

147
Reg.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**LOCALIZACION DEL DNA SINTETIZADO
DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE LA
GERMINACION DE MAIZ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RAQUEL ORTEGA MUÑOZ



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 está 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.

C O N T E N I D O .

	pag.
Introducción	1
I.- Generalidades	
1.0. Importancia de las angiospermas	4
1.1. Estructura de la semilla de maiz	5
1.2. Germinación	8
1.3. Bioquímica de la germinación	11
1.4. Duplicación del ADN y ciclo celular	15
1.5. Localización de la síntesis de ADN durante la germinación de semillas	17
1.6. Antecedentes inmediatos	21
II.- Hipótesis	23
III.- Objetivos	23
IV.- Materiales y Métodos	
Materiales	
1.0. Material Biológico	24
2.0. Soluciones amortiguadoras	24
Métodos	
3.0. Determinación de la viabilidad de las semillas utilizadas	29
3.1. Imbibición de los ejes embrionarios de maiz	29

3.2. Procesamiento de los ejes embrionarios de maiz al término de la imbibición	30
3.3. Aislamiento y purificación de núcleos a través de un gradiente discontinuo de sacarosa	31
3.4. Ensayo de difenilamina y curva patrón de ADN	33
3.5. Aislamiento y purificación de núcleos a través de un gradiente discontinuo de Percoll	34
3.6. Aislamiento y purificación de mitocondrias a través de un gradiente discontinuo de Percoll	38
3.7. Separación de organitos (núcleos, cloro- plastos y mitocondrias) de ejes embrionarios de maiz y determinación de la actividad de la enzima glutamato-deshidrogenasa (GDH-NADH) en cada una de las fracciones	41
3.8. Curva patrón de proteínas	44
3.9. Técnica citogenética	45
V.- Resultados	
1.0. Determinación de la viabilidad de las semillas	47
1.1. Aislamiento de núcleos a través de un gradien- te discontinuo de sacarosa	47
1.2. Aislamiento de núcleos a través de un gradien- te de Percoll	48

1.3. Aislamiento de mitocondrias a través de un gradiente discontinuo de Percoll	50
1.4. Separación de organitos (núcleos, cloroplastos y mitocondrias) de ejes embrionarios de maiz y determinación de la actividad de la enzima glutamato-deshidrogenasa (GDH-NAD), en cada una de las fracciones	52
1.5. Localización de la síntesis de ADN durante las primeras horas de la germinación de maiz por técnica autorradiográfica	63
1.6. Citogenética	76
VI.- Discusión	82
VII.- Conclusiones	86
VIII.- Referencias	87

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

ADN	ácido desoxirribonucléico
ARN	ácido ribonucléico
ARNm	ácido ribonucléico mensajero
ARNr	ácido ribonucléico ribosomal
ARNt	ácido ribonucléico de transferencia
ASB	albúmina sérica bovina
ATC	ácido tricloroacético
ATP	adenosin trifosfato
BND-celulosa	DEAE-celulosa naftoilada y benzoilada
CTC	cobre-tartrato (sodio-potasio)-carbonato
CTP	citidina 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
DOC	desoxicolato de sodio
EDTA	ácido etilen diamino tretracético
GTP	guanosina 5'-trifosfato
HEPES	2-hidroxietyl piperazina n'-2 ácido etanosulfónico
NBR	solución amortiguadora de resuspensión
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
SAS	solución amortiguadora de sacarosa
SSC	solución amortiguadora citrato de sodio-cloruro de sodio
UTP	uridina 5'- trifosfato

INTRODUCCION .

Dentro de los procesos que se reactivan después de la hidratación de las semillas se ha encontrado que en los embriones en germinación la duplicación del ADN junto con la primera división celular, son eventos que ocurren algunas horas después en comparación con otras actividades metabólicas (Cheah y Osborne, 1978; Osborne et al., 1984; Vázquez Ramos y Osborne, 1986).

Los trabajos realizados con semillas de diferente especie han mostrado que el inicio de la síntesis de ADN en los diferentes tejidos de una semilla en germinación puede ser variable y puede iniciarse tanto en tejidos meristemáticos como en tejidos de reserva. Van de Walle y Bernier (1967), al trabajar con embriones de maíz, vieron por técnica autorradiográfica que la incorporación de timidina tritiada en células radiculares ocurre en núcleo solamente después de las 39 horas de imbibición. Así mismo, se realizaron otros trabajos en los cuales se utilizaron diferentes semillas en germinación y vieron que la primera incorporación de timidina tritiada es en raíz y que dicha marca se localiza a las 12 horas de germinación exclusivamente en citoplasma y que a partir de las 16 hrs se encuentra ocasionalmente en la periferia de los núcleos (Galli y Sparvoli, 1973).

I N T R O D U C C I O N .

Dentro de los procesos que se reactivan después de la hidratación de las semillas se ha encontrado que en los embriones en germinación la duplicación del ADN junto con la primera división celular, son eventos que ocurren algunas horas después en comparación con otras actividades metabólicas (Cheah y Osborne, 1978; Osborne et al., 1984; Vázquez Ramos y Osborne, 1986).

Los trabajos realizados con semillas de diferente especie han mostrado que el inicio de la síntesis de ADN en los diferentes tejidos de una semilla en germinación puede ser variable y puede iniciarse tanto en tejidos meristemáticos como en tejidos de reserva. Van de Walle y Bernier (1967), al trabajar con embriones de maíz, vieron por técnica autorradiográfica que la incorporación de timidina tritiada en células radicales ocurre en núcleo solamente después de las 39 horas de imbibición. Así mismo, se realizaron otros trabajos en los cuales se utilizaron diferentes semillas en germinación y vieron que la primera incorporación de timidina tritiada es en raíz y que dicha marca se localiza a las 12 horas de germinación exclusivamente en citoplasma y que a partir de las 16 hrs se encuentra ocasionalmente en la periferia de los núcleos (Galli y Sparvoli, 1973).

Los diferentes estudios realizados acerca de la síntesis de ADN en órganos de almacenamiento como los cotiledones en diferentes semillas, han mostrado que cuando estos órganos se someten a reverdecimiento (y otros que sin someterse a reverdecimiento lo presentan ligeramente) ésta síntesis puede ocurrir tanto en órganos reverdecidos como aquellos que reverdecen ligeramente, localizándose en el citoplasma, principalmente en plastidios a las 6 horas de germinación. También se observó que la síntesis de ADN nuclear en cotiledones aparece de 24 a 30 horas después de la germinación y que ésta puede estar reducida a los paquetes vasculares, aumentando después de las 30 horas (Galli, 1985).

Se ha sugerido que antes de que se inicie la duplicación del ADN, debe existir un proceso de tipo reparativo del mismo durante las primeras horas de la germinación (Osborne et al., 1980/81). De hecho existe un proceso de síntesis de ADN desde los primeros minutos de iniciada la imbibición. Esta síntesis parece ser diferente a la que ocurre en tiempos considerados como de duplicación del ADN (Vázquez y López 1986).

En nuestro laboratorio se ha mostrado que el almacenamiento prolongado en condiciones adversas de temperatura y humedad producen fragmentación del ADN de las semillas de maíz de alta viabilidad (García, 1985). Cuando los ejes embrionarios de semillas deterioradas de maíz se incubaron por 3, 6, y 15

horas y se examinó el ADN nuclear, se pudo apreciar que gradualmente desaparece dicha fragmentación lo que sugiere un proceso de reparación del ADN (Mélendez, 1987).

Dado que la evidencia en la literatura tiende a indicar que la síntesis de ADN durante la germinación temprana de semillas ocurre principalmente en citoplasma, es decir en cloroplastos y mitocondrias y, por otro lado, la evidencia del laboratorio indica que debe haber síntesis nuclear en los mismos tiempos el presente trabajo trata de aportar datos para poder distinguir la localización celular de la síntesis de ADN que se está llevando a cabo durante las primeras horas de la germinación de maíz.

I.- GENERALIDADES .

1.0. IMPORTANCIA DE LAS ANGIOSPERMAS.

Las angiospermas o plantas con flores son las que predominan en el mundo actual e incluyen a casi todas las variedades de cultivos agrícolas, hortícolas y de jardinería. La palabra angiosperma proviene del griego angeion, vaso o conducto y sperma, semilla, y se refiere al hecho de que las semillas jóvenes se encuentran encerradas dentro de un ovario (Weier et al., 1979).

Las angiospermas se dividen en dos clases; las dicotiledóneas (dos cotiledones u hojas de semilla) y las monocotiledóneas (un solo cotiledón u hoja de semilla). Dentro de éstas últimas se encuentra la familia de las gramíneas, las cuales destacan por ser utilizadas como fuente alimenticia. En la actualidad esta familia es de suma importancia ya que la mayor parte de los alimentos de los seres humanos depende de ella (Cronquist, 1979; Jungenheim, 1976).

Dentro de las especies más importantes se encuentra el maíz, cuyo nombre botánico es Zea mays. Este presenta un tallo cilíndrico con nódulos sólidos, raíces fibrosas, hojas alternas, dos hileras de vainas paralelas a las hojas, y sus flores forman espiguillas que constituyen una inflorescencia (Matz, 1969). El tipo de fruto que presenta es denominado cariopsis y corresponde a un fruto seco indehiscente,

derivado de un ovario súpero y unilocular. Es, por cierto, la única semilla completamente unida a la pared del fruto (Moreno, 1984).

1.1. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE MAIZ.

En la semilla de maíz la testa se origina a partir de los tegumentos del óvulo. Equivale generalmente a una capa dura aunque en algunos casos presenta una subcapa delgada. Su importancia fisiológica depende de la presencia de las cutículas externa (que en ocasiones es serosa) e interna y radica en conferir a la semilla impermeabilidad al agua y/o gases, lo que permite una regulación del metabolismo y el crecimiento de los tejidos y órganos que la constituyen (Weier et al., 1979).

El endospermo es el principal tejido de reserva energético de la semilla. Se forma como consecuencia de la fertilización de los núcleos polares y está compuesto por 90 % de almidón, 7 % de proteínas y pequeñas cantidades de aceites y otros componentes químicos. Proporciona nutrimentos a la plántula hasta que las raíces están bien firmes y sus hojas elaboran carbohidratos en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos de la planta (Bewley y Black, 1978; Moreno, 1984).

Durante el desarrollo de la semilla, el endospermo rodea al embrión y puede permanecer como un tejido relativamente grande hasta que la plántula está por crecer. Cuando el

embrión acelera su desarrollo, el endospermo es absorbido o convertido en una capa fina de manera que el embrión ocupa virtualmente toda la semilla (Bewley y Black, 1978).

El embrión está formado por el eje embrionario que contiene un cotiledón y el escutelo (ver figura 1). Este último constituye una reserva importante de nutrientes para la plántula en desarrollo. El eje embrionario está compuesto por el hipocótilo, porción del eje embrionario que se encuentra por debajo del punto de inserción del cotiledón, al que se halla unido el escutelo, la rádicula y la plúmula. Esta es muy pequeña y se encuentra envuelta por una vaina cónica llamada coleóptilo. La raíz embrionaria también se rodea por una vaina denominada coleorriza (Greulach, 1970).

El epicótilo es el extremo apical o el primer internodo del eje embrionario y se forma por arriba del cotiledón. Por su parte, el mesocótilo es la porción nodal en el eje embrionario y se localiza entre el epicótilo y el hipocótilo.

El escutelo contiene un alto porcentaje de aceites (35 a 40 %) y sustancias activas e importantes en las etapas iniciales de la germinación (Bewley y Black, 1978; Moreno, 1984 (figura 2)).

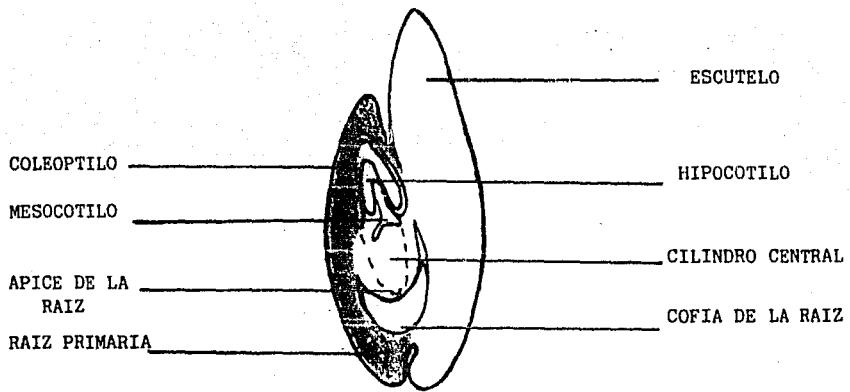


Fig No. 1 Corte longitudinal de un eje embrionario de maiz (Zea mays).

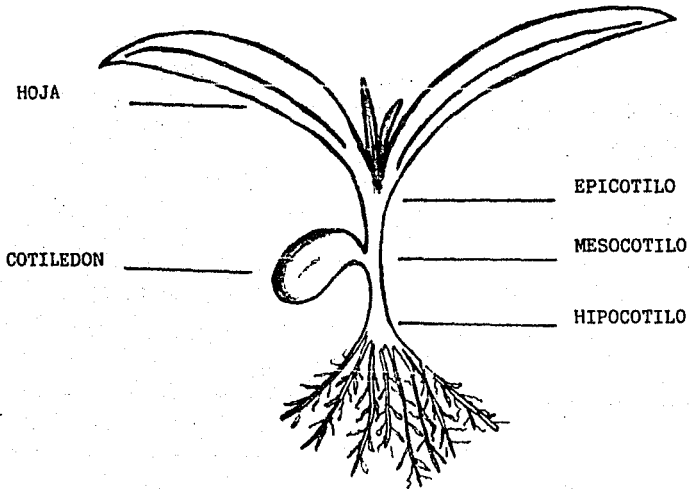


Fig No. 2 Partes de una plántula de maiz (Zea mays).

1.2. GERMINACION.

Las semillas maduras de la mayoría de las plantas presentan normalmente un periodo de latencia antes de desarrollarse en nuevas plantas. La germinación es un proceso muy complejo en el cual, al establecerse se activa toda la maquinaria metabólica de la semilla en latencia. El contenido de humedad desciende de 80 ó 90 % a un 10 % y a pesar de su extrema deshidratación, todas las células del embrión y la aleurona (del griego harina de trigo, es una capa de células vivas que se encuentra por debajo de la epidermis. Es un producto que se presenta en forma de gránulos en la masa celular y que se origina durante la maduración de la semilla, a medida que avanza la deshidratación) permanecen vivas (Mayer y Poljakof-Mayber, 1975; Font Quer, 1982).

La germinación es el conjunto de etapas sucesivas que conducen a que la semilla cambie de su estado latente al metabólicamente activo. Con ello se inician una serie de eventos moleculares que llevan finalmente a la formación de una planta a partir del embrión. Aunque este proceso no es fácil de precisar, generalmente se dice que una semilla ha germinado una vez que la radícula atraviesa por completo la testa de la semilla. Esto sólo ocurre mediante la adición de agua con lo que se manifiesta una elevación en la actividad metabólica general que termina con un incremento irreversible en el volumen del eje embrionario. El momento

exacto en el cual finaliza la germinación y comienza el crecimiento es muy difícil de determinar (Mayer y Paljakof-Mayber, 1975).

Para nuestros estudios definiremos a la germinación como el conjunto de etapas sucesivas que provocan que una semilla inactiva con un contenido bajo de agua manifieste un incremento en sus actividades metabólicas y se inicie una serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular.

Para que la germinación pueda ocurrir, es necesario que se reúnan ciertas condiciones propias de la semilla, esto es, que la semilla se encuentre íntegra y haya alcanzado una madurez fisiológica. Además, es importante que las condiciones del medio ambiente favorezcan este proceso ya que factores como el agua, la temperatura, el aire o composición gaseosa de la atmósfera y la luz suelen adquirir gran relevancia (García, 1985).

La absorción de agua es indispensable, entre otros, por los siguientes motivos: (1) para que los tegumentos se puedan romper como una consecuencia de las fuerzas de hidratación de las paredes celulares de la semilla; (2) para que se realicen las reacciones químicas que generan y regulan una actividad metabólica activa; (3) para que la semilla presente un aumento en la actividad metabólica que facilite la salida del embrión (Bewley y Black, 1978).

La absorción de agua reinicia el crecimiento y desarrollo

del embrión. La activación de los organitos en las células de la semilla (núcleos, mitocondrias, ribosomas, membranas) y la de macromoléculas (enzimas, ARNr, ARNm, ADN, etc) activa a su vez sus funciones (Ching, 1972).

1.3. BIOQUIMICA DE LA GERMINACION.

Muchos de los estudios bioquímicos sobre la germinación se han realizado en embriones aislados de frijol, centeno, trigo, etc. (Mory *et al.*, 1972; Sen y Osborne, 1977; Castroviejo *et al.*, 1979), y en estos sistemas de estudio se ha encontrado que algunos de los eventos tempranos que ocurren después de la hidratación son: producción de ATP, síntesis de ARN, síntesis de proteínas y reparación del ADN. En seguida, se lleva a cabo la duplicación del ADN y, posteriormente, la división celular y la movilización de reservas (Datta y Marcus, 1983; Vázquez Ramos y Osborne, 1986; Osborne *et al.*, 1980/81; Osborne *et al.*, 1984).

Para la obtención de poder reductor (NADH y NADPH) resultan de suma importancia las vías metabólicas tales como el ciclo de Krebs, la glucólisis, y la vía de las pentosas (Bewley y Black, 1978). También se ha observado que al inicio de la imbibición existe un incremento en cuanto a la toma de oxígeno por la hidratación de mitocondrias (Mayer y Poljakof-Mayber, 1975).

Se ha observado que en embriones de trigo la síntesis de proteínas empieza unos minutos después de iniciada la imbibición (Marcus *et al.*, 1966). La síntesis de proteínas comienza cuando las células están completamente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el ARNm. Para medir la capacidad de síntesis de proteínas en tejidos

embrionarios se les proporciona a éstos aminoácidos radiactivos y así se cuantifica qué proporción de éstos han sido incorporados a proteínas.

La incorporación de leucina a proteínas de embriones de avena continua aumentando aún cuando la imbibición ya haya cesado. Esto se debe probablemente al aumento del número de células que se hidratan conforme la imbibición aumenta y al incremento de la actividad sintética de células individuales (Murray, 1984). La síntesis de proteínas también se inicia en la primera hora de imbibición en embriones de trigo (Marcus *et al.*, 1966), cebada (Stoddart y Thomas, 1973) y centeno (Sen y Osborne, 1977) y en ejes embrionarios de frijol (Klein *et al.*, 1971). La síntesis de proteínas se inicia tan rápidamente después de la imbibición, que muy probablemente la mayoría de los componentes bioquímicos y estructurales necesarios deben de estar presentes en la semilla seca. La síntesis de proteínas permite a las células sintetizar las enzimas requeridas en el inicio de la germinación. Los ribosomas preparados de embriones secos son incapaces de sintetizar proteínas; sin embargo, la actividad de estas preparaciones ribosomales aumenta rápidamente con la imbibición. Por lo tanto, los polisomas están ausentes en embriones secos y su formación se inicia rápidamente al comienzo de la imbibición junto con los componentes citoplásmicos esenciales para la síntesis de proteínas (Marcus *et al.*, 1966; Bewley y Black, 1978).

La creciente eficiencia de la síntesis de proteínas durante esta fase lag puede ser atribuida en parte, a los niveles más elevados de ATP y GTP y quizá también a un aumento de ARN (Brooker et al., 1977). Sin embargo, en embriones de trigo no parece presentarse un aumento marcado en el contenido de polisomas durante el período lag a partir del inicio de la germinación (Bewley y Black, 1986). Ahora bien, los patrones de síntesis de proteínas y ARN obtenidos de los embriones hidratados han mostrado que los embriones tienen la capacidad de sintetizar todos los tipos de ARN (ARN mensajero, ARN ribosomal, ARN de transferencia). Se ha especulado que probablemente existan dos clases de ARN mensajero en embriones o ejes embrionarios secos: (1) ARN mensajeros residuales, esto es, producidos durante el desarrollo de la semilla y que no fueron destruidos durante la maduración tardía y la desecación y que pueden ser degradados inmediatamente después de iniciada la imbibición; (2) ARN mensajeros almacenados sintetizados durante el desarrollo de la semilla de manera que éstos están disponibles inmediatamente una vez iniciada la hidratación y pueden ser traducidos a proteínas ya que son parte integral de la germinación (Sánchez de Jiménez et al., 1981). Los estudios con uridina radiactiva muestran que el ARNm recién sintetizado aparece en el sistema de traducción de los ejes embrionarios de maíz dos horas después de iniciada la imbibición. Se encuentran moléculas de ARN marcadas en los

polisomas de las que el 60 % están poliadeniladas. También se demostró que el ARN polisomal poliadenilado es ARN mensajero al ser capaz de servir como molde en un sistema libre de células de traducción dependiente de ARNm. Esto demostró que se trataba de un ARN sintetizado de novo. Los resultados mostraron también que el ARN heterogéneo nuclear es la especie más abundante en las primeras horas de la germinación de maíz y que éste es rápidamente procesado a ARNm funcional, translocado al citoplasma y traducido (Van de Walle y Bernier, 1967; Domes y Van de Walle, 1983). La iniciación y continuación de la síntesis de ARN dependen de la existencia de una poza de precursores de ribonucleósidos trifosfatos: ATP, GTP, CTP, y UTP. Estos están presentes en cantidades pequeñas en embriones secos de trigo y van aumentando rápidamente durante las etapas tempranas de la germinación. El aumento de UTP y CTP es más lento; sin embargo, es más evidente entre 3 y 5.5 horas después de iniciada la imbibición. Es por ello que la síntesis de ARN a estos tiempos podría estar controlada por los niveles de ribonucleósidos trifosfato pirimidínicos. Sin embargo, no se conoce la naturaleza de los mecanismos que controlan las síntesis de ARN en semillas en germinación (Brooker et al., 1977; Cheah y Osborne, 1978; Sánchez de Jiménez y Aguilar 1984).

1.4. DUPLICACION DEL ADN Y CICLO CELULAR.

Se ha mostrado que dentro de los procesos bioquímicos que se desencadenan después de la hidratación de la semilla, el evento de la duplicación del ADN, junto con la primera división celular, ocurren tardíamente en embriones en germinación en comparación con otras actividades metabólicas (Chen y Osborne, 1970; Osborne et al., 1984, Vázquez Ramos y Osborne, 1986).

Durante cada ciclo celular, las células crecen por una duplicación de todos sus elementos estructurales y capacidades funcionales y dos procesos se han identificado durante cada ciclo celular; la duplicación del ADN y la división celular. El último evento se refiere a un periodo de post-germinación durante el desarrollo de la plántula, de acuerdo a nuestra definición particular de germinación.

El inicio de la síntesis duplicativa de ADN en diferentes tejidos de una semilla en germinación puede ser muy variable. Castroviejo et al., (1979) en sus estudios realizados sobre la síntesis de ADN con un precursor radiactivo en embriones de trigo mostraron que solamente después de 12 horas de germinación se observa una incorporación de timidina radiactiva a ADN. El contenido de ADN medido por el método de difenilamina fue el doble después de 16 a 20 horas de germinación, observándose una meseta después de la 20 horas. Para que se lleve a cabo una síntesis de ADN exitosa deben

de ocurrir un gran número de factores y enzimas que son requeridas para este proceso como lo son: las proteínas desenrolladoras, girasas, ARN polimerasas, deoxiribonucleasas, primasas, etc. Los estudios de éstas han indicado que si alguna de ellas no estuviese estructural y funcionalmente correcta la germinación no se llevaría a cabo exitosamente (Bewley y Black, 1986). El tiempo exacto en que comienza la síntesis duplicativa del ADN no se ha podido determinar. Más bien parece ser variable y depende de la especie con la cual se trabaje y va desde 3 horas hasta 12 horas de imbibición (Chen y Osborne, 1970; Mory et al., 1972; Osborne, 1982), aunque a tiempos más tempranos se observa un aumento en la incorporación de la marca radiactiva a ADN, lo cual podría atribuirse a una síntesis de tipo reparativo (Vázquez Ramos y Osborne, 1986).

Se ha estudiado la división celular mitótica en ejes embrionarios de maíz durante la germinación en los diferentes tejidos meristemáticos y se ha observado que a las 12 horas de germinación hay un 0.92 % de mitosis en mesocótilo y que en las demás regiones meristemáticas no se observa ninguna figura mitótica. Es hasta las 18 horas de la germinación cuando se pueden observar las primeras divisiones mitóticas en nudo escutelar (0.88 %) y raíz secundaria (0.64 %) aunque no en la raíz primaria, en tanto que en mesocótilo hay un incremento al 1.71 % de células en división. También se observó que a las 24 horas de germinación hay ya un

incremento notable de células en división (Baiza et al., 1986).

Los tiempos del ciclo celular son diferentes para cada especie y esto es debido principalmente a las variaciones de la duración de la fase G1. Algunas células se dividen muy lentamente y permanecen en G1 durante días o incluso años. En cambio, el tiempo necesario para que una célula pase desde la fase S hasta el final de la mitosis es notablemente constante independientemente de la velocidad de división (Alberts et al., 1986).

La división celular en las plantas superiores ocurre principalmente en las yemas de los tallos, en las puntas de las raíces y en los meristemas primarios y secundarios.

1.5. LOCALIZACION DE LA SINTESIS DE ADN DURANTE LA GERMINACION DE SEMILLAS.

Se han realizado experimentos con semillas de diferentes especie y se ha observado que el inicio de la síntesis de ADN en los diversos tejidos de una semilla en germinación puede ser muy variable e iniciarse tanto en tejidos meristemáticos como en tejidos de reserva (Olsson y Boutler, 1968).

En los tejidos de reserva en los cuales no se presenta la división celular, los niveles de ADN pueden o no cambiar después de la imbibición. En cotiledones de cacahuete los niveles de ADN se duplican entre los siete y diez días después de la imbibición y posteriormente declinan durante

los días siguientes. Parte del incremento puede deberse a síntesis de ADN plastídico y/o mitocondrial, aunque éste corresponde tan solo al 1 ó 2 % del ADN total. Así, puede afirmarse que la mayor parte de la síntesis de ADN debe ser de origen nuclear y podría deberse a una amplificación de genes para enzimas involucradas en la degradación de reservas (Bewley y Black, 1986). Sin embargo, no existe evidencia alguna que apoye esta posibilidad.

En ejes embrionarios de maíz, la síntesis de ADN se observa primero en la coleorriza y nodo escutelar después en la raíz y finalmente en mesocótilo (Bewley y Black, 1978). Van de Walle y Bernier (1967), observaron por técnica autorradiográfica la incorporación de timidina tritiada durante la germinación temprana de embriones de maíz. En células radiculares se encontraron en el citoplasma gránulos de plata reducidos a las 15 horas de germinación. Sólomente a partir de las 39 horas, los gránulos de plata estaban en núcleo. En otras regiones del embrión se encontró que la marca en núcleos aparece hasta la 51 horas de germinación exceptuando el meristemo caulinar de hoja en el que aparece hasta las 63 horas de germinación. En este mismo tiempo se encontró que los gránulos de plata eran abundantes en algunos núcleos y que otros no presentaban marca. Existe marca relevante en citoplasma de las células donde los núcleos no aparecen marcados.

Galli y Sparvoli (1973) utilizaron embriones de Haplopappus gracilis (la cual pertenece a la familia de las compuestas) en germinación. Y encontraron por técnicas autorradiográficas que la incorporación de timidina tritiada en raíz primaria se localiza exclusivamente en citoplasma a las 12 horas de germinación. La mayor parte de esta marca se localizó sobre mitocondrias y cloroplastos. A las 16 horas la marca se intensifica y ocasionalmente se distinguen gránulos de plata en la periferia de núcleos.

Los primeros núcleos marcados aparecen a las 20 horas en raíz primaria en tanto que en el hipocótilo y la plúmula la marca esta solamente en el citoplasma. Para las 24 horas de germinación hay una mayor cantidad de núcleos marcados y a las 36 horas de germinación hay un 90 % de núcleos típicamente marcados en raíz primaria. Con estos resultados mostraron que la incorporación de timidina tritiada ocurre en el ADN de cloroplastos y mitocondrias durante las primeras horas de la germinación.

Galli (1984), al trabajar con cotiledones de sandía crecidos en agua y en presencia de benziladenina que es una citocinina que promueve la división celular, observó que la síntesis de ADN ocurre en núcleo durante los primeros días de crecimiento. Al mismo tiempo pudo ver que la benziladenina promovió el crecimiento e incrementó una síntesis temprana de ADN nuclear, diferente a la síntesis duplicativa, ya que ésta no parecía estar ligada a la proliferación celular debido a que no se encontraron mitosis.

Galli (1985) trabajó con órganos de almacenamiento programados para crecer y reverdecer hacia órganos semejantes a hojas (Haplopappus gracilis, compuesta, Lactuca sativa, lechuga, Raphanus sativus, rabano. También trabajó con órganos de almacenamiento, los cuales envejecen y mueren después del agotamiento de reservas y en donde el crecimiento y reverdecimiento son escasos o no existen (Ricinus communis, ricino, Glycine max, soya y Hordeum vulgare, cebada). Estos se utilizaron para analizar el tipo de síntesis de ADN que llevan a cabo. Los resultados mostraron que la síntesis de ADN puede ocurrir tanto en órganos programados para reverdecer como en los órganos de almacenamiento que no reverdecen y se localiza en citoplasma, principalmente en plastidios a las 6 horas. También observó que la síntesis de ADN nuclear aparece entre las 24 y 30 horas.

1.6. ANTECEDENTES INMEDIATOS.

García (1985) reportó que el almacenamiento inapropiado de semillas de maíz en condiciones de alta temperatura y/o humedad producían deterioro en las semillas y que éste se manifestaba en la disminución de la viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas. La disminución de la viabilidad parecía estar relacionada con la disminución en la integridad del ADN y en la capacidad de síntesis del mismo. El deterioro provocado por estos tratamientos se refleja en la incapacidad de sintetizar ARN y proteínas en las primeras 15 horas de la germinación (Muro, 1986).

Zarain Herzberg et al., (1987) reportaron que los ejes embrionarios de maíz que habían sido irradiados con rayos gama e imbibidos por 3 horas mostraban un patrón de síntesis de ADN de tipo "reparativo" (después de analizar por cromatografía en BND-Celulosa el ADN marcado isotópicamente). Los ejes de alta viabilidad (control) imbibidos también por 3 horas mostraron patrones de síntesis de ADN que no pudieron catalogarse como de tipo "reparativo" o de tipo "duplicativo". Asimismo el patrón de síntesis de ADN presentado por ejes de alta viabilidad (control) imbibidos por 0 a 15 horas correspondió a uno de tipo "duplicativo". Incidentalmente, la adición de citocininas al medio de imbibición de ejes irradiados estimuló notablemente

la síntesis de tipo "reparativo", mientras que la de embriones no irradiados (control) cambio de una de tipo indefinido a síntesis de tipo netamente "reparativo".

Meléndez (1987) encontró que el bajo peso molecular del ADN de ejes de semillas deterioradas no germinadas cambiaba a alto peso molecular según los ejes se imbibían por 3, 6 y 15 horas.

Las evidencias anteriores sugirieron la presencia de un sistema activo de reparación de ADN durante la germinación temprana de maíz. No obstante, los reportes en la literatura utilizando técnicas de autorradiografía durante las primeras horas de germinación de semillas han mostrado que la marca incorporada en las células se acumula en citoplasma y organitos como plastidios y mitocondrias pero no en núcleos. Ante esta aparente discrepancia, el objetivo del presente trabajo fue tratar de localizar en donde se esta llevando a cabo la síntesis de ADN que ocurre en las primeras horas de la germinación.

II.- Hipótesis

Dado que existe síntesis de ADN desde los primeros instantes de la germinación de semillas de maíz, postulamos que esta síntesis debe ser el promedio de la síntesis en todos los compartimientos celulares en que existe ADN.

III.- Objetivos

1) Definir la localización del ADN sintetizado durante las primeras horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz.

2) Establecer si hay mitosis durante las primeras horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz.

IV.- Materiales y Métodos

Materiales

1.0.- Material biológico. Las semillas de maíz utilizadas, variedad chalqueño, fueron proporcionadas por la SARH (Productora Nacional de Semillas).

2.0.- Soluciones Amortiguadoras y Reactivos Utilizados:

2.1. Solución amortiguadora de imbibición

Cloruro de Magnesio (Merck)	10 mM
Cloruro de Potasio (Merck)	50 mM
Tris-HCl (pH 7.6) (Merck)	10 mM
Cloranfenicol (Sigma)	10 µg/ ml
Sacarosa (Merck)	2 %

2.2 Solución amortiguadora de homogenización "A" según

Sen y Osborne (1977).

Sacarosa (Merck)	0.3 mM
Cloruro de Potasio (Merck)	10 mM
Cloruro de Sodio (J.T. Baker)	15 mM
2-mercaptoetanol (Sigma)	15 mM
Espermina (Sigma)	0.15 mM
Espermidina (Sigma)	0.50 mM
Tris-HCl (pH 7.4) (Merck)	15 mM

2.3 Solución amortiguadora de homogenización según

Vázquez Ramos y Osborne (1986).

Cloruro de Sodio (J.T. Baker)	0.15 mM
-------------------------------	---------

Acido etilendiamino tetracético 0.1 mM
(Merck)

Dodecil sulfato de sodio 0.5 %
(Merck)

2.4 Solución amortiguadora de homogenización Honda
según Luthe y Quatrano (1980 a y b).

Ficoll 400 000 (Sigma) 2.5 %

Dextran T-40 (Merck) 5 %

Triton X-100 (Sigma) 0.25 %

Sacarosa (Merck) 0.44 M

Tris-HCl (pH 7.6) (Merck) 25 mM

Cloruro de Magnesio (Merck) 10 mM

2-mercaptoetanol (Sigma) 10 mM

2.5. Solución amortiguadora según Hrubec et al., (1985).

Sorbitol (Sigma) 0.3 M

HEPES (pH 7.5) (Sigma) 50 mM

EDTA (Merck) 1 mM

Cloruro de Magnesio (Merck) 1 mM

Ditiotreitol (Sigma) 10 mM

Albúmina serica bovina (p/v)
(Sigma) 0.4 %

2.6 Solución amortiguadora de resuspensión (NBR)

Tris-HCl (pH 7.8) (Merck) 50 mM

Cloruro de Magnesio (Merck) 5 mM

2-mercaptoetanol (Sigma) 10 mM

Glicerol (J.T. Baker) 10 %

2.7 Solución amortiguadora de sacarosa (SAS)

Sacarosa (Merck)	0.3 M
Tris-HCl (pH 7.6) (Merck)	50 mM
Cloruro de Magnesio (Merck)	0.005 M
2-mercaptoetanol (Sigma)	20 mM

2.8 Medio MS según Murashige y Skoog (1962).

Solución A:

Cloruro de Calcio (Merck)	440 mg/l
---------------------------	----------

Solución B:

Nitrato de Potasio (Merck)	1900 mg/l
Nitrato de Amonio (Merck)	1650 mg/l

Solución C:

Yoduro de Potasio (Merck)	0.83 mg/l
Cloruro de Cobalto (Merck)	0.025 mg/l

Solución D:

Fosfato monobásico de Potasio (Merck)	170 mg/l
Acido Bórico (J.T. Baker)	6.2 mg/l
Molibdato de Sodio (Merck)	0.25 mg/l

Solución E:

Sulfato de Magnesio (Merck)	370 mg/l
Sulfato de Cobre (Merck)	0.25 mg/l
Sulfato de Zinc (Merck)	8.6 mg/l

Solución F:

Sulfato ferroso (Merck)	28.8 mg/l
Acido etilendiamino tetracético (Merck)	37.3 mg/l
Glicina (Merck)	50 mg/l

Vitaminas:

Piridoxina (Sigma)	12.5 mg/250 ml
Acido nicotínico (Sigma)	12.5 mg/250 ml
Tiamina (Sigma)	2.5 mg/250 ml
Mio-inositol (Sigma)	2.5 mg/250 ml

Sacarosa (Merck) 30 g/l

Agar (Merck) 8.0 g/l

2.9 Solución amortiguadora Citrato de Sodio-Cloruro de Sodio (SSC).

Citrato de Sodio (Merck)	0.015 M
Cloruro de Sodio (Merck)	0.15 M

3.0 Líquido de centelleo

2,2'-p-fenil bis (5-fenoxazol) (Merck)	0.1 g/l
2,5-difenoxazol (Merck)	5.0 g/l
Tolueno (Merck)	1.0 litro

3.1 Líquido de centelleo Insta-Gel (Packard)

3.2 Reactivo de difenilamina

Difenilamina (Merck)	4.0 % en ácido acético glacial
----------------------	--------------------------------

- | | |
|----------------------|------------|
| Acetaldehido (Merck) | 1.6 mg/ ml |
|----------------------|------------|
- 3.3. Solución amortiguadora Honda (10x)
- | | |
|-----------------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 7.6) (Merck) | 250 mM |
| Cloruro de Magnesio (Merck) | 100 mM |
- 3.4. Soluciones para citogenética y autorradiografía
- 3.5. Fijador (relación 3:1)
- | | |
|-------------------------------|-------|
| Etanol absoluto (Merck) | |
| Acido acético glacial (Merck) | 100 % |
- 3.6. Acetorceína
- | | |
|-------------------------------|---------------|
| Orceína (Merck) | 1.25 g/100 ml |
| Acido acético glacial (Merck) | 45 % |
- 3.7. Pectinasa (Quimorgan, S.A.) 5.0 %
- 3.8. Emulsión fotografica NTB2 Nuclear Track (Kodak)
- 3.9. Revelador (Kodak) D-19
- 4.0 Soluciones para cuantificar proteínas
- 4.1 Desoxicolato de sodio (DOC) 0.15 %
(Sigma)
- Cobre-tartrato-carbonato (CTC): se hace una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.1 % y tartrato de sodio y potasio al 0.2 % y a esta se le añade lentamente una solución de Na_2CO_3 al 10 % .
- 4.2 Reactivo "A" se mezclan en partes iguales
- | | |
|----------------------------------|-------|
| Dodecil sulfato de sodio (Merck) | 10 % |
| Hidroxido de sodio (Merck) | 0.8 N |

4.3 Reactivo "B" un volúmen de reactivo de Folin se mezcla con cinco volúmenes de agua destilada.

Métodos

3.0 DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS UTILIZADAS.

Se utilizaron semillas de maiz variedad chalqueño de cosecha reciente. Se colocaron 50 semillas por caja de petri la cual se desinfectó con hipoclorito de sodio (0.5 %) durante un minuto, seguido de lavado con agua estéril.

Posteriormente se colocaron lotes de 50 semillas en bandejas que contenian agrolita previamente esterilizada y a las cuales se les adicionaron 500 ml de agua corriente. Las semillas se incubaron durante 7 días a 27 ° C y luz continua, con riego diariamente.

Al término de la incubación se determinó el porcentaje de germinación. Se sacaron las plántulas y a cada una se le midió la longitud del tallo y el peso fresco. Luego se procedió a secar las plántulas en un horno a 100 ° C durante 2 días y posteriormente se pesaron para determinar el peso seco.

3.1. IMBIBICION DE LOS EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

Se utilizaron 100 ejes embrionarios para la purificación de núcleos a través de un gradiente discontinuo de Percoll (suspensión coloidal estéril de partículas de sílice cubierto con polivinilpirrolidona (PVP)). Estos fueron desinfectados

con hipoclorito de sodio al 0.5 % durante un minuto seguido de un lavado con agua destilada estéril las veces que fuese necesario. Posteriormente, los ejes fueron colocados en un vaso de precipitado de 100 ml que contenía 5 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) estéril y, sobre estos, se agregó la solución amortiguadora de imbibición con timidina tritiada (40 μ Ci/ml) incubándose a 27 ° C con luz continua a diferentes tiempos de la germinación: 4, 6, y 15 horas. En algunos casos se imbibieron ejes embrionarios sin marca radiactiva.

También se emplearon 100 ejes embrionarios para la purificación de núcleos a través de un gradiente discontinuo de sacarosa los que fueron imbibidos como se ha descrito anteriormente.

Para la separación de núcleos, cloroplastos y mitocondrias se utilizaron 50 ejes embrionarios los cuales fueron imbibidos como se indicó anteriormente a diferentes tiempos de la germinación: 4, 6, 20 y 40 horas.

3.2. PROCESAMIENTO DE LOS EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ AL TERMINO DE LA IMBIBICION.

Una vez transcurrido el tiempo de imbibición los ejes se lavaron con 10 ml de citrato de sodio (1 %) que contenía 40 μ g/ml de timidina no radiactiva y enseguida se lavaron con 10 ml de etanol (80 %). En el caso de que no fueran a ser

utilizados de inmediato, los ejes se colocaron en tubos de ensayo y se guardaron a -70°C .

3.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE NUCLEOS A TRAVES DE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

(Meyer 1977).

Se imbibieron 100 ejes como se describió previamente; al término de ésta se homogeneizaron en un mortero previamente enfriado con 10 ml de SAS hasta que se obtuvo un material de consistencia pastosa. El homogeneizado se filtró en frío con vacío a través de 4 mallas de miracloth y una malla de nylon de $60\ \mu$ de paso. Posteriormente el filtrado se centrifugó a 2,000 rpm ($880 \times g$) durante 10 minutos, de 2 a 4°C . Al término de la centrifugación se decantó el sobrenadante y el paquete obtenido se resuspendió en 3 ml de SAS y se mantuvo en hielo.

Se prepararon las siguientes soluciones para realizar el gradiente; la solución "A" que contenía:

Sacarosa (Merck)	1.92 M
Cloruro de Calcio (Merck)	3 mM

y la solución "B" que contenía:

Sacarosa (Merck)	1 M
Cloruro de Calcio (Merck)	3 mM

Se hizo el gradiente discontinuo de sacarosa para la obtención de núcleos como se muestra en la Fig No. 3.

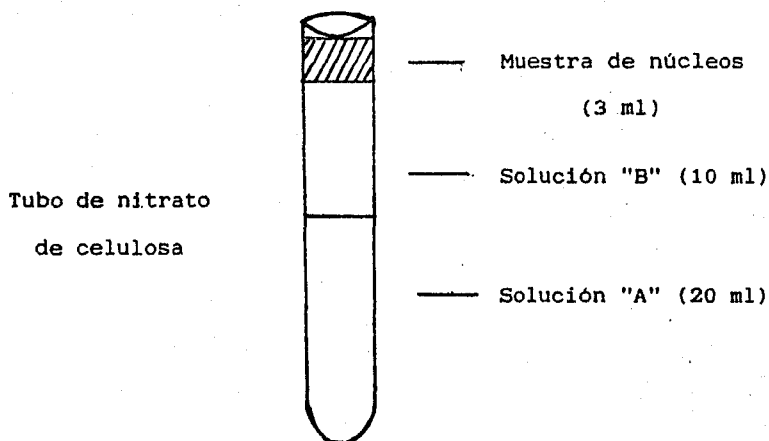


Figura No. 3. Gradiente discontinuo de sacarosa para el aislamiento de núcleos.

La suspensión obtenida de la centrifugación a 2,000 rpm se colocó sobre el gradiente discontinuo de sacarosa el cual se centrifugó en un rotor SW 25.1 (previamente enfriado) en una centrifuga Beckman L5-75 a 24,500 rpm (86'713 x g) durante 60 minutos a una temperatura de 2 ° C.

El sobrenadante se desechó, quedando así libre el paquete nuclear en el fondo del tubo. Este se resuspendió en 3 ml de SAS al 4 % y 2 ml de Tris 0.4 M pH 8.5 y se conservó en frío. Se realizaron frotis del paquete nuclear sobre un portaobjetos se fijaron con calor y luego se tiñeron con

azul de metileno (1 %) durante un minuto seguido de un lavado con agua destilada y posteriormente se observaron al microscopio. De la suspensión de núcleos se tomó 1 ml y se colocó en un frasco que contenía 10 ml de líquido de centelleo Insta-Gel y se cuantificaron las cpm en un contador de centelleo Packard.

Extracción y precipitación de los ácidos nucleicos.

Se tomó 1 ml de la suspensión nuclear se colocó en un tubo Eppendorf el cual se agitó suavemente durante 10 minutos en un baño a 37 ° C . Se le agregaron 0.5 ml de EDTA-salino, 0.5 ml de SSC y 10 µl de proteinasa k (10 mM) y se incubó a 37 ° C durante 18 horas. Después de la incubación se cuantificó el ADN por el método de difenilamina.

3.4. ENSAYO DE DIFENILAMINA Y CURVA PATRON DE ADN.

(Giles y Myers 1965).

Se tomaron diferentes alicuotas de ADN (µg) de esperma de salmón y se precipitaron con ácido tricloro acético (ATC) al 20 % , dejándose en frío durante 2 horas. Cada muestra se centrifugó a 4,500 rpm (2,450 x g) durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante de cada muestra y el ADN contenido en las pastillas se resuspendió en 1 ml de ácido perclórico (PCA) al 10 % . Se calentaron a baño maría durante 30 minutos a 80 ° C y realizó el ensayo de difenilamina.

A un mililitro de solución problema de ADN en 10 % de PCA se le adicionó difenilamina al 4 % en ácido acético glacial y 50 μ l de acetaldehído (1.6 mg/ml). Se incubó a 37 ° C durante 14 horas. Al término de la incubación se leyó la diferencia de absorbencias (595 a 700 nm) comparado con un blanco. La curva se obtuvo graficando la diferencia de absorbencias contra la concentración de ADN (μ g). Se interpoló la diferencia de absorbencias de cada una de las muestras problema en la curva patrón.

3.5. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE NUCLEOS A TRAVES DE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

(Luthe y Quatrano 1980 (a) y 1980 (b).

Se imbibieron 100 ejes embrionarios como se describió anteriormente, por diferentes tiempos.

Se homogeneizaron los ejes embrionarios con 2 ml de solución amortiguadora Honda en un mortero previamente enfriado y estéril. El tejido se maceró por 60 a 90 segundos hasta obtener una consistencia pastosa. Posteriormente, se le adicionaron seis volúmenes de solución amortiguadora Honda y se procedió a filtrar con vacío en un sistema que contenía 2 mallas de miracloth y una malla de nylon de 60 μ de paso. El filtrado se centrifugó en tubos Corex (15 ml) a 2,500 rpm (756 x g) en un rotor JA-20 de una centrífuga Beckman J2-21, durante 10 minutos entre 2 a 4 ° C de temperatura. Al

término de la centrifugación se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de solución amortiguadora Honda y se conservó en hielo.

Se realizaron preparaciones frescas del paquete nuclear y éstas fueron observadas al microscopio.

Se procedió mientras tanto a preparar el gradiente discontinuo de Percoll como se muestra en el cuadro No. I.

Cuadro No. I. Preparación del gradiente discontinuo de Percoll para aislar núcleos.

%	Percoll 100 %	Sacarosa 3 M	Buffer Honda (10 X)	Agua	Volumen final.
40	1.6 ml	0.6 ml	0.4 ml	1.4 ml	4.0 ml
60	2.4 ml	0.6 ml	0.4 ml	0.6 ml	4.0 ml
80	3.0 ml	0.6 ml	0.4 ml	-----	4.0 ml

Al tener los diferentes porcentajes se procedió a realizar el gradiente en un tubo de nitrocelulosa, como se muestra en la Figura No. 4.

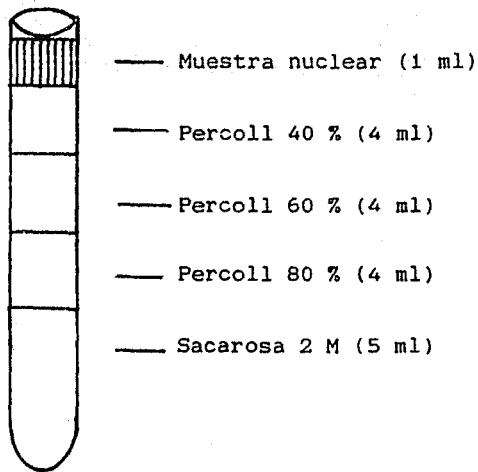


Figura No. 4 Gradiente discontinuo de Percoll para aislar núcleos.

La suspensión nuclear se colocó sobre el gradiente discontinuo de Percoll, el cual se centrifugó a 4,800 rpm (4,056 x g) en un rotor 628 de una ultracentrifuga IEC durante 40 minutos a 4 ° C .

Al concluir el tiempo de centrifugación se extrajo con una pieta Pasteur la banda donde quedaron los núcleos. Esta banda se disolvió en una solución amortiguadora Honda que contenía espermidina durante 2 minutos con el fin de remover el Percoll y se centrifugó a 4,330 rpm (5860 x g) en un rotor de titanio 628 en una centrifuga IEC por 5 minutos a 4 ° C. Al término de ésta se decantó el sobrenadante y la pastilla nuclear se resuspendió en solución amortiguadora de

resuspensión (NBR) y se centrifugó a 4,330 rpm nuevamente. Al concluir el tiempo de centrifugación se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en NBR y se mantuvo en frío. Se realizaron preparaciones frescas de la muestra nuclear y se observaron al microscopio. Se tomó 0.5 ml de la suspensión nuclear y se colocó en un frasco que contenía 10 ml de líquido de centelleo Insta-Gel y se cuantificaron las cpm.

Se tomó 1 ml de la suspensión nuclear y se cuantificó el ADN por el método de difenilamina descrito anteriormente.

En el gradiente se pudieron observar diferentes bandas a lo largo de éste las que se extrajeron y se les determinó las cpm y la cantidad de ADN presente por el método de difenilamina.

3.6. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE MITOCONDRIAS A TRAVES DE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

(Hrubec et al. 1985).

Se imbibieron 100 ejes embrionarios de maiz como se describió previamente en métodos empleándose esta vez 50 μ Ci/ml de timidina tritiada durante 15 horas a 27 ° C con luz continua. Los ejes se homogeneizaron con 2 ml de una solución amortiguadora que contenía sorbitol 0.3 M, Hepes 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DTT 10 mM, y 0.4 % de ASB (v/v), en un mortero previamente enfriado durante 90 segundos hasta obtener una consistencia pastosa. Posteriormente, el homogeneizado se filtró en un sistema que contenía 2 mallas de miracloth y una malla de nylon de 60 μ de paso, el mortero se enjuagó dos veces con 3 ml de solución amortiguadora. Del filtrado se tomaron 50 μ l para medir la toma de radiactividad. En seguida se centrifugó a 1,500 x g durante 10 minutos en un rotor JA 20 de una centrifuga Beckman J2-21. Al término de la centrifugación se decantó el sobrenadante y éste se conservó en frío. Mientras tanto, se procedió a preparar el gradiente de Percoll según se muestra en el cuadro No.II.

Cuadro No. II. Preparación del gradiente discontinuo de Percoll para el aislamiento de mitocondrias.

	Percoll 100 %	Buffer Hrubec	Vol. final
15 %	0.45 ml	2.55 ml	3 ml
22 %	0.66 ml	2.34 ml	3 ml
27 %	0.81 ml	2.19 ml	3 ml
60 %	2.4 ml	1.60 ml	4 ml

El sobrenadante mitocondrial de la centrifugación anterior se colocó sobre el gradiente (ver figura No.5) y se centrifugó en un rotor 628 de una ultracentrifuga IEC a 24,000 rpm (97,000 x g) durante 35 minutos a 4° C.

Al concluir el tiempo de centrifugación se separó cada banda presente en el gradiente con una pipeta Pasteur, cuidando de no mezclar las bandas. Cada una de las bandas obtenidas se lavaron con 3 ml de solución amortiguadora Hrubec y se centrifugaron por separado a 1,500 x g durante 10 minutos. Las pastillas obtenidas se precipitaron con ATC al 20 % y se dejaron en frío durante 30 minutos. Después de esto se centrifugó a 3,000 rpm (1,090 x g) durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en

la solución amortiguadora Hrubec y se volvieron a centrifugar a 3,000 rpm. El ADN se encontró en el sobrenadante en donde se leyó la absorbencia a 260 nm para cuantificarlo.

Se tomó 1 ml de cada banda y se realizó el ensayo de difenilamina para cuantificar el ADN presente en cada una de las fracciones. De estas muestras también se tomó 0.5 ml para determinar cpm.

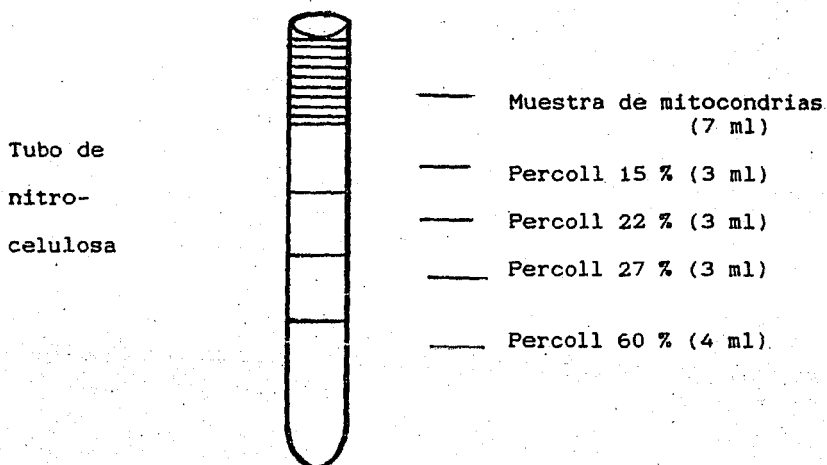


Figura No. 5. Gradiente discontinuo de Percoll para aislar mitocondrias.

3.7. SEPARACION DE ORGANITOS (NUCLEOS, CLOROPLASTOS Y MITOCONDRIAS) DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH-NADH) DE CADA UNA EN LAS FRACCIONES.

Se imbibieron 50 ejes embrionarios en condiciones estériles en medio MS durante 4, 6, 20 y 40 horas a 27° C con luz continua, como se describió previamente. Al término de la incubación se homogeneizaron los ejes con 2 ml de solución amortiguadora "A" (según Sen y Osborne, 1977), en un mortero previamente enfriado durante 30 minutos, se maceró el tejido durante 60 segundos obteniéndose una suspensión homogénea. Posteriormente, el homogeneizado se filtró a través de una malla de nylon de 60 μ de paso y dos capas de papel miracloth con la ayuda de vacío. Se enjuagó el mortero tres veces con 2 ml de solución amortiguadora "A" y así se obtuvo un volumen final de 7 a 8 ml. Del filtrado se tomó 50 μ l de muestra y se colocó sobre una membrana de fibra de vidrio Whatman GF/C para medir la toma de radiactividad del sistema. Posteriormente el filtrado se colocó en tubos Corex de 15 ml y se centrifugó a 2,500 rpm ((625 x g), Cheah y Osborne, 1978), durante 15 minutos en una centrifuga intermedia Beckman J2-21 en un rotor JA-20 previamente enfriado. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, el sobrenadante se colocó en otro tubo Corex de 15 ml y la pastilla se conservó en frío.

El sobrenadante se volvió a centrifugar a 7,000 rpm (3,000 x g Biggins , 1971), durante 15 minutos y al término de éste el sobrenadante se decantó a otro tubo Corex y la pastilla se conservó en frío. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm (10,000 x g) (Zelitch, 1967), durante 15 minutos, concluido el tiempo de centrifugación el sobrenadante se decantó en una probeta de 10 ml midiéndose así el volumen final y de este sobrenadante se tomaron 50 µl que se colocaron sobre un papel filtro Whatman GF/C para medir las cpm. La pastilla de esta centrifugación se conservó en frío. A los tubos que contenían las pastillas de las diferentes centrifugaciones (2,500 rpm, núcleos; 7,000 rpm, cloroplasto; 12,000 rpm, mitocondrias) se les limpiaron las paredes perfectamente para evitar la contaminación con lípidos y a cada tubo se adicionaron 3 ml de solución amortiguadora "A". Se resuspendieron bien y todas ellas se centrifugaron durante 10 minutos a la velocidad en que originalmente fueron obtenidas. Al término de ésta se decantó el sobrenadante y las pastillas se conservaron en hielo. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1 ml de ATC al 10 % para precipitar ácidos nucleicos y los tubos se dejaron en frío durante 1 hora. Al concluir este tiempo se le agregó a cada tubo 1 ml de ácido perclórico al 10 % y las muestras se hidrolizaron durante 30 minutos a 80° C. Una vez concluido el tiempo se tomó 1 ml de cada muestra y se colocó en

frascos que contenían 10 ml de líquido de centelleo Insta-Gel para poder determinar las cpm. El mililitro restante se utilizó para cuantificar al ADN por el método de difenilamina.

Para medir la actividad de GDH-NADH de cada una de las muestras de las diferentes centrifugaciones (núcleos cloroplastos y mitocondrias), se preparó una mezcla de reacción la cual contenía:

Tris-HCl 500 mM (pH 9.4), 2-cetoglutarato 60 mM (pH 7), NH₄Cl 600 mM, NADH 2.9 mM (pH 8). Para cada ensayo se trabajó con un volumen final de 3 ml como se muestra en el cuadro No. III.

La mezcla de reacción se incubó a 30° C por dos minutos; posteriormente se inició la reacción añadiendo el NAD y se leyó la absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro cada minuto hasta llegar a 8 minutos.

Cuadro No. III. Mezcla de reacción para medir actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa de cada una de las fracciones.

	Tris-HCl	NH ₄ Cl	2-cetoglutarato	NADH	Extracto
Muestra	1.7 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.2 ml	0.1 ml
Blanco	2.7 ml	-----	-----	0.2 ml	0.1 ml H ₂ O

Se graficó el incremento de absorbencia con respecto al tiempo; la velocidad de reacción se expresó como nanomoles de NAD transformados por minuto. Para determinar la actividad específica de cada muestra, se cuantificaron las proteínas por el método de Peterson (1977).

3.8. CURVA PATRON DE PROTEINAS.

(Peterson, 1977).

Primero se realizó una curva patrón de albúmina serica bovina (ASB). Para ello, se preparó una solución concentrada de ASB de 1 mg/ ml empleando agua desionizada como disolvente.

Se tomaron alicuotas de la solución concentrada de ASB y se llevo con agua desionizada a 1 ml para obtener un intervalo de concentración de 20 a 100 μ g de proteína. Para el caso de cada una de las muestras problema, se tomarón volúmenes de 10 y 20 μ l a los cuales se les añadió agua desionizada para obtener un volumen final de 1 ml. A cada muestra se le adicionó 0.1 ml de desoxicolato de sodio (DOC), se mezcló y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Al término de éste se le agregó 0.1 ml de ATC al 72 % (previamente frio), se mezclaron y se dejaron en frio. Al concluir el tiempo de incubación se centrifugaron a 3,000 rpm, a 4 ° C en una centrifuga MSE durante 15 minutos. Al termino de ésto se decantó el sobrenadante y se dejaron secar las pastillas. Cuando éstas estuvieron secas se les agregó 1 ml de agua y 1

ml de reactivo "A" (ver materiales), se mezclaron y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo se les agregó 0.5 ml de reactivo "B" (ver materiales), y se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se leyó la absorbencia a 750 nm.

La curva patrón se obtuvo graficando la absorbencia contra la cantidad de proteína (μg de ASB). Para calcular los valores proteínicos de cada una de las muestras problema, el valor de la absorbencia se interpoló en la gráfica patrón y así se determinó la concentración de proteína de cada una de las muestras problema.

3.9. TECNICA CITOGENETICA

(Baiza et al., 1986).

Se incubaron por diferentes tiempos 25 ejes embrionarios de maiz en condiciones estériles en medio MS, en obscuridad a 25° C. Al término de la incubación los ejes fueron lavados con agua destilada y fijados en una mezcla de etanol-ácido acético (3:1) durante 24 horas a temperatura ambiente. Después los ejes fueron transferidos a etanol al 70 % y se guardaron a 4° C hasta que fueron utilizados.

De los 25 ejes, 15 fueron escogidos por tamaño promedio y éstos fueron disectados con la ayuda de un microscopio estereoscópico, aislando las regiones meristemáticas: mesocó-

tilo (meristemo apical), raíz primaria y raíces seminales o secundarias (meristemos radiculares). Los meristemos fueron hidrolizados con HCl 1 N en un baño maría a 60° C durante 8 minutos. Posteriormente, las regiones meristemáticas fueron colocadas en placas de porcelana las cuales contenían pectinasa al 5 % y se dejaron allí durante 50 minutos. Al concluir el tiempo se removió la pectinasa y posteriormente se le adicionó acetorceína y se dejaron durante 45 minutos. Al concluir éste tiempo se sacaron cada uno de los tejidos y fueron colocados sobre un portaobjetos para distender los tejidos por aplastamiento. Estos tejidos se conservaron a 4° C durante 14 horas. Posteriormente las preparaciones se colocaron sobre un bloque de hielo seco durante 10 minutos para fijar el tejido, se eliminó el cubreobjetos y cada una de las preparaciones se lavó con etanol absoluto. Enseguida cada preparación fué montada con Bálsamo de Canadá, y se secaron durante dos semanas.

V.- R E S U L T A D O S .

1.0. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS.

Inicialmente, se determinó la viabilidad de las semillas, para poder asegurar la confiabilidad de los resultados . En el cuadro No. IV se muestran los promedios obtenidos (\bar{X}) en dichos experimentos y las desviaciones estandar (\pm).

Cuadro No.IV. Determinación de la viabilidad y vigor de las semillas de maíz. Promedio de cuatro lotes.

% Germinación	Longitud (cm)	Peso Fresco (gr)	Peso Seco (gr)
$\bar{X}= 90 \pm 2$	$\bar{X}= 8.23 \pm 3$	$\bar{X}= 15.89 \pm 5$	$\bar{X}= 1.40 \pm 0.5$

Los resultados muestran una alta viabilidad y un buen vigor de las semillas utilizadas en los experimentos de acuerdo a los patrones en el laboratorio.

1.1. AISLAMIENTO DE NUCLEOS A TRAVES DE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

(Meyer, 1977).

Se llevaron a cabo experimentos en los cuales se trató de aislar núcleos intactos de células de ejes embrionarios de

maiz. Se pudo observar que con este tipo de aislamiento se obtuvieron muy pocos núcleos intactos, ya que observaciones al microscopio, demostraron que conforme el tiempo iba transcurriendo, los núcleos se empezaban a deformar y a romper.

Al obtener la fracción nuclear del gradiente se cuantificó el ADN presente por el método de difenilamina y estos resultados mostraron una baja cantidad del ácido nucleico. Igualmente, se observó baja incorporación de cuentas. Esto sugirió que el método de aislamiento no era el adecuado ya que los núcleos no resistían altas concentraciones de sacarosa y se perdían durante el aislamiento. Es por esto que se decidió practicar el aislamiento de núcleos a través de un gradiente discontinuo de Percoll.

1.2. AISLAMIENTO DE NUCLEOS A TRAVES DE UN GRADIENTE DE PERCOLL.

(Luthe y Quatrano, 1980 (a) y 1980 (b)).

El aislamiento de núcleos de células de ejes embrionarios de maiz marcados radiactivamente e incubados por diferentes tiempos como se menciona en materiales y métodos.

Con esta metodología se logró obtener una mayor cantidad de núcleos comparada con la metodología anterior.

En el gradiente de Percoll se obtuvieron una serie de bandas como se muestra en la figura No.6 a cada una de las cuales

se les midió la cantidad de ADN presente así como la incorporación del material radiactivo a ADN. Los resultados mostraron una baja cantidad de marca radiactiva así como también poca cantidad de ADN .

En la banda 4 (que correspondería a núcleos) se encontró que la marca radiactiva era mínima. En la banda 1 encontrada por debajo de donde se había colocado la muestra nuclear, se encontró una cantidad alta de ADN de bajo peso molecular. También se encontró que la cantidad de marca radiactiva fue mucho mayor comparada con las de las diferentes bandas encontradas (2 y 3) e incluso con la banda nuclear.

Ahora bien, se realizaron preparaciones frescas de la fracción nuclear, se observaron al microscopio y se pudo observar que la cantidad de núcleos era mínima. Con base a este resultado se pensó que quizá el tiempo de centrifugación no era suficiente para que los núcleos pudieran bajar por lo que se realizó otro gradiente en el cual se aumentó el tiempo de centrifugación. Se pudo apreciar que este aumento en el tiempo no hacía que se obtuvieran más núcleos. Asimismo se observó que las bandas seguían apareciendo como en el gradiente anterior.

Este aislamiento se realizó varias veces con diferentes tiempos de imbibición pero omitiendo la marca radiactiva y se pudo apreciar que por medio de este método no se lograba obtener núcleos íntegros y en buen número ya que éstos se rompían con gran facilidad antes de penetrar al gradiente quedando la mayoría del ADN desnudo al inicio del mismo.

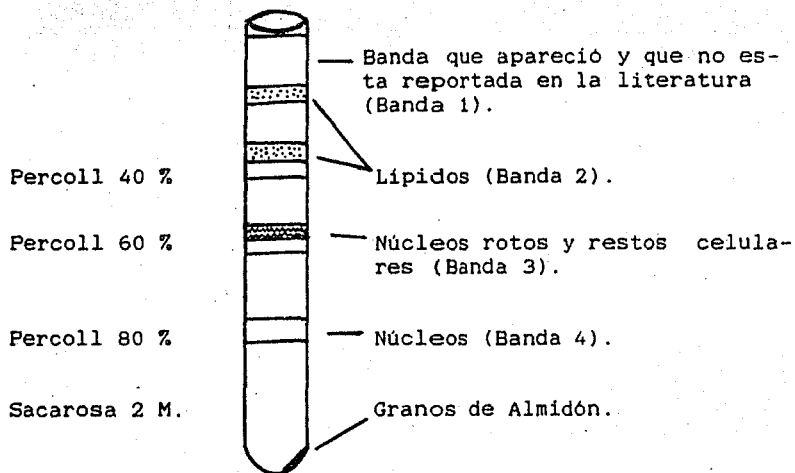


Figura No 6. Gradiente de Percoll obtenido después de la centrifugación de 4,800 rpm (4,056 x g) durante 60 minutos.

1.3. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS A TRAVES DE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

(Hrubec et al., 1985).

Este aislamiento se realizó con ejes embrionarios de maíz de 15 horas de imbibición con marca radiactiva continua (timidina tritiada, 50 μ Ci/ml). En este gradiente se obtuvieron 3 bandas como se muestra en la figura No.7.

En las diferentes bandas obtenidas se cuantificó el ADN presente por el método de difenilamina, y estos resultados

mostraron una baja cantidad del mismo. También se obtuvo muy poca incorporación del material radiactivo al ADN. Este aislamiento se realizó en varias ocasiones sin éxito y por ello se decidió aislar orgánitos de otra forma.

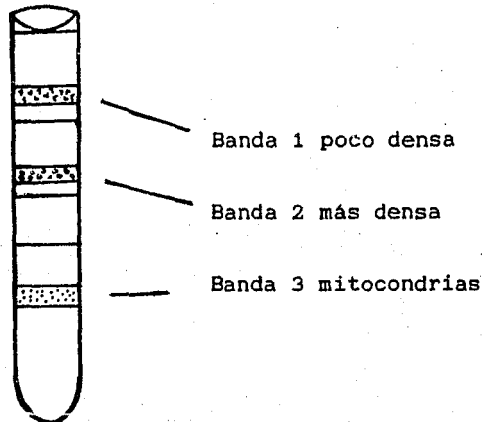


Figura No.7. Bandas obtenidas del gradiente discontinuo de Percoll para el aislamiento de mitocondrias. Los números indican las bandas encontradas en dicho gradiente.

Los resultados obtenidos anteriormente nos proporcionaron datos acerca de la sensibilidad tanto de núcleos como orgánitos a las diferentes concentraciones de sacarosa y de Percoll, ya que al querer aislar los núcleos por los dos tipos de gradientes éstos se deformaban y rompían.

También cuando se quiso aislar mitocondrias a través de un gradiente discontinuo de Percoll no se obtuvieron muy buenos resultados ya que hubo una muy baja incorporación de timidina tritiada a material insoluble en ATC.

Con estos resultados se decidió aislar núcleos y organitos de una forma más sencilla y sin dañarlos y además a través de un método que nos proporcionara una mayor cantidad de cada uno de ellos.

1.4. SEPARACION DE ORGANITOS (NUCLEOS, CLOROPLASTOS Y MITOCONDRIAS) DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH-NAD), EN CADA UNA DE LAS FRACCIONES.

Con base en los resultados anteriores se decidió separar en forma más sencilla por centrifugación diferencial, núcleos, cloroplastos y mitocondrias de embriones de diferentes tiempos de imbibición y medir tanto la marca radiactiva en ADN como la cantidad total del mismo por el método de difenilamina, (ver materiales y métodos).

Para poder estar seguros de que nuestras fracciones nucleares no estaban contaminadas con citoplasma se midió la actividad de la glutamato deshidrogenasa, ya que esta enzima se encuentra presente tanto en mitocondrias como en el citoplasma. La glutamato deshidrogenasa puede emplear tanto NAD como NADP como aceptor electrones, pero el NAD es el cofactor más eficiente. El NADH formado se oxida finalmente por la cadena de transporte de electrones. La glutamato deshidrogenasa desempeña un papel central en la desaminación de los aminoácidos debido a que el glutamato es el único

aminoácido que posee una deshidrogenasa tan activa en la mayor parte de los organismos.

La actividad de esta enzima se determinó en nanomoles de NADH transformados por minuto. Esta actividad se ve claramente en la fracción mitocondrial (24.35 nmoles NADH/min) y en el citosol (10.73 nmoles NADH/min) mientras que en núcleos no fue posible observar ninguna actividad. Cuando se midió la actividad enzimática en la fracción cloroplástica se obtuvo una actividad de 3.53 nmoles de NADH/min. Los resultados de la actividad específica de cada una de las fracciones se muestra en el cuadro No.V.

Cuadro No. V. Actividad de la glutamato-deshidrogenasa en núcleos, cloroplastos, mitocondrias y citosol, NO = No observada.

Organito	Actividad GDH-NAD en nmol de NADH/minuto	Actividad específica de GDH-NAD en nmol NADH/μg prot.
Núcleos	NO	NO
Cloroplastos	3.53	11.0
Mitocondrias	24.35	135.0
Citosol	10.73	48.0

Después de corroborar que no se tenía contaminación en núcleos con las fracciones citoplásmicas, se realizó la separación de organitos por centrifugación diferencial como se mencionó en materiales y métodos, con la finalidad de

cuantificar las cpm incorporadas y los μg de ADN presente en cada una de las fracciones. De la fracción nuclear se tomaron 100 μl de muestra y se realizaron preparaciones frescas con el objeto de observar núcleos. Estos se tiñeron con acetorceína y con azul de metileno y se observaron al microscopio en donde se encontró una mayor cantidad de núcleos íntegros comparado con los métodos anteriores, aunque a su alrededor se observaron cantidades variables de restos celulares. De cada tiempo de imbibición se realizaron preparaciones frescas para verificar la presencia de núcleos. De las fracciones restantes no se realizaron preparaciones ya que cloroplastos y mitocondrias sólo se pueden observar al microscopio electrónico y éste no estaba a nuestro alcance. Los resultados de estos experimentos mostraron que cuando se imbibió durante 4 horas, la incorporación de material radiactivo a ADN insoluble en ATC de núcleos, fue de $\bar{X} = 1,519 \pm 101.1$ cpm, (\bar{X} = promedio, \pm desviación estándar, $n = 4$), mientras que en citoplasma la incorporación total fue más alta (cloroplastos $\bar{X} = 1,247 \pm 101.6$ y mitocondrias $\bar{X} = 773.3 \pm 60.2$). Esto se puede apreciar claramente en la figura No. 8. Cuando se determinó la incorporación específica, es decir, la incorporación del material radiactivo a ADN en cada una de las fracciones considerando la cantidad de ADN presente en las fracciones, se observó que esta incorporación específica es mucho mayor en las fracciones citoplasmicas que en núcleo, como se muestra en la figura No.8. Se encontró que en la

fracción cloroplástica se tenía $\bar{X} = 743 \pm 300$ cpm/ μ g ADN de incorporación específica y en la fracción mitocondrial $\bar{X} = 1,105 \pm 200$ cpm/ μ g ADN de incorporación específica, mientras que en la fracción nuclear se observó solamente $\bar{X} = 13.89 \pm 2.7$ cpm/ μ g ADN de incorporación específica.

Cuando se aumentó el tiempo de imbibición a 6 horas se pudo apreciar que la incorporación del material radiactivo a ADN nuclear fue de $\bar{X} = 1,940 \pm 418$ cpm, en cloroplastos de $\bar{X} = 1,359 \pm 278$ cpm y en mitocondrias de $\bar{X} = 786 \pm 563$ cpm. Se puede observar que ni en la fracción nuclear ni en la citoplásmica hubo un incremento notorio de incorporación comparado con las fracciones de 4 horas (cloroplastos $\bar{X} = 1,359 \pm 278$ cpm y mitocondrias $\bar{X} = 786 \pm 563$ cpm, ver cuadro No. VI). Cuando se determinó la incorporación específica (cpm/ μ g de ADN) de cada una de las fracciones a las 6 horas de germinación se observó que en núcleos fue de $\bar{X} = 14.3 \pm 3$ cpm/ μ g ADN, en cloroplastos de $\bar{X} = 843 \pm 322$ cpm/ μ g ADN, y mitocondrias de $\bar{X} = 1,204 \pm 219$ cpm/ μ g ADN, como se puede apreciar en la figura No.9. No existe diferencia relevante en los resultados obtenidos tanto a 4 como a 6 horas de la imbibición (ver cuadro No.VI).

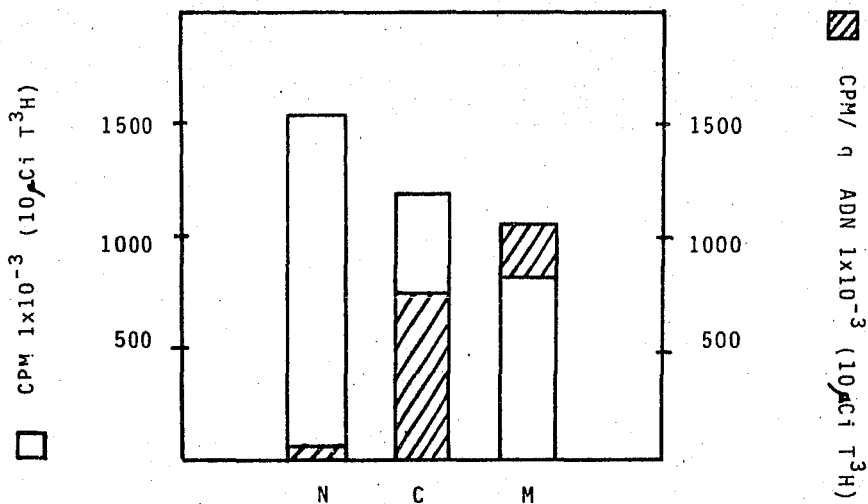


Figura No. 8. Incorporación de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN en ATC de núcleos (N) $\bar{x} = 1519.6 \pm 101.5$, cloroplastos (C) $\bar{x} = 1247.6 \pm 101.6$ y mitocondrias (M) $\bar{x} = 773.3 \pm 80.2$, de 4 horas de imbibición

Patrón de incorporación específica de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC por microgramo de ADN de núcleos (N) $\bar{x} = 13.8 \pm 2.7$, cloroplastos (C) $\bar{x} = 743 \pm 300$ y mitocondrias (M) $\bar{x} = 1105 \pm 200$ de 4 horas de imbibición

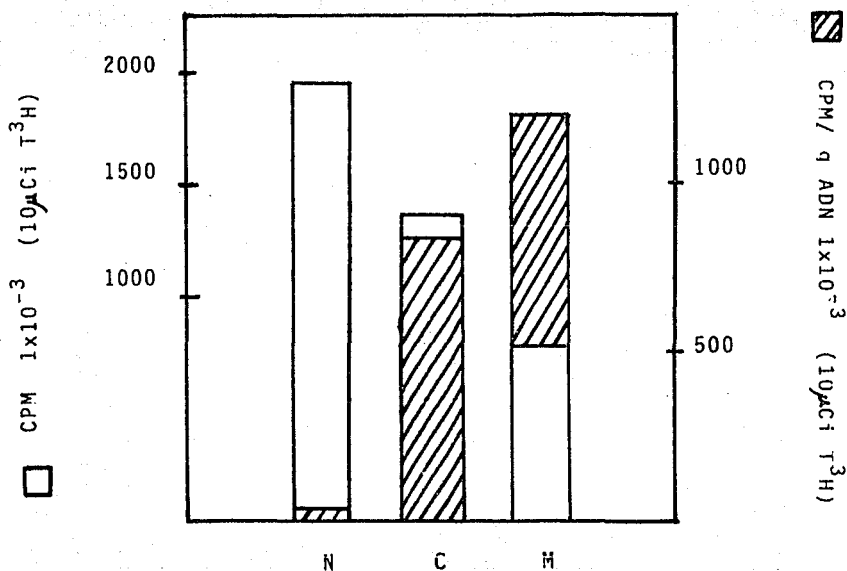


Figura No. 9. Incorporación de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC, de núcleos (N) $\bar{x} = 1940 \pm 418$, cloroplastos (C) $\bar{x} = 1359 \pm 273$ y mitocondrias (M) $\bar{x} = 786 \pm 563$, de 6 horas de imbibición .

Patrón de incorporación específica de timidina tritiada a ADN insoluble en ATC por microgramo de ADN, de núcleos (N) $\bar{x} = 14.3 \pm 3$, cloroplastos (C) $\bar{x} = 834.2 \pm 322$ y mitocondrias $\bar{x} = 1204 \pm 219$, de 6 horas de imbibición .

El tiempo de imbibición se incrementó a 20 horas, tiempo en el cual ya hay evidencia de la existencia de un proceso duplicativo en núcleos (Van de Walle y Bernier 1967, Galli 1985; Baiza et al., 1986). Se puede observar en la figura No. 10 que conforme se aumenta el tiempo de imbibición hay una mayor incorporación del material radiactivo tanto a la fracción nuclear (\bar{X} = 4,277 \pm 1,476 cpm) como en la fracción cloroplástica (\bar{X} = 3,135 \pm 971 cpm) y mitocondrial (\bar{X} = 1,565 \pm 1,046 cpm) aunque este aumento sigue siendo mayor en la fracción citoplásmica que en núcleo. Ahora, comparando cada una de las fracciones con los resultados obtenidos de incorporación específica (cpm/ μ g de ADN), se puede apreciar un aumento relevante en la fracción nuclear (\bar{X} = 49.2 cpm/ μ g ADN), mientras que en las fracciones citoplásmicas no hay modificación con respecto a las 6 horas (mitocondrias \bar{X} = 1,118 \pm 239 cpm/ μ g ADN y en cloroplastos \bar{X} = 993 \pm 319 cpm/ μ g ADN) (Ver cuadro VI).

Con el fin de hacer más evidente el cambio que se observa en la actividad específica en núcleos conforme avanza la germinación, se aumentó el tiempo de imbibición a 40 horas. Los resultados mostraron que en el núcleo hay un aumento muy alto de incorporación del material radiactivo a ADN insoluble, en ATC (\bar{X} = 10,941 \pm 5,138 cpm) mientras que en el citoplasma hubo una disminución de la cantidad del material radiactivo incorporado a ADN insoluble en ATC presente en cloroplastos (\bar{X} = 3,000 \pm 94.1 cpm) y mitocondrias (\bar{X} = 805 \pm 172.3 cpm), lo cual muestra una diferencia notoria de

incorporación siendo mayor ésta en núcleo. Cuando se determinó la incorporación específica de cada una de las fracciones se vió claramente que hubo un incremento en núcleo y éste fue de $\bar{X} = 265 \pm 99.5$ cpm/ μ g ADN mientras que en citoplasma se nota una caída en la incorporación específica ya que cloroplastos presentó una incorporación específica de $\bar{X} = 351 \pm 79$ cpm/ μ g ADN y mitocondrias $\bar{X} = 697 \pm 205$ cpm/ μ g ADN, como se puede apreciar en la figura No. 11 y cuadro VI.

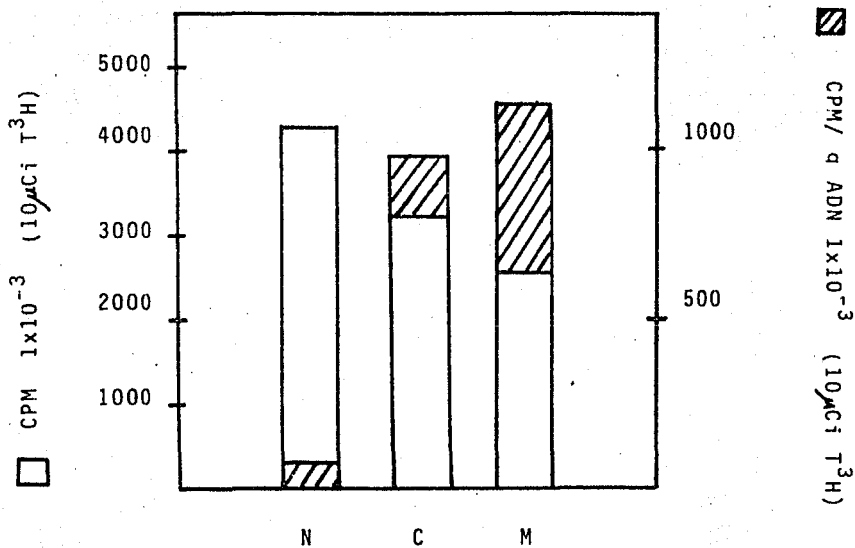


Figura No. 10. Incorporación de timidina tritiada ($10 \mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC, en núcleos (N) $\bar{X} = 4277 \pm 1476$, cloroplastos (C) $\bar{X} = 3135 \pm 971$ y mitocondrias (M) $\bar{X} = 1565 \pm 1046$ de 20 horas de imbibición

Patrón de la incorporación específica de timidina tritiada ($10 \mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC por microgramo de ADN de núcleos (N) $\bar{X} = 49.2 \pm 11$, cloroplastos (C) $\bar{X} = 993 \pm 319$ y mitocondrias (M) $\bar{X} = 1118 \pm 239$, de 20 horas de imbibición

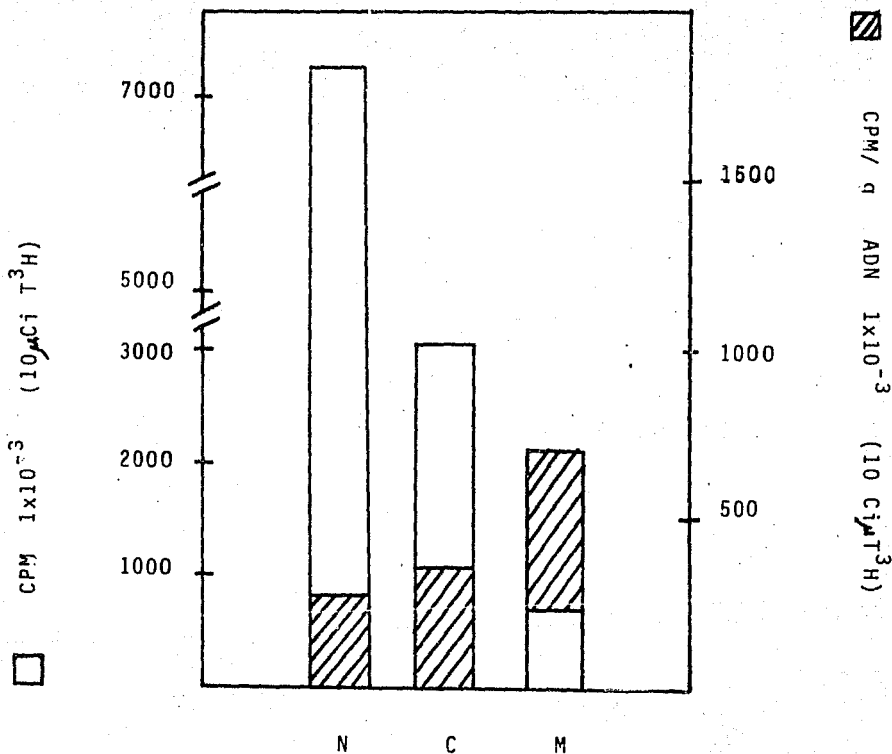


Figura No. 11. Incorporación de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC, en núcleos (N) $\bar{X} = 10941 \pm 5138$, cloroplastos (C) $\bar{X} = 3000 \pm 94.1$ y mitocondrias (M) $\bar{X} = 805 \pm 172.3$ de 40 horas de imbibición

Patrón de incorporación específica de timidina tritiada -- ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC por microgramo de ADN de núcleos (N) $\bar{X} = 265 \pm 99$, cloroplastos (C) $\bar{X} = 351 \pm 70$ y mitocondrias (M) $\bar{X} = 697 \pm 205$ de 40 horas de imbibición

ORGANITOS		Incorporación de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC.	Incorporación específica de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC por microgramo de ADN.
4 horas	Núcleos	$\bar{X} = 1519.6 \pm 101.5$	$\bar{X} = 13.8 \pm 2.7$
	Cloroplastos	$\bar{X} = 1247.6 \pm 101.6$	$\bar{X} = 743 \pm 300$
	Mitocondrias	$\bar{X} = 773.3 \pm 80.2$	$\bar{X} = 1105 \pm 200$
6 horas	Núcleos	$\bar{X} = 1940 \pm 418$	$\bar{X} = 14.3 \pm 3.0$
	Cloroplastos	$\bar{X} = 1359 \pm 278$	$\bar{X} = 834 \pm 322$
	Mitocondrias	$\bar{X} = 786 \pm 563$	$\bar{X} = 1204 \pm 219$
20 horas	Núcleos	$\bar{X} = 4277 \pm 1476$	$\bar{X} = 49.2 \pm 11.0$
	Cloroplastos	$\bar{X} = 3135 \pm 971$	$\bar{X} = 993 \pm 319$
	Mitocondrias	$\bar{X} = 1565 \pm 1046$	$\bar{X} = 1118 \pm 239$
40 horas	Núcleos	$\bar{X} = 10941 \pm 5138$	$\bar{X} = 265 \pm 99.0$
	Cloroplastos	$\bar{X} = 3000 \pm 94.1$	$\bar{X} = 351 \pm 70$
	Mitocondrias	$\bar{X} = 805 \pm 172.3$	$\bar{X} = 697 \pm 205$

Cuadro No. VI. Comparación de la incorporación de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC de 4, 6, 20 y 40 horas de imbibición con la incorporación específica de timidina tritiada ($10\mu\text{Ci}$) a ADN insoluble en ATC por microgramo de ADN de 4, 6, 20 y 40 horas de imbibición.

1.5. LOCALIZACION DE LA SINTESIS DE ADN DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE LA GERMINACION DE MAIZ POR TECNICA AUTORRADIOGRAFICA.

Para corroborar que la síntesis de ADN a tiempos tempranos de la germinación es de origen predominante en organitos se hicieron estudios autorradiográficos en colaboración con Baiza, estudiante de doctorado del departamento de Bioquímica, de la División de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Química. Se imbibieron 25 ejes embrionarios en condiciones estériles en medio MS con 50 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada a diferentes tiempos de la germinación (7 y 14 horas) con pulsos de 7 horas. Los ejes fueron disectados, extrayendo las regiones meristemáticas: mesocótilo (M), raíz primaria (R1) y raíces secundarias (R2), como se mencionó en materiales y métodos. La autorradiografía se realizó por ~~inmersión empleando la~~ emulsión "Nuclear Track NTB2" (Kodak). ~~En un cuárte oscuro con luz roja de seguridad (Safe-light~~ ~~4747 Series, Kodak), se preparó la cantidad necesaria de~~ emulsión diluida 1 a 1 con agua destilada estéril y se introdujo en un baño a una temperatura entre 40 y 42 ° C. hasta que quedó completamente líquida (aproximadamente 15 minutos). Posteriormente, se fueron sumergiendo cada una de las preparaciones teniendo cuidado de que no se acumularan burbujas sobre ellas; luego se colocaron en una gradilla y se dejaron secar durante 30 minutos. Cuando la emulsión estuvo completamente seca, las preparaciones se introdujeron en

cajas negras que contenían como desecador sílice de gel. Las cajas se cerraron herméticamente, se envolvieron en papel negro y se guardaron a 4 ° C durante un mes para permitir la exposición de la emulsión. Concluido el tiempo de exposición se revelaron todas las preparaciones y los controles respectivos. Todas las soluciones para este proceso se mantuvieron a 18 ° C. El revelado se realizó en el cuarto oscuro con luz roja especial para autorradiografía.

Los portaobjetos con emulsión se pasaron sucesivamente por: (1) revelador Kodak D 19 durante 5 minutos, (2) agua acidulada con ácido acético (solución al 1 %) durante 2 minutos, (3) agua destilada, 2 minutos, (4) fijador rápido para autorradiografía, durante 5 minutos, (5) tres pases con agua destilada 5 minutos cada uno. Posteriormente los portaobjetos se pusieron a secar en una gradilla con la ayuda de un ventilador (este secado se realizó fuera del cuarto oscuro).

Las preparaciones se observaron directamente sin cubreobjetos y el aceite de inmersión se colocó sobre la emulsión.

Al ser imbibidos los ejes embrionarios de 0 a 7 horas con marca continua, se encontró que la marca, aunque escasa, estaba preferencialmente en citoplasma como se puede apreciar en las figuras 12, 13, y 14.

Por cada tejido se contaron 10,000 células y se realizó una cuantificación en porcentaje de la marca encontrada.

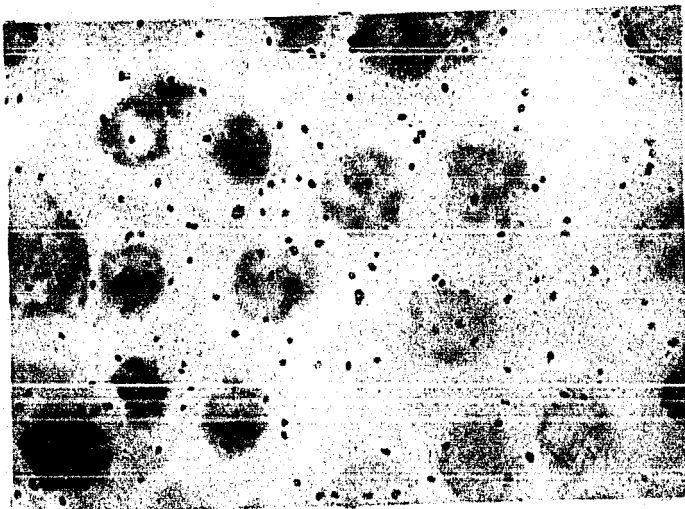


Figura No. 13. Incorporación de timidina tritiada. Los gránulos de plata vistos por autorradiografía se localizan en el citoplasma de las células. Raíz primaria de eje embrionario de maíz de 7 horas de germinación (100 X).

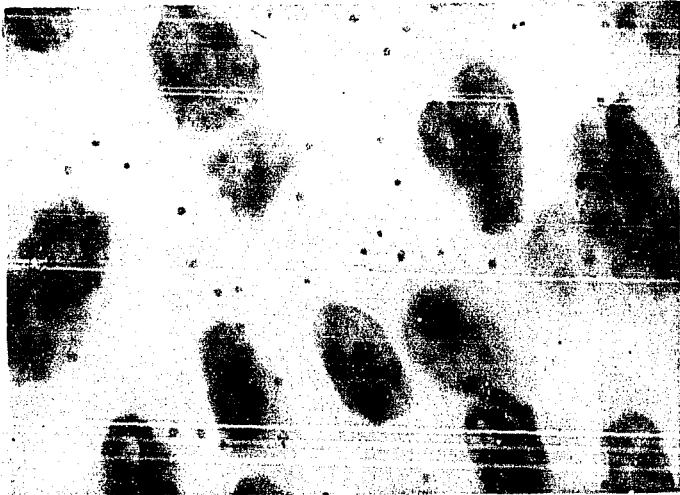


Figura No. 14 . Incorporación de timidina tritiada. Los gránulos vistos por autorradiografía se localizan en el citoplasma de las células. Raíz secundaria de eje embrionario de maíz de 7 horas de germinación (100 X).

Con ésto se determinó el porcentaje de células marcadas y con respecto a éste se cuantificó el número de gránulos encontrados en cada una de las células, cuantificándolos también en porcentajes.

En el cuadro No. VII se puede apreciar el porcentaje de células marcadas cuando se imbibieron durante 0 a 7 horas con marca continua. Los resultados mostraron que la marca está preferencialmente en citoplasma, encontrándose la mayor parte de células marcadas en mesocótilo (46.39 %), después en raíz primaria (27.2 %) y raíz secundaria (8.68 %).

En el cuadro No. VIII, se muestran los porcentajes de gránulos encontrados en cada uno de los tejidos. El mesocótilo presentó de 2 a 5 gránulos por célula en un porcentaje de 87.1 y al mismo tiempo este presentó 12.37 % de células que presentaron de 6 a 10 gránulos. Tanto en raíz primaria como en raíz secundaria el mayor número de células marcadas presentaron de 2 a 5 gránulos por célula y un mínimo del total de células marcadas presentó de 6 a 10 gránulos por célula. En mesocótilo presentó 0.5 % del total de células marcadas las cuales presentaron de 11 a 25 gránulos por célula, la raíz primaria 0.3 % del total de células marcadas las cuales presentaron de 11 a 25 gránulos por célula y la raíz secundaria 0.5 % del total de células marcadas las cuales presentaron de 11 a 25 gránulos por célula.

Cuadro No. VII. Medición por autorradiografía de la marca incorporada a las células en el periodo de 0 a 7 horas de imbibición con marca continua en (M) mesocótilo, (R1) raíz primaria y (R2) raíz secundaria.

M	% de células marcadas	
	R1	R2
46.39	27.2	8.68

Cuadro No. VIII. Porcentaje de gránulos encontrados en mesocótilo, raíz primaria y raíz secundaria con respecto al porcentaje del total de células marcadas, cuando se imbibieron de 0 a 7 horas, con marca continua.

Número de granulos	Porcentaje de granulos encontrados en citoplasma		
	M	R1	R2
2 a 5	87.1	94.3	92.0
6 a 10	12.37	5.3	8.04
11 a 25	0.5	0.3	0.5

Cuando se imbibieron ejes embrionarios de maíz durante 14 horas, con un pulso de marca radiactiva de 7 a 14 horas se

encontró que la mayor cantidad de marca está en citoplasma, predominando en mesocótilo con un 75 % de células marcadas; en seguida en raíz primaria con un 35.63 % y en raíz secundaria con un 25.15 %, como se puede apreciar en el cuadro No. IX .

La mayoría de las células marcadas en mesocótilo y en raíz primaria presentaron de 21 a 30 gránulos por célula, siendo éste un porcentaje de 39.3 del total de células marcadas del mesocótilo. En la raíz primaria se presentó un 37.4 % y en la raíz secundaria se presentó un 22.0 % de células marcadas que presentaron de 11 a 20 gránulos por célula del total de células marcadas, como se observa en el cuadro No. X.

Cuando se cuantificó la marca encontrada en el núcleo de las células de cada tejido se observó que ésta fue muy baja como se muestra en el cuadro No. IX.

La cuantificación de la marca radiactiva en núcleos nos indicó que la proporción de núcleos marcados fue muy baja en los tejidos meristemáticos, ya que esta marca no excede del 2 % del total de células marcadas a las 14 horas, como se puede apreciar en el cuadro No. IX. Al mismo tiempo, se midió el porcentaje de gránulos encontrados en los núcleos de los diferentes tejidos meristemáticos. Los resultados mostraron que mesocótilo presentó 0.59 % de núcleos marcados con 2 a 5 gránulos por célula. El porcentaje de núcleos marcados que presentaban de 6 a 10 gránulos por célula fue de 0.28 % y el de los que presentaron de 11 a 20 gránulos por célula

fue de 0.26 % . En raíz primaria se encontró que el 0.49 % de núcleos marcados presentaron de 2 a 6 gránulos por célula y raíz secundaria presentó 0.6 % de núcleos marcados que presentaron de 2 a 5 gránulos por célula con respecto al total de los núcleos marcados, como se puede apreciar en el cuadro No. X. La distribución de la marca radiactiva en cada uno de los diferentes tejidos meristemáticos se puede apreciar en las figuras 15, 16 y 17.

Cuadro No. IX. Cuantificación de la marca encontrada a las 14 horas de imbibición de los diferentes tejidos meristemáticos.

Cantidad de marca encontrada (%)					
Citoplasma			Núcleo		
M	R1	R2	M	R1	R2
75	35.63	25.13	1.40	0.91	0.71

Cuadro No. X. Porcentaje de gránulos encontrados en los diferentes tejidos meristemáticos con respecto al total de células marcadas, imbibidos durante 14 horas.

Número de gránulos.	Citoplasma			Núcleo		
	M	R1	R2	M	R1	R2
2 a 5	13.9	12.0	17.5	0.59	0.49	0.6
6 a 10	15.9	15.4	22.9	0.28	0.40	0.07
11 a 20	30.8	34.4	41.1	0.26	----	----
21 a 30	39.3	37.4	17.5	-----	----	----

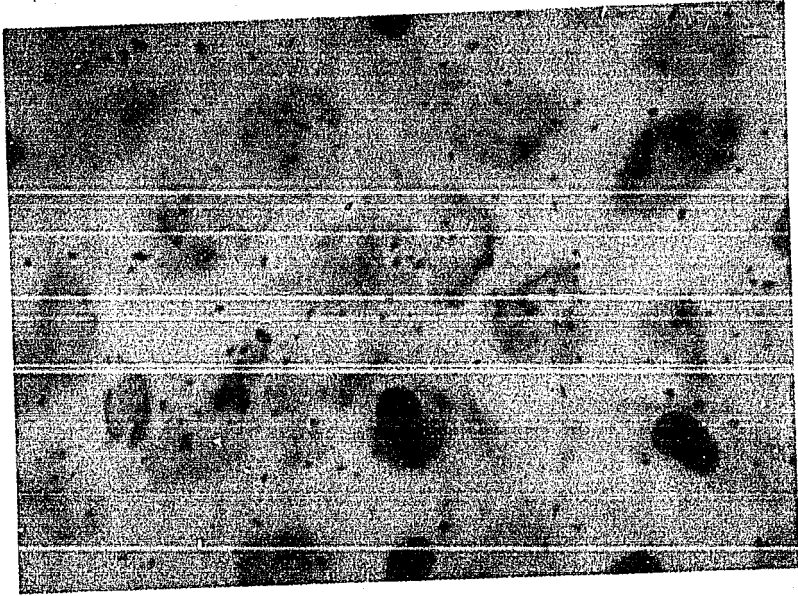


Figura No. 15. Incorporación de timidna tritiada. Los gránulos de plata se localizan mayoritariamente en el citoplasma y un porcentaje menor en núcleo. Imagen por autorradiografía en mesocotilo de eje embrionario de maiz de 14 horas de germinación (100 X).

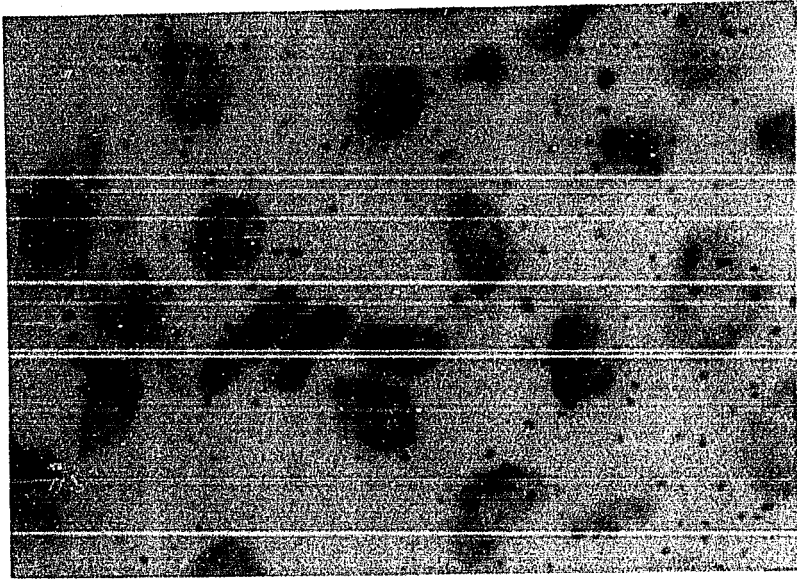


Figura No. 16. Incorporación de timidina tritiada. Los gránulos de plata se localizan tanto en núcleos como citoplasma pero preferencialmente en éste último. Imagen por autorradiografía de raíz primaria de eje embrionario de maíz de 14 horas de germinación (100 X).

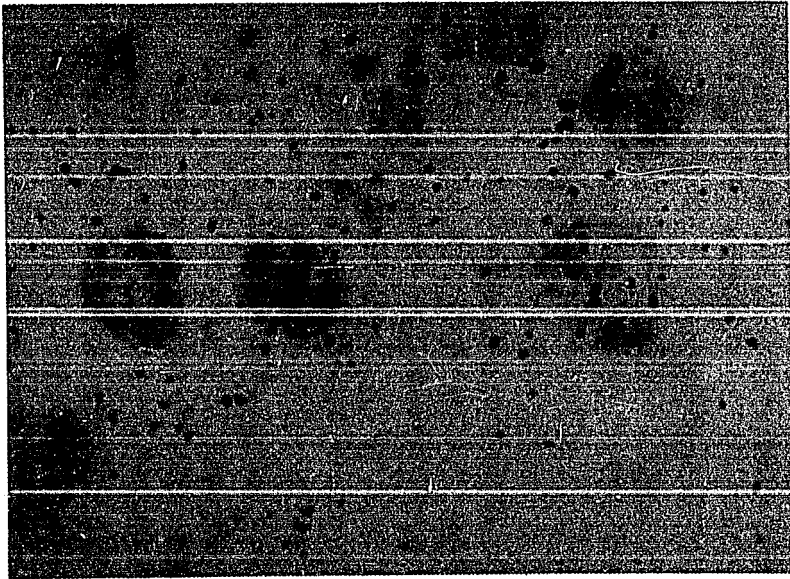


Figura No 17. Incorporación de timidina tritiada. Los gránulos de plata se localizan mayoritariamente en citoplasma (cloroplastos y mitocondrias) y en una cantidad menor en el núcleo de las células. Imagen por autorradiografía de raíz secundaria de eje embrionario de maíz de 14 horas de germinación (100 X).

1.6. CITOGNETICA.

Conjuntamente con los experimentos de autorradiografía se determinó si había presencia de figuras mitóticas a las 15 horas de la germinación. El resultado mostró que no existen figuras mitóticas en las primeras 14 horas y que de hecho comienzan a aparecer a las 24 horas de germinación.

Estos experimentos, realizados bajo la dirección de la Maestra Baiza, mostraron que a las 24 horas de germinación se observa un índice mitótico de 5 % en mesocotilo y de 2.1 % en raíz primaria. Al aumentar el tiempo de imbibición hasta 28 horas se observó un mayor porcentaje de división, es decir, que aquí ya hay una división más continua, encontrándose un índice mitótico de 9.0 % en mesocótilo y 3.2 % en raíz primaria. Ejemplos de esto se pueden apreciar en el cuadro No. XII y en las figuras 18, 19, 20, y 21.

Cuadro No. XI1. Indices mitóticos obtenidos de células meristemáticas de diferentes regiones de ejes embrionarios de maíz de 24 y 28 horas de germinación: mesocótilo (M), raíz primaria (R1).

Tiempo de Germinación (horas)	Indice mitótico (%)	
	M	R1
24	5.0	2.1
28	9.0	3.2

Los resultados anteriores muestran cláramente que se está llevando a cabo un tipo de síntesis de ADN en las primeras horas de germinación (diferente en cloroplastos y mitocondrias del que ocurre en núcleos) y posteriormente se realiza la síntesis duplicativa previa a que las células entren en división.

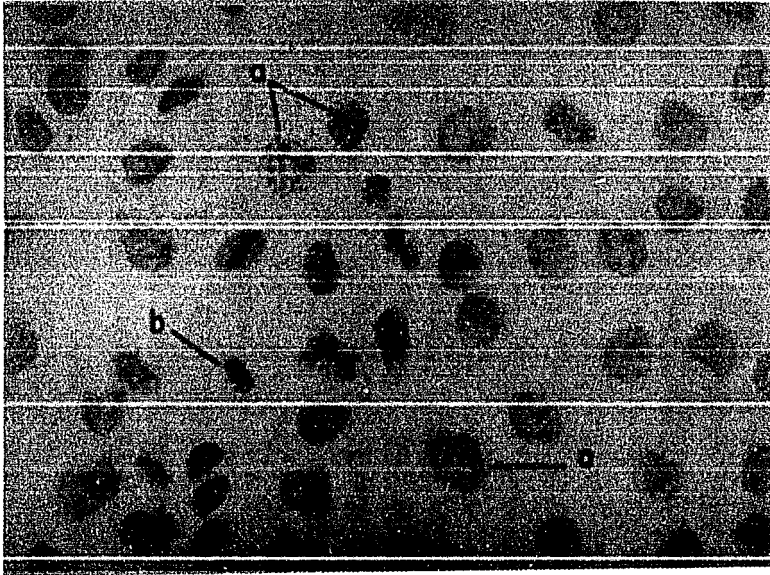


Figura No. 18. Primeras figuras mitoticas encontradas en raiz primaria del eje embrionario de maiz de 24 horas de germinación: a) profase, b) metafase (40 X).

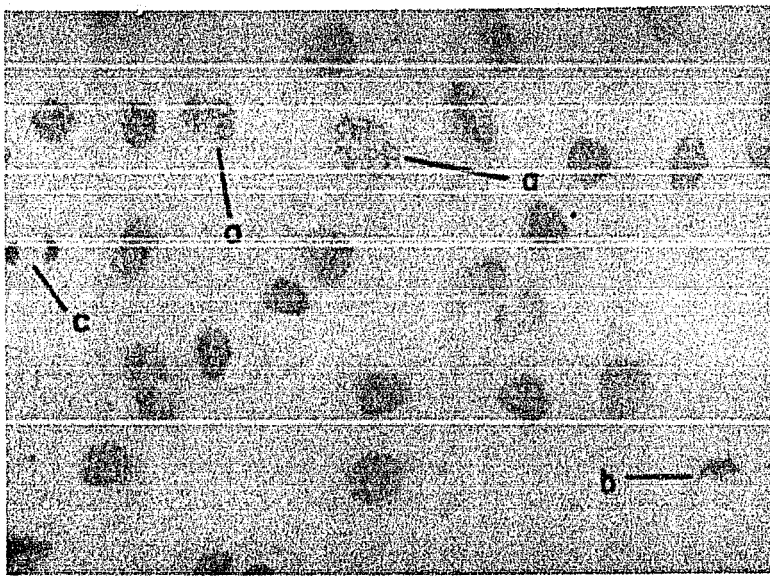


Figura No. 19. Primeras figuras mitóticas encontradas en raiz primaria del eje embrionario de maíz de 24 horas de germinación: a) profase, b) metafase y c) telofase (40 X).

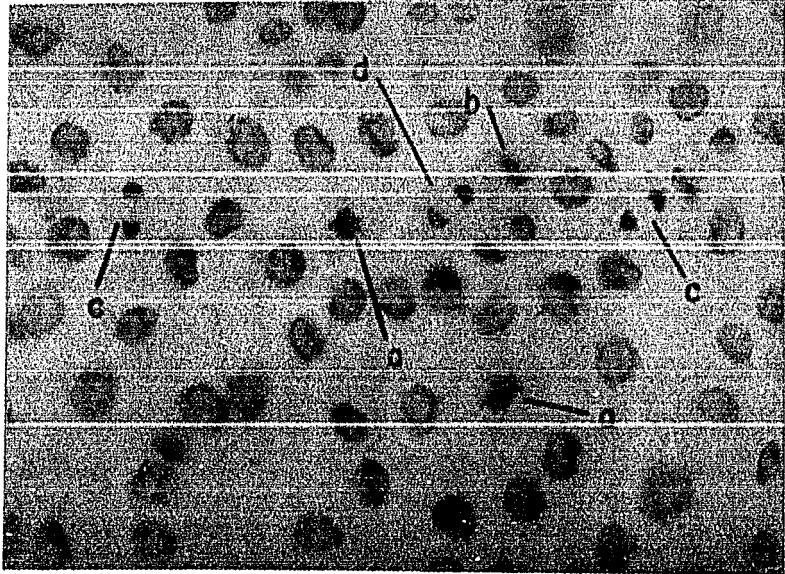


Figura No. 20. Primeras figuras mitoticas encontradas en mesocotilo de eje embrionario de maiz de 28 horas de germinación: a) profase, b) metafase, c) anafase, d) telofase (40 X).

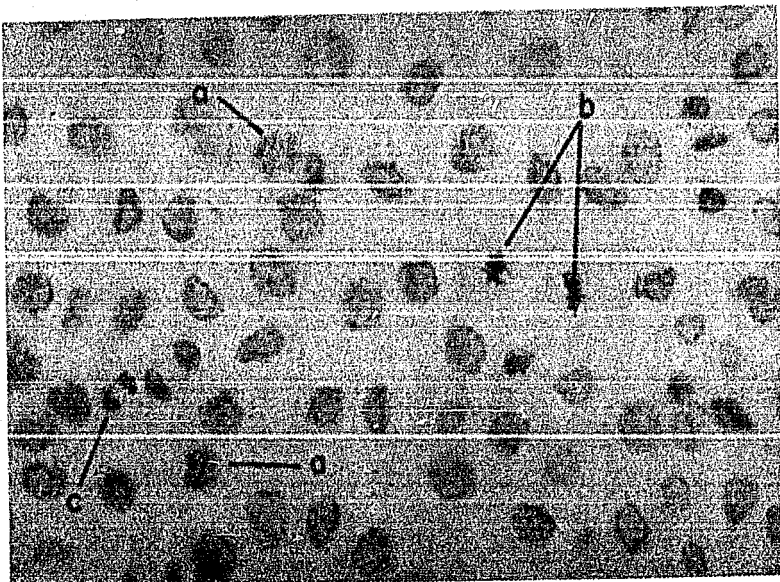


Figura No. 21. Figuras mitóticas encontradas en raíz primaria del eje embrionario de maíz de 28 horas de germinación: a) profase, b) metafase, c) anafase (40 X).

VI.- D I S C U S I O N .

Los estudios realizados con semillas en germinación han mostrado que el inicio de la síntesis duplicativa de ADN parece ser variable dependiendo de la especie y va desde 3 horas hasta 12 horas (Olsson y Boutler, 1968; Chen y Osborne, 1970; Mory et al., 1972; Galli y Sparvoli, 1973; Galli, 1985).

Van de Walle y Bernier (1967), observaron por técnica autorradiográfica que la incorporación de timidina tritiada en células radiculares a las 15 horas de la germinación de embriones de maíz ocurría únicamente en citoplasma; posteriormente observaron que sólo a partir de las 39 horas de germinación los gránulos de plata se encontraban en la periferia de los núcleos.

Similarmente Galli y Sparvoli (1973), trabajando con embriones de Haplopappus gracilis en germinación, encontraron por técnica autorradiográfica que la incorporación de timidina tritiada en raíz primaria se localiza exclusivamente en citoplasma a las 12 horas de germinación y que esta marca se intensifica a partir de las 16 horas encontrándose marca en núcleo después de las 20 horas de imbibición.

Nuestro trabajo apoya a las evidencias anteriores ya que al analizar la síntesis temprana de ADN de ejes embrionarios de maíz se encontró que entre 0 y 7 horas de imbibición la marca radiactiva se encuentra únicamente en citoplasma ya que no se

observaron núcleos marcados. Es a partir de las 14 horas de imbibición que se empiezan a observar núcleos marcados aunque en una proporción muy baja, localizándose la marca principalmente en citoplasma. Estos resultados son apoyados por los experimentos realizados utilizando centrifugación diferencial. En este caso se mostró que la incorporación específica de timidina tritiada fue mayor en la fracción citoplásmica en todos los tiempos ensayados y que en núcleos fue aumentando conforme transcurría el tiempo. No obstante, la incorporación absoluta del material radiactivo a ADN fue mayor en núcleo en todos los tiempos. La incorporación específica en núcleos aumenta visiblemente después de las 20 horas de imbibición mientras que en citoplasma no se modifica sino hasta las 40 horas de imbibición tiempo en que se ve reducida en un 50 % .

Por otro lado, se encontró que en las primeras horas de la germinación de maíz no se observaron figuras mitóticas las cuales aparecen hasta las 24 horas. El análisis por autorradiografía de secciones de ejes embrionarios germinados mostró que es hasta las 28 horas de imbibición cuando aparecen figuras mitóticas marcadas (comunicación personal de A. Baiza).

Lo anterior sugiere que la síntesis que se está llevando a cabo en núcleos en las primeras horas es diferente a la de tipo duplicativo. Existen evidencias de procesos reparativos del ADN durante las primeras horas de la germinación en

ejes embrionarios de semillas de centeno γ -irradiados (Cheah y Osborne, 1978; Osborne *et al.*, 1980/81; Osborne 1982; Osborne, 1983; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986), en ejes embrionarios de maiz γ -irradiados (Zarain *et al.*, 1987) y en semillas tratadas con agentes mutagénicos (Yamaguchi *et al.*, 1975). Recientemente, en nuestro laboratorio se observó, mediante gradientes alcalinos de sacarosa y geles de agarosa, que el ADN de bajo peso molecular proveniente de embriones de maiz deteriorados, no germinados, cambiaba a ADN de alto peso molecular según los embriones se imbibían por 3 a 15 horas lo cual sugiere que se está llevando a cabo un proceso de tipo reparativo (Mélendez, 1987). Con las evidencias acumuladas, especulamos que la síntesis que ocurre en núcleo en tiempos tempranos de la germinación es de tipo reparativo. Por ello, surgió la siguiente pregunta: ¿Porqué por técnica autorradiográfica no se observan gránulos de plata en núcleos en las primeras horas de germinación, aún cuando hay incorporación de timidina tritiada ?

Sugerimos que la ausencia de gránulos en núcleos se debe a que la marca se distribuye en toda la extensión del ADN nuclear y la actividad específica por región marcada es muy pequeña como para lograr producir manchas autorradiográficas. Esto pareciera evidente sobre todo si comparamos la cantidad de ADN en núcleo contra la que existe en organitos y que difiere en varios órdenes de magnitud.

En cuando a la síntesis que está ocurriendo en organitos

en las horas tempranas de la germinación, especulamos que es de tipo duplicativo ya que la cantidad de gránulos encontrados por técnica autorradiográfica es muy alta. No obstante, la investigación de la naturaleza de ésta síntesis se encuentra en proceso.

VII.- CONCLUSIONES .

- 1) La síntesis temprana de ADN de ejes embrionarios de maiz ocurre preferencialmente en organitos.
- 2) No se llevan a cabo mitosis en tiempos tempranos de la germinación de maiz. Por lo tanto, podemos decir que no hay síntesis duplicativa en núcleo.
- 3) La síntesis temprana de ADN que se lleva a cabo en núcleo podría ser de tipo reparativo.

VIII.- R E F E R E N C I A S

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., (1986). *Biología Molecular de la Célula*. ED. Omega. S.A. Barcelona, España. pp 656-657.

Baiza, A., Aguilar, R., y Sánchez de Jiménez, E., (1986). Histones and the first cell cycle in maize germination. *Physiol. Plantarum*, 68:259-264.

Bewley, D. J. y Black, M. (1978). *Physiology and Biochemistry of Seed in relation to germination*. Vol 2 (Viability, Dormonancy and Environmental Control) Springer-Verlag. pp 1-3, 7-13, 39-41.

Bewley, D. J. y Black, M. (1986). *Seeds physiology of development and germination*. Plenum Press. New York-London. pp.89- 171, 559-591.

Biggins, J. (1971). Protoplasts of algal cells. En: *Methods in Enzymology*. Vol. XXIII. Photosynthesis. Part A. San Pietro, A., pp 209-211.

Brooker, J.D., Cheung, C.P., y Marcus, A. (1977). *Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. (A. Khan, ed), North Holland Publishing Co. Amsterdam. p. 347-356.

Castroviejo, M, Tharaud, D., Morquot, B., y Lituak, S. (1979). Factors affecting the onset of deoxyribonucleic acid synthesis during wheat embryo germination. *Biochem J.* 181:193-199.

Cheah, K. S. E. , y Osborne, D.J. (1978) DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature*, 272:593-599.

Chen, D., y Osborne, D.J. (1970). Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos. *Nature*, 226:1157-1160.

Ching, T. M. (1972). Metabolism of germinating seeds, in: T.T. Kozlowski, Ed. Seed Biology, Vol.1, Academic Press, New York. pp. 116-117.

Cronquist, A. (1979). Introducción a la Botánica. 2a ed. Editorial Continental. S.A. México, D.F. p. 680.

Datta, K., Marsh, y Marcus, A. (1983). Early growth of wheat embrionic axes and the synthesis of RNA and DNA. Plant Physiol. 72:394-397.

Domes, J. y Van de Welle, C. (1983). Newly synthesized mRNA is translated during the initial imbibition phase of germination in maize embryos. Plant Physiol. 73:484-487.

Font Quer, P. (1982) Diccionario de Botánica. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España. p 35.

Galli, M.G. (1984). Synthesis of the DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and benzyladenine. Planta, 160:193-199.

Galli, M.G. (1985). DNA synthesis in storage organs of germinating seeds: An autoradiographic analysis. J. Exp. Bot., 36,167:963-973.

Galli, M. G. y Sparvoli, E. (1973). Priority of mitochondrial and plastidial DNA synthesis in respect to nuclear DNA replication in the embryo of germinating seeds. Caryologia, 26:496-506.

García, R.M. (1985). Relación entre viabilidad de germinación y síntesis de DNA en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Bilólogo) Facultad de Química. UNAM.

Giles, K.A. y Myers, A. (1965). An improved diphenilamine method for the estimation of dexyribonuclec acid. Nature, 206:9.

Greulach, V.A. (1970). Las plantas. Introducción a la botánica moderna. Ed. Wiley, S.A. México. p.223-226.

Hrubec, T., Robinson, M, y Donaldson, R. (1985). Isolation of Mitochondria from Soybean Leaves on Discontinuous Percoll Gradients. *Plant. Physiol.* 77:1010-1012.

Jugenheimeir, R.W.(1976). Corn:improvement, set production and uses. John Wiley and Sons, Inc. p. 25.

Klein,S., Barenhulz, H., y Budnik, A (1971). Protein synthesis and loss of viability in Phaseolus vulgaris embryos. *Plant Cell Physiol.* 12:41-60.

Luthe, D. S., y Quatrano, R. S. (1980 a). Transcription in isolated wheat nuclei. I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiol.* 65:305-308.

Luthe, D.S., y Quatrano, R.S. (1980 b). Transcription in isolated wheat nuclei. II. Characterization of RNA synthesized in vitro. *Plant Physiol.* 65:309-313.

Marcus, A., Feeley,J., y Volcani, T. (1966). Protein synthesis in imbibed. Seed. II. Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation, and polysome formation. *Plant Physiol.*, 41:1167-1177.

Matz, A.S. (1969). *Cereal Science*. The Abi Publishing Co. Inc. London, England. p.49-51.

Mayer, A.M. y Poljakoff-Mayber, A. (1975). *The germination of seeds*. 2a. ed. Pergamon Press. p. 21-28.

Meyer, W.A.O. (1977). Semejanza a nivel molecular de los genomas de varios géneros de trigo y centeno. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). Facultad de Química. UNAM.

Meléndez L. S. G. (1987). Patrones de peso molecular del DNA mediante gradientes de sacarosa y geles de agarosa de semillas deterioradas de maíz. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). Facultad de Química. UNAM.

Moreno, N.P. (1984). Glosario botánico ilustrado. Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos. Cd. Compañía Ed. Continental, S.A. de C.V. México. p. 115.

Mory, Y.Y., Chen, D., y Sarid, S. (1972). Onset of deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat embryos. *Plant Physiol.* 49:20-23.

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Muro, R.M. (1986). Efecto del deterioro de semillas sobre los sistemas de síntesis de proteínas en maíz. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico. Facultad de Química. UNAM.

Murray, D. R. (1984). Seed physiology. Vol. II. Academic Press, Australia. 1a ed. pp 75-115.

Olsson, R., y Boutler, D. (1968). Nucleic acid metabolism of Vicia faba during germination and growth. *Physiol Plant.* 21:428-434.

Osborne, D. J., Sharon, R., y Ben Ashai, R. (1980/81). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (Secale cereale). *Is. J. Bot.* 29:259-272.

Osborne, D. J. (1982). DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. in embryonic development, (Allan R. Liss, Inc. New York, N.Y.). Part B: Cellular Aspects. p. 577-592.

Osborne, D. J. (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61:3568-3577.

Osborne, D. J., Dell' Aquilla, A., y Helder, R. H. (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. F.E.B.S. Symposium on DNA (1983). *Folia Biologica (PRAHA) Special Publication.* p. 155-169.

Feterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. Anal. Biochem. 88:346-356.

Sanchez de Jiménez, E., Aguilar, R., y López, S. (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. Bioche. Biophys. Res. Commun. 99: 455-450.

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

Sen, S. y Osborne, D. J. (1977). Decline in ribonucleic acid protein synthesis with loss of viability during the early hour of imbibition of rye (Secale cereale L.)embryos. Biochem. J. 166:33-38.

Stoddart, J.L. y Thomas, H. (1973). Protein synthesis in barley embryos germinating seeds. Planta 112:309-321.

Van de Walle, C., y Bernier, G. (1967). L'incorporation de la thymidine tritiee dans le cytoplasme précède l'incorporation dans le noyan cellulaire au cours de la germination de Zea mays. Compt. Rend. Acad. Sc. Paris, 265:1599-1601.

Vázquez, R. J., y López, M. S. (1986). Inhibición in vitro de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maiz por novobiocina y ARA-CTP. Rev. Soc. Qui. Méx. en prensa.

Vázquez-Ramos, y Osborne, D.J. (1986). Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-Cellulose Chromatography. Mutation Res. 166:39-47.

Weier, E.T., Stocking, R.C y Barbour, G. M. (1979) Botánica. Ed. LIMUSA. México. p. p. 328-329.

Yamaguchi, H., Tatara, A., y Naito, T. (1975). Unsheduled DNA synthesis induced in barley seeds by gamma rays and 4-nitroquinoline-1-oxide. Japan. J. Genet. 50:30-318.

Zarain H.M., Bernal, L.I., y Vázquez Ramos, J. (1987). Effect of bezyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryos axes. *Mutation Res.* 181:39-47.

Zelitch, I. (1967). Mitochondria from spinach leaves. *Methods in enzymology*. Vol. X. Oxidation and Phosphorylation. Ed. Ronald W. Estabrook y Maynad E. Pullman, editores. pp 133-135.