



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE QUÍMICA

Cuantificación de Rubisco Activasa
en hojas de maíz modificadas
selectivamente con base en el
contenido de Rubisco Activasa a
partir de una variedad original de
maíz llamado Z0

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

AGUSTÍN OLMEDO GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ESTELA SANCHEZ QUINTANAR
VOCAL: Profesor: MARIA ANTONIA DOSAL GOMEZ
SECRETARIO: Profesor: MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
1er. SUPLENTE: Profesor: GLORIA GARCIA RAMIREZ
2° SUPLENTE: Profesor: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. 103, DEPTO. DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESORA Dra. Estela Sánchez Quintanar.

_____.

Supervisor técnico M. en C. Raúl Genaro Aguilar Caballero.

_____.

Sustentante Agustín Olmedo García.

_____.

Agradecimientos.

Este trabajo fue realizado con el apoyo del PAIP 6290-10.

A la Dra. Estela Sánchez por sus consejos, paciencia y por abrir el camino para la realización de este trabajo de tesis.

Al M. en C. Raúl Aguilar por compartir parte de su tiempo conmigo en la enseñanza y aprendizaje para este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 103 que en todo hemos compartido lo que es tener un espacio para el beneficio de todos.

A Erika, Sara, Verónica, Norma y Valeria por su amistad e invaluable consejo para el desarrollo de este trabajo.

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser parte de este gran universo de conocimiento y aprendizaje.

A la Facultad de Química por toda su valiosa contribución al enseñarme y permitir ocupar su espacio para mi formación profesional.

Dedicatorias.

Este trabajo está dedicado a mi madre que gracias a su apoyo incondicional y la fortaleza que me brinda termino una etapa de mi vida.

A mis hermanos que en todo momento están conmigo y que al estar juntos planeamos como aprovechar el tiempo para estar juntos.

A mi padre, Marino Olmedo C. **(q.e.p.d.)** por compartir tus experiencias que hoy en día siguen fomentando mi enseñanza para ser la persona que soy.

A mi tío Eusebio García, que ha estado conmigo siempre.

A mi tío Toribio Castañeda por el gran apoyo que nos brinda siempre.

A mi tía Divina que en ella tomo su cariño en todo momento.

A mis primos Selene, Josue e Iván que con ellos compartimos los momentos de nuestras vidas.

A mi amigo Eduardo A. **(q.e.p.d.)** a quien el tiempo no olvida su recuerdo.

A la Sra. Martha Amezcua. **(q.e.p.d.)** que es la persona que recordaré siempre.

A mis amigos de toda la vida: Antonio Quintal, Mario Amezcua, Juan Antonio Maldonado.

A María Guadalupe Ponce por dedicarme un espacio en su vida y que en ella he aprendido a ser cada día mejor.

A mis amigos de la Universidad: Alejandro, Lizbeth, Janett, Elba, Juan Pablo, Maura, Carlitos, Alberto, Noel, Lizeth, Rogelio, Tere, Jacqueline, Chío, Ángeles y Chucho.

Índice

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Generalidades del maíz.	3
2.2. Tipos de maíz.	4
2.3. Morfología.	4
2.3.1. Estructura del maíz.	5
2.3.2. Diferencias entre flores masculinas y femeninas.	6
2.3.3. Fisiología.	9
2.3.4. Tipos de variedades de granos.	9
2.3.5. Selección botánica.	10
2.4. Requisitos climatológicos.	10
2.4.1. Mejoramiento del maíz.	11
2.4.2. Mantenimiento de la semilla	13
2.4.3. Fotosíntesis.	14
2.4.4. Ciclo de Calvin.	14
2.4.5. El dióxido de carbono reacciona con ribulosa 1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato.	15
2.5. Fotosíntesis C4	16
2.5.1. Anatomía de Kranz.	18
2.5.2. Rubisco.	19
3. Hipótesis	22
4. Objetivo	23
4.1. Objetivos particulares.	23
5. Materiales y reactivos	24
5.1. Material biológico	24
5.2. Preparación de disoluciones para la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	24
5.3. Disolución amortiguadora de pH= 8.9 (de corrida para la electroforesis)	25
5.4. Disolución amortiguadora de pH= 6.8 para la muestra (4X)	25
5.5. Disolución amortiguadora de pH= 7.2 (PBS) para transferencia y Western blot	26
6. Obtención y cuantificación de las proteínas en las muestras de hojas de maíz	26
6.1. Preparación de la curva patrón de Albumina Sérica Bovina (BSA)	26
6,2. Extracción y cuantificación de proteínas	27

7.	Métodos	28
7.1	Cuantificación de proteína	28
7.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	28
7.3	Transferencia de proteínas	29
7.4	Western blot	29
7.5	Densitometría	30
7.6	Interpretación de datos	30
8.	Resultados	31
9.	Discusión	41
10.	Recapitulación	44
11.	Bibliografía	45

Índice de Tablas

		Página
Tabla 1.	Composición de los geles de poliacrilamida- SDS	24
Tabla 2.	Absorbancias de las diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina	31
Tabla 3.	Tabla de resultados obtenido a partir de la curva patrón de BSA para las diferentes muestras de hojas de maíz.	32
Tabla 4	Cantidad relativa de Rubisco Activasa de 29 muestras de hojas maíz representativas del lote Alta Rubisco Activasa	36
Tabla 5	Cantidad relativa de Rubisco Activasa de 29 muestras de hojas maíz representativas del lote Alta Rubisco Activasa	37

Índice de figuras

		Páginas
Figura 1.	Morfología de la planta de maíz.	3
Figura 2.	Estructura del maíz.	5
Figura 3.	Órganos sexuales femeninos de la planta de maíz.	7
Figura 4.	Órganos sexuales masculinos de la planta de maíz.	7
Figura 5.	Ciclo de Calvin.	15
Figura 6.	Obtención de 3-fosfoglicerato a partir de la ribulosa 1,5-bisfosfato.	16

Figura 7.	Esquema de la vía C4.	17
Figura 8.	Esquema de la estructura de cloroplastos en las plantas C4 y C3.	19
Figura 9.	Estructura de la ribulosa bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco).	19
Figura 10.	Esquema del comportamiento del anticuerpo en el Método de Western blot.	30
Figura 11.	Gráfica de la Curva Patrón de la Albumina Sérica Bovina (BSA)	31
Figura 12.	Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz. Tinción con azul de Coomassie.	33
Figura 13.	Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz. Tinción con azul de Coomassie.	34
Figura 14.	Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz. Tinción con azul de Coomassie.	35
Figura 15	Western blot de proteínas de muestras de hojas de maíz.	38

Índice de gráficas

		Páginas
Gráfica 1	Densitometría de las bandas del Western blot para las muestras: 28 , 22, 5, 17, 24, 15, 36, Z0 y Espinaca.	39
Gráfica 2	Densitometría de las bandas del Western blot para las muestras: Espinaca , 6, 95,76, 7 ,15,100,3,Z0 y Espinaca.	39
Gráfica 3	Densitometría de las bandas del Western blot para las muestras: 93,3, 43,95, Z0, 8 ,77,78,76 y Espinaca.	40
Gráfica 4.	Densitometría de las bandas del Western blot para las muestras: 90,Z0,78,37, Espinaca,77,52,58,57.	40

ABREVIATURAS

AAA +	ATP asas asociadas a una variedad de actividades celulares.
ADP	Adenosín difosfato
Alta RA	Lote de plantas de maíz obtenidos a partir de la selección de plantas con alto contenido de Rubisco Activasa
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosin trifosfato
B-Met	Mercaptoetanol
BSA	Albumina sérica bovina
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de sodio
IgG	Inmunoglobulinas
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
RA	Rubisco activasa
Rubisco	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	Dodecildisulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'- Tetrametilendiamina
UTR´	Región no traducible
Zo	Población de maíz original

1. RESUMEN.

En todas las especies vegetales, la fijación del CO₂ se lleva a cabo por la carboxilación de la ribulosa-1,5- bisfosfato, en una reacción que cataliza la enzima ribulosa-1,5- bifosfato carboxilasa (Rubisco). En plantas C₄, el oxalacetato se convierte en malato que se descarboxila, desprendiendo CO₂ dentro de las células de la vaina de haz, que habrá de ser fijado por la Rubisco.

Como estas células están rodeadas por células del mesófilo que han llevado a cabo la fijación inicial del CO₂ en el oxalacetato este proceso equivale a bombear CO₂ al interior de las células de la vaina de haz.

El maíz es un cereal originario de México y Centro América y ha sido siempre el cultivo americano que convirtió con mayor eficiencia la energía solar en alimento. Entre las ventajas de maíz como cultivo de grano es importante mencionar lo siguiente: Se adecúa de manera ideal a la mecanización desde la siembra hasta la cosecha, responde bien a la aplicación de grandes dosis de fertilizantes, encuentra un mercado ágil al comercializarse como alimento para el ganado sea de forma de grano, como ensilado de espigas o de la planta entera y entre los principales cultivos de campo principales tiene alto valor por hectárea.

La Rubisco cataliza el paso limitante de la velocidad de fijación del carbono. Está sujeta a control por parte de diversos factores, entre ellos el contenido de Rubisco activasa, el suministro de suficiente NADPH y ATP por reacciones lumínicas, el pH del estroma, la concentración del Mg²⁺ y la presencia general de un inhibidor.

El maíz tiene las características de plantas C₄ como especie de zonas tropicales o semitropicales; es una planta que se adapta a una gran cantidad de luz, a temperaturas altas y ambientes semiáridos.

El hombre ha realizado un intenso trabajo de mejora sobre el maíz usando la llamada selección masal.

Las hojas estudiadas provienen de plantas seleccionadas en base a su contenido de Rubisco activasa; la selección se hizo a partir de que el aumento de la cantidad de Rubisco activasa en las hojas incrementa la actividad de Rubisco (Martínez-Barajas et al., 1992). Por lo que al tener la planta mayor capacidad para asimilar el CO₂ puede mejorarse y el rendimiento sería mejor.

El estudio de las hojas permitió cuantificar la cantidad de proteína contenida en ellas y calcular la cantidad presente de Rubisco activasa usando técnicas inmunológicas y separación de proteínas (SDS-PAGE) para correlacionar la cantidad de Rubisco activasa con la capacidad de las plantas para tener una mayor producción.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. GENERALIDADES DEL MAÍZ.

El maíz es una de las pocas plantas de importancia económica originarias de México y Meso America (Jugenheimer, 1981).

El maíz es una planta herbácea que pertenece a la extensa e importante familia gramineae; es un cultivo anual que se planta por semillas y que tarda de 3 a 5 meses en madurar. Las flores masculinas forman la inflorescencia terminal; las flores femeninas están agrupadas en gruesos espádices laterales, las mazorcas, que nacen en la parte inferior del tronco. Las mazorcas están cubiertas por hojas modificadas que forman la “perfolia”. De entre las hojas del extremo superior de la mazorca salen los largos y delgados estilos sedosos que constituyen la “cabellera” sedosa de las mazorcas y que reciben el polen de las flores masculinas. La mazorca consiste en una estructura central, denominada olote, sobre la cuál los granos están dispuestos en hileras (Harrison, 1980).



Figura 1. Morfología de la planta de maíz.

2.2. TIPOS DE MAÍZ.

El maíz puede dividirse en variedades que difieren en el carácter de las semillas. Estos tipos son el dentado, cristalino dulce, harinoso, reventón, ceroso y tunicado.

- El maíz harinoso tiene sus granos compuestos en gran parte por almidón suave y las mazorcas tienen pocos dientes.
- El dentado se caracteriza por una depresión o “diente” en la corona de la semilla. Al secarse y contraerse rápidamente el almidón suave, da como resultado el característico dentado.
- El maíz dulce está caracterizado por una apariencia translúcida en la cornea cuando está inmaduro y por una condición vítrea cuando está seco.
- El maíz reventón (o palomero) es una forma extrema del cristalino con endospermo que contiene sólo una pequeña proporción de almidón suave.
- El maíz ceroso debe su nombre a la apariencia un tanto cerosa de sus granos; está totalmente compuesto por la forma molecular ramificada, amilopectina, mientras que el almidón del maíz común es aproximadamente 78 % amilopectina y 22 % amilosa, la cadena de forma lineal.
- El maíz tunicado es un tipo de maíz en que cada grano está encerrado en una túnica o vaina y no se cultiva comercialmente.
- Cada grupo puede mejorarse por fitomejoramiento (Jugenheimer, 1981).

2.3. MORFOLOGIA.

El cultivo de maíz es de régimen anual, su ciclo vegetativo oscila entre 80 y 200 días, desde la siembra hasta la cosecha.

2.3.1. ESTRUCTURA DEL MAÍZ.

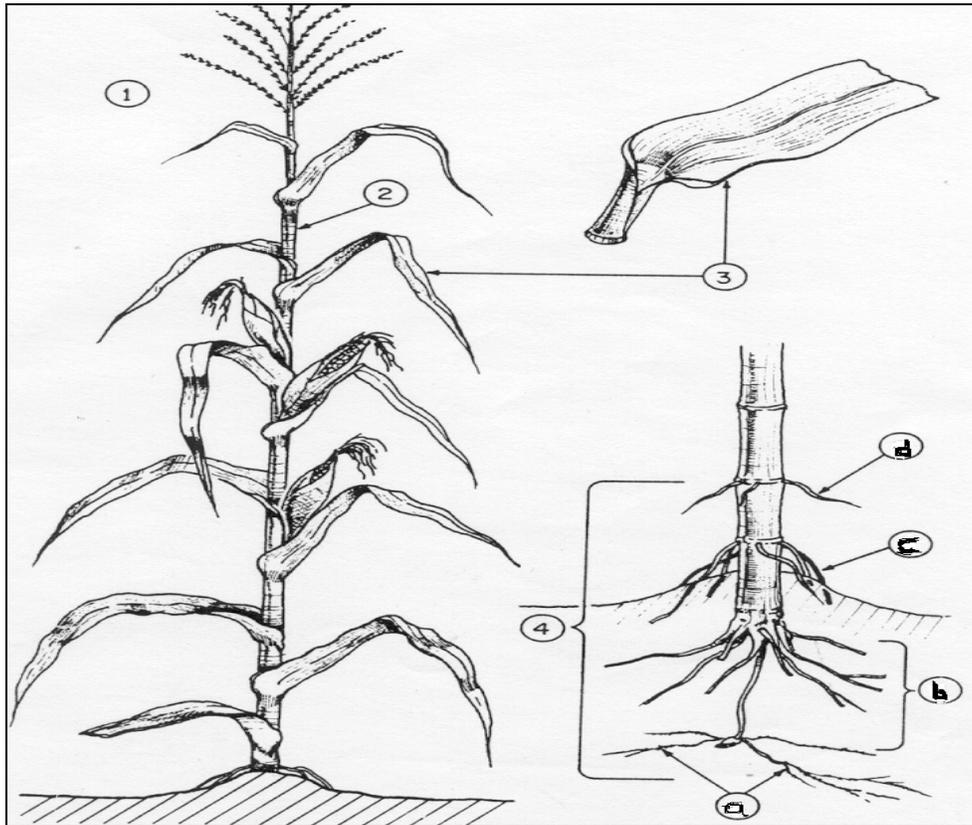


Figura 2. Estructura del Maíz

1) Planta: Existen variedades enanas de 40 a 60 cm de altura, hasta las gigantes de 200 a 300 cm.

2) Tallo: Es leñoso y cilíndrico. El número de nudos varía de ocho a veinticinco.

3) Hoja: la vaina de la hoja forma un cilindro alrededor del entrenudo, pero con los extremos desunidos. El color usual es verde pero se pueden encontrar hojas rayadas de blanco y verde o verde y púrpura. El número de hojas por planta varía entre ocho y veinticinco.

4) Sistema radicular:

a) Raíz seminal o principal: está representada por un grupo de una a cuatro raíces que pronto dejan de funcionar. Se originan en el embrión, suministra nutrientes a las semillas en las primeras dos semanas.

b) Raíces adventicias: El sistema radicular de una planta es casi totalmente de tipo adventicio. Puede alcanzar hasta dos metros de profundidad.

c) Raíces de sostén o soporte: este tipo de raíces se originan en los nudos cerca de la superficie del suelo.

d) Raíces aéreas: son raíces que no alcanzan el suelo.

El maíz es monoico, es decir, tiene flores masculinas y femeninas en la misma planta. Las flores son estaminadas o postiladas, las flores estaminadas o masculinas están representadas por la espiga, las pistiladas o femeninas son la mazorca (Pearson, David B, 1985).

2.3.2. DIFERENCIAS ENTRE FLORES MASCULINAS Y FEMENINAS.

INFLORESCENCIA MASCULINA

Está compuesta de la inflorescencia elemental, la espiguilla, y la total una panoja o espiga, las cuales pueden ser laxas o densas. El eje sobre el cual están dispuestas las espiguillas se llaman raquis, que puede ser continuo o articulado. La espiguilla está protegida por dos brácteas llamadas glumas.

Consta de espiguilla de un pequeño eje denominado raquilla, que soporta las flores; éstas están protegidas por dos brácteas llamadas glumillas o glumelas (lema y palea).

INFLORESCENCIA FEMENINA

Las flores pistiladas se localizan en las yemas florales que emergen en las axilas de las hojas y que, en proceso de desarrollo, se denominan yema floral pistilada, jilote, elote y mazorca.

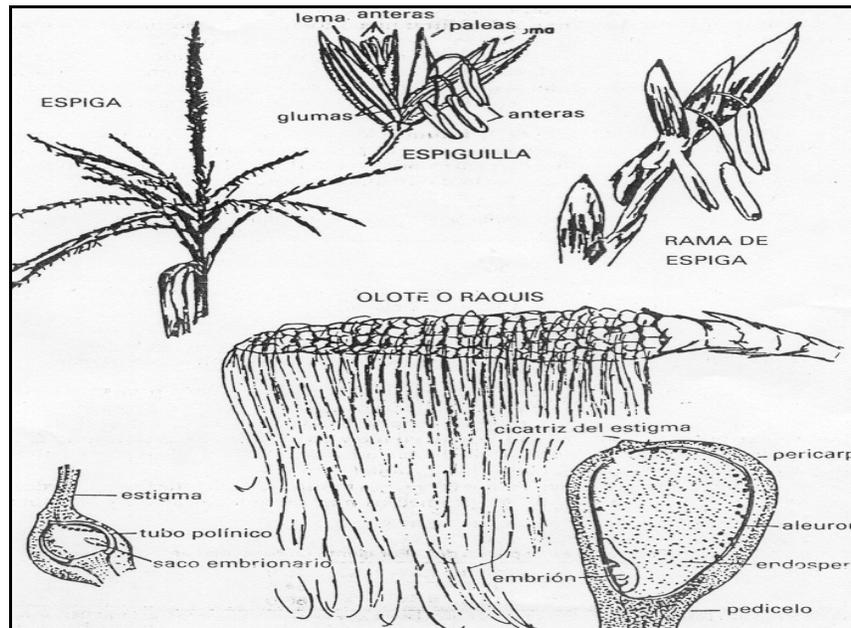


Figura 3. Órganos sexuales femeninos de la planta de Maíz.

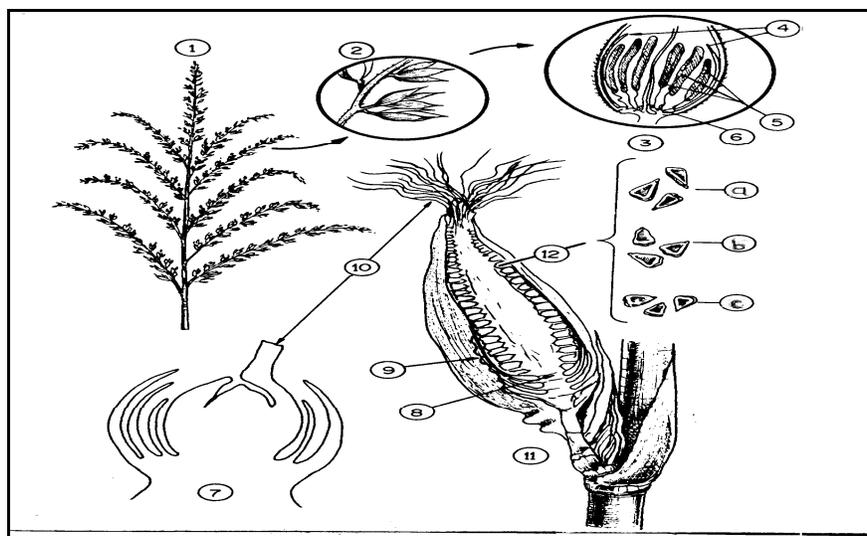


Figura 4. Órganos sexuales masculinos de la planta del maíz.

- 1) La inflorescencia de la flor masculina se presenta como espiga o panoja.
- 2) Las espiguillas se encuentran en pares, una sésil, la otra pedicelada. Los pares de espiguillas se orientan en dos hileras alternadas, a lo largo de las ramas laterales del tallo floral. El eje central superior o terminal lleva más de dos hileras.
- 3) Flor masculina: Cada una esta formada por glumelas, estambres y un pistilo rudimentario.
- 4) Par de glumelas.
- 5) Tres estambres fértiles.
- 6) Pistilo rudimentario.
- 7) Inflorescencia postilada: consta de ramas hojas y estigma.
- 8) Rama lateral modificada: los entrenudos son muy cortos.
- 9) Hojas: éstas cubren la inflorescencia.
- 10) Estigma: recibe el polen, se le conoce como cabello de elote.
- 11) Mazorca cada planta tiene de una a tres mazorcas, según las variedades y condiciones ambientales.
Los granos pueden ser de tres tipos
 - a) Granos de maíz cristalino.
 - b) Granos de maíz dentado.
 - c) Granos de maíz dulce (Reyes, 1990).

2.3.3 FISILOGIA.

La fisiología del maíz esta determinada en gran medida por el factor genético. La forma de crecimiento y desarrollo de la planta depende, hasta cierto punto depende de condiciones ambientales. Bajo las condiciones apropiadas de temperaturas, humedad y aireación el maíz germina dentro de los seis días posteriores a la siembra. No requiere de luz para germinar y, en general, no presenta problemas de latencia o dormancia.

La duración del ciclo de vida del maíz depende de las condiciones genéticas y también del ambiente. Periodos de sequía y temperaturas altas provocan una maduración temprana.

2.3.4. TIPOS DE VARIEDADES DE GRANOS.

Las variedades para la producción de granos se clasifican de acuerdo con las siguientes características:

1. Granos de color blanco. Se utiliza para la elaboración de harinas.
2. Granos con alta cantidad de carbohidratos. Son más aptos para alimentación de los animales.
3. Granos de estructura cerosa. Tienen alto contenido de amilopectina y se utilizan como alimento para el ganado.
4. Granos con alto contenido de aceite (industria aceitera).
5. Granos con alto contenido de proteína y de lisina. Se usa tanto en la industria como en la alimentación humana.

6. Granos con mayor proporción de almidón duro o cristalino. Utilizado para elaborar palomitas.

2.3.5. SELECCIÓN BOTANICA.

Las semillas obtenidas en la cosecha se seleccionan de acuerdo con lo siguiente:

- a. Ciclo vegetativo. La semilla puede ser precoz intermedia o tardía para madurar.
- b. Número de mazorca por planta.
- c. Altura de las mazorcas en la planta: para facilitar la cosecha, las mazorcas deben encontrarse a metro y medio del suelo.
- d. Resistencia de la planta al acame.
- e. Inclinación de las mazorcas maduras: en las regiones lluviosas una inclinación excesiva provoca que las mazorcas se pudran.
- f. Tamaño de la planta: en general las plantas enanas corresponden a variedades precoces de tierra fría y de regiones áridas. Las plantas altas corresponden a variedades tardías de tierra caliente y húmeda.
- g. Resistencia a enfermedades.

2.4. REQUISITOS CLIMATOLÓGICO.

El maíz exige un clima relativamente cálido y agua en condiciones adecuadas. En México, la mayoría de las variedades del maíz se cultivan en regiones de temporal de clima caliente y de clima subtropical húmedo y no se adapta a las regiones semiáridas (Pearson, 1985).

2.4.1. MEJORAMIENTO DEL MAÍZ.

El maíz es el cereal más importante y de origen americano que en la actualidad el único o el más se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo; su mejoramiento comprende la mejora sistemática de cultivo controlado y normalmente tienen mejores características de la planta, mayor rendimiento de grano y tallo; sólo es necesario seleccionar la mejor variedad para iniciar su mejoramiento parcial y controlar la descendencia de la semilla.

El fitomejorador distingue las diferencias importantes del material vegetal disponible y selecciona e incrementa los tipos más deseables.

Los métodos de mejoramiento del maíz pueden agruparse en 5 categorías generales:

- Selección masal. Es el método más antiguo y simple para mejorar el maíz, consiste en seleccionar mazorcas deseables de las mejores plantas y en sembrar la semilla seleccionada. El maíz es de fecundación cruzada casi por completo, el material producido es una mezcla compleja de híbridos y la selección da por resultado una desviación del promedio, en vez de una verdadera fijación del tipo. El éxito de la selección masal depende en gran medida de las cambiantes de frecuencias génicas y de la precisión en la selección de los tipos deseados.

Este método ha contribuido a la fijación de numerosas variedades y ha aportado modificaciones morfológicas como la altura de la planta, la inserción de la mazorca o el número del "rango" sin embargo, tiene el inconveniente de mejorar otros caracteres con notable lentitud dando por resultado que la mejora sea bastante inestable en el tiempo, puesto que tiene en cuenta exclusivamente caracteres aparentes de la planta (fenotipo) olvidando el conjunto de caracteres hereditarios (genotipo) aportados en el polen.

Una limitación de la selección masal como método para mejorar poblaciones consiste en que la selección fenotípica de plantas sembradas y se basó en una sola localidad.

- Selección de mazorca por surco: La productividad relativa de las diferentes mazorcas se evalúa sembrando una parte de la semilla de cada mazorca en surcos individuales y observando su comportamiento en las parcelas. La semilla de las mazorcas con los mayores rendimientos se incrementa para uso comercial.

- Hibridación intervarietal: Utiliza cruzamiento de la primera generación entre variedades de polinización libre de maíz como medio para obtener mayores rendimientos.

- Cruzadas múltiples, variedades sintéticas o compuestos: Define una cruce múltiple como la primera generación de una cruce que comprende más de cuatro líneas puras. La primera generación o las generaciones avanzadas de tal combinación pueden usarse para la producción de maíz comercial. Cuando las generaciones avanzadas se siembran y la variedad se conserva por selección masal, generalmente se define como una variedad sintética o compuestos.

- Híbridos de entre líneas puras: Los híbridos de maíz actuales entre líneas puras tienen una mayor potencialidad de rendimiento que las variedades sintéticas (Jugenheimer, 1981).

- Espiga-fila o “cruzamiento intervarietal”: Se obtiene semillas del cruzamiento de dos variedades de fecundación libre y de características bien diferenciadas, alternando en el campo fila de unas y otras variedades; una de las variedades se utiliza como variedad polinizadora y la otra como productora de semilla. Antes de la polinización se procede a la eliminación de las inflorescencias masculinas de todas las plantas de esta última variedad. En comparación con la selección masal, este método supone una mejora puesto que permite reunir los caracteres favorables tanto de la planta hembra como de la planta macho (Bartolini, 1990).

2.4.2. MANTENIMIENTO DE LA SEMILLA.

El maíz es una planta de polinización libre en la que cada semilla en la mazorca es un fruto independiente llamado carióspside. En el maíz los órganos sexuales están localizados en la espiga y en el jilote; la estructura del macho de la espiga que produce el polen y de la hembra es cada cabellito o estigma en el jilote.

La planta pertenece al grupo de las halógamas, en las que las estructuras sexuales están en diferentes partes de la planta; en este grupo quedan agrupadas las plantas de polinización libre. En el caso del maíz, los granos de polen se diseminan por el aire hasta caer por los cabellos que quedan polinizados para formar nuevas semillas.

Mantener las características de una variedad es difícil por que puede haber contaminación por otras variedades, además se requiere que estigmas de la variedad deseada están en estado fresco y receptivo. Por mantener los no consistentes caracteres valiosos de una variedad, la semilla se debe producir en lotes aislados donde no haya riesgo de contaminación por polen de otras variedades (De León, 2008).

Los principales factores que influyen en el crecimiento de la planta son: radiación solar; la concentración de CO₂, la temperatura, periodo libre de heladas, viento, granizo y precipitación (Rodríguez, 2008).

El resultado productivo final de un cultivo depende de la interacción positiva o negativa que se establece entre una serie de factores, comúnmente clasificados como fijos y variables. Entre los factores fijos destacamos la disponibilidad de luz y CO₂, la duración de la estación de cultivo y el suelo, y otros elementos del ambiente en que debe vegetar el cultivo y que no sean modificables para la acción del agricultor.

Entre los factores variables citamos el riego, la fertilización o el deshierbe y el genotipo de la variedad cultivada (Bartolini, 1990).

2.4.3. FOTOSÍNTESIS.

La fotosíntesis es un proceso biológico que utiliza la energía solar para la formación de uniones químicas. Los organismos fotosintéticos usan la energía de la luz para sintetizar compuestos orgánicos; el producto primario de la fotosíntesis es reducir el carbono (Xiong, E.Bauer, 1990).

En plantas el proceso de la fotosíntesis ocurre en los cloroplastos; la membrana fotosintética absorbe luz y transfiere electrones y protones que producen ATP.

La fotosíntesis tiene lugar en dos etapas: las reacciones de la fase luminosa y las reacciones de fase oscura. Las reacciones de la fase luminosa transforman la energía de la luz en ATP y poder reductor para la biosíntesis, NADPH.

Las reacciones de la fase oscura, llamada (Ciclo de Calvin), reducen los átomos de carbono totalmente oxidados, como el CO_2 a un estado reducido como una hexosa. Las reacciones de la fase oscura precisan de poder reductor en forma de NADPH, la diferencia entre NADH y el NADPH es que el primero se oxida en la cadena respiratoria para generar ATP, mientras que el segundo sirve como reductor en los procesos de biosíntesis.

2.4.4. CICLO DE CALVIN.

En el ciclo de Calvin la fuente de átomos de carbono es el dióxido de carbono en estado gaseoso. En los organismos fotosintéticos se les denominan autótrofos (se autoalimentan) ya que sintetizan glucosa a partir del dióxido de carbono y agua, mediante la utilización de la luz solar como fuente de energía para luego recuperar parte de esta energía a través de la glicólisis y el metabolismo aerobio, a partir de la glucosa sintetizada. El ciclo de Calvin tiene lugar en el estroma de los cloroplastos, en los órganos fotosintetizadores.

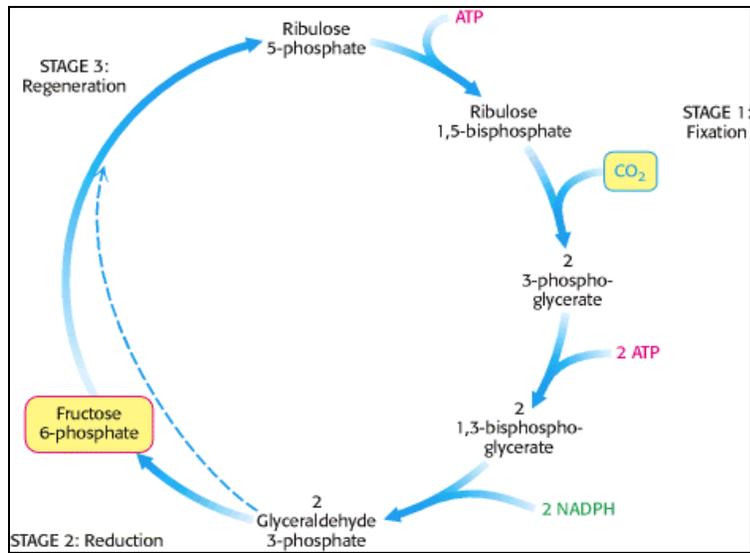


Figura 5 Ciclo de Calvin

El ciclo de Calvin se presenta en tres etapas:

- La fijación del CO_2 sobre la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato.
- La reducción del 3-fosfoglicerato para formar hexosas.
- La regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato de modo que se puedan fijar más moléculas de CO_2 .

2.4.5. EL DIÓXIDO DE CARBONO REACCIONA CON RIBULOSA 1,5-BISFOSFATO PARA FORMAR 3-FOSFOGLICERATO.

El primer paso del ciclo de Calvin es la fijación del CO_2 . La molécula de CO_2 se condensa con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar un compuesto inestable de seis átomos de carbonos que se hidroliza en dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

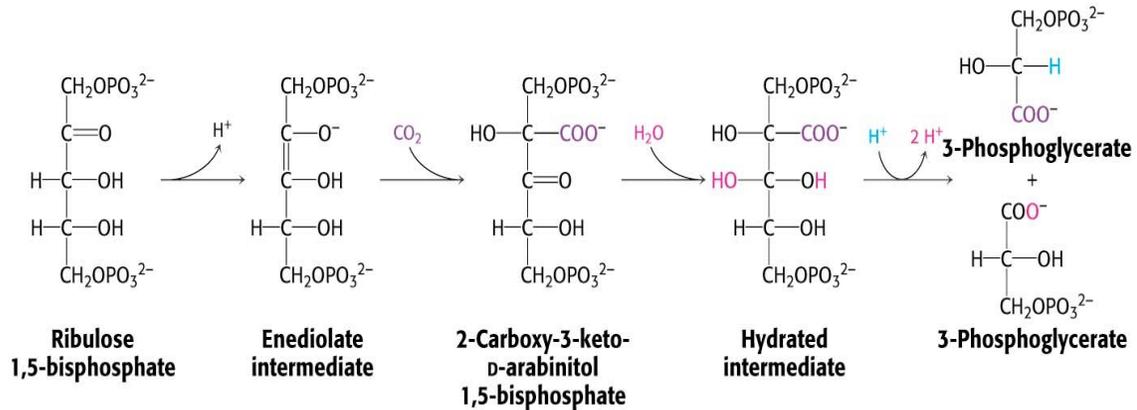


Figura 6 Obtención de 3-fosfoglicerato a partir de la Ribulosa 1,5-bisfosfato

Esta reacción está catalizada por la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco), una enzima localizada en la superficie de las membranas tilacoidales en el estroma de los cloroplastos (M. Berg, 2003).

2.5. FOTOSÍNTESIS C4.

Las plantas C4 como el maíz y caña de azúcar se desarrollaron a partir de la evolución de las plantas C3 adquiriendo el camino fotosintético C4 el cuál tiene un alto funcionamiento fotosintético y nitrógeno que utiliza con gran eficiencia. La mayoría de las plantas terrestres incluyendo cosechas importantes como arroz, trigo y cebada, asimilan el CO_2 atmosférico directamente a través del camino fotosintético C3, también conocido como Ciclo de Calvin y se clasifican como plantas C3.

La enzima de la fijación primaria del CO_2 es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) y reacciona no sólo con el CO_2 si no también con el O_2 que en presencia de altas concentraciones actúa como oxigenasa, y cataliza la oxigenación del 1,5 -bisfosfato de ribulosa a fosfoglucolato y 3 -fosfoglicerato (Scott y Eagleson, 1988).

Las plantas C4 como el maíz y caña de azúcar son capaces de fijar el CO_2 a compuestos de cuatro carbonos, como el malato; además de fijar el CO_2 por el ciclo de

Calvin. Las células foliares de esta planta presentan dos tipos de cloroplastos: Tipo mesófilo y tipo vaina, estos llevan el CO₂ desde las células del mesófilo, que están en contacto con el aire, a las células de la vaina del haz vascular que constituye el centro fotosintético. La descarboxilación de compuestos de cuatro carbonos en las células de la vaina del haz mantiene la concentración de CO₂ elevada en el sitio donde tiene lugar el ciclo de Calvin (Foyer, 1984).

Las plantas tropicales de tipo C₄ presentan escasa fotorespiración debido a que la elevada concentración de CO₂ en las células de la vaina del haz vascular acelera la reacción carboxilasa respecto a la oxigenasa, este efecto es importante a temperaturas elevadas. Esta estructura única de la hoja, conocida como anatomía de Kranz y la compartimentalización de células específicas de enzimas son esenciales para la cooperación del camino C₄ (Scott y Eagleson, 1988).

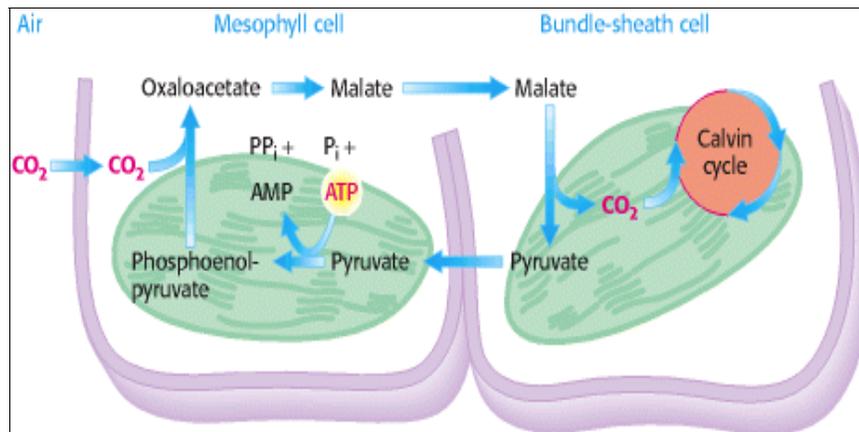
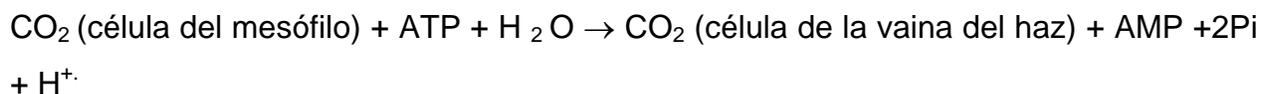


Figura 7. Esquema de la Vía C₄

La reacción neta de la vía C₄ es:



2.5.1. ANATOMÍA DE KRANZ.

Las células de las plantas C4 poseen una anatomía característica que es distinta de las plantas C3. En las hojas de las plantas C3, las células del mesófilo están distribuidas al azar en todo el tejido de la hoja y son los sitios primarios de fijación de CO₂ fosfoglicerato. En las hojas C4, de las células de la vaina del haz, son más prominentes que en las hojas C3. La estructura se conoce como anatomía de Kranz.

Las células del mesófilo de las plantas C4 fijan CO₂ en el ácido dicarboxílico C4 oxalacetato en una reacción que cataliza la fosfoenolpiruvato carboxilasa, que está presente en el citosol y tiene mayor afinidad por el CO₂ que la Rubisco. En algunas especies, el oxalacetato se reduce a malato en los cloroplastos del mesófilo y luego se transporta a las células de la vaina del haz vascular del cloroplasto, donde sufre descarboxilación (por NADP⁺) y enzima málica para dar NADPH, CO₂ y piruvato.

En el cloroplasto de la vaina de haz, la Rubisco fija el CO₂ como en las plantas C3 y éste entra en el ciclo de Calvin. El piruvato vuelve a la célula del mesófilo para convertirse en fosfoenolpiruvato. El resultado de este ciclo es el transporte constante del CO₂ hacia las células de la vaina de haz y las tasas de carboxilación del fosfoenolpiruvato y de la posterior descarboxilación del malato son ordinariamente mayores; la concentración del CO₂ en el interior de los cloroplastos de la vaina del haz vascular se mantiene a un nivel muy superior al atmosférico y reprime la actividad de la oxigenasa y por tanto de la fotorrespiración (Smith, 1998).

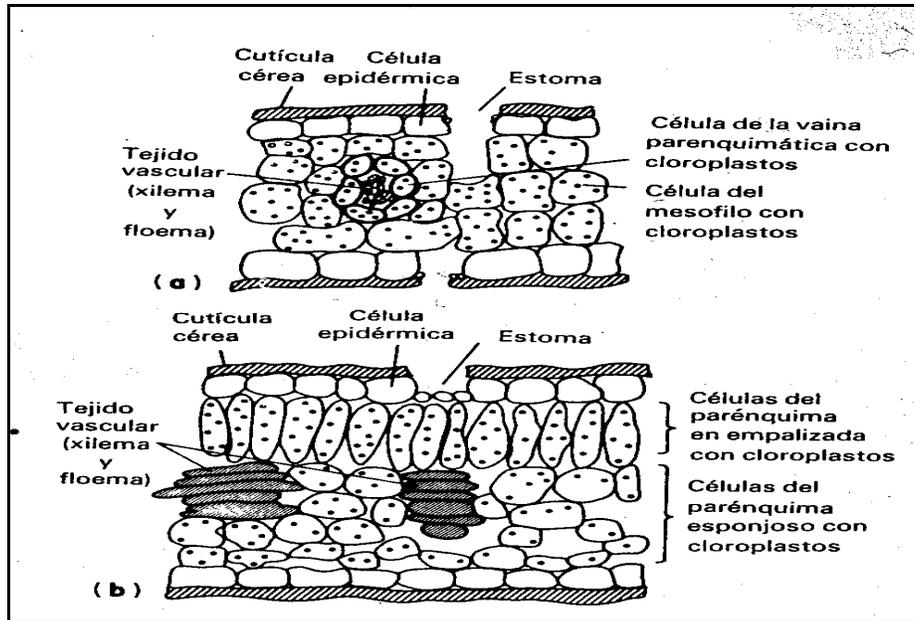


Figura 8 Esquema de la estructura de cloroplastos en las plantas C4 (a) y C3 (b)

2.5.2. RUBISCO.

La Rubisco de los cloroplastos consta de ocho subunidades grandes (L, de 55kd) y ocho pequeñas (S, de 13kd); cada cadena L contiene un centro catalítico y un centro regulador. La cadena S estimula la acción catalítica de la cadena L. Este enzima es muy abundante en los cloroplastos y comprende más de 16% de sus proteínas totales.

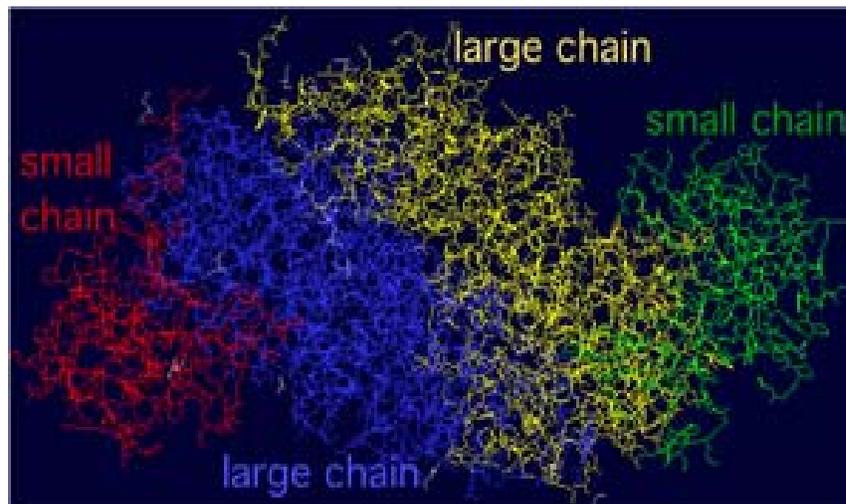


Figura 9. Estructura de la Ribulosa bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco).

La Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) es una enzima localizada en la superficie de las membranas tilacoidales que da al estroma de los cloroplastos y por su actividad precisa estar unida a un metal divalente como es el ion (Mg^{+2}), este ion sirve para activar a la molécula sustrato unida mediante la estabilización de su carga negativa y para completar el ensamblado del centro de unión con el Mg^{+2} se precisa de otra molécula de CO_2 distinta.

Esta molécula de CO_2 se añade al grupo no cargado amino de la lisina 201 para formar carbamato (Berg, M. 2003).

La Rubisco cataliza la fijación del CO_2 covalentemente por la Ribulosa 1,5 bifosfato (RuBp) para formar dos moléculas de ácido D-fosfoglicérico (PGA). Cuando el RuBp activa el sitio de Rubisco puede ser atacado por el O_2 para producir el 2 -fosfoglicolato y PGA. La enzima esta localizada en el cloroplasto. La Rubisco es modulada en la planta por factores como la intensidad de luz, concentración del sustrato, oxígeno y CO_2 (Dennis T, 1990).

La Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) es un biocatalizador global significativo, en plantas más altas, Rubisco representa una cantidad del contenido proteínico foliar y esta situado en el tejido conector del cloroplasto de las células de Kranz de plantas C4.

En numerosos experimentos se ha estudiado el detallado mecanismo cinético de la carboxilasa y de la oxigenasa. En ambas reacciones, la activación de la enzima por el ion de el CO_2 y del metal Mg^{+2} procede catálisis en presencia del bisfosfato de ribulosa 1,5 y del $CO_2 - O_2$ iones de este metal que son intermediarios de la reacción y de varios metabolitos cloroplásticos que interfieren en las reacciones llevando actividades modulatorias de Rubisco.

Esta proteína es la más abundante en hojas y es una enzima bi funcional que cataliza dos reacciones competentes que es la asimilación fotosintética del CO_2 y la oxidación

del carbón por foto respiración en el tejido conector de cloroplastos (Feller y Fischer, 1994).

Rubisco activasa es una proteína cloroplástica con actividad de chaperona molecular, constituida por dos polipéptidos de masa molecular aproximada de 41 y 45 kDa de acuerdo con la especie; en maíz son de 41 y 43 kDa (Martínez *et al.*, 1997).

De acuerdo a su secuencia la Rubisco Activasa ha sido clasificada dentro de un grupo de proteínas AAA+, (ATPasas asociadas a una variedad de actividades celulares) que comparten las características de poseer dominios de ATPasas conocidos como módulos AAA+, este tipo de proteínas constituye un grupo de chaperonas moleculares capaces de inducir un cambio conformacional en estructuras moleculares o macromoleculares (Hanson P. and Whiterheart S. 2005).

La Rubisco Activasa de maíz es codificada por 2 genes: Zmrca 1 y Zmrca 2, 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, posee la misma región codificadora o marco de lectura abierto idéntico y no muestran posibles sitios de empalme en sus regiones 3', este 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 postraducciona para regular la actividad de Rubisco Activasa (Vargaz-Suarez 2004).

3. HIPÓTESIS.

Dado que Rubisco Activasa mantiene el estado activo de la Rubisco, se puede considerar que al utilizar un proceso de selección basada en el contenido de Rubisco activasa, se obtendrán plantas de maíz con mayor capacidad fotosintética. Si esto es así entonces se obtendrán plantas de maíz de mayor tamaño y/o con mayor rendimiento del grano.

4. OBJETIVO.

Establecer las condiciones metodológicas para poder cuantificar el contenido de la proteína Rubisco activasa presente en hojas de maíz de lotes seleccionados por alta cantidad de Rubisco activasa (cosecha 2008).

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

Estimar la cantidad de proteína presente en lotes de hojas de maíz cosecha 2008 proveniente de una selección realizada previamente en base a la alta cantidad de Rubisco activasa a partir de una variedad original de maíz llamado Zacatecas 58 original (Zo).

5. MATERIALES Y REACTIVOS.

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Lotes de hojas de maíz de cosecha 2008 bajo el supuesto de su alta cantidad de Rubisco activasa presente en la hoja.

5.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE).

Para la preparación de las diferentes disoluciones amortiguadoras se usaron las siguientes soluciones concentradas:

- a) Solución 1: Acrilamida 30g, Bisacrilamida 0.8 g / 50 mL de H₂O. Completar a 1000 mL con agua destilada.
- b) Solución 2: Tris 9.07 g, SDS 0.2 g con un ajuste de pH =8.8 y aforo a 100 mL.
- c) Solución 3: Tris 3.02 g, SDS 0.2 g con un ajuste de pH =6.8 y aforo a 100 mL.
- d) APS 20 %.
- e) Temed 5 %

Tabla 1. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS.

REACTIVOS	GEL SEPARADOR (μL)	GEL CONCENTRADOR (μL)
SOLUCIÓN 1	3.6 mL	0.83 mL
SOLUCIÓN 2	4.5 mL	2.5 mL
SOLUCIÓN 3	-----	2.5 mL
H ₂ O	1.8 mL	1.65 mL
TEMED 5 %	15 μL	5 μL
APS 20 %	120 μL	50 μL

*Una vez que se han añadido, se debe utilizar lo más rápidamente posible la disolución.

Los geles se preparan de la siguiente manera:

En cada soporte, se montaron las placas de vidrio en un equipo para electroforesis modelo mini protean de (Biorad) con un separador de 1.5 mm de ancho, sellado en los extremos; posteriormente se preparó el gel separador y se vació en dos placas de vidrio y se dejó polimerizar.

Se preparó el gel concentrador el cual fué vertido sobre el gel anterior y con la ayuda de un “peine” se dejó el espacio para cargar la proteína.

Se montaron los soportes en la cámara y se cargó la proteína en base a 40 μ g.

Se corrió la electroforesis de las muestras a 60 mA, 2 hrs evitando que salga el frente de corrida. Posteriormente el gel se colocó en un recipiente de plástico limpio para realizar la tinción con azul de Coomassie.

5.3 DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE pH=8.9 (DE CORRIDA PARA LA ELECTROFORESIS)

Reactivos	Cantidad para preparar 1.5 L
Tris	4.8 g
Glicina	21.6 g
SDS	1.5 g

Llevar a un volumen de 1.5 L con agua.

5.4 DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE pH= 6.8 PARA LA MUESTRA (4X)

Se indican los volúmenes tomados de las diferentes disoluciones para preparar la disolución concentrada 4 veces.

MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos	Cantidades para preparar 8.0 mL
Tris-HCl 0.5 M a pH= 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10% (w/v)	1.6 mL
Azul de Bromofenol	0.05 %

Llevar a un volumen de 8.0 mL con agua utilizando, una probeta graduada de 10 mL. Guardar en alícuotas en tubos eppendorff de 500 μ L a -20° C.

5.5 DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE pH= 7.2 (PBS) PARA TRANSFERENCIA Y WESTERN BLOT.

Reactivos	Cantidades para preparar 1000 mL
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.36 g
NaCl	9.0 g
Tween 20	1.0 mL

Llevar a un volumen de 1000 mL con agua.

6. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LAS MUESTRAS DE HOJAS DE MAÍZ.

6.1 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Se preparó una solución concentrada disolviendo 0.1g de BSA (BioRad) en 500 μ L de agua desionizada.

La curva patrón se realizó variando la concentración de BSA. Para ello se tomaron volúmenes de la solución concentrada de 0,5, 10,15 y 25 μ L, se agregó un volumen de 200 μ L del reactivo de Bradford y se completó a 1000 μ L con agua desionizada.

Se midió la absorbancia de las disoluciones en una celda de plástico (BioRad) de 1200 μL , con paso óptico de 1cm a una λ de 595nm en un espectrofotometro BECKMAN DU 650. Las lecturas de Abs vs C de BSA; absorbancia en función de la concentración se representaron gráficamente.

6.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

A partir de los lotes seleccionados de alto contenido de Rubisco activasa del ciclo agrícola 2008, se recolectaron las hojas para determinar la cantidad de la rubisco activasa presente en dichas hojas de maíz.

Se cortó cada hoja de maíz en tamaños de 5.0 cm de largo / 4.5 cm de ancho, se eliminó la parte central de cada una de ellas, se pesó y se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino, se adicionó 1.5 ml de una disolución amortiguadora de pH=8.1 (0.1M Tricina-NaOH, 1mM PMSF, 10mM B-Met, 5mM EDTA, 10mM NaHCO_3 , 10mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 1mM de Benzamidina).

El extracto crudo así obtenido fue homogenizado y distribuido en tubos, los cuales se centrifugaron a 14000 rpm en una centrifuga BECKMAN modelo J2-21 utilizando un rotor JA-20 a 4°C durante 25 min; se recolectó el sobrenadante del extracto crudo en tubos eppendorff utilizando una micro pipeta RAININ y los tubos se guardaron a -70°C hasta su uso.

Del sobrenadante obtenido de extractos crudos para cada hoja de maíz, se tomaron alícuotas de 2 μL de cada muestra a la cuál se le añadió 798 μL de agua desionizada y 200 μL de reactivo de Bradford, la lectura obtenida se extrapoló a la curva patrón de BSA para obtener los $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de proteína de cada extracto.

7. MÉTODOS.

7.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteína se llevo a cabo empleando la técnica descrita por Bradford (1976).

El método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomasie brillante G250 (reactivo de Bradford) a los residuos de Arg,Trp,Tyr,His y Phe de las proteínas. El reactivo se une a los residuos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595nm.

7.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE).

La electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante es un método para analizar proteínas (Laemmli,1970). La separación de proteínas por SDS-PAGE es utilizada para determinar la abundancia relativa de la mayoría de las proteínas en una muestra, el método se basa en peso, carga y su capacidad para desplazarse a través de una corriente eléctrica.

El peso molecular aproximado de las proteínas de interés se determina comparando las bandas de proteínas con pesos moleculares conocidos. En nuestro caso se utilizó BSA y Rubisco activasa de espinaca.

Para separar electroforéticamente Rubisco Activasa de cada extracto de hojas de maíz, se utilizaron 40 µg de proteína total determinada por el Método de Bradford, y 6 µg de extracto de hojas de espinaca como referencia de peso molecular. Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturalizante en geles al 12% de acrilamida, con una corriente de 60 mA, dejándose correr 2 hrs para tener una adecuada separación de las bandas.

7.3 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS.

Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P, PVDF de Millipore (Absalon E. 2003), utilizando el equipo de transferencia de membrana en medio líquido. El orden de los papeles filtro y de la membrana utilizada fue el siguiente:

- Placa transparente (-) ánodo.
- Papel filtro (2)
- Membrana
- Papel filtro (2)
- Placa negra (+) cátodo.

Se llena la placa con disolución amortiguadora de pH =7.2 (PBS) con metanol al 10 %, se pone en baño de hielo y se transfiere a 100 volts por 1hr, la membrana se seca y se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

7.4. WESTERN BLOT.

La técnica de Western blot (Boyer, R. 2000) sirve para identificar proteínas mediante anticuerpos que se unen a proteínas específicas. En esta técnica el anticuerpo contra una proteína específica, se unirá a ésta y después se utiliza un segundo anticuerpo unido a peroxidasa que reconoce al IgG del primer anticuerpo lo que al utilizar el sistema de quimioluminiscencia hace aparecer una banda visible en el sitio en que el primer anticuerpo se ha unido a la proteína (Swanson *et al.*, 2008).

La membrana que se había almacenado se hidrató con metanol unos segundos y se lavó con agua desionizada; se saturó con leche descremada (Svelty) a 5% en PBS por 1 h en agitación constante y se agregó el primer anticuerpo contra la Rubisco activasa en dilución 1:10000 con leche al 5% en PBS, y se dejó en agitación a temperatura de 4° C toda la noche.

Posteriormente se lavó la membrana 2 veces 20 min cada vez, se agregó el segundo anticuerpo (HRP goat anti-Rabbit) en dilución 1:5000 en leche al 5% en PBS a

temperatura ambiente por 2 hrs. Se lavó la membrana con PBS, tres veces con un tiempo para cada uno de 20 min. Por último se reveló la membrana en cuarto oscuro utilizando el sistema de quimiluminiscencia de Millipore (Immobilon-Western).

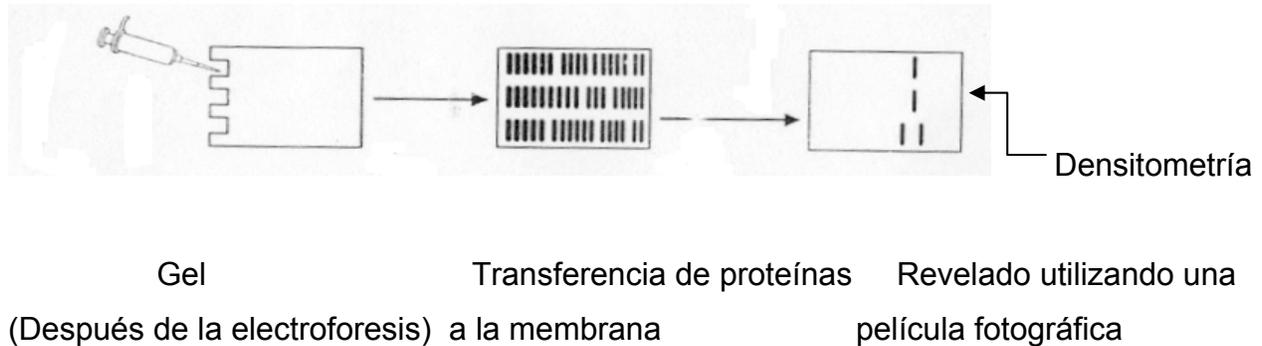


Figura 10. Esquema del comportamiento del anticuerpo en el Método de Western Blot.

7.5 DENSITOMETRIA.

La densidad óptica relativa obtenida para cada película fotográfica fue cuantificada por medio de un análisis densitométrico, utilizando el equipo Fluor-STM Multimarger (Bio-Rad) y el programa de computadora Quantity One de Bio- Rad

Las medidas de densidad óptica se indican en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (Odu / mm^2).

7.6 INTERPRETACIÓN DE DATOS

La lectura de densidad óptica de cada una de las muestras se comparó con la lectura densitométrica de la muestra llamado Zacatecas 58 original Zo tomando muestras de hojas de maíz de la cosecha 2008 con alta cantidad de Rubisco presente en las hojas de maíz. Los datos que se obtuvieron de esta relación de hojas con alta cantidad de Rubisco contra la variedad original de maíz llamado Zacatecas 58 lote Zo se analizaron en gráficas de bloque en el que se establecieron las cantidades de contenido relativo de Rubisco activasa vs el número de plantas que corresponden para cada hoja de maíz.

8. RESULTADOS.

Curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) utilizada para la obtención de la cantidad de proteína de cada extracto crudo.

Las disoluciones se midieron en una celda de plástico (BioRad) de 1200 μL , con paso óptico de 1cm a una λ de 595nm, utilizando como blanco agua desionizada. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Absorbancias de las diferentes concentraciones de Albumina Sérica Bovina

(BSA $\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	ABS 595nm
0	0
5	0.3291
10	0.6314
15	0.8967
25	1.1236

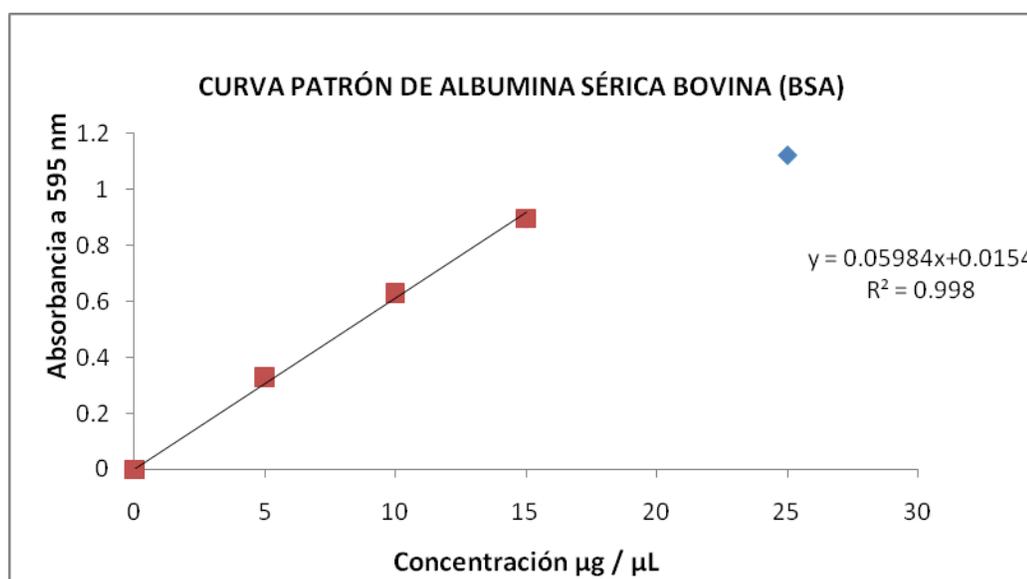


Figura 11. Gráfica de la Curva Patrón de Albumina Sérica Bovina

En la curva patrón mostrada en la figura 11 se observa que se cumple la ley de Lambert y Beer (Absorbancia vs Concentración) en un intervalo de concentración desde 0 hasta 15 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

Con la curva patrón se pudo obtener la cantidad de proteína contenida en cada hoja de maíz y en base a esto se inyectó el volumen de proteína en μL para cada uno de los pozos contenidos en el gel y se llevó a cabo la electroforesis.

TABLA 3. Tabla de resultados obtenido a partir de la curva patrón de BSA para las diferentes muestras de hojas de maíz.

Muestra	Peso (g) de la hoja de maíz	Absorbancia a 595 nm en 2 μL de muestra	Microgramos de proteína en 2 μL de muestra	Volumen de muestra en donde se tienen 40 μg de proteína(μL)
Z0	0.47	0.3096	4.91	32
55	0.42	0.3860	6.19	26
56	0.40	0.2353	3.67	44
53	0.36	0.3943	6.33	26
54	0.62	0.5787	9.41	18
8	0.40	0.3748	6.0	26
17	0.41	0.5176	8.39	20
13	0.54	0.364	5.82	28
51	0.62	0.6382	10.40	16
11	0.45	0.3910	6.27	26
15	0.36	0.3640	5.82	28
57	0.38	0.3479	5.55	30
59	0.36	0.3926	6.30	26
9	0.44	0.2716	4.28	38
52	0.56	0.4026	6.47	26
28	0.38	0.4112	6.61	24
22	0.33	0.5952	5.25	30
5	0.56	0.5854	9.52	16
24	0.50	0.4271	6.88	24
36	0.49	0.5129	8.31	20

RESULTADOS

Electroforesis para la separación de proteínas por peso molecular de las muestras representativas de las hojas de maíz utilizando BSA y la Pepsina como marcadores de pesos moleculares. Se indica la banda de Rubisco Activasa.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)

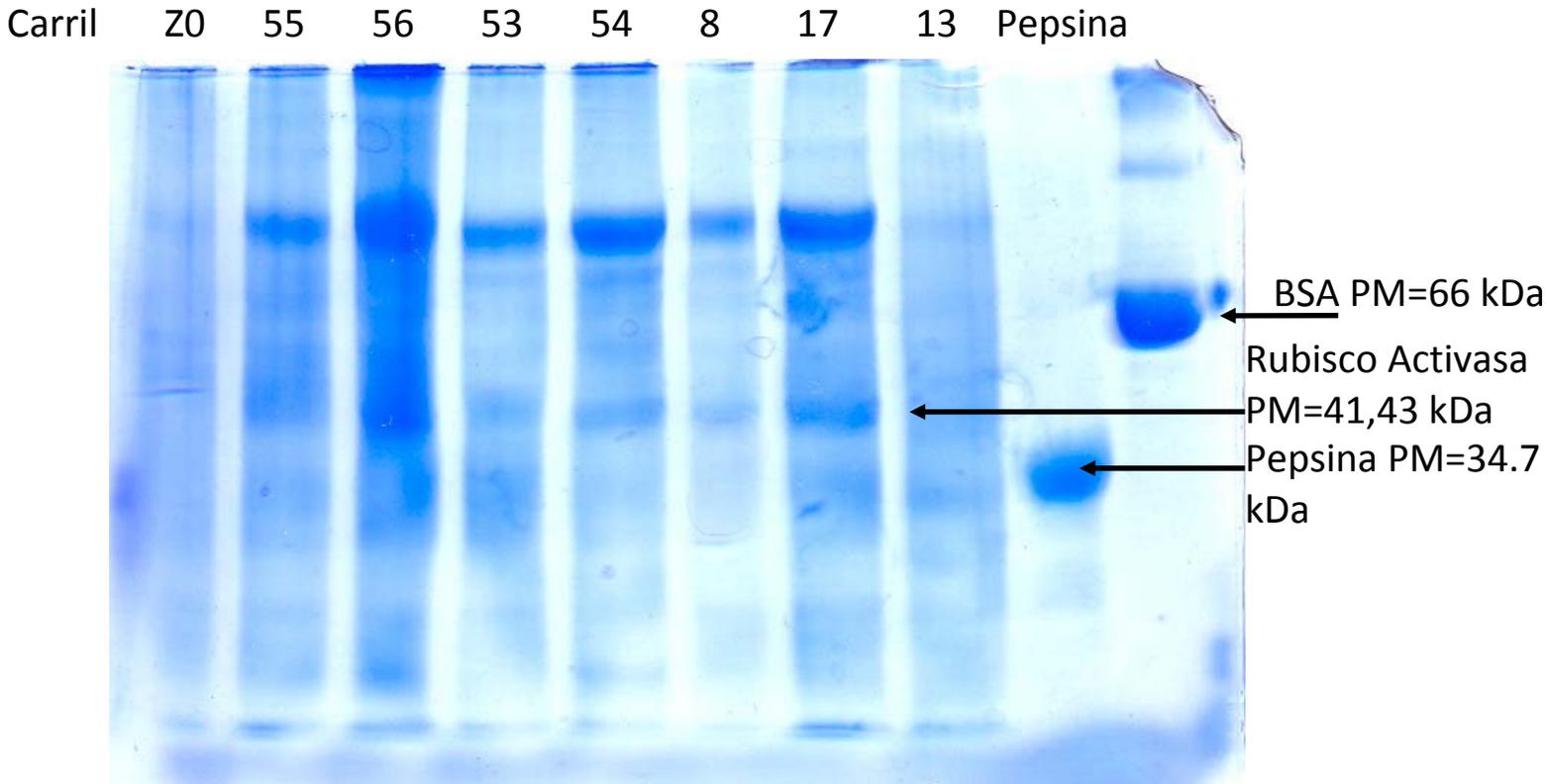


Figura 12. Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz (Tinción con azul de Coomassie) . Las muestras para cada carril en base a 40 μ g de proteína cruda son: muestra Z0 ,32 μ L de proteína, muestra 55, 26 μ L de proteína, muestra 56, 44 μ L de proteína, muestra 53 , 24 μ L de proteína , muestra 54, 18 μ L de proteína, muestra 8, 26 μ L de proteína, muestra 17, 20 μ L de proteína , muestra 13, 28 μ L de proteína , muestra pepsina, 30 μ L de proteína, muestra Albumina Sérica Bovina(BSA), 30 μ L de proteína.

RESULTADOS

Electroforesis para la separación de proteínas por peso molecular de las muestras representativas de las hojas de maíz utilizando BSA y la Pepsina como marcadores de pesos moleculares. Se indica la banda de Rubisco Activasa.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)

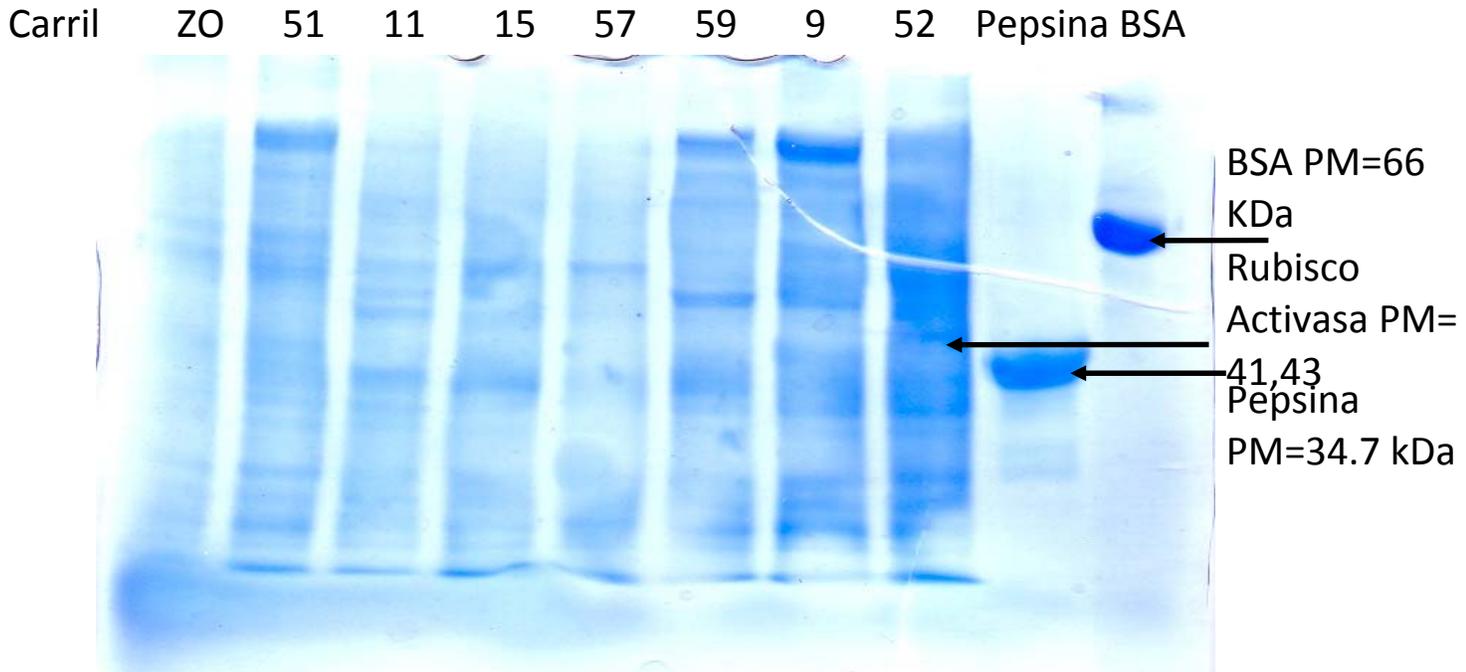


Figura 13. Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz (Tinción con azul de Coomassie). Las muestras de cada carril en base a 40 μg de proteína cruda son: muestra Z0 , 32 μL de proteína, muestra 51, 16 μL de proteína, muestra 11, 26 μL de proteína, muestra 15 , 28 μL de proteína , muestra 57, 30 μL de proteína, muestra 59, 26 μL de proteína, muestra 9, 38 μL de proteína , muestra 52, 26 μL de proteína ,muestra pepsina, 20 μL de proteína, muestra BSA , 30 μL de proteína.

RESULTADOS

Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz .La Rubisco activasa de hoja de Espinaca como marcador de peso molecular.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT

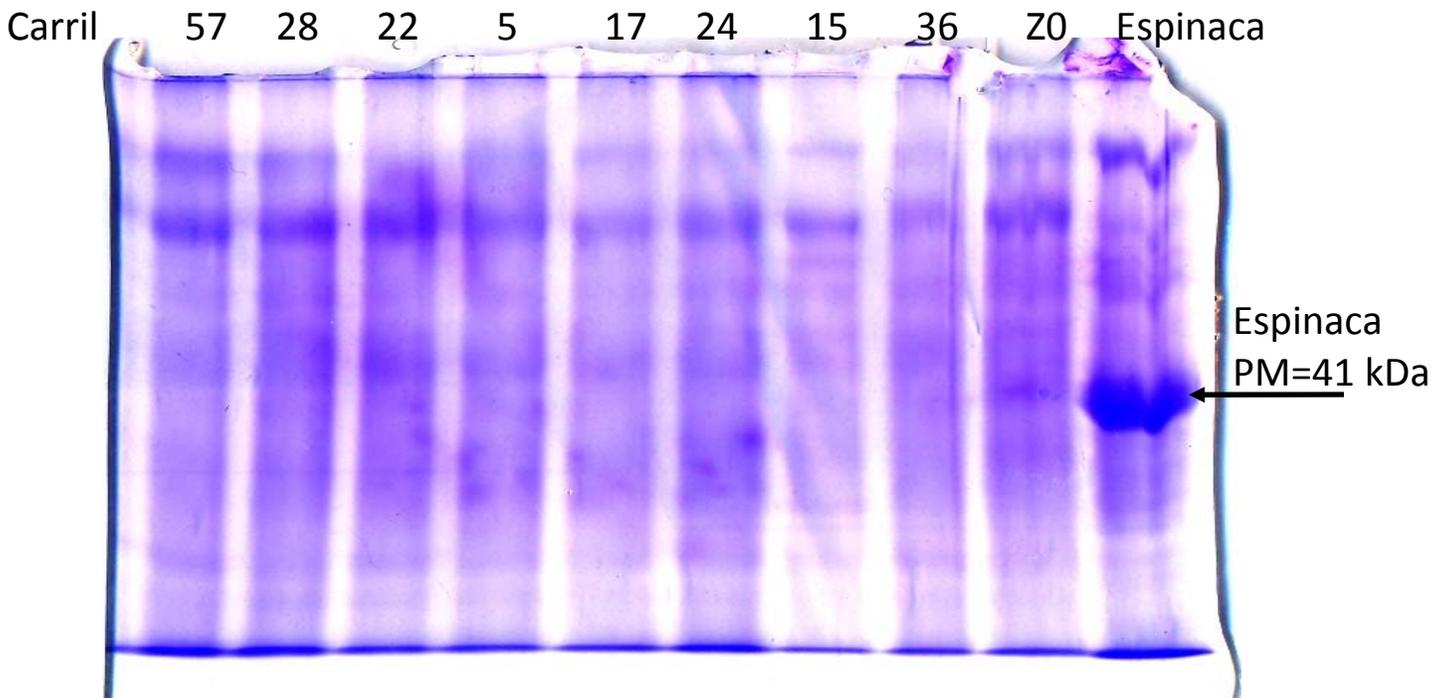


Figura 14. Separación de proteínas por peso molecular de muestras de hojas de maíz (Tinción con azul de Coomassie) . Las muestras de cada carril en base a 40 μ g de proteína cruda son: 57, 30 μ L de proteína, muestra 28, 24 μ L de proteína, muestra 22, 30 μ L de proteína, muestra 5, 16 μ L de proteína, muestra 17, 20 μ L de proteína, muestra 24, 24 μ L de proteína, muestra 15, 28 μ L de proteína, muestra 36, 20 μ L de proteína, muestra 20, 20 μ L de proteína, muestra de espinaca, 30 μ L de proteína.

Tabla 4. Cantidad relativa de Rubisco activasa de 29 muestras de hojas de maíz representativas del lote Alta Rubisco Activasa, ciclo agrícola 2008.

Número de planta	Contenido de Rubisco Activasa (ODU / mm ²) en muestra ciclo Z ₃ .
28	135.4
22	130.1
5	109.4
17	130.0
24	122.3
15	132.1
36	131.3
6	138.6
95	138.5
76	138.8
7	138.9
15	139.3
100	139.1
3	138.8
93	138.5
3	140.0
43	138.3
95	134.4
8	136.1
77	139.1
78	139.1
76	139.1
90	138.1
78	137.7
37	137.9
77	138.5
52	139.1
58	139.2
57	139.4
Z0 *	62.1
Promedio	135.76
Desviación estándar	6.452

Tabla 5. Cantidad relativa de Rubisco activasa de 29 muestras de hojas de maíz representativas del lote Alta Rubisco Activasa, ciclo agrícola 2008.

Número de planta	Contenido de Rubisco Activasa (ODU / mm ²) % en muestra ciclo Z ₃ .
28	218.03
22	209.50
5	176.16
17	209.33
24	196.94
15	212.72
36	211.43
6	223.18
95	223.02
76	223.51
7	223.67
15	224.31
100	223.99
3	223.51
93	223.02
3	225.44
43	222.70
95	216.42
8	219.16
77	223.99
78	223.99
76	223.99
90	222.38
78	221.73
37	222.06
77	223.02
52	223.99
58	224.15
57	224.47

*Promedio de 4 repeticiones

Inmuno transferencia Western blot en electroforesis de proteínas para muestras de hojas de maíz señalando la banda de Rubisco Activasa del Maíz de 43 kDa y de Espinaca de 41 kDa.

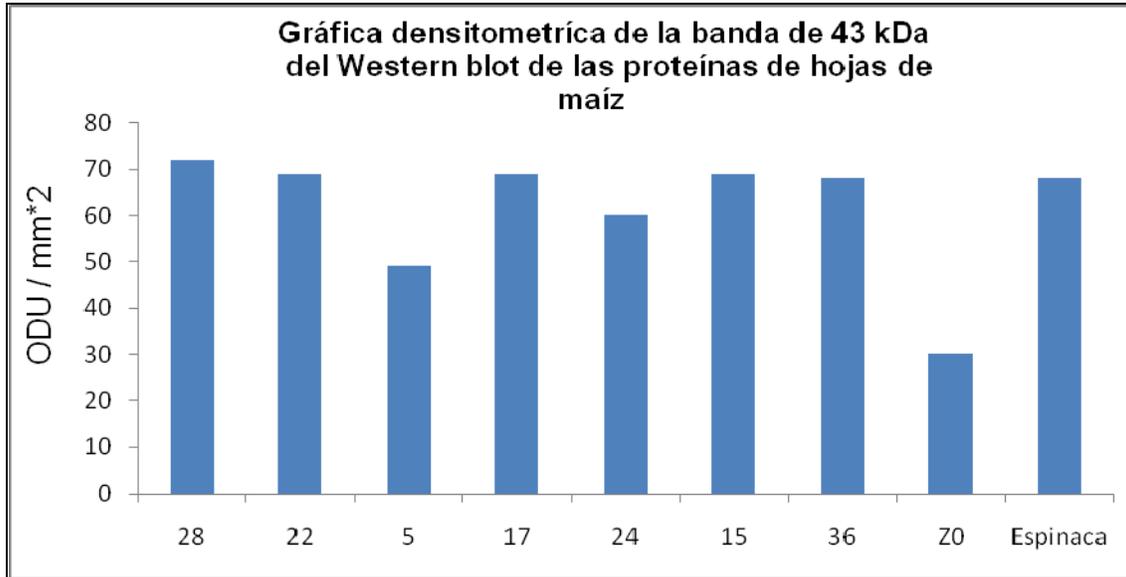
WESTERN BLOT



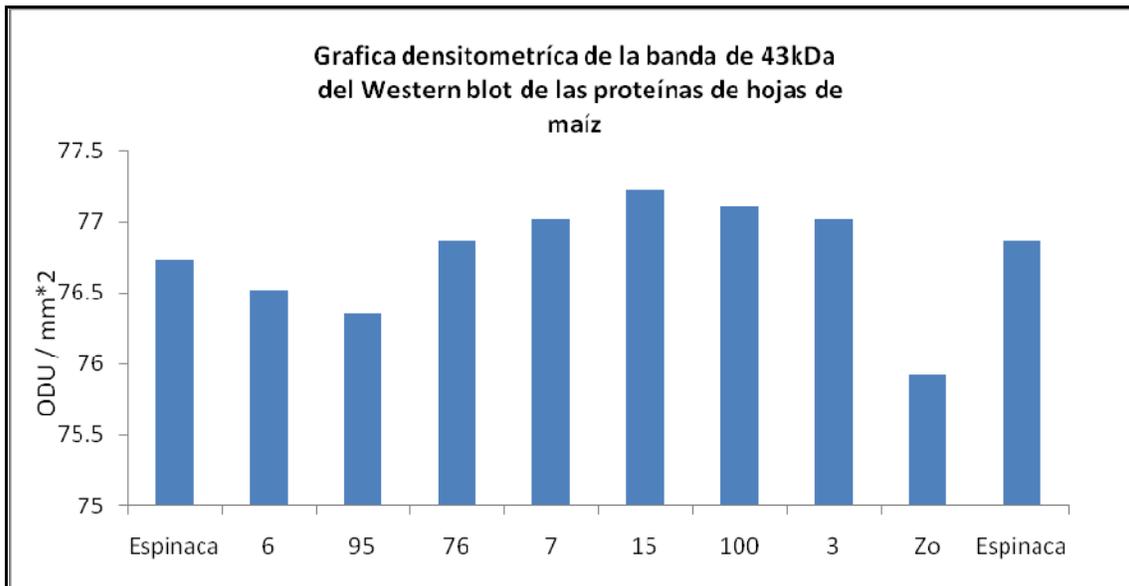
Figura 15. Se muestra un ejemplo del Western blot de proteínas de muestras de hojas de maíz ; Las muestras de cada carril en base a 40 μg de proteína cruda son: muestra 28, 24 μL de proteína, muestra 22, 32 μL de proteína, muestra 5 , 16 μL de proteína , muestra 17, 18 μL de proteína, muestra 24, 22 μL de proteína, muestra 15, 28 μL de proteína , muestra 36, 18 μL de proteína, muestra Z0, 26 μL de proteína, muestra de espinaca, 12 μL de proteína.

En las siguientes gráficas densitométricas se muestran los resultados de los experimentos por Western blot Se cuantificó la banda de 43 kDa de la Rubisco activasa, indicada en la figura 15.

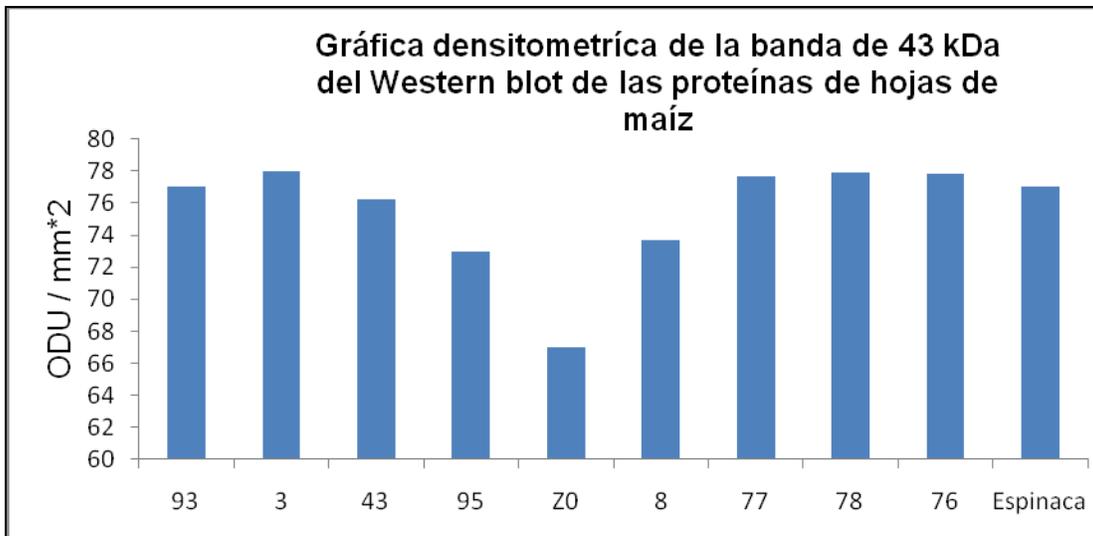
Se obtiene la cantidad de Rubisco Activasa expresadas en ODU / mm² para cada una de las muestras seleccionadas aleatoriamente y se hace la gráfica densitométrica de la banda de 43 kDa de las proteínas de hojas de maíz.



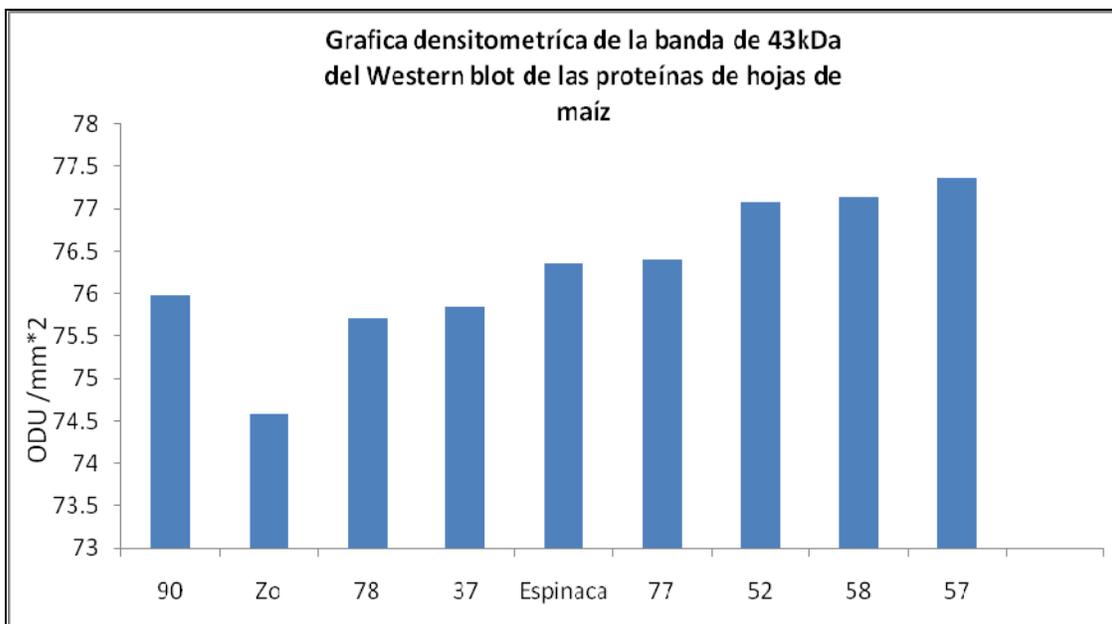
Grafica 1. Densitometría de las bandas del Western blot.



Grafica 2. Densitometría de las bandas del Western blot



Grafica 3. Densitometría de las bandas del Western blot.



Grafica 4. Densitometría de las bandas del Western blot.

9. DISCUSIÓN.

El trabajo de tesis fue realizado con lotes de hojas de maíz cosecha 2008 procedente de la selección masal por alto contenido de Rubisco Activasa y de lotes de hojas de la variedad original de maíz llamado Zacatecas 58 lote Zo. Para ello en las figuras 12, 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos para llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE), utilizando 40 μg de proteína total, que fue la cantidad necesaria de proteína para observar las bandas. Se utilizaron como marcadores de pesos moleculares a la Albúmina Sérica Bovina (BSA) con un peso molecular de 66 kDa y de la pepsina con peso molecular de 34.7 kDa. Se observa en las muestras de hoja marcados como número 55, 56,53,54,8,17,13 y Zo como control las bandas característica de maíz de la Rubisco activasa con un peso molecular de 41 y 43 kDa señalado en la (figura 12). El valor de la banda de 43 kDa se tomó para hacer las comparaciones respectivas, por considerar que es la forma nativa de la chaperona.

Posteriormente en la (figura 13) se observaron las muestras de hojas de maíz marcadas con el número Zo,51,11,15,57,59,9,52 en donde se observa nuevamente que la banda de la chaperona Rubisco activasa de 43 kDa, es superior en todas las muestras comparadas con el control Zo.

Se hace una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) para observar la presencia del marcador de peso molecular de la espinaca de 41 kDa aplicando aleatoriamente las muestras de proteína de maíz marcado con el número 28,22,5,17,24,15,36 y Zo .

De estas mismas muestras aplicando la técnica de Western blot se obtuvo la presencia de la chaperona Rubisco activasa del maíz para las muestras de hojas de maíz marcadas con el número 28,22,5,17,24,15,16 y Zo como control de la forma polipeptídica del maíz de masa molecular de 43 kDa (figura 15).

En las muestras de hojas de maíz marcadas como el número 36, 15, 24, 17, 5, Zo y la espinaca se observaron la otra forma polipéptica del maíz con una masa molecular de 41 kDa (figura 15).

El promedio de las 29 muestras analizadas fue de 135.76 y con una desviación estándar de 6.452 (tabla 4).

Se indica en la tabla 5 el contenido de Rubisco Activasa de cada una de las muestras expresadas en porciento (%) donde se tiene un incremento de los valores con respecto a la variedad original de maíz llamado Zo, el valor máximo obtenido es de la muestra marcado como numero 3 con 225.44 % y el valor mínimo es para la muestra marcado con el numero 5 con 176.16 %.

Se demuestra la aparición de bandas características presentes de la proteína Rubisco activasa del maíz con la ampliación y mejoramiento de la metodología mencionada anteriormente.

De acuerdo con las graficas de barras obtenidas para los resultados de la densitometría se tiene:

- Mayor cantidad de la proteína Rubisco activasa para todas las muestras seleccionadas aleatoriamente marcado con número en las hojas de maíz, usando la variedad original de maíz llamado Zacatecas 58 lote Zo como control.
- Las muestras en que se tiene mayor cantidad de proteína Rubisco activasa son las que están marcadas con los números:
28,22,17,15,36,76,7,15,100,3,93,3,43,77,78,76,57,58,52 y 77.
- De acuerdo con las gráficas densitométricas se observa en menor cantidad de proteína la variedad original de maíz llamado Zacatecas 58 lote Zo usado en todas las muestras como control.

Todo lo anterior indica que se obtiene una mayor cantidad de Rubisco activasa en las hojas de plantas de maíz a partir de seleccionar las semillas con alta cantidad de Rubisco activasa, esto sugiere que se deba sembrar semillas que se seleccionan por alta cantidad de Rubisco activasa a fin de mantener la capacidad fotosintética de la planta y así poder hacer un estudio más detallado sobre el funcionamiento de la chaperona Rubisco Activasa.

Las características de la planta, el estrés por luz, estrés hídrico y estrés por calor provocan cambios en esta relación en hojas de maíz.

En condiciones de sequía se promueve la expresión preferencial del poli péptido de 41 kDa y durante el estrés por calor la actividad de la Rubisco activasa aumenta, lo cual coincide con un aumento en la actividad de la Rubisco.

Los lotes con alta cantidad de Rubisco activasa proporciona a la planta mayor capacidad para fijar el CO₂; esto sugiere incrementar la actividad fotosintética de la planta para obtener un mejoramiento del maíz.

Se obtiene la cantidad presente de la proteína Rubisco activasa en hojas de maíz a partir de lotes seleccionados por alta cantidad de Rubisco activasa por graficas densitométricas.

La exposición de plantas a altas temperaturas ha sido el factor ambiental más analizado en la expresión de Rubisco activasa; este significado de los cambios en la expresión de diferentes formas de la Rubisco activasa no se ha podido ser precisado a la fecha, se especula que pueda ser importante para la aclimatación de la fotosíntesis.

10. RECAPITULACIÓN.

- Se establecieron las condiciones necesarias para la obtención de la chaperona Rubisco activasa presente en las hojas de maíz.
- Se analizaron las proteínas en hojas de maíz de 43 kDa (figura 15) utilizando la espinaca como marcador de peso molecular de 41 kDa que es similar al del maíz.
- Se establece una opción viable para poder seleccionar con mayor altura de la planta, mayor tamaño del grano y mayor capacidad fotosintética de la hoja de absorber una mayor cantidad de bióxido de carbono mejorando el medio ambiente en base al contenido de Rubisco Activasa.
- De lo anterior se deduce que es conveniente sembrar muestras con alto contenido de Rubisco activasa como un apoyo de la selección masal y hacer un seguimiento para siembras posteriores, para conocer el potencial de la planta en la optimización de la actividad de Rubisco por medio de la Rubisco Activasa.
- Será necesario investigar que mecanismos influyen o están implicados en la regulación de la expresión de la chaperona Rubisco activasa.

11. BIBLIOGRAFIA.

- Absalon Echeverria Claudia del R.(2003).Rubisco activasa y su impacto en la fotosíntesis de plantas transgénicas. Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Ameraya del Valle Erika V. (2005).Expresión de Rubisco activasa y su relación con la productividad del grano de maíz. Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Ayala-Ochoa A, León M, Jiménez- García L. F, and Sánchez de Jiménez E. (2004) In maize, two distinct Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxilase / oxigenase activase transcripts have different day / night patterns of expresión. Biochimie 86:439- 449.
- Bauer, Carl. E, Xiong Jin (2002)Complex evolution of photosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 503-521.
- Berg M. Jeremy. Bioquímica.5ª Edición. Editorial Reverté. 2003. Pp 551-562.
- Bortolini, Roberto. El maíz. Ediciones Mundi-Prensa.1990. Pp 27-36.
- Boyer Rodney Modern Experimental Biochemistry. 3ª Edition. Edit. Addison Wesley Longman. 2000. Pp 321-325.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein- dye binding Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Dennis, T. David.Plant physiology biochemistry and molecular biology. Edit Longman. 1990. Pp 224-237, 245.

- Drake G. Bert and González- Meler Miguel, P.Long Steve (1997) More efficient plants: A consequence of Rising Atmospheric CO₂? Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 48:609-39.
- Foyer, Christine H. Photosynthesis. México. Campania Editorial Continental S.A de C.V. 1984. Pp 155-174.
- Gerald E. Edwards, R. Franceschi Vincent, and V. Voznesenskaya Elena (2004) Single- cell C4 Photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. Annu. Rev. Plant biol. 55: 173-196.
- Hanson, P.I. and Whiterheart, S.W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 6:519-529.
- Harrison, G. B. Maselfield, Michael Wallis. Guía de las plantas comestibles. Ediciones Omega S.A. 1980. Pp 6-7.
- Jugenheimer, W. Robert. Maíz Variedades Mejoradas, Métodos de cultivo y producción de semillas. Editorial Limusa S.A. 1981. Pp 51, 113-132.
- Kin-Ying To, Der-Fen Suen, Shu-Chen Grase Chen (1999) Molecular Characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase / oxigenase activase in rice leaves. Planta 209:66-76.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of phage T4 head. Nature 227:680-685.
- Martínez-Barajas, J.E., Molina Galán, J. and Sánchez de Jiménez, E. (1997) Regulation of Rubisco activity during grainfill in maize: possible role of Rubisco Activasa. Journal of Agricultural Sciences 128:155-161.

- Matsuoka Makoto, T. Furbank Robert (2001) Molecular Engineering of C4 Photosynthesis. Annu. Rev. Plant. Mol. Biol. 52:297-314.
- Metzler E. David. Biochemistry. The chemical reactions of living cell. 2^a Edición. Harcourt / Academic Press. Pp 707-714.
- Pearson B. David. Maíz. Editorial Trillas. 1985. Pp 9-20.
- Reyes Castañeda Pedro. El Maíz y su cultivo. AGT Editor. S.A. 1990. Pp 104-105, 128.
- R. Portis Archie Jr, Cishan Li, Dafu Wang and E. Salvucci (2008) Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. Journal of experimental Botany vol. 59, N° 7, Pp 1597-1604.
- Sheen Jen. (1999). C4 gene expresión. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 187-217.
- Spreitzer J. Robert, and Michael E. Salvucci (2002) Rubisco: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 449-475.
- Suzuki Akira. (1987) Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase I. Structural, Immunochemical and Catalytic Properties. Elsevier. Paris. Biochimie. 69:723-734
- Scott Thomas y Mary Eagleson. Enciclopedia Concisa de Bioquímica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. 1988. Pp 111.
- Smith C.A Biosynthesis. Addison Wesley Long Man. 1998. Pp 38-45.
- Swanson Todd A. and Kim I. Sandra. Bioquímica y Biología molecular. 4^a Edición. Editorial Wolters Kluwer. 2008. Pp 422-424.

- Tolbert N .E (1997) The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol. 48: 1-25.
- Vargas Suárez Martín, Ayala-Ochoa Alfredo, Lozano Franco Jessica, García-Torres Itzhel, Díaz-Quiñones Alberto, Ortiz-Navarrete F. Vianney and Sánchez de Jiménez Estela (2004) Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. Journal of Experimental Botany, Vol.55, N° 408. Pp 2533-2539.
- Vargas Suárez Martín P.(2006).Regulación de la expresión génica de Rubisco Activasa en plantas de Maíz. Tesis de Doctorado. UNAM.
- Widmer Francois and Beffa Roland.Bioquímica y Biología Molecular. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza España.1997. Pp 40-43.