

00528
56



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGIA PARA LA
MEDICION SEMI-CUANTITATIVA DE UN PEPTIDO DE MAIZ.
SEMEJANTE A LA INSULINA (Zm.IGF), QUE PERMITA
RELACIONARLO CON LA PRODUCTIVIDAD DE LA PLANTA
DEL MAIZ".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GUSTAVO LOZANO VAZQUEZ



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES 2003
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

P R O F E S O R E S

Presidente: **ESTELA SANCHEZ QUINTANAR**

Vocal: **MA. DEL CARMEN PARRA GONZALEZ**

Secretario: **MARINA GAVILANES RUIZ**

1er. Suplente: **MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ**

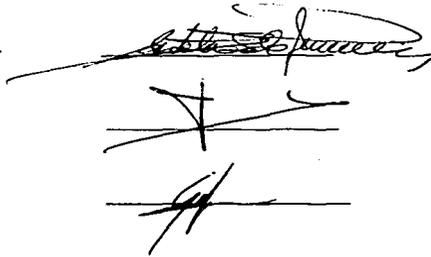
2do Suplente: **ALFREDO SALAZAR ZAZUETA**

Sitio donde se desarrolló el tema:
Facultad de Química, UNAM, Edificio "E", Departamento de Bioquímica, Laboratorio 103.

Asesor del tema: Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Supervisor Técnico: M. en C. Raúl Aguilar C.

Sustentante: Lozano Vázquez Gustavo.



The image shows three handwritten signatures, each written over a horizontal line. The top signature is the most elaborate, followed by a simpler one in the middle, and a third one at the bottom.

AGRADECIMIENTOS:

- **A Dios:** Por todo.
- **A mis padres Gabino y Lydia:**

Por que siempre se han preocupado por sus hijos, dando absolutamente todo por ellos, respetando nuestra individualidad y a la vez, promoviendo las condiciones equitativas para cada uno de nosotros.

- **A mis hermanos Sandra, Alberto y César:**

Que me han compartido su experiencia y han permiten la retroalimentación día con día.

- **A mis amigos:**

- De la Facultad de Química: Grupo 15 y camaradas anexos.

- De "la carrera". Principalmente a Isela y a Rocío, que me apoyaron fraternalmente y académicamente en momentos críticos de la carrera.

- Del Movimiento Estudiantil 1999-2000, proceso muy difícil y crítico en nuestra institución.

- Del proyecto -Brigada Multidisciplinaria de Trabajo Comunitario- "Mady Zhe Yoc".

- Del Proyecto: "EL café de tod@s".

- **A nuestra Universidad Nacional Autónoma de México,** factor determinante de mi compromiso productivo hacia mi persona, mis cercanos y a la sociedad.

Contenido:

I.- RESUMEN.	1
II.- INTRODUCCIÓN.	2
III.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS:	5
> Técnicas de fitomejoramiento en la planta de maíz.	5
• Selección masal tradicional.	5
• Selección masal visual estratificada.	5
> La semilla, su importancia y desarrollo.	8
• Estructura y funciones.	9
> El proceso de germinación.	11
• Algunos aspectos bioquímicos de la germinación.	12
> Fotosintatos.	20
> Transporte en el floema.	21
> Fisiología en el grano de maíz.	24
> Características biológicas del fruto del maíz.	26
IV.- OBJETIVOS.	27
V.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	29
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.	30
• Material Biológico.	30
A) Influencia de la insulina en el llenado del grano.	30
• Preparación de las muestras.	32
B) Establecimiento de las condiciones adecuadas para medir la concentración de Zm-IGF por dot-blot.	34
• Obtención de ejes embrionarios	34
• Obtención del extracto crudo.	34
• Método de Bradford.	35
• Identificación del péptido, mediante la técnica dot-blot.	36
• Diseño y elaboración de la curva patrón con insulina bovina (IB).	39
VII.- RESULTADOS.	40
1. Influencia de la insulina con respecto al aumento en peso del grano.	40
2. Establecimiento de las condiciones adecuadas en la técnica de	

dot-blot, para la cuantificación del péptido Zm-IGF en muestras de maíz Zacatecas 58.	44
3. Cuantificación del péptido Zm-IGF en dos ciclos de selección masal visual estratificada.	47
4. Distribución de las poblaciones Z ₀ y Z ₁₇ con respecto a su contenido de Zm-IGF.	51
VIII-DISCUSIÓN.	54
IX.- CONCLUSIONES.	60
BIBLIOGRAFÍA.	61
APÉNDICE.	66

I. RESUMEN.

Se estima que a mediados del siglo XXI, en nuestro país no se incrementará la producción de maíz y no aumentará el tamaño de las importaciones, sin embargo, sí aumentará su demanda; lo cual traerá como consecuencia una deficiencia en la cantidad de este producto con respecto a las necesidades de nuestra población. Este trabajo forma parte de un proyecto global que pueda contribuir a incrementar la eficiencia en la producción del maíz, por lo que nuestro objetivo es proponer una herramienta complementaria a la selección tradicional de semillas para el incremento de la productividad, mediante la medición semi-cuantitativa del péptido *Zea mays* Insulin-like Growth Factor (Zm-IGF).

Se tiene como antecedente que existe una correlación positiva en la selección masal del maíz con base en el contenido de la proteína rubisco activasa (RA); asimismo se sabe que la insulina y una proteína de maíz semejante a la insulina de mamífero (Zm-IGF), estimulan la germinación y el crecimiento del maíz.

El objetivo se logró básicamente en dos pasos; primero, una vez que se establecieron las condiciones adecuadas de la técnica de dot-blot, se determinó que existe una correlación positiva entre el contenido del péptido Zm-IGF en los ejes embrionarios de maíz y los ciclos de mejora en semillas de maíz Zacatecas 58. Segundo, la influencia de la insulina en el llenado del grano se logró determinar como un factor importante, aunque no de manera concluyente. En este caso, se aplicó insulina a mazorcas de dos ciclos de selección de temprana edad, manifestándose un incremento en peso, siendo mayor para aquellas en las que se adicionó insulina, con respecto a aquellas en que no se hizo.

Tomando en cuenta lo anterior, se concluyó que el Zm-IGF, se sugiere como un parámetro indicador de la productividad del maíz Zacatecas 58. Se propone que una selección de semillas de maíz para futuros ciclos de mejora en rendimiento, en función de éste parámetro y junto con el de Rubisco activasa, será más eficiente y complementaria a la selección tradicional, lográndose el incremento de la productividad de la planta del maíz.

II. INTRODUCCIÓN:

El maíz, *Zea mays L.*, ha estado presente en la dieta y cultura de los mexicanos a lo largo de su historia; se estima que para la primera mitad del siglo XXI será insuficiente su producción, esto se debe, entre otros problemas, a que la población aumenta continuamente y el volumen de la producción nacional no ha podido seguir ese mismo ritmo, de aquí la necesidad de buscar la manera de incrementar la producción de maíz para obtener un mayor rendimiento en los cultivos y así poder satisfacer la creciente demanda de nuestra población (Nadal, 2000). Para lograr dicha meta, se han desarrollado varios proyectos encaminados hacia la optimización de la productividad de la planta, por lo que ha sido necesario el estudio de la regulación que se lleva a cabo durante la germinación de la planta y el desarrollo de ésta.

En este sentido y bajo un contexto bioquímico, se ha reportado que el crecimiento y la reproducción celular son regulados por la participación de péptidos que fungen como factores de crecimiento, los cuales, en animales han sido agrupados en dos familias (IGF-I e IGF-II), tanto en eucariontes sencillos, como en los tejidos de mamíferos (Steller *et al.*, 1995; Rechler and Clemmons, 1998). Estos factores de crecimiento, son péptidos mitogénicos similares en estructura a la insulina, poseen cadenas polipeptídicas sencillas y algunos tienen enlaces disulfuro en su interior (García, 2001). En plantas existen estudios realizados en espinaca y *Lemma giba* que indican la existencia de péptidos que son reconocidos por anticuerpos contra insulina (Collier and Watkinson, 1987). Recientemente se han realizado trabajos en maíz que indican la existencia de un péptido endógeno (Zm-IGF), el cual regula la síntesis de proteínas ribosomales a través de una vía de transducción de señales específica (García, 2001). En estos trabajos se estudió la acción a nivel

fisiológico y bioquímico de este factor y se encontró que estimula la germinación y el desarrollo de la plántula de maíz.

Por otro lado, se conoce que Rubisco Activasa (RA) es una proteína cloroplástica que en muchas especies está constituida por dos polipéptidos de pesos moleculares aproximados de 41 y 43 KDa respectivamente, sin embargo, la proporción de cada uno cambia dependiendo de la especie (Salvucci *et al.*, 1987).

La Rubisco Activasa se considera, aunque de manera indirecta, un factor muy importante en la fijación del CO₂ en plantas, donde la fotosíntesis y en particular la fijación del CO₂, son procesos íntimamente relacionados con la productividad de las plantas (Morales, 1998).

Para la realización de este proyecto de investigación se tiene como antecedente que, Rubisco Activasa (RA) mostró tener una correlación positiva en las hojas de maíz, con el proceso de selección masal para productividad del maíz (Morales, 1998) ; si a esto se le suma la probable definición del Zm-IGF como un factor de crecimiento en plantas de maíz, que podrá ser a su vez un parámetro indicador de la productividad, entonces se tendrán elementos para generar una herramienta complementaria a la selección tradicional de semillas y que repercuta en el incremento de la productividad .

Por tal motivo, el objetivo general de esta investigación, es dar elementos para conocer si la eficiencia en la productividad del maíz tiene una relación positiva con el contenido del péptido Zm-IGF en los ejes embrionarios de maíz.

Para demostrar si esto es verdad, la experimentación se llevó a cabo en materiales de maíz de la variedad Zacatecas 58, seleccionados previamente en el Colegio de Posgraduados de Agronomía, en ciclos de mejoramiento para productividad, desde el material original (Zm₀) hasta 20 ciclos de selección (Zm₂₀). El proyecto se dividió

básicamente en dos pasos, primero se determinó la concentración del péptido similar a la insulina en los distintos ciclos de selección de semillas mejoradas, mediante el establecimiento de una metodología para la determinación semi-cuantitativa de este péptido; y segundo, se determinó el efecto de la insulina en el llenado del grano, a través de la adición de esta hormona a una fracción de mazorca de temprana edad en un medio de cultivo *in vitro* (MS).

III. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

➤ **Técnicas de fitomejoramiento en la planta de maíz.**

- Selección masal tradicional.

La selección masal ha sido utilizada por el agricultor desde tiempo inmemorial para mejorar sus plantas cultivadas. El método en su forma tradicional ha sido efectivo, ya que ha hecho del maíz una de las plantas más eficientes para producir el grano. Este hecho lo confirma, por ejemplo, la evidencia de que el maíz de México, evolucionó desde las formas silvestres (tal vez teocintle), hasta las altamente productivas, tales como las razas Tuxpeño, Celaya y Chalqueño. Los avances de la genética, en general, y en especial de la cuantitativa, han hecho posible mejorar en forma muy considerable la eficiencia de la selección masal mediante modificaciones sustanciales a la metodología tradicional. No puede haber duda tampoco de que la selección individual, practicada por el hombre en el maíz primitivo y aún en los tiempos modernos, fue fundamentalmente visual (Molina, 1983).

- Selección masal visual estratificada.

Selección individual con identificación visual de las características deseables es, por definición, **selección masal visual** y como tal, fue práctica común entre los agricultores mucho antes de que aparecieran las prácticas experimentales.

Para este caso, cuando hablamos de características deseables, nos referimos a aquellas características fenotípicas de la mazorca, juzgando visualmente su longitud, el diámetro, la sanidad, la profundidad del grano y, desde luego en forma apreciativa, el peso de la producción por planta. La amplísima gama de características de planta y de mazorcas que se encuentra en el mundo, es muestra clara de la eficiencia de tal método de selección. Sin embargo, una vez que se trató del mejoramiento del rendimiento, se debe de considerar

entonces lo que se conoce como la variación genético-aditiva, pues la caracterización y cuantificación de las cantidades relativas de variación genética en variaciones de polinización libre de maíz, se toman como una guía para obtener una eficiencia del mejoramiento genético. Dicha medida relativa esta dada por el avance genético promedio por ciclo de selección, que es una relación entre la ganancia promedio de gramos de mazorca seca por planta, por cada ciclo de selección. Donde se define al "ciclo de selección", como un ciclo agrícola que inicia con la siembra de la semilla y termina con la cosecha del fruto (mazorca deshidratada) y se lleva acabo una vez por año. La aplicación del método de selección masal, modificado por Gardner (1961), ha mostrado ser altamente eficiente para aumentar el rendimiento de las variedades, entendiéndose por ello, que el rendimiento para las semillas recibidas en este trabajo, está enfocado a las mazorcas secas que fueron visualmente mejores, donde aún falta trabajo por realizar para definir el concepto de rendimiento en función únicamente del grano. La modificación de Gardner, mencionada anteriormente, consistió en hacer de la selección masal un método más eficiente mediante la estratificación del lote de selección y la cosecha de plantas de competencia completa. Adicionalmente, Molina Galán propuso una ecuación matemática para ajustar el rendimiento individual de las plantas cosechadas del lote de selección masal, perfeccionando así esta metodología (Molina, 1983). Cuando se habla de estratificación del lote, se refiere a que un lote se divide en sublotes, donde el número de plantas, la distancia entre surcos y la distancia entre plantas individuales, varía conforme al criterio del fitomejorador. Lo más importante es que para el momento de la cosecha, los sublotes estén claramente delimitados y que se cosechen las plantas con competencia completa (plantas en las que exista manifestación integra de las características genotípicas y fenotípicas deseadas) dentro de un surco y también en surcos adyacentes. La o las mazorcas

producidas por cada planta se cosechan por separado y se identifican con el número de subote y plantas, se lleva a peso constante secándolas al sol o en secadora y se seleccionan un porcentaje de mazorcas determinado (presión de selección) de acuerdo a los criterios establecidos previamente.

El propósito de la sublotificación es dar oportunidades iguales o similares a las plantas de todo el lote de ser seleccionadas: en efecto, en un subote pequeño y compacto, el microambiente tenderá a ser uniforme y las diferencias fenotípicas entre las plantas se deberán, en buena parte a diferencias genotípicas: en esta forma, un subote de microambiente bueno producirá un promedio de fenotipos buenos, mientras que otro con microambiente malo producirá en promedio fenotipos malos; lo importante es que tanto del uno como del otro habrá algunos fenotipos superiores susceptibles de ser seleccionados y que en el siguiente ciclo tendrán la oportunidad de manifestar su potencial real. La condición de competencia entre las plantas hará que cada una de ellas se desarrolle mas o menos en el mismo microambiente; es decir, que explote la misma superficie y volumen de suelo y disponga de las mismas condiciones de luz, etc., siendo así que la condición de microambiente uniforme dará oportunidad a que las diferencias fenotípicas se manifiesten.

Dicho todo lo anterior se define a la **selección masal visual estratificada** como: una metodología agronómica que tiene la finalidad de favorecer el rendimiento de las mazorcas del maíz, con forme aumente los ciclos de selección. Se tiene a partir de la siembra de una población de plantas de maíz, la cual es sublotificada para generar microambientes uniformes, favoreciendo de esta manera la manifestación de las características genotípicas y fenotípicas del fruto; donde posteriormente se cosechan las mazorcas seleccionadas de manera individual, con identificación visual del fruto de las características físicas deseables (competencia completa), el material resultante (ciclo

original de selección) se utiliza para obtener el siguiente ciclo de selección . De esta manera, la semilla cosechada en el siguiente lote (primer ciclo de selección) constituirá un aumento de la variedad original; al cosechar el lote del segundo ciclo constituirá la semilla recombinada del primer ciclo de selección y así sucesivamente (Molina, 1983).

➤ La semilla, su importancia y desarrollo.

Las gramíneas (*Poaceae*, llamada también *Gramínea*) son una familia de plantas que contribuyen de forma muy importante a la economía del hombre, constituyendo una de las principales fuentes alimenticias en el mundo. El maíz, *Zea mays* L, es un buen ejemplo como modelo de estudio, además de su importancia biológica, constituye una de las principales fuentes alimenticias de nuestro país, por tanto, se entiende la relevancia de los estudios sobre estas familias de plantas. En particular el conocimiento de la estructura, desarrollo y funciones bioquímicas de las semillas puede contribuir al mejor entendimiento de los sistemas de regulación que determinan el buen establecimiento de la plántula (Ricón, 1997).

La semilla es, en general, la fase de la vida de la planta que está mejor adaptada para la supervivencia y dispersión de la mayoría de las especies vegetales (y aún para muchas especies animales que dependen de estas estructuras para su alimentación), (Reyes, 1991). Su función es la de dar lugar a un nuevo individuo, perpetuando y multiplicando la especie a la que pertenece.

La semilla es una estructura compleja, cuyo desarrollo se inicia con la fecundación de un óvulo maduro por el gametofito masculino (grano de polen) en el interior del saco embrionario. La fusión de los núcleos de los gametos femenino y masculino dan origen al embrión y al endospermo, este último constituye un tejido de almacenamiento de nutrientes

para el futuro desarrollo de la plántula (Bewley and Black, 1994). La cubierta o testa de la semilla se origina de los tegumentos del óvulo.

Una vez formada la semilla, se inicia la pérdida gradual de agua o desecación de los tejidos, perdiéndose aproximadamente un 90% de humedad en pocos días. La pérdida de agua provoca cambios drásticos en la actividad metabólica, e incluso se detiene la síntesis de macromoléculas complejas como: DNA, RNA y proteínas. De esta forma la semilla pasa de un estado metabólico inactivo o quiescente, el cuál le permitirá sobrevivir hasta encontrar las condiciones ambientales adecuadas para germinar (Kigel and Galili, 1995).

- Estructuras y sus funciones.

La semilla consta esencialmente de un embrión (formado por un eje embrionario y un cotiledón), una provisión de reservas nutritivas, que puede almacenarse en un tejido especializado (endospermo o albúmen) o en el propio embrión, y una cubierta seminal o pericarpio, que recubre y protege a ambos (Sánchez, 1998).

Consideraremos en breve algunos de los componentes de la semilla, los cuales pueden ser identificados en la figura 1.

El embrión consta del eje embrionario y un cotiledón (monocotiledón). El eje embrionario está compuesto del hipocótilo, al cual se encuentran unidos al cotiledón y la radícula (que es difícil de delinear a partir del hipocótilo).

En cuanto al endospermo, las semillas pueden clasificarse en endospérmicas y no endospérmicas en relación a la presencia o ausencia en la semilla madura de un endospermo definido, para el caso del maíz, se le considera una semilla endospérmica (Sánchez, 1998).

En los cereales y algunas leguminosas endospérmicas, la mayoría de las células

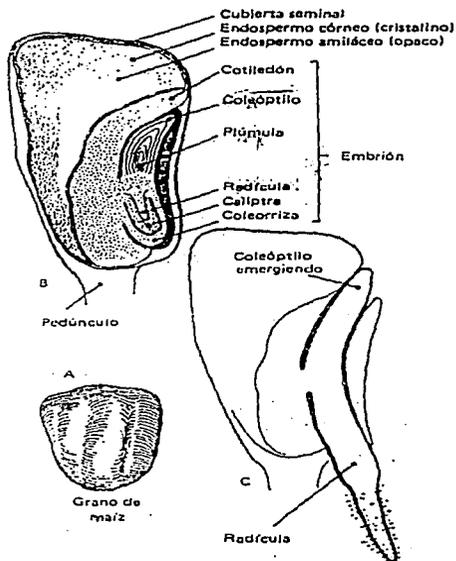
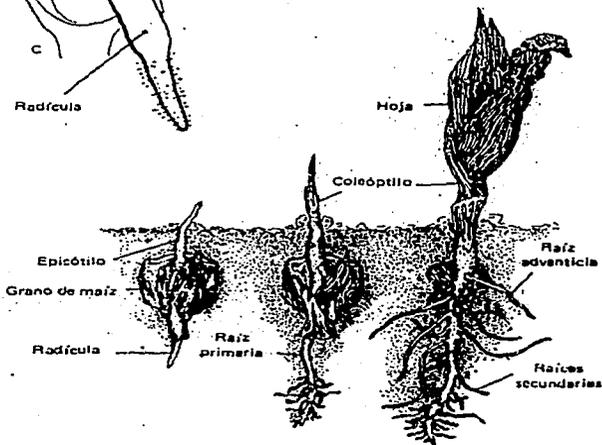


Figura 1 Germinación de una semilla de maíz (monocotiledónea). (De R.H. Arnett, Jr. y D.C. Braungart: *An Introduction to Plant Biology*, 3a. edición. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1970.)



están muertas en este tejido en la madurez y es el contenido citoplasmático que ha sido oculto, el que sustenta el desarrollo del embrión. Sin embargo, entre el exterior del endospermo y debajo de la cubierta seminal, permanece un tejido vivo derivado del cotiledón único constituido por una o varias capas de células ricas en proteínas (células de aleurona), que constituyen la llamada capa de aleurona. Estas células forman parte del endospermo y tienen un papel fundamental en la germinación de los cereales.

La importancia fisiológica del pericarpio, surge a partir de la presencia de la cutícula externa e interna, a menudo grasosa o encerada, y una o más capas de gruesas células protectoras. Estas características confieren al pericarpio cierto grado de impermeabilidad al agua y/o gases, incluyendo oxígeno; así que consecuentemente ejerce una influencia reguladora sobre el metabolismo y crecimiento de los tejidos y órganos internos de la semilla (Sánchez, 1998).

➤ El proceso de germinación.

La germinación consiste en la reiniciación de la actividad biológica y el crecimiento de los tejidos que constituyen el embrión de la semilla; lo que involucra la rehidratación, la utilización y movilización de reservas, así como el desarrollo gradual de sistemas sintéticos que transforman el embrión en una planta joven y la capacidad de asumir una vida autótrofa (Rincón, 1997). Generalmente se acepta que la germinación es el periodo metabólico que comienza con la rehidratación de los diferentes tejidos que constituyen la semilla y termina con el inicio del crecimiento de la radícula. Como regla práctica, se considera que una semilla ha germinado cuando su radícula atraviesa la cubierta seminal (Sánchez, 1998).

Cuando las condiciones de temperatura, humedad y aireación son las adecuadas, la semilla germinará dando origen, tras una serie de acontecimientos metabólicos, a una plántula. En tanto no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un periodo variable, que puede ser muy largo, hasta finalmente llegar a un momento en que pierde su capacidad para germinar. La longevidad de la semilla (tiempo durante el cual mantiene su viabilidad o capacidad para germinar) depende de la especie y de las condiciones de conservación.

La edad fisiológica corresponde a un tiempo de vida, el cual comienza a partir del inicio de la germinación y termina hasta la muerte del organismo.

- Algunos aspectos bioquímicos de la germinación.

Cuando ocurre la imbibición, la semilla se hidrata rápidamente y se activa el metabolismo celular que permitirá llevar a cabo la elongación del eje embrionario, la protrusión de la radícula y el posterior establecimiento de la planta (Bradford, 1995). En una etapa temprana de la germinación, inmediata a la imbibición, se producen cambios fisiológicos y bioquímicos, tales como reparación de membranas celulares, respiración mitocondrial, establecimiento energético (Bewley and Black, 1994), actividad enzimática de organelos, así como la síntesis de RNA y proteínas. eventos celulares fundamentales para completar el evento de germinación y la preparación para el subsecuente crecimiento (García, 2001).

Los eventos metabólicos relacionados con la germinación que han sido más estudiados son la respiración y la movilización de las sustancias de reserva. En las semillas re-hidratadas, tres rutas metabólicas son funcionales: glucólisis, ciclo de Krebs y vía de las pentosas-fosfato. Estas tres vías metabólicas generan distintos compuestos de

intermediarios y fundamentalmente gran cantidad de energía química en forma de ATP. Por su parte la movilización de las sustancias de reserva ocurre gracias al aumento de la actividad específica de enzimas hidrolíticas, este incremento se debe en parte a la actividad de las enzimas preexistentes, pero sobre todo a las síntesis de nuevas moléculas enzimáticas.

En los frutos monospermos de los cereales, el embrión está conectado al endospermo a través del escutelo, el cual, como se mencionó anteriormente para la capa de aleurona, forma parte del endospermo, que si bien esta capa de proteínas no almacena reservas, si es la responsable de que existan enzimas hidrolíticas para su movilización.

Los principales acontecimientos metabólicos relacionados con el proceso de germinación en los granos de cereales son los siguientes (Sánchez, 1998):

a) El embrión, una vez rehidratado, libera giberelinas que se difunden hacia el endospermo a través del escutelo.

b) Las giberelinas alcanzan las células de aleurona, donde inducen la producción de enzimas hidrolíticas, al desreprimir a los genes que codifican dichas enzimas.

c) Entre las enzimas hidrolíticas sintetizadas se encuentra la α -amilasa, la cual se difunde al endospermo para liberar en éste la glucosa a partir del almidón, mismo que representa del 70% al 80% de los carbohidratos almacenados en el endospermo.

d) Las moléculas de glucosa liberadas alcanzan por difusión al embrión y le sirven a éste como fuente de energía metabólica.

e) De esta manera es como el embrión dispone de las moléculas estructurales necesarias para iniciar la síntesis de sus propias biomoléculas, así como el aporte energético necesario.

f) Durante la germinación de semillas de maíz, los ejes embrionarios quiescentes reinician gradualmente la síntesis de proteínas traduciendo primeramente los mRNAs almacenados y posteriormente los sintetizados *de novo* (Bewley and Black, 1994; Sánchez and Aguilar, 1984).

g) Con todo lo anterior, el embrión inicia las divisiones mitóticas, el crecimiento celular y la diferenciación de las células que se van originando. El conjunto de todos estos procesos permite el crecimiento del embrión para formar una joven plántula (Sánchez, 1998).

o Síntesis de proteínas y RNA.

La síntesis de proteínas no ocurre en la semilla que se encuentra en estado latente, si no que se reinicia cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el mRNA. Se ha observado que los polisomas se encuentran ausentes en las semillas y su estructuración ocurre durante la imbibición (Reyes, 1991).

Desde el punto de vista molecular, la síntesis de proteínas es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de semillas, el cual se manifiesta aún antes de la síntesis de RNAs mensajeros (mRNA) (Spiegel and Marcus, 1975; Sánchez and Aguilar, 1984; Bewley and Marcus, 1990). Hay muchos estudios donde se ha evidenciado que en embriones quiescentes, existen muchos de los componentes requeridos para el proceso de la síntesis de proteínas (Bewley and Black, 1994); sin

embargo en esta etapa de desarrollo, no hay polisomas formados, solo monosomas, lo cual indica que en este momento no hay actividad de síntesis de proteínas, (Sánchez *et al.*, 1981) y que solo a partir de la imbibición, la cantidad de polisomas activos comienza a incrementarse rápidamente, trayendo como consecuencia la síntesis de proteínas (Domes and Walle, 1990; Pramanick *et al.*, 1992).

En muchas especies los mRNAs pueden encontrarse en pequeñas cantidades en embriones de semillas maduras y ser traducidos en etapas tempranas de la germinación, hasta el momento en que se sintetizan los transcritos específicos de la germinación; esto implicaría que la expresión genética durante este proceso incluye la traducción de mRNAs almacenados en los embriones de las semillas.

Se ha propuesto que existen dos tipos de mRNAs en los embriones secos de semillas quiescentes (Guy and Black, 1998):

a) mRNAs residuales: Son los que se sintetizan durante el desarrollo de la semilla y no se destruyen durante la maduración tardía y la desecación. Se piensa que no son esenciales para la germinación y que también pueden ser degradados al principio de ésta.

b) mRNAs almacenados o conservados: Estos son sintetizados durante el desarrollo, están disponibles y pueden ser traducidos después de la imbibición a proteínas que tienen parte funcional en la germinación.

Los mRNAs de las semillas quiescentes, se protegen de la degradación al ser almacenados en el núcleo y en el momento de la imbibición de la semilla, estos mRNAs son liberados a los sitios de síntesis cuando sean requeridos.

La transcripción de genes, aunque inicia de manera posterior a la traducción, es otro evento molecular temprano de la germinación (Bewley, 1997). Se considera que a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción *de novo* de mRNA (Guy and Black, 1998). Dicho lo anterior, se ha considerado que la traducción de los mensajes ocurre de manera diferencial, ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación, otros se traducen de manera más tardía, mientras que algunos no se traducen y son degradados (Sánchez and Aguilar, 1984; Sánchez, 1986; Bewley and Marcus, 1990).

Investigaciones al respecto, indican que los embriones de cereales sintetizan proteínas durante la germinación minutos después de ser colocados en agua a una temperatura apropiada. Sin embargo, no todos los mRNAs presentes son traducidos simultáneamente durante las primeras horas de germinación, lo que indica la existencia de un mecanismo de control para la traducción. Además se ha comprobado que no hay una correlación entre el nivel del mRNAs y la velocidad de traducción, o entre nivel de los mensajes presentes y la cantidad de proteínas.

Por otro lado, en embriones de cebada con 4 a 5 horas de germinación, se encontró que la síntesis de proteínas ocurre principalmente en el escutelo y en la raíz en desarrollo. Sin embargo en maíz, la mayor síntesis de proteínas ocurre en el eje embrionario, el cual tiene altos niveles de mRNA. En este cereal, la proliferación celular se presenta únicamente en las zonas meristemáticas del embrión y constituye un evento tardío que ocurre normalmente después del crecimiento por elongación celular y la protrusión de la radícula (Baiza *et al.*, 1989).

- o Hormonas en el proceso de germinación y desarrollo de la planta de maíz.

La comunicación en plantas superiores es mediada por la acción de mensajeros químicos llamados hormonas. Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos que en concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, expresándose en formas distintas de comunicación, ya sea entre diferentes tejidos y órganos que no están en contacto, o bien la comunicación que se da entre células muy cercanas o en otro caso, comunicación dentro de la mismas célula. En general, todas las partes de la planta que están en activo crecimiento, son centros de producción hormonal (Lehninger, 1999).

Las hormonas no siempre actúan como sustancias inductoras, también pueden inhibir procesos biológicos como el crecimiento y desarrollo de una planta (como es el caso del ácido absésico). En las células, las hormonas interactúan con proteínas específicas llamadas receptores. El complejo hormona-receptor es la forma activa de la hormona (Lindsey *et al.*, 2002). En términos generales se puede decir que las hormonas contribuyen al mantenimiento del medio interno, aprovechamiento de nutrientes, funciones reproductoras, entre otras (Lehninger, 1999).

Las hormonas vegetales han sido agrupadas en cinco clases: Auxinas (Rober-Kleber *et al.*, 2003), Giberelinas, Citoquininas, Ácido absésico y etileno (Lebravo., 2001), de las cuales solo mencionaremos a dos de los fitoreguladores más estudiados en el proceso de germinación:

Giberelinas: El modo de acción aceptado para este compuesto en la germinación de cereales, es que se transporta del escutelo o del eje embrionario hacia la capa de aleurona, donde induce la síntesis de enzimas específicas, denominadas hidrolasas, las cuales

degradan almidón y que se encuentran activas durante la germinación (Sánchez, 1998, White and Rivin, 2000).

Ácido abscísico (ABA): Se requiere para la maduración de la semilla y favorece su quiescencia, se encuentra en los frutos y en las yemas en latencia, provoca con frecuencia respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra factores de estrés (White and Rivin, 2000).

o Factores de crecimiento

En animales, se ha reportado la presencia de los factores de crecimiento (IGFs), los cuales son péptidos mitogénicos de bajo peso molecular similares en estructura a la proinsulina o a la insulina madura, por tanto poseen cadenas polipeptídicas sencillas, algunos de los cuales poseen los enlaces disulfuro en su interior, característicos de la insulina (Hall *et al.*, 1988; Russell and Wik., 1989). *In vitro*, los IGFs estimulan una gran variedad de acciones insulínicas, entre otras, mitogénicas y metabólicas. A pesar de las similitudes *in vitro* en estructura y actividad, los IGF-I y II tienen diferentes acciones *in vivo* (Robinson and Portis, 1988).

Estos factores de crecimiento similares a la insulina fueron descubiertos con base a su habilidad de estimular la sulfatación de los cartílagos. Posteriormente, por su similitud con la insulina, se denominaron factores de crecimiento similares a la insulina, los cuales se agruparon en dos grandes familias, siendo los de tipo I (IGFs I) o de tipo II (IGFs II) (Jones and Clemmons, 1995).

El IGF-I es una hormona trófica, cuya actividad depende de la cantidad y calidad de la hormona de crecimiento, de su receptor y del estado nutricional del organismo. Un estado nutricional adecuado es prerequisite para mantener niveles normales de IGF-I. El

IGF-I estimula la función de osteoblastos y la síntesis de colágeno *in vivo* e *in vitro* (Chuan, 1996; Gabbitas and Boen, 1995).

Factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) o somatomedinas, son péptidos sintetizados bajo la influencia de HG (hormonas de crecimiento), principalmente en el hígado, aunque también se producen en el músculo y el riñón (Cattani A, 1999).

- o Proteínas similares a la insulina en plantas.

En plantas, se ha demostrado la existencia de receptores membranales similares a los receptores de los factores de crecimiento de tipo IGF-I y IGF-II de animales, este conocimiento es relativamente reciente, por lo que hay muy poca información al respecto (Becraft, 1998). Reportes anteriores en espinaca y *Lemna giba*, mostraron la existencia de un péptido que es reconocido por anticuerpos contra insulina (Collier and Watkinson, 1987). En 1992, Hirano y colaboradores reportaron una proteína de reserva en soya, capaz de interactuar con los receptores de insulina de bovino (Hirano and Kagawa, 1992). Posteriormente, en 1997, Ilgoutz y colaboradores (1997) encontraron en hojas de lupino una proteína a la que denominaron leg-insulin, por otro lado se aisló un péptido de la fracción protéica de la semilla de frijol de soya con una secuencia de aminoácidos idéntica a un segmento de la cadena β de insulina de bovino (Olviera and Elenier, 1999), además se ha reportado el aislamiento de una proteína con peso molecular similar a insulina a partir de una leguminosa denominada cowpea (Venancio *et al.*, 2003), todos estos trabajos no hablan de la función de éstas proteínas en las plantas, solo se menciona que tanto en los invertebrados como en plantas, existen proteínas que están asociadas a las rutas de señalización de insulina (Xavier-Filho *et al.*, 2003).

Existen dos trabajos que hablan de efectos de insulina en plantas. En el primero se determinó un efecto estimulante de la insulina e IGFs después de la germinación de semillas de sandía y pepino, lo cual sugiere que estos péptidos provocan un crecimiento de la plántula (Goodman and Davis, 1993). El segundo trabajo indica que la insulina aplicada a ejes de maíz incrementa la síntesis de proteínas ribosomales y la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en la síntesis de proteínas ribosomales y la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en la subunidad pequeña del ribosoma (Sánchez de J. *et al.*, 1999), así como el incremento de la traducción del factor de iniciación iso 4E (Dinkova and Sánchez, 1999). Actualmente, en lo que se refiere a maíz, ya se demostró la existencia de una proteína de 20 kDa, que es reconocida por anticuerpos contra insulina. Así como también se determinó que este péptido, Zm-IGF, estimula la germinación de las semillas de maíz y principalmente la elongación del coleóptilo (García, 2001).

Por métodos histológicos y de inmunodetección, se ha sugerido que este péptido se encuentra localizado en las células que constituyen los tejidos meristemáticos del eje embrionario del maíz. El factor Zm-IGF estimula la síntesis de proteínas ribosomales en forma similar a la insulina; también estimula la síntesis de DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, por lo que es posible que intervenga en la proliferación celular (García, 2001).

➤ **Fotosintatos:**

Los frutos, como el del maíz, una vez cosechados se desarrollan a expensas de sus reservas almacenadas (**fotosintatos**: productos de la fotosíntesis). Se considera pues, que el fruto del maíz es una estructura especializada para el almacenamiento; mientras que tallos y hojas tienen menor capacidad de almacenamiento y más bien son estructuras fotosintéticas. La **sacarosa** es el fotosintato más importante y la principal forma de

transporte de los productos de la fotosíntesis, mientras que el **almidón**, es la forma mayoritaria de almacenamiento (Manrique, 2003).

➤ Transporte en el floema.

El floema como sistema conductor.- En las plantas vasculares, los fotoasimilados producidos en las hojas se transportan a distintos órganos (frutos, raíces y zonas de almacenamiento) a distancias que oscilan entre unos centímetros y varias decenas de metros. El floema tiene como característica distintiva la presencia de elementos cribosos, junto a estos se encuentran en proporción variable, las células parenquimáticas y fibras. Solamente los elementos cribosos están implicados directamente en el transporte. No obstante, algunas células parenquimáticas están estrechamente relacionadas con los elementos cribosos, interviniendo en la regulación de su metabolismo y en la carga de fotoasimilados (Azcón-Bieto, 2000).

- La estructura de los elementos cribosos está adaptada para el transporte.

Característica distintiva de los elementos cribosos maduros, de la que deriva su nombre, es la presencia de las áreas cribosas, regiones con numerosos poros. Son particularmente prominentes en las paredes transversales de los elementos de estos tubos (**placas cribosas**), en que los poros oscilan entre 0.1 y 5 μm de diámetro, ocupando cerca del 50% de la superficie de la pared (Azcón-Bieto, 2000).

- Células parenquimáticas especializadas se asocian a los elementos cribosos.

Los elementos de los tubos se pueden asociar a células parenquimáticas especializadas denominadas **células de compañía o acompañantes**.

Se considera pues, la existencia de un **complejo tubo criboso-célula de compañía**. Las células de compañía desempeñan funciones metabólicas, como la síntesis

de proteínas que no puede realizar el elemento criboso. En las venas menores de las hojas, las células de compañía tienen un diámetro mayor que los tubos cribosos, y se cree que están implicadas en la carga de fotoasimilados. En gimnospermas, estas funciones las desempeñan las células albuminosas (Salisbury and Ross, 1994).

- Sustancias transportadas en el floema.

La naturaleza de las sustancias que se transportan en el floema, es en forma de solución, pues son arrastradas en el lumen del tubo criboso por un flujo de agua, donde la composición del fluido del floema es muy variable, dependiendo de la especie, de la edad, estado fisiológico del tejido que se analiza, tiene un elevado contenido de materia seca, normalmente entre el 10 y 25 %; un bajo peso molecular de las sustancias disueltas y una viscosidad elevada, hasta dos veces superior a la del agua.

Los azúcares son el componente mayoritario del fluido del floema, ya que representa normalmente entre el 80 y 90% de la materia seca total. En cantidades menores se encuentran proteínas, aminoácidos y amidas, ácido málico y diversos aniones y cationes orgánicos. También se encuentran fosfatos de nucleótidos, fundamentalmente ATP y ADP y, en concentraciones muy bajas, diversas hormonas vegetales, incluyendo auxinas, citoquininas, gibberelinas, ácido abscísico y donde muy probablemente esté el Zm-IGF. El marcado isotópico ha permitido demostrar que la mayor parte de estas sustancias se transporta realmente en el lumen de los tubos cribosos (Salisbury and Ross, 1994 y Azcón-Bieto, 2000).

- El movimiento de los fotoasimilados: Fuentes y sumideros.

El transporte en el floema tiene lugar desde las fuentes a los sumideros.

Las **fuentes** son órganos que proporcionan carbohidratos para ser incorporados al tubo criboso. Ello implica la síntesis de formas que sean aptas para ser transportadas, comúnmente es la **sacarosa** y la disponibilidad de carbohidratos en cantidad superior a la necesaria para cubrir las necesidades metabólicas del tejido. Estos pueden proceder directamente de la fotosíntesis o de la movilización de las reservas acumuladas anteriormente.

Los **sumideros** son órganos "importadores" de carbohidratos, en los que se descargan los azúcares del tubo criboso. Estos azúcares pueden ser utilizados en el metabolismo y el crecimiento (sumideros consuntivos) o almacenarse como reservas (sumideros de almacenamiento) (Taiz and Zeiger, 1998).

- Las relaciones entre fuentes y sumideros dependen de la distancia y las conexiones vasculares.

El movimiento de los fotoasimilados en la planta está determinado por la situación de las fuentes y de los sumideros y es facilitado por la existencia de conexiones vasculares directas entre los órganos (Azcón-Bieto, 2000).

- Los sumideros compiten por los fotoasimilados disponibles.

La distribución de la materia seca (fotoasimilados fundamentalmente) entre los distintos sumideros se denomina **partición o reparto**, parámetro de considerable importancia en la determinación de la productividad de las especies cultivadas. La mayor productividad de los cultivares modernos se debe a un aumento en la producción de fotoasimilados acumulados en las partes aprovechables, normalmente en los frutos y las semillas, más que a un aumento en la fotosíntesis total de las plantas, y este efecto es resultado de procesos de selección y mejora desarrollados mediante procedimientos

empíricos. La comprensión de la regulación de la partición facilitaría, sin duda, el desarrollo de las variedades más productivas.

Los sumideros también influyen en las fuentes y un aumento en la demanda de fotoasimilados, en la fotosíntesis en las hojas y la movilización de las reservas, mientras que la eliminación de los sumideros tiene el efecto contrario. El control de de las fuentes por los sumideros implica distintas señales, con el cambio en la turgencia, en los niveles de carbohidratos y de hormonas. La partición de los fotoasimilados en la planta, es un proceso regulado de modo complejo por la interacción entre sumideros, de éstos con las fuentes y, probablemente, por la vía de transporte (Azcón-Bieto, 2000).

➤ Fisiología del grano de maíz (llenado).

Una vez diferenciada la estructura básica de la planta durante la formación de las semillas, comienza la etapa de maduración caracterizada por la expansión celular y el predominio de procesos anabólicos que conducen a la deposición de reservas, sin aumento en el número de células. Los asimilados requeridos en esta etapa provienen de la planta madre. Para el caso de las leguminosas como por ejemplo el chícharo (*Pisum sativum*), se sabe que los fotoasimilados necesarios son aportados principalmente por los folíolos y estípulas de la hoja axilante que lleva la rama floral y las paredes del mismo fruto (Perossé, 2002). En las gramíneas como el trigo, la fotosíntesis de la hoja bandera y la espiga son las que en mayor porcentaje determinan el llenado del grano. Los nutrientes son transportados a través del haz vascular (vía simplástica) que inerva al fruto y al óvulo a través del funículo. Sin embargo, el haz vascular llega hasta la cálaza o a las terminaciones de sus ramificaciones, relativamente lejos del embrión. Los fotoasimilados al llegar a la cálaza son descargados y bañan las paredes celulares estableciendo una alta concentración de solutos

osmóticamente activos que, al no encontrar conexiones por la vía simplástica, pasan hacia la nueva generación por vía apoplástica, es decir entre las paredes y los espacios intercelulares. Además, se encuentran presentes células de transferencia con proyecciones en sus paredes celulares, entre la cara abaxial de los cotiledones (en la zona de la depresión central, cóncava) y la correspondiente parte interna de la cubierta seminal con restos de endosperma (convexa), denominadas "pit y anti pit" respectivamente. De esta forma, al aumentar la superficie de contacto con la membrana plasmática se facilita el pasaje de nutrientes y se favorece el flujo de solutos a través de la misma (Perossé. 2002).

El éxito en el llenado del grano depende de las condiciones ambientales en el momento en que éste comienza y durante todo el período de llenado, e involucra complejas relaciones competitivas fuente-destino entre los órganos en el canopeo. Por lo tanto, un déficit hídrico en éste punto es crítico y determinante del rendimiento ya que afecta la acumulación de materia seca. La maduración se completa cuando la semilla alcanza el máximo peso seco (madurez fisiológica). Finalmente, en la etapa de **deshidratación**, se interrumpe la conexión vascular con la planta madre, y la semilla pierde paulatinamente más del 90% de su contenido de agua, lo que resulta en una gradual reducción del metabolismo. A medida que el agua es eliminada de los tejidos de la semilla, el embrión pasa a un estado metabólicamente inactivo y la semilla se convierte en una estructura autónoma que puede permanecer en un período de quiescencia hasta reiniciar la germinación (http://www.pasturasdeamerica.com/conservacion/maiz_planta.asp, (2003).

➤ Características biológicas del fruto del maíz.

La dinámica del porcentaje de humedad en los granos, está vinculada a su vez con la dinámica de la acumulación de materia seca. Durante el período de llenado de grano, que comienza en la floración y culmina con la madurez fisiológica, se distinguen diferentes subetapas según el proceso considerado.

El principio del período postfloración se le denomina "cuaje" y allí no se observa ningún crecimiento apreciable, los granos en esta etapa son acuosos. Luego del cuaje se observa una etapa de muy activo crecimiento de los granos, o de llenado efectivo, en la que los granos toman un aspecto lechoso en sus comienzos, pastoso posteriormente y duro hacia el final. Todo este llenado efectivo y constante concluye en la madurez fisiológica, momento en que los granos ya no crecen más y el rendimiento máximo posible se ha alcanzado.

En cuanto a la acumulación de agua en el grano se observa una importante acumulación inicial, que alcanza rápido un valor máximo. Dicho valor se mantiene casi constante durante la mayor parte del período de acumulación de materia seca en el grano, el cual una vez finalizado, da lugar a una fuerte caída del contenido de agua. Como el porcentaje de humedad es simplemente la relación entre el contenido hídrico y el peso fresco (de materia seca y agua) de los granos, el mismo declina fuertemente durante todo el llenado.

Luego de la madurez, cuando ya no hay más acumulación de materia seca, la disminución del porcentaje de humedad depende solo de secado de los granos, y

consecuentemente el grado de humedad cae más lento cuando termina la acumulación de materia seca. Aquí importa el aire que los rodea por la diferencia de temperatura existente.

Se establece que a partir de la madurez fisiológica, la pérdida de humedad es en términos generales más lenta que durante el llenado de granos, pues no se acumula más materia seca (Beraldi, 2002; Lopategui, 2002).

IV. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Explorar si los niveles del péptido Zm-IGF están relacionadas con la productividad del las plantas del maíz. De ser así, proponer la cuantificación del péptido como un elemento adicional para hacer una selección de cultivos mejorados.

Objetivos Particulares:

- Determinar la influencia de la insulina como un factor importante en el llenado de grano.
- Encontrar las condiciones adecuadas de la técnica de dot-blot, que permita medir semi-cuantitativamente al péptido Zm-IGF.
- Aplicar la técnica dot-blot para cuantificar al péptido Zm-IGF en ejes embrionarios de semillas de diversas poblaciones de maíz.
- Correlacionar la cantidad del péptido Zm-IGF presente en semillas de maíz, con el ciclo de mejoramiento de la variedad Zacatecas 58.
- Seleccionar semillas de maíz con altos contenidos de Zm-IGF y RA, para explorar su posible relación con la productividad.

HIPÓTESIS.

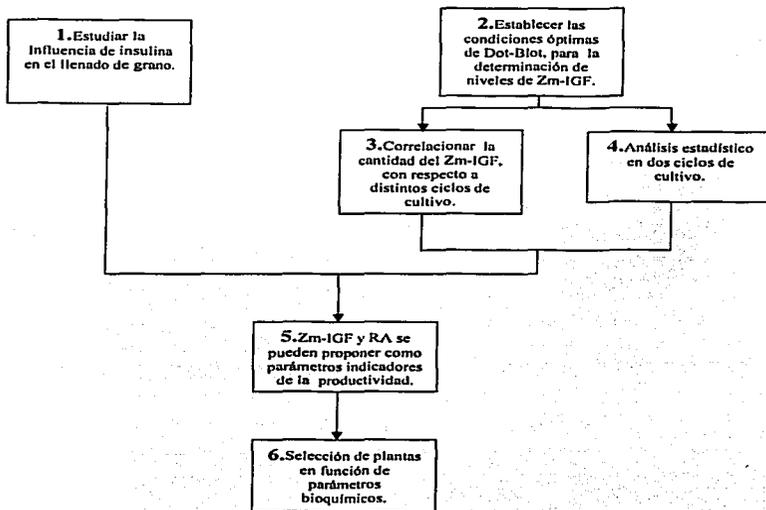
Si el Zm-IGF tiene un papel importante en el proceso de llenado de grano del fruto del maíz, entonces habrá una correlación entre los niveles de Zm-IGF, con respecto a los ciclos de selección y la cantidad de materia acumulada.

De cumplirse la hipótesis entonces:

- a) Un cultivo que esté integrado de plantas con altos niveles de Zm-IGF tendrá un mayor rendimiento.
- b) El Zm-IGF (así como RA), puede ser utilizado como parámetro auxiliador en la selección de cultivos con mayor productividad.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

Plan general de la estrategia experimental:



Se muestra la estrategia general del proyecto desarrollado en coordinación con el Programa de Colaboración con el Colegio de Postgraduados, en la que en esta tesis se concreta a realizar los pasos 1, 2, 3 y 4, los cuales sirven como trabajo preliminar para cubrir en un futuro los pasos subsiguientes.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

- **Material biológico:**

Semillas de maíz Zacatecas 58.

Zacatecas 58 es la colección número 58 del estado de Zacatecas; pertenece a la raza Cónico Norteño; tiene una floración y una madurez fisiológica medias de 70 y 120 días en Chapingo, respectivamente; siendo por tanto una variedad precoz. Su adaptabilidad es muy amplia, ya que crece en la llanuras de Zacatecas y Durango, en Chapingo (primavera y verano) y en Tepalcingo. Mor. (invierno).

A) Influencia de la insulina en el llenado del grano.

El material genético del presente estudio estuvo constituido por semillas de maíz (*Zea mays L.*) de la variedad Zacatecas 58 de dos diferentes ciclos de cultivo, Z_0 y Z_{17} ; los cuales se recolectaron a la misma edad biológica. Para esto hubo una diferencia de 4 días más para la población Z_{17} debido a que el proceso de deshidratación de ésta población fue más largo con respecto a la población Z_0 . Las muestras fueron tomadas de manera aleatoria y cuidando que tuvieran características morfológicas similares.

Las mazorcas de maíz utilizadas fueron cosechadas en estado lechoso, durante el periodo de "llenado de grano", el cual, es el tiempo adecuado para analizar la capacidad de toma de nutrientes.

▪ Reactivos y soluciones:

- Reactivos

- Microdyn ®.

- Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate (Tween 20). SIGMA.

o Soluciones:

-Agrimicfn® 500 (1g/1L).

-Captán® (1g/1L) , Fungicida, Curasemilla, N-triclorometiltio-4ciclohexeno-1,2 dicarboximida (*).

- Alcohol metílico (Metanol) al 70% (v/v): reactivo Baker® ACS, J.B. Baker.

- Disolución desinfectante: 50% de cloro comercial, 10 mL de Microdyn ® y 3 mL de Tween 20 como surfactante, en un volumen final de 1 L.

- Hipocolorito de sodio. "Cloralex®", 6% activo.

o Insulina de páncreas bovino, (IB) con una actividad de 28.5 U/mg (SIGMA; St. Lois, MO).

Medios de cultivo:

El medio de cultivo utilizado es el medio conocido como MS (Murashige and Skoog., 1962). La composición se muestra en la tabla 1 del apéndice

▪ Procedimiento:

Las semillas de los cultivos Z₀ y Z₁₇ se analizaron por separado y se aplicó el mismo tratamiento para cada una, para lo cual se inocularon fracciones en un medio MS sin insulina y por otro lado se inocularon fracciones en un medio MS con insulina (200 µM). Cada tercer día, se realizó un monitoreo de la variación del porcentaje en peso, la cual es representativa del llenado del grano.

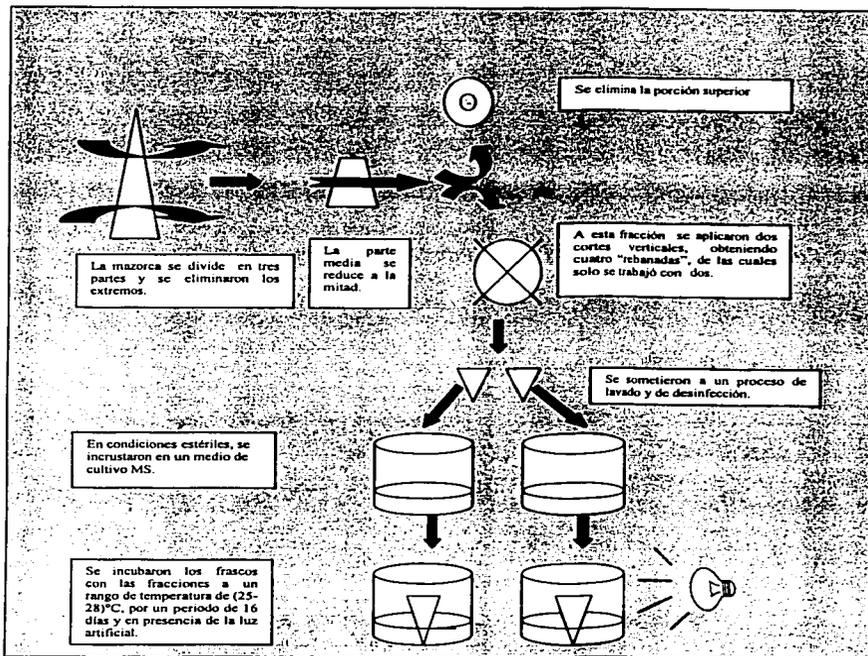
*Nota: Información de las Naciones Unidas: En Finlandia (1972), el captán esta prohibido por considerarse carcinogénico, mientras que en Noruega (1981), el uso es severamente restringido (<http://www.citcc.org.us/d0900a.htm#CAPTAN>).

o Preparación de las muestras (Ver figura 2).

La mazorca se orientó de manera vertical para seccionarla en tres partes (eliminando los extremos), la parte media, nuevamente posicionada verticalmente, se partió en dos piezas, de las cuales solo se trabajó con la fracción de diámetro mayor. A dicha fracción se aplicaron dos cortes, ahora transversales, obteniendo cuatro "rebanadas". De todas las fracciones obtenidas, se seleccionaron para el trabajo aquellas muestras que tuvieron características similares en peso, tamaño y número de granos. Finalmente, bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar, las muestras fueron sometidas a un proceso de desinfección, el cual consistió en que las fracciones de la mazorca se introdujeran por un minuto, en un frasco de vidrio que contenía una solución de alcohol al 70% (v/v), para favorecer la disolución de la grasa (cera) que cubría los granos de las mazorcas y facilitar el efecto de las siguientes disoluciones utilizadas; se desechó el alcohol, posteriormente se pusieron las muestras en la disolución desinfectante por 20 minutos. Concluido este tiempo, se desechó la disolución, para posteriormente agregar el bactericida denominado Agrimicín durante 10 minutos, se desechó éste y de la misma manera se agregó el fungicida Captán, el cual se mantuvo por 10 minutos y después se eliminó. Finalmente se llevaron a cabo cuatro lavados con agua estéril, con los cuales, las fracciones de mazorca quedaron listas para ser pesadas y posteriormente inoculadas en el medio MS.

Las muestras se colocaron en el medio de cultivo MS. por inmersión de la parte cónica de la fracción, finalmente, se incubaron los frascos con las fracciones a un rango de temperatura de (25-28)°C, por un periodo de 16 días, registrando su peso durante seis tiempos bajo condiciones estériles.

Figura 2.- Procedimiento para la preparación de las muestras Z_1 y Z_2 , y determinación de la influencia de la insulina en el llenado del grano.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

B) Establecimiento de las condiciones adecuadas para medir la concentración de Zm-IGF por dot-blot.

El material genético del presente estudio estuvo constituido por semillas de maíz (*Zea mays L.*) de la variedad Zacatecas 58 (Z_o) y los compuestos de selección masal visual estratificada de los ciclos 5, 10, 15 y 20.

La variedad original Zacatecas 58 Z_o y las cuatro variedades mejoradas, formaron parte del experimento de campo, llevado a cabo por el Dr. José Molina Galán, dentro del Programa de Colaboración con el Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Edo. de México y cuya finalidad fue la de evaluar el rendimiento del grano. Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar, con cuatro replicas. La parcela experimental consistió en dos surcos con 12 matas de 2 plantas, con separaciones de 80 cm entre cada surco y una distancia de 40 cm entre cada mata, para dar una densidad de 68,000 plantas por hectárea.

- Obtención de ejes embrionarios:

Un total de 60 semillas de cada población de Zacatecas 58, tanto la original Z_o, como la de sus diferentes ciclos de selección, fueron germinados a una temperatura de 24-25°C en la oscuridad. A partir de las 22 h de imbibición y hasta las 33 h, se monitoreó el estado de desarrollo de cada una y se colectaron las semillas cuya radícula había roto la testa (germinación). Se extrajo el eje embrionario y se almacenó en congelación (-70 °C).

- Obtención del extracto crudo:

-Se realizó una mezcla de ejes embrionarios macerados con N: líquido y amortiguador de extracción, en una relación aproximada de 1:3, donde el amortiguador contó con una mezcla de inhibidor de proteasas, teniendo la siguiente composición:

Amortiguador de extracción: 100 mM de KCL, 20 mM HEPES, 0.2 mM EDTA, 10% de glicerol. ajustado a un pH de 7.6.

Mezcla de inhibidores de proteasas: Para un volumen de 50 mL se tiene que por cada pastilla de inhibidores de proteasas, se agregan 50 μ L de Triton 100X, 500 μ L de 0.1 M PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo) y 50 μ L de β -mercapto etanol.

- En el homogenado, para separar los lípidos con una micropipeta, fue necesario favorecer la diferencia de densidades por centrifugación, en una centrífuga Beckman Gs-15R (utilizando el rotor Beckman F2402, 26000 RPM), a 1500 rpm, 30 minutos y a una temperatura de 4°C, descartando el pellet (núcleos y restos celulares), para trabajar únicamente con el sobrenadante en una posterior centrifugación, la cual fue a 90,000 rpm (utilizando el cabezal TLA100.2) por 60 minutos, a 4°C, y una ultracentrífuga Beckman TL-100. Nuevamente se eliminó el pellet, constituido por los microsomas y ribosomas y se obtuvo el sobrenadante, el cual se denominó **extracto crudo**.

Posteriormente se procedió a estandarizar la cantidad de proteína que se aplicó en el dot- blot para cada muestra, siendo necesario determinar primero la cantidad de proteína total contenida en cada extracto crudo, utilizando el método de Bradford.

Nota: todo lo anterior se desarrolló a una temperatura de 4°C.

- Método de Bradford:

Fundamento:

El color azul de Coomassie, contenido en el reactivo de Bradford, se une a las proteínas en una relación directa a la concentración de las mismas y posteriormente se obtiene una magnitud relativa, expresada en absorbencia a 595 nm (Bradford, 1976).

Reactivos:

- Reactivo de Bradford: Bio-Rad Protein Assay, reactivo concentrado. Bio-Rad
- Agua desionizada.

Materiales:

Espectrofotómetro (DU® 650) Beckman, celdas de plástico y pipetas volumétricas.

Procedimiento:

Para las muestras problema: En un tubo Eppendorf, se agregan 797 μL de agua desionizada, 3 μL de extracto crudo de ejes de maíz, y 200 μL del reactivo de Bradford. Agitar hasta homogeneizar completamente. Posteriormente leer en el espectrofotómetro a 295 nm.

- Identificación del péptido, mediante la técnica dot-blot.

Fundamento:

La técnica dot-blot es un tipo de ELISA rápido que utiliza como soporte sólido papel de nitrocelulosa. El antígeno (recombinante o sintético), en general, se adsorbe a través del vacío al soporte en forma de gota (*dot*) (utilizando el equipo "The convertible™, Filtration Manifold System, Cat series 1055, Gibco BRL, Life technologies, inc) se reconoce por el anticuerpo respectivo y se revela posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a la enzima peroxidasa, para revelar por luminiscencia (García Flores *et al 2001*).

- Identificación del péptido, mediante la técnica dot-blot.

Muestras y estándares:

- Extractos de proteínas, provenientes de los granos de maíz mejorados.

- o Un control negativo, elaborado a partir de albúmina de suero bovino Fracción V (GIBCO BRL, Life technologies™), a una concentración de 1 µg/µL. y un control positivo, elaborado a partir de insulina de páncreas bovino, (IB) con una actividad de 28.5 U/mg (SIGMA; St.Lois,MO) a una concentración de 1 µg/µL.

Reactivos y Soluciones

o Reactivos:

- Tris (hidroxi metil) aminometano , Ultra puro., Research Organics, INC.
- Monolaurato sorbitan polioxi-etileno (Tween 20), Sigma, P-1379.
- Cloruro de sodio (NaCl), cristal, reactivo Baker® ACS, J.B. Baker.
- Leche descremada: Leche *Svelty*, calcio plus, de Nestle®.

o Soluciones:

- Alcohol metílico (Metanol): reactivo Baker® ACS, J.B. Baker.
- Solución de buffer Tris (TBS): 0.15 M de NaCl, 0.05 M de Tris y 1% de Tween 20 y llevarlo a un pH de 7.4.
- Solución de buffer Tris (TBS): 1.0 M de NaCl, 0.05 M de Tris y 1% de Tween 20 y llevarlo a un pH de 7.4.
- Solución de saturación al 5% de leche descremada: Se agrega un 5% v/v, en solución amortiguadora TBS 0.15 M.
- o 1^{er} anticuerpo contra insulina de páncreas de bovino, desarrollado en Guinea pig (SIGMA, St.Lois, MO), dilución 1:5000, en solución de saturación al 5% de leche desgrasada con solución TBS 0.15 M.

- o 2° anticuerpo (Antiguína pig IgG, conjugado con peroxidasa y desarrollado en conejos), con la dilución 1:5000 en solución de saturación al 5% de leche desgrasada con solución TBS 0.15 M.
- o Membrana de transferencia millipore:(para aplicación tipo “blotting”), inmobilion-P, tipo del filtro: PVDF, con una medida de poro de 0.45 µm.
- o Reactivo de detección sistema ECL de AMERSHAM, BIOSCIENCES

Procedimiento:

La membrana se sumergió durante 15 segundos en metanol, posteriormente se depositó en agua desionizada por algunos minutos (10 min.). Se preparó el equipo de dot-blot, colocando la membrana de manera centrada y se selló. Una vez que se activó el vacío, se depositó una cantidad determinada de muestra (50 µL) en los pozos. Se mantuvo con vacío durante 1 h, pasado este tiempo, se secó la membrana a temperatura ambiente durante 15 min.

Posteriormente la membrana se depositó en metanol durante 15 segundos, se eliminó y luego se realizó un lavado con agua en agitación ocasional durante 15 minutos, se eliminó el agua y se bañó con la solución de saturación durante una hora a temperatura ambiente. Cuando se cumplió este tiempo, se hizo un lavado con TBS 0.15 M durante 15 min y se desechó, para agregar el 1^{er} anticuerpo disuelto en solución TBS 0.15 M, al 5% de leche descremada, se incubó durante una noche (17-19 horas) a 4 °C, en ambos casos se mantuvo con agitación suave.

Se realizó una serie de lavados posteriores, con TBS 0.15 M por 15 minutos, con TBS 1.0 M (de NaCl) durante 10 minutos y nuevamente TBS 0.15 M (de NaCl) por 10 minutos. Del mismo modo y posterior a los lavados, se aplicó el segundo anticuerpo

durante 1.5 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó un último lavado con TBS 0.15 M de NaCl a temperatura ambiente. Se reveló, con el reactivo de luminiscencia.

(Nota: Se hizo un control positivo con insulina y otro negativo con albúmina (1 µg/µL agua)).

- Diseño y elaboración de la curva patrón con insulina bovina (I.B.)

La metodología aplicada es por la técnica dot-blot.

- Se preparó una solución "stock" de Insulina bovina 1 µg por 1 µL de agua, a partir de ella, se realizaron diferentes disoluciones con distintas cantidades de la insulina, de tal modo que se tiene una serie de distintas concentraciones de IB a un volumen final definido de 50 µL (entendiéndose que se realizó un aforo con agua desionizada).

- Una vez que se aplica la muestra a la membrana y se lleva acabo la reacción de acoplamiento, la membrana se expone a una película de rayos "X" por 4.5 min. Posteriormente por medio del equipo Fluor-S, se determinó la densitometría de los puntos obtenidos en la película.

VII. RESULTADOS.

1. Influencia de la insulina con respecto al aumento en peso del grano.

Las muestras de maíz de los ciclos de selección Z_0 y Z_{17} , fueron recolectadas a temprana edad, en estado "lechoso". Posteriormente fueron preparadas de tal forma que se cortaron fracciones de mazorcas, las cuales se incrustaron por la región central (Figura 2) en el medio de cultivo MS, donde a uno de los lotes se le adicionó insulina ($200 \mu\text{M}$) y al otro lote no (control). Cada tercer día, se realizó un monitoreo de la variación del peso, la cual se considera representativa de la capacidad de llenado del grano. Para Z_0 , solo se trabajó con tres muestras para ver la influencia de la insulina y otras tres para observar el efecto en ausencia del factor, esto se hizo realizando un monitoreo del peso durante un periodo de dieciséis días (Tabla 1); de manera análoga, para Z_{17} , en ausencia de la insulina, se trabajó con cinco muestras y con cuatro para las muestras que tenían insulina (Tabla 2).

En las tablas 1 y 2, se muestran los valores del incremento en peso de la fracción del elote, los resultados comprenden, tanto el porcentaje obtenido por cada día y en cada muestra, así como el promedio final de las muestras con respecto al el último día. Para Z_0 el control tuvo un aumento de 5.6% de peso, mientras que en la muestra tratada con insulina fue de 13.5%, lo que indica un efecto de estímulo en la toma de nutrientes por la presencia de la insulina exógena.

En Z_{17} el incremento en el peso inicial de las mazorcas fue mayor que el de la población original, sin embargo, parecería no ser un cambio importante desde el punto de vista individual, pero es probable que sea significativo en cultivos de gran volumen, por otro lado, se presentó también un efecto de la insulina sobre las muestras, aunque menos pronunciado que en Z_0 , siendo de 7.25%-9.73% en peso.

Esto mismo se puede apreciar en la figura 3 para Z_0 y 4 para Z_{17} , donde cada conjunto de barras muestra el comportamiento en la variación de magnitud del peso de cada fracción de elote a un período determinado y cada barra indica la magnitud del porcentaje en peso por cada día de monitoreo. Siendo el lote "A" para Z_0 sin insulina, lote "B" Z_0 con Insulina, lote "C" para Z_{17} sin insulina y lote "D" Z_{17} con insulina.

En la figura 3 se observa el ciclo de selección original (Z_0), donde para el lote "A" (sin insulina) no se observa un comportamiento definido en la variación del porcentaje en peso, ya sea en la misma muestra, entre los días de monitoreo o bien entre muestras diferentes; se puede suponer que esto se debe a que en este ciclo de selección, en la población existe una baja producción del péptido endógeno Zm-IGF. Para el lote "B" (con Insulina), se observa en presencia del factor una tendencia de incremento en el porcentaje en peso, mostrando un efecto positivo en el llenado del grano. Para ambos lotes, es notorio que existe variación en la capacidad de llenado de grano entre cada muestra, esto se observa analizando la variación producida en cada día.

Los lotes C y D, corresponden al ciclo de selección Z_{17} (figura 4), esto significa que ha sido diecisiete veces seleccionado para mejorar la productividad de la planta, y se esperaría que la cantidad del péptido Zm-IGF endógeno se hubiera incrementado. Esto es consistente con las observaciones en el lote "C" (sin insulina), porque el promedio en peso inicial de las mazorcas es mayor que las de Z_0 . Por otra parte en el lote "D" (con insulina), se observa que en cada muestra hay un incremento en peso conforme avanza el tiempo, esto de forma semejante a la observada en Z_0 . Sin embargo se observó que no fue tan marcado el aumento; probablemente debido a que ya existe un contenido mayor del factor endógeno, el efecto de la insulina agregada es menos efectiva que en la población Z_0 .

Muestras correspondientes a Z₀.

No. de días	Variación del peso de la fracción del elote expresada en %						
	Muestras	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0
3	6.07	4.15	5.07	5.31	1.74		4.17
6	5.31	4.31	4.76	5.55	1.89		4.30
8	4.74	5.14	5.23	6.28	2.76		4.69
10	5.31	6.64	4.76	10.62	13.70		7.17
14	6.45	6.64	4.12	11.11	16.61		7.30
16	6.45	6.64	3.80	11.83	20.9912		7.82
Lote "A": Zo s/ insulina				Lote "B": Zo c/ insulina			
Zo Promedio de porcentajes de aumento en peso de la muestra sin Insulina Y = 5.635 % σ = 1.584 n = 3				Zo Promedio de porcentajes de aumento en peso de la muestra con Insulina Y = 13.549 % σ = 6.749 n = 3			

Tabla 1. Influencia de la Insulina en el desarrollo de los granos del maíz, en el Ciclo de selección Z₀. Se muestran los datos que corresponden al monitoreo en 16 días del porcentaje de incremento en peso de las fracciones de mazorca en estado lechoso, los cuales estuvieron en contacto con el medio MS, siendo para el lote "A" en ausencia de insulina, mientras que para el lote "B", en presencia de este factor. El promedio de porcentajes de aumento en peso de las muestras, corresponde a los valores reportados en el último día. Se observa que el promedio de % de aumento en peso: Zo s/insulina < Zo c/insulina.

Muestras correspondientes a Z₁₇.

No. días	Variación del peso de la fracción del elote expresada en %										
	Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	6.31	3.80	7.71	4.43	1.77		3.17	4.17	4.47	7.21	
6	5.78	4.47	6.73	5.16	0.16		4.28	4.02	4.32	6.91	
8	6.31	5.79	6.56	4.28	1.13		3.96	5.41	4.62	7.36	
10	9.47	10.92	8.04	4.13	2.75		5.55	8.82	4.62	7.51	
14	8.77	6.62	7.88	4.57	5.17		6.19	6.81	7.71	7.81	
16	9.64	6.62	8.04	5.31	6.63		7.77	7.73	15.58	7.81	
Lote "C": Z ₁₇ s/ insulina				Lote "D": Z ₁₇ c/ insulina							
Z ₁₇ Promedio de porcentajes de aumento en peso de la muestra sin Insulina Y = 7.25386 % σ = 1.650 n = 5				Z ₁₇ Promedio de porcentajes de aumento en peso de la muestra con Insulina Y = 9.73092 % σ = 3.90 n = 4							

Tabla 2. Influencia de la Insulina en el desarrollo de los granos del maíz, en el Ciclo de selección Z₁₇. Se muestran los datos que corresponden al monitoreo en 16 días del porcentaje de incremento en peso de las fracciones de mazorca en estado lechoso, los cuales estuvieron en contacto con el medio MS, siendo para el lote "C" en ausencia de insulina, mientras que para el lote "D", en presencia de este factor. El promedio de porcentajes de aumento en peso de las muestras, corresponde a los valores reportados en el último día, en donde se observa para el promedio del % de aumento en peso: Z₁₇s/insulina < Z₁₇c/insulina.

Muestras correspondientes a Z₀.

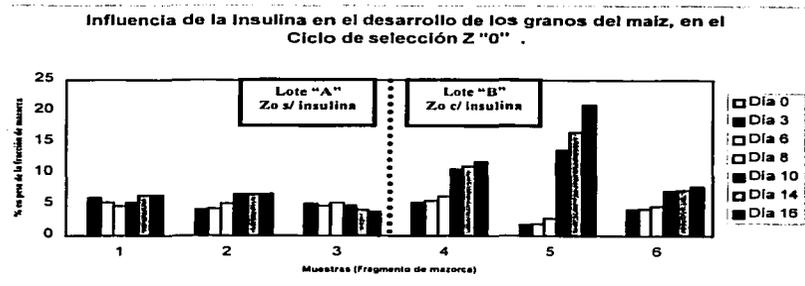


Figura 3.- Influencia de la Insulina en el desarrollo de los granos del maíz, en el ciclo de selección Z₀. Se muestra la tendencia en la variación de magnitud del peso, donde cada barra corresponde a la magnitud del por ciento en peso por día de monitoreo; y cada conjunto de barras corresponde a un ensayo realizado en siete tiempos que se aplicó a una muestra.

Muestras correspondientes a Z₁₇.

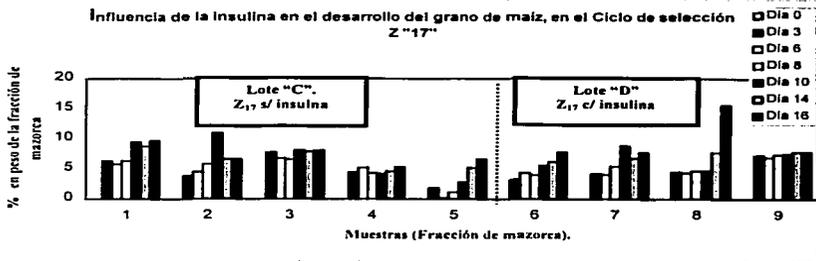


Figura 4.- Influencia de la Insulina en el desarrollo de los granos del maíz, en el Ciclo de selección Z₁₇. Se muestra la tendencia en la variación de magnitud del peso, donde cada barra corresponde a la magnitud del por ciento en peso por día de monitoreo; y cada conjunto de barras corresponde a un ensayo realizado en siete tiempos aplicado a una muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Establecimiento de las condiciones adecuadas en la técnica de dot-blot, para la cuantificación del péptido Zm-IGF en muestras de maíz Zacatecas 58.

- Determinación del rango de sensibilidad en la curva patrón de insulina bovina.

Se estableció una curva patrón con concentraciones conocidas de insulina bovina (IB) (0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), la cual se obtuvo a partir de la aplicación de la muestra a un sistema de dot-blot en membrana de nitrocelulosa. El sistema se reveló con ECL de Amersham, exponiéndose a una película de rayos X por 4.5 min. Posteriormente por medio del programa Fluor-S, se realizó la densitometría de los puntos obtenidos, lográndose así el rango de la curva patrón de IB equivalente a 0.0-1140 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$ (Figuras 5 y 7).

Curva patrón de Insulina bovina (IB).

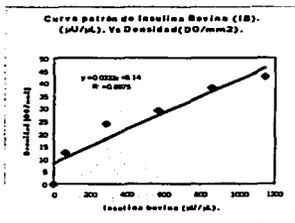


Figura 5.-Se obtuvo por medio de dot-blot, con un volumen de aplicación de 50 μL , partiendo de IB con actividad inicial de 28.5 U/mg de proteína.

- Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

A fin de poder medir los contenidos de proteína de los extractos de ejes embrionarios de maíz, se preparó una curva patrón a diferentes concentraciones de albúmina bovina como referencia, para lo cual se obtuvieron las absorbencias correspondientes a 595 nm. Con la curva trazada, las absorbencias de nuestros extractos de

ejes embrionarios se interpolaron en ésta curva, para así determinar las concentraciones de las mismas y posteriormente estandarizar el contenido de proteína en el que se realizaría la determinación inmunológica (Figura 6).

Curva patrón de albúmina:

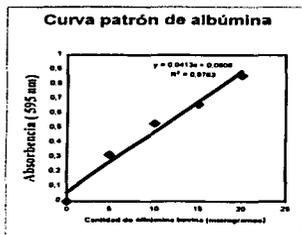


Figura 6. Curva patrón de albúmina bovina aplicando el método de Bradford. Esta curva se usó para medir proteína en el extracto crudo obtenido de las muestras de maíz Zacatecas 58.

- Determinación del factor Zm-IGF, en ejes de semillas de diferentes ciclos de selección masal visual estratificada.

Se realizó una prueba preliminar para la detección del factor Zm-IGF en los lotes de semillas Zm (original) y los ciclos de selección Zm₅ y Zm₁₀. En este caso en particular se aplicaron distintas cantidades conocidas de extracto crudo, se cuantificó proteína, se aplicó al dot-blot y se realizó su respectiva determinación densitométrica. La información que nos proporcionó este experimento fue el poder estimar un rango de cantidad de proteína en la que es posible detectar el péptido, el cual osciló entre 90µg- 260µg de proteína proveniente del extracto crudo (resultados no mostrados).

- Adecuación final de la técnica para la cuantificación del péptido Zm-IGF.

Se tomó como base central el experimento anterior, realizándose las modificaciones pertinentes para obtener las condiciones finales. Se determinó que la cantidad de proteína a

aplicar en los pozos para dot-blot era de 140 μg de proteína, para su detección y correlación con la curva patrón de IB.

Una vez afinado el método, partiendo de una mezcla de semillas de varias mazorcas del mismo ciclo, se trabajó con una cantidad determinada de ejes embrionarios de maíz. Se estandarizaron las condiciones para la técnica de dot-blot, se definieron las concentraciones del péptido Zm-IGF de los distintos extractos pertenecientes a las semillas problema, a través de medir las densidades que permitieran una interpolación con respecto a la curva patrón de IB. Todo esto se realizó con la finalidad de cuantificar al Zm-IGF en cada uno de los diferentes ciclos de semillas de maíz, tanto en las originales, como en las semillas mejoradas.

Se sabe que el Zm-IGF es una hormona que regula el crecimiento y el desarrollo de la planta de maíz (García., 2001). Las muestras de la variedad Zacatecas 58 original (Zm₀) y cuatro poblaciones genéticamente derivadas a través de la selección masal visual estratificada para mayor rendimiento del grano (Z₁, Z₁₀, Z₁₅ y Z₂₀), mostraron una correlación positiva con el contenido del factor: Conforme aumentó el ciclo de selección de mejoramiento en las semillas, también aumentó la cantidad del factor peptídico (Figura 8).



Figura 7.- Revelado en placa de rayos X de la curva patrón de insulina bovina (IB). De izquierda a derecha: 0.0, 57, 285, 570, 855 y 1140 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$ de insulina Bovina



Figura 8.- Revelado en placa de rayos X del péptido Zm-IGF con los diversos ciclos de selección de maíz Zacatecas 58. De izquierda a derecha los ciclos de selección de semillas mejoradas: Zm Original, Zm 5, Zm 10, Zm 15 y Zm 20.

La figura 7 y 8 se obtienen a partir de la aplicación de las muestras a un dot blot en la membrana de nitrocelulosa, la cual se reveló con el sistema ECL de Amersham, exponiéndose en una película de rayos X por 4.5 min. Posteriormente por medio del programa Fluor-S, se realizó la densitometría de los puntos obtenidos, tanto en la curva patrón de IB, como en las muestras problema, finalmente se logró la cuantificación del péptido Zm-IGF.

Cuantificación de Zm-IGF como equivalente de Insulina bovina, en ejes de cada ciclo de Semillas Mejoradas (SM).

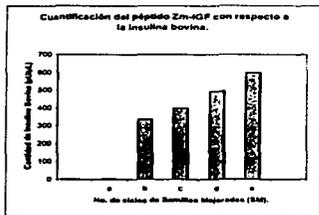


Figura 9.- Se cuantificó la cantidad de Zm-IGF presente en las semillas de maíz Zacatecas 58 original y las que han sido mejoradas. Se tomó a la Insulina Bovina (IB) como patrón de referencia para la cuantificación de dicho péptido, en términos equivalentes en μU de insulina.

3.-Cuantificación del péptido Zm-IGF en las semillas de dos ciclos de selección masal visual estratificada.

Las mazorcas de maíz, de la variedad **Zacatecas 58**, de los ciclos de selección **Zm₀** y **Zm₁**, se recolectaron en la etapa de madurez fisiológica, al término de veinte días de permanecer en condiciones naturales de secado para disminuir el porcentaje de humedad y lograr mejor su conservación para su futuro uso.

La metodología y las condiciones estandarizadas anteriormente para determinar la concentración del péptido Zm-IGF, se aplicaron de la misma manera para la siguiente fase (Figura 10), solo que ahora enfocando a comparar dos ciclos de selección en estado final de madurez (Figura 11 para **Zm₀** y figura 12 para **Zm₁**). Es necesario mencionar que para éste experimento se trabajó con un número de 83 y 79 mazorcas para **Zm₀** y **Zm₁** respectivamente, como muestras representativas de cada población (Tablas 3 y 4)*.

*Nota: El número de muestras presentado en tablas es menor al indicado anteriormente, ya que no se incluyeron las determinaciones de los granos en las que se encontraba dañado el embrión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10.-Aplicación de dot blot a dos ciclos de selección.

**Muestras de Maíz Zacatecas 58,
Ciclo de selección Zo**

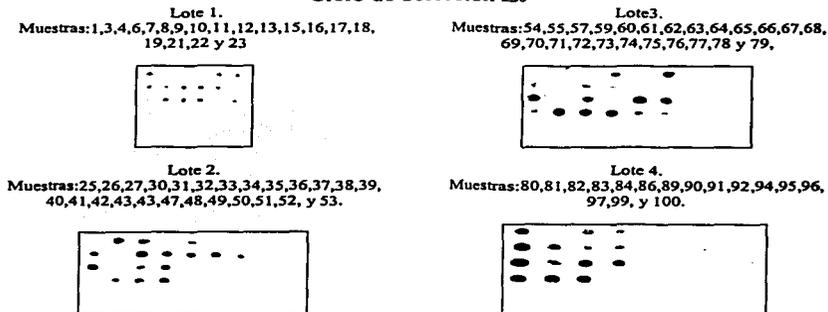


Figura 5. Análisis de las muestras del Ciclo de Selección Zm^o (lotes 1,2,3 y 4), mediante la aplicación de dot blot, donde para cada lote se realiza en la membrana la aplicación de las muestras. Éstas se revelaron con el sistema ECL de Amersham, exponiéndose en película de rayos X por 4.5 min. Posteriormente por medio del programa Fluor-S, se realiza la densitometría de los puntos obtenidos, tanto en la curva patrón de IB, como en las muestras problema, finalmente logrando la cuantificación del péptido Zm-IGF por la correlación de densidades entre ambos.

**Muestras de Maíz Zacatecas 58,
Ciclo de selección No. 17**

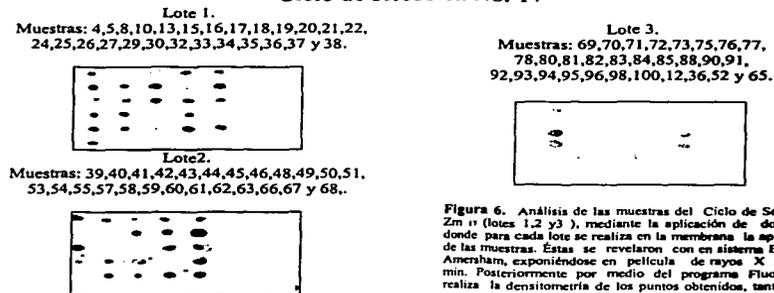


Figura 6. Análisis de las muestras del Ciclo de Selección Zm^o (lotes 1,2 y 3), mediante la aplicación de dot blot, donde para cada lote se realiza en la membrana la aplicación de las muestras. Éstas se revelaron con el sistema ECL de Amersham, exponiéndose en película de rayos X por 4.5 min. Posteriormente por medio del programa Fluor-S, se realiza la densitometría de los puntos obtenidos, tanto en la curva patrón de IB, como en las muestras problema, finalmente logrando la cuantificación del péptido Zm-IGF por la correlación de densidades entre ambos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

a) Cuantificación del péptido Zm-IGF el ciclo de selección Zm.

Información sobre las muestras recibidas

Se trabajó con un total de 83 muestras de semillas (Tabla 3), donde cada muestra corresponde a una mazorca de éste ciclo, las cuales se encontraron en buenas condiciones de sanidad (B), algunas muestras presentaron daño físico en el endospermo (D). Por otro lado se determinó su concentración con respecto a equivalentes de insulina, donde N/D significa valores inferiores al nivel de sensibilidad del método.

Tabla 3.-Datos obtenidos al aplicar el dot-blot, a las muestras de la población Zm, mediante la cuantificación del Zm-IGF con respecto a equivalentes de insulina bovina.

No de planta	Peso Mazorca (g)	Concentración $\mu\text{U/gL}$	Condiciones de sanidad
1	84	329	B
3	76	313	B
4	82	196	B
6	103	867	B
7	76	436	B
8	101	663	B
9	64	195	B
10	93	822	B
11	94	594	B
12	78	344	B
15	104	N/D	B
16	75	N/D	B
17	100	530	B
18	98	515	B
19	69	201	B
21	81	N/D	B
22	93	N/D	B
25	96	N/D	B
26	110	288	B
27	70	279	B
30	108	N/D	B
32	58	N/D	B
33	84	477	D
34	76	N/D	B
35	75	37	D
36	107	904	B
37	69	525	B
38	95	283	B
40	90	464	B
41	100	N/D	B
42	105	113	B
43	102	180	B
47	73	N/D	B
48	92	N/D	B

No de planta	Peso Mazorca (g)	Concentración $\mu\text{U/gL}$	Condiciones de sanidad
49	117	369	B
50	96	653	D
51	76	895	B
52	65	N/D	B
53	94	N/D	B
54	89	473	B
61	101	261	B
62	72	51	B
63	66	260	B
64	73	348	B
66	106	243	B
67	72	486	B
68	64	386	B
69	85	507	B
72	71	42	B
74	53	294	D
75	77	220	B
77	54	482	B
78	95	404	B
79	55	553	B
80	114	218	B
81	56	31	D
82	44	229	B
84	66	144	B
86	43	781	B
89	44	374	B
90	83	57	B
91	63	138	B
94	87	442	B
95	77	381	B
96	68	514	B
97	64	326	B
99	94	159	B
100	72	N/D	B

b) Cuantificación del péptido Zm-IGF el ciclo de selección Zm17.

Información sobre las muestras recibidas.

Para este ciclo se trabajó con un total de 79 muestras de semillas (Tabla 4), donde cada muestra corresponde a una mazorca de éste ciclo, las cuales se encontraron en buenas condiciones de sanidad (B), algunas muestras mostraron daño físico en el endospermo (D). También se determinó su concentración con respecto a equivalentes de insulina, donde N/D significa valores inferiores al nivel de sensibilidad del método.

Tabla 4.- Datos obtenidos al aplicar el dot-blot, a las muestras de la población Zm17, mediante la cuantificación del Zm-IGF con respecto a equivalentes de insulina bovina.

Muestra Z17	Peso de mazorca.	Concentración $\mu\text{U/L}$.	Condiciones de sanidad
4	181	428	Bien
5	112	249	Bien
8	115	700	Bien
12	119	281	Bien
13	74	499	Bien
15	155	758	Bien
16	134	580	Bien
17	40	711	Bien
19	49	735	Bien
21	155	502	Bien
22	92	760	Bien
24	116	748	Bien
25	163	707	Bien
27	131	601	Bien
29	174	297	Bien
30	108	671	Bien
32	116	226	D
33	110	631	Bien
35	143	208	Bien
36	202	848	Bien
37	162	698	Bien
40	140	241	Bien
41	119	108	Bien
42	132	283	Bien
43	98	342	Bien
44	97	N/D	Bien
45	98	N/D	Bien
46	133	301	Bien
48	220	299	Bien
49	130	703	Bien
50	160	215	Bien
51	97	N/D	Bien
52	135	589	Bien

Muestra Z17	Peso de mazorca.	Concentración $\mu\text{U/L}$.	Condiciones de sanidad
53	122	N/D	B
55	157	148	B
57	131	N/D	B
58	90	14	D
59	171	60	B
60	134	N/D	B
61	106	352	B
62	121	N/D	B
63	218	N/D	B
65	165	228	B
67	174	233	B
66	126	N/D	B
68	67	284	B
69	107	557	D
70	145	113	B
71	144	188	D
72	102	214	B
73	119	N/D	B
75	125	62	D
76	129	278	B
77	137	250	B
78	37	511	B
80	177	179	B
81	127	376	B
82	69	137	B
83	139	847	B
84	160	354	B
85	134	30	B
86	66	439	D
90	130	440	D
92	55	655	D
93	114	485	B
95	77	392	D
98	124	683	B

4. Distribución de las poblaciones Z₀ y Z₁₇ con respecto a su contenido de Zm-IGF.

Las muestras de las poblaciones Z₀ como Z₁₇, se ordenaron con base a su contenido de Zm-IGF considerando solo aquellas muestras que se encontraron en buenas condiciones ("B", Tablas 3 y 4) y mostraron valores "detectables" del péptido Zm-IGF. Los valores, desde 0 hasta 1000 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$, se ordenaron de manera creciente y se definieron rangos de cien unidades, con los cuales se determinaron los porcentajes de frecuencias relativas (frecuencias con respecto al total de muestras) que corresponden a cada intervalo (Tablas 5 y 6). Se determinó para cada caso el promedio de la muestra (Y), que es una medida de la tendencia central, la desviación estándar de la muestra (S), que indica la dispersión de las magnitudes determinadas con respecto al promedio de la muestra, la mediana, que es el punto medio o central de todos los valores de la muestra y la moda, que es el número mayor de frecuencias o repeticiones (Howard, 2001; Justo, 1991 y Montgomery, 2002). En las figuras 11 y 12, se observa respectivamente para Z₀ y Z₁₇, el comportamiento que corresponde a la distribución de la población, donde se grafica la cantidad del péptido Zm-IGF, con respecto a el porcentaje de frecuencia relativa presente en cada caso. La población Z₀ muestra una distribución distinta a la de la población de Z₁₇, ya que la primera se presenta como una "campana" asimétrica, cuya moda se expresa en rangos de concentraciones bajas (250 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) y en la segunda al tratarse de una población seleccionada, se muestran dos campanas, de las cuales la que corresponde a la de rangos de bajas concentraciones ("A"), podría ser equivalente a la moda de la población original y además presentándose una segunda moda con valores más elevados (750 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$).

Comportamiento de la población Z₀.

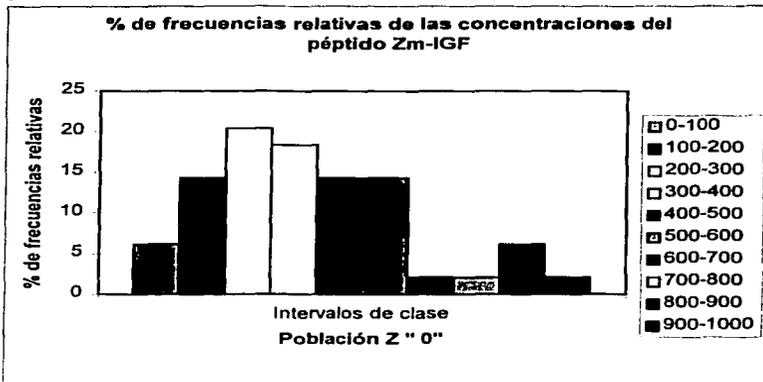


Figura 11: Para la población Z₀, las magnitudes de las concentraciones ($\mu\text{U}/\mu\text{L}$) se ordenaron de manera creciente en rangos de cien unidades, en los cuales se determinó el porcentaje de frecuencia relativa correspondiente. Para este caso se consideró tener una población de tipo asimétrica "unimodal".

Comportamiento de la población Z₁₇.

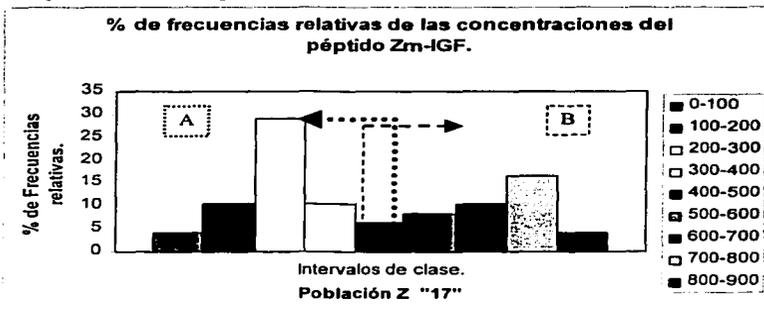


Figura 12: Para la población Z₁₇, las magnitudes de las concentraciones ($\mu\text{U}/\mu\text{L}$) se ordenaron de manera creciente en rangos de cien unidades, en los cuales se determinó el porcentaje de frecuencia relativa. Para este caso se observó una población de tipo "bimodal", siendo "A" la moda con menor magnitud en el rango de concentración con respecto a "B", que tiene una magnitud mayor.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 5: (Datos de la figura 11): Comportamiento de la población Z₆.

Intervalo de clase $\mu U/\mu L$	Marca de clase $\mu U/\mu L$	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	% de Frecuencia relativa
0-100	50	3	0.06	6.122
100-200	150	7	0.14	14.285
200-300	250	10	0.20	20.408
300-400	350	9	0.18	18.367
400-500	450	7	0.14	14.285
500-600	550	7	0.14	14.285
600-700	650	1	0.02	2.040
700-800	750	1	0.02	2.040
800-900	850	3	0.06	6.122
900-1000	950	1	0.02	2.040
Total		49	1	100
Media Muestral (Y)	Desviación Estandar Muestral (S)	Mediana	Moda	
383	219	348	250	

Tabla 6: (Datos de la figura 12): Comportamiento de la población Z₇.

Intervalo de clase $\mu U/\mu L$	Marca de clase $\mu U/\mu L$	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	% de Frecuencia relativa
0-100	50	2	0.04	4.16
100-200	150	5	0.10	10.41
200-300	250	14	0.29	29.16
300-400	350	5	0.10	10.41
400-500	450	3	0.06	6.25
500-600	550	4	0.08	8.33
600-700	650	5	0.10	10.41
700-800	750	8	0.16	16.66
800-900	850	2	0.041	4.16
Total:		48	1	100
Promedio de la muestra: (Y) A	Desviación Estandar Muestral (S)	Mediana	Moda	
291	113	250	250	
Promedio de la muestra: (Y) B	Desviación Estandar Muestral (S)	Mediana	Moda	
654	117	690	750	

VIII. DISCUSIÓN.

Influencia de la insulina con respecto al aumento en peso del grano.

Durante la etapa del llenado de grano de las mazorcas, el número de células se mantiene constante y se da el predominio de procesos anabólicos que conducen a la deposición de reservas en las semillas en formación. En condiciones normales de desarrollo, los fotoasimilados requeridos en esta etapa provienen de la planta madre (Perossé, 2002). Un aumento en la demanda de fotoasimilados, aumenta la fotosíntesis en las hojas y la movilización de las reservas hacia la mazorca.

Tomando como referencia lo anterior, se diseñó una metodología que permitiera contar con los elementos mínimos necesarios para medir cambios en la capacidad del llenado del grano en las mazorcas, por ello, las mazorcas de ambas poblaciones fueron recolectadas en los comienzos de la etapa de desarrollo, en la cual los granos se encontraban en estado lechoso y es justo en este momento cuando el proceso de llenado es más activo y se aprecia el mayor crecimiento de los granos (Beraldi, 2002; Lopategui, 2002). En otras palabras, en los experimentos de los cultivos *in vitro*, la fuente para la obtención de los fotoasimilados fue proporcionada por el medio de cultivo MS, el estado "lechoso" de la mazorca favoreció la demanda de los fotoasimilados en el fruto y su respectiva movilización, para el corte propuesto en "rebanadas" de las mazorcas, se asumió tener la estructura en red de microtúbulos de manera funcional, como vía de ingreso de los fotoasimilados a través del ote, por lo que este diseño permitió analizar el efecto del factor en este proceso.

Por otro lado, se conoce que la insulina es una hormona animal que regula el contenido de glucosa en la sangre, canalizándola a distintos destinos de acuerdo a las necesidades metabólicas del organismo, una de éstas es la de almacenamiento de fuentes de carbohidratos. De manera análoga se esperaría que el Zm-IGF en maíz, funja

como un regulador de los fotoasimilados y en este caso favorezca su almacenamiento, trayendo como consecuencia un aumento en el llenado del grano. De efectuarse esto, podríamos sugerir que el péptido está involucrado directamente en la producción del fruto, por lo menos en este sistema de cultivos *in vitro*.

En este experimento se trabajó con insulina y no con Zm-IGF, lo cuál se justifica porque en el momento en que se desarrolló el experimento no se contaba con grandes concentraciones del péptido purificado. Por otra parte, se conoce de trabajos experimentales previos en animales, la existencia de mitógenos similares en estructura y función a la insulina, denominados Insulin-like Growth Factors (IGFs) (Humell, 1990) y por último, se ha reportado que el Zm-IGF aislado del maíz, es reconocido por anticuerpos contra insulina y que tiene un comportamiento bioquímico semejante a este regulador en la planta (García, 2001). Por todo lo anterior se decidió usar insulina en el medio de cultivo MS para realizar la prueba mencionada.

En términos generales, los resultados mostraron un efecto positivo en el llenado del grano de las fracciones de mazorca en de ambos ciclos de selección, pues las magnitudes del por ciento en peso, tanto de Z₆ como Z₁₇, en los respectivos lotes "A" y "C" sin insulina (5.63 y 7.25 % respectivamente), resultaron ser menores con respecto a las magnitudes de los lotes "B" y "D" (13.54 y 9.73 % respectivamente), en las que se agregó insulina.

Correlación de la cantidad del Zm-IGF con respecto al ciclo de mejora.

La mayor productividad de los cultivares modernos se debe a un aumento en la producción de fotoasimilados acumulados en las partes aprovechables, normalmente en los frutos y las semillas. Este efecto es resultado de procesos de selección y mejora desarrollados mediante procedimientos empíricos. La comprensión de la regulación del reparto de fotoasimilados hacia los frutos, facilitará sin duda el desarrollo de variedades

más productivas. En esta investigación se propone que la presencia de un factor tipo Zm-IGF en semillas en formación, estaría relacionado con la productividad de una planta por generar mayor demanda de fotosintatos. Esta premisa estaría de acuerdo con los resultados anteriormente mostrados y se refuerza con la correlación observada entre la cantidad de Zm-IGF y el ciclo de mejoramiento de la población analizada, donde en efecto, la cuantificación de Zm-IGF en el tejido de ejes embrionarios, mostró un mayor contenido de Zm-IGF a medida que se incrementaron los ciclos de mejoramiento como se observó en los resultados de la figura 9.

Cuantificación del péptido Zm-IGF en dos ciclos de selección. Análisis estadístico.

El análisis de los histogramas que muestran el contenido de Zm-IGF, para la poblaciones de Z₀ y Z₁₇ (figuras 11 y 12) muestra comportamientos diferentes: Para el cultivo Z₀ fue de tipo asimétrico "unimodal", con una desviación estándar muy elevada (219 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) con respecto a su media (383 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$), mientras que para el cultivo Z₁₇, el comportamiento fue de tipo bimodal, lo que indica que contenía dos poblaciones distintas. De ellas, la primera se distribuyó a bajas concentraciones de péptido (0 a 500 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) y una desviación estándar amplia (113 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) y la segunda se distribuyó a concentraciones mayores (400 a 900 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) y con una desviación estándar más baja (117 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$), lo cual significa que en ésta última población, contuvo una mayor homogeneidad en sus componentes, al mostrar valores más definidos.

Más aún, para la población original se observó que la moda tuvo, un valor semejante al de la población mejorada (Z₁₇) en la región de intervalos a bajas concentraciones, siendo de 250 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$, en cambio en la segunda población a concentraciones elevadas, el valor de la moda fue de 750 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$. Para esta última población, que había sido sometida a un proceso de selección masal visual estratificada

de mejoramiento del rendimiento del fruto, los resultados se pueden interpretar como un incremento del número de muestras que tienen mayor concentración del péptido y que aún conserva una elevada identidad con respecto al comportamiento de la población original. En el tiempo en que se desarrolló esta tesis, se llegó a un total de 25 ciclos de mejoramiento, por lo que es probable que si se hubiese trabajado con éste último ciclo de mejora, existiría un incremento aún mayor en el número de muestras con mayor concentración de Zm-IGF.

El Zm-IGF muestra asociación con la productividad de la planta de maíz.

Los datos aquí presentados permiten considerar a este péptido como un factor de crecimiento de tipo insulínico, el cual, indirectamente a través de la insulina, sugiere tener una influencia positiva en la capacidad del llenado del grano de las mazorcas en estado lechoso, también se mostró una relación positiva entre el ciclo de selección de mejoramiento y el contenido del péptido en las semillas; además se determinó que existe un aumento de casi un 10% en la frecuencia de las muestras que tienen mayor concentración del péptido Zm-IGF en una población que ha sido seleccionada para mejoramiento del rendimiento del fruto del maíz, con respecto a aquella que no lo ha sido. Por todo lo anterior se puede concluir que estos estudios pueden ser el punto de partida para proponer al Zm-IGF de maíz, como un índice asociado a la productividad de la planta del maíz.

En este trabajo, aún no es posible hablar de la productividad en términos del rendimiento del grano de maíz, pues las muestras recibidas se limitan a relacionarlo con el rendimiento dado en cantidad de mazorca por planta. (Molina, 1983), si embargo se comenzó a abordar el tema al querer relacionar el llenado del grano con respecto a la presencia o a la ausencia de la insulina (que se ha propuesto como sustituto análogo del péptido Zm-IGF). También, el incremento del rendimiento del grano, se intentó

relacionar con el ciclo de mejoramiento, pero esta relación no es muy claro aún, a pesar de esto, se sabe de antemano que existe una relación positiva entre el porcentaje del rendimiento de la mazorca por planta y el ciclo de selección. (Molina, 1983). Queda pendiente reforzar la relación que pueda existir entre el péptido Zm-IGF y el llenado del grano, entre el ciclo de mejora y el llenado del grano, así como también establecer la relación que pueda existir entre el llenado del grano y el porcentaje de rendimiento de mazorca por planta y éste a su vez con el Zm-IGF.

Perspectivas del trabajo: Zm-IGF y RA (rubisco activasa) como parámetros indicadores de la productividad.

Trabajos anteriores han demostrado que el contenido de Rubisco activasa (RA) en las hojas de maíz tiene una correlación positiva con el proceso de selección masal para productividad del maíz (Morales, 1998); por otro lado, el presente trabajo sugiere la relación de los niveles de Zm-IGF encontrado en ejes embrionarios del fruto de esta planta, con la productividad del maíz. Con base en estos dos elementos, se sugiere para futuros trabajos, que tanto Rubisco Activasa (RA), como el Zm-IGF, sean propuestos como elementos indicadores para generar una herramienta complementaria a la selección tradicional de semillas que van dirigidas al incremento de la productividad.

Selección de semillas en función de parámetros bioquímicos.

Como trabajo de investigación complementario, orientado a probar la veracidad de esta propuesta, se cuantificaron los valores de RA en las hojas bandera de las mismas plantas en las que se determinó el contenido de Zm-IGF (Lozano, 2003). Los valores correspondientes de ambos parámetros se organizaron de acuerdo a la cantidad de éstos en forma decreciente (Tabla 2-Apéndice), se clasificaron las plantas que tuvieron magnitudes relativas semejantes de ambos parámetros con la finalidad de sembrar en el futuro ciclo agrícola, semillas con alto y bajo contenido de ambas

proteínas, para estudiar el efecto de estos indicadores genéticos en el desarrollo de la planta y en el llenado de grano del maíz. Así se tendrían como control positivo, grupos de semillas con contenidos "muy alto -muy alto" (MM) de ambos parámetros y como control negativo a aquellas que se representaron como "muy baja cantidad de los indicadores" (PP) (Tabla 3-Apéndice), donde la primer letra a la izquierda corresponde a valores de RA, (Lozano, 2003) y la segunda letra a la derecha, corresponde a valores determinados y clasificados en este trabajo en función de la concentración del péptido Zm-IGF. Solo es posible saber la efectividad de la combinación de estos elementos como parámetros de la productividad de la planta del maíz, hasta después de haber sembrado y cosechado el producto de la selección de éstas semillas. Las semillas están representadas por un número de planta, de acuerdo a su clasificación en los campos de cultivo del Colegio de Postgraduados, Estado de México.

Nota: En cuanto a la determinación de las magnitudes de RA, es necesario mencionar que se realizaron durante el proceso de elaboración de tesis de Licenciatura de Jessica Lozano Franco (datos no mostrados).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

IX.- CONCLUSIONES.

✓ El método de dot-blot estandarizado permite realizar mediciones adecuadas del contenido de una proteína poco representada como el Zm-IGF en muestras de maíz.

✓ Se determinó que existe una correlación positiva en la cantidad del péptido Zm-IGF presente en semillas de maíz y el ciclo de mejoramiento en la variedad Zacatecas 58.

✓ El Zm-IGF (*Zea mays* Insulin-like Growth Factor), se puede sugerir como un parámetro indicador de la productividad del maíz.

Bibliografía:

Azcón-Bieto., Fundamentos de fisiología vegetal, Ediciones Manuel Talón, Ed.Mc Graw-Hill. pp 65-82, (2000).

Bálza A.M., Vázquez R. J. and Sánchez E., DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135: 416-421, (1989).

Beercraft P.W. Receptor kinase in plant development. *Trends Plant Sci.* 3:384-388, (1998).

Bewley J.D. and Black M., Cellular events during germination and seedling growth In : *Seeds: Physiology of Development and Germination.* 2nd. Edition (1994), Plenum Press, New York, pp. 147-196, (1994).

Bewley J.D. and Marcus A., Gene expression in seed development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38: 165-193, (1990).

Bewley J.D., Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066, (1997).

Bradford K.J., Water relation in seeds germination. In: *Seed Development and Germination,* Marcel Dekker, New York, pp. 351-396, (1995).

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, (1976).

Chuan L., Osteogenic protein-1-mediated insulin like growth factor gene expression in primary cultures of rat osteoblastic cells. *Endocrinology.* 137:1921-1931, (1996).

Collier E. and Watkinson A., Partial purification and characterization of an insulin like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* 262:6238-6247, (1987).

Dinkova T.D. and Sánchez E., Differential expression and regulation of translation initiation factor -4E during maize germination. *Physiol. Plant.* 107: 419-425, (1999).

Domes J. and Van de Walle C., Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of embryonic axes from maize. *Physiol. Plant.* 79: 289-296, (1990).

Gabbitas and Boen., Morphogenic protein-2 inhibits the synthesis of insulin-like growth factors-binding protein-5 in bone cell cultures. *Endocrinology,* 136: 2397-2403, (1995).

García C., Aislamiento y caracterización de una proteína semejante a la insulina, presente en tejidos de maíz y su relevancia en la germinación y el desarrollo. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 24-24 y 36-40, (2001).

Gardner, C.O., An evaluation of effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. *Crop Sci.* pp: 241-245, (1961).

Goodman D.B and Davis W.L., Insulin accelerates the post germinative development of several fase storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 440-446, (1993).

Guy P.A. and Black M., Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigor. *Seed Sci. Res.* 8: 99-111, (1998).

Hall K., Brismor K. and Thoren M. Update on somatomedin. *Acta Pediatric. Scand.* 347 (suppl): 87-92, (1988).

Hirano H. and Kagawa H., Characterization of protein of released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry* 31: 731-735, (1992).

Howard B., Estadística paso a paso, Ed. Trillas, México, pp: 109-111, (2001).

Humel R.E., Insulin growth factors I and II. *J.Biochem.*190. pp: 445-462, (1990).

Ilgoutz SC, Knittel N, Lin JM, Sterle S. and Gayler KR Transcription of genes for conglutin gamma and leginsulin-like protein in narrow-leafed lupin. *Plant Mol. Biol.* 34:613-627, (1997)

Jones J. and Clemmons D., Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrin Rev.* (suppl) 16,1: 3-34, (1995).

Justo A., Fundamentos de estadística, Ediciones Daimon, México. Pp :9-52, (1991).

Kigel J. and Galili G., Seed Development and Germination. Marcel Dekker, Inc. New York p. 273, (1995).

Lebninger A., Principles of Biochemistry . Worth publishers, 9a Ed. New York, Pp.761-782, (1999).

Lindsey K., Casson S. and Chilley P, Peptides: New signalling molecules in plant. *TRENDS in Plant science* 2, pp: 78-83, (2002).

Lozano J., Efecto del estrés por frío en la elaboración de las isoformas de RA en plántulas de maíz (*Zea mays*, L) importancia de esta relación en la actividad de chaperona molecular. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, (2004).

Montgomery D. Diseño y análisis de experimento, 2a edición, Editorial Limusa, pp: 26-28, (2002).

Molina J., Selección Masal Visual Estratificada en Maíz: Manual interno de el Colegio de postgraduados, Montecillo, México, Centro de Genética, p.p. 5-35, (1983).

Morales A., Determinación de Rubisco y Rubisco activasa en diversos ciclos de selección en maíz var. Zacatecas 58. Tesis de Maestría, Colegio de postgraduados, Montecillo, México, p.p. 1-12 y 32-47, (1998).

Murashige T and Skoog, C. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol Plant.* 15, pp: 473-497, (1962).

Oliviera A.E.E. and Elenier A.A.O., Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein and Peptide Letters*, 6: 15-21, (1999).

Pramanick S.K., Krochko J.E. and Bewley J.D., Distribution of cytosolic mRNAs between polysomal and ribonucleoprotein complex fractions in alfalfa embryos. *Plant Physiol.* 99: 1590-1596, (1992).

Rechler M.M. and Clemmons D.R., Regulatory action of insulin like growth factor-binding proteins. *Trends in Endocrinol. Metabolism* 9: 176-183, (1998).

Reyes J. J., Estudio sobre el posible mecanismo de acción de la Benzil -Adenina en la estimación de de la síntesis de ADN y la división celular de ejes embrionarios de maíz. Tesis de Maestría en C.B., UNAM, México, D.F. p.p. 3-9, (1991).

Ricón G.M, Caracterización de partículas ribonucleoproteicas en ejes quiescentes de maíz. Tesis de Maestría en C.B. UNAM. México, D.F. p.p. 20-23, (1997).

Robinson S.P. and Portis A.R., Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* 268 : 93-99, (1988).

Rober-Kleber N., Albrechtova J., Fleig S., Huck N., et al. Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.* Pp:1302-1313, (2003).

Russell W.E. and Van Wik J.J., Peptide growth factors. In *Endocrinology.*: De Groot Ed. Philadelphia: WB Saunders; pp. 2504, (1989).

Salisbury F.B and Ross C.W., Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana, pp.25-30, (1994).

Salvucci M.E., J.M. Werneke, W.L. Ogren and A.R. Portis. Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiol.* 84: 930-936, (1987).

Sánchez L., Actividad de bombeo de H⁺ por la ATPasa de la membrana plasmática en embriones de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría en C.B. México D.F. p.p. 3-18, (1998).

Sánchez E., Aguilar R. and López S., Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99 : 445-45, (1981).

Sánchez E. and Aguilar R., Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant. Physiol.* 75 : 231-234, (1984).

Sánchez-M D., Puigdomenenech P. and Pagés M., Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination in maize. Plant Physiol. 82: 543-549, (1986).

Sánchez de J.E., E Beltrán and Ortiz-L. A., Insulin stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. Physiol. Plant. 105: 148-154, (1999).

Spielgel S. and Marcus A., Polyribosome formation in early wheat embryo germination is independent of either transcription or polyadenylation. Nature 256: 228-230, (1975).

Steller A.M., Delgado H.C. and Zou Z., Insulin-like factor II mediates epidermal growth factor-induced mitogenesis in cervical cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci 92: 1190-1974, (1995).

Taiz L. and Zeiger E., Plant Physiology. Ed. Sinaver Assoc. pp. 56-57, (1998).

Venâncio T.M., Oliveira A.E.A., Silva L.B., Machado O., Fernández K. and Xavier-Filho. A protein with aminoacid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna Unguiculata* (cowpea), Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 36:1167-1173, (2003).

White C. and Rivin C., Gibberelins and seed development in maize II. Gibberelin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos, Plant Physiol. 122: 1089-1098, (2000).

Xavier-Filho J., Oliveira A., Belarmino da Silva L., Rocha C., Motta V., Lima O., Oliva M., Valevski K and Xavier-Neto. Plant insulin or glucokinin: a conflicting issue. Braz. J. Plant Physiol. 15(1), pp:67-78, (2003).

Banco de datos de internet

Beraldi O., Agronoticias, (2002).

http://www.rosario.com.ar/agronoticias/archivos/dest_d.htm

Lebravo., (2001).

http://www.ndec.cl/~lebravo/Ejercicios_Gitias_practico6.doc

Lopategui E., Universidad Interamericana de PR - Metro, Facultad de Educación, Dept. de Educación Física, (2002).

<http://www.saludmed.com/Documentos/C11Q.html>

Cattani A., (1999).

http://escuela.med.puc.cl/paginas_publicaciones_ManualPed_CrecDess.html

Manrique K., Depto. de Mejoramiento y Recursos Genéticos, Centro Internacional de la Papa, (2003).

<http://www.redepapa.org/kunr.pdf>

Nadal A., Biodiversidad, sustento y culturas, "el caso del maíz mexicano en NAFTA: Variabilidad genética y liberación comercial, (2000).
<http://www.grain.org/sp/publications/biodiv241-sp-p.html>

Perossé P., Semillas, un punto de vista agronómico, Primera Edición. Córdoba - Argentina. Educación, Ciencia y Cultura para todos, (2002).
<http://www.semilla.cyta.com.ar/caracteristicas/caracteristicas.htm>

Apéndice

Tabla 1.- SOLUCIONES CONCENTRADAS (100x) DEL MEDIO MS.

NOMBRE DEL COMPUESTO	FORMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
MICRONUTRIENTES.				
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	1900	18.792
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	1630	20.813
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	440	2.993
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .H ₂ O	246.498	370	1.501
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	138.09	170	1.249
Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	149.01	16.9	9.999 x 10 ⁻³
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.60	0.0299
Acido Borico	H ₃ BO ₃	61.86	6.20	0.1002
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.999 x 10 ⁻³
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	25 µg	0.1 µM
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.93	25 µg	1.03 µM
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	25 µg	0.105 µM
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.038	25.83	0.0999
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.30	37.24	0.1002
AMINUAACIDOS				
Glicina	C ₂ H ₃ NO ₂	75.07	2.0	0.0366
VITAMINAS				
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555
Triamina-HCl	C ₇ H ₁₃ N ₃ Cl.Na ₂ .HCl	337.3	0.1	2.964 x 10 ⁻⁴
Ac. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.3	4.062 x 10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₂ .HCl	205.6	0.3	2.43 x 10 ⁻³

Clasificación de las muestras en función de la cantidad del péptido Zm-IGF

En todas las muestras del ciclo de selección Zo, una vez que se determinó la concentración del péptido Zm-IGF en lotes de semillas de cada mazorca, se ordenaron las magnitudes del péptido en forma decreciente y además, en función de éstas, se determinaron rangos de concentraciones, los cuáles se clasificaron de acuerdo a la siguiente nomenclatura:

- Muy alta concentración: (M).
- Alta concentración: (A).
- Regular concentración: (R).
- Pésima concentración: (P).

Esto tiene por finalidad facilitar el diseño de experimento, el cual propone seleccionar las plantas de mayor y menor contenido de Zm-IGF para autopolinizarlas y demostrar si existe una correlación entre el contenido de éste factor y la productividad de la planta.

Tabla 2- Correlación: No. de planta /Cantidad del péptido Zm-IGF; Población Zo.

No. de Planta	Concentración $\mu\text{U}/\mu\text{L}$	Nomenclatura
72	904	M
75	895	M
77	867	M
68	822	M
61	781	M
91	663	M
97	593	M
78	553	A
84	530	A
62	525	A
26	514	A
96	513	A
40	507	A
94	486	A
99	482	A
95	473	A
64	464	A
66	442	A
79	436	A
38	404	A
54	386	R
36	381	R
43	374	R
37	369	R

No. de Planta	Concentración $\mu\text{U}/\mu\text{L}$	Nomenclatura
1	348	R
63	344	R
86	329	R
80	325	R
82	313	R
37	288	R
67	283	R
27	279	R
12	261	R
90	260	R
69	243	P
17	229	P
11	220	P
18	218	P
19	201	P
89	196	P
9	195	P
7	180	P
49	159	P
8	143	P
42	138	P
3	113	P
6	57	P
4	51	P
10	41	P

Tabla 3: Selección de semillas en función de parámetros bioquímicos.

Clasificación: M—Muy alta cantidad

A—Alta cantidad

R—Regular cantidad

P—Pésima cantidad

1er letra—Rubisco activasa (Datos no mostrados)

2da letra—Factor ZmIGF

Semillas dañadas(*)

Por insectos: 59,65, 70 y 83

Por Hongos: 71

Aspecto chupado-amarillento: 81 y 33

Extracto viejo: 23

Clasificación	No. Planta	Peso de la mazorca (g)	Factor Zm-IGF $\mu\text{U}/\mu\text{L}$
MM	*59	62	456
	61	101	780
	*65	50	506
	96	68	512
	97	64	594
MA	66	106	442
	95	77	474
	99	94	482
AM	*70	72	706
	77	54	866
AA	40	90	506
	51	76	368
	54	89	386
	94	87	486
RP	3	76	114
	4	82	52
	6	103	58
	8	101	144
	9	64	196
	*33	84	250
	42	105	138
	69	85	244
PR	*71	115	336
PP	*23	94	Extracto viejo
	*81	56	36
	*83	86	188