



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Rubisco activasa y su impacto en la
fotosíntesis de plantas transgénicas**

Tesis que para obtener el título de
QUIMICA DE ALIMENTOS

Presenta:

Claudia del Rocío Absalón Echeverría



México, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003

2



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).

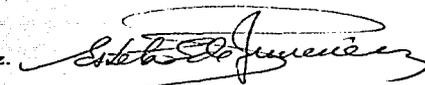
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente: Profa. Estela Sánchez Quintanar.
Vocal: Profa. Angelina Quintero Ruíz.
Secretario: Prof. Marcos Francisco Baez Fernández.
1er. Suplente: Prof. Rogelio Rodríguez Sotres.
2o. Suplente: Prof. Elpidio García Ramírez.

Laboratorio 103, conjunto "E", Facultad de Química.

Dra. Estela Sánchez de Jiménez.



M. en C. Raúl Aguilar Caballero.



Claudia del Rocio Absalón Echeverría.



Agradecimientos:

A Dios.

A Jorge Luis Absalón Montes y Graciela Echeverría Negrete, mis padres por su amor, esfuerzo y apoyo.

A Graciela Oliva Absalón Echeverría y Carina Elena Absalón Echeverría, mis hermanas.

A Martín Cruz Villafañe, mi esposo y compañero de vida.

A Jorge Absalón Quiroz, Oliva Montes Suárez, y Herlinda Negrete Barajas, mis abuelos.

A la Dra. Patricia León, por la donación de las semillas transgénicas utilizadas en este trabajo y por facilitarme las instalaciones de su laboratorio.

Al Dr. Víctor Barradas, por facilitarme las instalaciones de su laboratorio.

Al Dr. Martín Vargas, por enseñarme las metodologías utilizadas en este trabajo.

Contenido.

I. Resumen	1
II. Antecedentes	3
A. Fotosíntesis	3
1. El proceso fotosintético	3
2. El ciclo de Calvin-Benson	7
3. Metabolismo del carbono	10
a) Plantas con metabolismo C3	10
b) Plantas con metabolismo C4	11
c) Plantas con metabolismo CAM	14
B. Arabidopsis thaliana	15
1. Breve historia	15
2. Descripción	16
C. Plantas transgénicas	19
1. Métodos de obtención	19
2. Aplicaciones de las plantas transgénicas	27
D. Rubisco y Rubisco activasa	28
1. Estructura y función de Rubisco	28
2. Estructura y función de Rubisco activasa	33
III. Introducción	40
A. Objetivo general	41
B. Objetivos específicos	41

D

C. Hipótesis	41
IV. Materiales y métodos	43
V. Resultados	53
A. Obtención de plantas homocigotas	53
B. Caracterización bioquímica de las plantas antisentido	53
C. Contenido de proteína total en las plantas antisentido para RA y controles	58
D. Fotosíntesis	59
E. Efecto del tratamiento térmico en las plantas	59
F. Fotosíntesis durante el tratamiento térmico	68
G. Proteína total durante el tratamiento térmico	75
VI. Discusión de resultados	77
VII. Conclusiones	82
VIII. Bibliografía	84

E

Resumen.

Este trabajo tiene por objetivo conocer si la disminución en la cantidad de la proteína Rubisco activasa tiene algún efecto protector en plantas sometidas a estrés térmico y posteriormente recuperadas.

Para llevar a cabo este objetivo se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* homocigóticas con antisentido para el gen de la Rubisco activasa (RA) (donadas por la Dra. Patricia León del Instituto de Biotecnología, UNAM) y plantas tipo silvestre (WT.) sin modificación alguna. Ambos tipos de plantas fueron sometidas a un estrés térmico y posteriormente se realizaron las comparaciones de la cantidad de proteína de Rubisco y Rubisco activasa expresadas durante el tratamiento y un periodo de tres días de recuperación. La cantidad de Rubisco y RA expresada en éstas plantas fue medida por Western blot en los extractos de hojas. También se hicieron mediciones de fotosíntesis y la comparación del estado general de las plantas.

Se encontró que las plantas antisentido se pudieron agrupar en tres categorías: las que inhibieron fuertemente la expresión de RA (grupo I), las que mostraron una disminución ligera, y las que sobreexpresaron RA (grupo II). Las plantas antisentido que mostraron disminución en la expresión de RA presentaron aumento en la cantidad de proteína total, entre las que se identificó a la subunidad pequeña de Rubisco. Durante el estrés térmico, estas plantas aumentaron en gran medida la cantidad de RA y realizaron la fotosíntesis a una velocidad aproximadamente de la mitad de la velocidad de las plantas control. Las plantas antisentido que sobreexpresaron RA, presentaron un ligero aumento en la fotosíntesis y durante el estrés térmico ninguno de estos lotes de plantas con sobreexpresión de RA presentó variaciones en la cantidad de Rubisco ni en sus valores basales ni durante el tratamiento térmico.

Durante el tratamiento térmico las plantas que tenían disminuida la expresión de RA presentaron un aumento en la cantidad de esta proteína al terminar el tratamiento térmico, y durante el periodo de recuperación la cantidad disminuyó, para prácticamente recuperar la cantidad inicial de RA al tercer día de recuperación. Este fenómeno se muestra también en las plantas que sobreexpresaron RA y en las plantas control aunque en una magnitud mucho menor.

La velocidad de la fotosíntesis no se afecta durante el tratamiento térmico en ninguno de los lotes de plantas.

Se concluye que RA juega un papel importante en la activación de Rubisco, ya que el nivel endógeno de esta proteína en las hojas influye en la actividad de la fotosíntesis. El presente trabajo también refuerza la hipótesis de que RA es una chaperona molecular ya que aumenta de cantidad durante el estrés térmico.

Antecedentes.

Fotosíntesis.

El proceso fotosintético.

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual la biosfera capta la energía radiante, proveniente del sol, necesaria para la existencia de la vida. La energía solar que la Tierra recibe en un año es de aproximadamente 3×10^{24} Joules (J), de los cuales, solo 3×10^{21} J se utilizan para la fotosíntesis.

Gracias a la fotosíntesis ciertos organismos son capaces de captar la energía luminosa y convertirla en energía química, indispensable para cualquier tipo de vida. Estos organismos reciben el nombre de organismos fotosintéticos. Muchos de éstos organismos utilizan la energía que han captado para fijar anhídrido carbónico (bióxido de carbono ó CO_2) para convertirlo a sustancias orgánicas, y así poder sintetizar glúcidos como el almidón desprendiendo oxígeno (O_2), fenómeno que queda englobado y resumido en la siguiente ecuación química:



Los organismos fotosintéticos (también llamados autótrofos, fototróficos o quimiotróficos) pueden fabricar carbohidratos a partir de CO_2 y agua reduciendo el CO_2 a expensas de la energía suministrada por el trifosfato de adenosina (ATP) y la forma reducida del fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADPH) generados durante la transferencia fotosintética de electrones. Éstos organismos utilizan el CO_2 como la única fuente de átomos de carbono requeridos para la biosíntesis de carbohidratos, lípidos, proteínas y muchos otros compuestos orgánicos (Weier, et. al., 1974). De éste modo, son capaces de sintetizar ellos mismos

las sustancias complejas que requieren para vivir. Dentro de éstos organismos se encuentran las plantas, las algas y algunas bacterias.

De acuerdo con la fuente de energía que utilicen, los organismos autótrofos se dividen en:

1. Quimiosintéticos.- utilizan la energía proveniente de reacciones de óxido-reducción,
2. Fotosintéticos.- su fuente de energía es la luz solar.

Los organismos no fotosintéticos dependen, para subsistir, de los organismos fotosintéticos que mediante sustancias orgánicas les sirven de alimento y, por ende, de fuente de energía. Estos organismos se denominan heterótrofos y dependen de los organismos autótrofos para sobrevivir.

Los organismos fotosintéticos mantienen en la biosfera el equilibrio de compuestos esenciales para la vida, como CO_2 y O_2 y, al mismo tiempo, mantienen a los heterótrofos (Andreo y Vallejos, 1994).

Las plantas verdes contienen en sus cloroplastos enzimas que catalizan la conversión de CO_2 en compuestos orgánicos simples (reducidos), mediante un proceso llamado fijación del CO_2 o fijación del carbono. Las plantas convierten los productos simples de la fotosíntesis en biomoléculas más complejas, incluyendo azúcares, polisacáridos y metabolitos derivados de ellos. Las reacciones que resultan en la fijación del CO_2 forman una ruta cíclica donde los intermediarios clave se regeneran continuamente. Esta ruta fue elucidada en los tempranos 50's por Melvin Calvin y sus colaboradores y se llama usualmente el ciclo de Calvin (Lehninger, et. al., 1993).

Eficiencia de la fotosíntesis.

La hoja verde no es particularmente eficiente en la utilización de la luz solar. Del total de la energía radiante que reciben las hojas verdes, cerca de un 80% es absorbido por la hoja. Del 20% restante, una parte es reflejada por la superficie de la hoja y otra parte pasa a través de ella. Parte de la energía radiante del sol que es absorbida se transforma en calor que aumenta la temperatura de la hoja, otra gran parte de la energía absorbida es utilizada para la transpiración, y la proporción sobrante se utiliza en la fotosíntesis y es almacenada en moléculas de carbohidratos. Así, solo entre el 0.5 y el 3.5% de toda la energía radiante que recibe la hoja se utiliza en la fotosíntesis, un porcentaje muy bajo. Pero la cantidad de energía solar que se proporciona es continua y abundante. Se piensa que las hojas de las plantas superiores, bajo las condiciones más favorables, pueden ser cerca de 10 veces más eficientes (Andreo y Vallejos, 1984).

El cloroplasto es el orgánulo celular donde se realiza la fijación de CO_2 , éste orgánulo es característico de las células vegetales. Su forma, tamaño y cantidad dentro de la célula depende de la especie vegetal.

Los cloroplastos se encuentran separados del citoplasma celular por una membrana doble: la membrana externa es muy permeable y la membrana interna posee permeabilidad selectiva por lo cual posee algunas proteínas transportadoras como el translocador de triosas fosfato (Lehninger, et. al., 1993), que es un antitransportador, el cual cataliza el intercambio de un fósforo inorgánico (Pi) por una triosa fosfato, ya sea dihidroxiacetona fosfato o 3-fosfoglicerato. Este antitransportador mueve simultáneamente una triosa fosfato fuera del cloroplasto hacia el citosol y un Pi dentro del cloroplasto, donde es utilizado para la fotofosforilación.

Este translocador es de gran importancia. Fuera de este sistema de antitransporte, la fijación del CO_2 dentro del cloroplasto sería rápidamente detenida. El transporte neto de triosas fosfato fuera del cloroplasto tiene la función de remover los productos triosas fosfato de la fijación del carbono. En el citosol, las triosas fosfato son convertidas en sacarosa. El último paso de la síntesis de sacarosa produce una molécula de Pi libre. Este Pi es retornado al cloroplasto y utilizado en la síntesis de ATP, reemplazando efectivamente la molécula de Pi que se utilizó para generar una molécula de triosa fosfato. Por cada molécula de triosa fosfato que es removida del cloroplasto, un Pi es transportado dentro del cloroplasto. Si este intercambio fuera bloqueado, la síntesis de triosas fosfato terminaría rápidamente con el Pi disponible en el cloroplasto lo que impediría que continúe la fijación de CO_2 (Weier, et. al., 1974).

La membrana interna también es responsable del proceso de importación de proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo celular. La membrana interna rodea un gran espacio central llamado estroma, en el cual se localizan numerosos sistemas enzimáticos, entre los cuales se encuentra el que lleva a cabo la fijación del CO_2 . También localizadas dentro del estroma se encuentran unas estructuras membranosas dispuestas en forma de sacos aplastados o de discos, llamados tilacoides y cuyo espacio interior se conoce como lumen. Los tilacoides se apilan formando estructuras mayores denominadas granas. Puede ser que el lumen de un tilacoide se conecte con el de otro formando el espacio intratilacooidal, separado del estroma por la membrana tilacooidal.

Las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis se llevan a cabo dentro de los tilacoides ya que en ellos se encuentran los pigmentos que captan la energía solar y los complejos proteicos asociados al centro de reacción, los componentes de la cadena transportadora de electrones que

participan en la obtención de NADPH y los del complejo ATPasa que cataliza la formación de ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP). Dentro del cloroplasto también se llevan a cabo los procesos fotosintéticos del nitrógeno y del glicolato. El cloroplasto interactúa en forma muy estrecha con las mitocondrias, los peroxisomas y el citoplasma celular.

El ciclo de Calvin-Benson.

Mediante éste ciclo las plantas realizan la fijación de CO₂. El ciclo de Calvin Benson está compuesto por 12 reacciones que deben ocurrir seis veces para realizar la síntesis de una molécula de hexosa (ya que cada vez que ocurre el ciclo se incorpora un solo átomo de carbono) (Lehninger, et. al., 1993).

La fijación del CO₂ ocurre en tres etapas.

En la primera etapa (Weier, et. al., 1974), etapa de carboxilación (Lehninger, et. al., 1993), el CO₂ se fija a compuestos orgánicos mediante una condensación con un aceptor de cinco carbonos, la ribulosa-1,5-difosfato (RuBP), para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (Weier, et. al., 1974). Este paso es catalizado por la Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). El CO₂ se une a la forma enediólica de la RuBP formando un β-cetoácido inestable que es hidrolizado por la misma Rubisco a dos moléculas de ácido-3-fosfoglicérico ó fosfoglicerato (Lehninger, et. al., 1993).

En la segunda etapa (Weier, et. al., 1974), etapa de reducción, el 3-fosfoglicerato es reducido, utilizando NADPH (Lehninger, et. al., 1993), a gliceraldehido-3-fosfato: tres moléculas de CO₂ se fijan a tres moléculas de RuBP formando seis moléculas de gliceraldehido-3-fosfato (18 carbonos). La 3-fosfoglicerato quinasa, que se encuentra en el estroma, cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP al 3-fosfoglicerato, produciendo 1,3-difosfoglicerato. Entonces se realiza una reacción de reducción

catalizada por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, donde el NADPH dona electrones, produciendo gliceraldehido-3-fosfato (Weier, et. al., 1974) que se equilibra con el fosfato de dihidroxicetona por acción de la triosa fosfato isomerasa (Lehninger, et. al., 1993).

En la tercera etapa, cinco o seis moléculas de gliceraldehido-3-fosfato (15 carbonos) se utilizan para regenerar tres moléculas de RuBP, la sustancia con la cual se inicia esta ruta. Así, todo el proceso es cíclico y permite la conversión continua de CO₂ en triosas y hexosas fosfato. Esta etapa se divide en varios pasos.

El primer paso es catalizado por la enzima transcetolasa, que contiene pirofosfato de tiamina (TPP) como su grupo prostético y requiere para su funcionamiento Mg²⁺, y cataliza la transferencia reversible de un grupo cetólico de un donador cetosa fosfato, la fructosa-6-fosfato, a un aceptor aldosa fosfato, el gliceraldehido-3-fosfato, produciendo xilulosa-1,5-fosfato (una pentosa) y la eritrosa-4-fosfato (azúcar de cuatro carbonos).

El segundo paso lo realiza una aldolasa que cataliza la condensación reversible de un aldehído, la eritrosa-4-fosfato, con fosfato de dihidroxiacetona produciendo el compuesto de siete carbonos sedoheptulosa-1,7-difosfato. El tercer paso consiste en la remoción del primer grupo fosfato del primer átomo de carbono por la sedoheptulosa-1,7-difosfato produciendo sedoheptulosa-7-fosfato que es dividida, en el cuarto paso, por la transcetolasa produciendo una pentosa fosfato (ribosa-5-fosfato) y un fragmento de dos carbonos, transportado sobre el TPP, que, en el quinto paso, se condensa con el de tres carbonos del gliceraldehido-3-fosfato formando una molécula de xilulosa-5-fosfato en una reacción también catalizada por la transcetolasa. En el sexto y séptimo pasos, las pentosas fosfato (ribosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato) son convertidas en

ribulosa-5-fosfato dando paso al octavo paso donde la ribulosa-5-fosfato es fosforilada a RuBP por la ribulosa-5-fosfato quinasa.

El carbón fijado en el cloroplasto también se almacena en él convertido en gránulos de almidón insolubles en agua o sale al citosol donde se utiliza para formar sacarosa.

El resultado neto del ciclo de Calvin es la conversión de tres moléculas de CO₂ y de una molécula de fosfato en una molécula de triosa fosfato. Tres moléculas RuBP (un total de 15 carbonos), se condensan con tres moléculas de CO₂ (tres carbonos), formando seis moléculas de 3-fosfoglicerato (18 carbonos). Estas seis moléculas de 3-fosfoglicerato son reducidas a seis moléculas de gliceraldehido-3-fosfato gastando seis moléculas de ATP en la síntesis de 1,3-difosfoglicerato y seis moléculas de NADPH en la reducción del 1,3-difosfoglicerato a gliceraldehido-3-fosfato. Una de estas moléculas de gliceraldehido-3-fosfato es el producto neto del proceso. Las otras cinco moléculas de gliceraldehido-3-fosfato (15 carbonos), se rearreglan formando tres moléculas de RuBP (15 carbonos). El último paso en esta conversión requiere un ATP por RuBP, un total de tres ATP. Así, por cada molécula de triosa fosfato producida mediante la fijación fotosintética del CO₂, se requieren seis moléculas de NADPH y 9 moléculas de ATP (Weier, et. al., 1974).

Las reacciones luminosas de la fotosíntesis producen ATP y NADPH. El ATP se utiliza en la fosforilación de RuBP y de 1,3-difosfoglicerato y el NADPH en la reducción de 1,3-difosfoglicerato a gliceraldehido-3-fosfato. Así, la asimilación de cada molécula de CO₂ requiere tres ATP y dos NADPH por lo que se necesitan 18 ATP y 12 NADPH para equilibrar el ciclo y obtener una hexosa a partir de moléculas de CO₂ (Lehninger, et. al., 1993).

La fuente de ATP y de NADPH para estas reacciones son las reacciones de fosforilación dirigidas por la luz. De las nueve moléculas de ATP convertidas a nueve moléculas de ADP y nueve moléculas de fosfato en la generación de una molécula de triosa fosfato, ocho de esos fosfatos son liberados como fósforo inorgánico (Pi) y combinado con ocho moléculas de ADP para regenerar el ATP. El noveno fosfato es incorporado a la triosa fosfato. Para convertir las nueve moléculas de ADP a ATP, se debe importar una molécula de Pi del citosol, ya que estas reacciones se llevan a cabo dentro del cloroplasto, en el estroma.

Metabolismo del carbono.

Plantas con metabolismo C3.

Las plantas en las cuales el primer paso en la fijación de CO₂ es la reacción del CO₂ con la RuBP para formar 3-fosfoglicerato son llamadas plantas C3. Solamente utilizan el ciclo de Calvin para llevar a cabo la fijación de CO₂ (Weier, et. al., 1974). Ejemplos de estas plantas son el girasol, el trigo, el tomate y la espinaca, entre otras. Su anatomía es convencional, con distribución uniforme de las células del mesófilo por toda la hoja.

Este metabolismo se denomina así ya que el producto obtenido de la primera carboxilación es un carbohidrato cuyo esqueleto está formado por tres carbonos, de ahí su nombre de C3 (Lehninger, et. al., 1993).

Parece ser que la evolución de Rubisco produjo un sitio activo que no es capaz de discriminar bien entre oxígeno (O₂) y CO₂, tal vez debido a que la mayor parte de su evolución ocurrió antes de que el O₂ fuera un componente importante de la atmósfera. La constante de Michaelis-Menten (K_m) para el CO₂ es de alrededor de 20M, y para el O₂ es de 200M. La atmósfera moderna contiene cerca del 20% de O₂ y solo el 0.04% de

CO₂, proporciones que permiten que la "fijación" de O₂ por la Rubisco constituya un desperdicio de energía significativo. Durante la fotosíntesis, el CO₂ es consumido en las reacciones de fijación, alterando la proporción de CO₂ por O₂ en el espacio de aire alrededor de la hoja en favor del O₂. Adicionalmente, la afinidad de la Rubisco por el CO₂ disminuye con el aumento de la temperatura, exacerbando la tendencia de la enzima a catalizar la reacción de oxigenasa, desperdiciando energía. La fotorrespiración puede inhibir la formación neta de biomasa hasta en un 50%. Esto ha provocado adaptaciones en el proceso por el cual se realiza la fijación de carbón, particularmente en las plantas que viven en climas calurosos (Weier, et. al., 1974).

Todas las plantas poseen el ciclo de Calvin y Benson. Sin embargo, existen plantas que, debido al medio ambiente en donde viven, han desarrollado vías metabólicas auxiliares o asociadas al ciclo de Calvin-Benson. Estas no son vías alternativas, sino auxiliares del ciclo de Calvin (Lehninger, et. al., 1993).

Plantas con metabolismo C₄.

Muchas plantas en los trópicos, como las plantas de cultivo de climas templados nativas de los trópicos que se encuentran sometidas a altas intensidades luminosas y altas temperaturas, como el maíz, la caña de azúcar y el sorgo, han desarrollado un mecanismo para resolver el problema de la fotorrespiración. El último paso en la fijación del CO₂ a un producto de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato, es precedido de varios pasos, uno de los cuales es la fijación preliminar de CO₂ en un compuesto de cuatro átomos de carbono. Estas plantas se conocen como plantas C₄ (Weier, et. al., 1974). Este ciclo se debe, en parte, a una modificación bioquímica y, en parte, a una modificación anatómica de las hojas (Lehninger, et. al., 1993).

Las plantas C4 tienen elevadas velocidades de fotosíntesis, elevadas velocidades de crecimiento y baja proporción de fotorrespiración y de pérdida de agua (Weier, et. al., 1974), un punto de compensación de CO₂ muy bajo (Crosbie, et. al., 1981), y una estructura inusual de las hojas con dos tipos de células: mesófilas y del haz de vainas (Weier, et. al., 1974), que se encuentran arregladas en una anatomía especial denominada Kranz. Las células del haz de vainas rodean los vasos de las hojas (Lehninger, et. al., 1993) y sus plástidos carecen o tienen muy reducido el grana y almacenan almidón; las células del mesófilo rodean las células del haz de vainas (Lehninger, et. al., 1993) y sus cloroplastos tienen la grana típica y no almacenan o poseen muy poco almidón.

Estas plantas, fijan el CO₂ por el sistema enzimático de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa), que posee alta afinidad por el CO₂ y se encuentra en las células del mesófilo. El CO₂ se adiciona al ácido fosfoenolpirúvico (de tres carbonos (PEP)), formando un ácido de cuatro carbonos, el ácido oxaloacético (OAA). Posteriormente, otros dos ácidos de cuatro carbonos, ya sean málico ó aspártico, pueden ser formados a partir del OAA. Se piensa que estos ácidos actúan como un eficiente sistema de transporte de CO₂ y que se mueven de los plástidos de las células mesófilas a los de las células del haz de vainas donde liberan el CO₂. Entonces vuelven a las células mesófilas como ácidos de tres carbonos, donde pueden volver a tomar CO₂. El CO₂ liberado en los plástidos de las células del haz de vainas entra al ciclo de Calvin normal, o ciclo C3. Este sistema provee de una concentración suficientemente fuerte de CO₂ para que la Rubisco funcione muy cerca de su máxima velocidad, con relativamente poca competencia de la reacción con el O₂.

En las células del haz de la vaina de distintas especies de plantas C4 existen diferentes enzimas que catalizan la degradación del malato ó del

aspartato proveniente de las células mesofíticas, por lo que ésta ruta se ha dividido en tres subclases o especies:

- A. Especies C4 que poseen la enzima málica NADP⁻-dependiente (tipo ME-NADP⁻);
- B. Especies C4 que poseen la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (tipo PCK);
- C. Especies C4 que poseen la enzima málica NAD⁻-dependiente (tipo ME-NAD⁻) (Lehninger, et. al., 1993).

La ruta de fijación del CO₂ en las células de las plantas C4 tiene un costo de energía mayor que en las plantas C3. Por cada molécula de CO₂ fijado por la vía C4 se debe de regenerar una molécula de PEP a expensas de dos grupos fosfato de alta energía de ATP. Así, las plantas C4 necesitan un total de cinco ATP para fijar una molécula de CO₂, y las plantas C3 solo tres. Conforme aumenta la temperatura entre los 28 y los 30°C (y la afinidad de la Rubisco por el CO₂ disminuye), la ganancia de la eficiencia de la eliminación de la fotorrespiración en las plantas C4 compensa de mas el costo energético. Las plantas C4 crecen más que las plantas C3 durante el verano (Weier, et. al., 1974). Las plantas C4 requieren entre un tercio y un cuarto de la Rubisco que las plantas C3 para mantener la velocidad de asimilación de CO₂ (Brown, 1978, Sage, et. al., 1987, Long, 1999). La reducción en estos requerimientos explica que las plantas C4 contengan entre un 60% y un 80% menos Rubisco que las plantas C3 (Long, 1999).

Las enzimas fotosintéticas de éstas plantas presentan una compartimentalización espacial ya que las células del mesófilo poseen toda la PEP carboxilasa, la malato deshidrogenasa NADP⁻-dependiente y la piruvato fosfato diquinasa, mientras que las células del haz de la vaina poseen toda la Rubisco y las enzimas málicas dependientes de NAD⁺ y NADP⁻.

Este sistema fue estudiado por primera vez por Hatch y Slack y se conoce como la vía Hatch-Slack o la vía C4 de la fotosíntesis.

Plantas con metabolismo CAM.

Para sobrevivir en condiciones desérticas, las plantas deben soportar sequías recurrentes o evitar secarse, llevando a cabo la parte activa de su ciclo de vida rápidamente durante el corto periodo de lluvia. Al contrario con la mayoría de las plantas mesófilas, muchas plantas suculentas mantienen sus estomas cerrados durante el día y los abren durante la noche. Así, reducen la pérdida de agua durante el día, cuando el estrés debido a la falta de agua es fuerte, pero también se reduce la toma de CO₂, por lo cual muestran un tipo particular de metabolismo del carbono llamado Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM.- Crassulacean acid metabolism), ya que las plantas crasuláceas fueron las primeras en las cuales se observó este proceso.

En los órganos fotosintéticos de algunas plantas suculentas, la fijación de CO₂ por la PEP carboxilasa se realiza durante la noche, cuando los estomas están abiertos; el oxaloacetato formado se transforma en ácido málico por la acción de la malato dehidrogenasa. El ácido málico se acumula durante la noche en grandes vacuolas gracias a un mecanismo de transporte que no es bien conocido.

Durante el periodo lumínico siguiente el ácido málico sale de las vacuolas y se descarboxila. Según cual sea la enzima que catalice la descarboxilación del ácido málico las plantas CAM se dividen en dos grupos: uno se vale de la enzima málica NADP⁺ o NAD⁺-dependiente mientras que el otro grupo utiliza a la PEP carboxiquinasa. El CO₂ producido durante la descarboxilación entra al ciclo de Calvin-Benson. Mediante éste ciclo el ciclo de Calvin puede operar a “puertas cerradas”

durante el día, permitiendo que las plantas crasuláceas sobrevivan en ambientes áridos).

En éste ciclo las dos reacciones de carboxilación se encuentran separadas temporalmente, no espacialmente, como en las plantas C4 (Lehninger, et. al., 1993).

Arabidopsis thaliana.

Breve historia.

En el dominio de las plantas con flores, la pequeña crucifera *Arabidopsis thaliana* ha sido el sistema modelo para muchas investigaciones de genética molecular en el desarrollo de las plantas, incluyendo patrones de formación, fisiología, bioquímica e interacciones planta-patógeno.

Arabidopsis thaliana ha sido conocida por los botánicos por lo menos durante cuatro centurias y ha sido utilizada en investigación experimental por cerca de una centuria. Esta planta se ha utilizado para realizar estudios sobre mutagénesis, incluyendo la primera separación de auxótrofos en plantas, además de ser utilizada como modelo para examinar los efectos que tiene en la genética la radiación cósmica y la radiación proveniente de fuentes cercanas a los hogares, como el área que circunda la otrora planta nuclear de Chernobyl (Bowman, 1994).

El florecimiento de ésta planta como sistema modelo comenzó con el descubrimiento de que el tamaño de su genoma nuclear era el más pequeño conocido entre las plantas con flores y que contiene una cantidad muy baja de DNA repetido disperso, lo que la hace útil para estudios de genética clásica y genética molecular. Se estima que el tamaño de su genoma nuclear oscila entre 60,000 y 100,000 kilobases, muy parecido a

los de Caenorhabditis elegans y Drosophila melanogaster y solo entre 5 y 7 veces más grande que el de Saccharomyces cerevisiae.

Muchas mutaciones bioquímicas y morfológicas han sido mapeadas en los cinco grupos de anclaje del mapa genético. También se han hecho mapas mediante las técnicas de marcadores de "Restriction Fragment Length Polimorphism" (RFLP) y "Random Amplified Polimorphic DNA" (RAPD) han sido construidos como el primer paso hacia el mapeo físico del genoma de Arabidopsis (Bowman, 1994).

Descripción.

Arabidopsis thaliana es una pequeña hierba anual de la familia Brassicaceae. Esta familia posee 350 géneros y 3,000 especies y es homogénea en forma poco usual. Por ésta razón, las relaciones taxonómicas precisas de Arabidopsis con los otros miembros de ésta familia es incierta, con diferentes clasificaciones de las crucíferas de acuerdo con las diferentes posiciones del género Arabidopsis.

Aunque el origen geográfico exacto de ésta planta es desconocido, se piensa que surgió en Eurasia. Algunos autores han sugerido las tierras altas de Asia central del oeste de los Himalayas como su fuente. Se localiza en regiones geográficas y ecológicas muy variadas, aunque predomina en los climas moderadamente templados del hemisferio norte. Es común a través de Europa y el oeste de Asia, y puede encontrarse en el norte de África y en el este de Asia. Es común en los climas templados de Norteamérica pero, al no ser una planta nativa de esas regiones, su distribución dependió de las rutas de navegación. También se encuentra naturalizada en algunas áreas de Australia.

El hábitat de Arabidopsis varía entre las altas montañas del África ecuatorial a las tierras altas de los Himalayas y la mayor parte de la

Europa templada. Consistentemente con su amplia distribución geográfica y ecológica, hay una gran cantidad de variaciones ocurridas naturalmente en esta planta. Las poblaciones silvestres (ecotipos) han sido colectadas primeramente de Europa y el oeste de Asia, además del norte de África, Japón y Norteamérica. Muchos de los ecotipos son anuales invernales, con germinación de las semillas en otoño, sobreviviendo todo el invierno en el estado vegetativo de roseta y haciendo la transición al estado floral en primavera. Entre los ecotipos silvestres, la mayor fuente de variaciones fenotípicas es en respuesta a la duración del día y a la vernalización con respecto a la transición al estado floral, aunque las características de la hoja también varían. De todas formas, la mayoría de los ecotipos silvestres colectados son heteromórficos para varios caracteres, incluyendo el tiempo de floración.

Muchas de las cepas comúnmente utilizadas en los laboratorios tienen una sola semilla como fuente original y han sido engendrados por autofecundación por muchas generaciones. Por lo tanto, son homocigotas en la mayoría de sus "LOCI". Algunas cepas comunes de laboratorio, como *Landsberg erecta*, no son verdaderas plantas silvestres ya que han sido seleccionadas para ser homocigotas de mutaciones que resultan de su crecimiento en condiciones de laboratorio o de invernadero. Las divergencias en la secuencia de DNA estimada entre los ecotipos dio como resultado una diferencia de entre 1 y 1.5% de los nucleótidos de DNA entre tres ecotipos autofecundados de laboratorio (*Landsberg erecta*, *Columbia* y *Niederzenz*) (Bowman, 1994).

Arabidopsis thaliana es una planta de roseta anual, con fases de crecimiento separadas en fase vegetativa y fase reproductiva. El desarrollo vegetativo está caracterizado por la producción de hojas en roseta en una espiral filotáctica con una pequeña elongación internodal entre hojas sucesivas. El número de hojas de roseta formadas antes de la transición a

la etapa de floración varía con las condiciones de crecimiento: con bajas temperaturas de crecimiento y días cortos se retarda el paso a la etapa de floreo. Un aumento en el número de hojas está muy relacionado con un retraso en la transición a la etapa de floreo. El crecimiento vegetativo también varía con los antecedentes genéticos, los diferentes ecotipos tienen una variación muy grande en el número de hojas (desde los ecotipos que florecen tempranamente y que poseen entre 5 y 8 hojas, hasta más de treinta en los ecotipos que florecen tardíamente, cuando crecen en días largos). De ésta forma, las características de la hoja como la forma, el tallo, vello, tipo de margen y color también varían entre ecotipos.

El tamaño de sus cromosomas es pequeño en comparación con otras especies cercanas como Brassica, una característica que impidió estudios citológicos tempranos pero que ha facilitado los recientes estudios de genética molecular. Varias características hacen de *Arabidopsis* útil para la experimentación en genética clásica: su tamaño pequeño, su rápido tiempo de generación (5 a 6 semanas bajo condiciones óptimas de crecimiento), habilidad para crecer bien en condiciones controladas (ya sea en suelo o en medios de crecimiento), facilidad de fecundación ya sea cruzada o autofecundación, gran fecundidad (más de 10,000 semillas por planta), número pequeño de cromosomas y facilidad de mutagénesis. Regiones de organización nuclear menores y mayores han sido identificados citológicamente y se ha correlacionado su cariotipo con grupos de anclaje utilizando plantas trisómicas.

Esta planta posee el genoma nuclear más pequeño conocido entre las plantas con flores y posee muy poco DNA repetido disperso. El tamaño de su genoma nuclear oscila entre 60,000 y 100,000 kilobases, muy parecido a los de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* y solo entre 5 y 7 veces más grande que el de *Saccharomyces cerevisiae* (Bowman, 1994).

Plantas transgénicas.

El objetivo de la ingeniería genética es introducir genes funcionales de un organismo a otro organismo. Esto nos permite mejorar las características de los seres vivos y, por otro lado, estudiar sus rutas metabólicas, funciones que realizan enzimas específicas y el estudio de los mecanismos mediante los cuales se controla la expresión de los genes (Hyat, 1993).

Métodos de obtención.

Todas las técnicas de obtención de plantas transgénicas tienen un paso común: la obtención del vector que contiene el DNA que se va a introducir al genoma de la planta por transformar. Para obtener éste vector deben considerarse los siguientes pasos:

La construcción del vector debe asegurar la producción eficiente de productos funcionales de los genes en la célula blanco. Los vectores vegetales consisten de un cassette con una región promotora, un sitio de inicio de la transcripción y una región líder 5' no traducida del promotor de interés unido a un multieslabón sintético, seguido de una señal de poliadenilación. El multieslabón sintético permite la inserción de secuencias codificadoras derivadas de genes procarióticos o eucarióticos, incluyendo secuencias genómicas con intrones o cDNA. Esta estructura permite utilizar uno ó varios genes reporteros, los cuales permiten detectar rápidamente la transferencia de DNA, y genes con marcadores selectivos que permiten recuperar las células ó plantas transformadas mediante selección.

No todos los promotores son igualmente activos en todas las especies vegetales por lo que la elección del promotor debe basarse en la especie de planta a transformar (Hiat, 1993).

Los genes reporteros son genes que se expresan en células vegetales sin necesidad de integrarse al genoma, por lo cual se utilizan para demostrar que se ha realizado la transferencia de DNA mediante un estudio preliminar del efecto de la modificación que ejerce el vector en la expresión genética. Los genes reporteros más utilizados son genes que codifican enzimas con distinta especificidad al sustrato que pueden ser monitoreados mediante ensayos radioquímicos, como el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), histoquímicos, colorimétricos ó fluorimétricos, como el gen de la β -glucuronidasa (GUS), ó de luminiscencia, como el gen de la luciferasa (LUC). Otro tipo de genes, como el de la antocianina, producen una pigmentación morada en las células que lo contienen lo que hace que las pruebas de identificación sean no destructivas. Los genes reporteros han sido utilizados para el análisis de la expresión genética, para identificar secuencias reguladoras en genes, para caracterizar secuencias reguladoras involucradas en la respuesta genética a estímulos ambientales y fisiológicos, para determinar la actividad de promotores heterólogos en protoplastos de distintos orígenes y para evaluar parámetros que influyen en la transferencia y expresión del DNA.

La fuerza del promotor determina el nivel de transcripción del vector. Un promotor fuerte asegura un nivel de transcripción alto. Los promotores que pueden utilizarse son derivados de virus, bacterias y plantas como las regiones reguladoras 5' de genes de la opina sintasa, nopalina sintasa, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Actualmente también se utilizan elementos ARE y OCS o su combinación como promotores. Al mezclar y unir construcciones de promotores que combinan secuencias intensificadoras y secuencias codificadoras se puede incrementar la expresión genética. Debe considerarse que existen promotores con especificidad para tejidos que pueden permitir la expresión de genes en los sitios donde éstos son requeridos; además, debe recordarse

que los promotores retienen su sensibilidad a respuesta a señales reguladoras, como la luz ó las hormonas.

Los intrones son regiones de DNA no codificadoras que se presentan en muchos genes eucarióticos. Su inclusión en unidades de transcripción aumenta la expresión genética de los vectores al aumentar la cantidad de RNA en estado estable. Existen dos teorías para explicar éste fenómeno: una postula que el aumento es debido a estimulación de la iniciación de la transcripción y otra postula que aumenta la estabilidad de RNA en el núcleo ó que se aumenta la exportación del mismo al citoplasma. El grado de aumento depende de las secuencias exón que flanquean al intrón, los cuales influyen en la eficacia de "splicing" del intrón, y de la posición del intrón, siendo la colocación óptima cerca del extremo 5' terminal del mRNA (Hiatt, 1993).

Los marcadores moleculares permiten la recuperación de las líneas transformadas. Es importante que los marcadores permitan una selección limpia y no tengan efectos secundarios en la regeneración y fertilidad de las plantas. Algunos de éstos marcadores incluyen los genes de la gentomicina acetiltransferasa, de la EPSP sintasa bacteriana y vegetal (EPSP), de la fosfinotricina acetiltransferasa (BAR), de la acetolactato sintasa de *Arabidopsis*, maíz y tabaco (ALS) y la neomicina fosfotransferasa de bacterias (NPT II) entre otros. La selección con kanamicina utilizando el gene NPT II se utiliza ampliamente para recuperar líneas transformadas de plantas dicotiledóneas. Para plantas monocotiledóneas se puede utilizar la selección con basta, bialafos y clorsulfurón.

El uso de vectores virales produce rápidamente la integración estable de las secuencias de transformación y la regeneración de las plantas. Algunas veces los virus pueden catalizar su replicación y el movimiento de sus

genomas de las pocas células infectadas, al principio, a prácticamente todas las células de su hospedero en un periodo de días ó semanas, ya que han adaptado sus estrategias de infección a la arquitectura de la planta. Las células de las plantas maduras están conectadas entre sí mediante la plasmodermis formando un solo compartimento grande: el símplasto. Los virus que atacan a las plantas pueden alterar los límites de la plasmodermis permitiendo el movimiento de sus genomas entre células adyacentes. Movimientos de mayor distancia se realizan a través del tejido del floema.

Las técnicas utilizadas en células vegetales para introducir el vector al tejido blanco son las siguientes:

- 1) Transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ó agroinfección.

Uno de los métodos de obtención de las plantas transgénicas es la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta tecnología ha permitido la transferencia de genes que codifican la resistencia a virus, insecticidas e insectos, así como aumentar la calidad de la proteína contenida en las semillas. Se utiliza en plantas dicotiledóneas (Hiatt, 1993).

- 2) Transformación mediada por protoplastos.

Esta técnica puede ser utilizada en plantas monocotiledóneas transgénicas fértiles (maíz y arroz). Consiste en aislar protoplastos de cultivos embrionáricos en suspensión. Utilizando las técnicas de electroporación ó de PEG se introduce el vector dentro de los protoplastos. Su eficiencia es muy parecida a la obtenida con el bombardeo de microproyectiles y depende de la variedad de la planta utilizada ya que las diferencias entre las variedades actúan sobre la facilidad para transformarlas, sobre su adaptabilidad a los cultivos in vitro y sobre su capacidad para aceptar DNA extraño. La calidad de los cultivos embrionáricos en suspensión es un factor importante para la

regeneración de las plantas ó tejidos, generalmente se utilizan cultivos en suspensión derivados de callos de semillas maduras que muestran alta eficiencia de regeneración (aproximadamente 10%). Estas suspensiones se renuevan cada seis meses ya que tienden a perder su capacidad morfogénica si se prolonga su cultivo (Dennis y Turpin, 1990).

3) Cotransformación.

Esta técnica se ha utilizado con éxito para introducir genes no seleccionables en arroz. Consiste en mezclar plásmidos que contienen el gene no seleccionable con plásmidos que contienen el gen seleccionable con marcador, ésta mezcla se introduce en los protoplastos. Una ventaja de ésta técnica es que no es necesario construir un plásmido que contenga tanto el gen a introducir como el gen de selección, por lo que puede utilizarse cuando se desee introducir varios genes. Puede considerarse una variante de la técnica de transformación mediada por protoplastos.

4) RNA antisentido.

El RNA antisentido está involucrado en el control de la expresión genética en procaríotes y eucaríotes. Se ha encontrado que éste antisentido se encuentra naturalmente en ratones con deficiencia de mielina y en oocitos de *Xenopus*. Su mecanismo de acción involucra una formación duplex entre el RNA antisentido y una secuencia complementaria del ácido nucléico blanco, lo cual excluye a la secuencia blanco de participar en otras interacciones moleculares, entre ellas el cambio de la función del gene o su expresión. Esta técnica se ha utilizado para modular la expresión genética en animales y plantas. El uso de *Agrobacterium tumefaciens* para introducir los antígenos en plantas dicotiledóneas provee de un sistema versátil y eficiente que puede utilizarse con sistemas de genes reporteros y que causa el fenómeno de disminución (down regulation) de genes endógenos y de las proteínas que codifican de las plantas y, en algunos

casos, ocurre un cambio del fenotipo, lo cual es una característica medible. De todas formas, no parece haber correlación entre el número de copias del antisentido que posee la planta, el nivel de RNA antisentido en estado estable ó el nivel de reducción del transcrito afectado con los cambios fenotípicos que las plantas pudieran presentar.

Esta técnica permite conocer la función de genes específicos, de proteínas específicas, la identificación de genes desconocidos y la generación de nuevas plantas con características alteradas que aumentan su valor comercial (como en el caso de los genes de la poligalacturonasa en el jitomate), además de permitir la eliminación de la expresión de genes introducidos anteriormente en plantas.

La secuencia RNA antisentido consiste en una molécula pequeña de DNA estable diseñada para unirse a RNAs de una sola hebra mediante la complementación de pares de bases. Estas moléculas pueden ser RNA ó DNA. Solo se requiere un 80% de homología entre el RNA antisentido y el RNA blanco para que el RNA antisentido tenga efecto.

Se presume que no solamente existe una interacción entre RNA/RNA para explicar el efecto del antisentido y, aunque todavía no se ha dilucidado la forma de acción del antisentido, existen varias hipótesis:

- a) disminución de la proteína producida por el gene blanco, debido a una reducción en la cantidad de mRNA en estado estable, mediante un mecanismo aun desconocido;
- b) interacciones DNA/DNA entre el gene antisentido y el gene endógeno mediante competición de recombinación homóloga por factores de transcripción "trans-acting", pero es poco probable que esto ocurra;
- c) interacciones RNA/DNA entre el RNA antisentido y el gene endógeno, lo cual tendría como consecuencia la disminución de la transcripción del gene endógeno, pero no hay evidencia de que esto ocurra;

d) interacciones RNA/RNA con la subsecuente degradación de la cadena duplex, lo cual produciría una disminución de los RNA sentido y antisentido, fenómeno que ha sido observado en varios casos y que hace que ésta hipótesis sea la que cuenta con mayor fuerza y aceptación. Es posible que la doble cadena de RNA sea blanco de degradación específica ó que se degrade más rápidamente que el RNA de una sola cadena. Aún no se sabe si éste proceso se realiza en el núcleo ó en el citoplasma.

Se ha observado que un exceso de RNA antisentido no aumenta su efecto. También se ha observado que los genes antisentido complementarios que cubren desde el extremo 5' ó 3' hasta la mitad del gene son tan efectivos como aquellos que cubren todo el gene.

Sorpresivamente, la introducción de RNA sentido tiene el mismo efecto que la adición de RNA antisentido, éste fenómeno se ha denominado cosupresión y su mecanismo aún no se ha determinado, aunque se presume que pueden existir interacciones "trans" entre las secuencias homólogas de DNA ó que el exceso de RNA bloquea la transcripción de ambos genes.

La técnica con antisentido se ve limitada por la naturaleza reversible de la inhibición mediante la estructura duplex y la degradación del oligonucleótido complementario por nucleasas intracelulares (Hiatt, 1993).

5) Electroporación.

En ésta técnica una descarga eléctrica genera poros en la membrana celular, causando cambios en el genoma nuclear. La velocidad de transformación con éste método es mayor que la de los métodos de bombardeo de microproyectiles y agitación con camas de vidrio y tiene la misma efectividad (Dennis y Turpin, 1990).

6) Agitación con camas de vidrio.

En ésta técnica el DNA se introduce a las células rompiéndolas mediante una cama de vidrio en presencia del plásmido con DNA. Ésta

técnica reporta resultados muy parecidos a los obtenidos con la técnica del bombardeo ya que hay una integración al azar de DNA transformante dentro del genoma nuclear, presentando una ó varias copias del mismo.

7) Bombardeo con microproyectiles.

Esta técnica permitió la recuperación de la primera planta fértil transgénica de maíz y promete ayudar en la transformación de las plantas monocotiledóneas. Con ella se pueden realizar ensayos transitorios en genes dentro de ambientes de organización celular en especies homólogas. Posee la ventaja de que la penetración física de las paredes celulares permite realizar transferencias independientes de DNA en un amplio rango de tejidos. La pistola de microproyectiles fue diseñada para bombardear células vegetales con microproyectiles hechos con metales de alta densidad, como oro, tungsteno ó platino y cuyo diámetro oscila entre los 0.4 y 2 μm , cubiertos con DNA. Éstos proyectiles son disparados a altas velocidades a células intactas, los proyectiles atraviesan la pared celular y liberan el DNA dentro de la célula, algunas veces dentro de organelos.

La integración del DNA dentro del genoma de la planta y su posterior transferencia sexual a la progenie ha sido reportada en maíz, tabaco y soya. Ésta técnica también permite la transformación estable de cloroplastos. Existe una integración al azar del DNA transformante en el genoma nuclear con una ó varias copias del DNA marcado. Los tejidos que han sido sometidos a ésta técnica son polen, callo de microesporas de polen, embriones, callos embriogénicos, meristemos, hojas y cultivos en suspensión. Como se ve, ésta técnica permite la utilización de una gran variedad de tejidos. Los tejidos en los cuales ésta técnica es más eficaz son los tejidos de microesporas, polen y meristemos de retoño.

Cabe mencionar que el bombardeo de partículas causa un daño importante en las paredes celulares de los tejidos sometidos, por lo cual

debe cuidarse la viabilidad de las células. Un pretratamiento del tejido con manitol a una concentración entre 2 y 8% p/v ayuda a minimizar éstos efectos. También puede adicionarse manitol o alguna otra sustancia con propiedades osmóticas a los tejidos dañados para permitir su recuperación. El bombardeo también provoca un aumento en la producción de etileno que puede causar muerte celular por lo cual se recomienda agregar un antagonista del etileno en el medio de cultivo de las células para evitar daños mayores.

Aplicaciones de las plantas transgénicas.

Una de las principales aplicaciones que tiene la formación de plantas transgénicas es lograr el aumento en la calidad de las cosechas, proveerlas de resistencia contra enfermedades, insectos o herbicidas y mayor resistencia al estrés (Hiatt, 1993). Las ventajas que representa éste hecho son la reducción en el uso de insecticidas químicos y su fácil implementación, sin embargo, se pueden presentar problemas en cuanto a la aceptación de los alimentos así generados y a su posible inocuidad, el precio de las cosechas así obtenidas, el flujo y la erosión genéticas que puede causarse y el desarrollo de resistencia a éstos genes. El uso de éstas plantas se debe legislar en cada país y desarrollar sistemas de vigilancia en el uso de plantas transgénicas, proveer de información a los usuarios acerca de los beneficios, riesgos y cuidados que se deben tener al utilizar ésta clase de plantas modificadas y, sobretodo, estimular el uso correcto y ético de estas metodologías (Parkinson, 1997).

Además, las plantas transgénicas permiten estudiar *in vivo* las funciones de los genes y los mecanismos mediante los cuales se regulan (Hiatt, 1993). Estas plantas son de gran utilidad en los estudios científicos.

Rubisco y Rubisco activasa.

Estructura y función de Rubisco.

Rubisco (Ribulosa-1,5-carboxilasa/oxigenasa) (EC 4.1.1.39) es la enzima más abundante en el tejido verde de las plantas. Su función es la de unir el CO_2 atmosférico a un carbohidrato, la ribulosa-1,5 difosfato (azúcar de cinco carbonos), presente en el cloroplasto de las plantas, y del rompimiento mediante hidrólisis, del intermediario inestable de seis carbonos para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA), iniciando el ciclo de Calvin-Benson. Esta enzima también es llamada RuBP carboxilasa/oxigenasa, Carboxidismutasa o Rubisco.

Rubisco también cataliza la condensación de O_2 con RuBP. Este es el punto de inicio del proceso llamado fotorrespiración, el cual afecta la eficiencia de la fijación del CO_2 . Esta reacción produce una molécula de 2-fosfoglicolato (donde fue unido el oxígeno) y una molécula de PGA. Esta es la actividad de oxigenasa de la enzima, evidente en su nombre: Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa.

Los procesos de carboxilación y oxigenación son competitivos. En las concentraciones atmosféricas de CO_2 (0.03%) y de O_2 (21%) dos a tres moles de CO_2 son fijadas por una mol de O_2 , lo que indica que Rubisco posee una mayor afinidad por el CO_2 . La presencia de la reacción de oxigenación puede reflejar, en parte, que esta enzima evolucionó en el tiempo en que la atmósfera tenía mucho menor cantidad de O_2 . La función metabólica de esta reacción no está clara. Resulta en la no fijación del carbono y aparentemente es una desventaja para la célula; salvo los carbonos del fosfoglicolato, en que se aprovecha la energía celular. La condensación de O_2 con RuBP ocurre al mismo tiempo que la fijación de CO_2 (Lehninger, et. al., 1993).

Rubisco es una enzima compuesta por 16 subunidades, ocho subunidades grandes (LS) cuyo peso individual es de 53 kilodaltones (kDa), y ocho subunidades pequeñas (SS) con peso, cada una, de 14 kDa. La enzima, ya ensamblada, posee un peso de 550 kDa (Chapman, et. al., 1988) y forma una estructura L8S8. La subunidad L está codificada en el genoma del cloroplasto: su RNA mensajero (mRNA) está presente como parte del RNA del cloroplasto y es traducido en los ribosomas del cloroplasto, después de sintetizadas las subunidades se asocian a una proteína denominada proteína de unión de la subunidad grande (LSbp) cuya función es la de evitar la agregación de los péptidos antes de que sean ensamblados con las subunidades pequeñas (Hemmingsen, et. al., 1988); ésta subunidad es la que contiene el sitio catalítico de la enzima (Lehninger, et. al., 1993). La subunidad S es codificada en el genoma nuclear: su mRNA está asociado a ribosomas citoplásmicos y es muy posible que su función sea reguladora (Lehninger, et. al., 1993). Esta subunidad es sintetizada como un precursor de 20 kDa y tiene un péptido de tránsito de 46 a 57 aminoácidos que actúa como una llave, identificando el sitio de unión en la envoltura del cloroplasto y facilitando la entrada de la subunidad S dentro del cloroplasto mediante un proceso que requiere ATP. Durante o después del transporte el péptido de tránsito es suprimido. Dentro del cloroplasto las dos subunidades son ensambladas con la asistencia de una proteína de montaje o proteína de unión de la subunidad L (LSBP). Ambas subunidades tienen la remoción del fragmento amino terminal en algunas etapas del proceso de ensamblado. Este proceso en la subunidad S es una parte integral del proceso de entrada al cloroplasto.

El hexadecámero es disociado en sus subunidades bajo una variedad de condiciones desnaturizantes como urea 8 M, dodecil sulfato de sodio y pH extremo. La función exacta de la subunidad S no se ha entendido aún, pero su presencia en la holoenzima es esencial para su funcionamiento.

El arreglo tridimensional de las subunidades en la forma L8S8 de la Rubisco ha sido estudiada mediante microscopia electrónica y cristalografía de rayos-X. Las subunidades L se arreglan como dos capas de cuatro subunidades cada una en un arreglo cuadrado. Se había propuesto que las dos capas resbalaban una sobre otra pero recientemente se ha demostrado que esto no es cierto. La forma de la molécula parece un barril con 105 angstroms a lo largo del eje de los cuatro pliegues y 132 angstroms en su punto más ancho. Todas las subunidades L están elongadas e interdigitadas en pares.

Los 477 residuos de aminoácidos (según el organismo) de la subunidad L forman dos dominios. El primero consta de aproximadamente 168 residuos en las plantas superiores y forman el dominio N con muchos de estos residuos (del 5 al 134) formando una hoja beta antiparalela de cuatro hebras de tipo "sándwich abierto" de topología con una superficie expuesta al solvente. Los residuos 169 a 477 se pliegan formando un barril alfa/beta o dominio B. El barril está formado por ocho hebras beta unidas mediante puentes de hidrógeno torcidas pero aproximadamente paralelas. Tres residuos están involucrados en la catálisis y se encuentran dentro de 10 angstroms en la zona del sitio activo (Lys-175, Lys-201 y Glu-60). Glu-60 se localiza en el dominio N de la segunda subunidad L. De hecho, tres segmentos del dominio N pasan dentro de 13 angstroms del grupo amino épsilon de Lys-201, donde la enzima es activada mediante la formación de un enlace covalente con CO₂: la presencia de Mg²⁺ tiende a retener el enlace con el CO₂ y prepara al sitio activo para que ocurra una unión efectiva con RuBP. Como en otras enzimas, el sitio activo de Rubisco está formado en la interface de dos subunidades.

Las subunidades S se agrupan como dos tetrámeros, uno cerca de la parte alta y otro cerca de la parte baja de los cuatro pares L interdigitados. Las subunidades S tienen aproximadamente 123 residuos que forman un

dominio con forma de cerebro con su grupo carboxilo terminal cerca del eje de los cuatro pliegues. La contribución de las subunidades S a la conformación del sitio activo no se ha elucidado.

Las variaciones en la posición relativa del dominio N es la causa de los cambios en la afinidad relativa por CO_2 o O_2 (factor de especificidad), que distingue a varias especies de plantas.

La gran cantidad de Rubisco en el estroma del cloroplasto da como resultado una gran concentración de sitios activos, estimados entre 4 a 10 mM. Así la concentración de sitios catalíticos es mayor que muchos de los intermediarios involucrados en la asimilación de carbono. A pesar de todo la cantidad de RuBP cloroplástico en presencia de luz es entre 2 y 4 veces la concentración de los sitios activos y no es limitante para la fijación de CO_2 .

Debido a la importancia del proceso que realiza Rubisco (Salvucci y Ogren, 1996) y por ser el sitio donde inicia la fijación del CO_2 (Lehninger, et. al., 1993), Rubisco es el primer blanco de regulación del metabolismo de los carbohidratos y se encuentra altamente regulada. La luz, la presencia de inhibidores, la concentración de Mg^{2+} , la presencia y cantidad de CO_2 y de su sustrato y la acción de RA son factores que se conjugan para regular su actividad (Salvucci y Ogren, 1996). Además, ésta enzima está regulada alostéricamente ya que es activada por NADPH, 6-fosfogluconato, fructosa-1,6-difosfato, Mg^{2+} y CO_2 (Lehninger, et. al., 1993). Es necesario que Rubisco se encuentre carbamilada, es decir, unida a CO_2 , para que tenga actividad. La adición de la molécula de CO_2 se realiza en un sitio activo de un residuo de lisina, lo cual produce una especie aniónica estable que puede conjugarse con un catión metálico divalente, el Mg^{2+} . Éste ion metálico es esencial para la actividad catalítica de la enzima y solo puede unirse a Rubisco mediante éste proceso (Salvucci y Ogren, 1996). Cabe

hacer notar que la molécula de CO_2 que se une a la enzima para regularla no es la misma molécula de CO_2 que se incorpora a la ribulosa-1,5-difosfato en la reacción catalizada por ésta enzima. Los cambios en la activación de la Rubisco involucran cambios en la proporción de sitios activos que están carbamilados. El número de éstos sitios activos es el mayor factor de modulación de la velocidad de fijación del CO_2 en la hoja (Lehninger, et. al., 1993).

Dado que el sitio activo de Rubisco posee un alto grado de integridad estructural aunque Rubisco no se encuentre carbamilada, la enzima es capaz de unirse a su sustrato RuBP aún cuando no pueda realizar su función catalítica, por no estar carbamilada. Así, cuando la enzima está decarbamilada, su sitio activo se une fuertemente a su sustrato, lo que impide que la enzima pueda carbamilarse de manera espontánea. Esta situación estabiliza a Rubisco cuando se encuentra en estado inactivo. Existen ciertos azúcares fosfatados que se unen muy fuertemente a Rubisco una vez que el sitio activo se ha decarbamilado, funcionando como inhibidores competitivos de RuBP. Tres de éstos azúcares son el carboxiarabinitol-1-fosfato (CA1-P), el 3-cetoarabinitol difosfato y la xilulosa difosfato (Salvucci y Ogren, 1996).

El CA1-P es un análogo del sustrato y forma un estado de transición semejante al que ocurre en forma natural durante la reacción catalizada por Rubisco, su estructura es similar a la del intermediario del cétoácido de la reacción catalizada por la enzima. Este compuesto es sintetizado en la oscuridad por algunas plantas para inhibir la actividad de Rubisco, por lo que también se le conoce como el inhibidor nocturno. Esta sustancia se rompe cuando regresa la luz, permitiendo la reactivación de Rubisco (Lehninger, et. al., 1993).

Se han identificado múltiples factores que pueden afectar la velocidad de activación de Rubisco, uno de los cuales es la actividad de RA (Mott y Woodrow, 2000).

Estructura y función de Rubisco activasa.

Rubisco activasa (RA) es una proteína que se encarga de mantener en estado activo a Rubisco en sus condiciones fisiológicas (Salvucci y Ogren, 1996). Está codificada en el núcleo de la célula vegetal y es sintetizada en los ribosomas del citoplasma como un precursor, de ahí es transportada al cloroplasto, quedando en el estroma de éste último, donde es procesada a un péptido maduro mediante la remoción del péptido de tránsito, adquiriendo así un peso entre 41 y 46 kDa. Su función es la de mantener el estado activo de Rubisco a niveles adecuados para la fotosíntesis, en presencia de luz (Dennis y Turpin, 1990).

En muchas especies de plantas la proteína RA madura consiste en dos polipéptidos relacionados entre sí que surgen de un "splicing" alternativo del pre-mRNA en el intrón que se localiza cerca del extremo 3' del RNA. La estructura primaria de RA se encuentra altamente conservada (mayor al 80%) a nivel de aminoácidos a excepción de su extremo carboxi-terminal (Salvucci y Ogren, 1996).

RA se encuentra en todas las especies de plantas superiores, dos especies unicelulares de algas y en cianobacterias. Se ha demostrado que la distribución de los transcritos de mRNA de RA es paralela a la distribución de los transcritos para la subunidad pequeña de Rubisco, lo que indica que RA se encuentra, al igual que Rubisco, solamente en los cloroplastos. La forma en que RA actúa a nivel molecular es aún desconocida. Las hipótesis actuales que intentan explicar su mecanismo son dos:

- a) RA promueve la activación de Rubisco reparando el deterioro generado por los inhibidores competitivos de RuBP y de la baja concentración de

CO₂ en el cloroplasto. RA regula la actividad de Rubisco a través de su dependencia a los niveles de ATP y ADP, que a su vez dependen de la presencia de luz y de otros factores ambientales. Se piensa que RA revierte la inhibición de la actividad de Rubisco facilitando la carbamilación de Rubisco en presencia de RuBP además de ayudar a liberar a Rubisco de la inhibición de los azúcares fosfato unidos a Rubisco.

Esta hipótesis supone que el rol principal de RA es el de promover la disociación de RuBP y otros inhibidores de Rubisco, permitiendo que el sitio activo de Rubisco quede libre para poder ser activado por CO₂.

- b) La RA es una chaperona molecular, cuya función es mantener activa a la enzima Rubisco (Sánchez de Jiménez, et. al., 1995).

Las chaperonas moleculares son un grupo de familias de proteínas no relacionadas entre sí que asisten el ensamble no covalente de otros polipéptidos para que éste se realice correctamente. Estas proteínas no forman parte de la estructura ensamblada (Rothman y Kornberg, 1989, Gatenby y Ellis, 1990, Ellis, 1993), pero sí participan en el restablecimiento de las funciones y la estructura de las proteínas que ensamblan cuando éstas sufren algún daño por estrés, como el estrés térmico o por deterioro durante su función metabólica (Ellis, 1993).

Para muchas chaperonas moleculares el módulo poliadenilado AAA+ se une covalentemente a dominios que determinan la función celular. La actividad de ATPasa del módulo AAA+ actúa como un motor que dirige las interacciones intermoleculares que se requieren para la función. La molécula activa usualmente es multimérica, compuesta por varias subunidades AAA+ usualmente ensambladas en anillos (Newland, 1999). En el caso de la activasa parece ser que el sitio activo es un oligómero de entre 14 y 16 subunidades (Lilley y Portis, 1997, Wang, et. al., 1993).

Las subunidades de la activasa tienen la fuerte tendencia a asociarse entre ellas (Spreitzer y Salvucci, 2002).

La Rubisco activasa está formada por dos péptidos relacionados entre sí y que son producidos mediante "splicing" alternativo de un mismo transcrito primario (Werneke, et. al., 1988). Se encuentra ampliamente distribuida en los organismos fotosintéticos (Salvucci, et. al., 1987 Ellis y van der Vies, 1991).

Existen algunos hechos que hacen pensar que la Rubisco activasa actúa como chaperona molecular. Algunos de ellos son: el proceso mediante el cual la Rubisco activasa activa a la Rubisco es dependiente de ATP (Robinson y Portis, 1989), la Rubisco activasa se une preferentemente a Rubisco en forma no nativa, es decir, con posibles daños, en vez de a la forma nativa (Sánchez de Jiménez et. al., 1995), la disociación del complejo Rubisco-Rubisco activasa es dependiente de ATP, aumenta la cantidad de RA en la planta después de un estrés térmico con lo cual se alcanza un gran porcentaje de recuperación de la actividad de Rubisco; además de que RA se encuentra en grandes cantidades en las plantas verdes (Salvucci et. al., 1987) y no posee una cinética enzimática convencional por lo que debe alcanzar concentraciones no catalíticas para poder activar a la Rubisco (Sánchez de Jiménez, et. al., 1995). Todos éstos hechos, además de su amplia distribución en los organismos fotosintéticos y su respuesta ante el estrés térmico, concuerdan con las características de las chaperonas moleculares. Actualmente se considera que las chaperonas moleculares no solo intervienen en el proceso de plegado de las proteínas, sino que además actúan estabilizando, protegiendo y reparando las estructuras de las proteínas (Ellis y Van der Vies, 1991).

Debido a que durante el proceso de activación y de desactivación de la Rubisco por sus substratos ésta sufre muchos cambios conformacionales,

es muy probable que la RA le ayude a recobrar su conformación activa, proceso que lleva a cabo utilizando como fuente de energía ATP.

Se ha observado que la actividad de Rubisco se mantiene y hasta puede incrementarse después de un estrés térmico, respuesta paralela al aumento en la cantidad de RA. También se ha observado durante el periodo de llenado de grano en el maíz, periodo durante el cual la demanda de productos de la fotosíntesis (fotosintatos) aumenta considerablemente y también hay un aumento en la cantidad de RA pero no en la cantidad de Rubisco. Durante este periodo hay muy poco recambio de Rubisco lo que puede hacer pensar que el aumento de RA es necesario para que ésta pueda estabilizar a Rubisco.

La proporción entre RA y Rubisco, calculada con base en la masa molecular, indica que existen aproximadamente 30 RA por molécula de Rubisco lo que hace pensar que es necesario que la RA rodee a la molécula de Rubisco para realizar los cambios conformacionales necesarios para que la Rubisco entre en actividad (Saibil et al., 1993).

La posibilidad de que RA sea activa cuando se encuentra agregada con ella misma le da una gran similitud con la chaperonina GroEL, la cual es altamente cooperativa cuando se encuentra conformada como anillos heptaméricos (Salvucci y Ogren, 1996).

Es un hecho que las temperaturas elevadas inhiben la fotosíntesis (Berry y Björkman, 1980). Este fenómeno ha sido explicado como un aumento en la afinidad de Rubisco por el oxígeno, y por lo tanto un aumento en la fotorrespiración, cuando las temperaturas son elevadas, pero esta explicación no basta para explicar este fenómeno (Jordan y Ogren, 1984).

Es posible que la activación de Rubisco mediada por luz sea inhibida por temperaturas moderadamente elevadas a través de un efecto en RA ya que el aumento en la temperatura de la hoja de la planta ocasiona que RA forme agregados de alto peso molecular, los cuales son insolubles en el estroma, si la temperatura se incrementa rebasando los 40°C, donde la inactivación de la RA se vuelve irreversible. A temperaturas menores de 40°C, la inactivación de RA es reversible. Las temperaturas moderadamente elevadas tienen un efecto directo en la distribución y forma de RA. Las altas temperaturas afectan físicamente a RA, inhibiendo su actividad.

Se ha demostrado que Rubisco no es afectada directamente por temperaturas moderadamente elevadas, que incluso tolera los 45°C, donde la inactivación de Rubisco es irreversible (Feller et. al., 1998).

RA necesita ATP para realizar su función, el cual hidroliza produciendo ADP y Pi. El ADP inhibe la hidrólisis de ATP y el efecto de éste en la activación de Rubisco. Así, la activación de Rubisco mediante RA es regulada por la proporción existente entre ATP y ADP, lo cual relaciona a RA con el estado energético del cloroplasto, lo cual a su vez está relacionado con los factores ambientales. El ADP inhibe la actividad de Rubisco y por tanto la hidrólisis de ATP en una magnitud similar a la inactivación de RA debido a la temperatura. Sin embargo, no parece haber una relación muy estrecha entre la actividad de ATPasa de RA con su actividad como activador de Rubisco. Éste es un aspecto del mecanismo de RA que aún no se ha dilucidado completamente (Dennis y Turpin, 1990).

Parece que el substrato de RA es una forma específica de Rubisco que contiene algún azúcar fosfato unida fuertemente a su sitio activo. Un modelo de acción de RA propuesto por Salvucci y Ogren propone que ésta forma es convertida por RA a otra forma que une con menos fuerza al

azúcar fosfato de forma que ésta unión puede ser fácilmente disociada. Una vez libre el sitio activo, éste puede carbamilarse espontáneamente y/o llevar a cabo su función de catálisis ó unirse a RuBP. Parece ser que ésta actividad de RA es la que necesita la hidrólisis de ATP (Salvucci y Ogren, 1996).

Otro modelo, propuesto por Andrews, consiste del mismo mecanismo de acción anteriormente descrito, pero difiere en el papel que desempeña el ATP. El propone que la interacción entre Rubisco y RA provoca cambios conformacionales en RA. El ATP es hidrolizado por RA cuando ésta no está unida a Rubisco y cumple la función de regresar a la conformación de RA que le permite interactuar con Rubisco (Andrews, et. al., 1996). Experimentalmente, solo se ha observado la unión de RA a Rubisco cuando ésta se encuentra desnaturalizada, no cuando se encuentra en su estado nativo (Sánchez de Jiménez et. al., 1995).

La actividad de RA es promovida por la luz mediante un mecanismo que está relacionado con el fotosistema I y con la formación del gradiente de pH en el cloroplasto.

Por lo que se ha sugerido otra posibilidad de regulación de RA mediante el transporte de electrones a través del fotosistema I ó activación directa por la luz (Salvucci y Ogren, 1996). Otros estudios indican que es muy probable que existan interacciones directas entre la subunidad grande de Rubisco y RA (Larson, et. al., 1997).

La cinética de RA y su denaturalización física al aumentarse la temperatura parecen ser los factores principales de la disminución de la actividad de Rubisco a altas temperaturas (Crafts-Brandner y Salvucci, 2002, Salvucci et. al., 2001). El papel de RA en la activación de Rubisco es

de importancia vital, ya que se ha demostrado que Rubisco no puede llevar a cabo su función *in vivo* en ausencia de RA (Salvucci, et. al., 1985).

Introducción.

Rubisco es una enzima que poseen los vegetales cuya función es la de incorporar una molécula de bióxido de carbono ambiental a una molécula de pentosa presente en la planta para generar nuevos carbohidratos y almacenar energía. Así, esta enzima convierte el carbono inorgánico en carbono orgánico, el cual puede ser asimilado por los organismos no fotosintéticos.

Rubisco activasa es una proteína que regula la actividad de Rubisco. Aunque aún no se conoce en detalle la forma en la que actúa Rubisco activasa, dadas sus características funcionales podría ser una chaperona molecular (1), que protege a Rubisco de perder su estructura nativa (Sánchez de Jiménez E., et al., 1995). Nuevos estudios sugieren que Rubisco activasa es un factor imprescindible para la activación y mantenimiento del estado activo de Rubisco y que actúa sobre ésta modificando su conformación permitiéndole liberarse de sus inhibidores, manteniéndola en estado activo para que realice la fotosíntesis (Crafts-Brandner et. al., 2002).

Se ha observado que la velocidad fotosintética de las plantas disminuye si sufren un estrés térmico, sobre todo cuando el estrés involucra el aumento de la temperatura y se aplica de forma repentina, sin permitir que la planta se aclimate. Dado el papel de promotor de la actividad de Rubisco por parte de Rubisco activasa es probable que esta última sea un factor determinante para proteger del estrés térmico a la actividad de Rubisco.

(1) Las chaperonas moleculares son un grupo de familias de proteínas no relacionadas entre sí que asisten el ensamble no covalente de otros polipéptidos para que se realice correctamente. No forman parte de la estructura ensamblada, pero sí participan en el restablecimiento de las funciones y la estructura de las proteínas que ensamblan cuando estas sufren algún daño por estrés o por deterioro durante su función metabólica.

En éste proyecto de investigación se han planteado los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Conocer si la disminución en la cantidad de Rubisco activasa en plantas de Arabidopsis thaliana afecta su capacidad de recuperación después de un estrés térmico.

Objetivos específicos:

- 1) Crecer y seleccionar plantas transgénicas homocigotas con antisentido para Rubisco activasa.
- 2) Seleccionar experimentalmente las condiciones de estrés adecuadas para mostrar el fenómeno esperado.
- 3) Diseñar una cámara para la medición adecuada de fotosíntesis en Arabidopsis thaliana.
- 4) Determinar las concentraciones de Rubisco y Rubisco activasa en las plantas control y transgénicas antes y durante el periodo de recuperación del estrés.
- 5) Determinar la capacidad fotosintética de las plantas de Arabidopsis thaliana control y transgénicas antes y después del estrés.

Hipótesis:

La hipótesis a comprobar mediante éste proyecto es: si Rubisco activasa funciona primordialmente como chaperóna molecular se esperaría una relación entre la concentración de RA y la capacidad de recuperación de estrés térmico de las plantas. De tal manera que plantas con niveles normales o altos de RA se recuperarán mejor de un estrés térmico que las que tienen un bajo contenido de RA.

Para comprobar ésta hipótesis se utilizarán plantas de Arabidopsis thaliana ecotipo Columbia silvestres y plantas del mismo género y especie

que expresan RNA antisentido para RA, las cuales se esperaría posean mucha menor cantidad de la proteína RA que las plantas silvestres. Para obtener las muestras biológicas necesarias para realizar éste experimento, las semillas de esta población de *Arabidopsis thaliana* se sembrarán en medio MS con kanamicina para seleccionar las plantas que expresan el antisentido y después de 28 días serán sometidas a un estrés térmico; una parte se almacenará y otra se dejará en recuperación durante uno ó tres días. Se colectarán muestras de cada periodo que se analizarán posteriormente. A las plantas se les medirán los parámetros siguientes: fotosíntesis, cantidad de proteínas totales y se cuantificará el contenido de proteína Rubisco y RA.

Los lotes de plantas antisentido fueron gentilmente proporcionadas por la Dra. Patricia León, del Instituto de Biotecnología de la UNAM ubicado en Cuernavaca Morelos, quien las obtuvo transformándolas con una construcción que contenía la secuencia de RA en antisentido unido a resistencia a kanamicina. Se agradece a la Dra. Patricia León y a su equipo de trabajo todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Materiales v métodos.

Material biológico:

1. Hojas de plantas silvestres y de plantas con antisentido para RA y con resistencia a kanamicina provenientes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia fueron crecidas por 28 días después de haber sido sembradas en medio MS con kanamicina, sin tratamiento o sometidas a estrés térmico por dos horas. Las semillas de estas plantas fueron amablemente donadas por la Dra. Patricia León del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
2. Anticuerpos policlonales de conejo contra Rubisco y contra Rubisco activasa preparados en el laboratorio.

Materiales:

1. IRGA. Se utilizó un aparato para medir fotosíntesis CID modelo CI-301PS. Casa comercial CID.
2. Stocks de Rubisco y Rubisco activasa de espinaca preparados en el laboratorio.
3. Buffer de extracción:
Disolver en aproximadamente 45 ml. de agua:
1.792 gr de tricina (0.16 M);
0.0952 gr de cloruro de magnesio (0.0078 M);
0.084 gr de bicarbonato de sodio (0.016 M);
0.2046 gr de EDTA (0.009 M).
Ajustar el pH a 8.1.
Aforar a 60 ml.
Almacenar a 4°C.
Antes de ser utilizado, se añaden los siguientes inhibidores de proteasas:
0.046 gr de DTT disueltos en 3 ml. de agua;

0.54 ml de solución de 0.0087 gr. de PMSF disueltos en 1.35 ml. de acetona

(0.0009 M);

0.0076 gr de benzamidina disueltos en 2 ml. de agua;

2.46 ml de agua.

Agitar la solución y utilizar.

4. Reactivo de Bradford marca Biorad.
5. Albúmina de suero bovino (BSA) Sigma.
6. Buffer de muestra:

Pesar 0.3785 gr de Tris (0.062 M), 1 gr de SDS y 0.1 gr de azul de bromofenol (0.2%) y disolverlos en aproximadamente 30 ml de agua, añadir 5 ml de glicerol y disolver.

Ajustar el pH a 6.8.

Aforar a 50 ml.

Un momento antes de utilizarse añadir β -mercaptoetanol en la siguiente proporción:

170 μ l de buffer de muestra preparado como se indica en este punto y

7.5 μ l β -mercaptoetanol.

7. Solución I para electroforesis:

Disolver 30 gr de acrilamida y 0.8 gr de bisacrilamida en 100 ml de agua.

Añadir 0.2 gr de carbón activado y agitar unos momentos.

Filtrar en papel Whatman grueso hasta obtener una solución transparente.

Guardar en frasco ambar a 4°C.

8. Solución II para electroforesis:

Pesar 18.2 gr de Tris P.M.: 121.1 g/mol (1.5 M) y 0.4 gr de SDS y disolverlos en aproximadamente 80 ml de agua.

Ajustar pH a 8.8.

Aforar a 100 ml.

9. Solución III para electroforesis:
Pesar 6.05 gr de Tris (0.5 M) y 0.4 gr de SDS y disolverlos en aproximadamente 80 ml de agua.
Ajustar el pH a 6.8.
Aforar a 100 ml.
10. Buffer de corrida:
Se pesan 4.541 gr de Tris (0.025 M), 21.405 gr de glicina (0.2 M) y 1.5 gr de SDS y se disuelven en aproximadamente 1.3 L de agua.
Ajustar el pH a 8.3.
Aforar a 1.5 L.
Dejar reposar un día antes de usar.
11. Solución I de transferencia:
Solución I (4X).
Pesar 29.08 gr de Tris (1.2 M) y disolverlo en aproximadamente 180 ml de agua.
Ajustar el pH a 10.4.
Aforar a 200 ml.
12. Solución II de transferencia:
Solución II (4X).
Pesar 2.42 gr de Tris (0.1 M) y disolverlos en 180 gr de agua.
Ajustar el pH a 10.4.
Aforar a 200 ml.
13. Solución III de transferencia:
Pesar 1.06 gr de ácido amino-caprónico (0.04 M) y disolverlos en 180 ml de agua.
Ajustar el pH a 7.2.
Aforar a 200 ml.
14. Papel filtro Whatman.
15. Membrana de nitrocelulosa.

16. Solución TBS 0.15 M:

Pesar 12.114 gr de Tris (0.05 M) y 17.532 gr de NaCl (0.15 M) y disolverlos en 1.8 L de agua.

Añadir 2 ml. de Tween 20.

Ajustar el pH a 7.4.

Aforar a dos litros.

17. Solución TBS 1 M:

Pesar 3.0275 gr de Tris (0.05 M) y 29.22 gr de NaCl (1 M) y disolverlos en 400 ml de agua.

Añadir 0.5 ml de Tween 20.

Aforar a 500 ml.

18. Solución para lavado de membranas.

Tomar 4.68 ml de una solución 2 M de Tris-HCl y añadirle 30 ml de solución SDS al 10% y 1.044 ml de β -mercaptoetanol.

19. Metanol R.A.

20. Azul de Coomasie.

21. Rojo Ponceau.

22. Reactivos ECL de Amersham.

23. Placas para rayos X Kodak.

24. Película fotográfica Polaroid.

25. Cajas petri ó de plástico estériles.

26. Medio MS (Murashige Skoog) (con kanamicina (50 mg/L) según el método indicado por ambos autores en: *Physiologia plantarum* (Murashige y Skoog, 1962).

27. Celdas para espectrofotómetro de plástico y de cuarzo.

28. Morteros con pistilo.

29. Congeladores de -20 y -70°C.

30. Refrigerador.

31. Espectrofotómetro Beckman DU 650.

32. Centrifuga refrigerada Beckman GS-15R.

Métodos:

Para realizar las mediciones de la cantidad de Rubisco y de RA presentes en las muestras se aplicará la técnica SDS-PAGE acoplada a Western blot. Para obtener las mediciones de fotosíntesis se utilizará un medidor de fotosíntesis IRGA.

NOTA: El agua utilizada es agua destilada y desionizada si no se indica lo contrario.

A) Obtención de muestras.

- I) Selección de plantas homocigotas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia con antisentido para Rubisco activasa.
 - a) Las semillas de *Arabidopsis thaliana* tanto normales como las transformadas con la secuencia antisentido para RA, fueron donadas por la Dra. Patricia León del Instituto de Investigaciones en Biotecnología de la UNAM. Para germinarlas, las semillas se remojaron en agua destilada, desionizada y estéril durante media hora. El agua se decantó y se adicionó etanol absoluto durante cinco minutos, el cual se decantó y se añadió la solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 1%. Se agitó durante seis minutos y se decantó. Las semillas se enjuagaron varias veces con agua estéril para eliminar la mayor cantidad posible de solución desinfectante.
 - b) Las semillas se sembraron en cajas petri con medio MS con kanamicina 100 mg/ml. y se vernalizaron durante 48 horas.
 - c) Las cajas se colocaron en una incubadora a 25°C con un fotoperíodo luz-oscuridad de 8X16 horas, donde se dejó crecer las plantas durante 28 días.
 - d) Para producir la semilla las plantas se dejaron crecer en cajas petri durante 13 días y las plantas crecidas que sean resistentes a kanamicina se transplantaron a tierra y se dejaron crecer en las

mismas condiciones y manteniendo la tierra húmeda proporcionando agua por la parte inferior de la maceta hasta que las vainas con semillas comenzaron a secarse (entre dos ó tres meses). Se regó con agua cada vez que fué necesario.

- e) La inflorescencia se cortó y se colocó en una bolsa de plástico donde se dejó secar. Una vez seca la inflorescencia se obtuvieron las semillas, se limpiaron y se almacenaron en tubos Eppendorf a 4°C hasta su utilización.

B) Tratamiento de las muestras.

I) Obtención de las muestras biológicas.

- a) Las plantas se sometieron a estrés térmico a 35°C durante dos horas. Antes, y después de tres días del estrés térmico se midió la fotosíntesis mediante un aparato IRGA. Se recogieron muestras antes del estrés térmico, a las dos horas, después de un día y después de tres días del estrés térmico.
- b) Las muestras recolectadas se congelaron a -70°C con nitrógeno líquido y se almacenan a -70°C para llevar a cabo las determinaciones siguientes:

II) Extracción de las proteínas.

- a) Las plantas sin raíces se molieron en nitrógeno líquido y se adicionó buffer de extracción cuando el tejido se encontró perfectamente molido y descongelado. La proporción entre buffer y tejido es de dos ml, de buffer de extracción por gramo de tejido vegetal. La mezcla obtenida se centrifuga a 14.000 r.p.m. en una centrifuga Beckman con rotor F2402 (26.000 rpm) durante 11 minutos a 4°C. El sobrenadante se pipeteó a un tubo Eppendorf y se almacenó a -20°C.
- b) La cuantificación de la proteína contenida en los extractos se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976). Se realizó

una curva de calibración utilizando una solución, de 10 grs de BSA en 10 ml de agua:

BSA	H2O	Reactivo Bradford.
(μ l)	(μ l)	(μ l)
0	800	200
5	795	200
10	790	200
15	785	200

- c) En tubos Eppendorf se colocaron 5 μ l de extracto, se añadieron 800 μ l de agua y posteriormente se adicionaron 200 μ l de reactivo de Bradford. Se mezcló en Vortex y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 595 nm en celdas de plástico.
- III) Separación e identificación de las proteínas mediante la técnica de Western-blot.
- a) El extracto de hojas se descongeló en hielo. En un tubo Eppendorf se colocó la cantidad necesaria de extracto (4.5 μ g de proteína total para extractos de *Arabidopsis thaliana*). Se añadieron 0.5 μ l de buffer de muestra por μ l de extracto.
- b) Se agitó en Vortex y se centrifugó a baja velocidad (2 000 rpm).
- c) Los tubos Eppendorf se colocaron en agua hirviendo durante dos minutos.
- d) Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes utilizando geles de acrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).
- e) Se cargó la muestra y se dejó correr con 15 mA por gel mientras las proteínas estaban en el gel apilador y a 30 mA por gel cuando las proteínas entraron al gel separador. Se dejó correr hasta antes de que saliera el frente azul.
- f) Una vez que el gel terminó de correr se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. En el aparato de

- transferencia se colocó el siguiente sandwich, comenzando de la base (polo +):
- (1) Seis papeles filtro Whatman cortados del mismo tamaño del gel y embebidos de solución I de transferencia ya diluida.
 - (2) Tres papeles filtro Whatman cortados del mismo tamaño del gel y embebidos de solución II de transferencia ya diluida.
 - (3) Se colocó la membrana de nitrocelulosa cortada al mismo tamaño del gel, previamente colocada durante 15 segundos en metanol, 2 minutos en agua y enjuagada con solución II de transferencia.
 - (4) Se colocó el gel de acrilamida enjuagado con solución II de transferencia.
 - (5) Tres papeles filtro Whatman cortados del mismo tamaño del gel y embebidos de solución III de transferencia ya diluida.
 - (6) Se colocó la tapa (polo -) y se transfirió durante hora y media con 1.5 mA por cm².
- g) Al término de la transferencia la membrana se tiñó con Rojo Ponceau, se enjuagó en agua, se colocó en papel filtro y se dejó secar.
- h) Para realizar el revelado la membrana ésta se colocó en metanol durante 15 segundos. Posteriormente se colocó en agua durante cinco minutos.
- i) La membrana se colocó en solución TBS 0.15 M y se dejó en agitación moderada durante cinco minutos.
- j) Después se colocó en solución saturadora (TBS 0.15 M con leche en polvo descremada al 5%). Se dejó en agitación moderada y constante durante una hora.
- k) La membrana se enjuagó con TBS 0.15 M durante 15 minutos con agitación fuerte.

- l) El primer anticuerpo (ya sea contra Rubisco o contra Rubisco activasa) se le añadió a la membrana y se incubó a 37°C con agitación moderada y constante durante dos horas.
- m) La membrana se lavó en solución TBS 0.15 M y se agitó fuertemente durante 15 minutos.
- n) La membrana se lavó en solución TBS 1M y se agitó fuertemente durante 10 minutos.
- o) La membrana se lavó en solución TBS 0.15 M y se agitó fuertemente durante 10 minutos.
- p) Se añadió el segundo anticuerpo y se dejó agitando moderadamente a temperatura ambiente durante dos horas.
- q) Se colocó la membrana en solución TBS 0.15 M y se agitó vigorosamente durante 15 minutos.
- r) La membrana se puso en agua.
- s) Se procedió a revelar la membrana utilizando el kit ECL (Amersham). Se mezclaron cantidades iguales de soluciones A y B.
- t) La membrana se sumergió en la mezcla y se bañó con ella durante tres minutos; se colocó en el cassette, se cubrió con plástico autoadherente y se colocó sobre este la película para rayos X.
- u) La película se expuso 30 segundos y se pasó a la solución reveladora hasta que apareció la imagen, de ahí se enjuagó con agua 15 segs. y después se pasó a la solución fijadora. Finalmente se enjuagó con abundante agua.
- v) Se realizó una densitometría en las placas obtenidas.
- w) En caso de ser necesario se lavaron las membranas. Si la membrana ya está seca primero se colocó por 10 segundos en metanol y después durante 5 minutos en agua antes de lavarse.
- x) La membrana se colocó en la solución de lavado y se colocó a una temperatura entre 50 y 70°C con agitación ocasional.

- y) Se lavó durante 10 minutos con TBS 0.15 M 2X y procedió a realizar la técnica de Western ó si se hace posteriormente se enjuagó con agua y dejó secar.

C) Medición de la fotosíntesis.

- I) Las semillas de las plantas a las cuales se les midió la fotosíntesis se sembraron en frascos de gerber que contenían medio MS con kanamicina y se dejaron crecer en las condiciones indicadas para obtener las muestras.
- II) A todas las plantas se les midió de fotosíntesis antes del tratamiento térmico para lo cual, el frasco se tapó con una tapa para frasco de gerber a la cual se le adaptaron una entrada y una salida de aire con dos mangueras de plástico.
- III) Las plantas se colocaron de forma que reciban 400 microeinsteins $m^{-2}s^{-1}$ con una lámpara y en presencia de un medidor de intensidad lumínica.
- IV) La lectura de la medición de la fotosíntesis se realizó al obtener un valor constante.

Resultados.

Obtención de plantas homocigotas.

Las plantas homocigotas se obtuvieron sembrando 30 semillas por caja petri por lote de plantas, en medio MS con kanamicina. Las plantas que no presentan el antisentido para RA tampoco presentan la resistencia a kanamicina y adquieren un color blanco en éste medio a los pocos días de haber desarrollado las dos primeras hojas, muriendo a los pocos días de haberlo adquirido. Por tanto, las plantas que resisten el antibiótico y crecen aparentemente en forma normal son consideradas homocigotas. Para considerar un lote de plantas como homocigotas, debe de haber por lo menos un 98% de plantas verdes en el lote.

Se obtuvieron 6 lotes homocigotos de plantas antisentido para RA (12, 15, 16, 21, 22 y 24) y 2 lotes controles: W.T. y k^r (control que solo tiene el gen de la resistencia a la kanamicina).

Caracterización bioquímica de las plantas antisentido.

Las plantas homocigotas se sometieron a extracción de proteínas, separación de las mismas mediante SDS-PAGE e identificación y revelado mediante Western-blot con anticuerpos ya sea para ambas subunidades de Rubisco ó para Rubisco activasa (RA). Se analizó la cantidad de RA que presentaban las distintas plantas homocigotas obtenidas.

Las plantas de los distintos lotes con la misma edad fisiológica (28 días después de haber sido sembradas) se homogeneizaron con buffer de extracción para extraer las proteínas. En el extracto se cuantificó la proteína utilizando la técnica de Bradford y se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 10%, colocando la misma cantidad de proteína total de las plantas antisentido y controles (silvestre W.T.) y resistente a kanamicina (k^r) en cada carril. En el caso de las plantas que tenían menor

cantidad de RA (lotes 12, 15 y 16) se colocó doble cantidad de proteína total en comparación para poder observar a RA. El gel obtenido se transfirió a una membrana de nitrocelulosa la cual posteriormente se reveló con anticuerpos contra RA y con anticuerpos contra las dos subunidades de Rubisco.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

En la figura 1 se muestra un Western-blot realizado con anticuerpos contra las subunidades grande y pequeña de Rubisco.

El revelado muestra las subunidades grande y pequeña de Rubisco.

La misma membrana para detectar Rubisco se utilizó para detectar RA. En el revelado obtenemos las dos bandas características de RA. La diferencia en la cantidad de RA que posee cada planta es muy obvia. En la figura 2 se ilustra una de las tres réplicas que dieron resultados muy semejantes.

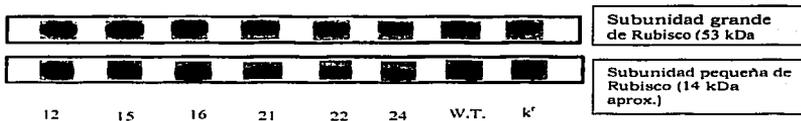


Figura 1. Los lotes de plantas 12, 15 y 16 contienen 5 μ g de proteína total, 21, 22, 24, WT. y k' contienen 2.5 μ g. La dilución utilizada para el anticuerpo fue de 1:4 000.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Western-blot con anticuerpos contra RA.

La misma membrana para detectar Ru se utilizó para detectar RA. En el revelado obtenemos las dos bandas características de RA. La diferencia en la cantidad de RA que posee cada planta es significativa. Se ilustra una de tres réplicas.

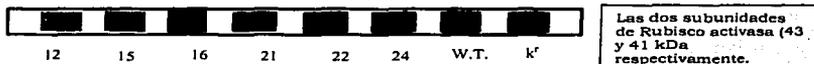


Figura 2. Así se observan las subunidades de Rubisco activasa en la película revelada obtenida del Western-blot.

A los Western-blot obtenidos se le realizó una densitometría para obtener la cantidad de RA que poseía cada lote con respecto al lote sin tratamiento (W.T.) y se corrigió por la cantidad de proteína aplicada. Valor relativo: W.T.= 1 (figura 3).

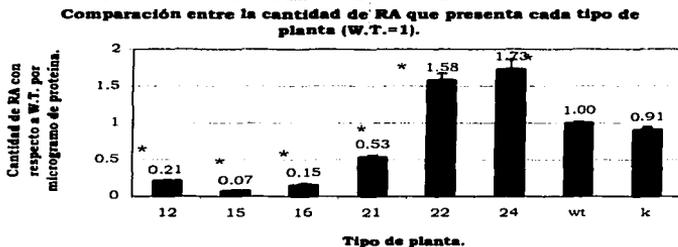


Figura 3. Comparación entre las cantidades de RA de los diferentes lotes de plantas antisentido (12, 15, 16, 21, 22 y 24) y los controles (W.T. y k'). Esta gráfica se obtuvo con los resultados de tres experimentos independientes y se corrigió por la carga de proteína aplicada. La gráfica representa el promedio de tres réplicas. Las barras muestran el error

estándar. Se marcan con asterisco las que son significativamente diferentes con relación al control con $p < 0.05$.

Las plantas con antisentido para RA expresan distintas cantidades de ésta proteína. Los lotes de plantas transgénicas 12, 15, 16 y 21 contienen mucho menos cantidad de RA que el lote normal (control W.T. y control kr), con rangos que van desde 0.07 hasta 0.53. Por otra parte, algunos lotes de plantas transgénicas (22 y 24) presentaron cantidades por arriba del control de la misma (1.58 y 1.73). Las plantas transgénicas con resistencia a kanamicina contienen prácticamente la misma cantidad de RA que las plantas W.T. (figura 3).

Estos valores inesperados de aumento en la cantidad de RA nos llevaron a hacer análisis de la cantidad de Rubisco. Para conocer si el tratamiento para la obtención de plantas transgénicas no afectó el contenido y/o la proporción entre subunidades de la Rubisco, se determinó la relación entre Rubisco subunidad grande (LS) y Rubisco subunidad pequeña (SS). Con este propósito se realizó una electroforesis de los extractos protéicos en geles de acrilamida al 10% cargando la misma cantidad de proteína total por carril y después de transferirlos a una membrana de nitrocelulosa, se reveló con anticuerpos contra ambas subunidades de Rubisco. Los datos expresados a continuación están dados por μg de proteína total.

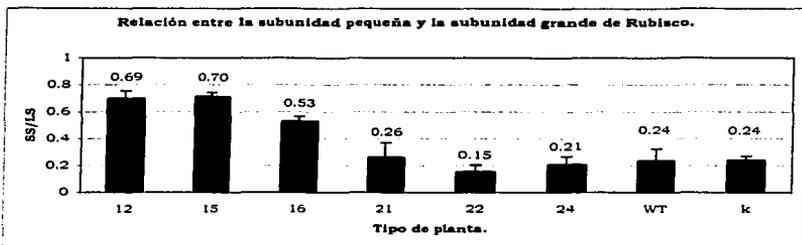


Figura 4. Variación en la proporción entre las dos subunidades de Rubisco de todos los lotes de plantas antisentido (12, 15, 16, 21, 22 y 24) y controles (W.T. y k). Los valores son promedio de tres experimentos independientes y la línea vertical representa el error estándar en cada caso.

La placa reveló las dos bandas esperadas de 55 y 14 kDa y se procedió a realizar una cuantificación relativa de las bandas por densitometría. Los resultados revelaron que el tratamiento con RA antisentido afectó la proporción existente entre la cantidad de subunidad grande y subunidad pequeña de Ru (figura 4). La relación molar normal de éstas subunidades es de 4:1 (W.T. y k), debido los valores de la masa molar de Ru LS, que es de 53 kilodaltones (kDa), mientras que la de SS es de 14 kDa. Ésta proporción se mantuvo como se esperaba en los dos controles (SS/LS aproximadamente igual a 0.25); sin embargo se presentó aumentada en los lotes de plantas transgénicas 12, 15, y 16, mientras que en las plantas que expresan RA en cantidad mediana (21) y en las que sobreexpresan RA (22 y 24) no se observaron cambios significativos con respecto a los controles. Los datos muestran el promedio de tres réplicas y el error estándar (figura 4). Es interesante hacer notar que en las plantas transgénicas con bajo contenido de RA, el aumento en la relación SS/LS es debido a un aumento

importante en la expresión de la subunidad SS y no a la disminución de LS.

Contenido de proteína total en las plantas antisentido para RA y controles.

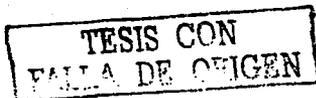
Por otra parte, se determinó la cantidad de proteína extraída expresada en mg por gramo de tejido fresco de cada lote de plantas, para determinar si había cambios importantes en la cantidad de proteína total en las plantas antisentido para RA. Se utilizó el método de Bradford.

Lotes.							
Grupo I.			Grupo II.			Controles.	
12	15	16	21	22	24	W. T.	k ^r
(µg de proteína total/mg de peso fresco).							
130	128.37	142.23	50	54.32	43.22	30.15	43.89
$\sigma = 1.8$	$\sigma = 2.81$	$\sigma = 2.44$	$\sigma = 1.19$	$\sigma = 0.93$	$\sigma = 0.45$	$\sigma = 1.7$	$\sigma = 1.84$

Tabla 1. Cuantificación de la proteína total obtenida en los distintos lotes de plantas antisentido (12, 15, 16, 21, 22 y 24) y controles (W.T. y k^r) expresados como µg de proteína total/mg de peso fresco.

Como puede observarse en la figura 5, las plantas que expresan bajo contenido de RA (lotes 12, 15 y 16) tienen significativamente aumentada la cantidad total de proteína ($p < 0.4$), mientras que las plantas del grupo II que expresan medianamente o sobreexpresan RA muestran niveles semejantes a los controles en contenido de proteína total.

Fotosíntesis.



La fotosíntesis se midió in vivo utilizando un aparato CID mediante la técnica IRGA (Infrared Ray Gas Analyzer). Las plantas de los diferentes lotes se obtuvieron de la forma mencionada anteriormente y fueron sometidas al mismo tratamiento térmico que se indicó. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

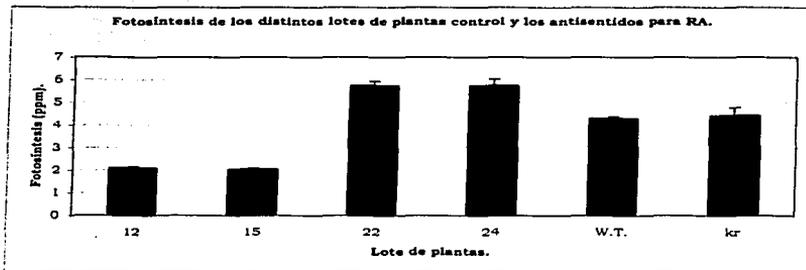


Figura 5. Valores de la fotosíntesis de las plantas antisentido para RA y las plantas control. La fotosíntesis se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 28 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos antes a la intensidad de luz de la medición (15 000 luxes). La fotosíntesis de las plantas que expresan menor cantidad de RA (12 y 15) es de aproximadamente la mitad de la de las plantas control. En cambio, las plantas que sobreexpresan RA presentan una fotosíntesis, aproximadamente, 40% mayor a la de los lotes control.

Efecto del tratamiento térmico en las plantas.

Para continuar el experimento se decidió realizar una prueba preliminar de tratamiento térmico, exponiendo un lote de plantas control y otro de plantas antisentido (15) a una temperatura de 35°C durante una hora, hora y media y dos horas. Los resultados mostraron que con hora y media de exposición se mostraban pocos cambios en el contenido de RA, sin

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

embargo las plantas resistieron bien hasta dos horas de estrés, por lo cual se determinó que los lotes de plantas se expondrían dos horas a 35°C, ya que de esta forma aseguramos ver claramente el efecto que el estrés térmico tendría en las plantas.

Las plantas de los lotes homocigóticos antisentido y las plantas controles se dejaron crecer a 25°C con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 16X8 hasta que cumplieron 28 días de haber sido sembrados. Ese día se sometieron a un tratamiento térmico de 2 horas a 35°C en presencia de luz. Se dejaron en recuperación hasta los 3 días siguientes. Las muestras se tomaron antes de realizar el tratamiento térmico (**stt**), inmediatamente después del tratamiento térmico (**2 htt**), un día después (**1 dr**) y tres días después (**3 dr**) del tratamiento térmico. A las muestras obtenidas se les extrajo la proteína total, la cual se cuantificó utilizando el método de Bradford. Las muestras se congelaron a -70°C hasta su utilización.

La proteína total de los extractos de cada lote fue separada mediante electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida al 10% el cual se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que se reveló contra ambas subunidades de Rubisco y contra RA. Para cada gel se cargaron dos lotes de plantas con el extracto antes del tratamiento térmico, después del tratamiento térmico, un día después del tratamiento térmico y tres días después del tratamiento térmico (figura 7).

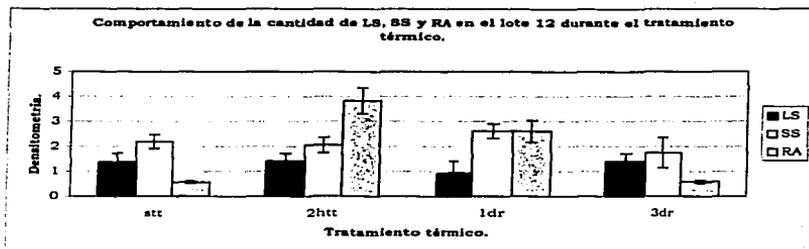


Figura 6. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote 12 resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote 12 de plantas mostró que la cantidad de ambas subunidades de Rubisco permanecen prácticamente sin cambio durante el tratamiento térmico y la recuperación. En cambio, RA aumenta significativamente en cantidad al final del tratamiento térmico para descender paulatinamente durante el periodo de recuperación y alcanzar prácticamente su valor original a los tres días de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

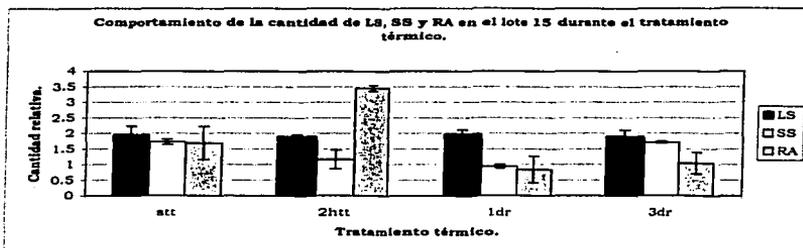


Figura 7. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote 15 resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote 15 de plantas mostró que la cantidad de subunidad grande de Rubisco permanece prácticamente sin cambio durante el tratamiento térmico y la recuperación, la subunidad pequeña de Rubisco disminuye durante el tratamiento térmico y prácticamente recupera su cantidad original al tercer día de recuperación. En cambio, RA aumenta significativamente en cantidad al final del tratamiento térmico para descender paulatinamente durante el periodo de recuperación y alcanzar prácticamente su valor original a los tres días de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

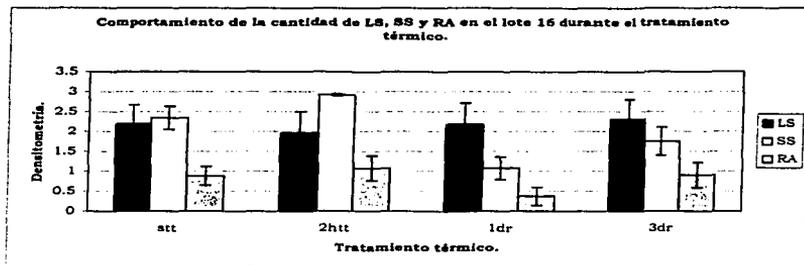


Figura 8. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote 16 resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote 16 de plantas mostró que la cantidad de subunidad grande de Rubisco permanece prácticamente sin cambio durante el tratamiento térmico y la recuperación, la subunidad pequeña de Rubisco aumenta después del tratamiento térmico y disminuye después de un día de recuperación para aumentar hasta casi su valor original a los tres días de recuperación. RA por su parte se comporta en forma semejante a la subunidad pequeña de Rubisco.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

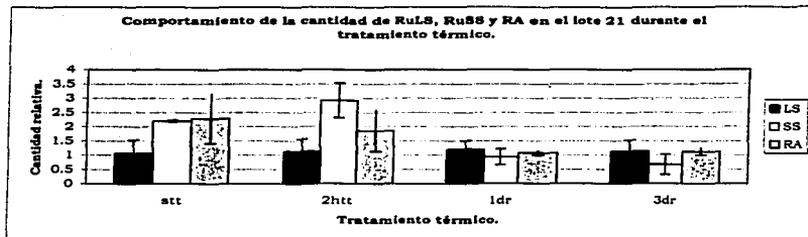


Figura 9. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote 21 resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote 21 de plantas mostró que la cantidad de subunidad grande de Rubisco se mantiene durante el estrés y la recuperación. La cantidad de la subunidad pequeña de Rubisco aumenta significativamente después del tratamiento térmico y desciende durante el periodo de recuperación hasta alcanzar una cantidad mucho menor a la inicial al final del tercer día de recuperación. En cambio, RA disminuye paulatinamente en cantidad durante el tratamiento.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

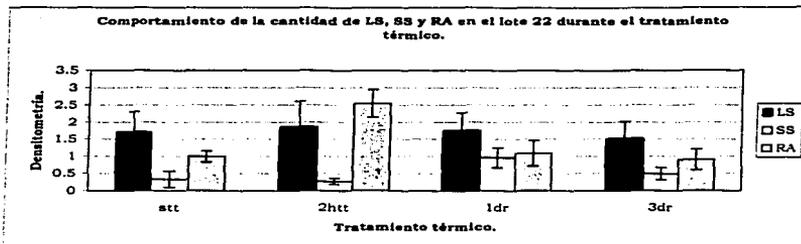


Figura 10. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote 22 resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote 22 de plantas mostró que la cantidad de subunidad grande de Rubisco permanece prácticamente sin cambio durante el tratamiento térmico y la recuperación; la subunidad pequeña de Rubisco aumenta en cantidad después de un día de recuperación y disminuye al tercer día de recuperación. En cambio, RA aumenta significativamente en cantidad al final del tratamiento térmico para descender paulatinamente durante el período de recuperación y alcanzar prácticamente su valor original a los tres días de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

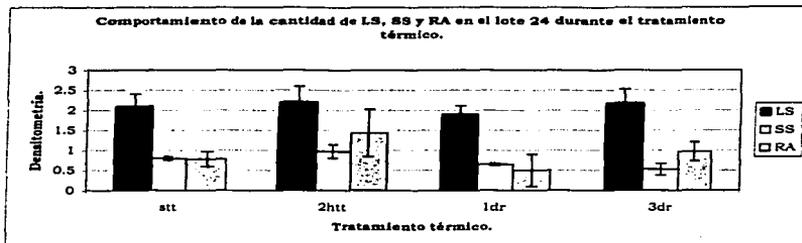


Figura 11. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote 24 resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote 24 de plantas mostró que la cantidad de ambas subunidades de Rubisco permanecen prácticamente sin cambio durante el tratamiento térmico y la recuperación. En cambio, RA aumenta cantidad al final del tratamiento térmico para descender después del primer día de recuperación y mantener prácticamente su valor original a los tres días de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

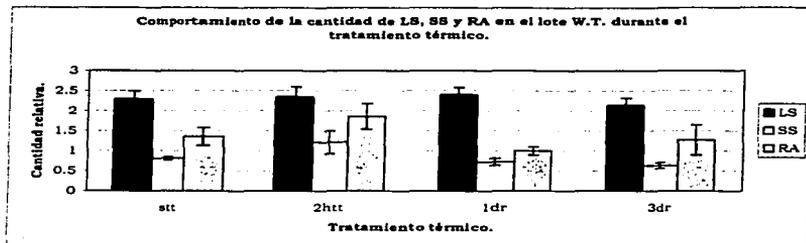


Figura 12. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote WT, resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote WT, de plantas mostró que la cantidad de las subunidades grande y pequeña de Rubisco permanecen prácticamente sin cambio significativo durante el tratamiento térmico y la recuperación. En cambio, RA aumenta ligeramente en cantidad al final del tratamiento térmico para descender paulatinamente durante el periodo de recuperación y alcanzar un valor cercano al original a los tres días de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

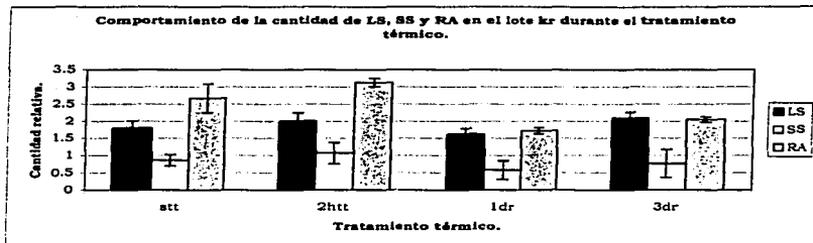


Figura 13. Densitometría de las bandas de Rubisco (LS y SS) y de RA del lote k^r resultadas en geles de poliacrilamida al 10% y reveladas por Western-blot con anticuerpos de conejo contra ambas subunidades de Rubisco (dilución 1:4 000) y RA (dilución 1:3 500) respectivamente. Los valores son promedio de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. El tratamiento térmico aplicado al lote k^r de plantas mostró que la cantidad de las subunidades grande y pequeña de Rubisco permanecen prácticamente sin cambio durante el tratamiento térmico y la recuperación. En cambio, RA aumenta ligeramente en cantidad al final del tratamiento térmico, desciende después del primer día de la recuperación hasta valores cercanos al inicial, siguiendo un patrón muy similar al de las plantas WT.

Fotosíntesis durante el tratamiento térmico.

Para realizar las mediciones de fotosíntesis se sembraron 60 semillas de cada lote de planta por caja petri y se incubaron por 28 días en las mismas condiciones que los lotes que se sembraron para el análisis de proteína. La fotosíntesis se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas, para lo cual se aclimataron 15 minutos a la intensidad de luz de la medición (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar la medición. A los 28 días se les

aplicó el tratamiento térmico anteriormente mencionado, midiéndose la fotosíntesis al término del tratamiento. Las plantas se dejaron reposar y se realizó la medición de la fotosíntesis el día y los tres días posteriores al tratamiento.

Los resultados muestran que la cantidad de RA afecta a la fotosíntesis, ya que las plantas con menor cantidad de RA tienen una fotosíntesis de aproximadamente la mitad de la de las plantas WT. Y las plantas con mayor cantidad de RA poseen una fotosíntesis mayor que las WT. (ver figura 6). En cuanto al estrés térmico, a continuación se presenta el efecto causado en la velocidad fotosintética de cada uno de los lotes de plantas analizados. Se representa el promedio de tres réplicas en cada caso.

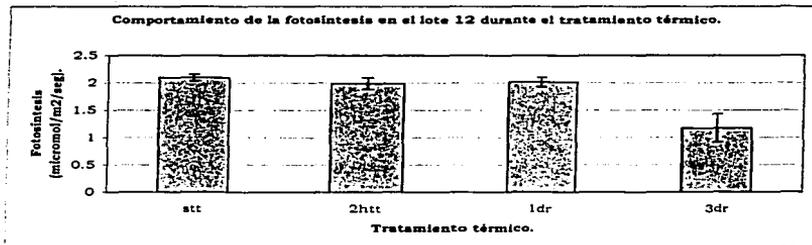


Figura 14. La fotosíntesis del lote 12 (grupo I) se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos a la intensidad de la luz del experimento (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar el procedimiento. Las plantas se sometieron al estrés térmico mencionado anteriormente, tomándose los niveles de fotosíntesis antes y después del estrés, un día y tres días de dicho tratamiento. Los resultados muestran que la fotosíntesis se mantiene constante durante el tratamiento térmico y

el primer día de recuperación, pero disminuye al tercer día de recuperación.

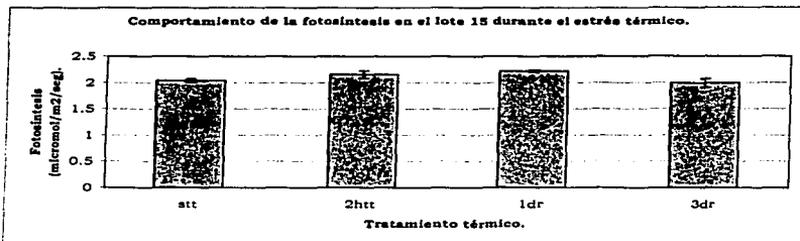


Figura 15. La fotosíntesis del lote 15 (grupo I) se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos a la intensidad de la luz del experimento (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar el procedimiento. Las plantas se sometieron al estrés térmico mencionado anteriormente, tomándose los niveles de fotosíntesis en los mismos periodos. Los resultados muestran que la fotosíntesis se mantiene prácticamente constante durante el tratamiento térmico y la recuperación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

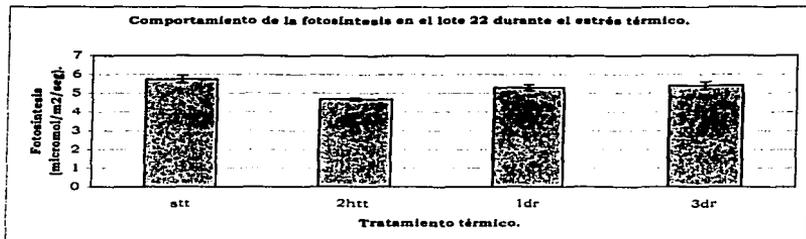


Figura 16. La fotosíntesis del lote 22 (grupo II) se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos a la intensidad de la luz del experimento (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar el procedimiento. Las plantas se sometieron al estrés térmico mencionado anteriormente, tomándose los niveles de fotosíntesis en los mismos periodos. Los resultados muestran que la fotosíntesis disminuye significativamente después del tratamiento térmico y después aumenta recuperando prácticamente su valor inicial al tercer día de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

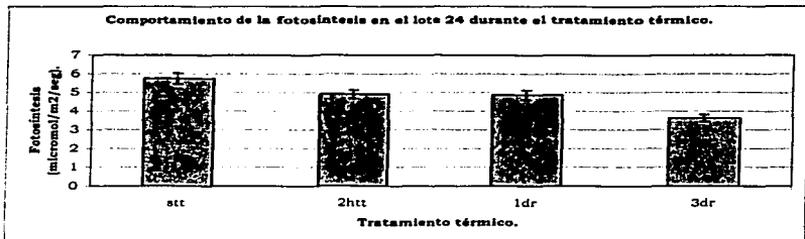


Figura 17. La fotosíntesis del lote 24 (grupo II) se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos a la intensidad de la luz del experimento (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar el procedimiento. Las plantas se sometieron al estrés térmico mencionado anteriormente, tomándose los niveles de fotosíntesis en los mismos periodos. Los resultados muestran que la fotosíntesis disminuye con el tratamiento térmico como en el caso anterior, sin embargo no logra recuperarse, ya que al tercer día tiene valores muy por debajo del control antes del estrés.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

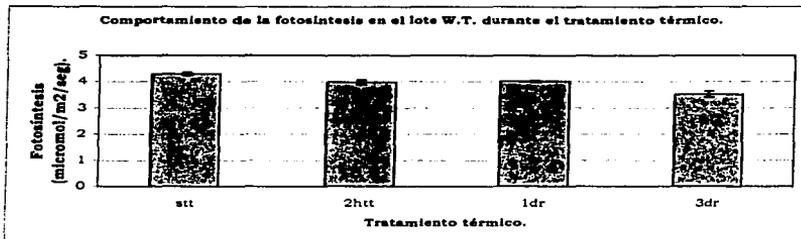


Figura 18. La fotosíntesis del lote WT. se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos a la intensidad de la luz del experimento (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar el procedimiento. Las plantas se sometieron al estrés térmico mencionado anteriormente, tomándose los niveles de fotosíntesis en los mismos periodos. Los resultados muestran que la fotosíntesis disminuye ligeramente con el tratamiento térmico y el primer día de recuperación, y disminuye en forma más pronunciada al tercer día de recuperación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

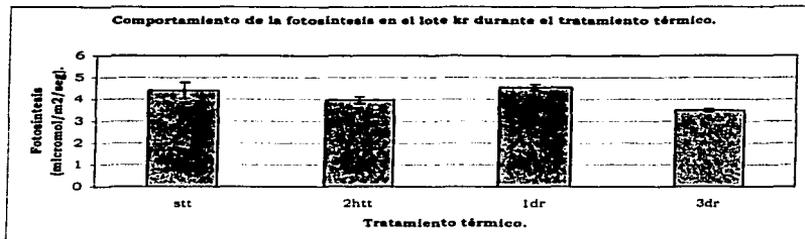


Figura 19. La fotosíntesis del lote k^r se midió in vivo mediante un aparato IRGA cuando las plantas cumplieron 27 días de haber sido sembradas. Las plantas se aclimataron 15 minutos a la intensidad de la luz del experimento (15 000 luxes) 15 minutos antes de realizar el procedimiento. Las plantas se sometieron al estrés térmico mencionado anteriormente, tomándose los niveles de fotosíntesis en los mismos periodos. Los resultados muestran que la fotosíntesis se mantiene constante durante el tratamiento térmico y el primer día de recuperación y disminuye al tercer día de recuperación, en forma similar al lote WT.

Los resultados muestran que el comportamiento de la velocidad fotosintética de las plantas del grupo control (WT. Y k^r) tiene un patrón muy semejante, además, ambas tienen un valor de fotosíntesis de alrededor de 4 µmol/m²/seg. En cambio, los lotes del grupo II (22 y 24) que tienen mayor cantidad de RA que los grupos control, inician con una velocidad fotosintética de alrededor de 6 µmol/m²/seg y solo el lote 24 disminuye su actividad fotosintética al final, alcanzando una velocidad fotosintética de alrededor de 4, igual que el valor de inicio de los lotes control. Por último, las plantas de los lotes del grupo I (12 y 15), que tienen menor cantidad de RA que los lotes control, inician con una velocidad fotosintética de aproximadamente la mitad del valor de la de las

plantas control y presentan dos comportamientos distintos: el grupo 12, que posee mayor cantidad de RA que la 15, presenta una tendencia similar a los controles, mientras que el grupo 15, el que tiene menor cantidad de RA, presenta una tendencia a incrementar su velocidad fotosintética, pero no logra sostenerla y regresa, al final del periodo de recuperación, a los valores originales de velocidad fotosintética.

Proteína total durante el tratamiento térmico.

Lotes								
	Grupo I			Grupo II			Controles	
Lote/ Estrés	12 µg de proteína total/mg de peso fresco.	15 µg de proteína total/mg de peso fresco.	16 µg de proteína total/mg de peso fresco.	21 µg de proteína total/mg de peso fresco.	22 µg de proteína total/mg de peso fresco.	24 µg de proteína total/mg de peso fresco.	W.T. µg de proteína total/mg de peso fresco.	k ^r µg de proteína total/mg de peso fresco.
stt	130 σ = 1.8	128.37 σ = 2.81	142.23 σ = 2.44	50 σ = 1.19	54.32 σ = 0.93	43.22 σ = 0.45	30.15 σ = 1.7	43.89 σ = 1.84
2 hrt	143.37 σ = 0.77	150.02 σ = 1.68	125 σ = 0.55	35.45 σ = 0.7	60.51 σ = 1.41	20.71 σ = 0.53	26.65 σ = 2.15	55.26 σ = 0.35
1 dr	189.56 σ = 0.77	174.25 σ = 0.65	160.34 σ = 1.56	59.32 σ = 0.46	45.71 σ = 1.23	51.63 σ = 0.77	50.98 σ = 0.68	70.20 σ = 1
3 dr	216.2 σ = 0.4	198.99 σ = 1.33	182.56 σ = 0.53	69.89 σ = 1.15	88.77 σ = 0.4	22.92 σ = 1.99	34.34 σ = 1.16	38.85 σ = 0.5

Tabla 2. Cuantificación de la proteína total obtenida en los distintos lotes de plantas antisentido (12, 15, 16, 21, 22 y 24) y controles (WT. y k^r) expresados como µg de proteína total/mg de peso fresco.

Durante el estrés térmico la proteína total de los controles (WT. y k^r) muestran un cambio pequeño después del estrés térmico, con tendencia a

aumentar después de un día de recuperación, regresando a las cantidades normales tres días después del estrés (figura 21). Los lotes de plantas que contienen mayor cantidad de RA (grupo II: 21, 22 y 24) muestran dos comportamientos un tanto diferentes: el lote 24 inicia con una cantidad ligeramente menor que la de los otros dos lotes la cual disminuye al final del estrés térmico, en cambio, los lotes 21 y 22 inician con una cantidad muy parecida de proteína total y finalizan con un aumento de casi el doble. Por último, los lotes de plantas que contienen menos RA que los controles (grupo I: 12, 15 y 16) contienen, desde antes del estrés térmico, mucha mayor cantidad de proteína total que los controles y, además, esta aumenta significativamente en cantidad durante el proceso de recuperación del estrés térmico, la cual no regresa a sus niveles basales después de los tres días de recuperación.

Discusión de los resultados.

Las plantas obtenidas en éstos experimentos variaron en la cantidad de RA que expresaron. Un grupo de ellos (grupo II) la sobreexpresaron hasta 1.89 veces en cantidad con respecto al control WT. a pesar de ser plantas homocigotas antisentido para RA, otro grupo (grupo I) mostró una expresión mínima de RA (0.069% con respecto a WT.) (figuras 2 y 3), como era de esperarse para plantas antisentido de RA. Se ha reportado que las características de las plantas transgénicas dependen del sitio donde se inserte el gen antisentido (Eckard et. al., 1997), y por ello existen otros casos en que el fenómeno aquí indicado ha ocurrido en estos experimentos de plantas transgénicas. Las plantas obtenidas para los distintos tipos de antisentidos variaron en sus características fisiológicas: las plantas que sobreexpresaban RA (grupo II), los controles y el antisentido 21 (del grupo I y que producía 53% de RA con respecto a WT.) presentaron una coloración verde fuerte (muy parecida a WT.) mientras que los demás antisentidos del grupo I, con cantidad disminuida de RA, presentaban un verde más claro, ligeramente amarillento y brillante, que se ha relacionado con clorosis. Éstos resultados concuerdan con lo reportado por Eckardt et. al. (1997), quienes reportan que la expresión del antisentido de cDNA directo contra RA redujo efectivamente la concentración de RA en Arabidopsis, llegando a obtener plantas con cantidades indetectables de RA. Ellos obtuvieron tres tipos de plantas: uno severamente enano y clorótico que no podía dar semilla a concentraciones normales de CO₂, (por lo cual se tuvo que aumentar la concentración de CO₂ para obtener semilla), otro con por lo menos 20% de RA con relación a WT. capaz de producir semilla en condiciones normales y de coloración verde brillante y ligeramente enanas con respecto a WT. y una tercera, cuya cantidad de RA era muy parecida a la de WT. prácticamente sin síntomas de clorosis y que podía crecer y dar semilla en condiciones atmosféricas normales (Eckard et. al. 1997). Cabe

mencionar que todos los lotes de plantas utilizados en nuestro experimento produjeron semilla sin necesidad de aumentar la concentración de CO₂ y se recuperaron satisfactoriamente del tratamiento térmico después del periodo de recuperación, debido a que se encontraban en un medio que contenía sacarosa. Es importante notar que la cantidad de RA si influyó en el fenotipo de las plantas y en la velocidad de fotosíntesis, ya que las plantas que presentaron menor cantidad de RA presentaron síntomas de clorosis y baja velocidad fotosintética; sin embargo, su recuperación del estrés térmico fue igual al de los otros lotes de plantas, fenómeno que puede atribuirse a que la planta, al encontrarse en un medio que contenía sacarosa, contó con nutrientes suficientes para sintetizar RA de novo y cubrir la necesidad de esta durante el estrés térmico y la recuperación.

Mott et. al. (2000) proponen un modelo matemático para explicar la fotosíntesis el cual obtuvieron estudiando la relación existente entre el flujo de luz que recibe una planta, la cantidad de Rubisco y la cantidad de RA. Este modelo indica que el efecto de la cantidad de RA en la activación de Rubisco es una función hiperbólica. Fenómeno que podría explicar el por qué lotes de plantas con cantidades mínimas de RA (lotes 12, 15 y 16) puedan realizar la fotosíntesis de manera que puedan vivir y aún soportar un estrés térmico.

La proteína total presentó un aumento significativo en las plantas con la expresión de RA más disminuida (figura 5), lo cual puede interpretarse como una reacción compensatoria de las plantas transgénicas a los posibles daños causados por la falta de RA. Además, durante el estrés térmico la cantidad de proteína total aumentó en estas plantas en mayor proporción que los controles o las plantas con alto contenido de RA (figura 21). El aumento de proteína total se puede atribuir al aumento de RA y al

de otras proteínas que actúan ante el estrés térmico (figuras 7 a 14) como Groel (Sánchez de Jiménez et. al. 1995).

En términos generales la subunidad pequeña de Rubisco aumentó en cantidad en las plantas con RA disminuida (lotes 12, 16 y 21) (figuras 4 y 7 a 14). Es posible que este fenómeno sea un mecanismo que posee la planta para reducir las dificultades que le produce tener un déficit de RA. Cabe mencionar que ambos polipéptidos se codifican en el núcleo, a diferencia del péptido mayor de Rubisco que se codifica en el cloroplasto, lo cual haría pensar que el tratamiento para obtener el antisentido afectó también la expresión de la subunidad pequeña de Rubisco. La cantidad de RA aumentó justo después del tratamiento térmico en las plantas que expresan menor cantidad de RA (figuras 7, 8 y 9). Este fenómeno ya se había reportado antes por Sánchez de Jiménez et. al. (1995) quienes reportan que la cantidad de RA aumenta durante un shock térmico en hojas de maíz, en concordancia con otras chaperonas moleculares que aumentan en concentración después de un shock térmico. Con un estrés térmico a 45°C aplicado durante cuatro horas a las hojas de maíz se observa un aumento en la banda de RA de 43 kDa, con su consecuente disminución a lo largo de su recuperación (Sánchez de Jiménez et. al. 1995), (Crafts-Brandner et. al., 2002).

Es interesante notar que tanto SS de Rubisco como RA se codifican en el genoma nuclear mientras que LS es una proteína codificada en el genoma del cloroplasto. Ambas muestran movimientos en su contenido a lo largo del estrés térmico y del periodo de recuperación, no así la subunidad grande de Rubisco (figuras 7 a 14). Tal vez el hecho de que RA y la subunidad pequeña de Rubisco se codifiquen en el núcleo tenga relación con este fenómeno.

ESTA TESIS NO SALE
DEL INSTITUTO

La actividad de Rubisco aumenta durante el estrés térmico y luego regresa a su nivel original (figuras 15 a 20), aunque no se presentan cambios en la cantidad de Rubisco entre los distintos lotes de plantas ni a lo largo del tratamiento térmico (figuras 7 a 14). Esto concuerda con la hipótesis de que RA es chaperona molecular de Rubisco la cual es una proteína que se encuentra en grandes cantidades en las hojas pero no toda se encuentra en forma activa. La forma activa de Rubisco depende de la cantidad de RA que, al ser su chaperona molecular, la activa. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Sánchez de Jiménez et. al (1995) y Eckard (1997) y con los aquí presentados ya que la cantidad de Rubisco en las hojas de las plantas en estudio permanece prácticamente constante durante todo el estrés térmico, mientras que la de RA varía.

En cuanto a la fotosíntesis, existe una clara correlación entre la cantidad de RA y la capacidad fotosintética de las plantas: las plantas con menor cantidad de RA (lotes 12, 15 y 16) presentan una fotosíntesis de aproximadamente la mitad de la de las plantas control, y las plantas que sobreexpresan RA presentan una fotosíntesis mayor que la de las control (figura 6). El mismo fenómeno fue reportado por Eckard et. al. (1997) al informar que la fotosíntesis se redujo significativamente en el clon R-100 que ellos obtuvieron y que contenía entre 30 y 40% de RA con respecto a WT., efecto que se hace más pronunciado a la elevada intensidad lumínica, por lo que atribuyen la reducción en la fotosíntesis a la disminución del contenido de RA.

Es importante hacer notar que la fotosíntesis de todos los lotes de plantas no fue afectada de manera drástica por el tratamiento térmico (figuras 15 a 20) mientras que la cantidad de RA aumentó justo después del tratamiento térmico (figuras 7 a 14). Es muy probable que este aumento esté relacionado con la función de RA de mantener la actividad de Rubisco la cual puede sufrir alteraciones durante el estrés térmico, o de otras

proteínas vitales para las plantas que requieran que exista mayor actividad de RA, por lo cual la planta se ve en la necesidad de sintetizar RA.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de proteína durante y después del tratamiento térmico muestran que los grupos II y control tienen un decremento en la cantidad de proteínas justo después del estrés térmico, la cual después aumenta y reestablece su contenido normal a los tres días de recuperación del estrés. En cambio, el grupo I, cuyo contenido de RA es menor al de los grupos control mantiene la cantidad de proteína durante el estrés térmico y aumenta esta al tercer día de recuperación. Este fenómeno hace suponer que RA puede actuar como chaperona de otras proteínas, ya que éstas no se pierden durante el estrés térmico y además aumentan al final del mismo.

Por su parte, Morales y colaboradores (1999) reportan que poblaciones de maíz genéticamente semejantes por que provienen de la misma población pero que han sido seleccionadas para mayor productividad, tiene mayor cantidad de RA en las hojas bandera durante el llenado de grano y presentan también mayor tara fotosintética, lo cual también concuerda y refuerza los resultados obtenidos ya que a mayor cantidad de RA se da mayor fotosíntesis, lo que implica mayor aporte de fotosintatos al llenado de grano en la mazorca.

Conclusiones.

Las plantas antisentido 12, 15 y 16, que muestran fuerte disminución en la expresión de RA, presentan aumentos importantes de proteína total (60.12% de aumento para el lote 12, 64.51% en el lote 15 y 77.90% en el lote 16) y de la subunidad pequeña de Rubisco en las hojas, como si fuese una forma de compensar la disminución de RA en las hojas.

La cantidad de RA en las plantas está relacionada con la fotosíntesis que son capaces de realizar, ya que a mayor cantidad de RA mayor fotosíntesis. El grupo I (12, 15 y 16) de bajo contenido de RA mostró una velocidad fotosintética disminuida significativamente (figura 6) (50% de disminución para el lote 12 y 47.61% para el lote 15), mientras que las plantas del grupo II (22 y 24) mostraron un incremento importante de RA y también de la velocidad inicial de fotosíntesis (figura 6) (38.09% de aumento en los lotes 22 y 24), en comparación con el grupo de plantas control.

El estrés térmico también afecta en forma diferencial al grupo de plantas disminuidas en su contenido de RA comparativamente con las que la sobreexpresaron ó con los controles. Esto es, el aumento de RA durante el tratamiento térmico en las plantas con menor cantidad de la misma fue mucho mayor que en las plantas que la sobreexpresan o que contienen cantidades normales de RA.

A pesar de la baja cantidad de RA en las plantas del grupo I, estas se recuperaron del estrés térmico en la misma forma que los otros grupos de plantas ya que prácticamente su clorosis no aumentó de manera significativa después del tratamiento térmico, regresaron a la cantidad de RA basal después del mismo y la velocidad de fotosíntesis no se afectó durante o después del tratamiento térmico, aunque el aumento en la cantidad de rubisco activasa solo permitió mantener la velocidad normal

de fotosíntesis, la cual de por sí ya se encontraba disminuída. Esto puede atribuirse al aporte de nutrientes, en especial de sacarosa, que proporcionó el medio MS, lo cual permitió la síntesis de novo de RA durante el estrés térmico, con lo cual se pudo suplir de la cantidad de RA necesaria para que Rubisco continuara funcionando de manera normal..

La cantidad de proteína total disminuye, en los lotes II y control, después del tratamiento térmico, y después regresan a su nivel basal. En el grupo I, la cantidad de proteína no disminuye durante el tratamiento térmico y aumenta al final del periodo de recuperación. Es posible que durante el estrés térmico y la recuperación RA esté actuando como chaperona, junto con otras proteínas como GROEL, manteniendo la estructura y función de varias proteínas, además de la ya observada en Rubisco. Esto indica que el tratamiento térmico afectó el metabolismo de las plantas depletadas de rubisco activasa, por lo cual tuvo que mantener mayor cantidad de proteína total después del tratamiento, a diferencia de los otros dos grupos de plantas.

Estos resultados fortalecen la teoría de que RA actúa como chaperona molecular de Rubisco.

Bibliografía.

- 1. Andreo, Carlos S. y Vallejos, Rubén H.** (1984). Fotosíntesis. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. p.p.: 1, 2, 5-21, 29, 39-53, 56. ISBN: 0827020732.
- 2. Andrews T., Hudson G., Mate C., Von Caemmerer S., Evans J. And Avridsson Y.** (1996). Rubisco, the consequence of altering its expression and activation in transgenic plants. *Journal of Exp. Botany* **46**: 1239-1300.
- 3. Berry J. A., Björkman O.** (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **31**: 491-543.
- 4. Bowman John** (editor). (1994) *Arabidopsis. An atlas of morphology and development.* Spriger-Verlag. New York, p.p.: 298-363. ISBN: 3540940898.
- 5. Brown R H.** (1978). A difference in the N use efficiency in C3 and C4 plants and its implications in adaptation and evolution. *Crop Science* **18**: 93-98.
- 6. Crafts-Brandner Steven J. And Salvucci Michael E.** (2002). Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiology.* **129**: 1773-1780.
- 7. Crosbie T. M., Pearse R. P., Moch J. J.** (1981). Selection for high CO₂ inbred lines of maize. *Crop Science* **21**: 629-631.

- 8. Chapman, M. S., Suh, S. W., Carmi, P. M. G., Cascia, D., Smith, W. W., y Eisenberg, D. S.** (1988). Tertiary structure of plant Rubisco: domains and their contacts. *Science* **241**: 71-74.
- 9. Dennis David T. and Turpin David H.** (1990). *Plant physiology biochemistry and molecular biology*. Longman Scientific and Technical.. ISBN: 0-582-46052-2 CSD.
- 10. Eckardt N. Gordon W., Archie R. Portis Jr., William L.** (1997). Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced ribulosa-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase content. *Plant Physiology* **113**: 575-586.
- 11. Ellis R. J.** (1993). The general concept of molecular chaperones. *Philos. Trans. R. Soc. Londres. B* **339**. **1289**: 257-261.
- 12. Ellis R. and Van der Vies S.** (1991). Molecular chaperones. *Annual Review Biochemistry* **60**: 321-347.
- 13. Feller U, Crafts-Brandner S. and Salcucci Michael E.** (1998). Moderately high temperatures inhibit Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase-mediated activation of Rubisco. *Plant Physiology* **116**: 539-546.
- 14. Gatenby A. A., y Ellis R. J.** (1990). Chaperone function; the assembly of ribulose biphosphate carboxylase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **168**: 227-231.
- 15. Hemmingsen S. M., Woolford C., van der Vies S. M., Tilly K., Dennis D. T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W. y Ellis R. J.** (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**: 330-334.

- 16. Hiat, A.** (1993). Transgenic plants: Fundamentals and applications. Marcel Deker. N.Y. (U.S.A.). p.p.: 116-328. ISBN: 0824787668.
- 17. Jordan D. B., y Ogren W. L.** (1984). The CO₂ especificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxilase/oxigenase dependence on ribulose biphosphate concentration, pH and temperature. *Planta* **161**: 308-313.
- 18. Larson Eric M., O'Brien Carolyn M., Zhu Genhai, Spreitzer Robert J. and Portis Archie R. Jr.** (1997). Specificity for activase is changed by a Pro-89 to Arg substitution in the large subunit of Ribulose-1,5-biphosphate carboxilase/oxigenase. *The journal of biological chemistry*. **27**: 17033-17037.
- 19. Lehninger Albert L., Nelson David L., Cox Michael M.** (1993) Principles of Biochemistry. Segunda edición. Editorial Worth Publishers. U.S.A. p.p.: ISBN: 1572599316.
- 20. Lilley R. M., Portis A. R. Jr.** (1997). ATP hydrolysis activity and polymerization state of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase activase: Do the effects of Mg²⁺, K⁺ and activase concentrations indicate a functional similarity to actin? *Plant Physiology* **114**: **605-613**.
- 21. Long S. P.** (1999). Environmental responses. En: Sage R. F., Monson R. K., eds. C4 plant biology. San Diego. Academic Press. 215-249.
- 22. Morales A., Ortega-Delgado M., Molina-Galán J., and Sánchez de Jiménez E.** (1999). Importance of Rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedure. *Journal of Experimental Botany* **50**: 823-829.

- 23. Mott Keith A. and Woodrow Ian E.** (2000). Modelling the role of Rubisco activase in limiting non-steady-state photosynthesis. *Journal of experimental botany*. **51**: 399-406.
- 24. Murashige T., Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. **15**: 473-497.
- 25. Newland A. F.** (1999). AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**: 27-43.
- 26. Parkinson A. L.** (1997) Biopesticides and transgenic plants. New technologies to improve efficacy, safety and profitability. *International Business Communications*. South Borough, M. A. (U.S.A.). p.p.: 5.3.1, 5.3.2.
- 27. Robinson S., y Portis A. R. Jr.** (1989). Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**: 93-99.
- 28. Rothman E. J. y Kornberg R. D.** (1989). Polypeptide chain binding proteins: catalyst of protein folding and related processes in cells. *Cell* **59**: 591-601.
- 29. Sage R. F., Pearcy R. W., Seemann Jr.** (1987). The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album* L. and *Amaranthus retroflexus* L. *Plant Physiology* **85**: 355-359.
- 30. Saibil H. R., Zheng D., Roseman A. M., Hunter A. S., Watson G. M. F., Chen S., auf der Mauer A., O'Hara B. P., Wood S. P., Mann N. H., Barnett L. K. y Ellis R. J.** (1993). ATP induces large quaternary

rearrangements in a cage-like chaperonin structure. *Curr. Biol.* **3**: 265-273.

31. Salvucci, Michael E. and Ogren, William L. (1996). The mechanism of Rubisco activase: Insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research* **47**: 1-11.

32. Salvucci Michael E., Osteryoung Catherine W., Crafts-Brandner Steven J., and Vierling Elizabeth. (2001). Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo. *Plant Physiology*. **127**: 1053-1064.

33. Salvucci Michael E., Portis A. R. Jr. y Ogren W. L. (1985). A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo. *Photosynth. Res.* **7**: 193-201.

34. Salvucci Michael E., Portis A. R., Ogren W. L., y Portis A. R. Jr. (1987). Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiology* **84**: 930-936.

35. Sánchez de Jiménez E., Medrano L., and Martínez -Barajas E. (1995). Rubisco activase, a posible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry* **34**: 2826-2831.

36. Spreitzer Robert J., Salvucci Michael E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions and possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology*. **53**: 449-475.

37. Wang Z. Y., Ramage R. T., Portis A. R. Jr. (1993). Mg^{2+} and ATP or adenosine 5'-[γ -thio]-triphosphate (ATP γ S) enhances intrinsic fluorescence and induces aggregation which increases the activity of spinach Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* **1202**: 47-55.

38. Weier T. Elliot, Stocking C. Ralph, Barbour Michael G. (1974). Botany. An introduction to plant biology. Editorial John Wiley and Sons. Quinta edición. Estados Unidos de Norteamérica. p.p.: 115-134. ISBN: 0471924687.

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