



31  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL 2,4-D SOBRE EL METABOLISMO DEL  
ARN POLISOMAL CITOPLASMATICO EN  
COLEOPTILO DE TRIGO.

149

T E S I S

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
p r e s e n t a :

MARIA BENITA LEONOR FERNANDEZ SALGADO

México, D. F.

1976



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CLAS 4  
ABS 10515 149  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC 1976  
1 \_\_\_\_\_



QUINQUA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Dra. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.  
VOCAL: Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA.  
SECRETARIO: M.C. VICTORIA VALLES.  
1er. SUPLENTE: Dra. ANGELINA QUINTERO.  
2o. SUPLENTE: Dr. BLAS LOTINA HENSEN.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA U.N.A.M.

SUSTENTANTE: MARIA BENITA LENOR FERNANDEZ SALGADO.

ASESOR DEL TEMA: Dra. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.

## C O N T E N I D O

### I.-OBJETIVO.

### II.-INTRODUCCION.

- A) La célula vegetal.
- B) Efecto de la luz en la germinación.
- C) Hormonas vegetales:
  - 1) Auxinas
  - 2) Giberelinas
  - 3) Citoquininas
  - 4) Inhibidores del crecimiento:
    - a) Ac.abscísico.
    - b) Etileno.
- D) Modo de acción de las auxinas.
- E) Efecto de las auxinas sobre el metabolismo del ARN.

### III.-MATERIALES Y METODOS.

- A) Materiales:
  - a) Reactivos
  - b) Material especial
  - c) Aparatos
  - d) Preparación de reactivos
- B) Métodos
  - a) Preparación e incubación del tejido.
  - b) Bioensayo para encontrar concentración óptima de 2,4-D
  - c) Obtención de polisomas de coleóptilo de trigo.
  - d) Obtención del ARN polisomal.
  - e) Determinación de Radioactividad.
  - f) Determinación espectrofotométrica del ARN.

- g) Radioactividad específica del ARN.
- h) Análisis electroforético del ARN.
- i) Hidrólisis enzimática del ARN polisomal
- j) Electrotroforesis del hidrolisado de ARN.

#### IV.-RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES.

##### A) Resultados:

- a) Concentración óptima de 2,4-D
- b) Incorporación del precursor marcado al ARN.
- c) Obtención de ARN polisomal de tejido incubado en presencia y en ausencia de 2,4-D utilizando adenina- $H^3$ .
- d) Obtención de ARN polisomal de tejido incubado con y sin 2,4-D en presencia de A- $H^3$ .  
(experimento 3)
- e) Obtención de ARN polisomal de tejido incubado en presencia y en ausencia de 2,4-D y utilizando como precursor marcado, uridina- $C^{14}$ .
- f) Hidrólisis de los diferentes ARN's obtenidos usando una mezcla de ribonucleasas.

##### B) Discusión.

##### C) Conclusiones.

#### V.-BIBLIOGRAFIA

## I.-OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el de saber el efecto que presenta el 2,4-D sobre el contenido y metabolismo de la fracción de ARN polisomal en coleóptilo de trigo.

Se ha reportado que dicho efecto es el de incrementar el contenido de ARN total cuando los experimentos se realizan, a concentraciones de 2,4-D óptimas para el crecimiento y en períodos de incubación largos.

Los trabajos reportados sobre este tema emplean tejidos, condiciones y tiempos de incubación diferentes, por lo que consideramos necesario realizar estudios básicos -- sobre el efecto del 2,4-D durante las primeras etapas de -- de incubación y de esta manera, saber que tipos de ARN's -- son estimulados por éste.

Basándose en trabajos reportados sobre este tema se pensó que también en este tejido se obtendría un aumento de la cantidad de ARN polisomal por efecto del 2,4-D. - En un experimento preliminar realizado en 5 hrs. de incubación, se obtuvo ARN polisomal marcado en todas sus especies por lo tanto, para los subsiguientes experimentos se decidió usar un tiempo de incubación más corto a fin de localizar aquella fracción del ARN polisomal que se marca preferentemente en las primeras horas, por acción de la auxina.

Para diferenciar el efecto producido por el 2,4-D sobre la fracción de ARNm se utilizaran como precursores -- marcados Adenina y Uridina.

## II.-INTRODUCCION.

A) LA CELULA VEGETAL.- La estructura celular se conoce desde hace más de tres siglos, los primeros en su conocimiento Robert Hooke en 1665, Matthius Jacob Schleiden y Theodor Schwann en 1838 formularon lo que conocemos en la actualidad como teoría celular.

En el reino animal y en el vegetal la estructura celular es básicamente la misma. En la fig.1 se muestra un esquema de las principales estructuras que integran una célula vegetal.

PARED CELULAR: una de las diferencias entre una célula vegetal y una animal es la presencia en la primera de una pared rígida y porosa que rodea y encierra al protoplasto.

Usualmente la pared celular está estructurada por tres niveles diferentes:

Lamela media que actúa como matriz intercelular y mantiene unidas a las células. Está compuesta principalmente por sustancias pépticas como el ácido péptico, calcio, lignina y suberina.

Pared primaria es la primera que se forma en una célula en desarrollo y mientras la célula está aún en proceso de crecimiento y elongación. Químicamente está compuesta de celulosa y varios polisacáridos no celulósicos llamados hemicelulosas, sustancias pépticas y pequeñas cantidades de proteínas y lípidos. Las proporciones de los diferentes azúcares son constantes y características para una especie vegetal dada. Es capaz de variar en grosor de acuerdo al estado



metabólico de la célula.

Pared secundaria se forma dentro de la pared primaria cuando la célula se ha elongado al máximo. Frecuentemente es más rígida y más gruesa que la pared primaria pero no todas las células la tienen.

La parte que queda dentro de la pared celular se le llama protoplasto, consiste del protoplasma y en la mayoría de las células vegetales, de una vacuola.

Una parte del protoplasma es el núcleo, dentro del citoplasma se encuentran diferentes estructuras como son: retículo endoplásmico, dictiosomas, ribosomas, esferosomas, lisosomas, plástidos, mitocondrias, microcuerpos y microtúbulos.

Los dictiosomas son activos en la elaboración, secreción y almacenamiento de varios productos metabólicos.

La presencia de los lisosomas no se ha confirmado como una característica universal de la célula vegetal. Estos organelos se encuentran ampliamente distribuidos en las células animales y se han descubierto en las vegetales unos cuernos similares que contienen muchas clases de enzimas hidrolíticas diferentes tales como desoxiribonucleasas, ribonucleasas, fosfatasas, proteasas, etc.

La mayoría de las células vegetales contienen plástidos, los cuales se han clasificado, en base a su color en tres grupos principales:

Plástidos verdes o cloroplastos, plástidos amarillos o cromoplastos y plástidos incoloros o leuoplastos.

Las células jóvenes que se dividen rápidamente, contienen plástidos pequeños que son precursores de los cromoplastos, cloroplastos y leucoplastos.

El núcleo es una estructura de aproximadamente 5 micras de diámetro envuelto en una membrana nuclear y rodeado por el citoplasma. Contiene el nucleolo y es el sitio en donde se sintetizan los ribosomas. El núcleo contiene además la información genética de la célula.

Una célula vegetal completamente desarrollada contiene una vacuola separada del citoplasma por una membrana llamada tonoplasto. En las células jóvenes las vacuolas existen en forma de pequeñas unidades dispersas. En el proceso de crecimiento, las vacuolas aumentan de volumen, se fusionan y forman una sola estructura que puede ocupar hasta el 95% del volumen celular.

La vacuola contiene diferentes sustancias que pueden ser: sales inorgánicas, antocianinas rojas y azules, ácidos orgánicos, aminoácidos, grasas, aceites, taninos, proteínas, etc.

Los componentes vacuolares frecuentemente representan alimentos de reserva. Recientemente se ha demostrado que contienen proteínas enzimáticamente activas.

En la Tabla I se muestra un cuadro simplificado de los componentes de una célula vegetal.

Esquema general de una célula vegetal.

A) Pared celular.

B) Protoplasto:

1.-Partes protoplásmicas:

a) Citoplasma:

- (1) Membrana citoplásmica ( plasmalema )
- (2) Membrana vacuolar ( tonoplasto )
- (3) Retículo endoplásmico
- (4) Aparato de Golgi ( dictiosomas )
- (5) Ribosomas
- (6) Lisosomas
- (7) Microcuerpos o peroxisomas
- (8) Hialoplasma

b) Mitocondria.

c) Plástidos:

- (1) Proplástidos
- (2) Cloroplastos
- (3) Leucoplastos
- (4) Cromoplastos

d) Núcleo:

- (1) Membrana nuclear
- (2) Cromatina
- (3) Nucleolo

2.-Partes no protoplásmicas:

a) Vacuolas

b) Sustancias ergásticas:

- (1) Cristales
- (2) Taninos
- (3) Grasas y aceites
- (4) Granos de almidón
- (5) Cuerpos proteicos

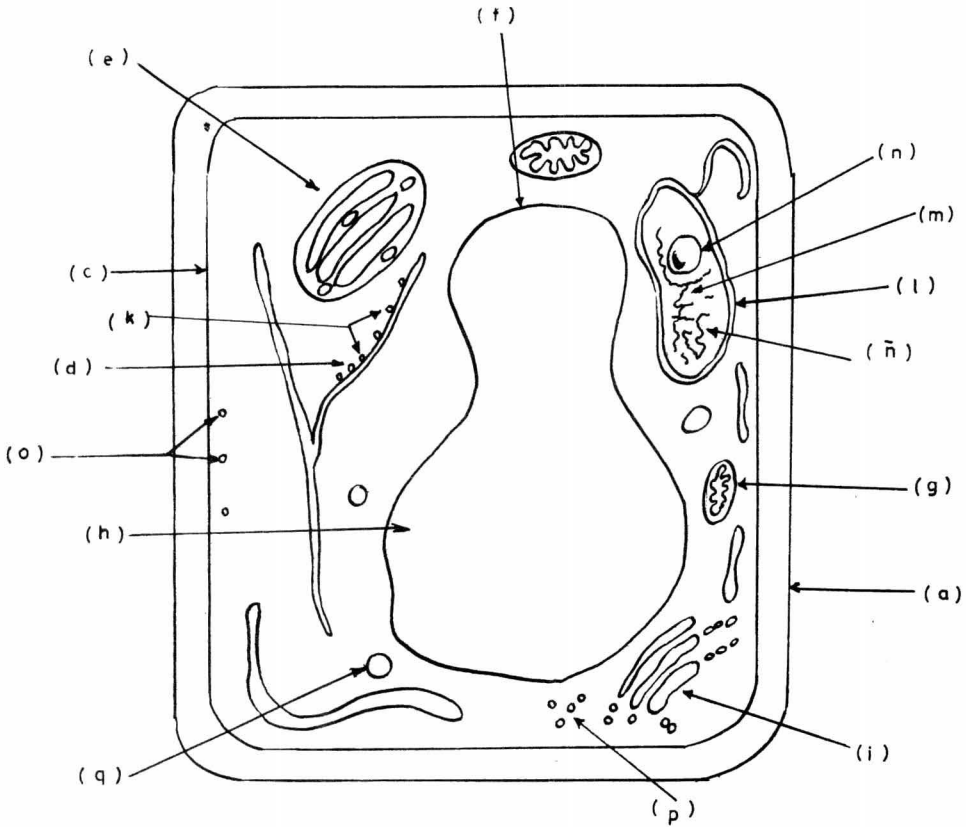


Fig.1., Célula vegetal. a)pared primaria, b)lamela media, c)plasmalema, d)retículo endoplásmico, e)cloroplastos, f)tonoplasto, g)mitocondria, h)vacuola, i)dictiosoma, j)hialoplasma, k)Ribosoma, l)membrana nuclear, m)cromatina, n)nucleolo, ñ)núcleo, o)microtúbulos, p)granos de almidón, q)esferoplasto.

## B) GERMINACION, EFECTO DE LA LUZ.

La germinación de una semilla y el crecimiento subsecuente de la plántula depende de las reservas alimenticias que se encuentran en los sitios de almacenamiento (endospermo y cotiledones). La utilización de estas reservas depende a su vez de mecanismos que produzcan una transformación adecuada de los productos de reserva a una forma, que pueda ser utilizada y transportada a las regiones de crecimiento de la plántula.

Esta movilización se debe en parte y principalmente a la acción en los tejidos de almacenamiento de enzimas hidrolíticas como las amilasas, proteasas, nucleasas y lipasas.

Los estudios realizados sobre germinación en ciertas semillas como la cebada y el arroz, indican que la inducción de la formación de ciertas enzimas durante la germinación está controlada por hormonas. El ejemplo más estudiado es el de la síntesis de la amilasa y de otras hidrolasas -- inducidas por el ácido giberélico durante la germinación de cereales.

Estas enzimas son sintetizadas por una capa especial de células llamada el tejido de aleurona que se encuentra en los tejidos de las gramíneas. El tejido de aleurona de la cebada es un tejido que consiste de tres capas de células homogéneas que no se dividen. Estas células responden al ácido giberélico, el cual se forma en el embrión durante las primeras etapas de la germinación, con una serie de cambios bioquímicos y morfológicos siendo el más predominante el au

mento de la actividad de la alfa amilasa y el de proteasas.

Este aumento, se ha encontrado, que es debido a la síntesis de novo de esas enzimas y la mayoría se secretan al endospermo después de su síntesis. (4,5,6)

En las semillas de trigo, el endospermo parece jugar un papel muy importante en la inducción de las enzimas hidrolíticas en el tejido de aleurona. En esta semilla el ácido giberélico no induce la síntesis de alfa amilasa en el tejido de aleurona separado del endospermo, al menos que se suministre una citoquinina antes de aplicar el ácido giberélico. Esto se debe quizás, a que en el endospermo se forman citoquininas que actúan sobre el tejido de aleurona sensibilizando a las células para reaccionar con el ácido giberélico que llega del embrión (7).

#### EFEECTO DE LA LUZ

En muchas semillas, tomando como ejemplo el de la semilla de la lechuga, la germinación es inducida por la luz.

Esta respuesta es más sensible a la luz roja mientras que la luz rojo lejano, aplicada después de un tratamiento con luz blanca o roja invierte el efecto e impide la germinación. Generalmente, las semillas pequeñas requieren de luz para su germinación. Seguramente su valor consiste en impedir que la semilla germine cuando está demasiado enterrada para poder llegar a ser una plántula que se pueda desarrollar. La acción inhibitoria de la luz rojo lejano en la germinación de las semillas puede tener una utilidad de adaptación para las plantas.

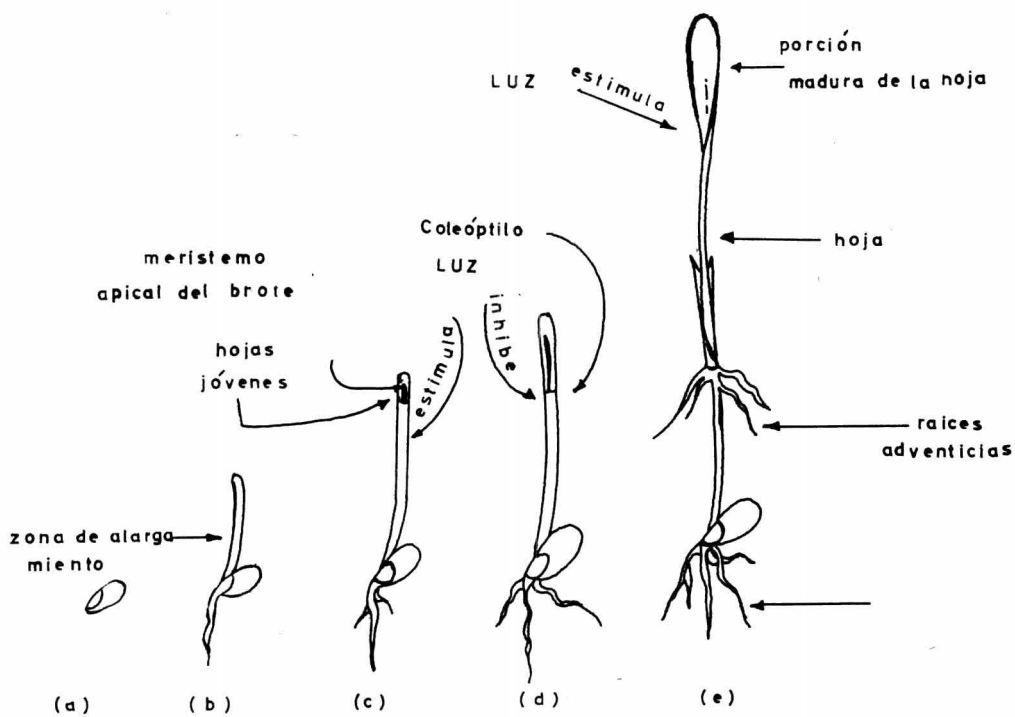
Cuando las semillas que requieren luz son iluminadas con la luz solar que ha pasado a través de hojas verdes, se inhibe su germinación porque el componente rojo de la luz solar ha sido eliminado al ser absorbido por la clorofila pasando solamente el componente rojo lejano.

El proceso de germinación involucra ciertos tipos de comportamiento muy interesantes controlados por la luz que ayudan a resolver los problemas que tiene el brote joven - para salir a la superficie del suelo.

La respuesta de ahilamiento (los entrenudos se alargan más de lo normal) controlada por el fitocromo sirve para asegurar que los brotes de las semillas que germinan a cierta distancia del suelo, se alarguen con rapidez y que la expansión de las hojas solo se efectúe cuando ya hayan salido a la luz.

El coleóptilo en forma de bala encierra a las hojas jóvenes y al meristemo apical del brote, sirve como un escudo y un taladro para abrir el camino hacia la superficie y permitir la expansión de las hojas las cuales son demasiado delicadas para forzar directamente su salida a través del suelo. Si la semilla germina bien bajo la superficie del suelo, primero se alarga el tallo que está debajo del coleóptilo, empujándolo hacia arriba junto con el brote que encierra.

El crecimiento del tallo es tan sensible a la luz que la luz tenue que penetra a cierta distancia de la superficie detiene el alargamiento del tallo cuando el coleóptilo no ha llegado todavía a la superficie. Sin embargo, esta luz estimula la elongación del coleóptilo el cual perfora la distancia que falta. Al llegar a la superficie deja de crecer y emerge la primera hoja que se desenrolla por la ac--



**Figura. 2** Secuencia que muestra los pasos progresivos en la germinación de una semilla de trigo.



ción de la luz y controlada por el fitocromo.(fig.2)

En el tallo se forman raíces adventicias justamente -  
por abajo del nivel del ápice del brote y de esta manera, es  
tas respuestas a la luz fijan la posición de los sistemas -  
de la raíz y ápice de la planta en forma adecuada con rela-  
ción al suelo.

La luz roja se ha usado en experimentos con hormonas  
vegetales para inhibir el desarrollo del mesocotilo o para  
llevar a cabo ciertas manipulaciones al trabajar con hormo-  
nas tales como las auxinas.

En cuanto al efecto de la luz roja sobre el coleóptilo  
de trigo, las evidencias sugieren que el efecto depende -  
de la parte de coleóptilo que se tome para la prueba (8,9,  
10,11).

### C) HORMONAS VEGETALES

El desarrollo de las plantas no se lleva a cabo en una  
forma desorganizada o al azar sino por el contrario, exis  
te una regulación precisa del crecimiento y la diferenciaci-  
ón. El control normal del desarrollo de una planta se lleva -  
a cabo por medio de pequeñas cantidades de sustancias espe-  
cíficas usualmente llamadas "hormonas vegetales".

Las hormonas, tanto animales como vegetales, son sinte-  
tizadas en tejidos particulares y trasportadas en cantidades  
muy pequeñas a otras regiones del organismo en donde llevan  
a cabo cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos.

En las plantas, las hormonas del crecimiento son importantes en la coordinación e integración del desarrollo de diferentes partes de la planta. Sirven como mensajeros químicos o señales que pasan de una célula a otra sirviendo como medio de comunicación.

Las hormonas del crecimiento juegan un papel muy importante en el control interno del desarrollo, interaccionando con procesos metabólicos clave tales como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

Los efectos del medio ambiente externo sobre el desarrollo están mediados, aparentemente, por alteraciones en la concentración de hormonas y su distribución dentro de la planta.

Las hormonas no solo necesitan estar presentes para que se lleve a cabo el desarrollo sino que deben existir en la cantidad, lugar y tiempo adecuados. Esto significa que la velocidad de síntesis de la hormona está controlada así como su translocación y que su concentración esta regulada por mecanismos de inactivación.

Los estudios en la química y fisiología de las hormonas vegetales proponen que en las plantas superiores existen cinco tipos de hormonas del crecimiento, estas son: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Las tres primeras favorecen el crecimiento mientras que las dos últimas lo inhiben.

Las interacciones de estas hormonas pueden presentar un efecto totalmente diferente al observado al probar cada una de ellas por separado.

	preparación	RESPUESTA	relación entre resp. y conc.
curvatura del coleóptilo.			
elongación del coleóptilo.			
crecimiento del primer internodo de la avena.			
prueba del epicótilo hendido del chícharo.			
inhibición del crecimiento de la raíz.			

**Fig. 3** Principales bioensayos utilizados para determinar y cuantificar auxinas. a) Prueba de la curvatura del coleóptilo de centeno, b) elongación del coleóptilo de avena, c) crecimiento del primer internodo de la avena, d) P. del epicótilo hendido del chícharo, y e) Inhibición del crecimiento de la raíz.

Como se mencionó anteriormente la primera auxina identificada fué el ácido indol acético y a partir de esta fecha se descubrieron otras sustancias relacionadas que tenían actividad. Actualmente se conocen muchas sustancias de estructura molecular diferente, como el grupo de los fenoxiácidos, que tienen un efecto fisiológico similar. En la fig. 4 se ilustran algunos derivados indólicos encontrados en plantas los cuales presentan actividad de auxinas.

#### b) Biosíntesis del ácido indol acético (AIA)

Las evidencias sugieren que el triptofano es el precursor del AIA ( 14 ). Al observar cultivos de Rhizopus suinus se descubrió que formaban AIA cuando se agregaba triptofano al medio y en experimentos in vivo se demostró la conversión de triptofano marcado con  $C^{14}$  a ácido indol acético- $C^{14}$ . Este hecho no fué muy aceptado por la contaminación del cultivo con diferentes microorganismos.

Black y Hamilton, trabajando con coleóptilos estériles de avena y con plantas de chícharo demostraron que en estos tejidos el triptofano es el precursor del AIA (15).

Wightman (16), utilizando triptofano marcado, brotes de jitomate y extractos de tejidos, demostró que las enzimas para la conversión del triptofano a AIA se encontraban en los extractos. La conversión la llevan a cabo por medio de la ruta metabólica del indol-piruvato y por el de la triptamina, fig. 5 Ambos caminos metabólicos funcionan in vivo, siendo el del indolpiruvato el más importante. (17)

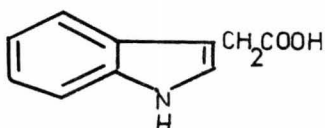
Sheldrade y Northcote muestran que las hojas jóvenes -

son los sitios más activos en la síntesis del AIA a partir del triptofano. Sin embargo, las hojas ya maduras también pueden sintetizarlo (18).

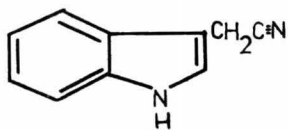
### c) Oxidación del AIA

El ácido indol acético se oxida in vivo en una serie de compuestos, siendo el más importante, el metilén oxindol.

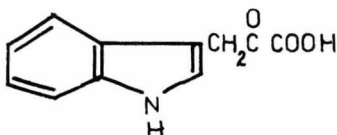
La oxidación está catalizada por varias isoenzimas - de la peroxidasa y aparentemente, por las oxidasas del AIA - que no presentan actividad de peroxidasa (19).



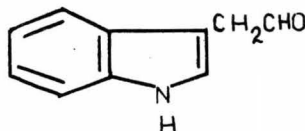
Ac. Indol-3-acético  
(AIA)



Indol-3-acetonitrilo



Indol-3-pirúvico



Indol-3-acetaldehído  
(IAAlD)

Figura:4 Compuestos indólicos naturales encontrados en plantas.

Estas reacciones de oxidación tienen interés desde el punto de vista de control de la actividad biológica del AIA ya sea destruyendo la forma activa o produciéndola (21,22).

La idea de que la oxidasa del ácido indol acético es importante in vivo para controlar la concentración del AIA, permite la posibilidad de encontrar inhibidores y tales inhibidores se han reportado (23).

d) Respuestas fisiológicas de los tejidos vegetales a las auxinas.

El efecto clásico de las auxinas es el de promover la elongación celular. Cualquiera que sean los sitios de acción primarios muchos de los efectos observados son probablemente secundarios a la elongación.

Para mantener la elongación celular es necesario que la célula mantenga toda su maquinaria necesaria para llevarla a cabo es decir, mecanismos de respiración, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, etc.

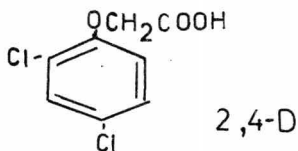
Las auxinas naturales (AIA) se producen en los brotes y son transportadas a las regiones basales por un sistema de transporte polar.

La alteración del transporte lateral está relacionada con el geotropismo y el fototropismo.

Otras de los efectos de las auxinas son: inhibición de la elongación de las raíces, inducción de la formación de raíces, diferenciación celular, respuestas trónicas, síntesis de etileno, etc., control de la abscisión de las hojas, dominancia apical, promoción de la división celular y del crecimiento de callos también favorecen el desarrollo del ovario a fruto, etc.

e) Auxinas sintéticas

Existen a la fecha numerosos compuestos químicos artificiales que presentan diferentes efectos dependiendo de la concentración a la cual se utilizan. A este tipo de compuestos pertenece el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) que presenta dos efectos totalmente diferentes: uno de herbicida y otro de auxina.



Generalmente, para saber si un compuesto determinado, presenta actividad de auxina, se utilizan los bioensayos ya mencionados para las auxinas naturales.

Se usan otras respuestas de las plantas como son: formación de raíces, de flores, abscisión de las hojas o estimulación de la división celular.

El metabolismo de estas auxinas sintéticas (2,4-D) no está completamente estudiado, el mecanismo más aceptado es el de la oxidación de la cadena lateral vía Beta-oxidación como se muestra en la fig.6

Las auxinas sintéticas (También llamadas auxinas-herbicidas) pueden actuar sobre las plantas a diferentes niveles como son: división celular, elongación, diferenciación y germinación. El efecto de estos compuestos sobre la división celular es una de las principales características.

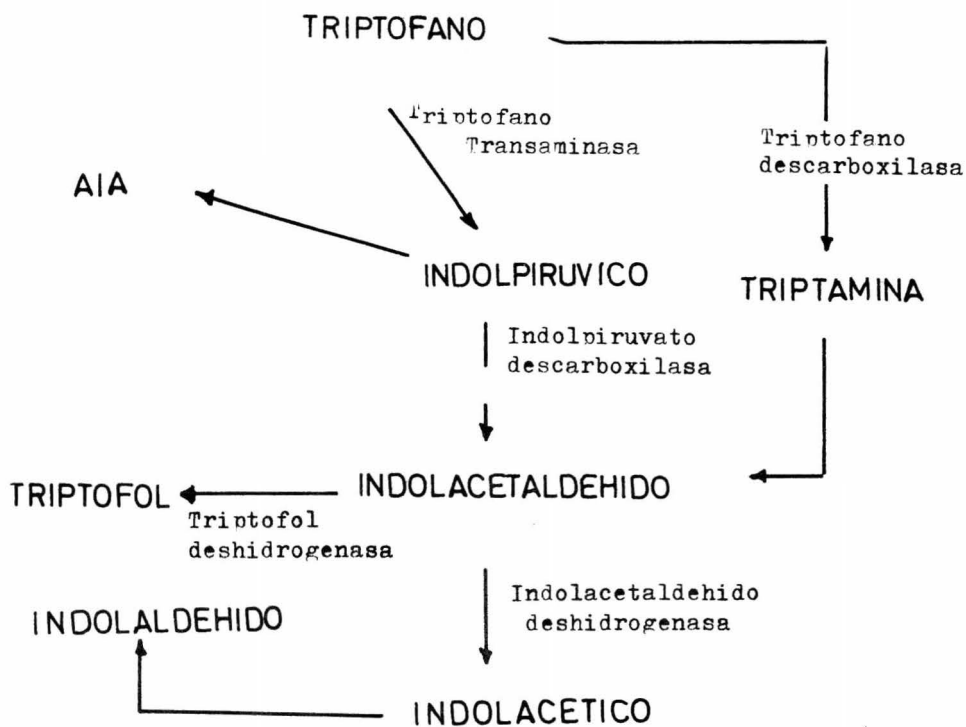


Figura: 5 Ruta biosintética probable para la síntesis de AIA en brotes de jitomate (20)

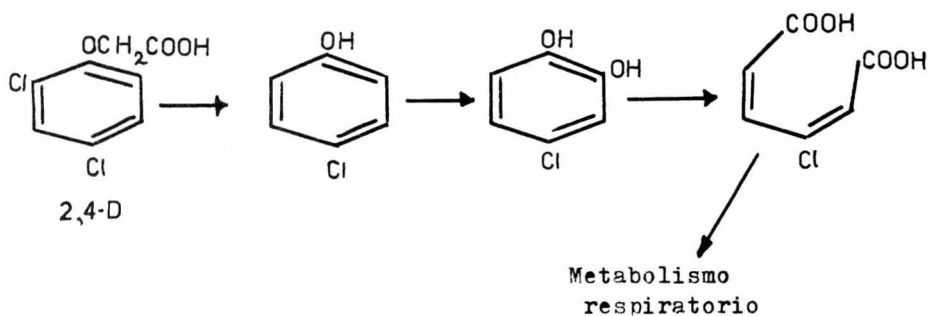


Figura: 6 Metabolismo del 2,4-D en las plantas (24)



Es probable que el efecto tóxico principal dependa de la alteración de la división celular, este efecto, difiere de tejido a tejido.

El efecto en la raíz es diferente ya que las auxinas naturales (AIA), a concentraciones en las cuales se favorece la elongación del brote, inhiben la elongación de la raíz pero si se usan soluciones mucho más diluidas la elongación de las raíces también se altera. Los herbicidas, sin embargo, a cualquier concentración inhiben su elongación.

Otro efecto producido por el 2,4-D y otros herbicidas son el encurvamiento de tallos y hojas lo cual se conoce como respuestas epinásticas y frecuentemente son causadas por un crecimiento muy acelerado de las células.

En relación a las respuestas fototrópicas, se ha encontrado que el 2,4-D presenta inhibición en las pruebas de -- curvatura.

La diferenciación celular, que representa el último -- paso del crecimiento, se ve afectada por estos compuestos.

Este efecto se ve restringido a células en desarrollo. Las auxinas inhiben marcadamente la germinación debido, probablemente al efecto de inhibición de la raíz. A semejanza de las auxinas naturales, los herbicidas-auxina inhiben la germinación de la semilla (24).

## 2.-GIBERELINAS:

Las hormonas vegetales llamadas giberelinas son un -

grupo de compuestos que presentan propiedades tales como la de promover el crecimiento. En determinados efectos son similares a las auxinas pero en otros son totalmente diferentes.

Las giberelinas están químicamente muy relacionadas, se encuentran en todas las especies de gimnospermas estudiadas, en algas, angiospermas y teridifitas.

El descubrimiento de estas hormonas se inició en 1926 cuando Aurosawa, un patólogo de plantas descubre que la enfermedad del arroz conocida como "Bakanae" es producida por un hongo llamado Gibberella fujikuroi.

Investigadores japoneses, Yabuta y Sumuki principalmente, descubrieron que cuando el hongo es cultivado en un medio de cultivo adecuado, secretaba una sustancia que cuando se adicionaba a una planta de arroz inducía la misma respuesta que el hongo. En 1939 se aisló la sustancia en forma cristalina y fué llamada giberelina A.

En 1954 se aisló y purificó una sustancia del mismo hongo a la que químicos ingleses denominaron ácido giberélico.

A partir de esta fecha se hicieron numerosos estudios sobre este tipo de sustancias y tanto por las propiedades que presentaban como por ser encontradas en plantas sanas no infectadas se les consideró como otro tipo de hormonas vegetales.

Actualmente se conocen más de 45 giberelinas diferentes y se les designa, para su nomenclatura con letras y subíndices, por ejemplo: giberelina  $A_1$ , giberelina  $A_2$ , etc.

### a) Metabolismo

Las giberelinas endógenas se sintetizan, aparentemente, en las mismas regiones de la planta en donde se sintetizan las auxinas, pero no necesariamente al mismo tiempo ni a la misma velocidad. Los ápices de las raíces, embriones en desarrollo y hojas jóvenes son el sitio de síntesis de las giberelinas.

### b) Biosíntesis

Las primeras etapas en la síntesis de las giberelinas son las mismas que la de los compuestos clasificados como terpenoides. Las giberelinas están muy relacionadas con los diterpenos (20 átomos de carbono).

Los estudios en la biosíntesis de las giberelinas se llevaron a cabo en plantas superiores, principalmente en el pepino (Echinocystis macrocarpa).

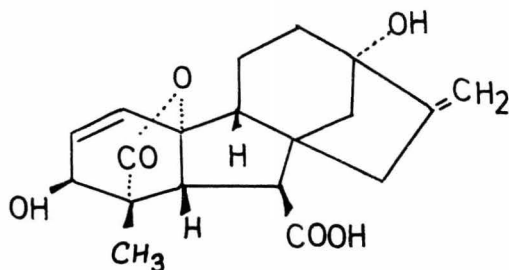
Birch (25) demostró que el acetato y el mevalonato se incorporaban al ácido giberélico, lo cual sugiere que las giberelinas se derivan de un diterpenoide tricíclico el cual es producto de la ruta del mevalonato. El primer producto cíclico es el kaureno cuyo precursor acíclico es el geranilpírofosfato y tiene como intermediario el copalilpírofosfato.

La oxidación del kaureno da origen al ácido kaurenico que es hidrolizado después en la posición 7B.

### c) Metabolismo catabólico

En la mayoría de los tejidos estudiados, una cantidad -

significativa de las giberelinas se convierten en derivados solubles en agua llamados giberelinas conjugadas. La mayoría son derivados glucosilados. Recientemente se ha reportado una unión pentídica del AG en el tejido de aleurona de la cebada.



Giberelina A<sub>3</sub> (ácido giberélico)

d) Respuestas fisiológicas

Las giberelinas son capaces de inducir el crecimiento normal en ciertas variedades enanas de chícharo y en algunas mutantes enanas de maíz.

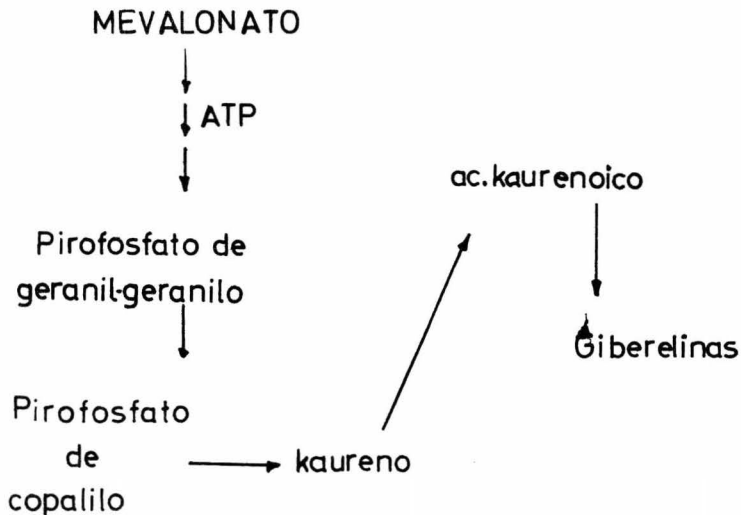
Aumentan el crecimiento por elongación en algunas plantas incluyendo el arroz, lechuga, pepino, trigo, etc.

La aplicación de ácido giberélico (AG) a plantas de día largo, estimulan la formación de flores bajo condiciones de luz no inductivas (27).

Se ha postulado que la estimulación de la floración en estas plantas es probablemente debida al efecto del AG en el crecimiento por elongación.

Además del crecimiento por elongación el AG es capaz de regular otros factores morfológicos en ciertas plantas - por ejemplo, la aplicación del AG a formas maduras de Hedera helix inducen la reversión morfológica a la forma juvenil de crecimiento (28).

El efecto del AG o de las giberelinas, que se ha estudiado más extensamente, es el de la inducción de la formación y secreción de hidrolasas en granos de cereales y especialmente en cebada.



Ruta biosintética de las giberelinas.

### 3.- CITOQUININAS

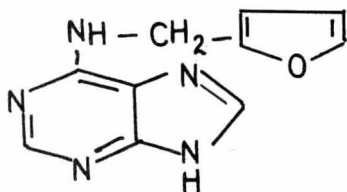
Se descubrieron como sustancias esenciales para el mantenimiento de la división celular en cultivo de tejidos vegetales, interaccionan con las auxinas determinando el patrón de diferenciación en un callo (tejido vegetal no diferenciado) (29,30).

Están involucradas en procesos fisiológicos tales como el de la dominancia apical y el de envejecimiento.

En contraste con las otras hormonas, las citoquininas son cuímicamente básicas. Las citoquininas endógenas probablemente son derivadas de la base nitrogenada, adenina.

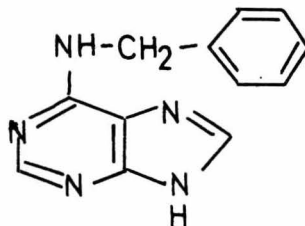
La primera citoquinina natural aislada e identificada fué la zeatina cuyo nombre cuímico es : 6-(4-hidroxi-3-metil-butil-2-enil)aminopurina (31,32,33,34).

Se piensa que las citoquininas naturales no existen en forma libre dentro de las células, ya que existe evidencia de que están normalmente unidas a una pentosa (ribosa). Algunas veces el ribósido está unido a un fosfato inorgánico formando un ribonucleótido.



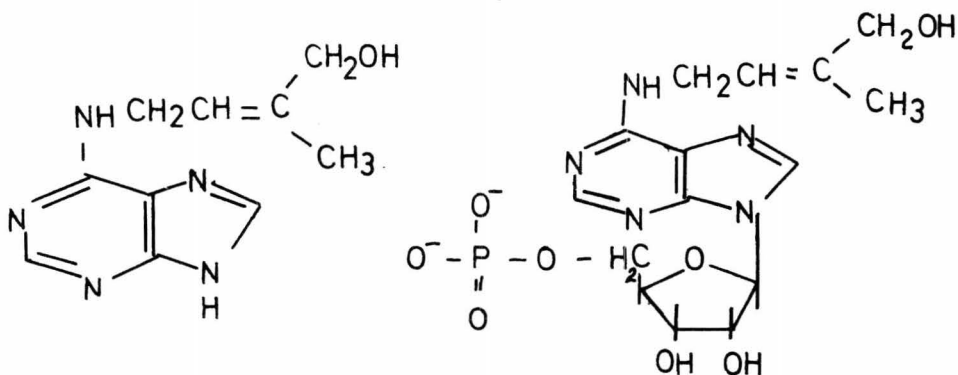
Quinetina

6-(furfurilamino)purina



Benziladenina

6-benzilaminopurina



Zeatina

Ribosil-zeatin-fosfato

#### a) Metabolismo

No se ha estudiado ampliamente el camino biosintético ni el de inactivación de las citoquininas naturales, pero se piensa que los primeros pasos en su síntesis, en plantas superiores sean los mismos que para las purinas.

#### 4) INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO:

##### a) Acido abscísico:

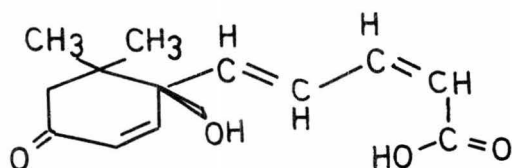
Existe desacuerdo en considerar al ácido abscísico y al etileno, como hormonas, pero la mayoría de los investigadores en este campo las consideran como tales, debido a que interactúan con las sustancias promotoras del crecimiento como -- las auxinas, giberelinas y citoquininas.

El descubrimiento del ácido abscísico fué consecuencia de los estudios realizados sobre la fisiología de la abscisión y la latencia de las yemas, durante los años 50's, pero no fué hasta el año de 1967 que se le dió el nombre de ácido abscísico, (35).

Se encuentra en muchos géneros de plantas, es un compuesto que presenta isomerismo óptico y geométrico. El ácido abscísico se encuentra siempre, en forma natural, en la forma (+), existe evidencia de que la forma "trans" no es activa.

El ácido abscísico (ABA) es un terpenoide derivado del mevalonato (36). Puede formarse como producto de degradación de la fotooxidación de la Xantofilas, como la violaxantina, uno de los principales carotenoides de las plantas. (37)

En la fig.7 se muestra el esquema de la biosíntesis del ABA y en la figura 8, su metabolismo.



Ac. 2- cis - abscísico.

El ABA es un inhibidor efectivo de la germinación de determinadas semillas (38,39), acelera la caída del fruto, (40), su nivel aumenta cuando la planta está sujeta a deficiencia de agua, puede invertir el efecto del AG en la síntesis de amilasas y proteasas, interviene en los procesos de envejecimiento de la planta, etc. (41,42,43,44,45,)

## B) ETILENO

Por su naturaleza física, existen muchos problemas para llegar a conocer el movimiento y control de esta sustancia dentro de la célula vegetal. Sin embargo, a las concentraciones tan bajas a las que se encuentra, está en la fase acuosa del -



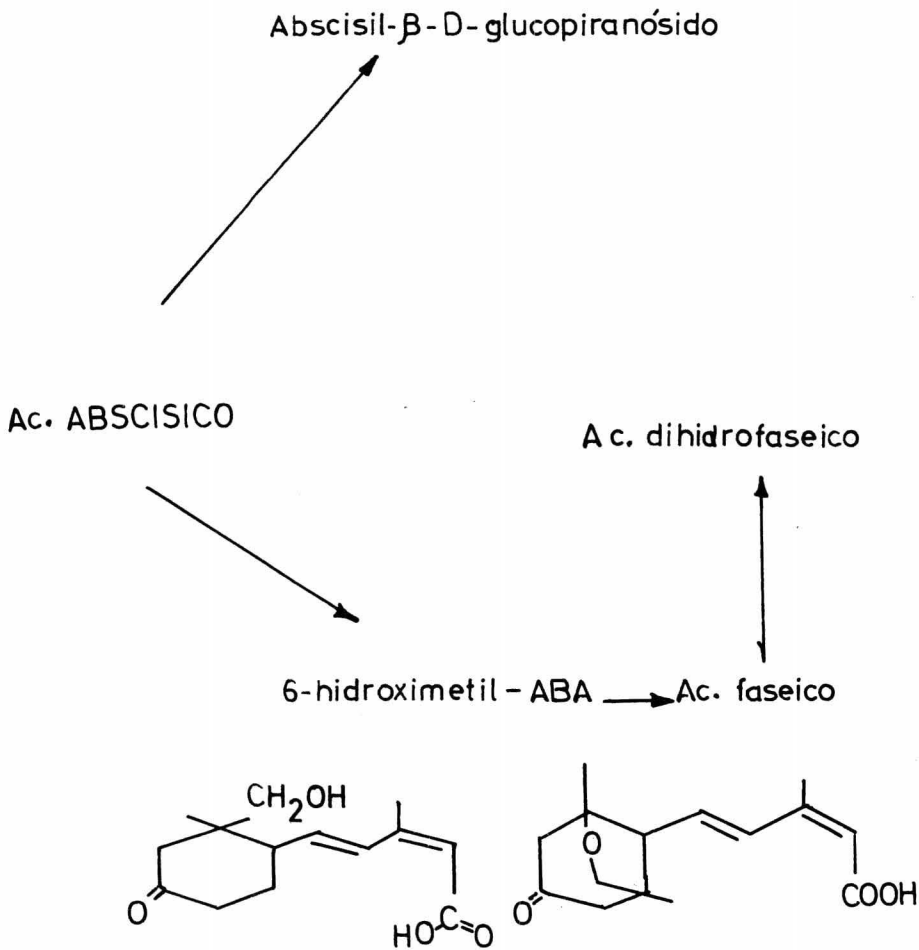


Figura 8 Metabolismo del ácido abscísico. (46,47)

citoplasma y pared celulares. La concentración de etileno - necesaria para producir un efecto fisiológico es del orden de 0.06 ug/l .

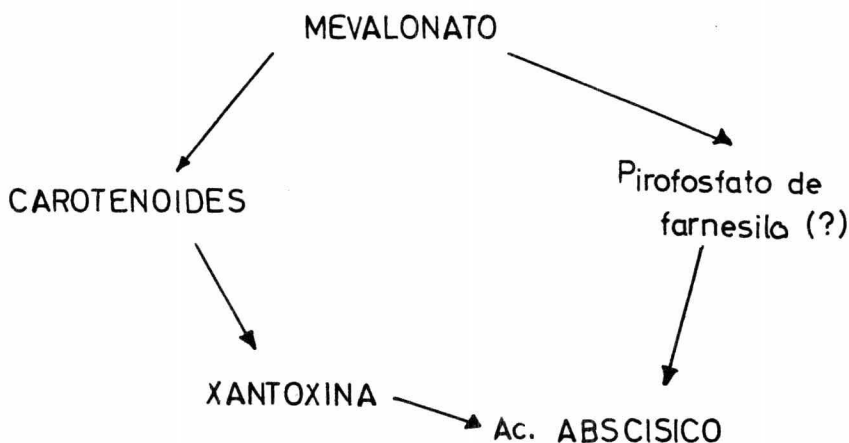


Figura : 7 · Biosíntesis del ácido abscísico, (48,49,50,51).

En las plantas superiores, se considera como precursor del etileno a la metionina.

Adicionando metionina marcada con  $C^{14}$  en varias posiciones, a rebanadas de manzana, se demostró (52,53) que el  $C_1$  se convertía a  $CO_2$ , el  $C_2$  a varios metabolitos,  $C_3$  y  $C_4$  formaban etileno y el metilo y el azufre aparecían en la cisteína. En la fig.9 se muestra el esquema de la biosíntesis.

De los primeros efectos del etileno estudiados, fué el de la maduración del fruto. Este efecto es utilizado en la industria de los cítricos, en donde se cosechan los limones, naranjas y uvas, cuando todavía no están maduros, madurándose posteriormente en cámaras que contienen etileno.

El etileno acelera la hidrólisis del almidón a azúcares así como la hidrólisis de pectina. También acelera el cambio de color de la superficie del fruto (pericarpio). Así mismo tiene efecto en la regulación de la abscisión, epinastia, expansión lateral de las células, hipertrofia, latencia, expansión de la hoja, inducción de la floración y expresión del sexo (54).

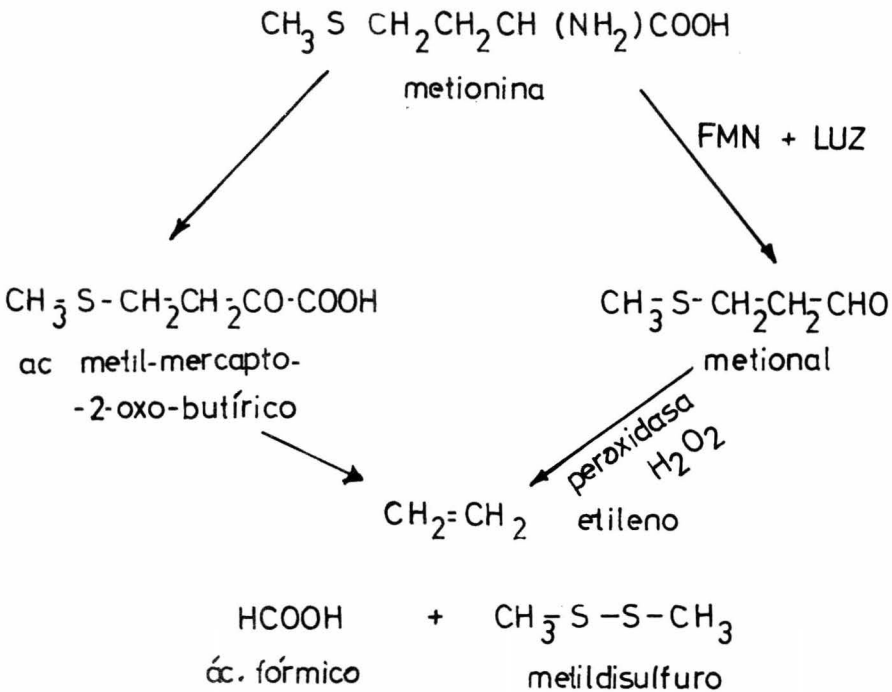


Figura:9 Posibles rutas metabólicas del etileno, (3)

#### D) MODO DE ACCION DE LAS AUXINAS

El efecto de las auxinas más estudiado, en plantas superiores, es el de elongación celular en coleóptilos y tallos de gramíneas, es por esto, que al referirnos al mecanismo de acción haremos referencia a este efecto.

Se han seguido tres caminos principales para llegar a conocer el mecanismo de acción de las auxinas así como de otras hormonas vegetales:

El primero, es el estudio de los numerosos análogos moleculares de las hormonas. Esto se ha hecho con el objeto de encontrar las características que debe reunir una molécula para presentar actividad. Tales estudios de relación estructura-actividad, nos permitirán conocer el tipo de moléculas en las células con las cuales reacciona la hormona y por medio de esto conocer el mecanismo por medio del cual interviene la hormona en la maquinaria celular.

El segundo camino, es el de examinar los cambios físicos en las células asociados con el crecimiento y relacionar estos efectos con los de las hormonas. Una parte de la célula vegetal que ha recibido atención especial es la pared celular, la razón de esto, es que para explicar el aumento en volumen de la célula, se necesita que ocurran ciertos cambios en la pared que permitan que la célula se estire.

Ya que las hormonas tienen cambios profundos sobre el metabolismo celular, el tercer camino, fué dirigido hacia los cambios bioquímicos provocados por estas.

Un efecto particular es el de distinguir entre causa y efecto. La gran multiplicidad de reacciones metabólicas inducidas o modificadas por las hormonas y la rapidez con la cual aparecen, ha provocado que la mayoría de los investigadores - en este campo traten de encontrar la "reacción maestra" entre la hormona y el receptor, por la cual se desencadenan todas - las demás reacciones y que traen como consecuencia el fenómeno observado.

La atención se ha dirigido hacia la posible interacción entre las hormonas y los ácidos nucleicos y por consiguiente síntesis de proteínas. Esto está justificado ya que el crecimiento y la diferenciación, dependen de la producción secuencial y ordenada de las proteínas.

#### E) EFECTO DE LAS AUXINAS SOBRE EL METABOLISMO DEL ARN

La primera observación de que las auxinas tenían relación con el metabolismo de los ácidos nucleicos fué hecha por Skoog en 1954, (55) trabajando con cultivos de tejido de tabaco. Bajas concentraciones de auxina favorecían la división celular mientras que altas concentraciones causaban la expansión celular y un aumento de ARN. Concentraciones más altas bloqueaban el crecimiento y la acumulación de ácidos nucleicos.

Skoog sugirió que las auxinas regulaban la relación de ácidos nucleicos en la célula y que esto determinaba el patrón de crecimiento, es decir, división o expansión celular.

A partir de estudios se ha acumulado evidencia de que -

las hormonas alteran los niveles de ácidos nucleicos en una amplia variedad de órganos y tejidos, (56,57).

El 2,4-D en concentraciones mayores de las óptimas para el crecimiento, es altamente tóxico. A estas concentraciones causa una acumulación de ácidos nucleicos y proteínas en las plantas tratadas, particularmente en las regiones en donde el 2,4-D causa el crecimiento no coordinado de las células, (58)

Se han encontrado respuestas similares, en diferentes hormonas. Se ha observado que el AG aumenta el contenido de ADN y ARN en la papa; las auxinas, citoquininas y giberelinas inhiben el proceso de envejecimiento en una gran variedad de hojas desprendidas y, al mismo tiempo, previenen la disminución de ácidos nucleicos y proteínas, (59,60,61,62).

El problema que no se ha resuelto es el de saber si estos efectos son modulaciones generales del metabolismo de los ácidos nucleicos o si son específicos para determinado proceso celular.

Se ha puesto mucha atención a los estudios del metabolismo de los ácidos nucleicos en presencia de hormonas por ejemplo: a) en la elongación del coleótilo, tallo e hipocotilo, b) crecimiento y multiplicación en cultivo de tejidos, c) envejecimiento de hojas desprendidas y d) síntesis de hidrolasas en células de aleurona aisladas.

Aquí se mencionan las evidencias que existen acerca del efecto de las auxinas sobre el metabolismo del ARN empleando coleótilos, segmentos de tallo o hipocotilos.

a) Efectos sobre transcripción (síntesis de ARN)

Se ha encontrado en muchas ocasiones, (63-69) que el crecimiento inducido por las auxinas se bloquea por inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas. Al mismo tiempo, las auxinas, incrementan la síntesis de ARN y proteínas (70-72).

Utilizando precursores marcados, se ha visto que las auxinas, a las concentraciones a las que estimulan el crecimiento, promueven la incorporación de estos precursores al ARN del hipocotilo de soya, (74): coleóptilo de trigo, (75): e-nicotilo de chícharo, (76): coleóptilo de centeno, (77,78), etc.

Estos efectos se previenen con las anti-auxinas por ejemplo el ácido trans-cinámico, (79). El ARN que se ve aumentado consiste principalmente de ARN polisomal lo que trae como resultado, un aumento de la cantidad de polisomas (80-83). Se ha observado también un aumento en la cantidad de ARNm (84-88) y ARNt (89).

El ARN adicional se encuentra primero en el nucleolo y posteriormente en el citoplasma, (81,90,91). Key y colaboradores han tratado de caracterizar que fracción del ARN se requiere para la acción de la auxina. Para este efecto, utilizaron 5-fluoruracilo, el cual reduce la formación de todas las especies de ARN menos en ARN con una relación de bases semejante al del ADN y por consiguiente ARNm, (92-95).

Se observó que el 5-fluoruracilo inhibía la síntesis de ARN pero no el crecimiento, por lo tanto, se pensó que el ARNm era el que se requería para la acción de la auxina.

El 2,4-D aumenta la síntesis de un ARN en el hipocotilo de soya, que se caracteriza por tener una secuencia rica en AMP (96-98).

Sin embargo, hay desacuerdo en cuanto a la velocidad de acción de las auxinas y la síntesis de ácidos nucleicos.

Los cambios en el contenido de ARN toman horas en hacerse aparentes (99). Sin embargo, la aceleración del crecimiento puede detectarse en unos minutos (100-102). Esto sugiere que la acción de la auxina, es una acción física inmediata (en las propiedades de la pared celular). Existen reportes en donde se señala que la incorporación de Uracilo - marcado, en el ARN, puede detectarse dentro de los 10 minutos siguientes de su aplicación, en presencia de la auxina, (103)

#### b) Auxinas y ARN polimerasa

Existe un efecto de la auxina sobre la síntesis de ARN a nivel nuclear. La cromatina aislada de tejido tratado con 2,4-D es más activa, en un sistema in vitro de síntesis de ARN, que la cromatina aislada de un tejido no tratado, (104). Este efecto parece que es por un aumento en la cantidad de ARN polimerasa y no por un aumento de la afinidad de la enzima por el ADN.

Se ha observado que la cromatina aislada, al ponerla en contacto con la auxina, no presenta un efecto diferente, mientras que si se le agrega un factor proteico, cuya estructura se desconoce, junto con la auxina, sí se ve aumentada la síntesis de ARN, (105). Al usar concentraciones saturantes de enzima, se observa el mismo efecto y se concluyó que era debido a un aumento de afinidad por el ADN, (105).

Experimentos en donde utilizan membranas citonasmáticas, han demostrado, que las membranas tienen la capacidad de incrementar la actividad de la ARN polimerasa de cromatina



de soya con o sin 2,4-D (106,107). Cuando las membranas no tratadas con la auxina, fueron centrifugadas y eliminadas de la suspensión, se perdió la capacidad de incrementar la actividad de la ARN polimerasa de la solución. Si las membranas se trataban con 2,4-D, el sobrenadante retenía la habilidad para estimular la actividad de la enzima. Se sugirió que la membrana contenía una proteína que era liberada por el 2,4-D aumentando la actividad de la ARN polimerasa, (108).

La unión del 2,4-D a proteínas se ha reportado (109) - y usando cromatografía de afinidad se ha aislado una fracción proteica la cual se une al 2,4-D y estimula la síntesis de ARN en ausencia de 2,4-D. La síntesis de ARN estimulada por el 2,4-D es sensible a alfa-amanitina, la cual actúa selectivamente sobre diferentes tipos de ARN polimerasa, particularmente la ARN polimerasa que transcribe ARNm, (110).

#### c) Unión de las auxinas a la cromatina

Se han reportado numerosos trabajos los cuales indican que las auxinas se unen a la cromatina (111-114) y a las histonas (115-116), alterando la afinidad mutua de las dos cadenas del ADN (117,118) o la unión de las histonas al ADN (111, 119), estas últimas sugerencias han sido discutidas, (120,121).

#### d) Auxinas y ribonucleasa

El tratamiento de tejidos con auxinas ha demostrado -- que presentan una *reducción en la cantidad de ribonucleasa,* -

(121,122).

El ARN obtenido de tejidos tratados con AIA es más re-sistente a la ribonucleasa, (123). La aplicación de ribonucleasas a los tejidos disminuye el crecimiento inducido por el AIA, (121,13).

Es posible que las auxinas, además de causar un incremento en la síntesis de ARN también causan una disminución del catabolismo del ARN y se ha sugerido, que el aumento en el contenido de ARN total sea debido a que disminuye el catabolismo del ARN y por consiguiente comparado con el control el ARN total sería mayor en el tejido tratado con la hormona.

#### e) Auxinas y enzimas

Independientemente de que las auxinas actúen a nivel de transcripción o de traducción, debe esperarse un cambio en el contenido de enzimas de los tejidos.

La elongación celular involucra cambios en la pared celular, por lo tanto, las enzimas que han sido más estudiadas son aquellas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos. Las enzimas y estructura de la pared celular no se conocen ampliamente, por lo tanto, son pocas las reacciones enzimáticas que se han estudiado. Se han encontrado cambios en los patrones de proteínas en tejidos tratados con auxinas, (124): aumento en la cantidad de celulasa (124-128) y hemicelulosa (84,129,130).

Un estudio en los niveles de ciertas glucanasas y enzimas pépticas, bajo la influencia del AIA (72), mostró que todas las enzimas de polisacáridos, excepto amilasa, aumentan

bajo la influencia del AIA.

Un pH bajo (de 3 a 4) causa la elongación de tejidos sensibles a las auxinas. Esta elongación empieza después de pocos minutos del cambio de pH y no se elimina por inhibidores metabólicos o falta de oxígeno, (132,133).

Se propone ahora que el efecto primario de la auxina sea el de causar una baja en el pH del medio, (134,135,136).

Esto resultaría de un bombeo de protones, lo que encuentra apoyo en los reportes de una disminución del pH dependiente de la auxina en secciones de coleóptilo de centeno, (137,138).

Se piensa que el pH bajo active enzimas ya presentes en la pared celular y causen la elongación celular, por ejemplo, activación de glucosil-transferasas, (139). Es posible que el mismo pH bajo cause la hidrólisis de los enlaces entre los polisacáridos de la pared, pero no hay nada demostrado.

### III.-MATERIALES Y METODOS:

#### A) MATERIALES:

##### a) Reactivos:

- 1.-Sacarosa (merck)
- 2.-Hidroximetil amino metano (Merck)
- 3.-Cloruro de potasio (merck)
- 4.-Cloruro de magnesio (merck)
- 5.-Duodecil sulfato de sodio (merck)
- 6.-Cloruro de sodio (merck)
- 7.-Acido etilendiaminotetracético (merck)
- 8.-Fosfato de sodio dibásico (merck)
- 9.-Fosfato diácido de potasio (merck)
- 10.-Mercaptoetanol (merck)
- 11.-Persulfato de amonio (Merck)
- 12.-N,N,N',N' tetramilenetilendiamina (Eastman)
- 13.-N,N'- metiléndiacrilamida (merck)
- 14.-Acilamida (merck)
- 15.-Fenol (merck)
- 16.-Acido acético (merck)
- 17.-Etanol absoluto (merck)
- 18.-2,5-difeniloxazol (Amersham/Searle)
- 19.-Eter etílico, Técnica química, S.A.
- 20.-Metanol (merck)
- 21.-Dioxano (merck)
- 22.-Naftaleno (Merck)
- 23.-Azul de bromo fenol (Merck)
- 24.-Acido ribonucleico de levadura (Calbiochem)
- 25.-Acido ribonucleico de transferencia de E.coli (Cal-  
bichem)

- 26.-Ribonucleasa T<sub>1</sub> (Miles)
- 27.-Ribonucleasa pancreática bovina (Calbichem)
- 28.-Acido diclorofenoxiacético (Merck)
- 29.-Uridina-C<sup>14</sup> , 50uCi/ml, 540 mCi/mMol (Amersham)
- 30.-Adenina-H<sup>3</sup> , 1 mCi/ml (New England Nuclear)
- 31.-Uridina-H<sup>3</sup> , 5mCi/10 ml , 8Ci/mMol (Schwarz/Mann )
- 32.-Peróxido de hidrógeno al 30%
- 33.-Hidróxido de Sodio (Merck)
- 34.-Acido clorhídrico.
- 35.-Hidróxido de Potasio (Merck)
- 36.-Hipoclorito de Sodio
- 37.-Azul de orto-Toluidina.

b) Material especial

- 1.-Agrolita
- 2.-Semillas de Trigo (Triticum aestivum, var. Pótamo) proporcionado por PRONASE.
- 3.-Hielo seco.
- 4.-Cajas de plástico de 40x30x15 cm
- 5.-Homogeneizador Potter de 100 ml
- 6.-Cámara para electroforesis en tubo.
- 7.-Viales de vidrio de 2.2 cm de diámetro (Packard)

c) Aparatos

- 1.-Espectrofotómetro (Zeiss, PMQII-46275)
- 2.-Espectrofotómetro (Pye Unicam SP 1800)
- 3.-Densitómetro (ISCO) modelo 490

- 4.-Centrífuga Beckman Modelo J-21
- 5.-Centrífuga MSE modelo LR-6
- 6.-Ultracentrífuga preparativa Beckman Modelo L
- 7.-Fuente de poder para electroforesis (ISCO)
- 8.-Contador de centelleo, Packard.

d) Preparación de Reactivos:

1.-Solución amortiguadora (Buffer "A") "A" :

Sacarosa	0.4 M
KCl	0.020 M
MgCl <sub>2</sub>	0.005 M
Tris-HCl	0.200 M
Mercaptoetanol	0.005 M
Ajustar pH a 8.5 con HCl	

2.-Solución Tris-KCl:

Tris-HCl	10 mM
KCl	15 mM
Ajustar pH a 8.5	

3.-Solución Tris-DSS:

Tris - HCl	10 mM
DSS	1%
Ajustar pH a 8.5	

4.-Solución amortiguadora de Fosfatos (Buffer fosfatos):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.005 M
Ajustar pH a 6.0 con KOH 0.1 M	

5.-Solución amortiguadora de Fosfatos-Sacarosa, pH 6.0

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.005 M
Sacarosa	1.0%

Ajustar pH a 6.0 con KOH 0.1M

6.-Solución patrón de 2,4-D , 0.01M

Pesar 0.22104 g de 2,4-D y disolver en 10 ml de KOH 0.1 M. Calentar hasta disolución y aforar a 100 ml con agua desionizada.

7.-Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.5

Se redestila el fenol, se pesan 85 g y se le agregan - 15 ml de agua destilada, se disuelve y se le agregan 100 ml de Tris 0.1 M pH 8.5 se agita durante 48 horas en frasco ámbar. Se separan las dos fases y se elimina la fase acuosa. Se alcanza un pH de 6.8

8.-Medio de incubación:

Sacarosa	1%
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.005 M
2,4-D	$1 \times 10^{-5}$ M

Adenina - $\text{H}^3$  o Uridina - $\text{C}^{14}$  .Las cantidades se especifican en cada uno de los experimentos.

9.-Solución amortiguadora I (Buffer I) para electroforesis en geles de acrilamida al 2.5%

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	30 mM
Tris-HCl	36 mM
EDTA (2Na)	1 mM

Ajustar pH a 7.8 con HCl

10.-Solución amortiguadora II (Buffer II ) para electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, (141)

EDTA (2Na)	1 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 mM
DSS	0.2 %
Tris-HCl	36 mM pH 7.8

11.-Solución amortiguadora III (Buffer III) para la hidrólisis enzimática del ARN. (141)

NaCl	30 mM
EDTA	2 mM
Tris- HCl	20 mM pH 7.5

12.-Ribonucleasa Pancreática "A"

La ribonucleasa pancreática bovina se disuelve en NaCl 0.15 M de manera que quedan 3050 U/ml. El pH se lleva a 5 con HCl 1 N. Se guarda a -20°C

13.-Ribonucleasa T<sub>1</sub>

Se disuelven las 100,000 U en 10 ml de NaCl 0.15 M, se guarda a -20°C

14.-Preparación de la solución de Bray: (142)

Naftaleno	60 g
PPO	4 g
POPOP	0.2 g
Etilen glicol	20 ml
Metanol	100 ml
Dioxano cbp	1000 ml



## B) MÉTODOS

### a) Preparación e incubación del tejido:

- 1.-Las semillas se seleccionan por aspecto y tamaño. Se esterilizan con una solución de Hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos, aplicando vacío y agitando. Se lavan perfectamente con agua corriente.
- 2.-Se siembran las semillas, 15 g/caja, en cajas de plástico que contengan agrolita humedecida con aproximadamente 250 ml de agua por litro de agrolita.
- 3.-Se incuban bajo luz roja durante 38 horas y 48 en la oscuridad a 25°C
- 4.-Al término de la incubación se seleccionan las plántulas de acuerdo a su tamaño. Se utilizan todas aquellas cuya longitud alcance aproximadamente 2.5 cm.
- 5.-Para obtener los coleóptilos, se cortan segmentos de 0.9 cm como se indica en el esquema. La hoja interna se elimina cuidando de no maltratar al tejido. Estas operaciones se llevan a cabo bajo luz roja. Durante la preparación del tejido, se mantiene en solución amortiguadora de Fosfatos-Sacarosa 1% (fig.10)
- 6.-La incubación del tejido en el medio apropiado se lleva a cabo en la oscuridad, a 25°C y aereación constante. La concentración óptima del tejido es de 4 segmentos/ml de medio de incubación. Antes de incubar se le aplica vacío durante 1 min.

### b) Bioensayo para encontrar concentración óptima de 2,4-D

Para encontrar la concentración óptima de 2,4-D se llevó a cabo un bioensayo (elongación del coleóptilo) se la siguiente manera:

- 1.-Se incubaron de 9 a 11 secciones de tejido, obtenido como se menciona previamente en matraces de bola de 10 ml que contenían 4 ml de medio (Buffer fosfato 0.005 M , pH 6.0 Sacarosa al 1% y 2,4-D en un rango de concentraciones de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M), incubando al mismo tiempo un control sin 2,4-D
- 2.-Se les aplica vacío durante 1 min., se incuban a 25°C en la oscuridad durante 20 horas y con aereación constante.
- 3.-Al término de la incubación, se miden y se saca la longitud promedio para cada concentración.

#### b) Obtención de polisomas de coleóptilo de trigo.

Para la obtención de los polisomas, se utilizó el método de Davies y Night, modificado (140).

- 1.-Se preparan 400 secciones de tejido.
- 2.-Se ponen 200 secciones en matraz de bola con 50 ml de medio de incubación.
- 3.-El tiempo de incubación es de 2 ó 5 horas, en la oscuridad a 25°C en las condiciones ya mencionadas.
- 4.-Al iniciar la incubación y al terminarla, se toman alícuotas de 0.005 y 0.010 ml respectivamente, para determinar radioactividad.
- 5.-Al término de la incubación se lava el tejido con buffer fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.005 M pH 6.0) para eliminar radioactividad externa.

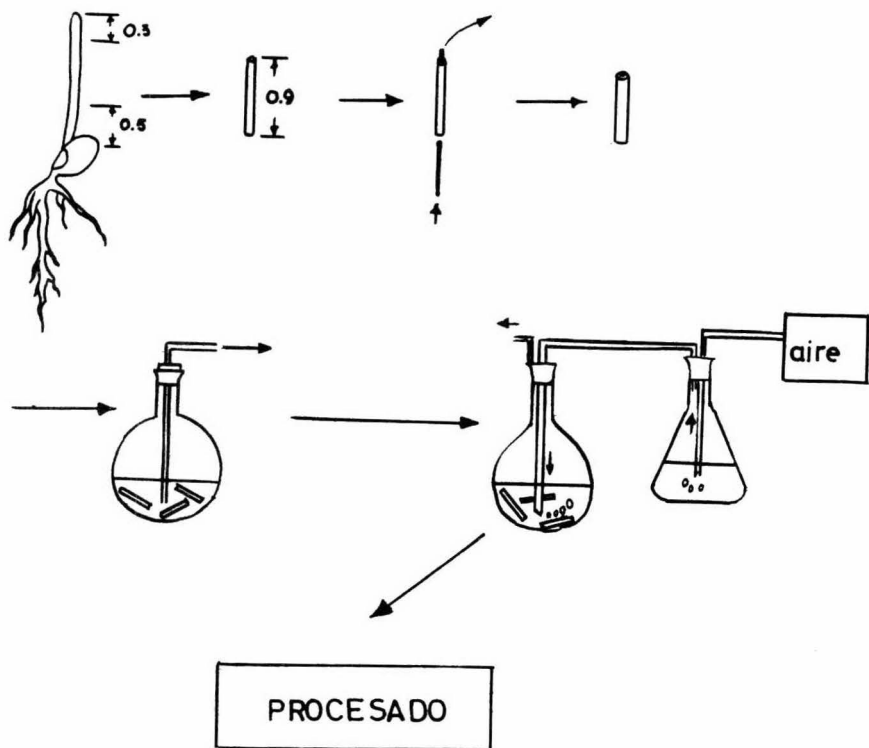
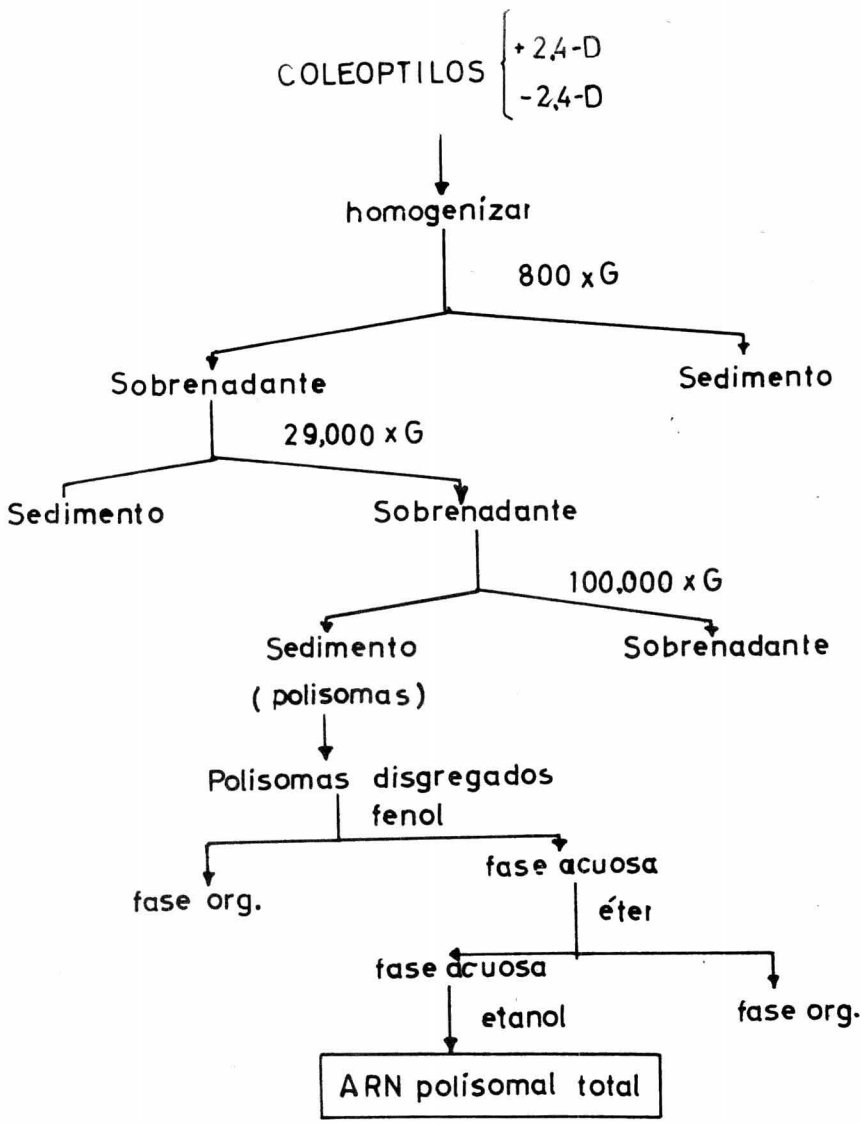


Figura : 10 Preparación e incubación del tejido.

Se siembran las semillas de trigo, ya esterilizadas en hipoclorito al 1%, en agrolita humedecida. Se incuban durante 36 horas bajo luz roja y 48 horas en la oscuridad a 25°C. Se seleccionan las plántulas de longitud de 2 a 2.5 cm, se cortan segmentos de 0.9 cm y se les extrae la hoja interna cuidando de no maltratar el tejido. Se incuban en las condiciones del experimento con agitación, aereación y a 25°C.



ESQUEMA : 1 Esquema general para la obtención de ARN poli-somal total de coleóptilos incubados en presencia y en ausencia de 2,4-D

nan 1.25 vols. de éter y se agita durante 5 min. Se elimina la fase orgánica y se repite el tratamiento.

5.-El resto de éter se elimina con vacío. A la fase acuosa obtenida, se le ajusta concentración de sales con NaCl 2.2 M para tener una concentración final de 0.22 M de NaCl (Se adiciona un vol.)

6.-Se precipita el ARN polisomal adicionando 2 volúmenes de Etanol helado. Se deja reposar en el congelador toda la noche.

7.-Para el análisis de éste ARN, se centrifuga el precipitado en etanol, se elimina el alcohol con corriente de aire y se resuspende el ARN en 0.3 ml de buffer I ó en agua desionizada.

#### e) Determinación de radioactividad:

Para determinar radioactividad se utilizó la solución de Bray (142). Las muestras usadas no fueron mayores de 0.5 ml se utilizaron 5 ml de solución/vial.

Para la determinación de radioactividad en geles se hace lo siguiente: El gel se corta en fracciones de 0.3 cm y se colocan en viales, se les adiciona 0.5 ml de agua oxigenada - al 30%, se dejan durante 12 horas a una temperatura de 75°C - para la disolución del gel. Se agregan 5 ml de la solución de Bray y se determina radioactividad en un contador de centelleo Packard. (149)

#### f) Determinación espectrofotométrica del ARN:

Para determinar la pureza y la cantidad de ARN poliso mal obtenido, se determinó el espectro de absorción en un -- rango de absorbencia de 200 a 300 nm, en un espectrofotómetro Pye Unicam. Del ARN obtenido como se menciona previamente se tomó una alícuota de aproximadamente 0.010 ml y se llevó a 1 ml con agua destilada. Se determinó su espectro de absorción y se sacaron las absorbencias a 230, 260 y 280 nm.

Considerando que 1 unidad de densidad óptica medida en una celda de 1 cm de paso y a 260 nm, corresponde a 50  $\mu$ g de ARN por mililitro, se calculó la cantidad total de ARN obtenido. Las relaciones de absorbencia se muestran en la tabla III, para los ARN de los diferentes experimentos.

g) Radioactividad específica del ARN:

Para determinar la radioactividad específica del ARN, se tomó una alícuota de 0.1 ml de la suspensión usada para determinar el espectro de absorción, se le determinó radioactividad como se menciona previamente y, tomando en cuenta la cantidad de ARN de la alícuota se calculó la radioactividad específica.

h) Análisis electroforético del ARN

Para observar el patrón de distribución del ARN marcado, así como su integridad, se analizó el ARN en electroforesis en geles de poliacrilamida al 2.5% (145).

1.- Se utilizan tubos de 0.6 cm de diámetro interno y 10 cm de longitud perfectamente limpios.

2.- La preparación del gel se hace de la siguiente manera:

a) Para 25 ml, se pesan:

Acrilamida	0.625 g
Bis-acrilamida	0.03125 g
Persulfato de amonio.	0.050 g
Temed	0.0125 ml

b) Para preparar la solución:

Mezclar en el orden indicado.

- 1) 15 ml de buffer I para electroforesis.
- 2) agregar acrilamida
- 3) agregar bis-acrilamida
- 4) agregar temed y agitar
- 5) agregar persulfato y agitar
- 6) Agregar 10 ml de buffer I, mezclar perfectamente.

El tiempo de gelificación es de 10 min.

Para llenar los tubos se procede de la siguiente manera:

Se cierran por un extremo con parafilm, se colocan perfectamente verticales. Con una pipeta pasteur se adiciona la solución anterior cuidando de que no se hagan burbujas. Para quitar el menisco, se pone una gota de agua en la superficie de la solución (deben verse dos fases bien definidas).

Una vez que la solución ha polimerizado se elimina el agua con un papel absorbente.

Se colocan los tubos en la cámara de electroforesis y none el buffer I en ambas cámaras. La muestra se coloca con una pipeta pasteur o una jeringa, previamente se le ajusta la concentración de sacarosa para tenerla al 20%.

El polo positivo se conecta en la parte inferior ya -

que el ARN al pH del buffer (7.8) tiene carga negativa.

Las muestras se corren durante 20 min. a 1 mA/gel y -- durante 2:30 hrs. a 5 mA/gel. Como estándar externo de corrimiento se usa azul de bromo fenol, (ABF).

Terminado el tiempo de corrimiento, se sacan los tubos. Si se colocaron los geles en tubos de cuarzo se puede hacer el registro óptico, en caso contrario, se sacan los geles de los tubos con una jeringa, inyectando agua por las paredes -- del tubo, cuidando de no maltratar el gel.

Para determinar los patrones de distribución se tiñen los geles con una solución de azul de orto-toluidina al 1% -- en ácido acético al 20%, durante 15 min. El exceso de colorante se elimina lavando con ácido acético al 1%.

Para desteñir los geles se ponen en solución de ácido acético al 1% durante 15 horas, con agitación y cambios de la solución de ácido.

El patrón de distribución de radioactividad se lleva a cabo como se menciona en el punto (e).

#### i) Hidrólisis enzimática del ARN

Con el fin de caracterizar las secuencias ricas en poli A, del ARN polisomal, se trató una alícuota (100-200ug de ARN) del ARN, con una mezcla de ribonucleasas, pancreática y T<sub>1</sub> para hidrolizar el ARN excepto los segmentos ricos en poli A, los cuales son resistentes a la hidrólisis por estas enzimas.

Se siguió la técnica de Gorski y Morrison (141) modificada:

Se resuspenden aproximadamente 200 ug de ARN en 0.1 ml de buffer III, se agregan 1 U de cada enzima por cada 25 ug de



ARN. Se incuba durante 30 min. a 37°C y se para la reacción por congelación.

j) Electroforesis del hidrolizado de ARN

Para la electroforesis del hidrolizado del ARN se sigue la siguiente técnica (141):

a) Preparación de los geles de poliacrilamida al 12% , DSS al 0.2%.

1) Para 25 ml de solución pesar:

Acrilamida	3 g
Bis-acrilamida	0.15 g
Persulfato de amonio	0.017 g
Temed	0.0125 ml

2) Para preparar la solución:

Se ponen 15 ml de buffer II (ver materiales) y se adiciona la acrilamida, bis-acrilamida, temed y el persulfato de amonio, agitar perfectamente. Se adicionan los 10 ml de buffer restantes. El tiempo de polimerización es de 30 min. aproximadamente.

Para la preparación de los geles se usan tubos de 0.6 cm de diámetro y 15 cm de longitud, lavados perfectamente.

Los tubos se llenan como se menciona previamente - hasta una altura de 10 cm.

La muestra de ARN hidrolizado, se ajusta a una concentración de sacarosa del 20%. Se coloca en un gel una alícuota de ABF como estándar de corrimiento externo, una muestra de

ARN de transferencia de E.coli y una muestra de ARN total de levadura, hidrolizado en la misma forma y condiciones.

Las muestras se corren a 1 mA/gel durante 20 min. y a 5 mA/gel durante 5:30 hrs, colocando el polo positivo en la parte inferior.

Al termino del corrimiento, se sacan los tubos, se saca el gel y se tiñen con una solución de azul de orto-toluidina al 1% en ácido acético al 20% durante 5 min. Se elimina el exceso de colorante con ácido acético al 1% y se destiñen durante 72 horas en solución de ácido acético al 1%, con agitación y cambios de la solución del ácido. El procedimiento de tinción solo se lleva a cabo para las muestras de ARNt de E.coli y para el ARN hidrolizado de levadura.

Los geles que tienen las muestras de los ARN polisomales hidrolizados no se tiñen, se cortan en secciones de 0.3 cm y se les determina radioactividad como se menciona en el punto (e).

#### IV.-RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES:

##### A) RESULTADOS:

##### a) Concentración óptima de 2,4-D

El primer paso en el desarrollo fué encontrar la concentración óptima de 2,4-D en la cual, la respuesta de elongación celular en el coleóptilo de trigo, es la máxima.

Para esto se llevó a cabo un bioensayo cuyos resultados se muestran en la tabla I, el tipo de curva obtenido - se muestra en la gráfica 1.

La concentración óptima que se encontró fué la de  $10^{-5}$  M. La elongación obtenida a esta concentración de 2,4-D representó, en relación al control, más del 40%.

Para todos los experimentos efectuados se utilizó esta concentración.

##### b) Incorporación del precursor marcado al ARN

Para determinar si el precursor marcado se incorporaba al ARN polisomal se hizo un experimento preliminar utilizando Uridina- $H^3$ .

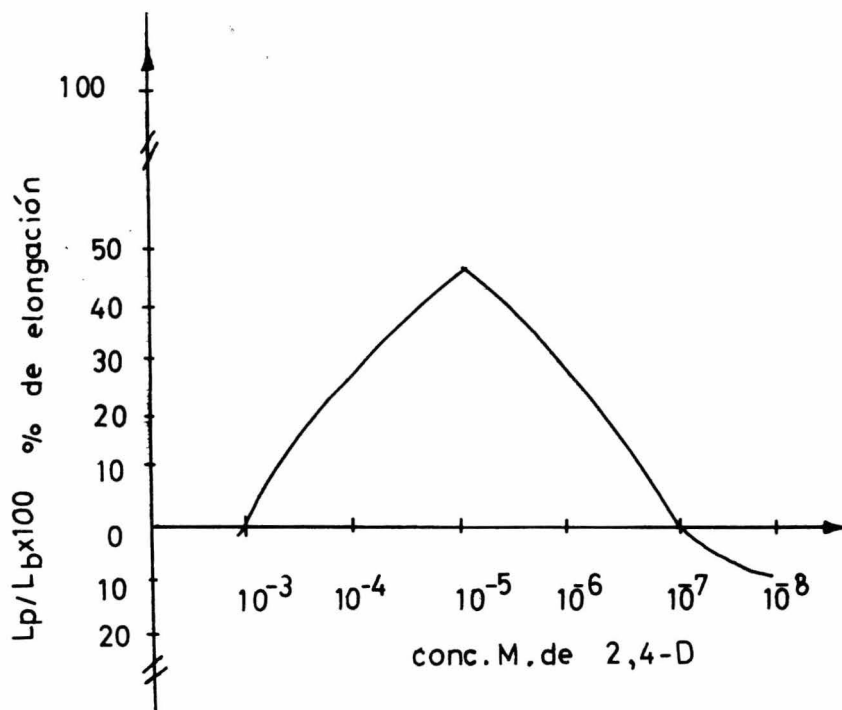
Se utilizaron 183 secciones de tejido como se menciona en métodos y se incubaron en 50 ml de medio de incubación ( $KH_2PO_4$  0.005 M, Sacarosa 1%, 2,4-D  $1 \times 10^{-5}$  M y 7.5  $\mu$ C/ml de Uridina- $H^3$ ).

PARLA I

Datos obtenidos del bioensayo para encontrar concentración óptima de 2,4-D

Coleóptilos	Concentración de 2,4-D (moles/litro)						
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	0
Longitud (cm)	1.56	1.96	2.07	1.80	1.38	1.29	1.42
Peso (mg)	12.91	16.50	16.85	15.20	11.98	10.80	12.01
Lp/Lb x 100	109	137	144	126	96	90	100
$\frac{Lp}{Lb} \times 100 - 100$	9	37	44	26	-4	-10	0

Se incubaron de 9-11 secciones de tejido tratado como se indica en métodos. Se probó un rango de concentraciones de 2,4-D de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M. El tiempo de incubación fué de 20 horas, a 25°C, en la oscuridad y con aereación constante. Lp corresponde al largo promedio de las secciones a las diferentes concentraciones usadas y Lb al de las secciones incubadas en ausencia de 2,4-D.



**Gráfica 1** Efecto de la concentración del 2,4-D en la elongación del coleótilo de trigo.

Se incubaron de 3 a 11 secciones de tejido de 0.9 cm de longitud en un buffer que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.005 M pH 6, sacarosa al 1% y 2,4-D en un rango de concentraciones de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M. El tiempo de incubación fué de 20 horas, en la oscuridad, a 25°C y con agitación y aereación constante. Lb corresponde a la longitud de las secciones incubadas sin 2,4-D y Lp a la de las secciones de tejido incubadas con 2,4-D.

El tiempo de incubación fué de 5 horas en las condicio---  
mencionadas previamente. Al final de la incubación se obtuvie  
ron los polisomas y el ARN polisomal como se indica en méto  
dos. tomando las alícuotas necesarias para la determinación -  
de la poza de  $U-H^3$ .

Se tomó una alícuota del ARN polisomal (0.010 ml) la cual  
se llevó a 1 ml con agua destilada y se le determinó su es  
pectro de absorción de 200 a 300 nm. Utilizando las absorben  
cias a 230, 260 y 280 nm se determinaron sus relaciones de --  
absorbencia de 260/230 y de 260/280 para determinar su pure  
za.

Se le determinó la radioactividad específica como se men  
ciona en métodos. En la Tabla II se muestran los datos de ra  
dioactividad obtenidos durante el proceso de obtención del -  
ARN, su cantidad y su radioactividad específica.

El ARN se analizó electroforéticamente en geles de polia  
crlamida al 2.5% para determinar su patrón de distribución  
óptico y de radioactividad.

La electroforesis se llevó a cabo como se menciona en mé  
todos, utilizando tubos de cuarzo de 0.6 cm de diámetro para  
poder hacer el registro óptico a 254 nm y posteriormente de  
terminar radioactividad en los geles, (gráfica 2).

Como puede verse en esta gráfica, la incorporación de mar  
ca se ve distribuída en todas las especies de ARN de la mues  
tra analizada.

Con los datos obtenidos en este experimento, se pensó en -  
modificar el tiempo de incubación a 2 horas para poder deter  
minar, si era posible, qué especie del ARN polisomal se marca-

ba preferentemente a tiempos cortos de incubación.

Para comparar el efecto en la cantidad de marca incorporada con y sin 2,4-D utilizando diferentes bases, se hicieron los siguientes experimentos:

### Experimento 2

#### c) Obtención de ARN polisomal de tejido incubado en presencia y en ausencia de 2,4-D utilizando Adenina-H<sup>3</sup>.

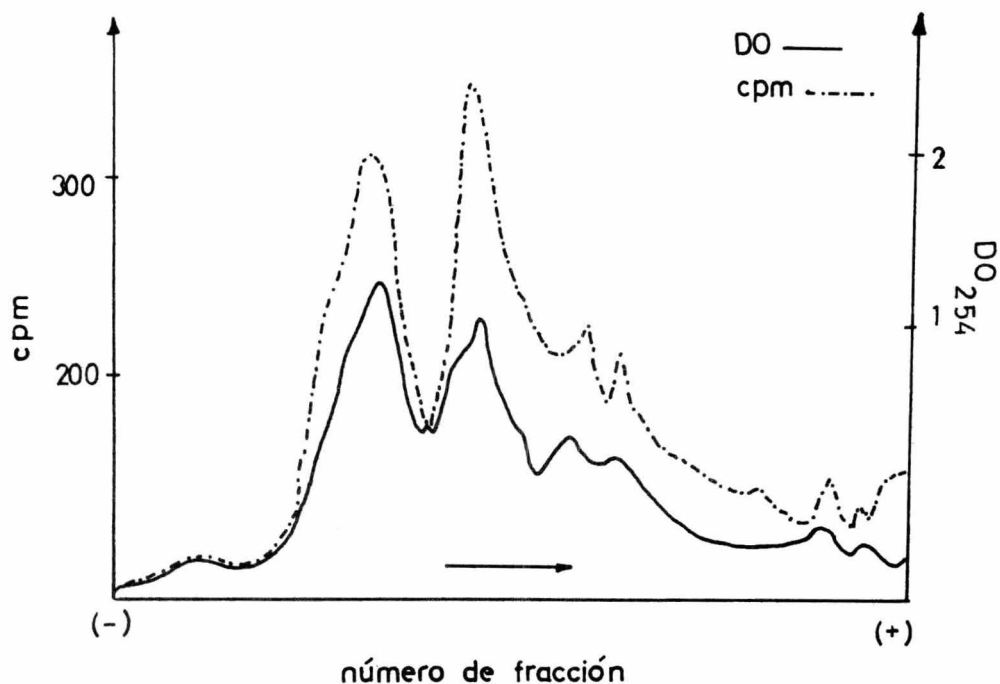
Se incubaron 215 coleóptilos en 50 ml de medio de incubación que contenía:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.005 M, sacarosa 1%, 2,4-D  $1 \times 10^{-5}$  M y 16 uC/ml de medio de incubación de Adenina-H<sup>3</sup>. Se incubaron al mismo tiempo, 215 secciones de tejido en 50 ml de medio de incubación pero sin 2,4-D. Se incubaron como se menciona previamente.

Al término de la incubación se procedió a obtener los polisomas y el ARN polisomal. Los resultados de radioactividad se muestran en la Tabla IV.

Se tomó una alícuota de 0.010 ml de la solución de ARN polisomal y se les determinó su espectro en un rango de 200 a 300 nm. Se sacaron sus absorbencias a 230, 260 y 280 nm. Las relaciones se muestran en la tabla III.

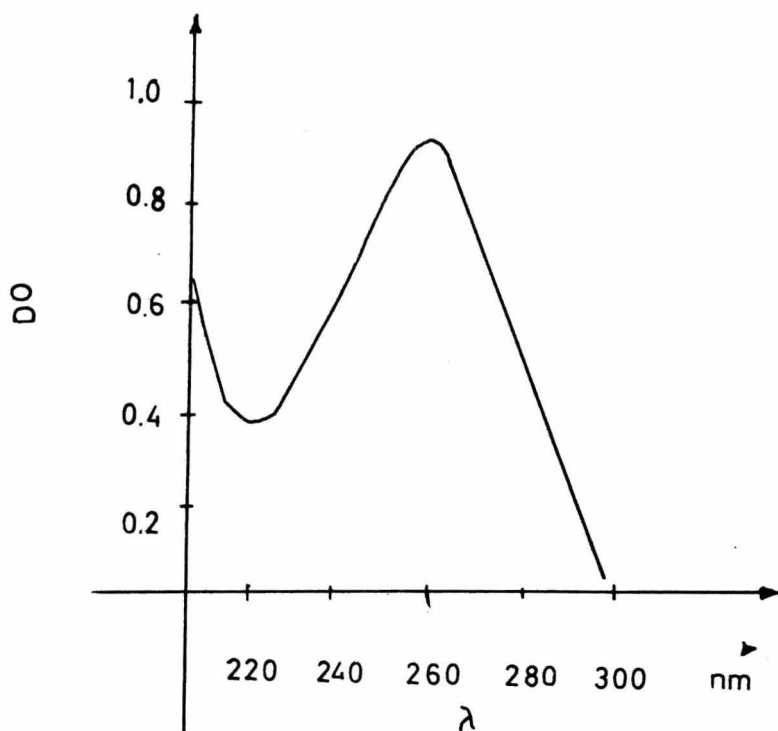
De la alícuota anterior llevada a 1 ml con agua, se tomó 0.1 ml y se le determinó radioactividad, para calcular radioactividad específica.

Para determinar su patrón de distribución de radioacti-



**Gráfica:2** Distribución electroforética de ARN polisomal en gel de poliacrilamida al 2.5% marcado con  $U-H^3$  e incubado en presencia de 2,4-D. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de 8.5 cm de longitud de diámetro 0.6 cm. Se colocaron como muestra 73  $\mu$ g de ARN polisomal obtenido de coleótilos de trigo incubados en presencia de 2,4-D y 7.5  $\mu$ C/ml de medio de incubación de Uridina tritiada. Se utilizaron celdas de cuarzo para hacer el registro óptico del gel a 254 nm. El tiempo de corrimiento fué de 2:30 hrs. La determinación del patrón de distribución de radioactividad se llevó a cabo como se indica en métodos. La flecha indica la dirección de corrimiento.





**Gráfica: 3** Espectro de absorción del ARN polisomal.

El ARN polisomal se obtuvo de coleóntilos de trigo incubados en presencia de  $U-4^3$  (7.5  $\mu$ C/ ml de medio de incubación), 50 ml de medio de incubación, durante 5 horas a 25°C (ver métodos). Se hizo es el espectro en un rango de contracción de 200 a 300 nm. Las relaciones de absorbancia - obtenidas fueron 2.2 y 1.9 para  $D0260/D0230$  y  $D0260/D0280$  respectivamente.

TABLA II

Datos de incorporación de  $U-H^3$  al tejido y al ARN polisomal para el exp. 1

Radioactividad inicial total en el medio de incubación.	8,040,000 cpm
Radioactividad total final en el medio de incubación.	3,945,000 cpm
Radioactividad que entró al tejido.	4,095,000 cpm
Radioactividad en el sobrenadante de 100,000xG (noza de $U-H^3$ )	248,040 cpm
ARN polisomal total.	880 ug (17.6 U DO)
Radioactividad Total	90,000 cpm
Radioactividad Especifica del ARN polisomal.	103 cpm/ug de ARN

Se incubaron 183 coleóptilos obtenidos como se menciona en métodos y se incubaron en 50 ml de medio de incubación que contenía  $KH_2PO_4$  0.005 M, Sacrosa 1%, 2,4-D  $1 \times 10^{-5}$  M y - 7.5  $\mu C/ml$  de medio de incubación de Uridina tritiada. El tiempo de incubación fué de 5 horas, a 25°C, en la oscuridad y con aereación constante. La determinación de radioactividad en las diferentes muestras se hizo en un contador de centelleo Packard con una eficiencia para el tritio de 38%.

vidad y su integridad se hizo el analisis electroforético en geles de poliacrilamida al 2.5% como se menciona en métodos. Se usaron 65 y 80 ug de ARN de cada muestra, control y problema, respectivamente. (Gráficas 4 y 5 ).

### Experimento 3

d) Obtención de ARN polisomal de tejido incubado con y sin 2,4-D en presencia de A-H<sup>3</sup>.

Con el objeto de saber si los resultados eran - reproducibles, se llevó a cabo otro experimento, utilizando las mismas condiciones que el experimento 2 con las siguientes variaciones: se utilizaron 210 secciones de tejido y el medio de incubación contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.005 M pH 6.0 , Sacarosa 1%, 2,4-D  $1 \times 10^{-5}$  M y Adenina tritiada 14 uC/ml de medio de incubación - empleado (50 ml). Todo el procedimiento se siguió como en el experimento 2. Los resultados se muestran en la Tabla III, IV y en las gráficas 4 y 6.

### Experimento 4

e) Obtención de ARN polisomal de tejido incubado en presencia y en ausencia de 2,4-D y utilizando como precursor marcado, Uridina-C<sup>14</sup>.

TABLA III

Determinaciones espectrofotométricas  
de las diferentes muestras de ARN  
nolisomal.

Exp.	Condiciones	DO <sub>230</sub>	DO <sub>260</sub>	DO <sub>280</sub>	<del>DO</del> <sub>260</sub> <del>DO</del> <sub>230</sub>	<del>DO</del> <sub>260</sub> <del>DO</del> <sub>280</sub>
2	+ 2,4-D	0.60	1.30	0.67	2.16	1.94
	- 2,4-D	0.46	1.03	0.51	2.20	2.00
3	+ 2,4-D	0.48	1.02	0.52	2.12	1.95
	- 2,4-D	0.34	0.76	0.39	2.07	1.96
4	+ 2,4-D	0.27	0.62	0.32	2.31	1.96
	- 2,4-D	0.21	0.44	- .22	2.12	2.00

Los resultados anteriores corresponden a las muestras de ARN nolisomal obtenidas de los Experimentos 2,3 y 4 mencionados anteriormente. Del ARN nolisomal precipitado en Etanol, se disolvió como se indica en métodos en buffer I en una pequeña cantidad (0.1 a 0.3 ml) de aquí se tomó una alícuota pequeña la cual se llevó a 1 ml y se determinó su espectro en un espectrofotómetro Pve Unicam 1800 en un rango de 200 a 300 nm. Se determinaron las lecturas de absorbancia a 230, 260 y 280 para sacar las relaciones, las cuales coinciden con lo ya reportado (147).

Se incubaron 213 coleóptilos en 50 ml de medio de incubación que contenía:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.005M pH 6.0, sacarosa 1%, 2,4-D  $1 \times 10^{-5}$ M y 0.3 uC/ml de Uridina- $\text{C}^{14}$ .

La incubación se llevó a cabo como en los experimentos anteriores, se extrajo el ARN polisomal y durante el procedimiento de extracción se tomaron las alícuotas respectivas, - Tabla IV.

Se determinó el espectro de absorbencia del ARN, se determinaron las absorbencias a 230, 260 y 280 nm para sacar las relaciones, Tabla III.

La radioactividad específica se saca como se menciona previamente. Se analizó en geles de poliacrilamida al 2.5% y se determinó el patrón de distribución de radioactividad, - gráficas 4 y 7.

f) Hidrólisis de los diferentes ARN's obtenidos, usando una mezcla de ribonucleasas.

Para determinar si la diferencia en incorporación de marca al utilizar Adenina tritiada o Uridina- $\text{C}^{14}$ , se debía a un efecto del 2,4-D sobre la elongación de la fracción del poli A del ARNm, se hidrolizaron las diferentes muestras de - ARN's. Como la fracción de poli A del ARNm es resistente a la acción enzimática de las ribonucleasas A y  $\text{T}_1$ , se pensó en analizar posteriormente, los residuos obtenidos de esta hidrólisis.

La hidrólisis del ARN polisomal de los diferentes

TABLA IV

DATOS DE INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD

	EXP. 2		EXP. 3		EXP. 4	
	+ 2,4-D	-2,4-D	+2,4-D	- 2,4 -D	+2,4-D	- 2,4 -D
RADIOACTIVIDAD INICIAL TOTAL EN EL MEDIO DE INCUBACION	60,282,000	56,531,600	84,270,000	65,510,000	9,440,000	10,130,000
RADIOACTIVIDAD FINAL EN EL MEDIO DE INCUBACION (cpm)	37,694,000	33,231,000	22,990,000	16,170,000	6,795,000	5,415,000
RADIOACTIVIDAD QUE ENTRO AL TEJIDO (cpm)	22,588,000	23,300,600	61,280,000	49,340,000	2625,000	4,715,000
RADIOACTIVIDAD EN EL SOBRENADANTE DE 100 000 x g	7,856,000	3,183,300	3,270,000	2,570,560	1,624,320	1,138,320
ARN TOTAL (ug)	975	772	723	765	795	734
cpm totales en ARN polisomal	1,104,266	484,357	283,612	135,405	100,930	54,050
RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA ARN	1392	627	392	177	140	76

experimentos se llevó a cabo de la siguiente manera:

Para una cantidad de los ARN's obtenidos en el experimento 3, se utilizaron 1 U de cada enzima/25 ug de ARN, el ARN se resuspendió previamente en buffer III, se incubaron 30 min. a 37°C. Al término de la incubación se analizaron los residuos de la hidrólisis en geles de poliacrilamida al 12%, DSS al 0.2 por ciento, como se indica en métodos. Los resultados se muestran en la gráfica 8.

De los resultados obtenidos anteriormente, se decidió aumentar el tiempo y las condiciones de la hidrólisis ya que en el control de ARN total de levadura usado, no se obtuvo una hidrólisis completa.

En las gráficas 8-14 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes muestras de de ARN polisomal empleadas, así como las condiciones de las hidrólisis.

## B) DISCUSION:

De los datos obtenidos para el bioensayo del 2,4-D, (Tabla I y gráfica 1) se puede observar que la concentración óptima de esta auxina a la cual se obtiene el máximo efecto de elongación es de  $1 \times 10^{-5}$  M.

Analizando los resultados obtenidos en el experimento preliminar de 5 hrs. de incubación (gráfica 2, Tabla II) se observa que en estas condiciones se obtiene ARN polisomal -- marcado en todas sus especies. Los resultados del patrón de distribución del ARN de este experimento, en geles de poliacrilamida, nos indican que hay una degradación ligera aún cuando todo el proceso de extracción se llevó a cabo a temperaturas

cercanas a 4°C. Este fenómeno es debido a que en estos tejidos hay una gran cantidad de ribonucleasas ( ) lo cual hace difícil el análisis. En cuanto a la pureza del ARN obtenido, se puede ver de la gráfica (3), que este material tiene un grado de pureza aceptable, tomando en cuenta las relaciones de  $DO_{260}/DO_{230}$  y  $DO_{260}/DO_{280}$ .

La evidencia de que trabaja con la fracción polisomal no se presenta en este trabajo pero se realizó en el mismo laboratorio (Tesis de Maestría en ciencias de JLDV). Es decir, se realizó un análisis de la distribución de polisomas en gradiante de sacarosa y por determinación de la absorbencia a -260, se pudo concluir que la fracción con la que se estaba trabajando correspondía a una mezcla de polisomas de diferente longitud.

Los datos de distribución de radioactividad en electroforesis indican lo siguiente: la presencia de 2,4-D acelera la incorporación de la marca en todas las especies de ARN, (gráficas 5, 6 y 7). Así mismo, la gráfica 6 nos sugiere que con 2,4-D hay mayor cantidad de marca en las fracciones más cortas de ARN. Es necesario, sin embargo, considerar para la interpretación de los datos, que en los tres casos hay degradación del ARN y por lo tanto con estos resultados no se puede llegar a una conclusión en cuanto a la distribución de la marca en las especies del ARN.

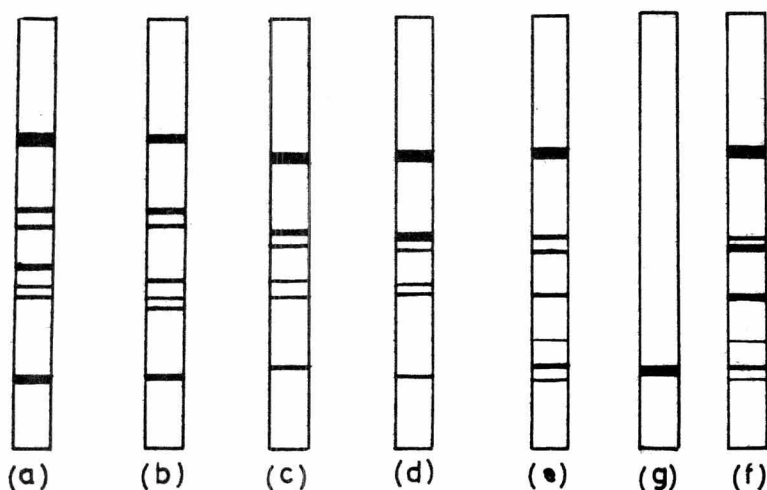
En base a los diferentes porcentajes de incorporación obtenidos con adenina y uridina (222 y 184% respectivamente) de la tabla IV, se pensó que había un aumento preferencial de las especies de la fracción de ARNm, rico en poli A. Esta posibilidad es también apoyada por los datos obtenidos por JLD, quien



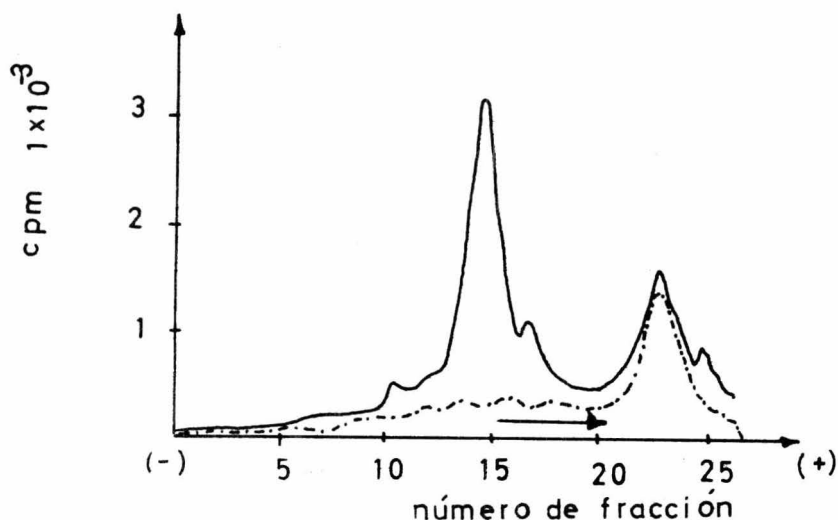
condiciones más drásticas, pero no se llegó a una hidrólisis total.

La gráfica 10 nos indica que la diferencia en radioactividad específica se debe a un aumento en el número de especies de ARNm. Los fragmentos residuales tienen un número aproximado de 75 nucleótidos.

Al analizar los datos obtenidos en la Tabla V, se puede observar que a medida que la hidrólisis es mayor, la diferencia entre el control y el problema, marcados con adenina, se acentúa mientras que los marcados con uridina mantienen la misma relación en cuanto a recuperación. Esto nos indica que la diferencia en incorporación de marca se debe a que en presencia de 2,4-D se incrementa el número de especies de ARNm y al hidrolizar la muestra de ARN polisomal total, la diferencia entre el control y el problema se vé aumentada debido a que en el problema hay mayor número de fragmentos ricos en poli A. En el caso de ARN marcado con uridina, no se observa una diferencia puesto que la marca se encuentra en fragmentos que sí son hidrolizados. En este caso el porcentaje de recuperación es de 26% y posiblemente sea limitación del método el no llegar a un 100% de hidrólisis.



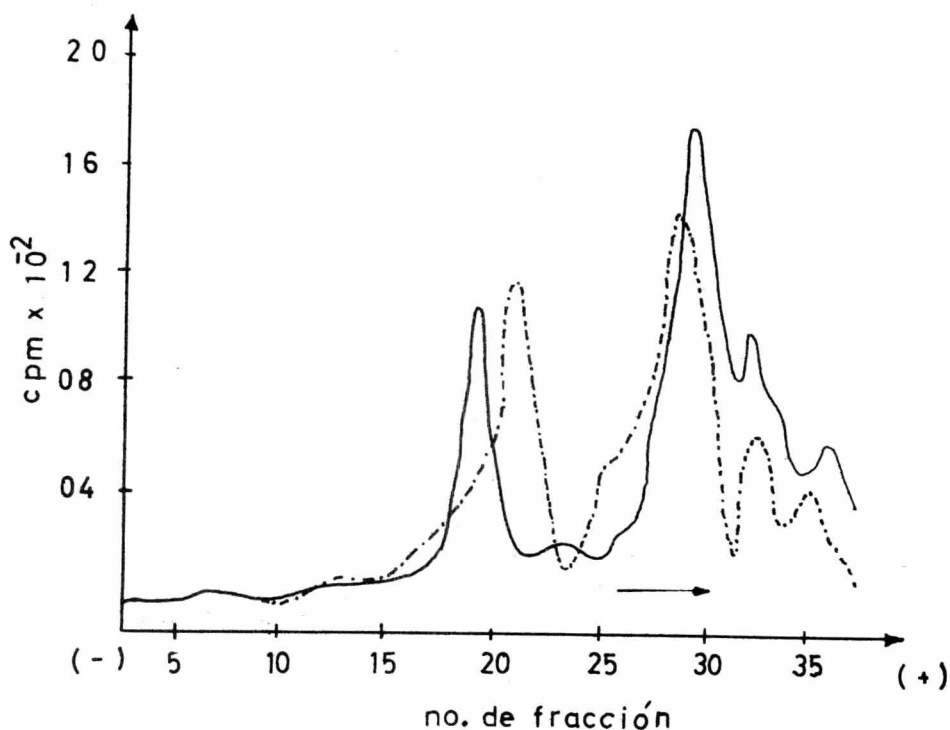
**Gráfica:4** Patrones de distribución de ARN total polisomal en geles de poliacrilamida al 2.5%. El tiempo de corrimiento fue de 2:30 hrs. para a y b y de 3:00 hrs. para c, d, e, f y g. Se tiñeron como se indica en métodos y posteriormente se cortaron y se les determinó radioactividad. a) ARN marcado con  $AH^3$  en presencia de 2,4-D, 80ug, b) ARN marcado con  $AH^3$  en ausencia de 2,4-D, 65ug, c) ARN marcado con  $AH^3$  en presencia de 2,4-D, 64 ug, d) ARN marcado con  $AH^3$  en ausencia de 2,4-D, 60 ug, e) ARN marcado con  $U-C^{14}$  en presencia de 2,4-D, 50ug, f) ARN marcado con  $U-C^{14}$ , 55 ug y g) ARN soluble de E.coli como estándar de corrimiento.



**Gráfica 5** Patrón de distribución de radioactividad de los ARN's polisomales obtenidos en el experimento 2.

El ARN polisomal fué analizado electroforéticamente como se menciona en la Gráfica 5 y después se terminó su patrón de radioactividad en el mismo. Se pudieron 80  $\mu\text{g}$  del ARN polisomal obtenido de tejido tratado con 2,4-D y 65  $\mu\text{g}$  de ARN obtenido de tejido sin tratar. La determinación de la radioactividad en el gel se llevó a cabo como se menciona en métodos.

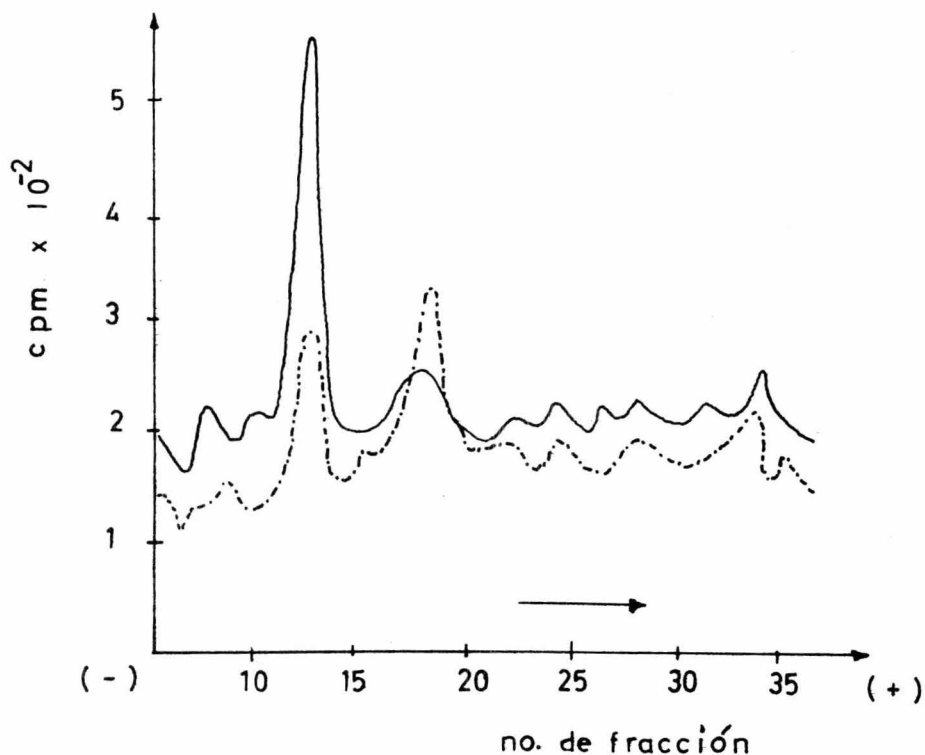
(—) ARN marcado con  $\text{AH}^3$  en presencia de 2,4-D y (---) ARN marcado con  $\text{AH}^3$  en ausencia de 2,4-D. Los datos en la gráfica están ya corregidos de tal manera que se tenga igual cantidad de ARN/gel.



**Gráfica: 6** Patrón de distribución de radioactividad de los ARN's polisomales obtenidos en el experimento 3.

El ARN polisomal fué analizado electroforéticamente como en la gráfica 5 y posteriormente fué determinado su patrón de distribución de radioactividad en estos mismos geles, como se indica en métodos. Se utilizaron 64 ug de ARN polisomal obtenido de tejido incubado con 2,4-D y  $AH^3$  y 60 ug de ARN polisomal de tejido no tratado con 2,4-D pero en presencia de  $AH^3$ .

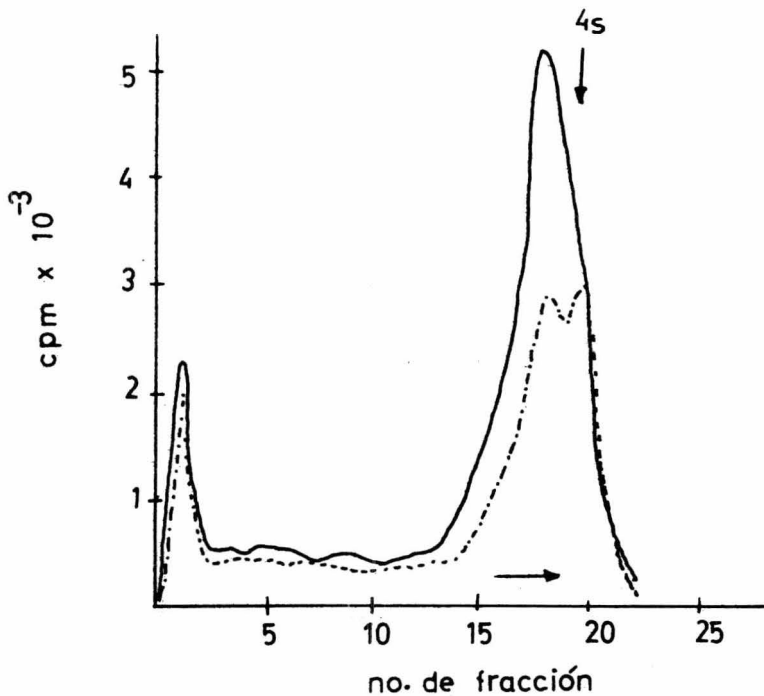
( — ) ARN polisomal obtenido de tejido incubado con 2,4-D y ( - - - ) ARN polisomal obtenido de tejido no incubado con 2,4-D. Los datos están ya corregidos para igualar cantidades de ARN polisomal. La flecha indica la dirección de corriente del A.C.



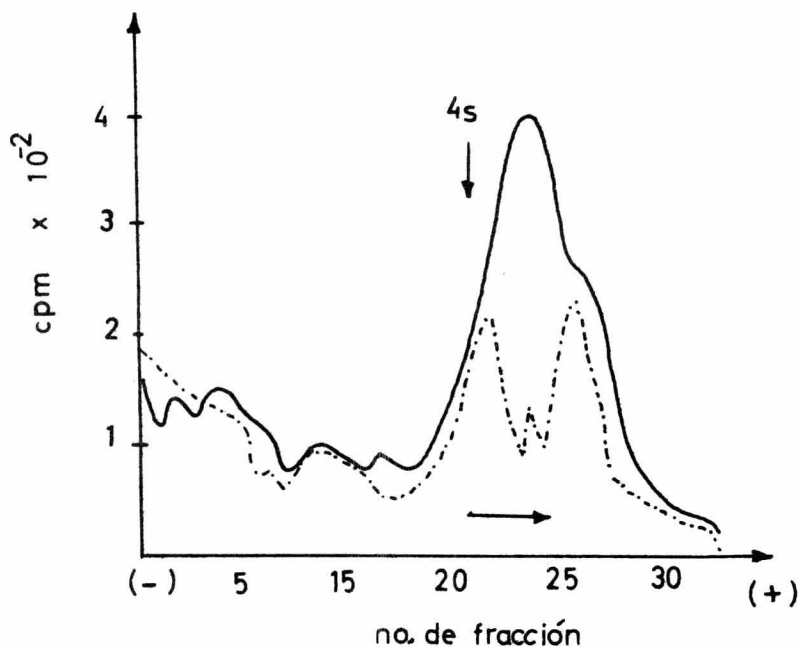
**Gráfica :7** Patrón de distribución de radioactividad de los ARNs obtenidos en el experimento 4.

El mismo gel de la gráfica 4 se utilizó para determinar el patrón de distribución de radioactividad como se indica en métodos.

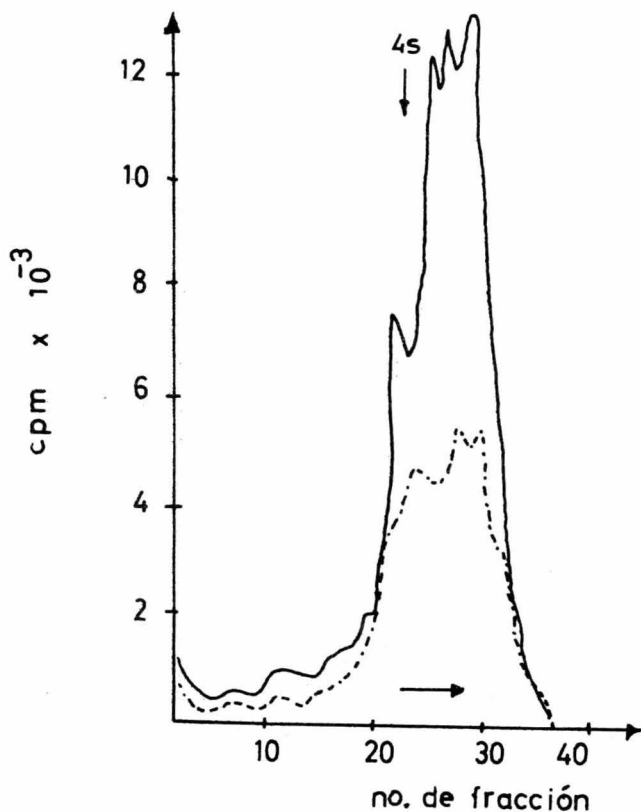
Se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de ARN polisomal obtenido de coleóntilos tratados con 2,4-D y 54  $\mu\text{g}$  de RNA polisomal obtenido de tejido no tratado, ambos en presencia de  $\text{H-C}^{14}$ . ( — ) ARN obtenido de tejido tratado con 2,4-D y (.....) ARN obtenido de tejido no tratado. Los datos de la gráfica están *va* corregidos.



**Grafica : 8** Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de los ARN's del experimento 3, tratados con una mezcla de ribonucleasas (1 U de cada enzima por cada 25  $\mu$ g de ARN) durante 30 min. a 37°C. Se utilizaron 45  $\mu$ g del ARN obtenido de tejido tratado con 2,4-D (—) y 127  $\mu$ g de tejido no tratado (---) La gráfica está corregida para tener la misma cantidad de ARN/cel. La determinación de radioactividad se llevó a cabo como se menciona en métodos.

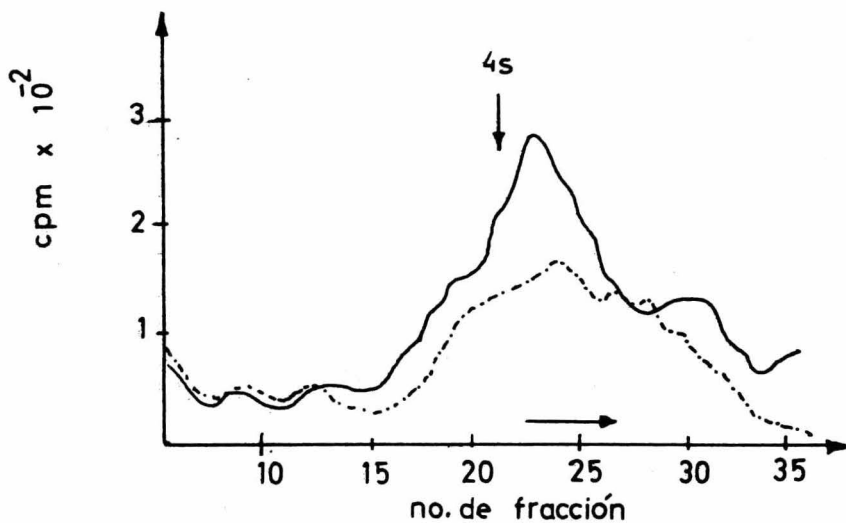


Gráfica : 9 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% del ARN del experimento 3 tratado con una mezcla de ribonucleasas igual a la usada en la gráfica 8. El tiempo de incubación fué de 1 hr. a 37°C, se usaron 200  $\mu$ g de cada ARN. (—) ARN obtenido de tejido tratado con 2,4-D, (-.-.-) ARN obtenido de tejido no tratado. La -- flecha indica la dirección de corrimiento.

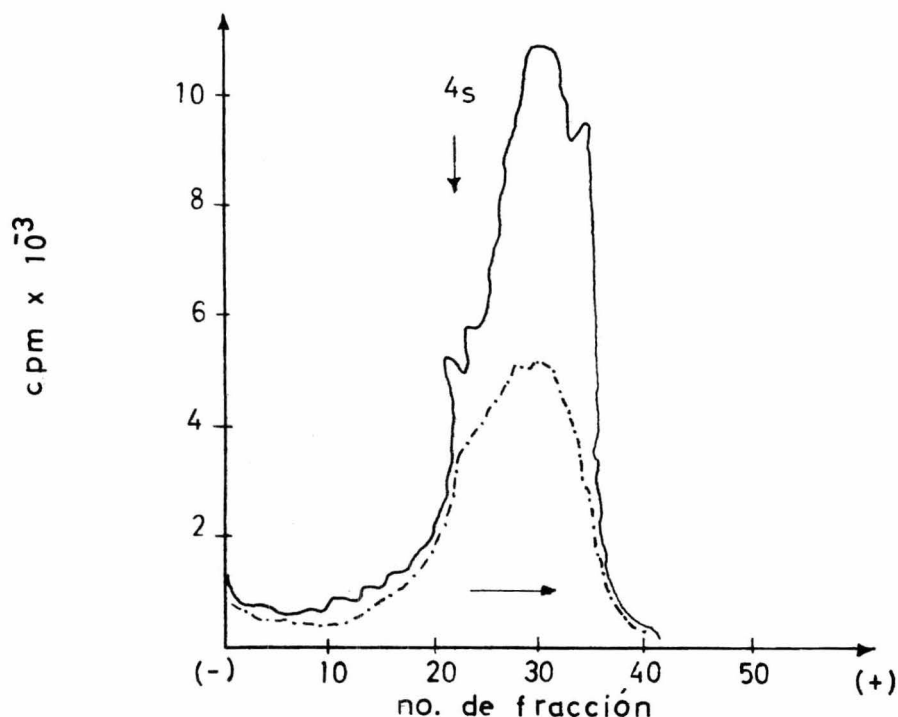


Gráfica: 10 Electroforesis en zeles de poliacrilamida de los ARN's del experimento 2, tratados con una mezcla de ribonucleasas (1 U de cada enzima/25 $\mu$ g de ARN) durante 1:30 hrs. a 37°C. Se usaron 200 $\mu$ g de cada muestra de ARN. (—) ARN obtenido de tejido tratado con 2,4-D, (- - -) ARN obtenido de tejido no tratado. La flecha vertical indica la movilidad del rRNA usado como referencia.

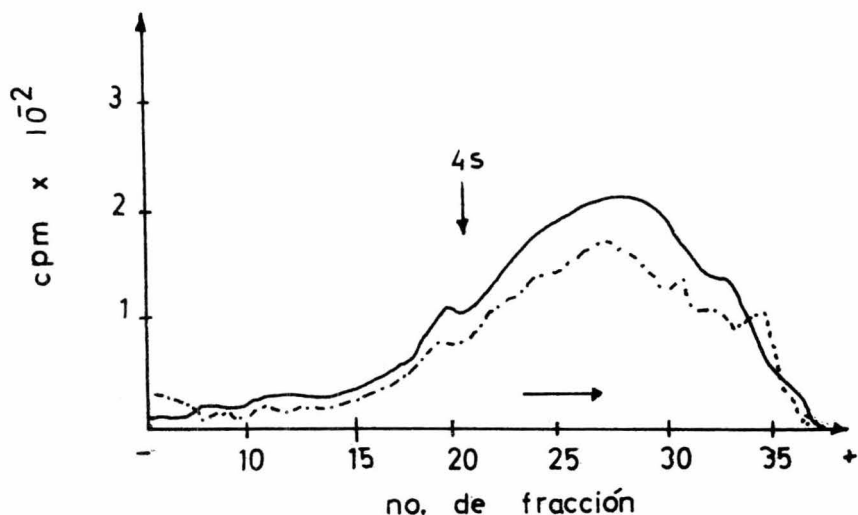




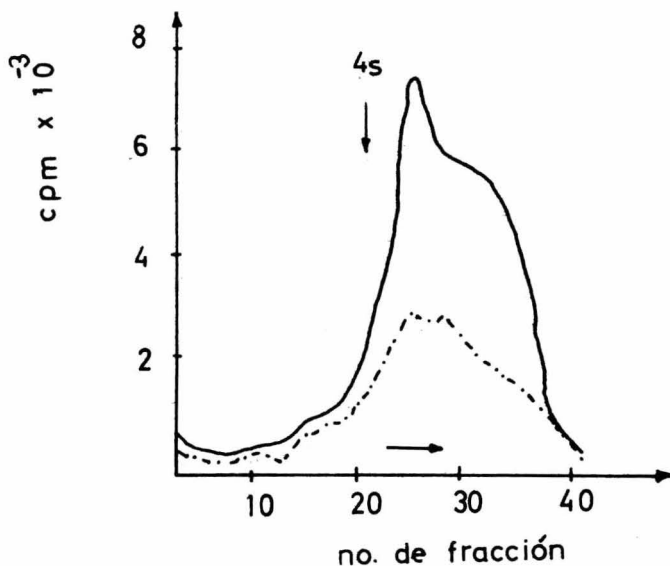
**Gráfica:11** Electroforesis de los ARN's del experimento 4 tratados con una mezcla de enzimas (la misma que para la gráfica 10) durante un tiempo de 1:30 hrs. a 37°C y en buffer pH 7.5 se usaron 150  $\mu$ g de cada ARN. (—) ARN obtenido de tejido tratado con ,4-D y (-.-.) ARN obtenido de tejido no tratado.



Gráfica :12 Patrón de distribución de radioactividad del análisis electroforético de una muestra de ARN's tratados con una mezcla de ribonucleasas ( 2 U de cada enzima por cada 25  $\mu$ g de ARN) durante 2:30 horas a 37°C y en buffer pH 7.5. Se usieron aproximadamente las mismas cantidades de ambos ARN's. (200 $\mu$ g de c/u) (—) ARN polisomal obtenido en el experimento 2, de coleótilos de trigo incubados en presencia de 2,4-D y A-H<sup>3</sup>, (---) ARN polisomal obtenido en el mismo experimento pero de tejido no tratado con 2,4-D.



**Gráfica 13** Patrón de distribución de ARN polisonal tratado durante 3 horas con una mezcla de ribonucleasas (3U de cada enzima/25ug de ARN). El ARN se calentó brevemente a 90°C durante 3 min. y se enfrió rápidamente. Se incubaron 100 ug de cada ARN. La electroforesis se llevó a cabo en geles de 10 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro. El tiempo de corrimiento fue de 20 min. a 1mA/gel y de 5:30 hrs. a 5 mA/gel. Se usó como estándar de corrimiento una muestra de ARNt de *E. coli*. (—) ARN obtenido de tejido tratado con 2,4-D y (---) ARN obtenido de tejido no tratado.



**Gráfica: 14** Patrón de distribución de radioactividad de ARN polisomal, tratado con una mezcla de ribonucleasas (misma que 13) durante 3 horas. Se calentó previamente el ARN a 60°C durante 2 min. y se enfrió rápidamente. La incubación se hizo a 37°C. Se usaron - 150  $\mu$ g de ARN de cada muestra. (—) ARN obtenido de tejido tratado con 2,4-D y (---) ARN obtenido de tejido no tratado.



TABLA V

gráfica	tratamiento	ug RNA	cpm totales.	cpm recup.	% recup.
8	+ Aux	95.5	37 436	31 843	85
	- Aux	127.5	22,567	18,938	85
10	+ Aux	2.00	278 400	140 085	50
	- Aux	2.00	125 400	62 225	49
11	+ Aux	150	21 000	6026	28
	- Aux	150	11 400	3409	28
12	+ Aux	200	278 400	117 000	41
	- Aux	200	125 400	44 513	36
13	+ Aux	150	208 800	92 000	44
	- Aux	150	75 050	24 000	32
14	+ Aux	100	14 000	3 420	24
	- Aux	100	7 600	2 041	26

Tabla de recuperación de radioactividad en los geles, se sacaron los porcentajes de recuperación en base a la radioactividad que tenía la muestra hidrolizada y la determinada al cortar el gel.

### C) CONCLUSIONES:

De los datos presentados se puede concluir lo siguiente:

El 2,4-D incrementa la incorporación de marca en la fracción polisomal del ARN (Tabla IV).

Analizando los datos de la Tabla IV se puede decir que la poza no es el factor determinante.

De la tabla IV se observa que el contenido de ARN polisomal no cambia; para explicar el incremento en incorporación de marca, el aumento debe de ser en una fracción que no contribuya en gran parte a la cantidad de ARN polisomal total, esta fracción es el ARNm y estaría de acuerdo con la diferencia de incorporación de marca obtenida cuando se usa Uridina o cuando se usa Adenina como marcador.

El incremento de incorporación de marca en el ARN mensajero se debe al aumento del número de especies del ARNm ricas en poli A y no a la elongación de los fragmentos de poli A de cada molécula de ARNm sintetizada (gráficas 8-14).

VI.-BIBLIOGRAFIA:

- 1.-Jensen, W.A. "The Plant Cell" Ed. Macmillan, 7a. edición 1973
- 2.-Salisbury, F.B. "vascular Plants, form and function" Ed. Macmillan. 2a. edición 1973
- 3.-Phillips, I.D.J., 1971 "Introduction to the Biochemistry and Physiology of plant growth substances". Ed. McGraw Hill Book Co.
- 4.-Milner, P. and Varner, J.E., 1967 Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58 , 1520
- 5.-Ahsford, A.E. and Jacobsen, J.V. 1974 Planta 120, 81
- 6.-Zwar, J.H. and Jacobsen, J.V. 1972 Plant Physiol. 49 , 100
- 7.-Mismo que 3
- 8.-Lawson, V.R. et. al. Plant Physiol. 1975. 55, 1062
- 9.-Muir, R.M. and Chang, K.C. Plant Physiol. 1974 54, 286.
- 10.-Ray, P.M. "La planta viviente" Ed. Holt, Rinehart and Wiston, Inc. 1963
- 13.-Audus, L.J. In " Plant growth substances" Vol I Chemistry and physiology. Ed. Leonard Hill, 1972
- 14.-Schneider, E.A. and Whightman, 1974. Annu. Rev. Plant Physiol. 3 487
- 15.-Black, P.S. and R.H. Hamilton 1971, Plant Physiol. 48, 603
- 16.-Wight, F. 1973, Biochem. Soc. Symp. 38, 247
- 17.-Mismo que 16 y 28
- 18.-Sheldrake, R.A. and D.H. Northcote, 1968. Nature 217, 195
- 19.-Schneider, E.A. and Wightman. 1974, Annu. Rev. Plant Physiol 25, 487
- 20.-Wightman, F. 1973 Biochem. Soc. Symp. 38, 247
- 21.-Tuli, V. and H.S. Moyed, 1969. J. Mol. Biol. 244, 4916
- 22.-Basu, P.S. and V. Tuli. 1972 Plant Physiol. 50, 499

- 23.-Sotiner, T et.al. 1970. *Physiol. Plan.* 23, 775
- 24.-Audus, L.J. 1964. "In The physiology and Biochemistry of herbicides" Ed. Academic Press, N.Y.
- 25.-Birch, A.J. et.al. 1958. *Proc. chem. Soc.* 192
- 26.-Nadeau, R. and Rappaport, L. 1974, *Plant. Physiol.* 54, 809
- 27.-Lang, A. 1965, "In Hanbook of Plant Physiology" Ed. W. Ruhland, 15, 1380
- 28.-Plogler, C.E. And Dahmus, M.E., 1974. *Plant Phisol.* 54, 88
- 29.-Skoog, F.F. and M. Strong and C.o. Miller., 1965, *Science.* 148, 532.
- 30.-Miller, C.O. et. al. 1955 *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1392
- 31.-Hall, R.H., 1973 *Annu. Rev. Plänt. Physiol.* 24, 415
- 32.-Kende, H. 1971, *International Review of Cytology*, 31 301
- 33.-Skoog, F. 1970. *Anne. Rev. Plant. Physiol.* 21, 359
- 34.-Letham, D.S. et.al. 1964. *Proc. Chem. Soc.*, pag. 230.
- 35.-Addicott, F.F. et, at. 1968. *Science*, 159, 1493
- 36.-Noddle, R.C. and Robinson, D.R. 1969 *Biochem. J.* 112, 547
- 37.-Taylor, H.F. and T.A. Smith. 1967, *Nature.* 215, 1513
- 38.-Ihle, J.N. and Dure, L. III. 1970. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 38, 995
- 39.-Chen, D. and Osborne, E.J. 1970 *Nature* 226, 1157
- 40.-Davies, L.A. and Addicott, F.T. 1972 *Plant. Physiol.* 49, 644
- 41.-Wright, S.T.C. and Hiron, R.W. 1969. *Nature* 224, 719
- 42.-Wriqt, S.T.C. 1969. *Planta.* 86, 10
- 43.-Milborrow, B.V. and Noodle, P.C. 1970 *Biochem. J.* 119, 727
- 44.-Cummins, W.R. Kende, H., and Raschke, K. 1971 *Planta* 99, 347
- 45.-Raschke, K. 1975. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 26, 309
- 46.-Taylor, H.F. and Smith, T.A. 1967 *Planta* 103, 263
- 47.-Firn, R.D. and Friend, J. 1972 *Nature*, 215 1513
- 48.-Milborrow, B.V. 1974a. *Annu. Rev. Plant. Phyiol.* 25 259



- 49.-Milborrow,B.V. 1970 J. Exp. Bot. 21,17
- 50.-Milborrow,B.V. 1969 Chem.Comm. pag. 966
- 51.-Tinelli,E.T.,Sondheimer,E.,and Walton,D.C. 1973 Tetra-  
hedron Let. pag. 139
- 52.-Leeberman,M.et.al.Plant Physiol. 41,376. 1966
- 53.-Burg,S.P. and Clagett,C.O. 1967 Biochem.Biophys.Res.  
Commu., 27,125
- 54.-Mapson,L.W. 1970 Endeavour 39,29
- 55.-Skoog,F.1954. Sustances involved in normal growth diffe-  
rentiation of plants. Brookhaven Symp.Biol. 6(BNL 258),1
- 56.-Giles,K.W. and Meyers,A. (1966) Phytochemistry 5,193
- 57.-Nitsan,J.and Lang,A.,1966 Plant Physiol.Lancaster 41,965
- 58.-Hanson,J.B. and Slife,F.W. 1969 Residue Rev. 25,56
- 59.-Cherry,J.H. 1967a.Symp.Soc.Exp.Biol. 21,24
- 60.-Wollgiehn,R.1967 Symp.Soc.Exp.Biol. 21,179
- 60.Simon,E.W. 1967 Symp.Soc.Exp.Biol. 21,215
- 62.-Woolhouse,H.W. 1967 Symp.Soc.Exp.Biol. 21,21
- 63.-Key,J.L.1964 Plant.Physiol. 39, 365
- 64.-Key,L.and J.Ingle,1968 Biochemistry and Physiol pf Plant  
growth sustances.Ed.F.Wghtman and G.Setterfield.Runge Press  
Otawa.
- 65.-Nooden,L.D. and K.V. Thimann, 1963 Proc.Nat.Acad.Scie.(USA)  
50,194
- 66.-Nooden,L.D. and K.V. Thimann. 1965 Plant Physiol. 40,193
- 67.-(" " ) 1966 Plant Physiol 41,157
- 69.-Nooden,L.D. 1968 Plant.Physiol. 43,140
- 70.-Key,J.L. and J.B.Hanson.1961,PlantPhysiol. 36,145
- 71.-Tester,C.F. and Dure,J.S. 1967,Biochem. 6,2532
- 72.-Fan,P.F. and G.A. MacLachlan, 1967a Plant Physiol. 42,1114
- 73.-Datko,A.T.and J.C.Maclachlan. 1968 Plant.Physiol. 43,735
- 74.-Key,J.L. and Shannon,1964.Plant.Physiol. 39,360
- 75.-Arnuelsen,T.A. and Galston,A.W. 1966 Physiologia Pl.19,167

- 76.-Davies, D.D., Patterson, B.D. and Trewavas, A.J. 1969, Plant growth regulators, monograph no. 31 Soc. Chem Ind. pp208
- 77.-Missod, R. et.al. 1971 Biochem. Biophys. Acta. 224, 423
- 78.-Masuda, Y. and Kamisaka. 1969 Plant and Cell Physiol. 10, 79
- 79.-Masuda, Y. and Tanimoto, E. 1967. Plant and Cell Physiol. 8, 458
- 80.-Key, J.L. and J.C. Shannon, 1964. Plant Physiol. 39, 360
- 81.-Davies, E. and MacLachlan, G.A. 1968. Archs. Biochem. Biophys. 128, 595
- 82.-Trewavas, A. 1968a. Arch. Biochem. Biophys. 123, 324
- 83.-Trewavas, A. 1968b. Phytochem. 7, 673
- 84.-Masuda, Y. 1968a. Biochemistry and physiology of plant growth substances. Ed. Whitmann and G. Setterfield. Runge Press, Ottawa.
- 85.-Tanimoto, E. and Y. Masuda. 1969. Plant and Cell Physiol. 10, 485
- 86.-Masuda, Y. Tanimoto, A. And Wada, S. 1967 Physiol. Plant. 20, 713
- 87.-Masuda, Y. and Tanimoto, E. 1967. Plant and Cell Physiol. 8, 459
- 88.-Missod, R. et.al. 1971 Biochem. Biophys. Acta. 224, 423
- 89.-Esnault, R. 1968. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 50, 1887
- 90.-Key, J.L. 1966. Plant Physiol. 41, 1257
- 91.-Mismo que 82
- 92.-Key, J.L. 1966. Plant. Physiol. 41, 1257
- 94.-Mismo que 64
- 93.-Key, J.L. and J. Ingle, 1964 Proc. Nat. Aca. Sci. (USA) 52, 1382
- 95.-Key, J.L. et.al. 1967. Annu. N. Y. Acad. Sci. 144, 49
- 96.-Mismo que 71
- 97.-Key, J.L. et.al., 1967. Annu. N. Y. Acad. Sci. 144, 49
- 98.-Mismo que 64
- 99.-Key, J.L. 1964. Plant Physiol. 39, 365
- 100.-Ray, P.W. and Ruesink, A.W. 1962. Devl. Biol., 4, 377
- 101.-Nissl, D. And M.H. Zenk. 1969. Planta 89, 323
- 102.-Burtrom, H.G. et.al. 1970 Physiol. Pl. 23, 1223
- 103.-Masuda, Y. and Kamisaka, S. 1969 Plant. Cell Physiol. 10, 79

- 104.-O'Brien, T.S., B.C. Jarvis, J.H. Cherry and J.B. Hanson. 1968  
Biochem. Biophys. acta. 169, 35
- 105.-Matthyse, A. and C. Phillips, 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)  
68, 897
- 106.-Hardin, J.W. et.al. 1972. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69, 3146
- 107.-Hardin, J.W. and J.H. Cherry, 1972. Biochem. Biophys. Res. Commu.  
48, 299
- 108.-Mismo que 106
- 109.-Yamada, Y. and T. Yasuda, M. Koge. 1971. Agr. Biol. Chem. 35, 99
- 110.-Mismo que 106
- 111.-Fellenberg, G. 1969a. Planta 84, 195
- 112.-Fellenberg, G. 1969b. Planta 84, 324
- 113.-Fellenberg, G. Planta, 95, 359, 1970
- 115.-Yasuda, T. and Y. Yamada, 1970. Biochem. Biophys. Res. Commu. 40,  
649
- 114.-Guifoyle, T.C. et.al. 1974. Plant Physiol. 53, no. 1
- 116.-Yasuda, T. and Y. Yamada. 1971 FEBS Letters. 18, 115
- 117.-Davies, P.J. 1973. Bot. Rev. 39, 139
- 118.-Bamberger, E.S. 1971. Phytochem. 10, 957
- 119.-Grieshaber-Schenber, P. and G. Fellenberg. 1972 Pflanzenphysiol.  
66, 106
- 120.-Kamisaka, S. and Y. Masuda. 1971. Plant Cell Physiol. 12, 201
- 121.-Spiker, S. and R. Chalkley, 1972. Planta 102, 362
- 122.-Pilet, P.E. and R. Braun. 1970 Physiol. Pl. 23, 245
- 123.-Bendaña, F.E. and A.W. Glaston 1965. Science 150, 69
- 124.-Patterson, B.D. and A.J. Trewavas. 1967 Plant Physiol. 42, 1081
- 125.-Fan, D.F. and G.A. MacLachlan. 1966, Can. J. Bot. 44, 1025
- 126.-Fan, D.F. and G.A. MacLachlan. Plant Physiol. 42, 1114 (1967a)
- 127.-(" " " ) 1967b Can. J. Bot. 45, 1837
- 128.-MacLachlan, G.A. et.al. 1968. Biochemistry and Physiology of  
plant growth substances. Ed. T. Wightmann and G. Sutterfield.

- 129.-Tanimoto, E. and Y. Masuda, 1968, *Physiol. Pl.* 21, 820
- 130.-Masuda, Y. and R. Yamamoto, 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 63, 879.
- 131.-Ray, P. W. 1973. *Plant Physiol.* 51, 609
- 132.-Evans, W. L. et. Al. 1971 *Plant Physiol.* 47, 335
- 133.-Rayle, D. L. and R. Cleland, 1970. *Plant Physiol.* 46, 250
- 134.-Hangel, A. et. al. 1971. *Planta*, 100, 47
- 138.-Rayle, D. L. 1973. *Planta*, 114, 63
- 135.-Rayle, D. L. and R. Cleland, 1972, *Planta*, 104, 282
- 136.-Kenneth, D. et. al. 1974 *Plant Physiol.* 53
- 137.-Cleland, R. 1973, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 70, 3092
- 139.-Johnson, D. et. al. 1974 *Plant Physiol.* 53, 224
- 140.-Devies, E. et. al. 1972. *Plant Physiol.* 50, 581
- 141.-Gorski, J., Morrison, R. et. al. *J. mol. Biol.* 86, 363, 1974
- 142.-Bray, G. A. 1960. *Analytical Biochemistry*, 1, 279
- 143.-Kurland, C. G. 1960. *J. Mol. Biol.* 2, 83
- 144.-Brawerman, G. Mendecki, J. and Se yong Lee. 1972. *Biochem.* 11, 637
- 145.-Schultz, G. A., Chen, D., Katchalski, E. 1972. *J. Mol. Biol.* 66, 379
- 146.-Castañeda, M. and Santiago, R. *Basic Life Sciences I, Gene expression and its regulation*, Alexander Hollander, Ed. pag. 267. 1973
- 147.-Dingman, W., and Sporn, M. *Biochim. Biophysica acta*, 61, 164. 1973
- 149.-Gordon, H. A. *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*, American Elsevier Publishing Co. (New York) 1969