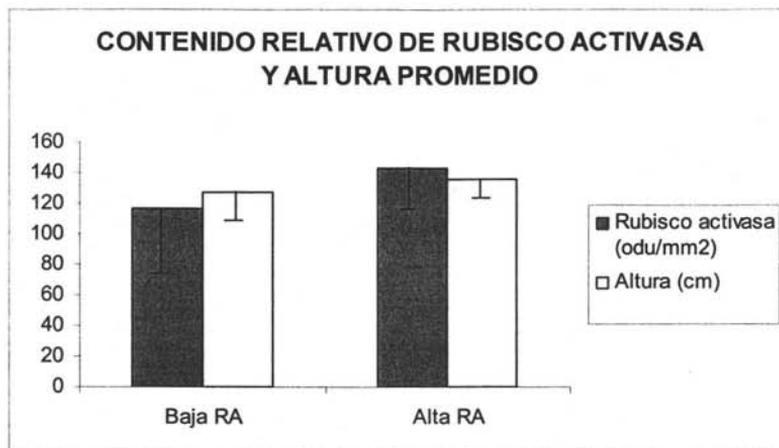


Fig.14. Contenido relativo de Rubisco activasa y altura promedio de plantas seleccionadas aleatoriamente (ciclo agrícola 2004). Se determinó la altura desde la base de la planta hasta la base de la espiga, de una muestra aleatoria de 23 plantas por lote. El valor promedio de las alturas se comparó con las medidas promedio de cantidad de Rubisco activasa de las mismas plantas, observando con esto que el lote Alta RA incrementó su altura respecto al lote Baja RA.

No obstante los valores de desviación estándar, cuando se graficó la distribución de frecuencia de la altura de las 23 plantas (figura 15) se observó claramente que aquellas que constituyen el lote Alta RA muestran su máximo de frecuencia en intervalos de altura mayores respecto a las plantas con Baja RA, de la misma forma, la figura 13 muestra que cuando se graficó la distribución de frecuencia del contenido relativo de Rubisco activasa se repitió éste comportamiento, concordando con lo previsto anteriormente en la figura 9.

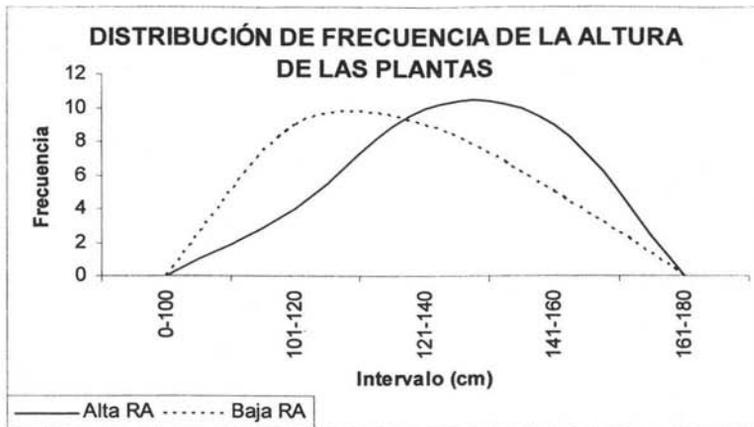


Fig.15. Distribución de la altura de una muestra aleatoria de los lotes Alta RA y Baja RA, ciclo agrícola 2004. Se determinó la altura de 23 plantas tomadas al azar de cada lote del ciclo agrícola 2004, los datos se ordenaron de forma ascendente en intervalos de 20 cm. Se observa que las plantas Alta RA tienden a incrementar la magnitud de su altura respecto a las plantas con Baja RA.

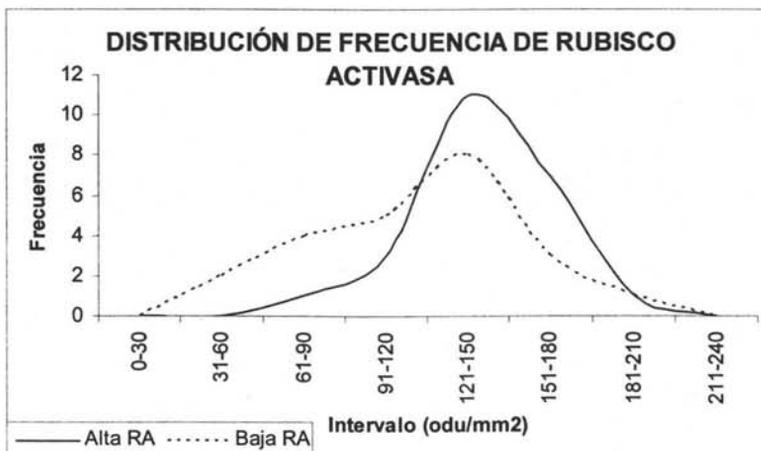


Fig.16. Distribución de frecuencia de contenido de Rubisco activasa en una muestra aleatoria de cada lote del ciclo agrícola 2004. Se determinó la altura de 23 plantas tomadas al azar de cada lote del ciclo agrícola 2004, los datos de contenido de Rubisco activasa de cada una de ellas se compararon para examinar el cambio en la altura de las plantas en función de la expresión de Rubisco activasa. Los datos se ordenaron de forma ascendente en intervalos de 30 odu / mm².

En éstas gráficas, los valores de desviación estándar se entienden como la amplitud de las gráficas e indican en el caso de la altura, que las muestras abarcan intervalos desde 100 -180 cm mientras que la cantidad de Rubisco activasa se encuentra entre 30-210 odu/mm^2 en promedio. Sin embargo lo que resulta importante de éstas observaciones es que la selección por alto contenido de Rubisco activasa proporcionó a la planta mayor capacidad fotosintética que se percibió como incremento de la altura de las plantas.

Por otra parte, la diferencia del peso de mazorca promedio por parcela se puede atribuir a la pérdida de granos de algunas mazorcas durante el manejo post-cosecha, ya que si hubiese habido diferencia entre lotes en el peso de la mazorca se habría reflejado en al menos una de las gráficas de la figura 10; No obstante, como ya se hizo notar anteriormente, prácticamente todos los parámetros de rendimiento asociados a la mazorca permanecieron iguales independientemente de la selección por Rubisco activasa.

Selección de maíz por contenido de Rubisco activasa.

A partir del ciclo agrícola 2004 se seleccionaron nuevamente algunas plantas por su contenido de Rubisco activasa: 15 del lote **Alta RA** que de acuerdo al análisis densitométrico, mostraron la mayor cantidad de Rubisco activasa (intervalo: 160 – 220 odu/mm^2) y 10 del lote **Baja RA** cuyo contenido de Rubisco activasa fuese igual o menor que 80 odu/mm^2 (ver figura 12).

Éstos nuevos grupos de selección, mostrados en la Tablas 9 y 10, son representativos de cada lote y por lo tanto constituyen un grupo control porque son las plantas que incrementaron o disminuyeron en mayor grado la expresión de Rubisco activasa durante el ciclo agrícola 2004.

Tabla 9. Grupo de plantas seleccionadas por su alto contenido de Rubisco activasa, a partir del lote Alta RA (ciclo agrícola 2004)

Número de planta del lote Alta RA	Cantidad relativa de Rubisco activasa (odu/mm ²)	Peso de mazorca (g)
4	162	48.0
78	162	52.5
22	170	88.0
24	170	66.0
93	173	60.0
7	174	53.0
79	175	42.5
17	178	21.5
80	183	50.5
77	184	10.5
23	189	70.0
85	189	39.0
15	198	67.0
16	201	34.5
92	203	59.0
		Promedio: 50.8

Tabla 10. Grupo de plantas seleccionadas por su bajo contenido de Rubisco activasa, a partir del lote Baja RA (ciclo agrícola 2004)

Número de planta del lote Baja RA	Cantidad relativa de Rubisco activasa (odu/mm ²)	Peso de mazorca (g)
44	27	66.5
33	72	45.0
37	39	66.0
49	53	45.0
46	57	51.5
39	57	27.0
40	59	37.0
35	66	21.5
38	66	45.0
19	78	75.0
		Promedio: 47.9

Si bien los lotes **Alta RA** y **Baja RA** del ciclo agrícola 2004 no mostraron diferencia en los parámetros de rendimiento evaluados, nos preguntamos si las plantas más contrastantes en su contenido de Rubisco activasa, (plantas que integran el grupo control) son las plantas que en las gráficas de distribución de frecuencia del peso de mazorca están dentro de los intervalos de mayor o menor peso de la mazorca, respectivamente. Para responder ésta pregunta se trazó una gráfica de frecuencia organizando los datos del peso de mazorca de forma ascendente en intervalos de 25 g y considerando el número de muestras de cada lote como 100 % de frecuencia. Se calculó el promedio del peso de mazorca de cada grupo control (ver tablas 9 y 10) y dichos promedios se señalaron en la gráfica. La figura 17 muestra ésta gráfica y en ella es fácil observar que el promedio que corresponde al grupo de selección Alta RA supera al promedio de Baja RA en poco más de 2 unidades. Sugiriendo con esto que la población seleccionada por alta expresión de Rubisco activasa tiende a incrementar el peso de su mazorca.

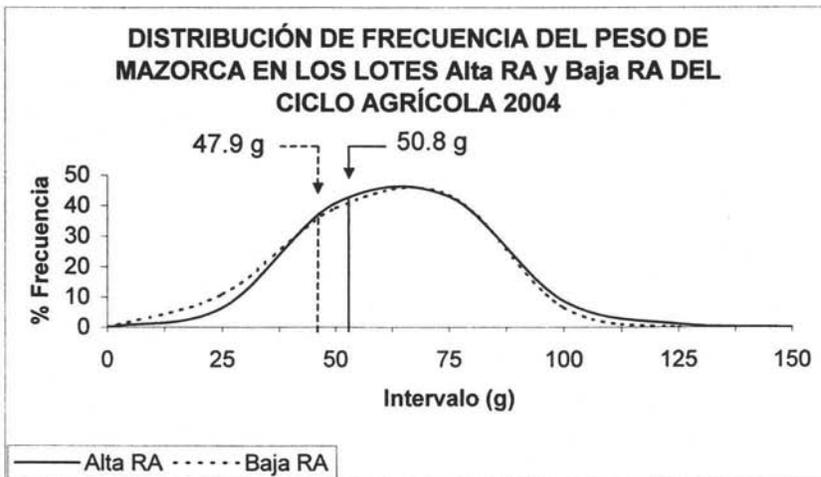


Fig. 17. Distribución de frecuencia del peso de mazorca de los lotes Alta RA y Baja RA, ciclo agrícola 2004.

Se organizaron los datos del peso de mazorca de cada lote, en intervalos crecientes de 25 g. Por otra parte, se seleccionaron por su contenido de Rubisco activasa 15 plantas representativas de Alta RA y 10 de Baja RA. Los promedios que se señalan en la gráfica corresponden al promedio del peso de mazorca de las plantas seleccionadas. Nótese que el promedio Alta RA es ligeramente mayor que el de las plantas Baja RA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSIÓN

Purificación de Rubisco activasa

Una parte importante de ésta investigación fue la purificación de Rubisco activasa, ya que fue necesario que ésta se encontrara relativamente libre de contaminantes para preparar anticuerpos que permitieran la adecuada caracterización de su expresión.

Los resultados descritos en éste trabajo demuestran que sí fue posible la purificación de Rubisco activasa a partir de hojas de espinaca, siguiendo el protocolo descrito por Robinson *et al.* (1988). Sin embargo, cabe mencionar que fue necesario adicionar etapas como la concentración con equipo de vacío (Speed – Vacuum) o mediante el uso de un desecante polimérico tal como el polietilenglicol (PEG). Éstas etapas se adicionaron con base en resultados de pruebas de ensayo y error realizadas previamente.

Asimismo la determinación de proteína total en cada etapa proporcionó datos que permitieron seguir el proceso de purificación, para analizar su rendimiento y el porcentaje de recuperación final que se obtuvo. (Ver Tabla 4 capítulo RESULTADOS).

De acuerdo a las experiencias que se adquirieron durante ésta etapa del trabajo experimental se sugiere atención especial en la precipitación con sulfato de amonio, por ser la etapa que determina la eliminación de la enzima Rubisco del resto de las proteínas (Robinson *et al.* 1988), lo cual es un paso importante dada la acumulación de ésta proteína en el extracto de hojas. Por otra parte la selección del método de concentración que se use es estratégica, ya que por ejemplo en el caso de la concentración con vacío, la concentración excesiva puede ocasionar problemas en la resuspensión posterior de las proteínas, por lo cual se recomienda el uso de PEG porque permite al mismo tiempo la absorción lenta de agua y la eliminación de sales por la difusión a través de un saco de diálisis.

Debido a que la integridad estructural de las proteínas está en función de las condiciones de pH y temperatura, resulta importante mantener durante todo el proceso de separación pH cercano a 7 y temperatura menor a 4° C.

De igual forma es necesaria la adecuada manipulación de la disolución con proteínas evitando en todo momento la formación de espuma, porque promueve la desnaturalización de la proteína por contacto con la superficie. Por otra parte es importante señalar que al mostrar los resultados, que permitieron establecer las condiciones experimentales que se utilizaron a lo largo de éste trabajo; se apoya la discusión que a nuestro objetivo interesa y que para su mejor comprensión se muestra en los siguientes apartados:

Contenido de Rubisco activasa como característica de selección

Éste trabajo muestra los resultados del análisis de contenido de Rubisco activasa y rendimiento de dos lotes de maíz: **Alta RA** y **Baja RA**, que constituyen el primer ciclo de selección por Rubisco activasa o población Z₁.

Para estudiar el efecto de ésta selección, los lotes se obtuvieron por autofecundación; es decir que el polen de la inflorescencia masculina de una planta seleccionada por su contenido de Rubisco activasa, se depositó en los estilos o inflorescencia femenina de la misma planta, evitando con esto variaciones de expresión ocasionadas por el entrecruzamiento entre diferentes plantas.

El análisis del contenido de Rubisco activasa en los lotes **Alta RA** y **Baja RA** de dos ciclos agrícolas diferentes muestra que existe diferencia en la cantidad promedio de Rubisco activasa entre lotes, tal como se describe en las gráficas de la figura 12 en las cuales se observa que las poblaciones **Alta RA** tienen sus máximos de frecuencia en intervalos de contenido mayores que el lote **Baja RA** independientemente del ciclo agrícola en cuestión. Sin embargo, los valores elevados de las desviaciones estándar (tabla 5) indican que la diferencia no es estadísticamente significativa.

No obstante, es interesante que la expresión de Rubisco activasa en las dos poblaciones Z_1 mantiene la diferencia en base al carácter bioquímico con que fueron seleccionadas, ya que tratándose de poblaciones cultivadas en diferentes años, aún cuando el diseño experimental fue el mismo, las condiciones ambientales invariablemente fueron distintas pudiendo ocasionar cambios importantes en la cantidad y características de expresión de Rubisco activasa según reporta Martínez-Barajas (1994).

Sin embargo, los resultados mostraron un patrón similar de expresión en los dos años y todo parece apuntar hacia la conservación de la selección previa de cada lote; es decir que las plantas que se obtuvieron de la siembra de plantas seleccionadas por alto contenido de Rubisco activasa tienden a mantener esa característica, de la misma forma que las plantas seleccionadas por baja Rubisco activasa.

Éstas observaciones hacen pensar que la obtención de plantas de maíz con elevado contenido de Rubisco activasa es posible mediante el sistema de selección aquí diseñado.

Efecto de la selección por contenido de Rubisco activasa en el rendimiento del maíz.

Los resultados de la comparación del rendimiento en los dos lotes de maíz muestran que no se modificó su rendimiento, aún cuando cada lote difiere en la cantidad de Rubisco activasa.

Por otro lado Morales A. y colaboradores (1999) reportaron que la cantidad de Rubisco activasa de una población con 23 ciclos de mejoramiento por selección masal e estratificada (Z_{23}) es 50% mayor que en una población sin seleccionar (Z_0) mientras que el rendimiento de Z_{23} es 46% más alto que Z_0 . En otras palabras: el cambio en el contenido de Rubisco activasa es paralelo al aumento del rendimiento, sin embargo éste incremento empezó a ser el cambio significativo en el rendimiento de las plantas hasta el quinto ciclo de selección.

Se sabe además que la autofecundación trae consigo la disminución del vigor de la planta original, que hace difícil que un cambio en el rendimiento se aprecie en el primer ciclo de elección (Allard R. W. ,1975).

Sin embargo tal como se describe en la tabla 6 y en las gráficas 15 y 16 las plantas del lote Alta RA incrementaron su altura, respecto a las plantas Baja RA, lo cual se explica porque el incremento en la cantidad de Rubisco activasa proporciona a la planta mayor capacidad para fijar CO₂.

Ésta observación sugiere que para obtener maíz más productivo es necesario además del aumento de la cantidad de Rubisco activasa dirigir el incremento de la actividad fotosintética hacia el mejoramiento de la mazorca del maíz.

En el 2005, Bernal y colaboradores reportaron que en plantas de frijol, la deficiencia en la movilidad de fosfato provoca disminución de la fotosíntesis neta y acumulación de almidón en las hojas.

En éste contexto, la aspersión de fosfato durante la etapa de llenado de grano a plantas de maíz seleccionadas por alto contenido de Rubisco activasa; podría ser una alternativa para buscar mayor rendimiento de la planta, porque el llenado de grano es el momento en el cual las hojas, principalmente la hoja bandera, dirigen su capacidad fotosintética hacia la producción de compuestos que serán translocados a la mazorca para asegurar la formación de las semillas (Loza-Tavera, 1992).

De acuerdo a los resultados observados en ésta investigación, se plantea que se necesita más de un ciclo de selección por Rubisco activasa para concluir acerca de su eficiencia como método de mejoramiento de maíz. Sin embargo, hace falta lograr que la actividad de Rubisco activasa repercuta sobre la etapa de llenado de grano en maíz y para ello será necesario entender el proceso bioquímico a través del cual se logra el incremento en Rubisco activasa; es decir a que nivel se regula la expresión de Rubisco activasa en la planta de maíz. Para éste propósito sería necesario investigar el contenido de sus transcritos en plantas que difieran en la expresión de la proteína.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye que:

- ✓ La característica de contenido en Rubisco activasa tiende a mantenerse de un ciclo de mejoramiento al otro a través de la selección por éste parámetro.
- ✓ Existe una correlación positiva entre el incremento de Rubisco activasa y el aumento de longitud de las plantas de maíz.
- ✓ La obtención de poblaciones de maíz con mayor expresión de Rubisco activasa es posible mediante el método de selección.
- ✓ Será necesario investigar más acerca de los mecanismos implicados en la regulación de Rubisco activasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Allard Robert Wayne.** (1975) Principles of Plant Breeding. New York, J. Wiley
pp. 213-223
- Ayala-Ochoa, A., Vargas-Suárez, M., Loza-Tavera, H., León, P., Jiménez-García, L. and Sánchez-de-Jiménez, E.** (2004) In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. *Biochimie* **86**:439-449
- Bernal, L.** (2005) Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency. *Journal of Plant Physiology*. **162**: 970-976
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Comité Sin Maíz No Hay País.** (2003) Sin Maíz No Hay País. CONACULTA, Culturas Populares de México. Primera edición. Capítulos 2 y 4. pp. 83-118, 155-176
- Daie, J.** (1985) Carbohidrat partitioning and metabolism in crop. *Horticulture Review* **7**:69-108
- Edwards, G. E. and Huber, S. C.** (1981) The C₄ pathway. *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol 8. Chapter 6* pp. 237-278

-
- Ellis, R. J. and van der Vies, S. M.** (1991) Molecular chaperones. Annual Review Biochemistry. **60**: 321-347
- Gifford, R. M. and Evans, L. T.** (1983) Photosynthesis, carbon partitioning and yield. Annual Review Plant Physiology. **32**: 485-509
- Hanson, P. I. and Whiteheart, S. W.** (2005) AAA+ proteins: Have engine, will work. Molecular Cell Biology. **6**: 519-529
- Horton, H. R.** (1995) Principios de Bioquímica. Prentice-Hall. Primera edición, E.U.A. Capítulo 16. **pp.** 15-27
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of phage T4 head. Nature **227**:680-685
- Lorimer, G. H.** (1981) The carboxylation and oxygenation of Ribulose-1,5-bisphosphate: The primary events in photosynthesis and photorespiration. Annual Review Plant Physiology. **32**: 344-383
- Loza-Tavera, H., Martínez-Barajas, E. and Sánchez de Jiménez, E.** (1990) Regulation of Ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase expression in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations. Plant Physiology. **93**: 541-548
- Loza-Tavera, H.** (1992) Regulación de la expresión de los genes que codifican la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa durante el desarrollo de maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM.

-
- Martínez-Barajas, J. E.** (1994) El papel de la Rubisco activasa en la regulación de la actividad de Rubisco. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM
- Martínez-Barajas, J. E., Molina Galán, J. and Sánchez de Jiménez, E.**(1997) Regulation of Rubisco activity during grain fill in maize: possible role of Rubisco Activase. *Journal of Agricultural Sciences* **128**: 155-161
- Mathis, P. and Pailotin, G.** (1981) Primary processes of photosynthesis. The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol 8. Chapter 3 pp. 97-155
- Molina-Galán, J.** (1983) Selección masal visual estratificada en maíz. Colegio de Postgraduados. Chapingo Edo. De México. pp. 5-33
- Morales A., Ortega-Delgado, M. L., Molina-Galán, J. and Sánchez de Jiménez E.** (1999) Importance of Rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedures. *Journal of Experimental Botany* **50**: 823-829
- Robinson, S. P., Streusand V. J., Chatfield, J. M. and Portis, A. R.** (1988) Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiology*. **88**:1008-1014
- Robinson, S. P. and Portis A. R.** (1989) Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **268**: 93-99
- Sánchez de Jiménez, E., Medrano, L. and Martínez-Barajas, E.** (1995) Rubisco Activase, a Possible New Member of the Molecular Chaperone Family. *Biochemistry* **34**: 2826-2831

- Salvucci, M. E. and Ogren, W. L.** (1985) A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase *in vivo*. *Photosynthesis Research*. **7**: 193-201
- Singh, R. B.** (2000) Enviromental consequences of agricultural development: a case study from the Green Revolution state of Haryana, India. *Agriculture Ecosystems & Environment*. **82**: 97-103
- Somerville, C. R. Portis, A. R. and Ogren, W. L.** (1982) A mutant of *Arabidopsis thaliana* wich lacks activation of RuBP carboxylase *in vivo*. *Plant Physiology*. **70**: 381-387
- Streusand, V. J. and Portis, A. R.** (1987) Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of Ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiology*. **85**: 152-154
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **76**:4350
- Vargas-Suárez, M., Ayala-Ochoa, A., Lozano-Franco, J., García Torres, I., Díaz-Quiñones, A., Ortiz-Navarrete V. and Sánchez-de-Jiménez E.** (2004) Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. **55**: 2533-2539