



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE LOS EVENTOS BIÓTICOS Y ABIÓTICOS
QUE ESTIMULAN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEASA DE
RUBISCO ACTIVASA (PROT-RA) EN MAÍZ**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN QUÍMICA
P R E S E N T A :
KATHIA L. JIMENEZ MONROY



MÉXICO, D.F.,

2008



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.

J U R A D O A S I G N A D O :

P R O F E S O R E S

Presidente: **Estela Sánchez Quintanar**

Vocal: **Homero Hernández Montes**

Secretario: **Rogelio Rodríguez Sotres**

1er sup. **Luis Tonatiuh Sánchez Linares**

2do sup. **Martha Patricia Coello Coutiño**

Esta tesis de Licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez, en el L-103 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora: Dra. Estela Sánchez Quintanar

Sustentante: Kathia L. Jiménez Monroy

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi **familia**, por su fe y apoyo incondicional en cada dificultad que he atravesado durante toda mi vida.

Gracias papá y mamá por haberme apoyado en obtener mi carrera y adentrarme en el placer del conocimiento, el cual no tiene ahíto. A mis hermanos, Cyn por su apoyo y exigencias, a Miguel por estar siempre ahí, ya que ambos supieron enseñarme a su manera la forma de alcanzar mis sueños.

A mi Abuelita: esta tesis y las que vienen son gracias a ti.

A la familia González Monroy: tía Luzma, tío Honorio, Pablín, Sol, Alfonso, Dari, Honi y familia, porque han logrado transmitirme su fortaleza y ayudarme a encontrar el lado bueno de las cosas aún en las situaciones más adversas.

Alex, me encuentro profundamente agradecida contigo porque no te has separado de mi lado, me has ayudado a no renunciar cuando todo parece estar mal y me has brindado luz cuando todo parece estar oscuro. Gracias Laura, José y Luis, por escucharme, motivarme y apoyarme en todo momento.

Quiero agradecer también a mis amigos, que son el mejor tesoro:

- ★ Dianis, eres mi compañera de aventuras, nunca perdiste la fé en mí y me has apoyado siempre.
- ★ Alan, a pesar de habernos conocido poco en la carrera me permitiste acercarme y formar esta increíble amistad, contigo he confirmado que no existe la casualidad.

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por su infinita paciencia y sus sabios consejos.

Al M. en C. Raúl Aguilar Caballero por su siempre oportuna experiencia.

A los miembros del L-103 y del departamento de Bioquímica, amigos entrañables y consejeros en todas las áreas científicas y humanas: César, Sara, Julissa, Susana, Augusto, Carlos, Edson, César, Chayito y Normita.

A los doctores del departamento de Bioquímica: Tzevtanka Dimitrova, Martín Vargas, Rogelio Rodríguez y Eleazar Martínez, muchísimas gracias por su invaluable ayuda.

También agradezco infinitamente a la profesora Guadalupe Vélez Pratt que ha tenido a bien permitirme ser su alumna, contagiarme con su gran amor por la Bioquímica y estimularme para realizar más estudios en esta rama científica.

Por último pero no menos importante, gracias a la U.N.A.M. y en especial a la Facultad de Química. Es un gran honor poder ser parte de este gran mundo de la ciencia y haber podido convivir con tan excelentes colegas y docentes.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Tabla de contenido.....	i
Lista de ilustraciones.....	iii
Agradecimientos.....	vi
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
I. Antecedentes.....	1
1.1. Generalidades del maíz.....	1
1.1.1. Aplicaciones del maíz.....	2
1.1.2. Producción mundial.....	3
1.2. Rubisco y su función biológica.....	4
1.3. Rubisco activasa y su función bioquímica.....	11
II. Planteamiento del problema.....	13
Objetivos.....	13
III. Material y métodos.....	14
3. 1. Material biológico.....	14
3.2. Tratamientos abióticos.....	15
3.3 Tratamientos bióticos.....	15
3.4. Purificación de polipéptidos de RA a partir de hojas de espinaca para la obtención de anticuerpos.....	16

3.5. Obtención de anticuerpos de conejo.....	17
3.6. Extracción de RA a partir de hojas de maíz.....	17
3.7. Transferencia de proteínas.....	18
3.8. Western Blot.....	18
3.9. Revelado.....	19
IV. Resultados.....	20
V. Discusión.....	37
VI. Conclusiones.....	39
Referencias bibliográficas.....	40
Bibliografía.....	48

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración número	Página
Figura 1. Principales importadores de maíz.....	3
Figura 2. Perspectiva esquemática del ciclo de Calvin.....	5
Figura 3. Perspectiva esquemática de los procesos de formación de carbohidratosy la regeneración de RuBP...	6
Figura 4. Diferencias estructurales entre las hojas de las plantas C3 y C4.....	8
Figura 5. Reacciones del ciclo C4.....	9
Figura 6. Etapas de crecimiento.....	14
Figura 7. Columna tipo Sefadex G-25.....	21
Figura 8. Columna de intercambio aniónico tipo Q-Sefarosa.....	22
Figura 9. Electroforesis desnaturizante tipo SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico tipo Q-Sefarosa.....	23
Figura 10. Título de anticuerpos realizado mediante la técnica tipo ELISA-Dot.....	25
Figura 11. (A) Electroforesis desnaturizante tipo SDS-PAGE teñido con Azul de Coomasie al 2% (B) Western	

Blot del gel desnaturalizante duplicado.....	26
Figura 12. Electroforesis desnaturalizante teñido con Azul de Coomasie al 2% del experimento abiótico por estrés de calor a 44°C.....	27
Figura 13. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento de calor y su control.....	28
Figura 14. Electroforesis desnaturalizante teñido con Azul de Coomasie al 2% del tratamiento abiótico de frío a 4°C durante 5 días intercalados.....	29
Figura 15. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del experimento del tratamiento con frío y su control.....	30
Figura 16. Electroforesis desnaturalizante teñido con Azul de Coomasie al 2% del tratamiento de baja intensidad lumínica.....	31
Figura 17. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento de baja intensidad lumínica y su control.....	32
Figura 18. Electroforesis desnaturalizante teñido con Azul de Coomasie al 2% del tratamiento con oscuridad.....	33

Figura 19. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento con oscuridad y su control.....	34
Figura 20. Electroforesis desnaturalizante teñido con Azul de Coomasie al 2% del experimento de ciclo circadiano.....	35
Figura 21. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento de ciclo circadiano.....	36
Tabla 1. Descripción de las etapas de purificación realizadas para la purificación de los polipéptidos de R.A. en espinaca	20
Tabla 2. Esquema de inmunización realizado con los polipéptidos de R.A. purificados de espinaca.....	24

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi **familia**, por su fe y apoyo incondicional en cada dificultad que he atravesado durante toda mi vida.

Gracias papá y mamá por haberme apoyado en obtener mi carrera y adentrarme en el placer del conocimiento, el cual no tiene ahíto. A mis hermanos, Cyn por su apoyo y exigencias, a Miguel por estar siempre ahí, ya que ambos supieron enseñarme a su manera la forma de alcanzar mis sueños.

A mi Abuelita: esta tesis y las que vienen son gracias a ti.

A la familia González Monroy: tía Luzma, tío Honorio, Pablín, Sol, Alfonso, Dari, Honi y familia, porque han logrado transmitirme su fortaleza y ayudarme a encontrar el lado bueno de las cosas aún en las situaciones más adversas.

Alex, me encuentro profundamente agradecida contigo porque no te has separado de mi lado, me has ayudado a no renunciar cuando todo parece estar mal y me has brindado luz cuando todo parece estar oscuro. Gracias Laura, José y Luis, por escucharme, motivarme y apoyarme en todo momento.

Quiero agradecer también a mis amigos, que son el mejor tesoro:

- ★ Dianis, eres mi compañera de aventuras, nunca perdiste la fé en mí y me has apoyado siempre.
- ★ Alan, a pesar de habernos conocido poco en la carrera me permitiste acercarme y formar esta increíble amistad, contigo he confirmado que no existe la casualidad.

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por su infinita paciencia y sus sabios consejos.

Al M. en C. Raúl Aguilar Caballero por su siempre oportuna experiencia.

A los miembros del L-103 y del departamento de Bioquímica, amigos entrañables y consejeros en todas las áreas científicas y humanas: César, Sara, Julissa, Susana, Augusto, Carlos, Edson, César, Chayito y Normita.

A los doctores del departamento de Bioquímica: Tzevtanka Dimitrova, Martín Vargas, Rogelio Rodríguez y Eleazar Martínez, muchísimas gracias por su invaluable ayuda.

También agradezco infinitamente a la profesora Guadalupe Vélez Pratt que ha tenido a bien permitirme ser su alumna, contagiarme con su gran amor por la Bioquímica y estimularme para realizar más estudios en esta rama científica.

Por último pero no menos importante, gracias a la U.N.A.M. y en especial a la Facultad de Química. Es un gran honor poder ser parte de este gran mundo de la ciencia y haber podido convivir con tan excelentes colegas y docentes.

A B R E V I A T U R A S

ATP. Adenosin Trisfosfato

BTP. Bis tris propano

CA1P. 2-carboxiarabinitol 1-fosfato

DAS. Días después de la siembra (Days after sowing)

DMSO. Dimetil sulfóxido

DTT. Ditioneitol

EDTA. Etilendiamino tetraacetato

PMSF. Fluoruro de fenilmetilsulfonil.

ORF. Marco de lectura abierta (open reading frame)

prot-RA. Proteasa de Rubisco activasa

Rubisco. Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa

RA. Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa activasa

RuBP. Ribulosa-1,5-bifosfato.

rca. Gen de la Rubisco activasa.

U.D.O. Unidades de densidad óptica.

UTR. Región no traducida (untranslated region).

RESUMEN

Ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa oxigenasa activasa (Rubisco activasa, **RA**), es una enzima cloroplástica que actúa como chaperona molecular sobre Ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco).

Estudios previos realizados sobre el origen de los polipéptidos de 43 y 41 kDa de la RA en maíz, encontraron que a pesar de existir dos genes, *Zmra1* y *Zmra2*, ambos codifican para el mismo polipéptido de 43 kDa y mediante estudios realizados con anticuerpos diseñados se descubrió que ambos péptidos presentan la misma región carboxi-terminal pero difieren en su región amino-terminal, por lo que se propuso un mecanismo post-traduccional regulado por una proteasa de RA (prot-RA) putativa con acción sobre el polipéptido de 43 kDa originando a su vez el polipéptido de 41 kDa.

Este trabajo de investigación se realizó con la finalidad de identificar el tipo de eventos que tienen un efecto evidente en la mayor formación del polipéptido de 41 kDa y, en consecuencia, que estimulan la expresión de la prot-RA.

Para este propósito se experimentó sobre plántulas de 15 días en diferentes condiciones: altas y bajas temperaturas, baja intensidad lumínica y oscuridad.

Asimismo, se experimentó con el ciclo circadiano sobre plántulas en la segunda (L1, 8 días) y sexta etapa de crecimiento (L2, 15 días), cada una muestreada cada 4 hrs durante las 24 hrs.

De nuestros resultados, se pudo concluir que los eventos con mayor efecto sobre relación 43/41 kDa de RA la maíz son: las altas temperaturas, en este caso se sometió a la plántula a 44° C durante 24 hrs. y el ciclo circadiano durante la sexta etapa de crecimiento a las 8 y 20 hrs.

I. ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DEL MAÍZ.

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida» **(Lehman y Kutsher, 1979)**.

Botánicamente, el maíz (*Zea mays L.*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Es una especie que se reproduce por polinización abierta. La flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiga) se hallan en distintos lugares de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado.

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad en México y América Central, de donde se difundió hacia el norte hasta el Canadá y hacia el sur hasta la Argentina. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas **(Bressani, 1972)**.

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas:

- a) Fase vegetativa. Se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales.
- b) Fase reproductiva. Se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos **(Daniel et al., 1977)**.

La planta ha adquirido características y diferencias morfológicas en las fases vegetativa y de reproducción, como consecuencia de la evolución, de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han adaptado a zonas ecológicas concretas, desarrollando características particulares, como por ejemplo la sensibilidad con respecto a la duración del día y a la temperatura, que limitan su adaptabilidad a zonas con diferente latitud y altitud. Por tanto, se deben realizar programas de mejora en las zonas en que se van a cultivar las variedades mejoradas, aunque esto no significa, empero, que se puedan

obtener características genéticas específicas mediante retrocruzamiento (**Aguirre, Bressani y Scrimshaw, 1953**).

Esta variabilidad es de gran valor para mejorar la productividad de la planta y determinados elementos orgánicos del grano (**Chávez, 1973; Daniel et al., 1977**).

1.1.1 Aplicaciones del maíz

El maíz tiene tres posibles aplicaciones: alimento, forraje y materia prima para la industria. Como alimento, se puede utilizar todo el grano, maduro o no; o bien, se puede elaborar con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios. En lo que respecta a su aplicación como forraje, en los países desarrollados, más del 60 por ciento de la producción se emplea para elaborar piensos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes (**Johnson, Rooney, y Khan, 1980**).

A su vez, el aumento de los precios del petróleo ha impulsado la intensificación de las investigaciones sobre la fermentación del maíz para producir alcohol combustible, el cual tiene un uso muy difundido en algunas partes de los Estados Unidos. Con maíz fermentado se elaboran también algunas bebidas alcohólicas (**Leibovits y Ruckenstein, 1983**).

Por último, también tienen importancia las aplicaciones de los residuos de la planta de maíz, que se utilizan, entre otras cosas, como alimento para animales y como base para extraer diversos productos químicos de las panojas, como por ejemplo, furfural y xilosa. Estos residuos también tienen importancia como elementos para mejorar los suelos (**Onigbinde y Akinyele, 1989**).

1.1.2 Producción mundial

La superficie plantada con maíz pasó de 105 millones de hectáreas en 1961 (**El maíz en la nutrición humana, 1993. Colección FAO: Alimentación y nutrición, N° 25**) a 145,38 millones de hectáreas en el periodo 2005/06 (**Fuente: FAS, USDA. Proyecciones agrícolas 2006-2015. Febrero 2006**).

La producción creció significativamente debido en parte al aumento de las tierras cultivadas con el cereal, aunque sobre todo gracias a mejoras genéticas, a la aplicación de técnicas más eficientes y a la utilización de fertilizantes, así como a la introducción de variedades nuevas con mayor capacidad de reproducción.

En la **figura 1**, se muestran los principales importadores de maíz: Japón, Corea del Sur y México, de éste último se espera incremente sus importaciones hasta ocupar el segundo lugar en el periodo comprendido en 2009-2016, con la cantidad de seis millones de toneladas métricas en 2004-05 a trece millones de toneladas métricas importadas en 2015-16 (**Fuente: FAS, USDA. Proyecciones agrícolas 2006-2015. Febrero 2006**).

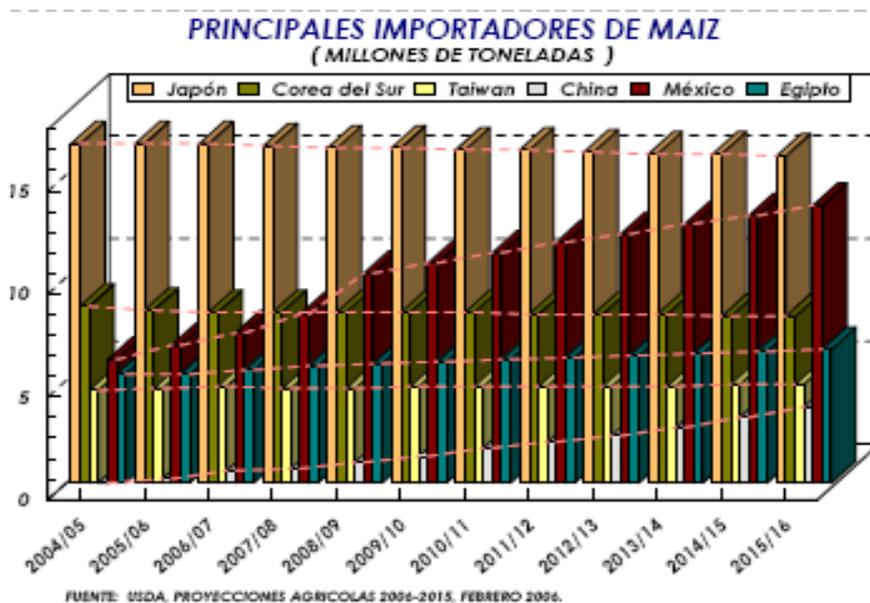


Figura 1. La barra en color rojo representa a México y su comportamiento en la importación de maíz con respecto a Japón y Corea del Sur, países que en la actualidad ocupan los primeros lugares en importaciones.

1.2 RUBISCO Y SU FUNCIÓN BIOLÓGICA

Los procesos fotosintéticos de las plantas superiores y algas se realizan a nivel de los cloroplastos. La división del trabajo dentro de un cloroplasto es sencilla. La absorción de la luz y todas las reacciones luminosas se producen dentro de las membranas tilacoides o sobre ellas. El ATP y el NADPH producidos por estas reacciones se liberan al estroma circundante, en donde se producen todas las reacciones oscuras de síntesis (**Mathews, van Holde, Ahern, 2002**).

La función de las reacciones oscuras es la de fijar el CO₂ atmosférico en los hidratos de carbono, utilizando la energía del ATP y el poder reductor (NADPH) generados en las reacciones luminosas. La fijación del dióxido de carbono se realiza mediante la adición de un CO₂ cada vez a una molécula aceptora (Ribulosa 1,5-bisfosfato, RBP) y el paso de la molécula a través de una serie cíclica de reacciones que se muestran esquemáticamente en la **figura 2**. Al conjunto de la serie se le denomina **ciclo de Calvin**, en honor de su descubridor (**Mathews, van Holde, Ahern, 2002**).

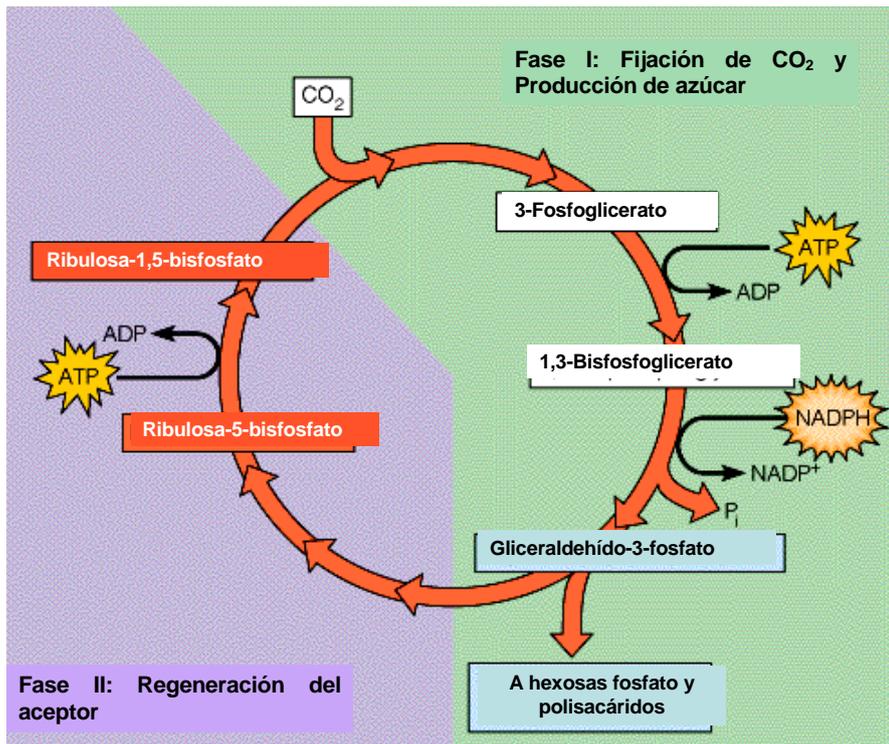


Figura 2. Perspectiva esquemática del ciclo de Calvin.

El ciclo de Calvin puede contemplarse como formado por dos fases. En la fase I, el dióxido de carbono se atrapa en Ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) en forma de carboxilato y se reduce al nivel de aldehído-cetona que se encuentra en los azúcares, con lo que se produce una síntesis neta de hidratos de carbono. La fase II está dedicada a la regeneración de RBP (Figura 3).

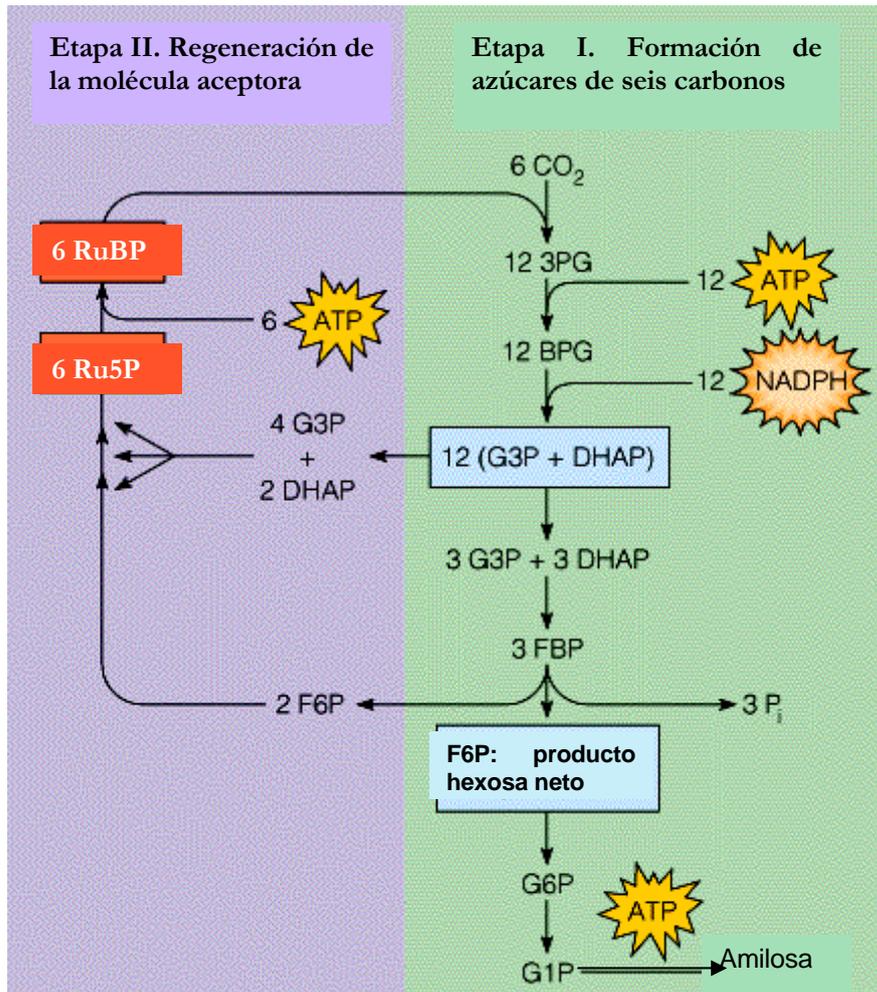


Figura 3. Perspectiva esquemática de los procesos de formación de carbohidratos y la regeneración de RuBP.

La enzima central de las reacciones oscuras, la Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), se estimula por un pH elevado, por el CO_2 y el Mg^{2+} (Miziorko y Lorimer, 1983).

La enzima cloroplástica Rubisco consiste en ocho copias de la subunidad grande (LSU, ~53 kDa) y ocho copias de la subunidad pequeña (SSU, ~14 kDa). La subunidad grande forma un centro octamérico asimismo las subunidades pequeñas forman dos capas de cuatro subunidades cada una, en sitios opuestos del centro octamérico. El gen para la SSU (*rbcS*) se encuentra en el núcleo y la LSU se codifica por el gen *rbcL* en el plástido. La síntesis de esta enzima, tal vez la más abundante en el planeta, requiere de la expresión de genes contenidos en dos genomas y la coordinación de tres compartimientos subcelulares: núcleo, citosol y cloroplasto **(Buchanan, Grusisem y Jones, 2000)**.

Rubisco es la enzima que cataliza la fijación de CO₂ por Ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) para formar dos moléculas de ácido D-fosfoglicérico (PGA). También, inicia la fotorrespiración catalizando la reacción con oxígeno usando también RuBP para formar una molécula de fosfoglicolato y otra de PGA. Las reacciones de carboxilación y oxigenación se realizan en el mismo sitio activo de la enzima y tanto el CO₂ como el O₂ son sustratos competitivos **(Andrews y Lorimer, 1978)**. La evolución en varios ambientes, por lo general calientes o deficientes en carbono inorgánico disponible (CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻), ha dado como resultado organismos fotosintéticos que pueden concentrar CO₂ en células u organelos que contienen Rubisco **(Parry *et al.*, 2003)**. Las plantas terrestres que tienen un mecanismo de concentración de CO₂, llamadas plantas C₄, introdujeron una ruta adicional fotosintética que ayuda a conservar el CO₂, evitando la fotorrespiración y se le llama ciclo C₄ porque involucra la incorporación de CO₂ a un intermediario de cuatro carbonos (oxalacetato; **figura 4**).

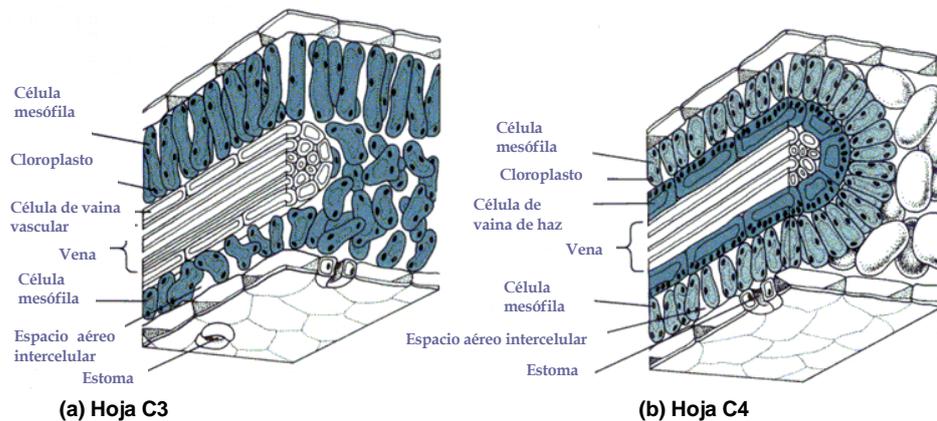


Figura 4. Diferencias estructurales entre las hojas de las plantas C3 y C4. Los estomas son orificios a través de los cuales la hoja intercambia gases y vapor de agua con el entorno. (a) Plantas C3. En las plantas C3, la fotosíntesis del ciclo de Calvin se produce en su mayor parte en las células mesófilas. (b) Plantas C4. En las plantas C4 las células mesófilas realizan el ciclo C4. Los compuestos C4 se ceden posteriormente a las células de haces vasculares especializados, en donde tiene lugar la mayor parte de la fotosíntesis del ciclo de Calvin.

Las plantas C4 concentran su fotosíntesis del ciclo de Calvin (C3) en *células de los haces vasculares especializados* que se encuentran justo debajo de una capa de células mesófilas. Estas últimas células, que están expuestas más directamente a CO₂ externo, contienen las enzimas del ciclo C4. Esta ruta es un mecanismo esencial para atrapar CO₂ en un compuesto de cuatro carbonos oxalacetato y transmitirlo a las células de vainas de haces para su uso en el ciclo de Calvin.

La clave de la eficacia de las plantas C4 es que la enzima de fijación de CO₂ usada en esta ruta es PEPcase (fosfoenol piruvato carboxilasa), carece de la actividad oxigenasa que presenta Rubisco y tiene mucha menor K_M para CO₂. Así pues, incluso en condiciones de alta concentración de O₂ y baja concentración de CO₂, las células del mesófilo continúan bombeando CO₂ hacia las células de vainas de haces que realizan la fotosíntesis. Este proceso ayuda a mantener unas concentraciones de CO₂ suficientemente elevadas en las células de la vaina vascular, favoreciendo la fijación y reduciendo la fotorrespiración.

Además, si la fotorrespiración llega a ocurrir, el CO₂ que es liberado en tal proceso puede recuperarse en gran parte en las células del mesófilo circundantes y devolverse al ciclo de Calvin (figura 5; Mathews, van Holde y Ahern, 2002).

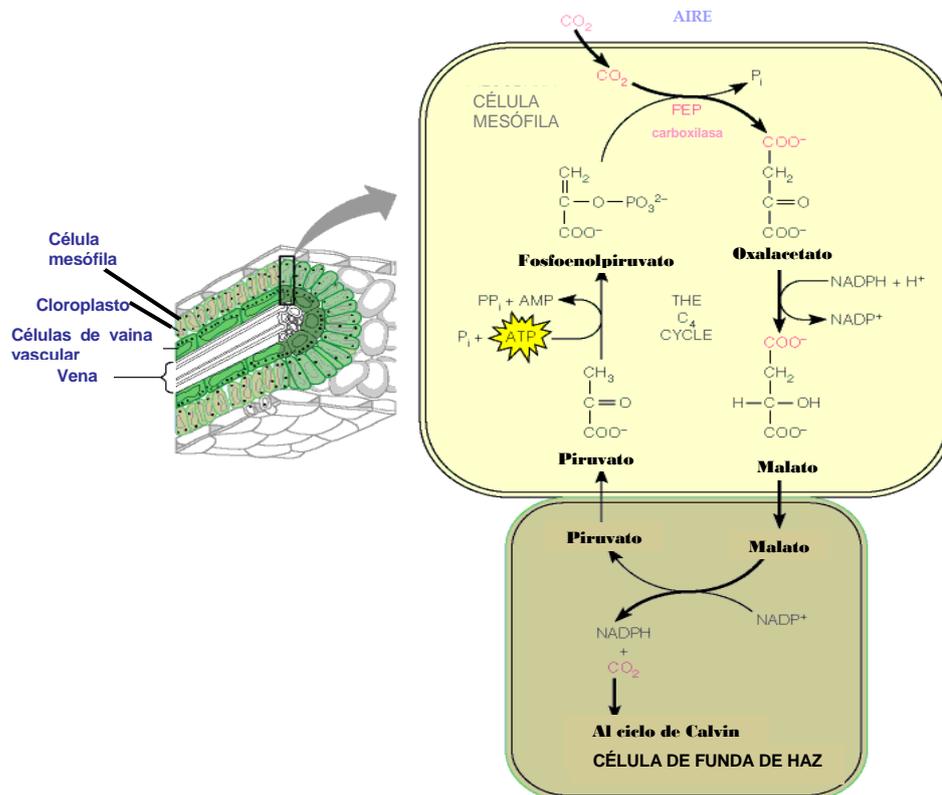


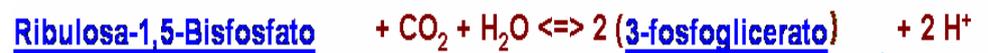
Figura 5. Reacciones del ciclo C4. El CO₂ se transporta desde las células del mesófilo a las células de vainas de haces mediante su acoplamiento al fosfoenolpiruvato, formando oxalacetato. El oxalacetato se reduce a continuación a malato, que se transfiere a las células de la vaina vascular y se descarboxila. El piruvato producido se devuelve a las células del mesófilo, en las que se fosforila para regenerar el fosfoenolpiruvato.

La gran atención que han recibido las plantas tipo C-4 surgió, en gran parte, a causa de la importancia económica de algunas de ellas y debido a que, bajo irradiación elevada y temperaturas calurosas, son capaces de fotosintetizar con mayor rapidez y producir mucha más biomasa que las plantas C-3. Las investigaciones de la ruta C-4 también nos han enseñado mucho acerca de las limitantes para la fotosíntesis en plantas C-3, además de que han impulsado el conocimiento ecológico general sobre los factores que controlan la productividad en diversos climas (Salisbury, 1992).

La estricta regulación de Rubisco es mediada por factores como luz, estado metabólico, medio ambiente, disponibilidad de CO₂ y presencia de factores oxidantes, lo cual repercute en la velocidad de asimilación del carbono. Adicionalmente en el caso del maíz la velocidad de síntesis de Rubisco es también regulada durante el desarrollo temprano de plántulas (Loza-Tavera, 1992; Lea y Leegood, 1993).

En el siguiente esquema se ven representadas las 2 reacciones (carboxilación y oxigenación) que cataliza Rubisco:

Carboxilación:



Oxigenación:



1.3 RUBISCO ACTIVASA Y SU FUNCIÓN BIOQUÍMICA.

Rubisco activasa (RA) es una chaperona molecular (**Sánchez-de-Jiménez, 1995; Neuwald A.F. et.al, 1999**) presente en maíz, formada por dos polipéptidos de 43 y 41 kDa, los cuales son codificados por dos genes diferentes que sin embargo comprenden una región idéntica de ORF, correspondiente al polipéptido de 43 kDa de RA y sus transcritos no muestran sitios putativos de “splicing” (**Ayala-Ochoa et al., 2004**). Para determinar el origen del polipéptido de 41 kDa se realizó la traducción *in vitro* de mRNA de poly A⁺ de hojas con lo que se demostró que la síntesis *de novo* se realiza sólo para el polipéptido de 43 kDa de RA. (**Vargas-Suárez M., et al., 2004**).

RA promueve la carbamilación de Rubisco en presencia de RuBP u otros compuestos fosforilados que se unen fuertemente a la forma no carbamilada. Esto probablemente explica como Rubisco puede activarse rápidamente después de un incremento de intensidad de luz, a pesar de tener altas concentraciones de RuBP en el estroma. Aún más, la completa activación de Rubisco a niveles de CO₂ normales en presencia de RA probablemente ayuda para lograr los elevados estados de activación, comúnmente observados *in vivo* a elevadas intensidades de luz (**Lorimer, 1981**).

El control regulatorio de Rubisco por el estado de carbamilación puede reducirse también con baja luz. El control de la carbamilación puede volverse ineficiente en condiciones de baja luz debido a los niveles de CO₂, cierta fracción de sitios activos serán descarbamilados, aún en presencia de RA funcional (**Sage et al., 1990**).

ADP es un potente inhibidor de la actividad de RA y la actividad de RA es sensible a la relación de ATP/ADP *in vitro*. La relación de ATP/ADP en el estroma supondría que cambiará con las variaciones de luz y CO₂ y esto podría explicar muchas de los cambios observados en la activación del estado de activación de Rubisco *in vivo* (**Portis, 1990**).

Los estudios anteriores realizados en este laboratorio proponen un mecanismo para explicar la presencia del péptido de 41 kDa, el cual consiste en que el polipéptido de 41 kDa proviene del polipéptido de 43 kDa a través de una proteólisis regulada en la región amino-terminal del péptido mayor. Esto provocaría las variaciones en la relación de polipéptidos de 43/41 kDa de RA en las hojas a diferentes etapas del desarrollo. Esta relación es importante porque modifica la actividad chaperona de RA. En este trabajo realizado en maíz se identificó que la mejor actividad como chaperona molecular la presenta el polipéptido de RA de 41 kDa, cuya expresión resultó ser mayoritaria ante la situación de estrés por agua y durante el verano (**Vargas-Suárez *et al.*, 2004**).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Congruente con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, el contenido total de RA en el maíz es regulado por un mecanismo dependiente de las señales del desarrollo y del medio ambiente.

De acuerdo al mecanismo propuesto, se esperaría que la proteasa específica que hace el corte del péptido de 43 kDa fuere activada por factores bióticos y/o abióticos. La importancia de obtener una relación favorable a 41 kDa significaría una mayor actividad de Rubisco activasa y por tanto una mayor fijación de CO₂.

OBJETIVOS

Generales:

- Identificar qué tipo de tratamientos bióticos y/o abióticos afectan la expresión de la proteasa de Rubisco Activasa que origina el polipéptido de 41 kDa de Rubisco Activasa.

Particulares:

- Purificar RA (espinaca) y preparar anticuerpos contra esta proteína
- Probar el efecto de diferentes formas de estrés, bióticos o abióticos, en la relación 43/41 kDa y determinar cuantitativamente la relación de los polipéptidos en función de los factores bióticos y abióticos.
- Identificar los factores o las condiciones en las que la formación del polipéptido de 41 kDa es mayoritaria.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se sembraron en invernadero semillas de maíz de la variedad Chalqueño (*Zea mays* L.). Se utilizó como referencia las etapas de crecimiento establecidas por Loza-Tavera (fig. 6, 1990). Para estudiar los tratamientos abióticos se estandarizó el muestreo de la segunda y cuarta hojas a las 17 hrs. durante la 6ª etapa de crecimiento (15 DAS). En el caso de los eventos bióticos el muestreo se realizó cada 4 horas durante 24 hrs. en la 2ª (8 DAS) y 6ª etapa de crecimiento (15 DAS).

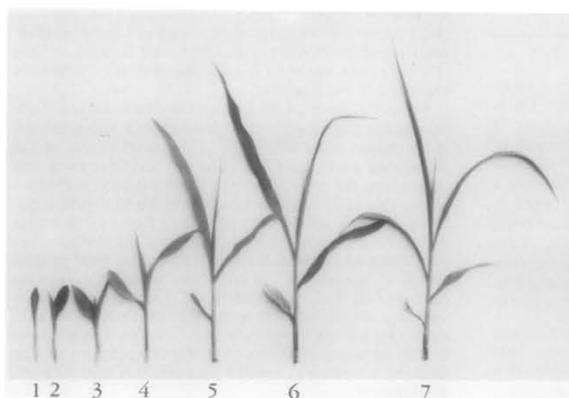


Figura 6. Etapas de crecimiento. Etapa 1 = La 1ª hoja no tiene la lígula expuesta y la 2ª hoja se encuentra enrollada, aproximadamente 6 días después de la siembra (DAS). Etapa 2 = La 1ª hoja muestra la lígula pero no está completamente expuesta; la 2ª hoja está enrollada en la base pero abierta en la punta. Aproximadamente 7 DAS. Etapa 3 = La 1ª hoja tiene la lígula expuesta mientras que en la 2ª hoja, la lígula está al nivel de la primera pero no está expuesta; la punta de la 3ª hoja se puede observar. Aproximadamente 8 DAS. Etapa 4 = la 1ª y la 2ª hojas tienen la lígula expuesta; la 3ª hoja se expande por encima de la parte media; la punta de la 4ª hoja se observa. Aproximadamente 10 DAS. Etapa 5 = la 1ª y 2ª hojas tienen la lígula expuesta; la 3ª hoja se ha expandido casi por completo pero la lígula no está expuesta; la 4ª hoja está medio expandida. Aproximadamente 12 DAS. Etapa 6 = la 1ª, 2ª y 3ª hojas tienen expuesta la lígula; la 4ª hoja está casi expandida por completo; la 5ª hoja muestra la punta; la 1ª hoja muestra signos de senescencia en la punta. Aproximadamente 15 DAS. Etapa 7 = de la 1ª a la 4ª hojas tienen la expuesta la lígula; la 5ª hoja está casi expandida por completo; la 6ª hoja muestra la punta; la 1ª hoja es senescente por completo; la 2ª hoja muestra signos de senescencia en la punta. Aproximadamente 17 DAS.

3.2 TRATAMIENTOS ABIÓTICOS.

Efecto de la temperatura: Se colocó un lote A de plantas a 21-23° C y después de 14 días se sometió a estrés a una temperatura de 44° C durante un día. El lote B (control de alta temperatura) fue crecido 15 días entre 21-23° C. Para baja temperatura se creció un lote C entre 21-23° C durante 12 días seguido de 3 días a 4° C. El lote D (control de baja temperatura) fue crecido 15 días entre 21-23 ° C.

Efecto de la intensidad de la luz: Se empleó el lote K (baja intensidad de luz) a una intensidad de luz entre 146.76 y 91.25 μm de fotones $\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$ y un lote I (control de baja intensidad de luz) que fue crecido entre 537.55 y 210.05 μm de fotones $\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$, ambos lotes fueron colectados a los 15 días después de la siembra.

Efecto de oscuridad: se utilizó el lote M crecido en dos condiciones, durante los primeros 8 días a condiciones estándares del invernadero (537.55 y 210.05 μm de fotones $\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$) y los siguientes 7 días en total oscuridad (30.25 μm de fotones $\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$). Por último el lote N (control de oscuridad), que fue crecido durante 15 días a 185.86 μm de fotones $\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$.

3.3 TRATAMIENTOS BIÓTICOS.

Para los efectos bióticos se analizó el cambio de relación de RA de 43/41 kDa en plántulas de diferente etapa de desarrollo y durante el ciclo circadiano de 24 hrs. Se muestrearon plántulas a dos estadios de desarrollo (2ª y 4ª hoja respectivamente): L1, a los 8 días (2ª etapa) y L2, a los 15 días (6ª etapa de crecimiento). Cada lote se muestreó durante el día: a las 8, 12, 16, 20, 24 y 4 hrs. para observar cambios en la producción de la prot-RA durante el ciclo circadiano.

3.4 PURIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE RA A PARTIR DE HOJAS DE ESPINACA PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS. (Método de Robinson, 1988)

El siguiente procedimiento se realizó en el cuarto frío a -4°C . Se partió de aproximadamente 100 g de hojas de espinaca, los cuales fueron triturados con nitrógeno líquido, y se les agregó 200 mL de buffer de extracción {50 mM Bis-Tris-Propano, 10 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM NaHCO_3 , 5 mM EDTA, 1 mM Benzamidina, 1 mM PMSF, 10 mM DTT, a $\text{pH}=8.1$ }. La mezcla se dejó en agitación lenta durante 30 minutos y después se filtró a través de 4 capas Miracloth y 4 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 20000 g durante 45 minutos. Se colectó el sobrenadante y se precipitó la RA con sulfato de amonio hasta alcanzar un punto de saturación del 35% después se centrifugó a 12000 g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante que contenía en su mayoría Rubisco y se resuspendió el precipitado en un volumen mínimo del buffer A {10 mM Bis-Tris-Propano, 100 mM KCl, 10 mM DTT, 0.2 mM ATP, a $\text{pH}=7$ }. Se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford (**Bradford MM., 1976**) y se pasaron por una columna de exclusión molecular tipo Sefadex G-25 para remover las sales. Se colectaron 80 fracciones de 1.3 mL c/u, las cuales se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm, ubicando a las primeras fracciones como las de mayor contenido de proteína. Las fracciones colectadas se concentraron mediante el equipo de Speed Vacuum (HETOVAC, VR-1) y se diluyeron en un volumen de 1.3 mL total de buffer B (10 mM Bis-Tris-Propano, 10 mM DTT, 0.2 mM ATP, ajustar $\text{pH}=7$). Posteriormente se ultracentrifugó a 117000 g durante 1 hora. El sobrenadante se colectó y se sometió a diálisis. Después se cuantificó la proteína que pasó por la columna de intercambio iónico tipo Q-Sefarosa usando un gradiente de KCl entre 0 y 1 M. Se obtuvieron 55 fracciones c/u de 1.5 ml, de las cuales se juntaron las fracciones que eluyeron en el intervalo de 0.2 a 0.25 M y se verificó el grado de purificación mediante geles desnaturalizantes tipo SDS-PAGE al 10% junto con marcadores de peso molecular (Bio-Rad. Broad Range Molecular Weights).

Las fracciones identificadas con alto contenido de RA fueron de la 16 a la 18.

3.5 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS EN CONEJO.

Como control negativo de los anticuerpos anti-RA, previamente a la inmunización, se extrajeron 3 mL de sangre del conejo y se analizó mediante un Western Blot en donde la respuesta del suero fue inespecífica, descartando la presencia de estos anticuerpos.

El proceso de inmunización fue realizado en un conejo macho tipo New Zealand, vía ganglio poplíteo usando los polipéptidos purificados de espinaca para obtener anticuerpos anti-RA, en total se realizaron 2 inoculaciones con 13 días de diferencia entre ellas. La concentración de la muestra empleada fue de 0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se realizaron pruebas de capilares para comprobar la formación de anticuerpos después de 7 días y a los 28 días, para obtener el título final de anticuerpos, se empleó la técnica de ELISA-Dot.

Al final del proceso de inmunización se extrajeron 50 mL de sangre y mediante una centrifugación a 1300 g se obtuvieron 27 mL de suero inmune, el cual fue dividido en alícuotas y congelado a -71°C .

3.6 EXTRACCIÓN DE RA A PARTIR DE HOJAS DE MAÍZ.

Se pesaron aproximadamente 1 g de las muestras de hoja de maíz, las cuales fueron pulverizadas en un mortero con N_2 líquido, a continuación se agregaron 0.5 mL de buffer de extracción (100 mM Tricina-NaOH o 50 mM Bis-Tris-Propano, 10 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM NaHCO_3 , 5mM EDTA, 1 mM Benzamidina, 1 mM PMSF, 10 mM DTT) y se homogenizó la mezcla para verterse en tubos Ependorf de 1.5 mL. Después se centrifugaron los tubos a 19000 g en la centrífuga Beckman GS-15R durante 20 min. Se colectó el sobrenadante en otro tubo Ependorf de 1.5 mL y se emplearon 2 μL de cada muestra para cuantificar por medio del reactivo de Bradford (Bio-Rad) la cantidad de proteínas presentes por muestra.

Las muestras fueron congeladas a -71°C en el congelador tipo REVCO para su posterior análisis en geles desnaturalizantes tipo SDS-PAGE al 10% junto con marcadores de peso molecular, todos los geles se hicieron por duplicado para teñir con azul de Coomassie al 2% y el otro fue transferido a una membrana de PVDF para analizarlo por Western Blot.

3.7 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Para la transferencia de proteínas se aplicó el método de Kyhse- Anderson (1984) para sistemas semi-secos. Se prepararon tres buffers: buffer **ánodo I** (0.3M Tris, 10% Metanol, a pH=10.4), buffer **ánodo II** (0.025 M Tris, 10% Metanol, a pH=10.4) y buffer **cátodo** (0.025 M Tris-base, 0.04 M glicina o ácido 6-amino-n-caproico, 10% Metanol).

Se corta la membrana (Immobilion-P Transfer Membranas Millipore; tipo de filtro: PVDF. Tamaño de poro: 0.45 μm .) de un tamaño similar al gel y se hidrata.

El orden del sistema es el siguiente:

- a) Plato del electrodo cátodo
- b) 3 papeles filtro embebidos en buffer cátodo
- c) Gel desnaturalizante embebido máximo 15 min. en buffer cátodo
- d) Membrana embebida en buffer ánodo II
- e) 1 papel filtro embebido en buffer ánodo II
- f) 2 papeles filtro embebidos en buffer ánodo I.

El tiempo promedio para la transferencia de geles de $8.5 \times 5.5 \text{ cm}^2$ fue de 30 min. a 0.2 Amperes por membrana (5.5 mAmp/cm^2).

La membrana se almacena a 4°C para posteriormente hacer el Western Blot.

3.8 WESTERN BLOT

Después de hidratar la membrana primero 1 minuto en metanol y Lugo en agua destilada por 3 minutos, se le deja remojando por 30 min. en solución de TBS-T {0.15 M NaCl, 0.05 M Tris, 0.089mM Tween, a pH=7.4}.

Se puso el primer anticuerpo (anticuerpos anti-RA contra espinaca descrito anteriormente) en la primera solución de leche en polvo al 5% en TBS-T en una dilución de 1:20000. Se dejó en agitación constante por dos horas a 37°C . Transcurrido este tiempo se lavó 3 veces por 10 minutos c/u con TBS-T a temperatura ambiente.

Después se agregó el segundo anticuerpo (Zymed Laboratorios invitrogen immunotetection HRP-Goat anti-rabbit IgG (H+L) Conjugate) en leche al 5% en TBS-T a una dilución de 1:5000 en durante una hora en agitación constante.

Por último se repitió el lavado con solución TBS-T 3 veces por 10 minutos c/u.

3.9 REVELADO.

Las membranas se revelaron de la siguiente manera:

Se mezclan 0.3 mL de c/u de los 2 reactivos quimioluminiscentes (Millipore Immobilion Western Chemiluminiscent HRP Substrate), se vierten sobre la membrana que está en un cassette y se recubre con plástico la membrana junto con la mezcla, se apaga la luz y se coloca la película de rayos X (KODAK) sobre el plástico. Se cierra el cassette. Transcurridos 30 segundos se abre el cassette y se introduce la película en la solución reveladora (KODAK GBX). Bajo la luz roja se espera hasta verse las bandas y después se enjuaga en agua, finalmente se pasa a la solución fijadora (KODAK GBX). Esperar mínimo dos minutos antes de encender la luz.

Se repitió el mismo procedimiento para uno y dos minutos en presencia de los reactivos quimioluminiscentes.

IV. RESULTADOS

El proceso de purificación de los polipéptidos de 41 y 45 kDa, a partir de 105.3 gramos de hojas de espinaca de Rubisco activasa, se divide básicamente en 4 etapas, descritas en la **tabla 1**, en donde se indica la cantidad de proteínas y el rendimiento de cada etapa de purificación.

<i>Paso de Purificación</i>	<i>Cantidad de proteínas</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
1) 1ª centrifugación. Sobrenadante.	127.7 mg	100.00
2) 2ª centrifugación de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Precipitado resuspendido	34.6 mg	27.09
3) Desalinización (Sefadex G-25). Fracciones 13-28.	21.7 mg	16.99
4) Columna de intercambio aniónico (Q-Sefarosa). Fracciones 16-20.	0.7 mg	0.55

Tabla 1. Etapas de purificación. Para calcular la cantidad proteínas obtenida en cada caso se empleó el método de Bradford.

En resumen, las hojas fueron trituradas con nitrógeno líquido, suspendidas en buffer de extracción y centrifugadas para así separar las proteínas de los organelos membranosos (paso 1), el sobrenadante obtenido se precipitó con sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 35%, concentración a la cual se ha reportado la precipitación

mayoritariamente de Rubisco activasa mientras Rubisco permanece en el sobrenadante (paso 2; **Robinson, 1988**).

La **figura 7** muestra el resultado del proceso de desalinización y fraccionamiento de la muestra en la columna Sefadex G-25 (paso 3), del cual se obtuvieron en total 126 fracciones de 1.3 mL c/u. Las proteínas se separaron por masa molecular, de menor a mayor conforme se incrementa la elusión, en donde las proteínas de interés (41 y 45 kDa) se concentraron en las fracciones 13-28.

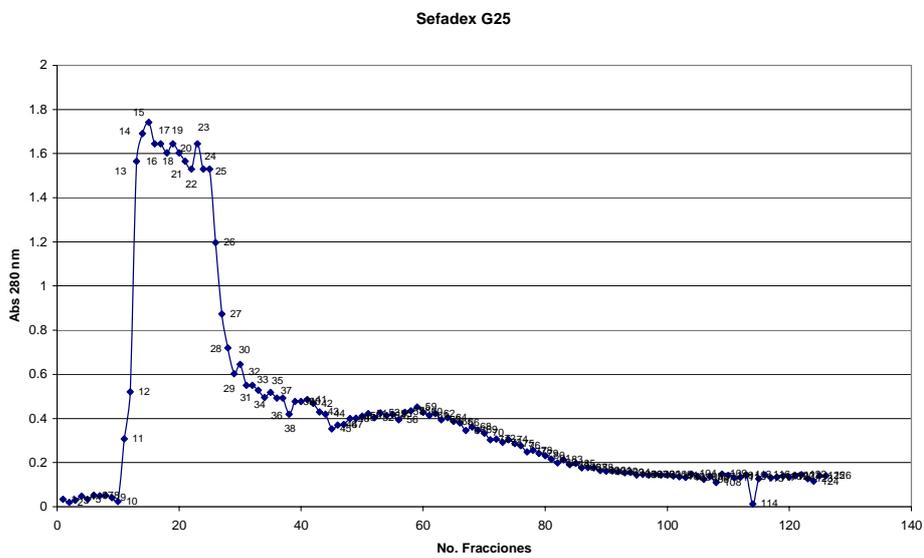


Figura 7. Columna tipo Sefadex G-25. Las fracciones fueron analizadas a 280 nm y por su tamaño, las proteínas de interés eluyeron entre las fracciones 13-28.

Los resultados del paso 4 están representados en el **figura 8**, en donde las muestras de proteína se sometieron a un gradiente entre 0- 0.5 M de cloruro de potasio y se lavó con 1 M de KCl en la columna de intercambio aniónico tipo Mono Q-Sefarosa (FPLC) y fueron analizadas a 280 nm.

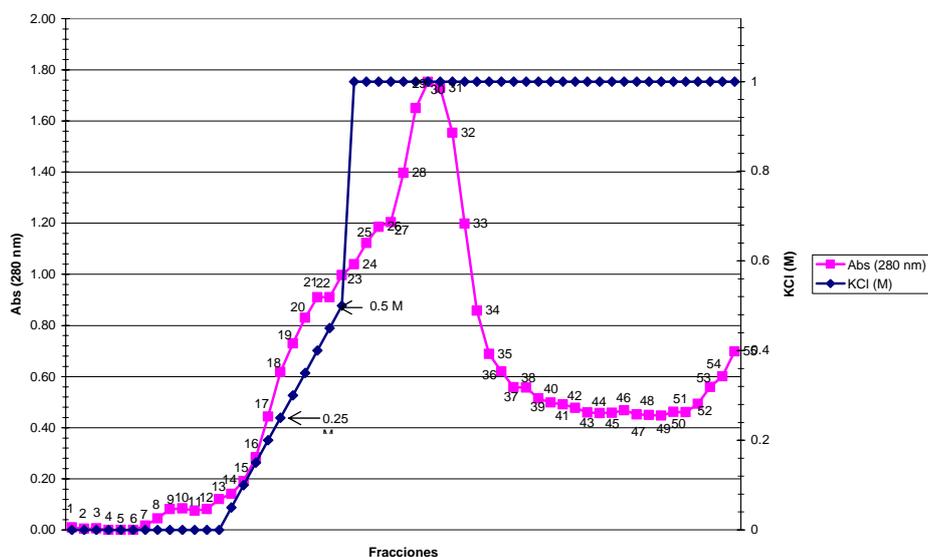


Figura 8. Columna de intercambio aniónico tipo Q-Sefarosa. La línea azul indica el incremento gradual del gradiente de KCl en el intervalo de 0.0-0.5 M y el incremento lineal final de entre 0.5-1.0 M

Las muestras se analizaron mediante geles desnaturizantes al 10%. Se tomaron muestras de las fracciones dentro del intervalo de 0-1 M de KCl. A continuación se presentan las muestras de las fracciones 18, 22, 24, 26, 31, 32, 33 y 36. Para identificar a las fracciones que contienen los polipéptidos de Rubisco activasa, se utilizó un marcador de masa molecular, como se observa en la **figura 9**.

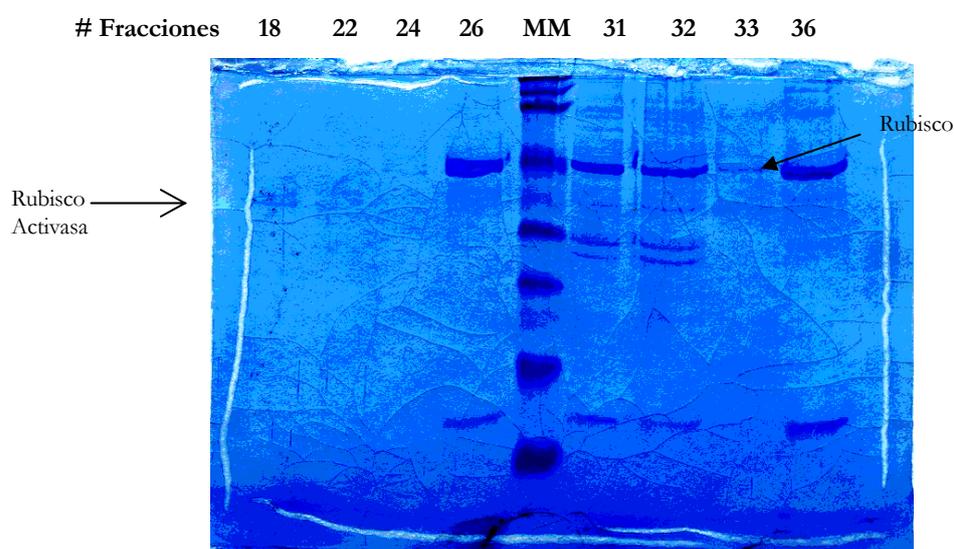


Figura 9. Electroforesis desnaturizante tipo SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico tipo Q-Sefarosa. Gel teñido con azul de Coomasie al 2%; en cada carril se cargaron 8 μg de muestra; el primer carril contiene a la fracción 18 y muestra alto contenido de RA purificada, las fracciones 22 y 24 presentan muy baja cantidad de RA, los demás carriles muestran alto contenido de Rubisco y algunas trazas de RA. El marcador de masa molecular se abrevió como MM.

Las fracciones 16-20, obtenidas de la columna Q-Sefarosa, fueron seleccionadas debido a su alto contenido de RA y una menor contaminación de Rubisco. Estas fracciones seleccionadas, se utilizaron para la producción de los anticuerpos anti-RA, para lo cual se concentraron e inocularon vía ganglio poplíteo a un conejo macho tipo New Zealand, como se muestra el esquema de inmunización de la **tabla 2**. El valor final de la muestra concentrada fue de 0.22 µg/µL, es decir que en cada uno de los procesos 1 y 3 fueron inculados 22 µg de proteína en el conejo.

<i>Proceso</i>	<i>Día</i>	<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>
1) 1ª Dosis (100 µL). Inyección en ganglio poplíteo.	1	-	-
2) 1ª Sangría (3 mL).	7	Capilares y ELISA-Dot	Se confirma la presencia de anticuerpos anti-RA. Título máximo de anticuerpos= 1:2000
2) 2ª Dosis (100 µL). Igual vía de administración.	14	-	-
4) 2ª Sangría (50 mL).	28	ELISA-Dot	Título máximo de anticuerpos: 1:20'000

Tabla 2. Esquema de inmunización, usando los polipéptidos purificados de espinaca para obtener anticuerpos del tipo anti-RA.

Para determinar el título de los anticuerpos se realizó la prueba ELISA-Dot, utilizando las fracciones del cuarto proceso de purificación. Se observa un decremento gradual de la sensibilidad del anticuerpo conforme se aumenta la dilución de izquierda a derecha, así como de arriba hacia abajo sobre c/u de las tiras de PVDF conforme se disminuye la cantidad de proteína de los extractos de RA. La mayor sensibilidad del anticuerpo se presenta en el carril 6 (dilución 1: 8000) para la cantidad de 6.25 µg de extracto crudo de

la proteína de RA y en el carril 4 (dilución 1:1000) para la cantidad 0.39 μg de extracto crudo de RA. Los resultados obtenidos de esta prueba indicaron un título de 1:20'000 (carril 5), el cual se utilizó para los Western blots correspondientes a los experimentos de tratamientos bióticos y abióticos que afectan la expresión de la prot-RA., como se muestra en la **figura 10**.

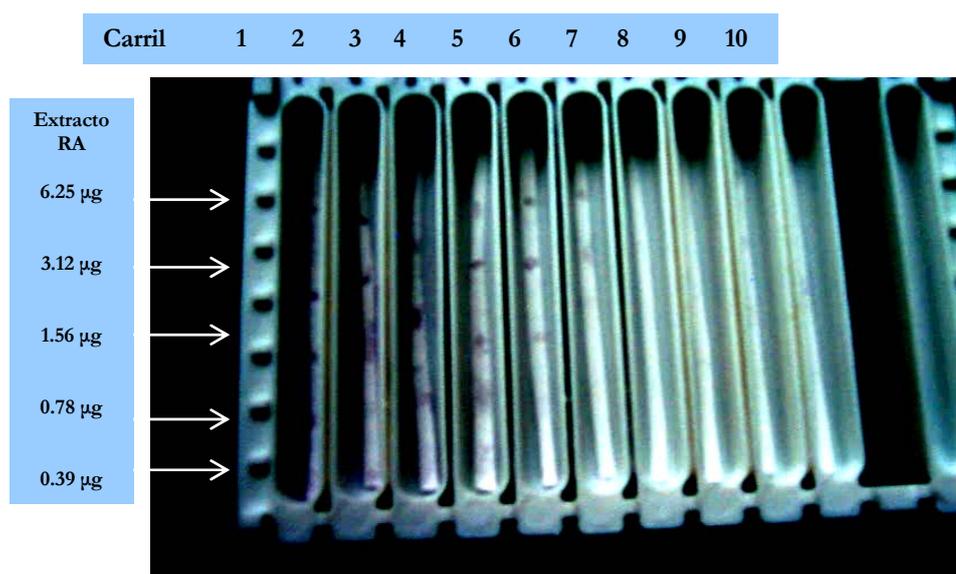


Figura 10. Título de anticuerpos realizado mediante la técnica tipo ELISA-Dot. Línea horizontal. Carril 1= 1:100, carril 2= 1:200, carril 3= 1:500, carril 4= 1:1000, carril 5= 1:2000, carril 6= 1:4000, carril 7= 1:6000, carril 8= 1:8000, carril 9= 1:20'000. La cantidad de proteínas contenidas en los extractos de RA fue colocada de forma decreciente en tiras de PVDF.

Por último, se realizó por duplicado una electroforesis desnaturizante tipo SDS-PAGE usando dos tipos de marcadores de masa molecular, α (Protein standards prestained broad range 250- 10 kDa, Biorad) y β (Prestained Molecular Weight Marker 26.6- 180 kDa, Sigma), con dos propósitos: (1) Para llevar el seguimiento del grado de purificación durante el proceso de separación de RA y (2) Verificar el grado de pureza de los anticuerpos obtenidos haciendo uso de la técnica de Western blot.

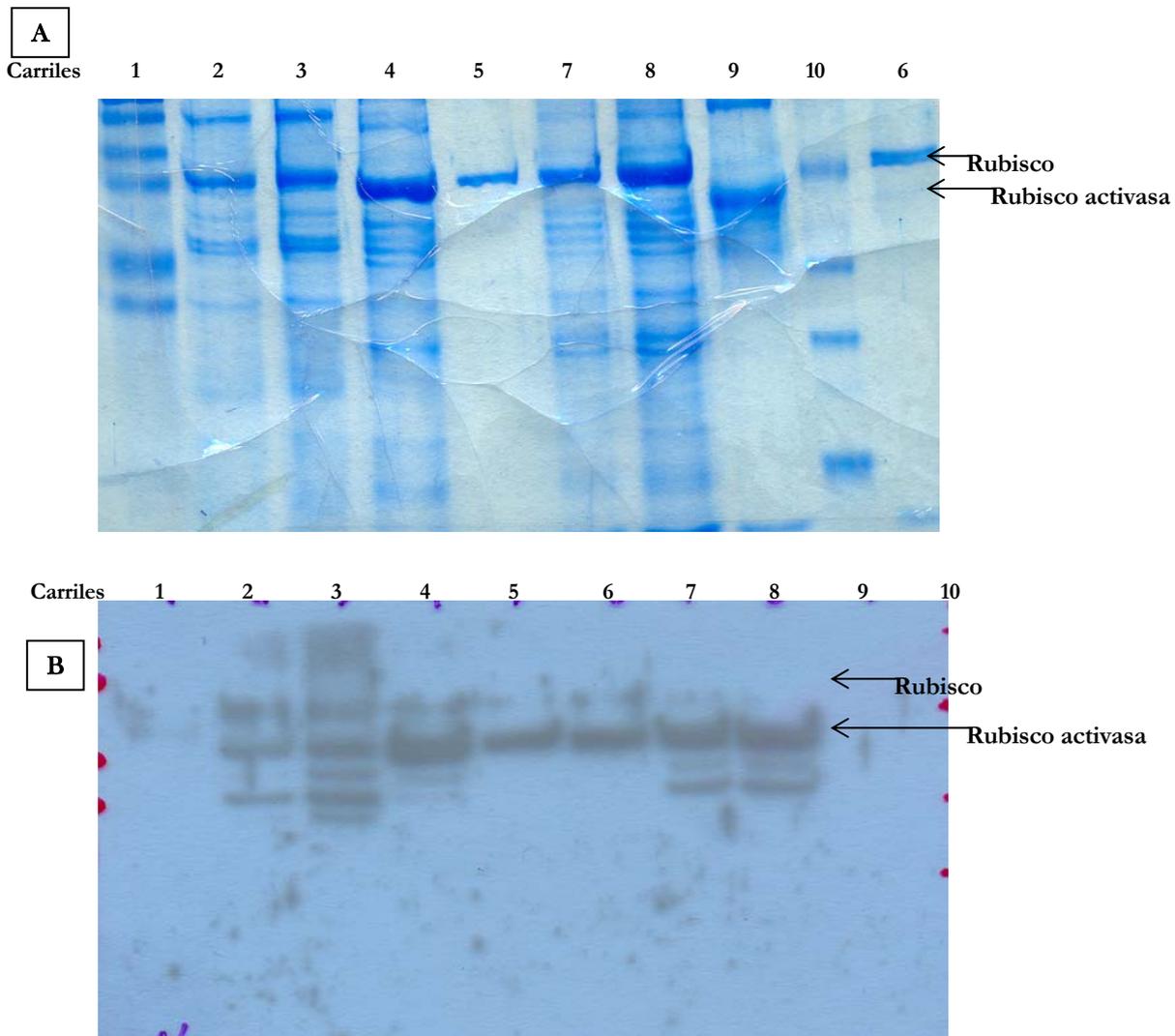


Figura 11. (A) Gel de electroforesis tipo SDS-PAGE teñido con Azul de Coomasie al 2%. Se presentó un error de carga y el carril 6 se cargó al final. (B) Western Blot del gel desnaturizante duplicado. Carril 1= Marcador de masas moleculares colorido α . Carril 2= fracción de 8 μ g de RA obtenida de la columna Sefadex G-25. Carril 3= fracción de 16 μ g de RA obtenida de la columna Sefadex G-25. Carril 4= Sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Carril 5= 8 μ g de RA inyectada en conejo. Carril 6= 16 μ g de RA inyectada en conejo. Carril 7= 8 μ g de extracto crudo. Carril 8= 16 μ g de extracto crudo. Carril 9= Ovalbúmina. Carril 10= Marcador de masas moleculares colorido β .

Del procedimiento anterior se observó que los anticuerpos obtenidos no solamente reconocían a RA, también a Rubisco y a proteínas de menor peso molecular. Por este motivo los western blot se emplearon marcadores de masa molecular como apoyo en la identificación de RA.

Tratamientos bióticos y abióticos.

El tratamiento abiótico de estrés por calor se muestra en la **figura 12**, en donde se comparan plantas del invernadero (25°C, control), con plantas sometidas durante 24 hrs a 44 °C, experimento en el que se mantuvieron niveles similares de humedad en las plantas. Ambos lotes de plántulas fueron sometidos al mismo fotoperiodo (13/11hrs de luz/oscuridad), durante un lapso de 15 días.

En los primeros cuatro carriles (plantas sometidas a estrés) se observa una deficiencia de producción del polipéptido de 43 kDa, comparado con las plantas control (carriles 6-9) que muestran una producción normal de los dos polipéptidos de 43 y 41 kDa de RA.

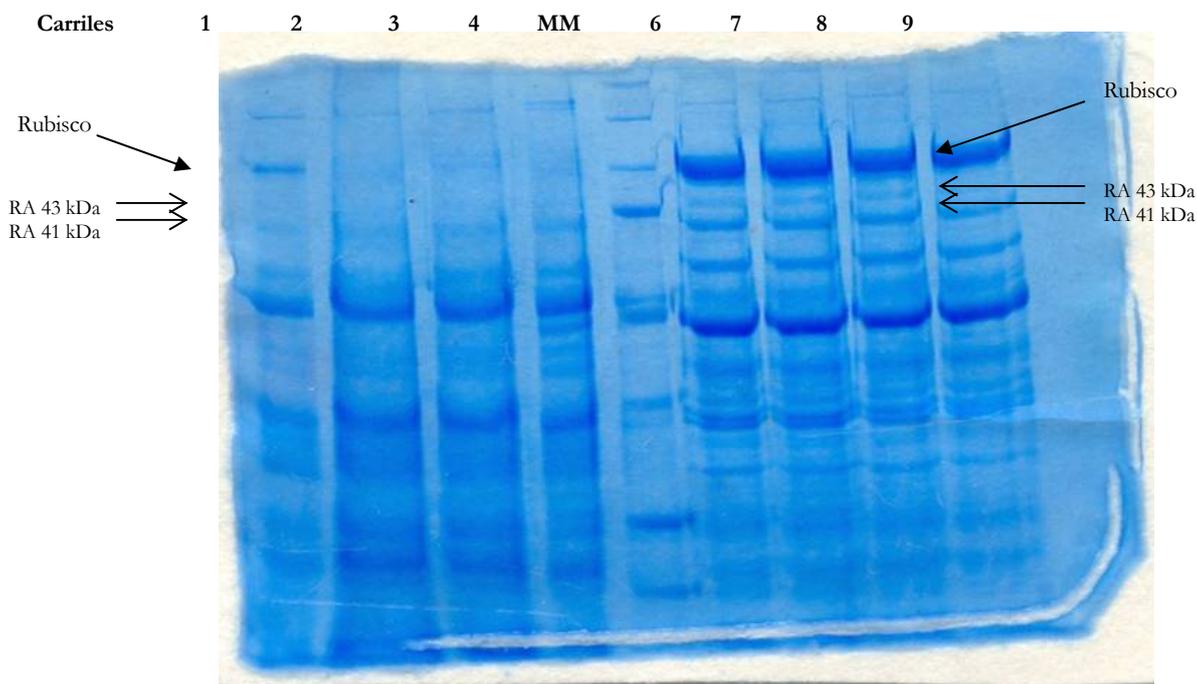


Figura 12. Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie al 2% del tratamiento abiótico por estrés de calor a 44°C. Carriles 1-4= extractos sometidos a estrés durante 24 hrs a 44° C. Carril 5= marcador de masa molecular. Carriles 6-9= extractos de plantas control

A continuación, se muestran las densitometrías del experimento de calor en la **figura 13**. En particular, la cantidad del polipéptido de 43 kDa del experimento de calor se incrementó 1.35 U.D.O. más que la cantidad obtenida en su control y para el caso del polipéptido de 41 kDa, el aumento de cantidad de proteína fue de 1.12 U.D.O para el experimento de calor. Sumando las U.D.O. de las dos subunidades de RA del tratamiento de calor y comparándolo con su control, se observa un incremento en el experimento de calor de 2.47 U.D.O. con respecto a su control. Para obtener los datos estadísticos que indicaran si hay diferencias significativas entre las medias de cada experimento respecto a su control, se realizaron las pruebas de hipótesis con diferencia de medias correspondientes. El resultado obtenido fue que la banda de 43 kDa del tratamiento de calor respecto a su control así como la banda de 41 kDa en contraste con su control son diferentes, lo que implica que el efecto de alta temperatura (44 °C) es significativo en el aumento de la expresión de ambos polipéptidos de RA sin presentar un cambio representativo en la relación 43/41 kDa de RA, relación que disminuyó un 9% durante el tratamiento por calor con respecto a su control.

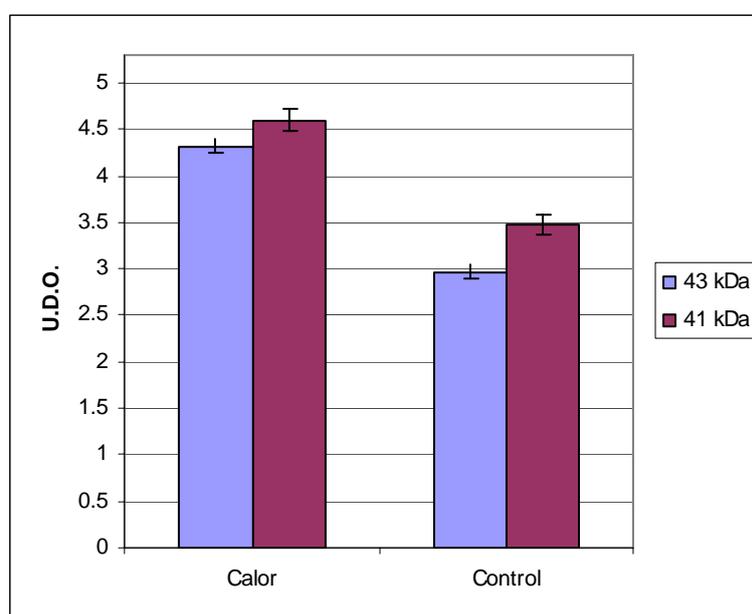


Figura 13. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA de experimento de estrés por calor y su control.

En la **figura 14** se muestra el experimento de estrés por frío en plantas que fueron germinadas durante 10 días en el invernadero y las plántulas fueron sometidas durante 3 días a 4°

C. A ambos lotes se les sometió al mismo fotoperiodo (11/13hrs de luz/oscuridad) durante 15 días.

Después de analizar las bandas correspondientes a los polipéptidos de 43 y 41 kDa, no se encontró un cambio significativo en la relación 43/41 kDa de RA.

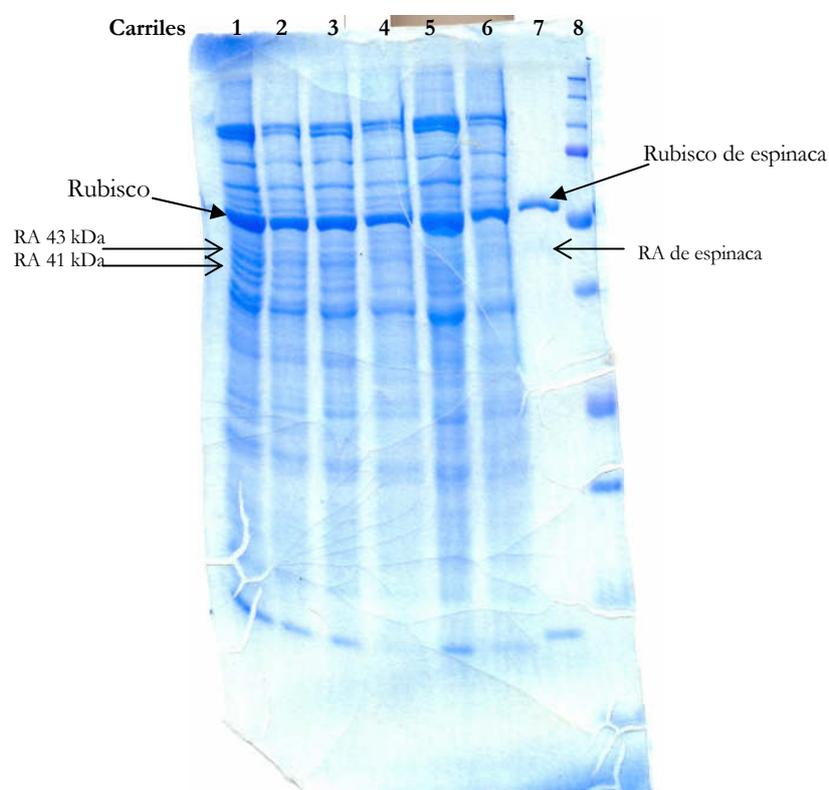


Figura 14. Gel de electroforesis desnaturalizante teñido con Azul de Coomassie al 2% del tratamiento abiótico por estrés de frío a 4°C durante 5 días intercalados. Carril 2-3= Extractos sometidos a estrés por frío. Carril 4-6= Extractos control crecidos en invernadero. Carril 7= Extracto de espinaca. Carril 8= Marcador de masa molecular. (Carril 1= extracto sometido a estrés por frío, no se toma en cuenta por mostrar un corrimiento electroforético inadecuado).

En la **figura 15** se muestran las densitometrías del tratamiento de estrés por frío y de su control. Para el experimento de frío se observa un pequeño incremento en la cantidad del polipéptido de 43 kDa de 0.26 U.D.O. y para el polipéptido de 41 kDa el incremento fue de 0.13 U.D.O. comparado con el lote control. En total, es decir sumando las U.D.O. de las dos subunidades de RA por el tratamiento de frío y su control respectivamente, se encontró un aumento del tratamiento en 0.39 U.D.O comparativamente con su control, aumento poco significativo.

La prueba de hipótesis propuesta para este experimento resultó en que no hay una diferencia significativa entre la subunidad de 43 kDa de RA del tratamiento con frío con respecto a su control ni para la subunidad de 41 kDa de RA, es decir que no hay cambio en la relación 43/41 kDa de RA en condiciones de frío, siendo el valor de la diferencia de las relaciones del 3%.

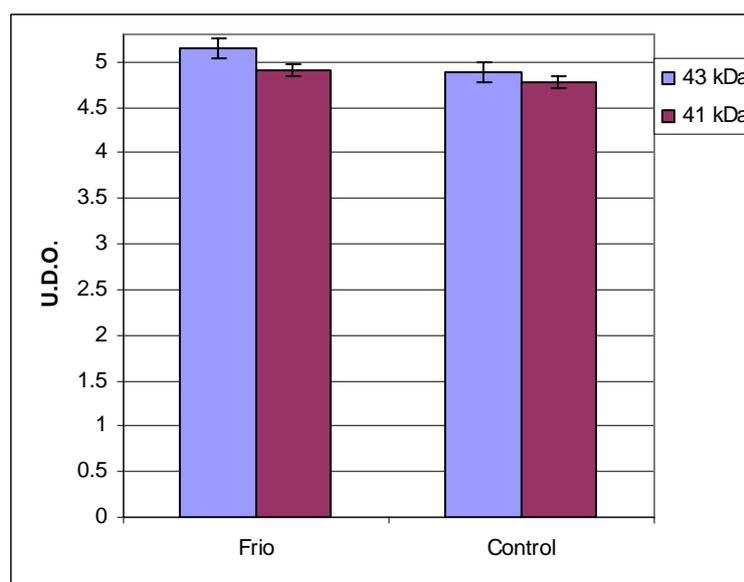


Figura 15. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento con frío y su control.

El siguiente gel corresponde al tratamiento de baja intensidad lumínica (15 DAS a una intensidad de luz en el intervalo entre 146.76 y 91.25 $\mu\text{m} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$) junto con un lote control (15 DAS en el intervalo entre 537.55 y 210.05 $\mu\text{m} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$). Aparentemente no se observan cambios significativos en la relación 43/41 kDa de RA; sin embargo, en las densitometrías se pueden observar los cambios en la cantidad de RA total en las plántulas. El tipo de fotoperiodo de este experimento fue de 11/13 hrs de luz/oscuridad, durante 15 días.

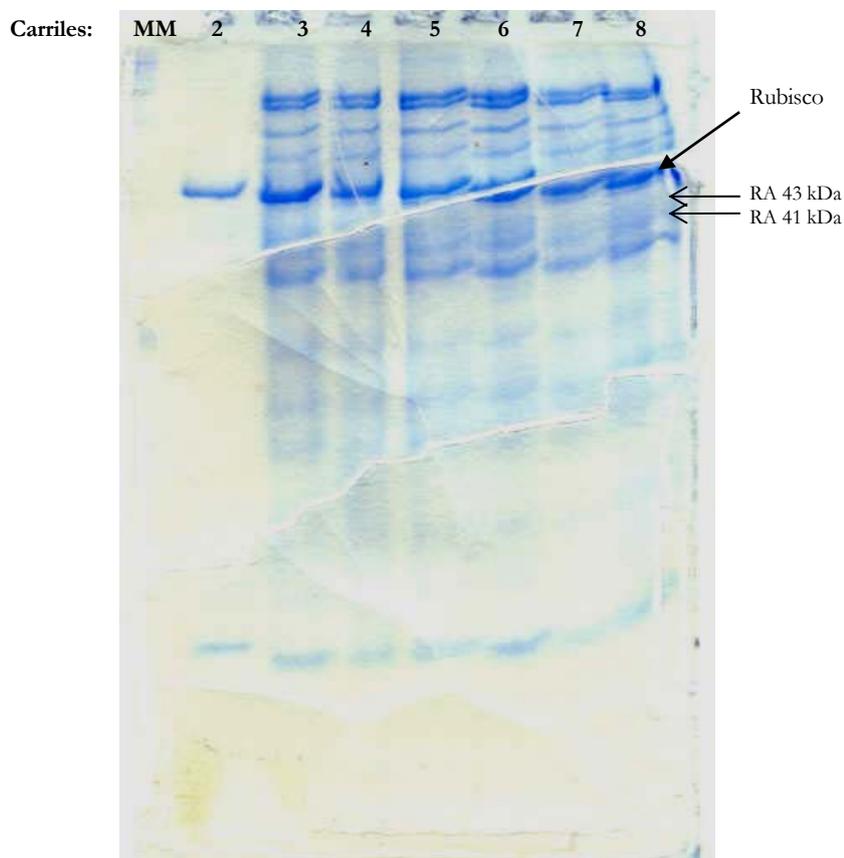


Figura 16. Carril 1 = marcador colorido de masas moleculares; Carril 2 = extracto de espinaca; Carril 5 = extracto control; Carril 6-8 = baja intensidad de luz. (Carril 3-4 = extractos control con fallo experimental por problema de secado).

La **figura 17** muestra las densitometrías correspondientes al tratamiento de baja intensidad lumínica.

Al comparar la cantidad total de RA, sumando las dos subunidades de RA para el tratamiento y su control respectivamente, se puede observar una disminución de 1.41 U.D.O. para el experimento de baja luz respecto al lote control, en particular de 0.63 U.D.O. para el polipéptido de 43 kDa y de 0.78 U.D.O. para el polipéptido de 41 kDa.

Los resultados de la prueba de hipótesis señalan que no existe una diferencia significativa al comparar las medias de las subunidades de 43 y 41 kDa para las plántulas del tratamiento de baja intensidad lumínica respecto a su control, es decir que no hay un cambio en la relación de 43/41 kDa ante el efecto de baja intensidad lumínica, relación cuyo valor disminuyó un 3% en el tratamiento de baja intensidad lumínica.

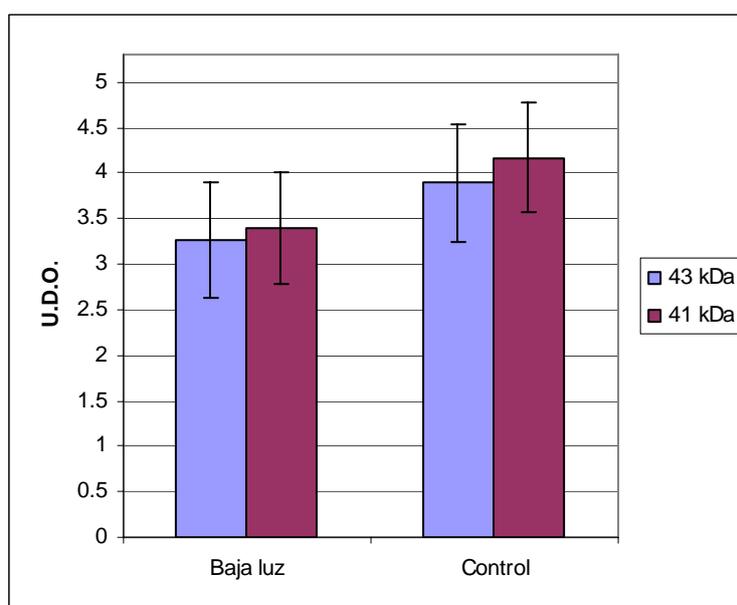


Figura 17. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento de baja intensidad lumínica y su control.

La **figura 18** muestra el resultado del tratamiento en oscuridad en el cual se sometieron las plántulas a 7 días de total oscuridad en el mismo invernadero en donde se dejaron las plántulas que sirvieron como su control.

El tipo de fotoperiodo fue de 13/11hrs de luz/oscuridad, durante 15 días.

En el gel se observa la tendencia a incrementar la formación de la banda de 41 kDa de RA respecto a la banda de 43 kDa.

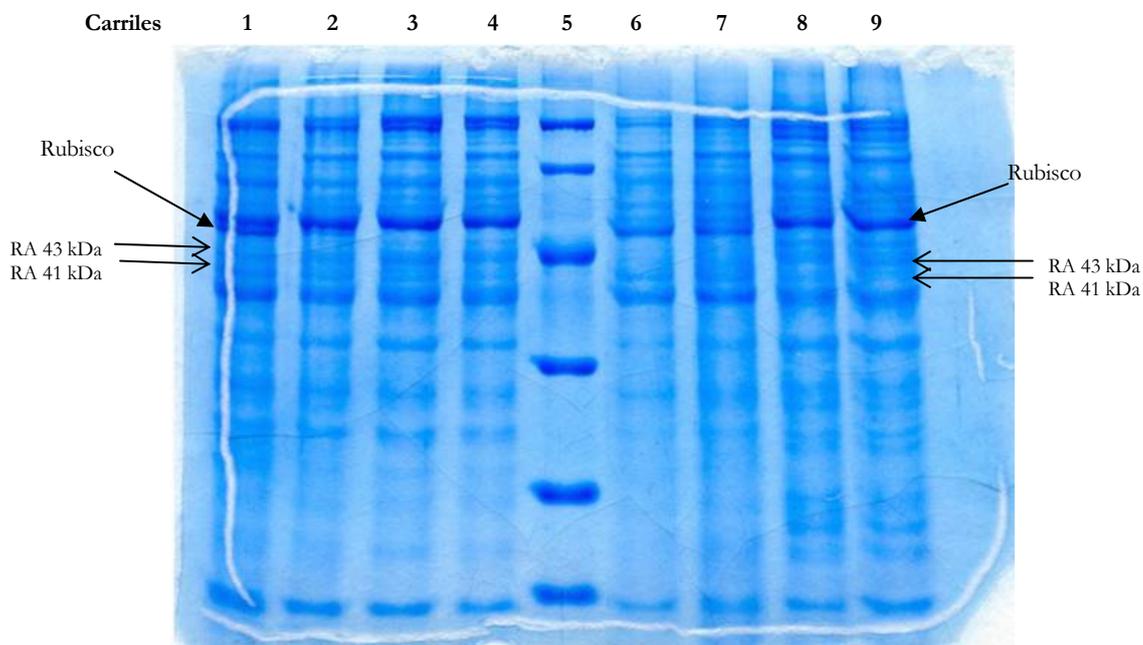


Figura 18. Experimento abiótico de oscuridad. Carriles 2-4= extractos control. Carril 5= marcadores de masa molecular. Carriles 6-9= extractos de oscuridad (Carril 1= extracto control, no se tomó en cuenta debido al error experimental que implica la grieta formada en su carril).

Las densitometrías del experimento de oscuridad se muestran en la **figura 19** junto con su control. La cantidad total de RA del experimento aumenta respecto a su control en 0.4 U.D.O. De forma particular el incremento del polipéptido de 41 kDa aumentó 0.25 U.D.O. y el aumento del polipéptido de 43 kDa fue de 0.15 U.D.O.

La prueba de hipótesis realizada con las medias de las subunidades de 43 y 41 kDa del tratamiento comparado con su control, resultó no presentar diferencias significativas, es decir que no hay un cambio evidente en la relación 43/41 kDa de RA asociado a estrés por oscuridad, aumentando un 2% la relación durante el tratamiento por oscuridad.

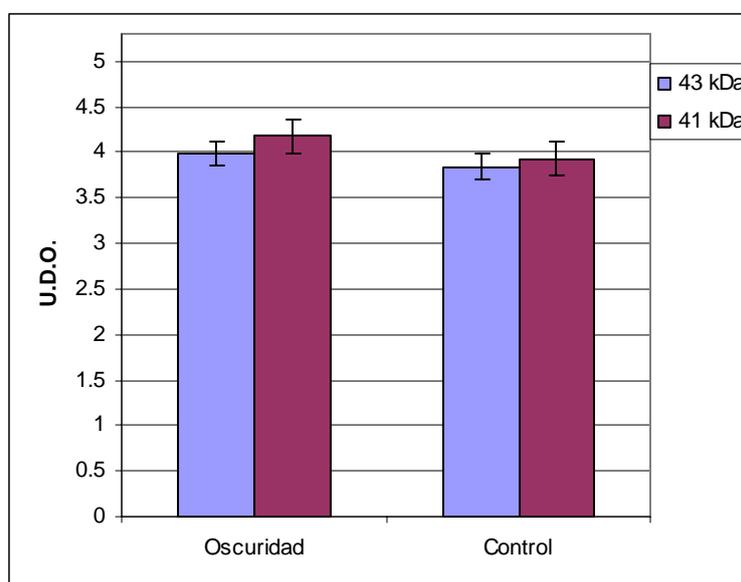


Gráfico 19. Gráfico de las U.D.O. de las subunidades de RA del tratamiento con oscuridad y su control.

En la **figura 20** se observa el tratamiento que corresponde al ciclo circadiano, para el cual se utilizaron muestras de la segunda y de la sexta etapa de desarrollo a las 8 y 20 hrs c/u. El tipo de fotoperiodo al que se realizó el experimento fue de 13/11 hrs de luz/oscuridad.

Se observa un cambio en la relación de los polipéptidos de 43 y 41 kDa, cambio evidente para las plántulas de la sexta etapa de crecimiento a las 8 hrs, en donde se observa un incremento en la producción del polipéptido de 41 kDa en comparación con las plántulas muestreadas a las 20 hrs, las cuales muestran una producción similar de los polipéptidos de 43 y 41 kDa.

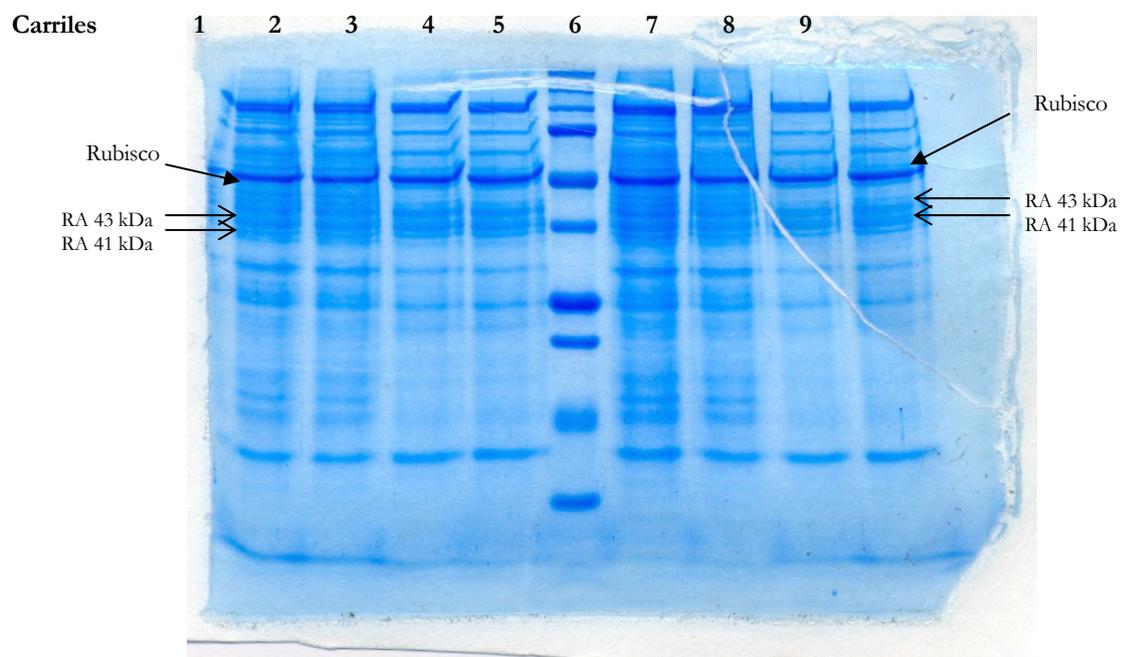


Figura 20. Experimento biótico de ciclo circadiano. Carriles 1-2= extractos de la segunda etapa de crecimiento, tomados a las 8 hrs. Carriles 3-4= extractos de la sexta etapa de crecimiento, tomados a las 8 hrs. Carril 5= marcador de masa molecular. Carriles 6-7= extractos de la segunda etapa de crecimiento, tomados a las 20 hrs. Carriles 8-9= extractos de la sexta etapa de crecimiento, tomados a las 20 hrs.

En la **figura 21** se muestran las densitometrías del tratamiento biótico, en donde es mayor la formación del polipéptido de 41 kDa a las 8hrs durante la sexta etapa de desarrollo (L2) en comparación con las mismas plántulas L2 a las 20 hrs. En cantidad total de RA, las plántulas L2 a las 8 hrs. disminuyen 1.13 U.D.O. con respecto a las plántulas de la segunda etapa de crecimiento (L1) a las 8hrs y 1.11 U.D.O. con respecto a las plántulas L2 a las 20 hrs.

Adicionalmente, las plántulas L1 casi no presentan cambios en la cantidad de su RA durante su ciclo circadiano, en cambio las plántulas L2 además de presentar una disminución de su RA durante el día, presenta una disminución mayor del polipéptido de 43 kDa las plántulas L2 de las 8hrs que del polipéptido de 41 kDa respecto a las plántulas L2 muestreadas a las 20 hrs.

Con los datos graficados se realizaron las pruebas de hipótesis, primero para las medias de L1 a las 8 y 20 hrs, después para L2 a las 8 y 20 hrs.

El resultado fue que la cantidad de los polipéptidos de RA no se ve afectada en L1 ya sea durante el día o la noche, en cambio en L2 sí se observa un cambio significativo en la banda de 43 y 41 kDa, cuya abundancia disminuye durante las primeras horas del día comparado con la noche.

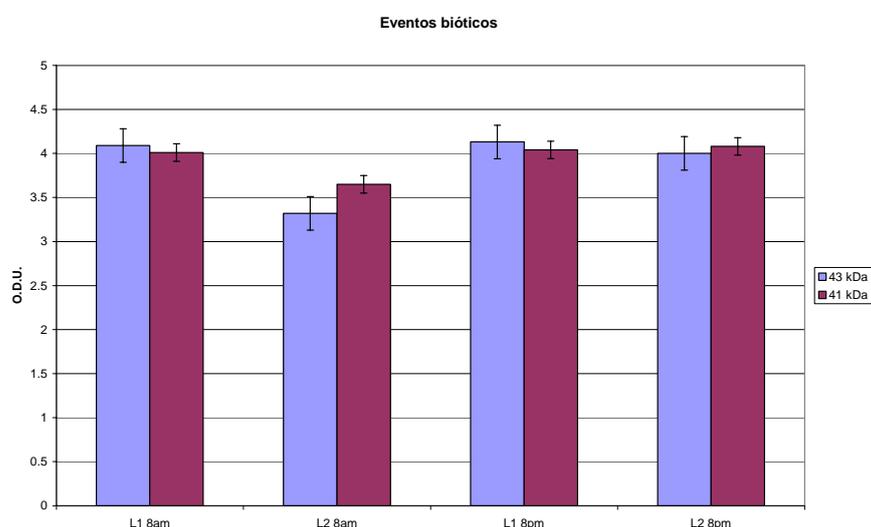


Figura 21. Gráfico de las subunidades de RA en conjunto con los tratamientos del ciclo circadiano, en donde se muestreó para la etapa L1 y L2 a las 8 y 20 hrs respectivamente. Se observa que durante la etapa L2 (6ª etapa de crecimiento) a las 8am se observa menor cantidad del polipéptido de 43 kDa y de RA en general respecto a la misma etapa L2 a las 20 hrs.

V. DISCUSIÓN

Confirmando los hallazgos reportados en el artículo realizado anteriormente en este laboratorio por **Vargas-Suárez M., et al. (2004)**, en nuestro trabajo encontramos que es más eficiente la proteólisis de RA que forma el polipéptido de 41 kDa ante estrés por altas temperaturas en comparación con las plántulas que fueron sometidas a bajas temperaturas, en donde no se observaron cambios significativos en la cantidad de polipéptidos de RA.

En nuestros resultados, el incremento en la cantidad de la proteasa de RA para aumentar la formación del polipéptido de 41 kDa en el experimento de calor, responde a la necesidad de las plántulas de maíz de proteger la actividad de Rubisco ante una inminente desnaturalización por el efecto de la elevada temperatura (**Sánchez de Jiménez et al., 1995; Crafts-Brandner, Salvucci, 2000; Salvucci et al., 2001; Sharkey et al., 2001**).

La sensibilidad de la activasa a altas temperaturas varía entre las especies de planta y la actividad activasa se aclimata durante un tiempo relativamente corto cuando la temperatura de la hoja se incrementa de forma gradual (**Law and Crafts-Brandner, 1999**).

En contraste con nuestro experimento de calor (**fig.12**), no se observó un cambio en la relación de 43/41 kDa de RA en las plántulas sometidas a bajas temperaturas, debido a que la actividad de Rubisco no se ve afectada a estas condiciones como fue observado por **Salvucci y Crafts-Brandner (2004)** y esto es consistente con la ausencia de cambios evidentes en la relación 43/41 kDa de RA.

Así mismo, nuestros resultados indicaron que los experimentos en maíz sobre estrés por intensidad lumínica, ya sea por baja intensidad u oscuridad, no estimulan un incremento en la formación del polipéptido de 41 kDa y en consecuencia no se estimula la formación del complejo 43/41, refiriéndonos a los eventos abióticos. Entre los estudios sobre la luz

y su actividad en RA (**Lan et al, 1992**) se encontró que en las especies que contienen dos isoformas de RA, que sólo difieren en su región carboxi-terminal y se originan por splicing alternativo, como en *Arabidopsis thaliana* y espinaca, la isoforma larga presenta residuos Cys en la posición 411 y 392, esenciales para preservar una baja hidrólisis de ATP y la actividad de activación de Rubisco en presencia de ADP.

En maíz la observación de que la intensidad de luz no modula la actividad de Rubisco es consistente con la ausencia reportada de la isoforma correspondiente al péptido más largo (de 45 kDa), así como en tabaco que sólo muestra la isoforma pequeña, que no tiene el puente disulfuro. (**Zhang et al., 2002**).

En nuestros resultados, para el caso de ciclo circadiano, se observó un cambio en la cantidad de las subunidades de RA para las plántulas de la sexta etapa de crecimiento (L2, 15 días) a las 8 hrs. con respecto a las mismas plántulas L2 a las 20 hrs. (**Figura 20**).

El cambio fue más pronunciado para el polipéptido de 43 kDa, en donde se observa que a las 20 hrs. se presentan cantidades similares de ambos polipéptidos y conforme se hace de día la proteasa de RA produce la proteólisis del polipéptido de 43 kDa manteniendo a su vez la cantidad del polipéptido de 41 kDa.

El ciclo circadiano endógeno puede contribuir, mediante la regulación de la expresión génica, a la regulación de la actividad de Rubisco, la cual tiene un patrón diurno debido a la acumulación de inhibidores durante la noche (**Pilgrim and McClung, 1993; Martino-Catt and Ort, 1992**).

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se identificaron dos eventos en los que se estimuló la proteólisis de Rubisco activasa, observándose en el cambio de la cantidad de los polipéptidos de RA de maíz:
 - a. El tratamiento de estrés por calor, durante 24 hrs. a 44° C, y
 - b. A lo largo del ciclo circadiano, en plántulas que se encontraban durante la etapa L2 de crecimiento a las 8 hrs, comparada con plántulas en la misma etapa de crecimiento a las 20 hrs.

- ✓ Los eventos que no tuvieron un efecto evidente sobre la cantidad de polipéptidos de RA fueron: Los eventos abióticos de baja temperatura, intensidad lumínica y oscuridad, así como el evento biótico del ciclo circadiano durante la etapa L1 de crecimiento a las 8 y 20 hrs de la misma etapa de crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE F., Bressani R., Scrimshaw N. S. 1953. The nutritive value of Central American corns III tryptophan, niacin, thiamine and riboflavin content of twentythree varieties in Guatemala. *Food Res.* 18: 273-279.
- ANDREWS T. J., Lorimer G.H. 1978. Photorespiration still unavoidable? *FEBS Lett.* 90: 1-9.
- ANDREWS T. J., Badger M. R., Lorimer G. H. 1975. Factors affecting interconversion between kinetic forms of ribulose diphosphate carboxylaseoxygenase from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* 171: 93–103.
- AYALA-Ochoa A, Vargas-Suárez M., Loza-Tavera H., León P., Jiménez-García L. Felipe, Sánchez de Jiménez E. 2004. In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. *Biochimie*: 86: 439-449.
- BILGER W, Schreiber U, Lange O.L. 1987. Chlorophyll fluorescence as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. In JD Tenhunen, FM Catarino, OL Lange, eds, *Plant Response to Stress*. Springer, Berlin, pp 391–399

- BRADFORD M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.

- BRESSANI R. 1972. La importancia del maíz en la nutrición humana en América latina y otros países. En R. Bressani, J. E. Braham y M. Béhar. Ediciones Mejoramiento nutricional del maíz. Pub. INCAP, L-3, págs. 5-30. Guatemala, INCAP.

- BROOKS A, Portis AR Jr. 1988. Protein-bound ribulose biphosphate correlates with deactivation of ribulose biphosphate carboxylase in leaves. *Plant Physiol* 87: 244-249.

- CHÁVEZ A. 1973. El maíz en la nutrición de México. En simposio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo, junio 29-30, 1972. Colegio de Postgraduados E.N.A, págs. 9-11, Chapingo, México, SAG.

- CRAFTS-Brandner & Salvucci. 2000. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *PNAS.* 97: 13430-13435.

- DANIEL V. A., Rajan, Sanjee-varayappa K. V., Scrinivasanks y Swaminathan M. 1977. Effect of insect infestation on the chemical composition and protein efficiency ratio of the proteins of kaffir corn and green gram. *Indian J. Nutr. Diet.* 14: 38-42.

- JIN S. H., Hong J., Xue-Qin L & De-An J. 2006. Antisense inhibition of Rubisco activase increases Rubisco content and alters the proportion of Rubisco activase in stroma and thylakoids in chloroplasts. *Ann. Botany*: 97, 739-744.

- JOHNSON B. A., Rooney L. W. y Khan M. N. 1980. Tortilla making characteristics of micronized sorghum and corn flours. *J. Food Sci.*: 45: 671-674.

- KHAN S., Andralojc P. J., Lea P. J., Parry M. A. J. 1999. 2'-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate (CA1P) protects ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *Europ. J. Biochemistry*. 266: 840-847.

- KOBZA J, Edwards GE 1987. Influences of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat. *Plant Physiol*. 83: 69–74.

- LAW & Crafts-Brandner. 1999. Inhibition and Acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol*. 120: 173-181.

- LAWLOR D. W. 1995. The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff N., ed. *Environment and plant Metabolism*. Oxford: Bios. Science Publishers. 129-160.

- LEIBOVITS Z., Ruckenstein C. 1983. Our experiences in processing maize (corn) germ oil. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 395-399.

- LORIMER GH. 1981. The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 349- 383.

- LILLEY & Portis Jr. 1997. ATP Hydrolysis activity and polymerization state of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Plant Physiol.* 114: 605-613.

- MARTINO-CATT S., Ort D.R. 1992. Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *PNAS. U.S.A.* 89: 3731-3735.

- MIZIORKO H.M., Lorimer G.H. 1983. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 507-535.

- MOTOHASHI K., Kondoh A., Stumpp M. T., and Hisabori T. 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *PNAS.* 98: 11224-11229.

- NEUWALD A.F., Aravind L., Spounge J. L., Loonin E. V. 1999. AAA+: A class of chaperone like ATPases associated with the assembly, operation and assembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27-43.
- ONIGBINDE A.O., Akinyele I. O. 1989. Association between chemical composition and protein digestibility of heat-damaged maize (*Zea mays*) flour. *Food Chem.* 34: 35-39.
- PARRY M. A. J., Andralojc P. J., Mitchell R. A. C., Madgwick P. J., Keys A. J. 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Botany.* 54: 1321-1333.
- PARRY C. Queitsch, Suk-Whan H., Vierling E., and Lindquist S. 2002. Rubisco activity: Effects of drought stress. *Ann. Botany:* 89: 833-839.
- PORTIS Jr., Lilley and Andrews. 1995. Subsaturating Ribulose-1,5-bisphosphate concentration promotes inactivation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). *Plant Physiol.* 109: 1441-1451.
- PORTIS A. R. 1990. Rubisco activase. *Biochem Biophys Acta.* 1015: 15-28
- PILGRIM and McClung. 1993. Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for Ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase synthesis, assembly and activation in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Physiol. 103: 553-564.

- QUEITSCH C., Suk-Whan H., Vierling E., and Lindquist S. 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. Plant Cells. 12: 479-492.

- ROBINSON S. P., Streusand V. J., Chatfield and Portis A. R. 1988. Purification and assay of Rubisco activase from leaves. Plant Physiol. 88: 1008-1014.

- ROKKA, Zhang and Aro. 2001. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function. Plant J. 25(4): 463-471.

- SAGE R.F., Sharkey T.D., Seeman J.R. 1990. Regulation of Ribulose-1,5-Biosphosphate Carboxylase Activity in Response to Light Intensity and CO₂ in the C₃ Annuals *Chenopodium album* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Plant. Physiol. 94: 1735-1742.

- SALVUCCI & Crafts-Brandner. 2004. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. Plant Physiol. 134: 1460-1470.

- SALVUCCI M. E., Osteryoung K. W., Crafts-Brandner S. J., and Vierling E. 2001. Exceptional sensitivity of Rubisco activase in Plants from contrasting thermal Environments. *Plant Physiol.* 127: 1053-1064.

- SALVUCCI and Anderson. 1987. Factors affecting the activation state and the level of total activity of Ribulose bisphosphate carboxylase in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 85: 66-71.

- SÁNCHEZ de Jiménez E., Medrano L., Martínez-Barajas E. 1995. Rubisco activase, possible new member of the molecular chaperone family. *Biochem.* 34: 2826-2831.

- SERVAITES J.C., Parry M.A.J., Gutteridge S., Keys A.J. 1986. Species variation in the predawn inhibition of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.* 82: 1161-1163.

- SERVAITES J.C. 1985. Binding of a phosphorylated inhibitor to ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase during the night. *Plant Physiol.* 78: 839-843.

- SHARKEY T. D., Badger M. R., von Caemmerer S., Andrews T. J. 2001. Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco activase. *Photosynthesis Res.* 67: 147-156.

- TEZARA W., Mitchell V.J., Driscoll S.D., Lawlor D.W. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914-917.

- VARGAS-Suárez M., Ayala-Ochoa A, Lozano-Franco J., García-Torres I., Díaz-Quiñones A., Ortíz-Navarrete V. F., Sánchez de Jiménez E. 2004. Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *J. Exp. Botany*. 55: 2533-2539.

- WEIS E.1981a. Reversible heat-inactivation of the Calvin cycle: a possible mechanism of the temperature regulation of photosynthesis. *Planta* 151: 33-39.

- WEIS E. 1981b. The temperature sensitivity of dark-inactivation and light-activation of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 129: 197–200.

- ZHANG N., Kallis R. P., Ewy R. G., and Portis, J.R. 2002. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *PNAS*. 99: 3330-3334.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL CONSULTADA

- BUCHANAN B.B., Gruissem W., Jones R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, USA, 2000, p. 43, 287, 426-427, 610-624.

- COLECCIÓN FAO: Alimentación y nutrición. No. 25. El maíz en la nutrición humana, 1993.

- FAS, USDA. Proyecciones agrícolas 2006-2015. Febrero 2006.

- LEHMAN y Kutsher. Leyenda de los soles. Códice Vaticano Ríos, 1979. Lámina 7, p. 339.

- LOZA-Tavera H., Regulación de la expresión de los genes que codifican la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa durante el desarrollo de maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, 1992.

- MATHEWS C. K., van Holde K. E., Ahern K. G. Bioquímica, tercera edición. Pearson Addison Wesley, España, 2002. págs. 687-698.

- SALISBURY F. B. Ross C. W. Fisiología Vegetal. Parte Dos. Bioquímica de las plantas. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México, 1994. Cap. 11, págs. 249-251, 256-267.