

141
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO DE BENCILADENINA
SOBRE LA POBLACION DE RNA
MENSAJEROS PRESENTES DURANTE
LA GERMINACION DEL MAIZ**



T E S I S EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE JUAN ZUÑIGA AGUILAR

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



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.

CONTENIDO.

	Pag.
1. INTRODUCCION.	1
2. GENERALIDADES.	2
2.1 Angiospermas	2
2.1.1 Estructura de una semilla de angiosperma	2
2.2 Germinación	6
2.3 Bioquímica de la germinación	8
2.5 Fitorreguladores en la germinación	9
2.7 Efecto de las citocininas sobre la síntesis de RNA	14
2.8 Efecto de las citocininas sobre la síntesis de DNA	15
2.9 Mecanismo de acción de las citocininas	16
2.10 Antecedentes inmediatos	18
3. HIPOTESIS.	19
4. OBJETIVOS.	19
5. MATERIALES.	20
5.1 Material Biológico	20
5.2 Material Químico	21
6. METODOS.	28
6.1 Obtención de los ejes embrionarios de maíz	28
6.2 Imbibición de los ejes embrionarios de maíz	29
6.3 Metodología para la extracción del RNA total	29
6.4 Preparación de la resina de oligo-(dT)celulosa	32
6.5 Separación del RNA poli-[A ⁺]	32
6.6 Traducción <i>in vitro</i> del RNA poli-[A ⁺]	34
6.7 Analisis de la incorporación de metionina, L-[³⁵ S] en proteína, por medio del material insoluble en TCA	36
6.8 Electroforesis PAGE-SDS	38
6.8.1 Preparación de los geles de poliacrilamida	38
6.8.2 Tinción de los geles	39
6.8.3 Tratamiento de fluorografía	40
7. RESULTADOS.	42
7.1 Extracción del RNA total	42
7.2 Separación del RNA poli-[A ⁺]	48
7.3 Traducción <i>in vitro</i> del RNA poli-[A ⁺]	57
7.4 Electroforesis PAGE-SDS y Fluorografía	74
8. DISCUSION.	79
9. CONCLUSIONES.	84
10. REFERENCIAS.	85

1. INTRODUCCION.

El maíz es una planta monocotiledónea de la familia de las angiospermas (Matz, 1969), cuya semilla representa el elemento nutritivo primordial de los pueblos americanos desde tiempos precolombinos. En México, la importancia de esta planta no es menor, por lo que son de gran relevancia los estudios que se llevan a cabo sobre los eventos metabólicos que ocurren durante su germinación. Dentro de estos estudios se encuentran aquellos que analizan el efecto de los fitorreguladores u hormonas vegetales sobre el metabolismo del maíz durante la germinación. En este punto, se han hecho varias investigaciones sobre el efecto que ejercen las citocininas, demostrándose que estas moléculas reguladoras promueven los procesos metabólicos de la germinación en diferentes niveles. De particular interés se encuentran sus efectos en el metabolismo del DNA. La Benciladenina (BA, una citocinina sintética) ha demostrado tener efectos sobre el tipo de síntesis del DNA y la promoción de un cambio en la actividad de la DNA polimerasa durante la germinación, promoviendo también un adelanto de ciclos celulares, posiblemente afectando enzimas relacionadas con este evento metabólico (Reyes y Vázquez Ramos, 1988 y 1991). Se desconoce el mecanismo por el cual BA promueve estos cambios, pero algunas evidencias indican su influencia sobre los productos protéicos directamente involucrados con los procesos afectados (DNA polimerasa, proteína p34, etc., Vázquez Ramos y Reyes, 1988 y 1990).

2. GENERALIDADES.

2.1 Angiospermas.

El término angiosperma proviene de los vocablos griegos *angeion*, que significa vaso o conducto y *sperma*, que significa semilla. Este término es aplicado por lo tanto a aquellas plantas superiores cuyas semillas jóvenes se encuentran encerradas dentro de un ovario (Weier y col, 1970). Las angiospermas son las plantas con flores y actualmente predominan en el reino vegetal, constituyendo casi todas las variedades de cultivos agrícolas, hortícolas y de jardinería.

2.1.1 Estructura de la semilla de Angiosperma.

Las semillas de angiosperma se desarrollan de un óvulo fecundado, el cual consiste de un embrión envuelto derivado de la fusión de los núcleos de gametos masculino y femenino (Mayer, 1975).

La estructura del embrión está constituida por un eje embrionario, el cual puede tener uno o más cotiledones y el escutelo. El eje embrionario consiste del hipocotilo al que están unidos los cotiledones, la radícula y la plúmula o epicotilo (ver fig. 2.1). En raras ocasiones se encuentra presente un mesocotilo, que es la parte nodal localizada entre el escutelo y el coleóptilo.

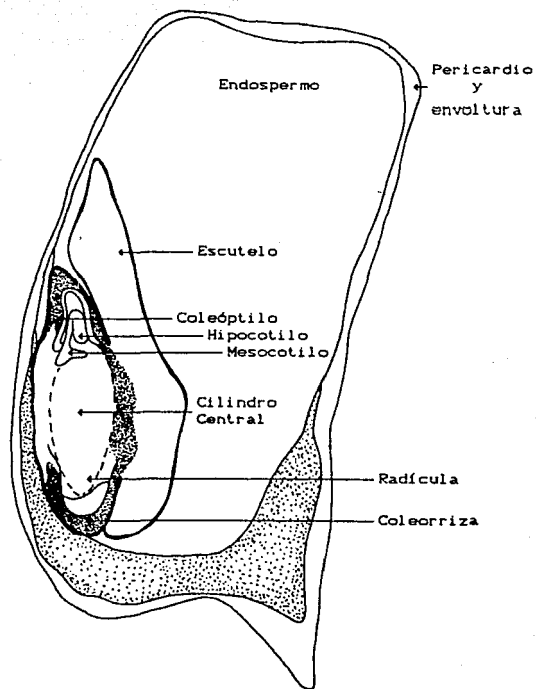


Figura 2.1 Estructura de una semilla de angiosperma.

El epicotilo es el extremo apical o el primer internodo del eje embrionario y se forma por arriba del cotiledón. El escutelo contiene un alto contenido de aceites (de un 35 a un 40%) y sustancias activas e importantes en las etapas iniciales de la germinación.

La testa o envoltura se desarrolla a partir de los tegumentos del óvulo. Es una capa dura cuya importancia fisiológica radica en la presencia de las cutículas externa e interna, que le confieren a la semilla impermeabilidad al agua y/o gases, con lo que se logra un efecto regulador sobre el metabolismo y el crecimiento de tejidos y órganos (Weier y col, 1979).

El endospermo es el principal tejido de reserva energético de la semilla. Está compuesto por 90% de almidón, 7% de proteínas, pequeñas cantidades de aceite y otros compuestos químicos. En el endospermo, la proteína se encuentra formando una red córnea en la que están incluidos los gránulos de almidón (citado en Miranda, 1984). Es la fuente de nutrimentos del eje embrionario durante la germinación y de la plántula durante el desarrollo, hasta que las raíces están bien firmes y las hojas elaboran carbohidratos en cantidad suficiente para satisfacer las demandas energéticas (Bewley y Black, 1984). Dentro de las angiospermas se encuentran dos clases de plantas: las dicotiledóneas, plantas con semillas de dos cotiledones, y las monocotiledóneas, plantas con semillas de un cotiledón.

La familia de las gramíneas se encuentra dentro de las monocotiledóneas, destacando ampliamente por ser utilizadas como fuente alimenticia de los seres humanos (Cronquist, 1970; Junghenheimer, 1978).

Una de las especies de gramíneas más importantes, desde el punto de vista alimenticio, cultural y económico, es el maíz, originario de América, de nombre botánico *Zea miz Linnaeus*

Como miembro de esta familia, el maíz posee sistemas de raíces fibrosas, hojas alternadas, dos hileras de vainas paralelas en las hojas, hojas separadas de las vainas, tallos cilíndricos con nódulos sólidos y flores más o menos espigadas (Matz, 1980).

Después del trigo, el maíz es, desde el punto de vista de producción, la planta alimenticia más importante del mundo.

La semilla de maíz contiene:

Humedad (%)	18.7
Almidón (%)	71.5
Proteínas (%)	9.01
Grasas (%)	4.78
Fibra (cruda, %)	2.66
Azúcares totales (%)	2.58
Cenizas (óxidos, %)	1.42
Carotenoides totales (mg/Kg)	30.0

2.2 Germinación.

Las semillas de la mayoría de las plantas presentan normalmente un período de latencia metabólica antes de desarrollarse en nuevas plantas. Durante este proceso, la semilla pierde agua, descendiendo el contenido de humedad de 80 o 90% hasta 10% .

La germinación es un conjunto de procesos mediante los cuales la semilla abandona su estado de latencia y adopta un metabolismo activo, permitiéndole llevar a cabo los eventos moleculares que conducirán a la formación de una nueva planta a partir de un embrión (Mayer, 1975).

El término de germinación es difícil de definir; es por ello que se han dado más de un tipo de definiciones, basadas en puntos de vista agronómicos, fisiológicos y bioquímicos.

Desde el punto de vista fisiológico, la germinación ha ocurrido una vez que una parte del embrión, normalmente la radícula, emerge a través de la cubierta de la semilla (Bewley y Black, 1978).

De acuerdo al trabajo en nuestro grupo de investigación, definimos la germinación desde el punto de vista bioquímico, como la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular, momento a partir del cual termina.

De cualquier forma, para que se presente la germinación, se requiere de ciertas condiciones favorables. Dichas condiciones pueden dividirse en externas o extrínsecas e internas o intrínsecas.

Las condiciones externas que favorecen el proceso de germinación son un adecuado suplemento de agua, la temperatura apropiada, una composición favorable de gases y, para algunas semillas la luz es un factor importante (Mayer, 1975).

Para que se inicie la germinación, el requisito más importante es la entrada de agua, la cual debe de ser en primera instancia muy rápida. Esto constituye el primer estadio de la germinación, denominado imbibición, la cual consiste de tres fases:

La fase I, que es independiente de la actividad metabólica de la semilla, es una fase de absorción de agua del medio por la cubierta más externa de la semilla, y se presenta como consecuencia de las fuerzas de hidratación de las paredes celulares de esta. La fase II es un período de entrada de agua más lento en el cual la semilla hidratándose presenta un metabolismo activo como preparación para los posteriores eventos de la germinación. La fase III es un período de entrada de agua que está asociado francamente con los eventos visibles de la germinación, y es en este momento cuando el metabolismo se incrementa notablemente (Bidwell, 1979; Bewley y Black, 1978).

Los factores internos, los cuales actúan no solamente a este nivel, sino a través de todo el desarrollo y crecimiento de una planta, están constituidos por los fitorreguladores u hormonas vegetales, moléculas reguladoras de las cuales se ha sugerido una función como promotores integrales del crecimiento.

2.3 Bioquímica de la germinación.

El inicio de la actividad metabólica está restringido principalmente por la entrada de agua. La entrada de agua a las células activa secuencialmente las funciones de los organelos y de las macromoléculas (mitocondrias, ribosomas, núcleos, membranas, enzimas, RNAs, DNA, etc.) (Ching, 1972)..

La germinación en embriones de una amplia variedad de semillas de gramíneas como trigo, centeno, cebada, maíz, etc., parece presentar una serie de eventos comunes. Estos eventos se clasifican en tempranos, que incluyen la hidratación, la producción de ATP, la iniciación de la síntesis de RNA total, la síntesis de proteínas y la reparación y síntesis de DNA; y los eventos tardíos, que incluyen la expansión celular, la replicación del DNA y la movilización de las reservas energéticas (Osborne, 1983).

La síntesis de proteínas está ausente en la semilla seca. En embriones de trigo y centeno se ha observado que la síntesis de proteínas comienza minutos después de iniciada la imbibición (Marcus, 1966; Sen y Osborne, 1975), cuando las células se hidratan para permitir la unión de los RNA mensajeros a los ribosomas. Este corto período de tiempo entre la entrada de agua y la síntesis de proteínas indicaría la presencia de la mayoría de los componentes bioquímicos y estructurales necesarios.

Los ribosomas obtenidos de embriones secos son incapaces de sintetizar proteínas, pero la actividad sintetizadora de estas preparaciones se presenta y aumenta rápidamente con la

imbibición (Marcus, 1966). Esto indica que en los embriones no se encuentran presentes los polisomas, lo que se confirma tras la observación de la disminución de los ribosomas libres con la eventual entrada de agua, y la consiguiente aparición de polisomas.

2.8 Fitorreguladores en la germinación.

La germinación de una semilla está relacionada con las condiciones óptimas en cuanto a su integridad metabólica y genética, y con las condiciones ambientales propicias para su desarrollo (Greulach y Edison, 1970).

La regulación del comportamiento metabólico de una planta está manejada durante su desarrollo a través de los fitorreguladores, los cuales modulan tanto el comportamiento celular como las interacciones entre los diferentes tipos de células presentes en el tejido de un organismo pluricelular. También modulan la respuesta a los estímulos provenientes del medio ambiente.

Los fitorreguladores son compuestos químicos producidos en muy pequeñas cantidades en una planta, ejerciendo un marcado efecto sobre el metabolismo aún en partes de la planta diferentes del sitio de producción, promoviendo respuestas bioquímicas, fisiológicas y también morfológicas (Moore, 1979).

El concepto de que la germinación es controlada por la interacción entre diversos fitorreguladores se basa en las respuestas de semillas a mezclas de sustancias aplicadas juntas o secuencialmente (Khan, 1967; Addicot, 1972). Por ejemplo, el efecto inhibitor de ABA puede ser evitado por la aplicación de citocininas pero no por GA. Pero GA puede revertir la dormancia impuesta por la cumarina (Berrie y col., 1968).

Hasta la fecha se han establecido 6 grupos básicos de fitorreguladores, de los cuales 5 se han estudiado más ampliamente: auxinas, giberelinas, el ácido abscísico, el etileno, y las citocininas (Moore, 1979).

AUXINAS. Entre los efectos más notables que se ha demostrado que promueve el ácido indolacético (AIA, la principal auxina) se encuentran la elongación y la expansión celular, por lo que se le atribuye un papel importante en el crecimiento de las plantas (Cohen, 1982). AIA produce sus efectos durante la germinación liberándose enzimáticamente de sus precursores para transportarse a la punta del coleóptilo de la semilla en crecimiento (Euwens, 1975).

GIBERELINAS. Lona (1956) y Khan y col. (1956) están entre los primeros que demostraron que el ácido giberélico (GA) estimula la germinación de *Lactuca scariola* y *Lactuca sativa* en la obscuridad. En estos casos GA sustituye a la luz promoviendo la germinación. Aunque el efecto de GA parece ser similar al de la luz (Evenari y col., 1958), GA es más efectivo que la luz

roja al revertir el efecto inhibitor en la germinación de Lechuga impuesto por altas temperaturas, llevando a la conclusión de que GA y la luz actúan parcialmente de la misma manera, pero que su modo de acción no es idéntico (Evenari y col, 1958; Ikuma y Thimann, 1973).

Algunos estudios muestran que durante las etapas tardías de la germinación (y aún post-germinativas, según nuestra definición), las giberelinas se sintetizan en el embrión y son transportadas a la capa de aleurona, donde estimulan la síntesis de enzimas específicas. La α -amilasa fué la enzima más estudiada y es sintetizada *de novo* en granos de cebada (Hill, 1977) y trigo (Bernal, 1984), a partir de RNA mensajero inducido por la influencia de GA.

Posteriormente, se han reportado evidencias que indican que las giberelinas son sintetizadas también en la aleurona en respuesta a otro factor químico originado en el embrión (Jacobsen y Chandler, 1987).

Se ha reportado un aumento en el nivel de giberelinas durante el rompimiento de la dormancia (Frankland y Wareing, 1966). Este incremento en el nivel de GA puede ser debido a la liberación de formas enlazadas, a su transporte desde una parte de la semilla hasta otra, o debida a síntesis, existiendo evidencias para cada uno de estos procesos (Lang, 1970; Jones y Stoddart, 1977).

ACIDO ABSICICO. La presencia del ácido abscísico (ABA) ha sido reportada en varias semillas y frutos (Addicott y Lyon, 1969; Milborrow, 1974).

El papel regulatorio que se ha atribuido a ABA es como inhibidor de la germinación y el crecimiento. Una estrecha correlación entre la concentración de ABA en el embrión y su capacidad para germinar se encontró en soya. Las semillas no germinan hasta los 21 días después de la antésis, y durante este tiempo el nivel de ABA decae considerablemente. También, cuando ABA es removido por lavados, ocurre la germinación (Quatrano, 1987). ABA induce la síntesis de proteína de reserva, mientras que inhibe la síntesis de carboxipeptidasa C, que es considerada como una "enzima específica" de la germinación (Dure, 1985).

Los efectos de ABA pueden explicarse considerándolo como un compuesto inductor de dormancia (Koorneef y col, 1984; Karssen, 1982; Karssen y col, 1983.), o puede actuar previniendo el crecimiento del embrión, como sucede en *Chenopodium album* (Karssen, 1988).

ABA es rápidamente metabolizado en los tejidos de la semilla y algunos de los productos de su metabolismo son activos biológicamente (Walton, 1981), aunque este aspecto de su acción reguladora no ha sido estudiado a fondo.

ETILENO. Existe poca evidencia sobre la influencia del etileno en el proceso de germinación (Lieberman, 1979). La germinación de algunas especies de semillas puede ser estimulada por adiciones externas de etileno (Ketring, 1977). Una evidencia

directa del requerimiento de etileno para la germinación de *Amaranthus* ha sido mencionada por Kepeczynski y Karssen (1985).

En otros sistemas, como los frutos o el tejido de almacenamiento, se ha demostrado que uno de los efectos del etileno son la activación génica y la formación de RNA mensajero específico, afectando de esta manera la maduración de los frutos. En adición, se han encontrado cambios en el nivel de enzimas hidrolíticas, auxinas endógenas y posiblemente en la formación de polirribosomas (Ketring, 1977).

CITOCININAS. Las citocininas son un grupo de fitorreguladores que en semillas y/o en cultivo de tejidos vegetales en presencia de auxinas, promueven la división celular (Miller y col, 1956; Skoog, 1965;). En tabaco, se ha demostrado que la división celular no se lleva a cabo en ausencia de citocininas (Nishinari y Syono, 1966; Skoog y col, 1967).

Hewett y Wareing (1963) sugieren la idea de que la acción reguladora es debida a más de una citocinina, al separar cinco citocininas a partir de callos de *Populus*, sin identificarlas.

El eje embrionario de garbanzo controla el metabolismo de las reservas energéticas almacenadas en los cotiledones a través de las citocininas (Muñoz y col, 1990).

En el sistema de cotiledones aislados de semillas de sandía, las citocininas pueden tomar el papel de la luz como inductoras de la transcripción del gene de la proteína LHCP

(Light Harvesting Chlorophyll a/b Protein) y la síntesis de esta (Longo y col, 1990).

Además de estos efectos, las citocininas afectan el desarrollo de una planta a diversos niveles, tanto fisiológicos como metabólicos. Dentro de los procesos fisiológicos pueden mencionarse los siguientes: Promueve la división y la diferenciación celular en cultivos de tejidos vegetales (Varnell y Vasil, 1978), y un retraso en la senescencia de la hojas (Tetley y Thimann, 1974).

En cuanto a sus efectos metabólicos, se ha encontrado que las citocininas incrementan el contenido total de proteínas (Tepfer y Fosket, 1978), particularmente la actividad específica de algunas enzimas, como endopeptidasas, pirofosfatasa, fosfoenol piruvato carboxilasa (Karavaiko y col, 1978), RNA polimerasa (Kulaeva, 1981) y DNA polimerasa (Vázquez Ramos y Reyes, 1990). Aumentan la tasa de biogénesis de cloroplastos y la síntesis de la ribulosa bifosfato carboxilasa (Harvey y col, 1974). Además, adelanta ciclos celulares y la síntesis replicativa del DNA durante la germinación (Reyes y col, 1991).

2.7. Efecto de las citocininas sobre la síntesis de RNA.

En casi todas las investigaciones se ha utilizado la citocinina Bencil Adenina (BA, N¹⁵ benzilaminopurina), que es un fitorregulador sintético. Estas investigaciones demuestran que el efecto producido por las citocininas sobre el metabolismo

celular se ve acompañado de un aumento en la síntesis de RNA total.

Al agregar BA a hojas de *Phaseolus vulgaris* se observa un aumento en la cantidad presente de RNA total (Fletcher, 1969; Jacoby y Dagan, 1970; Naito y col, 1978; Yokoyama y col, 1980), que es independiente de la edad del tejido y decrece cuando se elimina (Naito y col, 1978), aunque cuando esta adición se hace a hojas jóvenes, el incremento en el RNA total antecede al momento en que se presenta la división celular (Zwar, 1973; Naito y col, 1979; Yokoyama y col, 1981) y se incrementa el contenido de DNA y de proteínas (Yokoyama y col, 1981).

BA revierte los efectos inhibitorios del ABA sobre la síntesis de ácidos nucleicos (Khan, 1967; Sussex y col, 1975; Trewavas, 1970; Walton y col, 1970; Walbot y col, 1975). Parenjothy y Wareing (1971) muestran evidencias de que en la reversión de la senescencia, es más importante la síntesis de RNA mensajero y RNA soluble que la de RNA ribosomal; aunque se ha postulado que el incremento en la síntesis de RNA ribosomal de cloroplastos puede contribuir a este retraso de la senescencia (Dyer y Osborne, 1971).

2.8 Efecto de las citocininas sobre la síntesis de DNA.

Algunos ensayos realizados han demostrado un incremento en la cantidad de DNA cuando son adicionadas citocininas a tejido medular de *Nicotiana tabacum*, fenómeno previo (Das y col,

1965; Patau y col., 1957) o coincidente (Phillips y Torre, 1973; Sympson, 1977) con el momento en que ocurre la división celular. Resultados semejantes han sido reportados para tabaco (Zwar, 1973), frijol (Naito y col, 1978; Tsuji y col, 1979; Yokoyama y col, 1980,1981) y cotiledones de calabaza (Mikulovich y Kulaeva, 1977).

El estudio del efecto de BA sobre la síntesis de DNA durante la germinación de semillas de maíz indica un incremento en más del 50% en relación al control, con un pico de síntesis a las 6 horas de germinación; así como un incremento en la síntesis de tipo reparativa en ejes embrionarios γ -irradiados; en ejes embrionarios no irradiados cambia el tipo de síntesis, de un tipo indefinido a un tipo reparativo (Zarain y col, 1987; Reyes y Vázquez Ramos, 1988).

2.9 Mecanismo de acción de las citocininas.

Se han sugerido un número amplio de posibles mecanismos de acción de las citocininas. Debido a que se les ha encontrado en los t-RNA, cerca de la posición del anticodón, se ha sugerido que actúan sobre el metabolismo de proteínas a nivel de traducción (Thomas, 1977; Hill, 1977). Otros resultados sugieren un efecto en el AMPc o en la permeabilidad de la membrana (Thomas, 1977).

Realizando experimentos de inhibición, tanto de la transcripción como de la traducción en ejes embrionarios de maíz durante la germinación, se demuestra que se anula el efecto estimulador en cuanto a la síntesis de DNA, promovido por BA (Vázquez Ramos y Reyes, 1988). Por ello se piensa que un incremento en la síntesis de RNA (principalmente mensajero) y de proteínas pareciera ser la causa de la estimulación de la síntesis de DNA. Otro efecto promovido por BA que refuerza esta suposición, es el aumento en la actividad de la DNA polimerasa (Vázquez Ramos y Reyes, 1990).

Pero, las revisiones del modo de acción de las citocininas (Kende, 1971; Hall, 1973; Thomas, 1977; Van Staden y col., 1982) no arrojan evidencias decisivas. La observación de la falta de relación entre los efectos inducidos por las citocininas y su concentración interna pudiera ser explicada por la hipótesis de Trevas (1982), quien propone que no es el nivel de la concentración del fitorregulador lo que determina su actividad, sino la sensibilidad a este. Si la acción del fitorregulador es debida a un complejo hormona-receptor, entonces el número de receptores más que la concentración de fitorregulador determinaría la respuesta fisiológica. Hasta la fecha no se ha podido demostrar la existencia de tales receptores.

2.10 Antecedentes inmediatos.

Los estudios que se han hecho en nuestro laboratorio para determinar los efectos que ejercen las citocininas en la germinación del maíz, revelan que BA incrementa la síntesis de DNA durante las primeras 12 horas de la germinación con un pico a las 6 horas (Vázquez Ramos y Reyes, 1990). También se ha demostrado que BA incrementa la síntesis reparativa de DNA en ejes embrionarios γ -irradiados durante las primeras horas de la germinación, y en ejes no irradiados cambia el patrón de síntesis de un tipo indefinido a una síntesis reparativa (Zaraín y col, 1988, Reyes y Vázquez Ramos, 1988). Se ha demostrado que BA incrementa la actividad de la DNA polimerasa (Vázquez Ramos y Reyes, 1990), la síntesis replicativa del DNA, y adelanta ciclos celulares durante la germinación (Reyes y col., 1991).

Hasta la fecha no se conoce el mecanismo por el cual BA promueve estos efectos. La inhibición de la transcripción y la traducción en ejes embrionarios de maíz durante la germinación, eliminó el efecto estimulador de BA sobre la síntesis de DNA, lo que sugirió que la estimulación de dicha síntesis de DNA sería promovida por un aumento en la síntesis de RNA (principalmente mensajero) y de proteínas totales.

Con los antecedentes anteriores, el presente trabajo se enfocó a la investigación del efecto de BA sobre la población de RNA mensajeros de maíz presentes en este proceso.

3. HIPOTESIS.

Se propone como hipótesis de trabajo, que la Benciladenina provocará modificaciones en la población de los RNA mensajeros presentes durante la germinación de ejes embrionarios de maíz; si esto es así, se podrá detectar mediante la traducción *in vitro* de tales RNA mensajeros seguida de un análisis por electroforesis y autorradiografía de los patrones proteicos obtenidos.

4. OBJETIVOS.

4.1 GENERAL. Utilizar las técnicas abajo mencionadas para analizar el efecto de BA sobre la población de RNA mensajeros de maíz durante la germinación.

4.2 PARTICULARES. Establecer las metodologías para:

- a) La extracción de RNA total de ejes embrionarios de maíz,
- b) la separación del RNA mensajero (poliadenilado),
- c) la traducción de este RNA mensajero en un sistema de traducción libre de células y
- d) el análisis de los productos proteicos con incorporación de marca radiactiva, por medio de:
 - i. el material TCA insoluble y
 - ii. electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y posterior fluorografía.

5. MATERIALES

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

5.1.1 Para este estudio se utilizaron semillas de maíz, *Zea mays* linneus var. chalqueño obtenidas de un proveedor del valle de Chalco, Edo. de México. El tejido que se utilizó es el eje embrionario, el cual se disectó manualmente y se almacenó a -4°C en desecador hasta obtener la cantidad suficiente para cada experimento. Para cada uno de los tiempos se utilizó 1.0 g de ejes, deshechando los que fueron dañados por la navaja.

5.1.2 Equipo de síntesis in vitro de proteínas :

(Equipo comercial de New England Nuclear, Du Pont)

Lisado de reticulocitos de conejo.

RNA poli-[A^3] control (RNA poli-[A^3] total de células HeLa infectadas por Adenovirus).

Cocktail de traducción :

Espermidina

Fosfato de Creatina

Ditiotreitol

Trifosfato de guanosina

Todo lo anterior en solución amortiguadora de HEPES

(Acido N-2-HidroxiEtilPiperazin, N-2-Etano sulfónico)

Metionina, L-[^{35}S]

Acetato de Potasio 1.0 M

Acetato de Magnesio 50 mM

5.2. MATERIAL QUIMICO.

(Todo el material de vidrio que se utilizó para almacenar los reactivos y las soluciones amortiguadoras fué de color ámbar. Este material y el de porcelana fué tratado con H_2SO_4 concentrado, enjuagado con H_2O desionizada estéril y esterilizado en autoclave antes de ser utilizado).

-Reactivos, soluciones amortiguadoras y equipo-

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico

Bencil Adenina

Acido tricloroacético

Etanol

Acetona

Metanol

Acido Acético

Citrato de Sodio

Cloranfenicol

Proteinasa K

Acetato de Sodio

Hipoclorito de sodio

5.2.1 Soluciones para la extracción de RNA total.

5.2.1.1 Solución amortiguadora de Imbibición :

Tris-HCl (Hidroximetilaminometano base, ajustando el pH con HCl, Sigma Chemical Co.)	pH 7.6	50 mM
Cloruro de Potasio (KCl)		50 mM
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)		10 mM
Sacarosa		2 %
Cloranfenicol (Sigma Chemical Co.)		10 µg/ml

5.2.1.2 Solución de Bencil adenina 10⁻⁸ M :

Para preparar 10 ml de esta solución, se disuelven 2.2 mg del polvo en 800 µl de HCl 0.1 N y se agita suavemente. Se añaden 4 ml de H₂O destilada estéril y 600 µl de Tris-Cl 1 M. En este punto debe controlarse bien el pH ya que la BA precipita a un pH > 6. Finalmente se afora a 10 ml con agua estéril. (El pH para conservar mejor la solución es entre 3 y 4).

5.2.1.3 Solución amortiguadora de imbibición con BA :

La solución de BA 10⁻⁸ M se diluye hasta la concentración requerida de 10⁻⁴ M con la solución amortiguadora de imbibición.

5.2.1.4 Solución amortiguadora de Extracción :

Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB, Sigma)		2 %
Tris-HCl (Sigma Chemical, Co.)	pH 8.0	100 mM
Acido Etilendiaminotetraacético (EDTA)		20 mM
Cloruro de Sodio (NaCl)		1.4 M

5.2.1.5 Solución amortiguadora de precipitación :

CTAB (Sigma)	1 %
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM
β -Mercaptoetanol	1 %

5.2.1.6 Solución de CTAB al 10 % :

CTAB	10 %
NaCl	700 mM

5.2.1.7 Solución de Cloruro de Cesio 1 M :

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	50 mM
Cloruro de Cesio (CsCl)	1.0 M

5.2.1.8 Solución de Cloruro de Cesio 5.7 M :

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	50 mM
CsCl	5.7 M

5.2.1.9 SEVAG (Cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1)

5.2.1.10 Solución amortiguadora para homogeneizar :

NaCl	1.3×10^{-2} M
EDTA pH 7.5	5.0×10^{-2} M
Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	0.5 M

5.2.2. Soluciones para eliminar carbohidratos:

Etanol		70 %
Acetato de sodio	pH 8.0	100 mM

5.2.3 Soluciones para la separación de RNA
poli-[A] en columna de oligo[dT]-celulosa.

5.2.3.1 Resina de oligo-[dT]celulosa (Sigma Cem. Co.)

5.2.3.1 Solución Amortiguadora de Carga :

Tris-HCl	pH 7.6	20 mM
LiCl		0.5 M
EDTA		1 mM
Lauril Sarcosinato de sodio (SLS, Sigma)		1 %

5.2.3.2 Solución de lavado :

HzO destilada estéril		
NaOH		100 mM
EDTA		5 mM

5.2.3.3 Solución amortiguadora de carga con LiCl 0.1 M :

Tris-HCl	pH 7.6	20 mM
LiCl		0.1 M
EDTA		1 mM
Dodecil sulfato de litio (LDS)		0.1 %

5.2.3.4 Solución amortiguadora de elución :

Tris-HCl pH 7.5	20 mM
EDTA	1 mM
LDS	0.05 %

5.2.3.5 Acetato de Sodio pH 5.2

3 M

5.2.3.6 Etanol

70 %

5.2.3.7 Líquido de centelleo:

2,2'-p-fenilbis (5-fenoxazol) (POPOP, Merck)	0.1 g
2,5-difenoxazol (PPO, Merck)	5.0 g
Tolueno	1.0 L

5.2.4 Soluciones requeridas para geles de acrilamida.

5.2.4.1 Solución amortiguadora para el gel separador :

Tris-HCl pH 8.8	0.75 M
Dodecil Sulfato de Sodio (SDS; Merck)	2 %

5.2.4.2 Solución amortiguadora para el gel concentrador :

Tris-HCl pH 8.8	0.25 M
SDS	2 %

5.2.4.3 Solución amortiguadora para los electrodos :

Tris-HCl pH 8.3	25 mM
L-glicina	0.19 M
SDS	2 %

5.2.4.4 Solución amortiguadora para la muestra :

Tris-HCl pH 6.8	50 mM
EDTA	20 mM
SDS	1 %
Glicerol	10 %
β -mercaptoetanol	1 %
Azul de bromofenol	0.01 %

5.2.4.5 Solución para tefir el gel :

Azul de Coomassie	0.2 %
Metanol	50 %
Acido acético	7 %

5.2.4.6 Solución desteñidora :

Metanol	10 %
Acido acético	7 %

5.2.4.7 Solución stock de acrilamida 30 % :

Acrilamida (Merck)	30.0 g
Bis-acrilamida	0.8 g
H ₂ O destilada	completar hasta 100 mL

5.2.5 Soluciones requeridas para Fluorografía.

5.2.5.1 Solucion requerida para el primer y segundo lavado :

DimetilSulfóxido concentrado (DMSO, J.T. Baker)

5.2.5.2 Solución para el tercer lavado :

2,5-difeniloxazol (PPO, Merck)	27.5 g
DMSO concentrado (J.T. Baker)	100 mL

5.2.5.3 H₂O desionizada.

5.2.6 OTROS MATERIALES.

5.2.6.1 Nitrógeno líquido

5.2.6.2 Tubos FEP (Etilén propileno fluorinado, Nalgene Brand Products)

5.2.6.4 Película para autorradiografía Cronex 4 X (DU PONT)

5.2.5.5 Pantalla amplificadora QUANTA III-T (DU PONT)

5.2.5.6 Solución reveladora (revelador GBX, KODAK)

5.2.5.7 Solución fijadora (fijador GBX, KODAK)

6. METODOS

Todo el material de vidrio que se utilizó para almacenar los reactivos y las soluciones amortiguadoras fué de color ámbar. Este material y el de porcelana fué tratado con H_2SO_4 concentrado, enjuagado con H_2O destilada estéril, y esterilizado en autoclave antes de ser utilizado.

Las soluciones amortiguadoras que contienen SDS fueron esterilizadas en autoclave ántes de adicionárselo. La solución stock de SDS fué calentada por 1 hora a 85°C y después de esto agragada a la respectiva solución amortiguadora estéril hasta su concentración requerida.

La solución amortiguadora de imbibición fué esterilizada en autoclave sin el cloranfenicol, el cual se filtró a través de una membrana en un equipo millipore para filtración al vacío y se agregó al final.

La solución de Bencil adenina fué esterilizada también por filtración a través de filtros millipore.

6.1 Obtención de los ejes embrionarios de maíz.

La obtención de los ejes embrionarios se hizo como se indica en MATERIALES, 5.1.

6.2 Imbibición de los ejes embrionarios de maíz.

Para todos los tiempos de incubación, 1.0 g de ejes embrionarios se lavaron por 30 segundos en una solución de hipoclorito de sodio 0.1 %. Trabajando en condiciones de esterilidad, utilizando un mechero Fisher, se lavaron tres veces con H₂O destilada estéril y se pusieron entre dos discos de papel filtro Whatman (#1 o #2) dentro de una caja Petri estéril.

Se humedecieron los filtros con 5 ml de la solución amortiguadora de imbibición (en los tratamientos control), ó 5 ml de la solución amortiguadora con BA (en los tratamientos con BA), después de lo cual las cajas Petri se colocaron en una estufa con regulación de temperatura a 25 °C por 3, 6, 9 y 15 horas.

Al finalizar los respectivos tiempos de incubación, se procedió de inmediato a extraer los ácidos nucleicos.

6.3 Metodología para la extracción del RNA total.

El método que se utilizó (Taylor & Powell, 1982) se basa en la extracción de los ácidos nucleicos con un detergente catiónico, el CTAB, y una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico, tras una ruptura celular rápida con nitrógeno líquido.

Trabajando en las mismas condiciones de esterilidad, 1.0 g de ejes embrionarios embebidos en solución amortiguadora de imbibición con ó sin BA (según el tratamiento), se colocaron en un mortero estéril sobre hielo y se maceraron hasta polvo fino con la cantidad necesaria de nitrógeno líquido, transfiriéndose el polvo inmediatamente a un tubo FEP (Nalgene) que se encontraba también en hielo.

Se agregaron 12 ml/g de ejes, de solución amortiguadora de extracción 2X hirviente y β -mercaptoetanol hasta 2 %, mezclando suave y perfectamente por rotación del tubo, transfiriéndose a un baño de agua a 55°C por un lapso de 2 a 2 1/2 horas con agitación manual por rotación cada 15 minutos

Al finalizar este período, se agregó un volumen de SEVAG, agitando por 15 minutos muy suavemente y destapando el tubo para permitir el escape de gas, hasta tener bien mezcladas las fases.

Se centrifugó a 13 000 X g por 10 minutos a 4°C en un rotor JS-13 (Beckman) en una centrifuga J2-21 (Beckman), transfiriendo la fase acuosa a otro tubo FEP, teniendo cuidado de no llevar nada de la interfase (restos vegetales). Se agregó 1/10 de volumen de CTAB al 10 % y se repitió la extracción con SEVAG.

La última fase acuosa se pasó a otro tubo FEP y se agregó un volumen de solución amortiguadora de precipitación. La disminución en la concentración de las sales debió de causar la precipitación de los ácidos nucleicos, pero fué necesario agregar H₂O destilada estéril gota a gota, agitando suavemente hasta que

no se diera la redisolución de los ácidos nucleicos y se dejó precipitando toda la noche a -4°C .

Se centrifugó a $1\ 500\ \text{X}\ \text{g}$ en la centrifuga J2-21 con el rotor JS-13. Se retiró el sobrenadante por decantación.

La pastilla se seco al vacío en un desecador por 10 minutos, se resuspendió en 1.7 ml de la solución de CsCl 1M, la cual se estratificó sobre un colchón de 0.5 ml de la solución de CsCl 5.7 M en el tubo de una centrifuga TL-100 (los tubos tienen una capacidad de 2.5 ml) y se centrifugó a $120\ 000\ \text{X}\ \text{g}$ durante 14:30 horas a 20°C .

El RNA formó una pastilla en el fondo del tubo y el DNA quedó en la interfase. Retirando con mucho cuidado el sobrenadante y descartando el DNA, se resuspendió la pastilla de RNA en 1 ml de una solución amortiguadora que contiene Tris 10 mM, EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol al 1%, esto se transfirió a un tubo Eppendorf estéril nuevo.

El RNA se precipitó agregando NaAcO 3 M hasta concentración final de 0.3 M y 2.2 ml de etanol al 70% frío, guardando a -70°C por 30 minutos, centrifugando en microfuga por 5 minutos, y almacenando finalmente a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para resuspender, primero se centrifugó por 5-10 minutos en la microfuga, antes de disolver en H₂O destilada estéril.

6.4. Preparación de la resina de oligo[DT]-celulosa.

Se equilibraron 300 mg de la resina en 1 ml de la solución amortiguadora de carga. Se preparó una columna (Dispocolumn, previamente esterilizada) de 1 ml y se lavó con 3 volúmenes de columna de cada uno de los siguientes reactivos:

- i. H₂O estéril
- ii. NaOH 0.1 M y EDTA 5 mM
- iii. H₂O estéril

Se checó que el pH del efluente fuera menor de 8.0 .

6.5. Separación del RNA poli-(A⁺).

La columna ya preparada como se indicó en 6.4, se lavó con 5 volúmenes de la solución amortiguadora de carga con LiCl 0.5 M.

El RNA total se centrifugó por 5 minutos en la microfuga y la pastilla se secó al vacío por 10 minutos en un desecador (se hizo lo mismo para cada tiempo de los dos tratamientos), después de lo cual se resuspendió en el volumen necesario de H₂O destilada estéril, se calentó a 65°C por 5 minutos, se le agregó un volumen igual de la solución amortiguadora de carga, permitiendo que alcanzara la temperatura ambiente para aplicar a la columna.

El eluyente se colectó y se calentó nuevamente a 65 °C, reaplicándolo a la columna, después de que alcanzó la temperatura ambiente y se lavó esta con 8 volúmenes de columna de la solución amortiguadora de carga.

El RNA poli-(A⁺) se eluyó de la columna con 4-5 volúmenes de columna de amortiguador de elución en fracciones de 1/3 del volumen de columna. Para la cuantificación del RNA eluido en cada fracción, se leyó la absorbencia a 260 y a 280 nm en un espectrofotómetro ULTROSPEC II (LKB, BIOCHROM), previa identificación de las fracciones que contenían el RNA poli-(A⁺) por medio de una tinción preliminar con bromuro de etidio. La absorbencia a 260 nm es un índice de la concentración del RNA, ya que una unidad de absorbencia de una solución de RNA contenida en una celda de 1 cm de paso de luz, corresponde a 40 µg de RNA/ml. El cociente de absorbencias 260/280 nm indica la pureza del RNA; un valor entre 1.8 y 2.0 corresponde a una solución con una buena pureza, mientras que valores por debajo de 1.7 indican la presencia de contaminantes.

Una vez que se identificaron y se cuantificaron las fracciones correspondientes al RNA poli-(A⁺), se agregó a cada una de ellas acetato de sodio 3 M hasta una concentración final de 0.3 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío (el etanol absoluto y el etanol al 70% están almacenados en condiciones asépticas a -20 °C).

Al terminar de usar la columna, se lavó con la solución de lavado (ver "preparación de la resina de oligo-(dT)celulosa en 6.4).

6.6 Traducción in vitro del RNA poli-(A⁺).

Todo el material que se utilizó en estos ensayos, puntas de pipeta automática y tubos Eppendorf sobre todo, fueron nuevos y se deshecharon o se lavaron, designándolos para otros ensayos.

Los ensayos de traducción in vitro se llevaron a cabo en una campana de extracción mantenida como área de esterilidad con la ayuda de un mechero Fisher.

La traducción in vitro del RNA poli-(A⁺) obtenido mediante la cromatografía de afinidad en la resina de oligodT1-celulosa, se realizó con un equipo comercial de síntesis in vitro de proteínas, que consiste en un sistema libre de células (lisado de reticulocitos de conejo) con metionina, L-[³⁵S] como aminoácido marcado radioactivamente (DU PONT, NEN Research Products, Biotechnology Systems).

Este equipo contiene todos los factores protéicos y cofactores necesarios para la traducción de una amplia variedad de RNA's eucarióticos. El investigador tiene que aportar únicamente el RNA que se desea traducir. Inclusive está incluido un RNA mensajero como control de la traducción, obtenido de células HeLa infectadas por adenovirus.

El ensayo de traducción *in vitro* se realizó utilizando una pipeta automática electrónica EDP 2 (Rainin instrument Co. Inc.), puntas desechables estériles, Heat Block (VWR Scientific), y tubos Eppendorf desechables estériles mantenidos en una cuba de hielo (esto con el fin de detener la posible degradación de los factores de traducción, y el comienzo prematuro de la síntesis de proteínas ántes de que fueran agregados los componentes en todos los tubos), de la siguiente manera:

Los tubos Eppendorf se numeraron progresivamente (ver tabla 7.6 en RESULTADOS).

Se pipetearon hasta el fondo de cada tubo las cantidades indicadas del RNA mensajero correspondiente.

Se pipeteó hasta el fondo de cada tubo la cantidad apropiada de H₂O grado "traducción".

Se pipetearon hasta el fondo de cada tubo 13 μ l de la mezcla de traducción.

Se pipetearon hasta el fondo de cada tubo 10 μ l del lisado de reticulocitos de conejo.

Se retiraron los tubos de la cuba de hielo, se agitaron en vórtex (para una perfecta mezcla de todos los componentes), y se les dió un pulso en una microfuga (pequeñas gotas pueden quedar adheridas a las paredes de los tubos y nunca entrar en reacción).

Los tubos fueron incubados por 60 minutos a 37 °C en el Heat Block.

6.7 Análisis de la incorporación de metionina, L-(³⁵S) en proteína, por medio del material insoluble en TCA.

Se depositó una alícuota (como primer intento se depositó el total del volumen) de la mezcla de reacción en cuadros de papel Whatman 3 mm de microfibra de vidrio de 2.4 cm por lado, humedecidos en TCA al 10%. Los discos se colocaron en un equipo millipore de filtración al vacío, y se lavaron secuencialmente con 500 ml de TCA 10%, H₂O destilada, etanol al 70% y acetona, se secaron en un horno a 60 °C por 20 minutos, se colocaron en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se contaron en el contador de centelleo (MINAXIβ, TRI-CARB) por 3 minutos.

El análisis del material insoluble en TCA no es una prueba fiel para investigar la incorporación de marca radiactiva, pero es un control que nos indica un valor aproximado de esta incorporación en proteína sintetizada de novo.

El proveedor reporta que las concentraciones de los iones necesarios para la traducción, como son Mg⁺⁺ y K⁺ (suministrados como acetatos), son óptimas para la traducción del RNA mensajero control. Pero tuvieron que realizarse experimentos para conocer la concentración óptima de estos iones para lograr una buena traducción del RNA mensajero obtenido de los ejes embrionarios de maíz.

Para ello, primeramente se realizó un ensayo manteniendo los componentes en la misma concentración recomendada por el fabricante, haciendo variar únicamente la cantidad adicionada de

RNA poli-[A^{*}], con el fin de encontrar aquella concentración del RNA mensajero que diera una buena incorporación de marca en proteína sintetizada *de novo*. Hecho lo anterior debió procederse a hacer variar la concentración de acetato de magnesio, manteniendo constante la concentración de acetato de potasio. Encontrando la concentración óptima de acetato de magnesio, se le debió de mantener constante haciendo variar después la concentración de acetato de potasio.

Como se indica en RESULTADOS, el ensayo de traducción con las concentraciones de iones recomendadas por el fabricante, dió una magnífica incorporación de marca aún con la concentración más baja del RNA mensajero que se adicionó, por lo que se consideró que las concentraciones utilizadas de estos iones fueron buenas para nuestros propósitos.

Para esta titulación de RNA poli-[A^{*}], se utilizó el RNA mensajero extraído de ejes embrionarios embebidos por 6 horas en ausencia de BA (tratamiento control). Una vez que se establecieron las condiciones para lograr una buena traducción que se detectó por una buena incorporación de metionina, L-[³⁵S] en proteína sintetizada *de novo*, se procedió a realizar el ensayo de traducción de todos los tiempos de los dos tratamientos. Para el montaje de esta metodología, ver RESULTADOS.

Tras observar semicuantitativamente la tendencia de incorporación de metionina, L-[³⁵S] en función del tiempo de incubación de los ejes embrionarios y de la solución amortiguadora de imbibición que se utilizó para el tratamiento control y el tratamiento con BA, se procedió a correr la electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

8.8. Electroforésis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

8.8.1. Preparación de los geles de poliacrilamida.

Gel separador.

Para preparar el gel separador, se mezclaron 0.9 ml de la solución stock de poliacrilamida, 15 ml de la solución amortiguadora stock de Tris-SDS, pH 8.8, y se aforó a 30 ml con H₂O destilada. La solución se desgasificó al vacío por un lapso de unos 20 minutos (el aire es un inhibidor de la polimerización). Antes de vaciar dentro de las placas de vidrio se adicionaron los catalizadores, 7.5 μ l de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletiléndiamina, BIO-RAD) y 0.75 ml de persulfato de amonio en solución (BIO-RAD). Se cubrió la superficie con una película de agua para cubrir el gel del aire y se esperó un lapso de 45 minutos para lograr una completa polimerización. Transcurrido este tiempo se decantó para eliminar el agua y se secó con sanitas toda el agua remanente.

Gel apilador.

El gel apilador se preparó de manera análoga al gel separador, pero en este caso se mezclaron 1 ml de la solución stock de poliacrilamida, 5 ml de la solución amortiguadora stock de Tris-SDS, pH 8.8, aforando a 10 ml con H₂O destilada.

Después de desgasificar se adicionaron los catalizadores, 5 μ l de TEMED y 0.5 ml de persulfato de amonio, y se vertió sobre el gel separador que ya estaba polimerizado entre las placas de vidrio, sobre las cuales ya se había colocado el peine indicado según el número de pozos deseado. Igualmente se cubrió con una película de agua que se retiró al final de los 45 minutos de polimerización.

Las alícuotas de 20 μ l de la mezcla de traducción se disolvieron en 40 μ l de la solución amortiguadora de la muestra (ver MATERIALES) y se calentaron a 80 °C por 2 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se aplicaron a su correspondiente pozo en el gel apilador.

La electroforesis fue corrida en sistema de amortiguadores discontinuos (modificación del método de Laemmli, 1970) en un aparato de electroforesis vertical (LKB-Produkter AB), conteniendo un gel apilador o concentrador y un gel separador. El período de corrida fue de 18 horas a 80 mV con corriente constante.

6.8.2. Tañido de los geles.

Este paso no es estrictamente necesario, pero se llevó a cabo para comparar cualitativamente las bandas reveladas por tinción de Coomassie con las bandas reveladas por

autorradiografía, y para establecer el Rf de los marcadores de peso molecular, ya que no se tuvieron los elementos necesarios para su identificación por autorradiografía.

Los geles se retiraron de las placas de vidrio y se sumergieron por 10-15 minutos en la solución para teñir el gel. Después de esto se enjuagaron y se sumergieron en la solución desteñidora por el tiempo necesario.

6.8.3. Tratamiento de fluorografía.

Los geles desteñidos fueron enjuagados con H₂O destilada y secados lo más posible.

Se sumergieron por 30 minutos en una solución de DMSO concentrado. Después de esto, se retiraron y el líquido se guardó como "Solución de primer lavado".

A continuación se sumergieron los geles en solución nueva de DMSO por otros 30 minutos, retirándose al final y guardando el líquido como "Solución de segundo lavado".

Los geles se sumergieron en una solución de PPO al 25% en DMSO, por un lapso de 3 horas, guardando también esta solución para tratamientos de fluorografía posteriores.

El último paso consistió en sumergir los geles en H₂O destilada por un tiempo de 2-3 horas o aún mayor. Un hecho que indicó si el tratamiento fué aplicado correctamente, es que al

momento de entrar los geles en contacto con el H₂O se pusieron de un color blanquecino lechoso, perdiendo su transparencia.

6.8.4. Secado de los geles.

Los geles se retiraron del H₂O y se enjuagaron, ya que la solución de DMSO que permaneció en el gel, precipita al contacto con el H₂O.

Para secar los geles, se colocaron entre dos cuadros de papel celofán dulce, de un área mayor al área de los geles, retirando todo el aire que quedó atrapado. Para mayor facilidad, la colocación de los geles entre los cuadros de celofán se realizó bajo el agua, con lo que se eliminó la formación de burbujas de aire.

Los geles cubiertos con celofán se colocaron en un marco de acrílico y se dejó que se secaran al aire, lo que se consiguió alrededor de 30 horas después.

6.8.5. Revelado por autorradiografía de las bandas con marca radiactiva.

Cuando los geles estuvieron perfectamente secos, se colocaron contra una película negativa para autorradiografía (CRONEX SAFETY 4X, DU PONT) dentro de una pantalla amplificadora

(QUANTA III-T KC, DU PONT), y se dejaron por el tiempo necesario en un ultracongelador a -70°C . Este tiempo dependió de la cantidad de radiactividad medida en cuentas por minuto presente en los geles, pero varió entre 1 y 3 días.

Transcurrido el tiempo de impresión, laborando en cuarto oscuro, se revelaron las placas.

Para ello, se agitaron sumergidas en solución reveladora (revelador GBX, KODAK) por 5 minutos, se enjuagaron con agua del grifo, y se agitaron sumergidas en solución fijadora (fijador GBX, KODAK), se enjuagaron nuevamente con agua del grifo y se colgaron para escurrimiento y secado.

7. RESULTADOS.

7.1 EXTRACCION DEL RNA TOTAL.

La determinación de las condiciones óptimas de extracción se llevó a cabo trabajando con ejes embrionarios de maíz embebidos en soluciones amortiguadoras de imbibición con y sin BA respectivamente, por un lapso de 8 horas.

Se realizaron algunas modificaciones al protocolo original, pero en general se mantuvieron sin cambio la preparación de reactivos y soluciones amortiguadoras, así como también los pasos de congelación y macerado de los ejes.

Algunos problemas que se presentaron son los siguientes:

En cuanto a la incubación del polvo del macerado de ejes a 55°C en amortiguador de extracción, se observó la formación de

agregados o acúmulos en el seno del líquido, lo que desde luego impediría la acción de la solución amortiguadora de extracción sobre el polvo en toda la superficie de contacto. Por esta razón, se dejó por un tiempo de 2 horas en lugar de retirarlo cuando se alcanzará la temperatura de 50 °C como estaba indicado. Al agitar por rotación y suavemente con la mano cada 15 minutos se logró evitar la formación de esos agregados, asegurando de esa manera el contacto de la solución amortiguadora en toda la superficie del polvo.

Por otro lado, en el momento de adicionar la solución amortiguadora de precipitación, sí se observó un enturbiamiento del líquido pero nunca una precipitación completa del RNA total. El factor precipitante de esta solución es la reducción en la concentración de NaCl a la mitad del valor original, por lo tanto se procedió a diluir la solución "in situ" adicionando H₂O desionizada estéril gota a gota para reducir aún más la concentración de NaCl. Con lo anterior se logró precipitar completamente el RNA total, lo cual se comprobó al agitar el tubo y no observar resuspensión del RNA precipitado, pero para una mejor precipitación se le dejó por toda la noche en reposo a -4°C.

Los resultados de las extracciones de RNA total a partir de 2.0 g de ejes embrionarios embebidos por 6 horas en presencia de BA, y de 1.0 g de ejes embrionarios embebidos el mismo tiempo, pero en ausencia de BA se muestran en la tabla 7.1 :

EXTRACCION DE RNA TOTAL DE MAIZ A LAS 6 HORAS DE IMBIBICION

tiempo	tratamiento	absorbencia (dil. 1:100)		cociente 260/280nm	µg de RNA por ml
		260 nm	280 nm		
6 horas	B. A.	0.52	0.276	1.88	2080
6 horas	control	0.278	0.145	1.917	1112

Tabla 7.1 Ejes embrionarios de maiz embebidos por 6 horas en ausencia (control, 1.0 g) y presencia de BenzilAdenina 10^{-4} M (BA, 2.0 g). Posteriormente se hizo la extracción del RNA como se indicó anteriormente y la cuantificación se hizo espectrofotométricamente a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{gRNA}/\text{ml}$.

Los resultados obtenidos son de 2080 μg de RNA total/ml cuando se obtuvieron a partir de 2.0 g de ejes embrionarios, y de 1112 μg de RNA total/ml cuando se obtuvieron a partir de 1.0 g de ejes embrionarios, mostrando que hay una proporcionalidad directa entre la cantidad de RNA total extraído y la cantidad en gramos de ejes que se emplean.

Al analizar la pureza de estas preparaciones por medio del factor de absorbencias, se vió que ambas son aceptables, la primera con un factor de 1.88 y la segunda de 1.917. Con estos resultados se consideró tener ya las condiciones óptimas y la habilidad para lograr una buena extracción de RNA total a partir de 1.0 g de ejes embrionarios de maíz, por lo que se procedió a trabajar con los tiempos problemas de imbibición, es decir 3, 6, 9 y 15 horas. En la tabla 7.2 se muestran los resultados obtenidos.

No fué sorpresa el hecho de no encontrar diferencias marcadas en cuanto a las cantidades relativas de RNA total extraído de ejes embrionarios de maíz embebidos por diferentes períodos de tiempo en presencia de BA en relación con su control. Más bien, las diferencias que se dieron se atribuyeron al manejo manual y a la efectividad con que se extrajeron las muestras de RNA total.

EXTRACCION DE RNA TOTAL DE MAIZ A LAS 3, 6, 9 Y 15 HORAS DE
IMBIBICION

tiempo	tratamiento	absorbencia (dil. 1:100)		cociente 260/280nm	µg de RNA por ml
		260 nm	280 nm		
3 horas	control	0.737	0.382	1.93	2948
3 horas	B. A.	0.460	0.256	1.88	1920
6 horas	control	0.531	0.263	2.02	2124
6 horas	B. A.	0.610	0.309	1.97	2440
9 horas	control	0.418	0.204	2.05	1672
9 horas	B. A.	0.473	0.244	1.94	1892
15 horas	control	0.451	0.216	2.09	1804
15 horas	B. A.	0.511	0.281	1.82	2044

Tabla 7.2 1.0 g de ejes embrionarios de maíz fueron embebidos por 3, 6, 9, y 15 horas en ausencia (control) y presencia de Benciladenina (BA), respectivamente. La determinación se hizo espectrofotométricamente a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a 40 µgRNA/ml.

Estas preparaciones de RNA total se utilizaron subsecuentemente para separar el RNA poli-(A⁺) y traducir este por medio del sistema de reticulocitos de conejo (ver resultados respectivos).

Observando la tabla 7.2, los valores de los factores 260/280nm nos dicen que el RNA total de estas preparaciones tienen una pureza bastante aceptable; sin embargo, mediante estos factores no es posible evaluar el estado de integridad del RNA. Para conocer este estado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de estas preparaciones. Entonces se observaron las zonas de corrimiento correspondiente a las poblaciones de RNA ribosomales 28S y 18S cuando el gel se tñó con bromuro de etidio y se colocó en un transiluminador de U.V. (resultados no mostrados).

La electroforesis en gel de agarosa debió de correrse con las muestras de RNA mensajero, pero la cantidad obtenida de estos es tan poca (aproximadamente el 1% del RNA total con el método empleado) que no alcanzaría para la electroforesis y los ensayos de traducción. Entonces se aceptaron como válidos para el RNA mensajero, los resultados obtenidos con el RNA total.

Todas las muestras de RNA total que se extrajeron en este paso fueron posteriormente lavadas varias veces con etanol al 70% y acetato de sodio 3M (pH 5.2, hasta 0.3 M para reducir la cantidad de carbohidratos contaminantes, y se resuspendieron en la cantidad necesaria de H₂O desionizada estéril para su posterior paso por la columna de oligo-(dT)celulosa.

7.2 SEPARACION DEL RNA MENSAJERO.

Las condiciones ambientales durante estos ensayos fueron similares a las empleadas durante la extracción en cuanto a la asepsia y el material y soluciones amortiguadoras empleadas fueron igualmente esterilizadas.

Para la separación del RNA mensajero a partir del RNA total, se utilizó primero el RNA total extraído de ejes embrionarios de maíz embebidos por 6 horas en las soluciones amortiguadoras de imbibición con y sin BA. Esto con el fin de adquirir la habilidad necesaria para lograr un mejor manejo y aprovechamiento de las muestras que se obtendrían después, y con las que se analizaría el efecto de BA sobre la población de RNA mensajeros presentes durante la germinación del maíz.

Durante el corrimiento de la primera cromatografía en columna de oligo-[dT]celulosa, se tuvieron problemas por la precipitación del SDS presente en las soluciones amortiguadoras, cuando se encuentra a bajas temperaturas, ya que por una parte la columna se almacenó a -4°C , y por otra, los tubos Eppendorf donde se colectaron las fracciones de elución debieron forzosamente permanecer en hielo, y esto provocó nuevamente la precipitación del SDS, por lo que tuvieron que calentarse con el calor de la mano para poder verterse en las celdas y leerse en el espectrofotómetro.

Se presentan en la tabla 7.3 los resultados obtenidos en esta primera cromatografía en columna de oligo-[dT]celulosa:

S
E
P
A
R
A
C
I
O
N

D
E

R
N
A

M
E
N
S
A
J
E
R
O

D
E

M
A
I
Z

Número de fracción	Volumen (ml)	Absorción		Cociente 260/280nm	µg de RNA por ml	
		260 nm	280 nm			
1	1.0	3.061	2.862	1.07	122.44	
2	"	3.006	2.784	1.08	120.24	
3	"	1.414	0.817	1.73	56.56	
4	"	0.342	0.261	1.31	13.68	
5	"	0.234	0.206	1.14	9.36	
6	"	0.191	0.173	1.10	7.64	
7	0.5	0.405	0.405	1.0	16.2	
8	"	0.236	0.218	1.08	9.44	
9	"	0.199	0.181	1.09	7.92	
15	"	0.281	0.271	1.04	11.24	
16	"	0.205	0.194	1.06	8.2	
17	"	0.171	0.155	1.10	6.84	
18	"	0.228	0.218	1.05	9.12	
19	"	0.456	0.462	0.99	18.24	
20	"	0.218	0.204	1.07	8.72	
21	"	0.29	0.236	1.23	11.6	
22	"	0.083	0.054	1.54	3.32	
23	"	0.073	0.044	1.66	2.92	
24	"	0.044	0.018	2.44	1.78	
25	E L U C I O N ↓	"	0.054	0.027	2.0	2.16
26		"	0.044	0.023	1.91	1.76
27		"	0.07	0.045	1.56	2.8
28		"	0.054	0.031	1.74	2.16
29		"	0.058	0.037	1.57	2.32
30		"	0.056	0.028	2.15	2.24
31		"	0.179	0.096	1.864	7.16
32	"	0.1	0.057	1.754	4.0	
33	"	0.057	0.028	2.035	2.28	
34	"	0.035	0.013	2.69	1.4	
35	"	0.044	0.012	2.0	1.76	
42	"	0.036	0.016	2.25	1.44	

SEPARACION DE RNA MENSAJERO DE MAIZ.

Tabla 7.3 Separación de RNA mensajero de maíz a partir de RNA total mediante cromatografía de afinidad en columna de oligo-1dTicelulosa. Medición espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbencia a 260 nm corresponde a 40 µgRNA/ml.

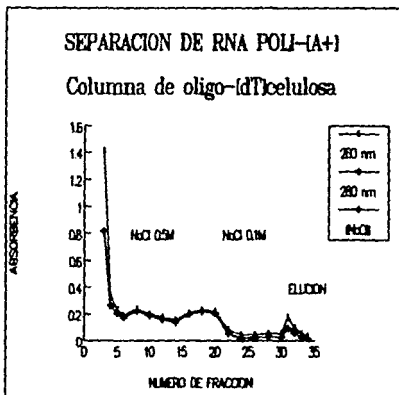


Figura 7.1 Perfil de elución de RNA a través de una columna de oligo-(dT)celulosa durante el aislamiento de RNA mensajero de maíz a partir de RNA total. NaCl 0.5 M: Amortiguador de lavado con (NaCl) = 0.5 M. NaCl 0.1 M: Amortiguador de lavado con (NaCl) = 0.1 M. ELUCION: Amortiguador de elución con (NaCl) = 0.

Analizando en la tabla 7.3 la pureza de estas fracciones por medio de los valores de los cocientes de absorbencia 260/280nm, se ve que al principio estos valores están muy alejados de los esperados, pero tienen una tendencia a acercarse al valor óptimo de 2.0 conforme avanza la cromatografía. No obstante esto, el perfil de elución observado en la figura 7.1 resulta congruente con lo reportado en la literatura. Al principio de la elución, se obtienen valores muy altos en la absorción (tanto a 260 como a 280 nm), estos valores disminuyen gradualmente mientras avanza la cromatografía y se disminuye la concentración de NaCl. En el momento de adicionar el amortiguador de elución se observa un pico de absorción, correspondiente al RNA poli-(A⁺).

Los resultados de elución son bastante buenos en cuanto a la pureza y concentración del RNA mensajero que se obtiene. Pero el hecho de tener que calentar los tubos que contienen las fracciones de elución (ya sea con la mano o en un heat block) introduce más posibilidades de contaminación por el exceso de manipulación, aparte de la pérdida de tiempo que trae consigo. El problema de la precipitación del SDS se trató de eliminar sustituyendo la sal de NaCl por la de LiCl en las soluciones amortiguadoras de lavado y elución. Los resultados que se obtuvieron son similares a los anteriores, pero no se eliminaron los problemas de la precipitación del SDS (datos no mostrados).

Posteriormente, trabajando en la separación de RNA poli-(A⁺) a partir de 83 µg de RNA total, se equilibró la resina de oligo-(dT)celulosa en NaOH 0.1 M (Maniatis y col., 1989), y se

cambió el detergente SDS en la solución amortiguadora de carga , por lauril sarcosinato de sodio (SLS). Por otra parte se eliminó la solución amortiguadora de carga con LiCl 0.1 M, debido a que en el paso de lavado donde esta es utilizada se obtiene muy poco RNA no poliadenilado (Maniatis y col., 1989).

En la tabla 7.4 se anotan los resultados de absorción de las fracciones obtenidas con estas modificaciones, y en la gráfica 7.2 se observa el perfil de elución obtenido con estos resultados. Sin embargo, se siguió presentando el problema de la precipitación del SDS presente en el amortiguador de elución. Esto era importante ya que al momento de leer en el espectrofotómetro, el SDS no resuspendido adecuadamente interfería aumentando el valor real de absorbencia.

Ya que el cambio de la sal de NaCl por la de LiCl no fué suficiente para evitar este problema, se decidió cambiar la forma sódica del SDS en el amortiguador de elución, por la sal de litio, es decir, dodecil sulfato de litio (LDS).

Para reducir el tiempo de corrida y las posibilidades de contaminación de las muestras, de las fracciones eluidas se tomó una alícuota de 5 μ l y se adicionaron a 5 μ l de una solución de bromuro de etidio sobre una tira de papel celofán dulce. La fluorescencia de las muestras con RNA se observó por medio de un transiluminador de U.V. De esta manera no se leyeron todas las fracciones, sino solamente aquellas fracciones cercanas a la elución y se leyeron en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm para la determinación de su pureza y cuantificación. Se presentan en la tabla 7.5 y en la figura 7.3 los resultados obtenidos.

OBTENCION DE RNA MENSAJERO DE MAIZ

Número de fracción	Volumen (ml)	Absorbencia		Cociente 260/280nm	µg de RNA por ml
		260 nm	280 nm		
1	1.0	0.453	0.28	1.608	18.12
2	"	0.669	0.338	1.98	26.76
3	"	0.095	0.055	1.727	3.8
4	"	0.064	0.038	1.684	2.56
5	"	0.047	0.030	1.57	1.88
6	"	0.047	0.030	1.57	1.88
7	"	0.049	0.032	1.53	1.96
8	0.5	0.158	0.068	2.32	6.32
9	"	0.150	0.075	2.0	6.0
10	"	0.038	0.017	2.235	1.52
11	"	0.030	0.011	2.73	1.2
12	"	0.030	0.015	2.0	1.2
13	"	0.005	0.004	1.25	0.2

Tabla 7.4 Separación de RNA mensajero de maíz a partir de RNA total mediante cromatografía de afinidad en columna de oligo(dT)celulosa. Las fracciones se cuantificaron espectrofotométricamente a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbencia a 260 nm corresponde a 40 µgRNA/ml.

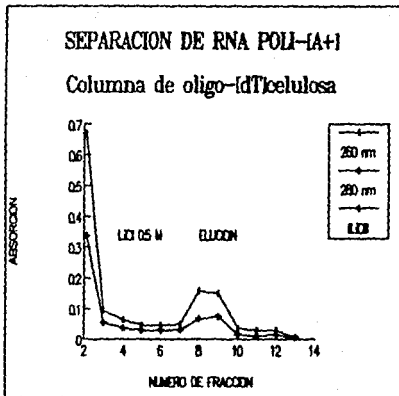


Figura 7.2 Perfil de elución de RNA a través de una columna de oligo-(dT)celulosa durante el aislamiento de RNA mensajero de maíz a partir de RNA total. LICI 0.5 M: Amortiguador de lavado con $[LiCl] = 0.5$ M. ELUCION: Amortiguador de elución con $[LiCl] = 0$.

OBTENCION DE RNA MENSAJERO DE MAIZ

Número de fracción	Volúmen (ml)	Absorbencia		Cociente 260/280nm	µg de RNA por ml
		260 nm	280 nm		
7	0.5	0.04	0.028	1.548	1.6
8	"	0.043	0.029	1.48	1.72
9	"	0.292	0.135	2.096	11.28
10	"	0.195	0.104	1.89	7.8
11	"	0.065	0.042	1.55	2.6
12	"	0.047	0.032	1.47	1.88

Tabla 7.5 Separación de RNA mensajero a partir de RNA total mediante cromatografía de afinidad en columna de oligo-dT/celulosa. Las fracciones se cuantificaron espectrofotométricamente a 260 y 280 nm, tras ser previamente teñidas con bromuro de etidio y observadas con luz U.V. Una unidad de absorbencia a 260 nm corresponde a 40 µgRNA/ml.

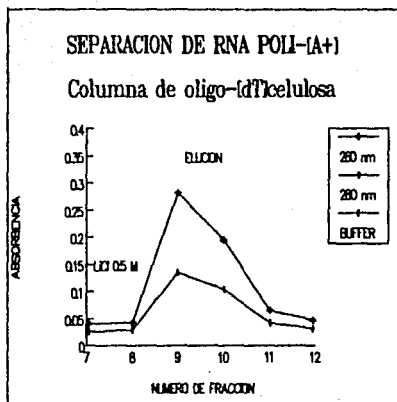


Figura 7.3 perfil de elución de RNA de las fracciones cercanas a la elución del RNA poli-(A⁺), en columna de oligo-(dT)celulosa durante el aislamiento de RNA mensajero de maíz a partir de RNA total.

Los resultados que se tuvieron con estas últimas modificaciones rinden un perfil de elución similar a los obtenidos anteriormente, pero en este ensayo se logró eliminar la precipitación del detergente utilizado en las soluciones amortiguadoras de carga y elución (LDS). Esto aunado a la técnica de tinción con bromuro de etidio disminuyeron el tiempo total de la cromatografía y las posibilidades de contaminación de las muestras importantes.

El RNA poli-[A⁺] obtenido se resuspendió en la cantidad de H₂O desionizada estéril necesaria para alcanzar una concentración de alrededor de 0.1 µg RNA/µl.

7.3 TRADUCCION IN VITRO DEL RNA POLI-[A⁺].

En el presente proyecto los ensayos de traducción se llevaron a cabo mediante un equipo comercial de reticulocitos de conejo, tratado con una nucleasa con objeto de reducir el nivel endógeno de RNA mensajero (Pelham & Jackson, 1970).

Ya que deben establecerse las concentraciones óptimas de los iones presentes en el equipo, se procedió en primer lugar a determinar la concentración adecuada de RNA mensajero, de tal manera que se obtuviera un valor alto de incorporación de la metionina, L-[³⁵S] con la menor cantidad adicionada de este RNA (titulación del RNA mensajero).

Debe mencionarse que en el momento de iniciar los ensayos preliminares la actividad radiactiva del ³⁵S se encontraba a

menos de una vida media. Por ello, cuando se utilizó la metionina de este lote, se agregó el doble de lo recomendado. De esta manera, cuando se aumentó el volumen de metionina y se alteró la concentración de los iones presentes, se hicieron ajustes en los volúmenes correspondientes para mantener constante su concentración

Para la titulación del RNA mensajero se mantuvieron constantes las concentraciones de todos los factores, haciendo variar únicamente la concentración del primero. Una vez que se conoció la concentración óptima de RNA para una buena traducción, debió de procederse a cuantificar las concentraciones de los iones indispensables para la traducción (como K^+ y Mg^{++}).

En la tabla 7.6 se muestra la manera de preparar los tubos para el ensayo de traducción *in vitro*. En la tabla 7.7 se encuentran los resultados de la titulación de RNA mensajero de maíz, y en la figura 7.4 la gráfica de la titulación del RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de germinación en ausencia de BA.

Ya que a cada uno de los tubos se adicionan volúmenes iguales de metionina, K^+ , Mg^{++} , y cocktail de traducción, estos se prepararon en una "premezcla de traducción", para reducir los errores originados al manejar volúmenes tan pequeños.

PREPARACION DE LOS TUBOS PARA LA TRADUCCION *in vitro* DEL RNA
MENSAJERO DE MAIZ

Número de tubo	RNA		H ₂ O (μl)	Premezcla (μl)	lisado (μl)	total (μl)
	tipo	volúmen (μl)				
1	CONTROL	1.0	1.0	13.0	10.0	25.0
2	6 HC	0.0	2.0	"	"	"
3	"	0.0	2.0	"	"	"
4	"	0.5	1.5	"	"	"
5	"	0.5	1.5	"	"	"
6	"	1.0	1.0	"	"	"
7	"	1.0	1.0	"	"	"

Tabla 7.6 Tabla de preparación de los tubos para la titulación de la cantidad necesaria de RNA mensajero de maíz necesaria para una buena traducción *in vitro* con un equipo de reticulitos de conejo y metionina-L-³⁵S. CONTROL: RNA mensajero obtenida de células MeLa infectadas por adenovirus, como control de la traducción. 6 HC: RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de la germinación.

TITULACION DEL RNA MENSAJERO DE MAIZ EN UN SISTEMA DE SINTESIS
DE PROTEINAS LIBRE DE CELULAS

Número de tubo	RNA		cpm totales
	tipo	volúmen (μ l)	
1	CONTROL	1.0	376 046
2	6H C	0.0	200 977
3	"	0.0	146 328
4	"	0.5	243 486
5	"	0.5	281 175
6	"	1.0	387 728
7	"	1.0	401 382

Tabla 7.7 titulación de la cantidad de RNA mensajero de maíz necesaria para una buena traducción in vitro con un equipo de reticulocitos de conejo y metionina, L-³⁵S. CONTROL: RNA mensajero obtenido de células HeLa infectadas por adenovirus, como control de la traducción. 6 HC: RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de la germinación.

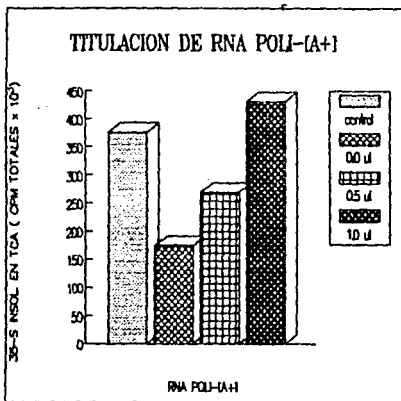


Figura 7.4 Titulación de RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de la germinación. Los productos se analizaron colocando 25 µl de la mezcla de reacción sobre un papel Whatman GF/A y se trataron para analizar el material radiactivo insoluble en TCA en un contador de centelleo. CONTROL: RNA mensajero control de la traducción. Los demás son cantidades crecientes de RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de la germinación.

En esta primera traducción in vitro del RNA mensajero obtenido a partir de ejes embrionarios de maíz, se encontró una tendencia al aumento en la incorporación de ^{35}S en forma proporcional a la concentración de RNA poli-(A⁺) presente en la mezcla de traducción. También, al analizar los valores de cpm resultantes de la incorporación de marca por la traducción del RNA mensajero, es evidente que las concentraciones de los componentes del equipo (que son óptimas para la traducción del RNA control suplementado), son también apropiadas para la traducción eficiente del RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz. Por esta razón se mantuvieron bajo estas condiciones, y ya no se necesitaron hacer experimentos para determinar su concentración óptima.

Interesantemente, se observa también que aunque el ^{35}S se encontraba con menos de una vida media al momento del ensayo, se obtuvieron valores de cpm totales desde 170 000 hasta 430 00. Se decidió entonces reducir la cantidad de marca en la mezcla de traducción, y se pusieron en adelante 2.0 μl en lugar de los 5.0 μl recomendados en el equipo.

El ensayo de traducción para comparar el efecto de BA sobre la población de RNA mensajeros en ejes embrionarios a las 6 horas de germinación se hizo con esta modificación, mostrándose la tabulación de los resultados en la tabla 7.8, y la gráfica de incorporación por efecto de BA en la figura 7.8 .

EFFECTO DE BENCILADENINA SOBRE LA POBLACION DE RNA
 MENSAJEROS DE MAIZ A LAS 6 HORAS DE GERMINACION

Número de tubo	RNA		cpm totales (promedio)
	Tipo	Volúmen (μ l)	
1	CONTROL	1.0	45 654
2 y 3		0.0	13 100
4 y 5	6H C	1.0	118 500
6 y 7	6H BA	1.0	240 000

Tabla 7.8 Efecto de benciladenina sobre la síntesis de RNA mensajero en ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de la germinación. CONTROL: RNA mensajero de células MeLa infectadas por adenovirus, como control de la traducción. Tubos 2 y 3, blanco sin mRNA. 6H C: RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de germinación sin BA. 6H BA: RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz a las 6 horas de la germinación en presencia de BA.

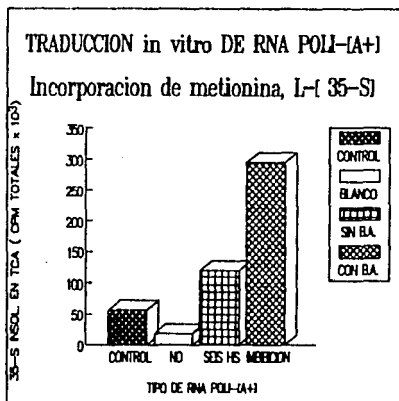


Figura 7.5 Efecto de Benziladenina sobre la traducción de RNA mensajero de maíz a las 6 horas de germinación.
control: RNA mensajero control de traducción. BLANCO: no RNA.
SIN BA: RNA mensajero de maíz de 6 horas de germinación en ausencia de BA. CON BA: RNA mensajero de maíz de 6 horas de germinación en presencia de BA.

Los resultados muestran un aumento en la síntesis de proteínas en cerca del 100% cuando se aplica BA en la solución amortiguadora de imbibición. Los resultados son excelentes. Sin embargo, realizando experimentos para corroborar la incorporación a los tubos blanco, se encontró un alto nivel de traducción. Es decir, se tuvieron valores de cpm muy altos (datos no mostrados). Estos valores tan altos pudieron haber sido originados por un lavado defectuoso de los papeles filtro Whatman GF/A. El tratamiento de los discos de papel filtro tras pipetear la mezcla de traducción en ellos consistió en colocarlos en el aparato de filtración al vacío (Millipore) y lavarlos secuencialmente con 500 ml de TCA (10%, H₂O, etanol (70% y acetona, respectivamente. Se secaron por 20 minutos en el horno a 60 °C y se colocaron en un frasco con líquido de centelleo.

Lo anterior hizo obligado el realizar un ensayo de traducción modificando el procesamiento de los filtros.

Se realizó un experimento con dos "blancos" tratados de manera habitual, y dos "blancos" tratados de la manera siguiente: Los filtros fueron hervidos por 10 minutos en TCA al 10% en matraces Erlenmeyer después de depositar la alícuota de la mezcla de traducción. Se les introdujo hielo con el fin de depositar los filtros en el fondo del matraz. Después de esto, se manejaron de la misma manera que en el tratamiento habitual. En la tabla 7.9 se muestran los resultados obtenidos, y en la figura 7.6 los resultados de este tratamiento hirviendo los discos de papel.

RESULTADOS OBTENIDOS TRAS HERVIR O NO LOS DISCOS DE PAPEL
WHATMAN DURANTE EL ANALISIS DEL MATERIAL INSOLUBLE EN TCA

Número de tubo	RNA		Tratamiento	cpm totales
	Tipo	Volúmen (μl)		
1	CONT.	1.0	Habitual	134 724
2	--	0.0	Hervir	55 401
3	--	"	Hervir	51 326
4	--	-	Habitual	145 177
5	--	"	Habitual	110 892

Tabla 7.9 Efecto sobre el valor de cpm obtenido cuando se tratan los discos de papel filtro Whatman GF/A hirviendo y sin hervir, analizando los productos proteicos radiactivos insolubles en TCA. CONT.: RNA mensajero control de traducción. Los tubos 2, 3, 4 y 5 no contienen RNA mensajero.

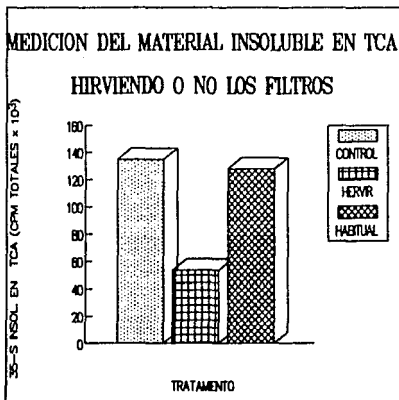


Figura 7.6 Efecto de hervir los discos de papel filtro en TCA al 10N, sobre el número de cpm detectadas en contador de centelleo. control: RNA mensajero control de la traducción. El procedimiento se realizó como se indica en el texto.

El hervir los discos de papel filtro Whatman en TCA 10% resultó en la reducción del número de cpm totales en alrededor del 50% en relación al tratamiento habitual. De acuerdo a esto, el análisis del material radiactivo insoluble en TCA de los ensayos de traducción subsecuentes se realizó hirviendo los papeles filtro Whatman GF/A.

También se trató de reducir el valor de cpm totales a los tubos blanco, enfocando el problema sobre el tipo de papel utilizado. Para ello se cambió el papel Whatman GF/A por papel Whatman 3mm, que es altamente específico en el análisis de los productos proteicos con incorporación de marca. Además, el cuadro de papel se humedeció antes de pipetear la alícuota de la mezcla de traducción con TCA al 10% frío. Esto se hizo por los resultados obtenidos tras hervir los filtros, ya que al reducir el número de cpm totales significaba que parte de la marca se adsorbía sobre el papel.

Por lo que toca al valor del "blanco" en sí, con el tratamiento habitual se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para el RNA control de la traducción (comparar el tubo número 1 con los tubos 4 y 5 en la tabla 7.9), lo que llevó a pensar en la posibilidad de que podría tratarse de ³⁵S incorporado en proteína sintetizada de novo. Para saberlo, se realizó un experimento tratando la mitad de los tubos con proteasa (proteínasa "K"), y la otra mitad con el tratamiento establecido, ambos hirviendo los discos de papel filtro. Estos resultados se muestran en la tabla 7.10 y en la figura 7.7.

TRATAMIENTO DE LA MEZCLA DE TRADUCCION CON PROTEASA

Número de tubo	RNA	Proteasa (μ l)	cpm totales	% de reduccion
1	---	0.0	59 059	--
2	---	100	17 874	70
3	6HC	0.0	89 698	--
4	6HC	100	23 707	74
5	6H BA	0.0	69 708	--
6	6H BA	100	27 893	60

Tabla 7.10 Tratamiento con proteasa a los productos obtenidos tras 1 hora de incubación de la mezcla de traducción. Los tubos 2, 4, y 6 se incubaron en presencia de proteínasa "K" por 30 minutos más. 6H C : RNA mensajero de ejes embrionarios a las 4 horas de la germinación en ausencia de BA. 6H BA : RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz al mismo tiempo de germinación, pero en presencia de BA.

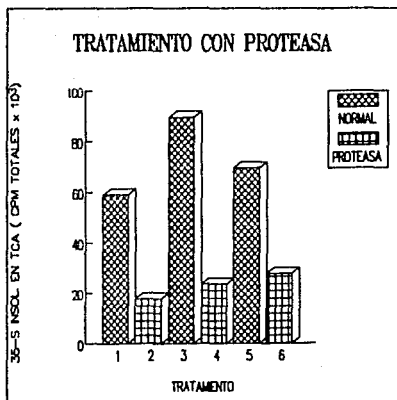


Figura 7.7 Tratamiento con proteasa a los productos obtenidos tras 1 hora de incubación de la mezcla de traducción. Los tubos 2, 4, y 6 se incubaron 90 minutos más en presencia de proteinasa "K". tubos 1 y 2: sin mRNA. tubos 3 y 4: RNA mensajero de maíz a las 6 horas de germinación en ausencia de BA. tubos 5 y 6: RNA mensajero de maíz a las 6 horas de germinación en presencia de BA.

El tratamiento con proteasa redujo el número de cpm totales entre un 60 y un 70% respectivamente. Esto significa que, al menos parte de la radiactividad que se detecta en los tubos "blanco" es marca específica en proteína sintetizada *de novo*. Con este resultado se detectó la presencia de un nivel considerable de RNA mensajero endógeno en el sistema de reticulocitos de conejo, el cual no puede ser eliminado fácilmente, como se observó en la figura 7.7.

La traducción *in vitro* de los RNA presentes en los ejes embrionarios de maíz embebidos por 3, 6, 9 y 18 horas se realizó con todas las modificaciones anteriores. Dada la dificultad en aislar RNA mensajero, se investigó también la capacidad del sistema de traducción para traducir RNA total. Se colocaron RNA mensajero extraído de ejes embrionarios a las 6 horas de germinación en ausencia ($0.1080 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y presencia de BA ($0.1076 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), y RNA total ($10 \pm 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) de ejes embrionarios de maíz en los demás tiempos. Los resultados se tabulan en la tabla 7.11, y se muestra la gráfica en la figura 7.8.

En esta figura se observa que el RNA mensajero (tubos número 5 y 6 de la tabla 7.11) fué más eficaz que el RNA total (tubos número 3, 4, 7, 8, 9, y 10 de la tabla 7.11) para ser traducido por el sistema de traducción *in vitro*, al menos en la incorporación que se detecta en el contador de centelleo. Aunque se tuvieron problemas nuevamente con los valores de incorporación del tubo blanco, ya que no hay diferencia marcada entre el resultado del tubo número 1 (blanco sin RNA) y los tubos con RNA total.

EFFECTO DE BENCILADENINA SOBRE LA POBLACION DE RNA MENSAJEROS
DE MAIZ A LAS 3, 6, 9 Y 15 HORAS DE GERMINACION

Número de tubo	RNA		cpm totales
	Tratamiento	tipo	
1	—	—	10,192
2	CONTROL	RNA _m	11,874
3	3H C	RNA _{tot}	10,816
4	3H BA	"	13,328
5	6H C	RNA _m	27,681
6	6H BA	"	26,612
7	9H C	RNA _{tot}	8,501
8	9H BA	"	9,850
9	15H C	"	11,161
10	15H BA	"	11,365

Tabla 7.11 Traducción *in vitro* del RNA mensajero de maíz a diferentes tiempos de la germinación. El ensayo se practicó como se indica en METODOS. CONTROL: RNA mensajero control; 3H C, 9H C, y 15H C: RNA total de ejes embrionarios de maíz a las 3, 6, y 15 horas de la germinación en ausencia de BA. 3H BA, 9H BA, y 15H BA: RNA total de maíz a las 3, 6, y 15 horas de la germinación en presencia de BA. 6H, C: RNA mensajero de maíz a las 6 horas de la germinación. 6H BA: RNA mensajero de maíz a las 6 horas de la germinación. El tubo número 1 es el blanco sin RNA:

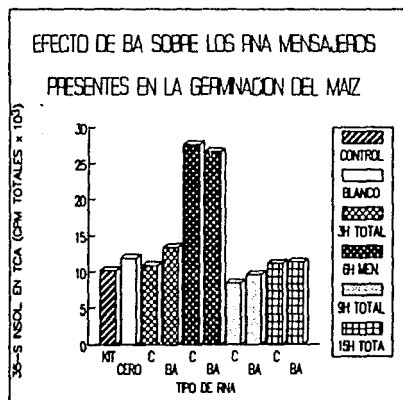


Figura 7.8 Traducción *in vitro* de los RNA mensajeros de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de la germinación. El ensayo se realizó como se indica en METODOS. Kit: RNA mensajero control. C: RNA total (excepto el tubo 3) de ejes embrionarios de maíz embebidos en ausencia de BA. BA: RNA total (excepto el tubo 6) de maíz en presencia de BA. 3, 6, 9, y 15 horas de la germinación. CERO corresponde al tubo control sin RNA.

Tras los resultados observados en cuanto al valor relativo de cuentas por minuto, obtenidas en los tubos con RNA de diferente tiempo de imbibición y en el tubo blanco, se decidió realizar una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida para observar los patrones protéicos, y ver si se podía obtener información más representativa que la de los resultados anteriores.

7.4 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y Fluorografía.

Los geles obtenidos como se indica en METODOS, se tificaron primero con azul de Coomasie y después se procesaron para la fluorografía. Los marcadores moleculares se detectaron por la tinción de Coomasie; se tomaron los Rf correspondientes y se graficó el $-\log$ del Rf contra el peso molecular particular.

El gel que se muestra en la figura 7.9 se tificó con azul de Coomasie. Como se vé, no hay diferencias en el patrón de bandeo en ningún carril. Esto era de esperarse, ya que las proteínas sintetizadas *in vitro* se enmascaran por la presencia de las proteínas del sistema de reticulocitos de conejo.

Después del tratamiento para la fluorografía (ver METODOS), los geles ya secos se colocaron contra una película negativa dentro de una pantalla amplificadora el tiempo adecuado al número de cpm totales con que se cargaron los pozos del gel. En la figura 7.11, los patrones de bandeo se observan muy diferentes a los obtenidos por la tinción de Coomasie.

ELECTROFESIS PAGE-SDS DE LOS PRODUCTOS PROTEICOS OBTENIDOS
 MEDIANTE LA TRADUCCION *in vitro* DE LOS RNA MENSAJEROS DE MAIZ
 OBTENIDOS A DIFERENTES TIEMPOS DE GERMINACION

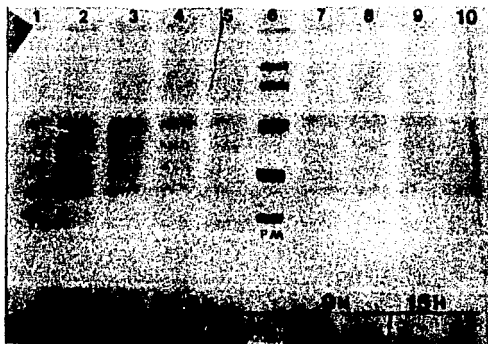


Figura 7.9 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida-SDS. Carril 1: proteínas sintetizadas a partir del RNA mensajero control de traducción. Carriles 2 y 3, 7 y 8, 9 y 10: proteínas sintetizadas al utilizar RNA total de maíz a las 2, 9, y 15 horas de germinación. Carriles 4 y 5: Proteínas sintetizadas a partir de RNA mensajero de maíz a las 4 horas de la germinación. Carriles 2, 4, 7 y 9, RNA extraído de ejes embrionarios de maíz incubados en ausencia de BA. Carriles 3, 5, 8 y 10, incubación con BA. Tinción por Coomassie.

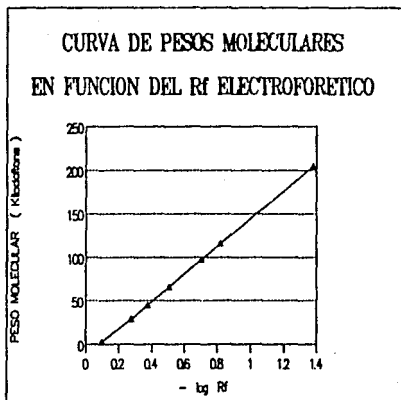


Figura 7.10 Curva de pesos moleculares en función del Rf obtenido por los marcadores de peso molecular en la electroforesis PAGE-SDS. Anhidrasa carbónica 29 000 Daltons; Albúmina de huevo 45 000 Daltons; Albúmina bovina 66 000 Daltons; Fosforilasa B 97 400 Daltons; β -galactosidasa 116 000 Daltons; Miosina 205 000 Daltons.

FLUOROGRAFIA DEL GEL CORRESPONDIENTE A LOS PRODUCTOS DE LA
 TRADUCCION *in vitro* DE LOS RNA MENSAJEROS DE MAIZ OBTENIDOS
 EN DIFERENTES TIEMPOS DE GERMINACION

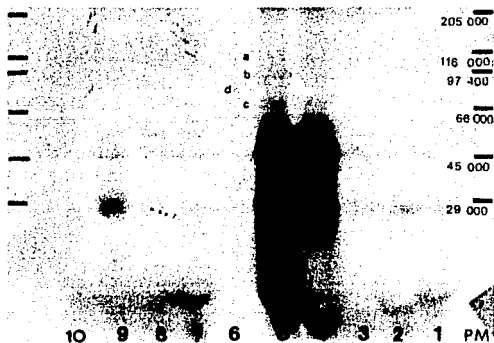


Figura 7.11 Autorradiografía del gel que se muestra en la figura 7.9. a: proteína de 116 000 daltons. b: proteína de 97 400 daltons. c: proteína de 66 000 daltons. d: proteína de 45 000 daltons. PM: marcadores moleculares.

A simple vista (ya que no se usó densitómetro, debido a que no se contaba con uno), los carriles 4 y 5 (figura 7.11), que corresponden a las proteínas obtenidas tras la traducción del RNA mensajero de maíz a las 6 horas de la germinación, son los que tuvieron mayor cantidad de proteína sintetizada, como se observa por la densidad de marca en estos carriles. Los carriles correspondientes a los productos de la traducción cuando se utilizó RNA total de maíz (carriles 2, 3, 7, 8, 9, y 10, figura 7.11) presentaron una cantidad más baja de proteína que el RNA mensajero, pero similar a la obtenida con el RNA mensajero control (carril 1, figura 7.11).

Por otro lado, en los productos del RNA mensajero de ejes embrionarios embebidos por 6 horas en presencia de BA, se observó un aumento en la intensidad de al menos 3 bandas de alrededor de 111 000 (marca a, figura 7.11), 90 000 (marca b, figura 7.11), y 67 000 Daltons (marca d, figura 7.11) respectivamente (los pesos moleculares en función del r_f electroforético se muestran en la figura 7.10); y la aparición de una banda de aproximadamente 77 000 Daltons (marca c, comparar los carriles 4 y 5 de la figura 7.11). Con el RNA total, en el tratamiento control y con respecto al tratamiento con BA, se observa el acrecentamiento de una banda de aproximadamente 18 000 Daltons, en el carril correspondiente a los productos proteicos del RNA mensajero de ejes embrionarios de maíz embebidos por 15 horas en ausencia de BA (carriles 9 y 10 de la figura 7.11).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8. DISCUSION.

La extracción de RNA total a partir de fuentes vegetales, presenta el inconveniente de la existencia de fitocromos (Carbohidratos, pigmentos, etc.) que absorben en una amplia gamma del espectro electromagnético. Aquellas especies que absorben en la región del ultravioleta interfieren en la determinación espectrofotométrica de los criterios de pureza y concentración de muestras de RNA (Jurnak y cols., 1984), criterios que requieren la lectura de las absorbencias a 260 y 280 nm. Es por ello que se prefieren medir estos parámetros valiéndose de una electroforesis en gel de agarosa, observando la integridad de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (28S y 18S). Sin embargo, este último procedimiento es sumamente cualitativo y exige una gran experiencia por parte del investigador. Por otro lado, cuando las preparaciones de RNA serán utilizadas finalmente en un sistema de síntesis de proteínas libre de células, la titulación de la concentración óptima de RNA para la incorporación de marca en proteína sintetizada *de novo*, evita los problemas concernientes a la determinación real de esa concentración.

Durante el desarrollo experimental, la obtención del RNA total a partir de los ejes embrionarios de maíz pudo estandarizarse de tal manera que se obtuvo una cantidad de RNA proporcional a la cantidad de ejes utilizados (Alrededor de 1.0 mg de RNA total a partir de 1.0 g de ejes embrionarios). Además, las preparaciones obtenidas presentaron un grado de pureza

bastante bueno (factores de absorbencia 260/280 nm entre 1.8 y 2.0, tabla 7.4) y con una integridad aceptable como se observó al correr una electroforesis en gel de agarosa (datos no mostrados).

Con todo lo anterior, las muestras de RNA total extraídas de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación, se lograron obtener con una pureza excelente, en alta cantidad y con una integridad necesaria para garantizar la estabilidad del RNA mensajero.

La separación de este RNA mensajero por el método originalmente empleado (Maniatis y col., 1982), tuvo un rendimiento de cerca del 1% en relación al RNA total (alrededor de 9 µg de RNA poli-(A⁺)/1 mg de RNA total), resultados acorde con lo reportado en la literatura (Taylor y Powell, 1982).

El hecho de presentarse la precipitación del detergente empleado en los amortiguadores de carga y elución durante la cromatografía en columna de oligo-(dT)celulosa, constituyó un problema debido a la manipulación que debió realizarse al calentar las muestras precipitadas para resuspenderlas y obtener de esa manera lecturas espectrofotométricas representativas. Estas manipulaciones pudieron constituirse en elementos de contaminación del RNA mensajero, hecho que debió ser evitado al máximo, debido a la importancia de la integridad estructural de estas moléculas como requerimiento tanto para su capacidad para ser traducidas, como para la obtención de proteínas de peso molecular correspondiente a las esperadas de la codificación por un RNA mensajero íntegro. Por esta razón, se hicieron varios intentos para evitar los problemas de precipitación del

detergente; estas acciones se enfocaron desde el cambio de la sal presente en los amortiguadores (LiCl en lugar de NaCl), hasta el cambio de la forma sódica del SDS en el amortiguador de elución a su forma de litio (Dodecil sulfato de litio, LDS) y aún más, el cambio del SDS por Lauril sarcosinato de sodio (SLS) en el amortiguador de carga. Al introducir formas más solubles de los detergentes y de la sal empleada para regular la fuerza iónica en estas soluciones, se evitó la precipitación del detergente en los tubos durante la colecta de las fracciones de la cromatografía. Con ello se evitaron también todas las maniobras que implicaron el trabajar con el espectrofotómetro como área aséptica con una gran cantidad de tubos. El manejo de esta cantidad de tubos disminuyó al medir cualitativamente la fluorescencia de las muestras con RNA poli-[A⁺] en un transiluminador de ultravioleta después de tefir las fracciones de elución con una solución de bromuro de etidio. Todo esto ayudó a una determinación del RNA mensajero en las fracciones de elución, más rápida, segura y confiable.

La concentración de RNA poli-[A⁺] se estableció en alrededor de 0.1 µg RNA/µl (por datos previos, Quintero, comunicación personal).

Los resultados obtenidos para la titulación del RNA mensajero, muestran que a esta concentración de 0.1 µg/µl este es capaz de ser traducido con una eficiencia similar a la exhibida por el RNA mensajero control de traducción (comparar tubos 1, 6 y 7 de la tabla 7.7, y la figura 7.4), debido a esto, esta concentración se consideró aceptable para realizar los ensayos subsecuentes.

Para lograr la estandarización de un buen blanco de referencia en los ensayos de traducción al analizar los productos por medio de un contador de centelleo, las modificaciones que se hicieron estuvieron orientadas a lograr la eliminación de incorporación inespecífica de material TCA insoluble sobre los filtros de microfibra de vidrio. Los resultados mostraron que efectivamente, algo de la marca inespecífica se adsorbe en el filtro, pero que puede ser reducida significativamente al humedecer los filtros en TCA antes de adicionar la mezcla de traducción, y posteriormente hirviendo los filtros para una mejor precipitación de las proteínas y eliminación de aminoácidos libres, dentro de los cuales se encuentra la metionina, L-[³⁵S] (aunque podría pensarse que algo de este aminoácido radiactivo se encuentra aún pegado a su respectivo tRNA, y de esta manera no podría eliminarse con esta metodología).

El tratamiento con proteasa reveló la existencia de un nivel importante de RNA mensajero endógeno en el sistema de traducción; pero este RNA es muy difícil de eliminar. No obstante, los problemas que ocasionó en el método de análisis del material insoluble en TCA no se presentaron durante la electroforesis.

Lo anterior, confirmado por otros investigadores (referencias personales), demuestran que la detección del nivel de incorporación de marca radiactiva en un sistema de síntesis *in vitro* de proteínas, por medio del material insoluble en TCA, no es totalmente reproducible ni representativo, por lo que se le tomó solamente como un indicio de la tendencia del sistema a

la incorporación de metionina, L-f³⁵S) en función de la cantidad de RNA mensajero adicionado al sistema.

Por otro lado, debido a problemas que se presentaron durante la separación del RNA mensajero, se investigó también la capacidad del sistema de reticulocitos para traducir RNA total en lugar de RNA mensajero. Se encontró que aunque se adicionó 100 veces más RNA total que RNA poli-(A⁺) y bajo las condiciones muy particulares de los ensayos, el sistema de reticulocitos tradujo más eficientemente el RNA mensajero que el RNA total (comparar los tubos 4 y 5 de la tabla 7.11, y los carriles 5 y 6 de la figura 7.11, con los tubos 3, 4, 7, 8, 9 y 10 y carriles 2, 3, 7, 8, 9 y 10 de la misma tabla y figura).

Analizando precisamente la figura 7.11, se observa que BA promovió la modificación del patrón de RNA mensajeros presentes en ejes embrionarios de maíz a las 8 horas de germinación, que es el tiempo en el que Vázquez Ramos y Reyes (1990) observaron un incremento durante la síntesis de DNA en el mismo sistema. Con BA se observó un aumento en las bandas correspondientes a proteínas de 111 000 (-a-, figura 7.11), 90 000 (-b-, figura 7.11) y 67 000 daltons aproximadamente (-d-, figura 7.11), y la aparición de una banda correspondiente a una proteína de alrededor de 77 000 Daltons (-c-, figura 7.11). No se sabe si esto refleja un aumento en la síntesis del RNA mensajero correspondiente o un incremento en la tasa de traducción de este).

Debido a que el gel es desnaturizante, mediante la técnica electroforética empleada, no es posible afirmar que una banda corresponda a una proteína biológicamente activa, ya que bien podría tratarse de la subunidad de una proteína polimérica.

9. CONCLUSIONES.

LOGRARON ESTABLECERSE LAS METODOLOGIAS EXPERIMENTALES PARA LA EXTRACCION DEL RNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ, ASI COMO LA SEPARACION DEL RNA MENSAJERO (POLIADENILADO) CON LA PUREZA E INTEGRIDAD REQUERIDAS PARA SU UTILIZACION EN ENSAYOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

SE ESTABLECIERON LAS CONDICIONES PARA LOGRAR UNA OPTIMA TRADUCCION *IN VITRO* DEL RNA MENSAJERO DE MAIZ, POR MEDIO DE UN SISTEMA DE RETICULOCITOS DE CONEJO. SE ENCONTRO QUE EL RNA MENSAJERO ES MAS EFICIENTE QUE EL RNA TOTAL EN CUANTO A SU CAPACIDAD PARA SER TRADUCIDO POR EL SISTEMA DE SINTESIS LIBRE DE CELULAS.

SE DEMOSTRO QUE BA PROMOVIO CAMBIOS SOBRE LA POBLACION DE RNA MENSAJEROS DE MAIZ A LAS 6 HORAS DE LA GERMINACION, AUMENTANDO LA SINTESIS DE CIERTAS PROTEINAS CON RESPECTO AL CONTROL Y PROMOVRIENDO LA SINTESIS DE AL MENOS UNA PROTEINA QUE NORMALMENTE NO SE SINTETIZA DURANTE ESTE PERIODO DE GERMINACION.

LA COMPROBACION DE LA HIPOTESIS EXPERIMENTAL SE LOGRO CON UN EXITO PARCIAL, PORQUE LOS RESULTADOS QUE COMPLEMENTAN LOS OBJETIVOS PROPUESTOS NO FUERON ALCANZADOS DEBIDO AL EXCESO DE TIEMPO QUE REQUIRIO EL MONTAJE DE LA METODOLOGIA EXPERIMENTAL; SIN EMBARGO, EN EL LABORATORIO SE TRABAJARA CON EXPERIMENTOS POSTERIORES PARA LA OBTENCION DE ESTOS RESULTADOS.

10. REFERENCIAS.

- 1.- Addicott, F. T., (1972). Biochemical aspects of the abscisic acid, in: D.J. Carr (ed), Plant growth substances, Springer Verlag, p.p. 272-280.
- 2.- Addicott, F. T., and Lyon, J. L., (1969), Ann. Rev. Plant Physiol. 20, p. 139.
- 3.- Bernal Lugo Irma, (1984), Acción de fitorreguladores en inducción de enzimas hidrolíticas en el endospermo y su control, en: Cuadernos de posgrado 11, Biquímica Vegetal, p.p. 87-102, Facultad de Química, UNAM.
- 4.- Berrie, A. M. M., Parker, W., Knights, B. A. and Hondrie, M. R., (1968), Studies on Lettuce seed germination I. Coumarin induced dormancy, Phytochemistry 7, p.p. 567-573.
- 5.- Bewley, J. D. and Black, M., (1978), Physiology and Biochemistry of seed in relation to germination. vol. I, Development, Germination and Growth, Springer Verlag, p.p. 1-13, 115-117, 132-171.
- 6.- Bidwell, R. G., (1970), Fisiología Vegetal, AGT editor, México, D. F., p.p. 75-77, 409-448, 569-598.
- 7.- Cohen, J. D., (1982), Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-L-aspartate from seeds of *Glycine max* L., Plant Physiology 70, 749-753.
- 8.- Cronquist, A., (1979), Introducción a la Botánica, 2a. edición, Editorial Continental, S. A., México, p. 680.
- 9.- Cheung, C. P., Wu, J. and Suhadolnik, A., (1979), Dependent of protein synthesis on RNA synthesis during early hours of germination of wheat embryos, Nature 277, p.p. 66-67.
- 10.- Ching, T. M., (1972), Metabolism of germinating seed, in: T. T. Kozlowski (ed), Seed Biology, vol. 3, Academic Press, New York, p.p. 116-117.
- 11.- Das, N. K., Patlau, K. and Skoog, F., (1965), Physioli. Plant 9, p.p. 640-651, citado por Zwar, 1963.
- 12.- Dyer, T. A., Osborne, D. J., (1971), Leaf nucleic acids. II, Metabolism during senescence and the effect of Kinetin, J. Exp. Bot. 22, p.p. 552-560.
- 13.- Dure, L. S., (1975), Ann. Rev. Plant Physiol. 26, p. 289.
- 14.- Euwens, C. L., Schwabe, W. W., (1975), J. Exp. Bot. 26, p.p. 1-14.

- 15.- Evenari, M., Neuman, G., Blumenthal-Goldschmidt, S., Mayer, A. M. and Poljakoff-Mayber, A., (1958), Bull. Res. Council Israel 6d, p. 65.
- 16.- Fletcher, R. A., (1969), Retardation of leaf senescence by BA in intact bean plants, Planta 80, p.p. 1-8.
- 17.- Frankland, P. and Wareing, P. F., (1966), J. Exp. Bot. 17, p. 506.
- 18.- Greulach, A. V. and Edison, J. A., (1970), Las plantas, Introducción a la botánica moderna, Ed. Limusa-Wiley, 1^o ed., México, D. F.
- 19.- Hall, R. H., (1973), Ann. Rev. Plant Physiol. 24, p. 415.
- 20.- Harvey, B. M. R., Lu, B. C., Fletcher, R. A., (1974), BA accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons, Can. J. Bot. 62, p.p. 2481-86.
- 21.- Hewett, E. W. and Wareing, P. F., (1963), Physiol. Plant. 28, p. 393.
- 22.- Hill, A. T., (1977), Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, Ed. Omega, Barcelona, España.
- 23.- Ikuma, H. and Thimann, K. V., (1973), Plant Cell Physiol. 4, p. 113.
- 24.- Jacobsen, J. B. and Chandler, P. M., (1987), in Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development, p. 164 (Ed. P. J. Davies), Nijhoff, Dordrecht.
- 25.- Jacoby, B. and Dagan, J., (1970), Effects on ¹⁴N-BA on primary leaves in intact bean plants and on their sodium absorption capacity. Physiol. Plant. 23, p.p. 397-403.
- 26.- Jones, R. L. and Stoddard, J. L., (1977), in: The Physiology and Biochemistry in Seed Dormancy and Germination, p. 77 (Ed. A. A. Khan), North-Holland, Amsterdam.
- 27.- Junhenheimer, R. W., (1976), Corn: improvement, set production and uses, John Wiley and sons, Inc., p. 25.
- 28.- Karavaiko, N. N., Krawiarz, K., Khokhlova, V. A., Kulaeva, O. N., (1978), Fiziol. Rast. 25, p. 83.
- 29.- Karssen, C. M., (1968), Acta Bot. Neerl. 17, p. 293.
- 30.- Karssen, C. M., (1982), in Plant Growth Substances, p. 623 (Ed. P. F. Wareing), Academic Press, London.

- 31.- Karssen, C. M., Brinkhorst-Van der Swan, D. L. C., Breekland, A. E. and Koorneef, M., (1983), *Planta* 157, p. 158.
- 32.- Kende, H., (1971), *Intern. Rev. Cytol.* 31, p. 301.
- 33.- Kepczynski, J. and Karssen, C. M., (1985), *Physiol. Plant.* 63, p. 49.
- 34.- Ketring, D. L., (1977), in *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, p 157 (Ed. A. A. Khan), North-Holland, Amsterdam.
- 35.- Khan, A. A., (1956), citado por Mayer, A. M., (1959), *Nature* 184, p. 828.
- 36.- Khan, A. A., (1967), Antagonism between cytokinins and germination inhibitors, *Nature* 216, p.p. 166-67.
- 37.- Koorneef, M., Reuling, G. and Karssen, C. M., (1984), *Physiol. Plant.* 61, p. 377.
- 38.- Kulaeva, O. N., (1981), Cytikinin action on transcription and translation in plants, in: *Metabolism and molecular activities of cytokinins* (Ed. J. Guern and C. Péaud Lenoël), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 39.- Laemmlı, U. K., (1970), *Nature* 227, p. 680.
- 40.- Lang, A., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, p. 357.
- 41.- Lanzillo, J. J., Stevens, J. and Fanburg, B. L., (1980), *Electrophoresis* 1, p. 180.
- 42.- Lieberman, L., (1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, p. 353.
- 43.- Lona, F., (1956), L'acide gibberellico determina la germinazione dei semi di *Lactuca scariola* in fase di scoto inibizione, *L'ateneo parmense* 27.p.p. 641-44.
- 44.- Longo, G. P. M., Bracalle, M., Rossi, G. and Longo, C. P., (1990), Benziladenine induces the appearance of LHCP-mRNA and of the relevant protein in dark-grown excised watermelon cotyledons, *Plant Mol. Biol.* 14, p.p. 559-573.
- 45.- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., (1982), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.p. 107-108.
- 46.- Maniatis, T., Fritsch, E. M. and Sambrook, J., (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.p. 7.9-7.11.

- 47.- Marcus, A., Feeley, J. and Volcani, J., (1968), Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetic of amino acid incorporation, ribosome activation and polysome formation. *Plant Physiol.* 41, p.p. 1167-72.
- 48.- Matz, A. S., (1969), *Cereal Science*, The Abid Publishing Co. Inc., London, England, p.p. 49-51.
- 49.- Mayer, A. M. and Poljakoff, A., (1975), *The germination of seeds*, 2nd Ed., Pergamon Press, p.p. 21-26.
- 50.- Mikulovich, T. P. and Kulaeva, O. N., (1977), Synthesis of DNA in isolated pumpkin cotyledons, *Fiziol. Rast.* 24, p.p. 521-27.
- 51.- Milborrow, B. V., (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, p. 259.
- 52.- Miller, C. O., Skoog, F., Okamura, F. S., Saltza, M. H., Von and Strong, F. M., Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division, *J. Am. Chem. Soc.* 79, p.p. 1345-50.
- 53.- Citado en Miranda Ham, María de Lourdes, (1984), Estudio sobre la síntesis de ADN en la germinación de maíz, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 54.- Muñoz, J. L., Martín, L., Nicolás, G. and Villalobos, N., (1990), Influence of Endogenous Cytokinins on Reverse Mobilization in Cotyledons of *Cicer arctictinum* L., *Plant Physiol.* 93, p.p. 1011-16.
- 55.- Naito Kumihiko, Tsuji Hideo and Hatekeyama Isao, (1978), Effect of BA on DNA, RNA, protein, and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to BA according to leaf age, *Physiol. Plant* 43, p.p. 367-71.
- 56.- Nishinari Noriko and Syono Kunihiro, (1986), Induction of cell division synchrony and variation of cytokinin contents through the cell cycle in tobacco cultured cells, *Plant Cell Physiol.* 27, p.p. 147-53.
- 57.- Osborne, D. J., (1983), Biochemical control systems operating in the early hours of the germination, *Can. J. Bot.* 61, p.p. 3568-77.
- 58.- Parenjothy, K. and Wareing, P. F., (1971), The effects of ABA, kinetin and 5-fluorouracil on RNA and protein synthesis in senescencing radish leaf discs, *Planta* 99, p.p. 112-19.
- 59.- Patau, K., Das, N. K. and Skoog, F. (1957), Induction of DNA synthesis by kinetin and indolacetic acid in excised tobacco pith tissue, *Physiol. Plant* 10, p.p. 949-66.

80.- Phillips, R. and Torre, J. G., (1973), DNA synthesis, cell division and specific cytodifferentiation in cultured pea root cortical explants, *Dev. Biol.* 31, p.p. 336-47.

81.- Quatrano, R. S., (1987a) en *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, p. 494, (Ed. P. J. Davies), Nijhoff, Dordrecht.

82.- Reyes, J., (1988), Estimulación de la síntesis de DNA durante las primeras horas de la germinación de *Zea maíz L.* por Benzil-adenina, tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

83.- Reyes Jiménez, J., Jiménez García, L. F., González, M. A. and Vázquez Ramos, J. M., (1991), Benziladenine Stimulation of Nuclear DNA Synthesis and Cell Division in Germinating Maize, *Seed Science Research*, in press.

84.- Sen, S. and Osborne, D. J., (1978), Early ribonucleic acid synthesis during the germination of Rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis, *Biochem. J.* 148, p.p. 381-87.

85.- Skoog, F. and Miller, D. O., (1957), Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro, *Symp. Exp. Biol.* 11, p.p. 118-31.

86.- Splinder, S., Siebert, P., Coffman, F. and Jurnak, F., (1984), Isolation of Biologically Active mRNA, *Biochem. Ed.* 12, p.p. 22-25.

87.- Sussex Ian, Clutter Mary and Walbot Virginia, (1975), BA reversal of ABA inhibition of growth and RNA synthesis in germinating bean axes, *Plant Physiol.* 56, p.p. 575-78.

88.- Simpson, S. F. and Torrey, J. G., (1977), Hormonal control of deoxyribonucleic acid and protein synthesis in pea root cortical explants, *Plant Physiol.* 59, p.p. 4-9.

89.- Taylor, B. and Powell, A., (1982), Isolation of Plant DNA and RNA, *Focus* 4, p.p. 4-5.

90.- Tepfer, D. A. and Foslet, D. E., (1978), Hormone-mediated translation control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max*, *Devel. Biol.* 62, p.p. 486-97.

91.- Tetley, R. N. and Thimann, K. V., (1974), The metabolism of the oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins, *Plant Physiol.* 54, p.p. 859-62.

92.- Thomas, T. H., (1977), in *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, p. 111 (Ed. A. A. Khan), North-Holland, Amsterdam.

- 73.- Tsuji, H., Naito, K., Hatakeyama, I. and Ueda, K., (1979), BA-induced increase in DNA content per cell, chloroplast size, and chloroplast number per cell in intact bean leaves, *J. Exp. Bot.* 30, p.p. 1145-51.
- 74.- Trewavas, A., (1970), The turnover of nucleic acids in *Lemna minor*, *Plant Cell and Env.* 45, p.p. 742-51.
- 75.- Trewavas, A., (1982), *Physiol. plant* 55, p. 60.
- 74.- Varnell, R. J. and Vasil, I. K., (1978), Experimental studies of the shoot apical meristem of seed plants. II. Morphological and cytochemical effects of kinetin applied to the exposed meristem of *Pinus elliotti*, *Amer. J. Bot.* 65, p.p. 47-49.
- 76.- Van Staden, J., Davey, J. E. and Brown, N. A. C., (1982), in *The Physiology and Biochemistry of seed Development Dormancy and germination*, p. 137 (Ed. A. A. Khan), Elsevier Biomedical Press.
- 77.- Vázquez-Ramos, J. M. and Reyes, J., (1990), Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by Benzyladenine during early germination of maize axes, *Canadian J. Bot.*, p.p.
- 78.- Walbot, V., Clutter, M. and Sussex, I., (1975), Effects of abscisic acid on growth, RNA metabolism and respiration in germinating bean axes, *Plant Physiol.* 56, p.p. 570-74.
- 79.- Walton, D. C., Soofi, G. and Sondheimer, E., (1970), The effect of abscisic acid on growth and nucleic acid synthesis in excised embryonic bean axes, *Plant Physiol.* 45, p.p. 37-40.
- 80.- Walton, D. C., (1980/81), *Is. J. Bot.* 29, p. 168.
- 81.- Weier, E. T., Stocking, R. C. y Barbour, G. M., (1979), *Botánica*, Ed. LIMUSA, México, p.p. 328-29.
- 82.- Yokoyama, M., Naito, K. and Suzuki, H., (1980), Effects of BA on chlorophyll, DNA, RNA and protein content of attached young bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves, *Ann. Bot.* 45, p.p. 549-53.
- 83.- Yokoyama, M., Naito, K. and Suzuki, H., (1981), BA enhanced cell proliferation and suppressed greening in attached young bean leaves. *Plant Cell Physiol.* 22, p.p. 823-27.
- 84.- Zarafin, H. M., Bernal-Lugo, I. and Vázquez-Ramos, J. M., (1988), Effect of Benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes, *Mut. Res.* 181, p.p. 103-110.
- 85.- Zwar, J. A., (1973), Effect of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith, *J. Exp. Bot.* 24, p.p. 701-10.