

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



SEMEJANZA A NIVEL MOLECULAR DE LOS
GENOMAS DE VARIOS GENEROS
DE TRIGO Y CENTENO

222

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

p r e s e n t a

ALEJANDRO OTTO MEYER WILLERER

-1974-



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE Prof. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.
VOCAL Prof. GUADALUPE VELEZ PRATT.
SECRETARIO Prof. JOSE DE JESUS MANRIQUE.
1er. SUPLENTE Prof. MAGDALENA OLIVA DE GARCIA.
2o. SUPLENTE Prof. PAULINA CASTRO ARDON.

Sitio donde se desarrolló el tema: DEPARTAMENTO
DE BIOQUIMICA, DIVISION DE ESTUDIOS SUPE-
RIORES, FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

Sustentante: ALEJANDRO OTTO MEYER WILLERER

Asesor del tema: DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.

A MI FAMILIA

AL PROFESOR JULIO TERAN

A MIS AMIGOS

A CARMEN

A LA DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
CON SINCERO AGRADECIMIENTO POR SU
APOYO Y ORIENTACION EN EL DESARROLLO
DE ESTA TESIS.

CON ESTIMACION Y AGRADECIMIENTO POR
SU ASESORAMIENTO DE ESTE TRABAJO
A LA DRA. GUADALUPE VELEZ PRATT
Y AL DR. JOSE DE JESUS MANRIQUE

MI AGRADECIMIENTO SINCERO AL
DR. MAN MOHAN KOHLI
A LA DRA. MARGARITA DE SOSA
AL DR. RUBEN SOSA
Y AL DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
POR SU VALIOSA AYUDA EN EL
DESARROLLO DE ESTA TESIS

A MIS MAESTROS

From where comes the wheat, the blessed grass
which gives us our bread ?

Nobody knows..

.....J. Henri Fabre

T E S I S
SEMEJANZA A NIVEL MOLECULAR DE LOS GENOMAS DE VARIOS
GENEROS DE TRIGO Y CENTENO

I N D I C E.

	Páginas
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	5
1.- Aspectos generales de los cereales.	
✓ 2.- Generalidades sobre ADN.	
✓ 3.- ADNs en plantas.	
4.- ADNs en trigo y centeno.	
MATERIALES	31
METODOS EXPERIMENTALES	35
1.- Selección de las semillas.	
2.- Siembra.	
3.- Germinación.	
4.- Selección de raices y tallos.	
✓ 5.- Ruptura de los tejidos.	
✓ 6.- Obtención de paquetes de tejido total roto.	
✓ 7.- Obtención de paquetes nucleares.	
✓ 8.- Extracción y precipitación de los ácidos nucléicos.	
✓ 9.- Purificación con enzimas.	
10.- Diálisis.	
✓ 11.- Características espectrofotométricas de los ADNs.	

	Páginas
RESULTADOS	50
✓ 1.- Germinación y rendimiento de tejido	
✓ 2.- Obtención de núcleos	
✓ 3.- Espectros de Absorción y criterios de pureza	
✓ 4.- Rendimiento de ADNs	
✓ 5.- Determinación de las temperaturas de fusión (T _m) de los ADNs	
6.- Datos correspondientes a las cinéticas de reasociación	
7.- Curvas de cinéticas de reasociación invertidas	
8.- Cálculos para corregir las pendientes	
9.- Cálculos para la determinación de la cantidad de pares de nucleótidos en cada familia	
10.-Contenido de pares de nucleótidos por genoma	
11.-Repetición de cada familia en el Genoma	
12.-Porcentaje de contribución de cada familia en el genoma	
DISCUSION	88
CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFIA	96

INTRODUCCION.

Esta tesis fue enfocada hacia el estudio de las propiedades moleculares de los genomas de trigo, centeno y triticale para un mejor entendimiento del comportamiento y mejoramiento de estas plantas de cultivo, tomando en cuenta la producción de trigo en México, que forma una parte muy importante en el desarrollo económico y social de la Nación.

En la última década se han llevado a cabo experimentos para la obtención de granos de trigo utilizando variedades mexicanas enanas y semienanas obteniendo de esta forma híbridos resistentes a enfermedades y sin tener problemas en la cosecha ni problemas de almacenamiento.

El desarrollo y distribución de éstas variedades con propiedades óptimas (Pénjamo 62, Sonora 63, Lerma Rojo 64, etc.), condujeron a una mayor fertilidad, por lo que resultó un incremento fenomenal en la producción nacional de granos (1000 kg/hectárea) durante los primeros años de la década de los sesentas.

El impacto de estas variedades ha sido tan grande, que han desplazado a las variedades comunes hasta por un 95% de las áreas cultivables de trigo en México (1).

No obstante lo anterior, se pensó en la posibilidad de obtener un híbrido el cual fuera utilizable en diversas regiones climatológicas presentando cier-

ta facilidad de adaptación a ellas, ya que existe el precedente de que ciertas variedades de híbridos de trigo no son aplicables a zonas de cultivo, para lo cual se experimentó con híbridos de trigo y centeno, los cuales empezaron a ser estudiados desde 1876 por Wilson (2). A partir de entonces se han hecho muchos intentos para incorporar características agronómicas valiosas de ambos géneros en una sola especie.

En general se encontró que si existe una gran diferencia genética entre los padres con alta capacidad de producción, los híbridos obtenidos son mejores (3), pudiéndose aprovechar ésto para la obtención de semillas de interés Nacional.

ANTECEDENTES.

1.- Aspectos generales de los cereales:

Los estudios acerca del origen y evolución de un número de cereales han indicado que todos ellos han seguido esencialmente los mismos pasos desde pastos silvestres hasta plantas cultivadas y que la domesticación de gramíneas en particular y que las cosechas de semillas en general tienen muchos rasgos en común.

La taxonomía de plantas cultivadas ha dado lugar a una serie de confusiones, por lo que se ha preferido la clasificación de pozas genéticas sugerida por Harlan y de Wet (4) con el propósito de tratar a los distintos cereales conforme a una base uniforme, dando a conocer con este sistema todas las posibilidades de variación dentro de un acercamiento genético máximo dividido en pozas genéticas primarias, secundarias y terciarias.

La poza genética primaria incluye a todas las razas que puedan ser cruzadas por medio de los granos, produciendo híbridos razonablemente fértiles en los cuales los cromosomas se aparean bien y cuyos descendientes tienen una segregación genética normal. La poza genética primaria corresponde al concepto ampliamente aceptado de las especies biológicas.

La poza genética secundaria incluye a todas aquellas especies que puedan ser cruzadas con los granos, pero con restricciones en la fluidez de los genes. Los genes pueden ser transferidos de una poza genética secundaria a una primaria, pero se tienen problemas con aquellas barreras que separan a las especies biológicas tales como la esterilidad, deficiente apareamiento cromosómico, híbridos débiles ó letales, ó derivados de híbridos de poca adaptabilidad, etc.

La poza genética terciaria incluye a todas las especies que pueden ser cruzadas con los granos, pero los híbridos no dan resultado alguno, debido a que son letales, completamente estériles o anormales. Si es que existe la posibilidad de la transferencia de genes, debe de ser a través de manipulaciones radicales de alguna forma tales como el cultivo de embriones, cultivo de tejidos, etc., (4).

Esta clasificación de pozas genéticas (5) no tiene la intención de ser un sistema taxonómico aparente, pero sí una disposición sencilla para enfocar genéticamente las propiedades taxonómicas ya conocidas. Las pozas primarias y secundarias de algunos cereales se muestran en la TABLA 1, (5).

La evolución de los cereales se piensa que ha sucedido casi totalmente dentro de la poza genética primaria. Se ha podido demostrar en el caso del trigo,

Tabla 1.

POZAS GENETICAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DE ALGUNOS CEREALES*.

<u>Siembra</u>	<u>Nivel de</u>	<u>POZA GENETICA PRIMARIA</u>			<u>POZA GENETICA SECUNDARIA</u>		
		<u>Ploidía</u>	<u>Subespecies</u>		<u>Razas Silvestres</u>	<u>Razas herbáceas</u>	
			<u>Cultivadas</u>				
Einkorn	2 X	T. monococcum	T. boeoticum	T. boeoticum	T. S.	Aegilops	
Emmer	4 X	T. dicoccum	T. dicoccoides	Ninguno	T. S.	Aegilops	
Timopheevii	4 X	T. timopheevi	T. araraticum	T. timopheevi	T. S.	Aegilops	
Trigo harinero	6 X	T. aestivum	Ninguno	Ninguno	T. S.	Aegilops	
Centeno	2 X	S. cereale	S. cereale	S. cereale	T. S.	Aegilops	
Cebada	2 X	H. vulgare	H. spontaneum	H. spontaneum	Ninguno		
Avena	2 X	A. strigosa	A. hirtula	A. strigosa	Avena spp.		
Avena	6 X	A. sativa	A. sterilis	A. sterilis	Avena spp.		
				A. fatua			
Arroz	2 X	O. sativa	O. rufipogon	O. rufipogon	Oryza spp.		
Arroz africano	2 X	O. glaberrima	O. barthii	O. stapfii	Oryza spp.		
Sorgo	2 X	So. bicolor	So. bicolor	So. bicolor	So. halpense		
Mijo	2 X	P. americanum	P. violaceum	P. americanum	P. purpureum		
Maíz	2 X	Z. mays	Z. mexicana	Z. mexicana	Tripsacum spp.		
					Z. perennis		

* Formada por J.R. Harlan et. al. (5)

Abreviaciones: T.= Triticum; S.= Secale; H.= Hordeum; A.= Avena; O.= Oryza; So.= Sorghum
P.= Pennisetum; Z.= Zea.

que durante su evolución ha habido alguna contribución de la poza genética secundaria. El genoma D de Aegilops squarrosa fue adicionado al trigo tetraploide (6) después de su domesticación y recientemente se ha adicionado el genoma Secale a los trigos tetraploides y hexaploide para producir de ésta manera los Triticales. Como mencionaba Harlan (7), el trigo es un poliploide bien amortiguado que puede aguantar un choque genético de citoplasma extraño mucho mejor que los diploides amortiguados débilmente (5).

El conocimiento de la homología de los genomas y de las tendencias evolutivas en la tribu Triticeae, la cual incluye a los géneros Triticum y Aegilops, que son ejemplos clásicos de series poliploides, provee al científico de hoy oportunidades únicas para la inducción y explotación de mutantes (8).

El trigo común ó harinero, (Triticum aestivum) es un allo-hexaploide con 42 cromosomas. Los otros trigos de importancia para el cultivo, tales como el Triticum durum, son allo-tetraploides con 28 cromosomas. Ambos se piensa que son derivados de híbridos entre especies diploides dentro de la subtribu Triticinae. McFadden y Sears (9) y Kihara (10), han designado como uno de los ancestros diploides al Triticum monococcum, el cual contribuye con uno de los genomas, el A, que se encuentra en ambos trigos antes mencionados, en el tetraploide AABB y en el he-

xaploide AABBDD.

Se había aceptado en forma general, que el Triticum speltoides era la fuente del genoma B. No ha sido posible desafortunadamente demostrar esta hipótesis de la homología o no homología de los cromosomas, debido a que el Triticum speltoides suprime la actividad regulatoria del cromosoma 5B del trigo y por lo tanto permite el apareamiento no sólo de cromosomas homólogos, sino también de los homoeólogos (o cromosomas relacionados). En una revisión efectuada por Kimber y Athwal (11), se analizaron las posibilidades de que el genoma B en trigo provenga de Triticum speltoides basándose en estudios morfológicos y cariotípicos (12), así como evidencias geográficas (13), y estudios cuantitativos de las afinidades de apareamiento de 5 grupos de cromosomas homoeólogos y el cromosoma correspondiente a Triticum speltoides (14), no obstante la variedad de formas en que se ha atacado el problema, no existen evidencias de suficiente peso para apoyar en forma definida el origen del genoma B en trigo y una de las razones por la cual podría atribuirse a Triticum speltoides es por su localización geográfica, la cual no ha sido estudiada; por lo tanto no se puede atribuir al genoma B un origen específico (15).

De estudios extensos citológicos, ecológicos y morfológicos, parece que el centeno cultivado (Se-

cale cereale L.) fue originado de productos herbáceos derivados de cruces entre Secale montanum y Secale vavilovii, éste último parece ser un descendiente de Secale silvestre a consecuencia de una translocación cromosomal. Secale silvestre a su vez fue derivado de Secale montanum ó un ancestro común. Secale africanum, Secale dalmaticum, Secale ciliatoglume y Secale kulprijanovii parecen ser variedades ligeramente modificadas aisladas de Secale montanum. Las variedades de Secale anatolicum son formas herbáceas de Secale montanum genealógica y cromosomalmente distintas de las formas anuales herbáceas de las cuales surgió Secale cereale, (16). Ver FIGURA 1.

Los cromosomas del trigo común (Triticum aestivum L.) han sido atribuidos a siete grupos homoeólogos. Cada grupo contiene un cromosoma de cada uno de los tres genomas del trigo hexaploide, estando relacionados genéticamente los tres cromosomas y generalmente siendo de un origen común. Esta similitud genética fue demostrada por Sears (17). Los otros cuatro géneros de la subtribu Triticinae todos tienen como número cromosómico básico siete. Por lo tanto es posible que los cromosomas de éstos géneros puedan ser también adscritos a estos siete grupos homoeólogos como los definidos en el trigo.

En una recopilación efectuada por Rosalind Morris, se pueden apreciar todos los estudios efectua-

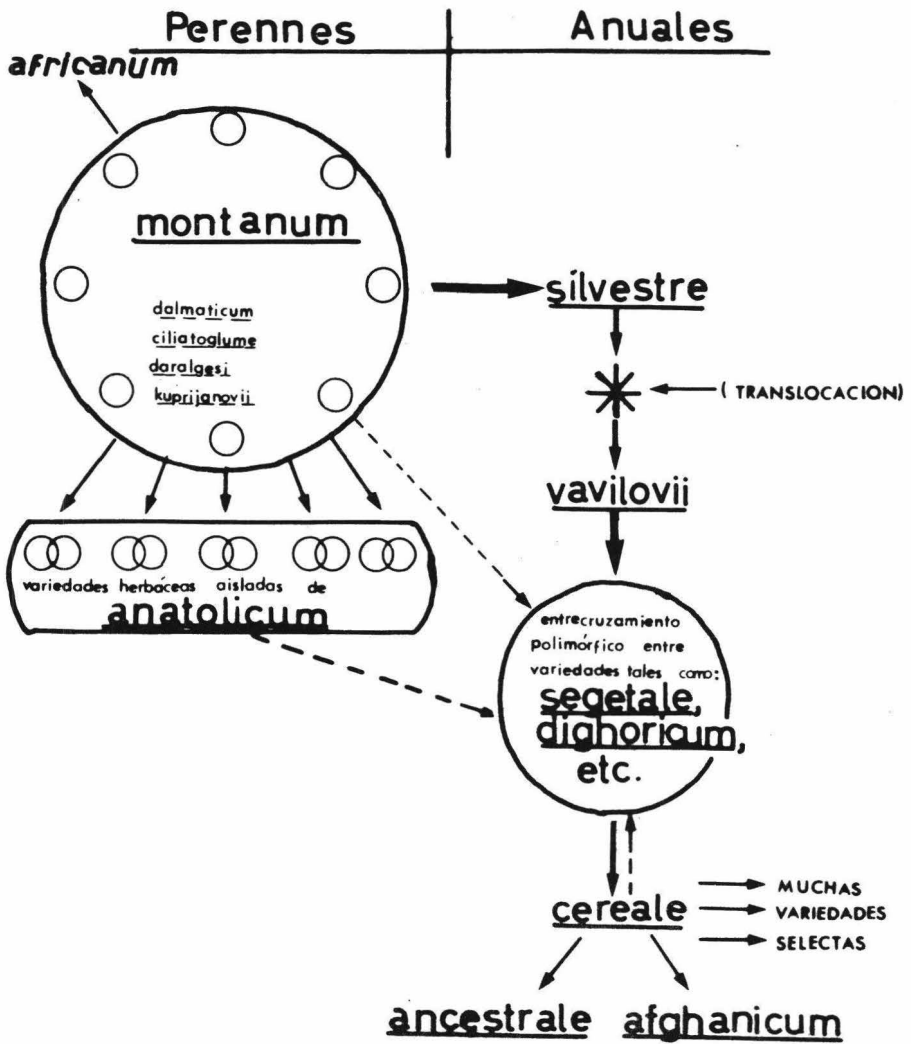


FIGURA 1.- Relaciones Filogenéticas en el género *Secale* L.

dos en las localizaciones cromosomales de genes para los diferentes caracteres en trigo (18).

Debido a que los cromosomas de centeno no se aparean con los de trigo, uno depende de evidencias indirectas para poder averiguar las relaciones de homeología. Los efectos de compensación de un cromosoma de centeno por ausencia de varios cromosomas de trigo pueden estudiarse de la misma manera que para los híbridos entre diversas variedades de trigo (19).

Debido a que los cromosomas de centeno (Secale cereale) no se pueden diferenciar individualmente, a excepción del cromosoma con satélite, se ha experimentado un sistema estándar con translocaciones establecidas para una clasificación inequívoca, utilizando un método gráfico especial que relaciona las proporciones de los brazos de los cromosomas durante la mitosis (20).

Se puede utilizar la ausencia de heterocromatina en las regiones centrómeras y su presencia en las terminaciones de los cromosomas de centeno, para facilitar su identificación de aquellos que provienen del trigo, en el caso que se quieran identificar los diferentes cromosomas en un genoma de Triticale (21).

Las variaciones de cromosomas de varias clases de triticales hexaploides han sido estudiadas, encontrando un promedio de la frecuencia de euploides ($2n = 42$) de 81.5% con un rango de 57.2% hasta un 100%. Se

recomienda a los investigadores que trabajan con Tri-ticale que verifiquen en forma de rutina los mapas cromosómicos de estos híbridos (22), utilizando las puntas de las raíces sin tener que destruir al resto de la planta para una probable utilización posterior de ésta (23).

Love y Craig (24), Gaines y Stevenson (25), y Leighty (26,27) revisaron la literatura en hibridaciones trigo-centeno intentadas por Wilson, Carman, Rimpau, Signa, Schiephacke, Miczynski, Nakao, Tschermak, Jesinko, Blackhouse y Mcfadden (28). Estos autores obtuvieron híbridos F_1 cruzando el trigo con polen de centeno.

Gaines y Stevenson (25), Tschermak (29), y Bledsoe (30) obtuvieron híbridos F_1 de cruzas recíprocas entre trigo y centeno. Reportan que los híbridos formados por trigo (femenino) y centeno (masculino) se asemejan más al trigo que aquellos híbridos formados de la cruzada recíproca. Bledsoe (30) reportó que los híbridos F_1 de centeno (femenino) y trigo (masculino) se semejan más al centeno en los caracteres vegetativos en los primeros estados de crecimiento de la planta, y que los caracteres esenciales eran similares a los del trigo y a los de los productos de cruzas entre trigo (femenino) y centeno (masculino).

Robbelen y Smukupt (31) obtuvieron anfidiploi-

des inducidos con colchicina de cruza recíprocas del centeno "Petkuser Spring" y del trigo "Chinese Spring".

Centeno "Prolific Spring" fue cruzado con polen de trigo "Chinese Spring", y el genoma del trigo fue sustituido en el citoplasma del centeno por medio de cruza regresivas. Las plantas de trigo ($2n=42$), con citoplasma de centeno, presentaban esterilidad masculina completa, esterilidad femenina parcial, y el vigor de las plantas fue muy reducido. La adición de un cromosoma de centeno o un par de cromosomas de centeno al genoma de trigo, restauró la fertilidad masculina y el vigor de las plantas de trigo con citoplasma de centeno (28).

Parte de la diferencia en la producción de semillas podría ser atribuido al crecimiento relativamente lento de los tubos de polen de trigo en los estilos de centeno; por lo tanto los gametos masculinos no alcanzaron al saco embrionario para su fertilización. En particular, el haploide Secalotriticum tenía un tallo más corto (5 cm) que las plantas de Triticale correspondientes, y la aparición de la espiga fue 10 días antes en el Secalotriticum que en el recíproco.

Se han hecho muchos intentos para incrementar la fertilidad y calidad de los Triticales 6X, que son superiores en características de fertilidad y producción de semillas a la de los triticales 8X, pero que

aún no son tan buenas como las del trigo. Se ha pensado que la inestabilidad citológica es responsable de la baja fertilidad de los triticales (32). Riley y Chapman (33) indicaron que la baja fertilidad de los anfiploides trigo-centeno pudo haber resultado entre las interacciones de fenotipos adaptados a diferentes sistemas de crecimiento. Se sugiere que la viabilidad del polen no es un factor importante en la producción de semillas (32).

Bhatt (34) efectuó un estudio con el propósito de optimizar métodos de selección de los padres para la hibridación en trigo de cultivo con el objeto de aumentar el rendimiento de semillas. La aplicación del método de análisis multivariado para la selección de padres efectuando cruzas entre ellos con divergencia intergenotípica alta, resultó más eficiente que el método de selección de padres de acuerdo a su diversidad ecográfica. Los métodos convencionales y aquellos efectuados al azar fueron menos eficientes. Los datos relativos de estos cuatro sistemas mencionados anteriormente fueron obtenidos a partir de: (i) el rendimiento de los híbridos F_2 , (ii) la importancia y la variación en el rendimiento de líneas F_5 , y (iii) las posibilidades de entrecruzamientos útiles detectables en F_5 (34).

En los últimos años se han hecho intentos de hibridaciones entre diferentes gramíneas, entre ellos

Brink, et al (35) con *Hordeum X Secale*, Smith (36) con *Triticum X Agropyron*, Briggles (37) con *Triticum X Secale*, Garrish (38) y Mock et al (39) con *Zea X Sorghum*, Kruse (40) con *Hordeum X Triticum*, Siddiqui (41) con *Aegilops X Triticum X Secale*, etc; obteniendo en su mayoría híbridos con poca o ninguna fertilidad. Sin embargo se ha logrado obtener una serie de nuevos híbridos especialmente de trigo y centeno, trayendo ésto con sígo implicaciones taxonómicas y citogenéticas dando lugar a controversias sobre cómo nombrar a estos nuevos híbridos (42).

2.- Generalidades sobre ADN:

En 1869 Friedrich Miescher aisló por primera vez el ADN de células (43), éste no fue directamente identificado como material de información genética hasta 1943 por Avery y sus colaboradores (44). De éstos estudios se encontró que la cantidad de ADN de cualquier especie de célula u organismo es notoriamente constante y la cantidad de ADN que aparece por célula está en proporción a la complejidad de la misma y por lo tanto al contenido de información genética.

En el período de 1949 a 1953, Chargaff y sus colaboradores (45) efectuaron estudios sobre hidrolizados de especímenes de ADN aislados de diferentes organismos, llegando a las siguientes conclusiones: El ADN aislado de diferentes tejidos de las mismas especies tienen las mismas composiciones de bases; la composición de bases del ADN varía de una especie a otra; la composición de bases del ADN en una especie dada no cambia con la edad, estado nutricional, ó cambios en el medio ambiente; en casi todos los ADNs examinados, el número de residuos de adenina es igual al número de residuos de timina ($A=T$), y el número de residuos de citosina es siempre igual al número de residuos de guanina ($C=G$). Por lo tanto, se puede decir que la suma de residuos de purina

es igual a la suma de residuos de pirimidina: $A + G = C + T$. La composición de bases del ADN puede usarse para clasificar taxonómicamente a los organismos.

En 1953 Watson y Crick (46) postularon un modelo preciso de la estructura tridimensional del ADN, el cual estuvo basado sobre los datos de rayos X obtenidos por Franklin (47) y Wilkins (48) y los datos sobre equivalencias de bases observados por Chargaff (45). Este modelo no solamente explicaba muchas de las observaciones hechas sobre las propiedades físicas y químicas del ADN, sino que también sugirió un mecanismo con el cual la información genética podría ser replicada exactamente.

Este modelo consiste de dos cadenas polinucleotídicas helicoidales formadas a la derecha, enrolladas sobre el mismo eje, para formar una doble hélice. Las dos cadenas o bandas son antiparalelas, esto es, los puentes 3' y 5' fosfodiéster internucleotídicos van en direcciones opuestas.

Las bases púricas y pirimídicas de cada banda están acomodadas en la parte interior de la doble hélice, con sus planos paralelos de una a otra y perpendiculares a lo largo del eje de la doble hélice. Las bases de una banda están apareadas en los mismos planos con las bases de la otra banda, de tal manera que puedan formar puentes de hidrógeno entre ellas, lo cual se muestra en la FIGURA 2.

Este apareamiento de bases de acuerdo al modelo Watson-Crick (46) para la doble hélice, incluye no sólo el número máximo posible de puentes de hidrógeno entre pares de bases, sino también aquellos pares que le dan una máxima estabilidad.

Para explicar la periodicidad observada por el método de rayos X (47), la cual es de 3.4 \AA , Watson y Crick postularon que las bases están apiladas cercanamente en forma perpendicular a lo largo del eje y que cada 10 residuos de nucleótidos hacen una vuelta completa de la doble hélice la cual tiene una longitud de 34 \AA . Estas distancias repetidas solo son posibles si las purinas y pirimidinas están apareadas de la manera antes mencionada.

Las bases relativamente insolubles e hidrofóbicas están apiladas muy cercanamente dentro de la doble hélice, protegiéndose en esta forma del agua, y los residuos hidrofílicos de azúcar, así como los grupos fosfatos secundarios cargados eléctricamente se localizan en la periferia, estando así expuestos al agua. Debido a lo anterior, la doble hélice es estabilizada no sólo por los puentes de hidrógeno entre los pares de bases complementarias, sino también por las interacciones hidrofóbicas entre las mismas.

Propiedades de las moléculas de ADN en solución.

Las soluciones de moléculas pequeñas nativas de ADN, o de fragmentos de moléculas grandes de ADN, comparten un número de características químicas y propiedades físicas.

Los grupos fosfato, los cuales constituyen los puentes entre los mononucleótidos adyacentes, se unen fuertemente a cationes divalentes, tales como el Mg^{++} y el Ca^{++} , así como a aminas policatiónicas, tales como la espermina y la espermidina, las cuales se encuentran asociadas con ADN en algunos virus y bacterias; en la cromatina de eucariotes se ha encontrado ADN unido fuertemente con histonas. La unión de estas poliaminas en las ranuras de la doble hélice del ADN neutralizan sus cargas negativas, haciéndola una molécula más flexible.

Si bien las propiedades de los puentes de hidrógeno de las diferentes bases dependen de su forma iónica, la estabilidad de éstos puentes de los pares de bases de la doble hélice del ADN, es una función del pH. Los pares de bases son más estables entre un pH de 4 y 11, fuera de estos límites, el ADN de doble hélice se hace más inestable y se desdobra.

En cuanto a la viscosidad de soluciones acuosas de ADN, tenemos que debido a la rigidez de la doble hélice y al gran tamaño del ADN en relación a su pe-

queño diámetro, casi todas las soluciones diluidas de ADN son altamente viscosas. Por esta razón el ADN muestra un comportamiento ideal como soluto solamente en soluciones extremadamente diluidas.

Otra de las propiedades importantes del ADN es su comportamiento frente a cambios extremos de pH, calor, disminución en la constante dieléctrica del medio acuoso por la adición de alcoholes, cetonas, etc; con lo cual pasa de una estructura de doble hélice a una estructura de simple hélice al azar, lo cual se conoce como desnaturalización.

Durante la desnaturalización del ADN no sufren ruptura las uniones covalentes que forman la estructura primaria del mismo. Como se mencionó anteriormente, hay dos series de fuerzas que son responsables del mantenimiento de la estructura de doble hélice del ADN: (i) Puentes de hidrógeno entre los pares de bases y (ii) Interacciones hidrofóbicas entre secuencias sucesivas de bases. Cuando alguna de estas dos series de fuerzas son interrumpidas, la estructura de doble hélice nativa, lleva a cabo una transición hacia una estructura de simple hélice al azar.

La desnaturalización del ADN nativo está acompañada por cambios dramáticos en sus propiedades físicas: la viscosidad disminuye, la absorción de luz a 260 nm aumenta, la rotación óptica se hace más negativa, y la densidad buoyant se incrementa. El cam-

bio físico más comúnmente usado para la medición de la desnaturalización del ADN es el incremento en la absorción de la luz a 260 nm, al cual se le conoce como efecto hipercrómico. Este incremento puede ser de un 20 a 60% dependiendo de la naturaleza del ADN, siendo éste directamente proporcional al contenido de pares de bases A-T; mientras mayor sea la proporción de pares de A-T, mayor será el incremento en la absorbancia.

Así la composición de bases de una muestra de ADN puede determinarse llevando a cabo mediciones espectrofotométricas para calcular la magnitud del efecto hipercrómico.

Otro de los fenómenos que presentan las soluciones de ADN es el hipocromismo, el cual es debido a interacciones electrónicas entre las secuencias de bases en la estructura nativa de la doble hélice, con lo cual disminuye la cantidad de luz que cada residuo pueda absorber. Cuando la estructura de doble hélice está desordenada, las bases se encuentran des-apiladas interaccionando menos entre sí, y por lo tanto absorben casi tanta luz como si fueran bases libres.

Las moléculas de ADN nativo usualmente se desnaturalizan dentro de un rango muy pequeño de temperatura, esta transición brusca es similar al punto de fusión de cristales orgánicos. De hecho la desnaturalización térmica del ADN es frecuentemente designada

como fusión.

El ADN de diferentes tipos de células tienen puntos de fusión característicos definidos como la temperatura en el punto medio de la curva de fusión. El punto de fusión (T_m) se incrementa en una forma lineal de acuerdo al contenido de pares de bases G-C, unidas por tres puentes de hidrógeno, por lo que son más compactos y estables que los pares de A-T, que presentan sólo dos puentes de hidrógeno. Por lo tanto un ADN de doble hélice con un alto contenido de G-C hará una estructura más estable y requerirá una cantidad mayor de energía térmica para separarse en simples hélices.

Si la determinación del punto de fusión de un ADN específico se lleva a cabo bajo condiciones pre-establecidas de pH y fuerza iónica, se puede hacer una relación de su composición de bases según la ecuación de Marmur y Doty (49). En general se ha encontrado que la temperatura de fusión de un ADN es independiente de su peso molecular (44).

Como habíamos mencionado antes, la desnaturalización del ADN se puede llevar a cabo por calor, álcalis, agentes químicos desnaturalizantes, etc., con lo cual se obtiene una separación completa de las bandas complementarias. Un proceso contrario a éste es la reasociación, o sea, que las bandas complementarias separadas por el proceso de desnatu-

realización se vuelvan a unir. Los factores que pueden afectar la reasociación son: fuerza iónica, pH, temperatura y tamaño de los polinucleótidos y complejidad de éstos, así como la viscosidad del solvente utilizado (50).

El análisis cinético de la reasociación del ADN nos indica la presencia de múltiples copias de ciertas secuencias en un genoma y nos provee un medio de evaluación de su contenido informacional. Basándose en análisis cinéticos, el ADN de núcleos de células eucarióticas puede ser dividido en tres clases de acuerdo a la amplitud de repetición: (i) Series de secuencias con alto grado de repetición que generalmente aparecen como un satélite en los gradientes de densidad de CsCl, un ejemplo típico es el ADN satélite de roedores; (ii) Series de secuencias moderadamente repetidas, las cuales se reasocian con una velocidad intermedia, presente en todos los eucariotes; (iii) aquellas secuencias cuya velocidad de reasociación es compatible con la complejidad del genoma del organismo en cuestión. Estas secuencias se consideran que están representadas una sola vez por genoma haploide y son llamadas secuencias "únicas" (51), (52), (53).

3.- ADNs en plantas:

No obstante que la determinación de los ácidos nucleicos en plantas es relativamente complicado en relación con la de tejidos animales, debido principalmente a las dificultades que se presentan en su purificación, se han realizado diversos estudios para tratar de caracterizarlos (54).

Green (55) aisló ADNs de 16 especies de musgos que tienen un nivel de organización intermedia entre las algas pluricelulares y las plantas vasculares. La composición de bases fue determinada por centrifugaciones en gradientes de CsCl, encontrándose que todos los musgos analizados presentaron un rango de contenido de G-C de 35-41%, similar al de las plantas vasculares. El procedimiento utilizado para la extracción del ADN fue similar al método descrito por Marmur (56).

Miksche (57) aisló ADN de coníferas (56), analizándolo por ultracentrifugación, desnaturalización térmica y cinética de reasociación para determinar la composición de bases, así como la presencia de secuencias repetitivas.

Shah y Levings (58) extrajeron ADNs (56) de cloroplasto y de núcleo de maíz utilizando gradientes de sacarosa discontinuos para aislar y purificar a los organelos. Caracterizaron a los ADNs determinando sus temperaturas de fusión y contenidos de G-C (49).

Wells y Birnstiel (59) llevaron a cabo estudios sobre ADNs mitocondriales y cloroplásmicos de plantas superiores como espinaca, lechuga, frijol y chícharo aislados por técnicas de fraccionamiento celular acuoso y no-acuoso, analizándolos por centrifugación en gradientes de CsCl para determinaciones de densidad buoyant, utilizando como referencia para estas determinaciones ADN de *Micrococcus lysodeikticus* (1.731 g/cm^3), encontrándose una densidad buoyant de 1.697 g/cm^3 para ADN cloroplásmico y de 1.706 g/cm^3 para ADN mitocondrial.

Posteriormente Wells e Ingle (60) trataron de establecer una relación entre las densidades de ADNs de cloroplasto y mitocondria y las densidades de ADNs nucleares en plantas superiores como cebolla, acelga y tabaco. Encontraron que la constancia de densidad de ADN de cloroplasto con valores de 1.697 ± 0.001 (y cuyo valor de ADN nuclear correspondiente con densidades que fluctúan entre 1.691 a 1.702 g/cm^3) apoya la hipótesis propuesta por Baxter y Kirk (61) de que el ADN de cloroplasto en todas las plantas superiores puede tener una composición de bases constante (37-38% de G-C). Los datos para ADN mitocondrial sugieren una constancia similar a la anterior (61), (62).

W. Thornburg (63) ha reportado datos acerca de cinéticas de reasociación rápidas de ADNs de calabaza,

col, frijol y tabaco habiendo determinado también las densidades buoyant, las cuales fluctúan entre 1.706 y 1.708 g/cm³.

Entre otros muchos trabajos sobre la extracción y caracterización de ADN de plantas, cabe mencionar el realizado por Ohyama (64), el cual efectuó la extracción de ADN de protoplastos de cultivo de células de zanahoria (*Daucus carota*) en suspensión; determinando los Tms, cinéticas de reasociación y densidades buoyant.

4.- ADNs en trigo y centeno:

La extracción de ADNs de trigo y centeno ha sido efectuada por varios investigadores, entre ellos Bendich y McCarthy (65) los cuales aislaron ADNs de plantas totales de trigo, centeno, cebada y avena, ob-
teniendo de esta forma mezclas de ADNs nucleares y ci
toplásmicos.

La composición de bases de los cuatro cereales antes mencionados, fueron determinadas a partir de sus densidades buoyant y de sus temperaturas de fusión (T_m), en dicha composición se encontraron pequeñas diferencias en el grupo de ADNs estudiados; presentando también diferencias en los T_m s y densidades buoyant. En las determinaciones de las curvas de cinética de reasociación correspondientes, se encontró una velocidad de reasociación mayor entre los ADNs de las plantas estudiadas que en la que se presenta en animales. Por lo cual se puede asumir (65) que los ADNs de plantas superiores están caracterizados por tener una gran proporción de ADN redundante, más de la que está presente en animales. Sin embargo este es un punto abierto a discusión.

Posteriormente estos mismos autores (66) llevaron a cabo estudios para comparar el comportamiento de ADNs obtenidos de plantas totales de trigos que presentaban diferentes ploidías (diploide- T. mono-

coccum; tetraploide - T. durum y hexaploide - T. aestivum) bajo los siguientes parámetros: determinación de Tms, densidad buoyant y cinéticas de reasociación, encontrándose diferencias en las secuencias de bases de los ADNs entre biotipos de un simple género de plantas y entre el genoma de un allopoliploide.

Otros trabajos efectuados con ADNs totales fueron realizados por Mitra y Bhatia (67), utilizando diferentes especies de trigos obteniendo datos similares a los reportados anteriormente (65). Sin embargo es interesante observar que en las curvas de reasociación de sus ADNs correspondientes a trigos diploides y poliploides pueden ser separadas en diferentes fracciones correspondientes a secuencias repetidas y no repetidas alrededor de un Cot de 100.

Bendich y Bolton (68) llevaron a cabo estudios en ADNs totales de varios miembros de la familia Leguminosae y de trigo, centeno y avena, encontrando que existe alrededor de un 10% como máximo de homología en las secuencias polinucleotídicas de los ADNs entre las monocotiledóneas y dicotiledóneas estudiadas, mientras que existe de 20 a 90% de homología en las secuencias polinucleotídicas de los ADNs dentro de una misma familia.

Huguet y Jouanin (69) realizaron un estudio acerca de la heterogeneidad del ADN nuclear de trigo, utilizando parámetros tales como ultracentrifugación

analítica y determinación de T_m ; a partir de los cuales calcularon el contenido de G-C obteniéndose para éste un valor de 45.6%. Basados en la gran amplitud de transición térmica que presentó el ADN, estos autores afirman que la composición de bases del ADN nuclear de trigo presenta una gran heterogeneidad. Estas observaciones los condujeron a proponer que la fusión discontinua del ADN, revela la presencia de varias familias de moléculas de ADN. Sin embargo las bases en que se apoyan para proponer esto, no son suficientes como para aceptar sus puntos de vista.

Hotta et al (70) llevaron a cabo un estudio en el cual compararon los valores obtenidos para la densidad buoyant de ADNs nucleares y citoplásmicos (incluyendo plástidos y mitocondrias) de raíces de trigo. Sin embargo el método de extracción de los ADNs es muy criticable, ya que utilizan temperaturas muy elevadas durante la extracción.

En estudios posteriores realizados por Huguet y Jouanin (71), sobre los ADNs satélites del genoma de trigo, aislados por gradientes de densidad con $Cs_2SO_4 - Ag^+$ obteniéndose un satélite pesado y uno ligero. Enfocaron su estudio hacia el aislamiento y análisis del satélite pesado, el cual corresponde al ADN altamente repetitivo, debido a que presentó dificultad para desnaturalizarlo y una velocidad de reasociación rápida, el cual corresponde a un 5 a 10%

del ADN total de trigo, de acuerdo a los datos reportados por Bendich y McCarthy (65).

No obstante que Huguet y Jouanin (71) apoyan el hecho de que existen ADNs satélites en el genoma de trigo, existen discrepancias muy fuertes en este punto, ya que en un trabajo posterior realizado por Ingle, Pearson y Sinclair (72), afirman que no encontraron ADN satélite en gradientes de CsCl de ADN de monocotiledóneas, a las cuales pertenecen trigo y centeno.

En cuanto a los estudios realizados sobre ADN de centeno, Ranjekar y Lafontaine (73) llevaron a cabo la extracción y aislamiento de cromatina nuclear total de centeno, la cual fue estudiada por medio de cinética de reasociación, gradientes de densidad en CsCl y temperatura de fusión (T_m). Se encontró que cerca de un 70% del ADN nuclear total está formado de secuencias repetidas de nucleótidos, constituyendo varias familias con grados de redundancia que van de 10^2 a 10^6 .

La determinación de gradientes de densidad en CsCl del ADN nativo de centeno, presenta un pico amplio por lo cual parece ser bastante heterogéneo en su naturaleza. La densidad buoyant correspondiente fue de 1.694 g/cm^3 y el T_m fue de 77°C , no obstante que éstos autores no reportan condiciones del experimento, concluyen que en centeno, existe una gran cantidad de -

ADN repetitivo disperso a través del genoma; en base a esto ellos asumen que tal ADN se encuentra tanto en los segmentos heterocromáticos, como en los eucromáticos de el cromosoma.

MATERIALES.

1.- Semillas:

Las semillas utilizadas para la realización de este trabajo fueron las siguientes:

Triticum aestivum variedad vulgare (6X)

Triticum monococcum variedad Einkorn (2X) (MV-73)*

Triticum durum variedad Chapala (4X) (CB-03)*

Triticum aestivum variedad Torim (6X)*

Triticale Armadillo (6X)*

Triticale Chapala-Snoopy (6X) (X-10629-0Y), (CB-273 MV-73)*

Secale cereale variedad Snoopy Bulk (2X)*

* Todas estas semillas fueron donadas por el Dr. Kohli del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México.

2.- Reactivos:

a.- Solución amortiguadora de citrato de sodio - cloruro de sodio pH = 7.0 (CSC). La solución se encuentra formada por 0.15 M de citrato de sodio (Merck), y 1.5 M de cloruro de sodio (Merck).

b.- SSC = 10^{-1} de CSC.

c.- DSC = 10^{-2} de CSC.

ch.- Fronasa (Calbiochem) 4 mg/ml.

Preparación: Disolver 400mg de pronasa en 90 ml de agua destilada, ajustar con HCl hasta un pH = 5, calentar la solución a 80°C por 10 minutos, enfriar y adicionar una solución de NaOH hasta obtener un pH = 7. Adicionar finalmente 5.85 g de NaCl y aforar a 100 ml con agua destilada. Esta solución se almacena en congelación. Para destruir ADNasas, se incuban los tubos con la enzima a 37°C durante 4 horas antes de usarse (75).

d.- Ribonucleasas.

Preparación: Se disuelven 500 microgramos de ARNasa T₁ (Sankyo) y 50 mg de ARNasa pancreática bovina (Calbiochem), en 50 ml de solución 0.15 M de cloruro de sodio. Se almacena a -10°C. Para destruir las ADNasas, esta preparación se debe calentar a 90°C durante 10 minutos antes de usarse.

e.- Amilasas.

Preparación: Disolver en una solución de DSC 0.026 g de alfa amilasa (Fluka)(10 EU/mg) y 0.035 g de beta amilasa (Fluka)(7.5 EU/mg), aforar a 25 ml con DSC y conservar esta mezcla a

-10°C.

- f.- Mezcla Sevag: Cloroformo (Merck) - Alcohol iso-
amílico (Merck) en una proporción
de 24:1 (v/v) respectivamente.
- g.- Solución de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 4%.
- h.- Ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA) - sa-
lino: EDTA (Merck) 0.1 M, cloruro de sodio (Merck)
0.15 M, ajustar a pH = 8.
- i.- Solución de sacarosa (Baker Analyzed) 1.92 M -
solución de cloruro de calcio (Merck) 3 mM.
- j.- Solución de sacarosa (Baker Analyzed) 1.0 M -
solución de cloruro de calcio (Merck) 3 mM.
- k.- Solución amortiguadora de sacarosa (SAS):
0.3 M sacarosa (Baker Analyzed).
0.01 M Tris (Hidroximetil aminometano)(Merck).
0.005 M $MgCl_2$ (Merck).
0.005 M de 2-mercaptoetanol (Sigma) (Densidad =
1.114 g/ml).
- l.- Etanol absoluto (Merck).
- ll.- Dietiléter anhidro (Merck).
- m.- Solución amortiguadora Tris (Merck) 0.4 M, pH=8.5.
- n.- Solución de cloruro de calcio (Merck) 0.3 M.
- ñ.- Solución de azul de metileno al 1%.
- o.- Tritón X-100 (Sigma).
- p.- Solución de glicerina al 20%.
- q.- Perclorato de sodio 5M (Merck).
- r.- Solución de hipoclorito de sodio al 3%.

rr.- Hielo seco.

3.- Otros materiales específicos:

- a.- Malla de nylon de 47 micras de paso (Pharmacia Fine Chemicals).
- b.- Bolsas de diálisis (W.H. Curtin & Co.) No. 24.
- c.- Gasa estéril.
- ch.- Mortero grande de porcelana.
- d.- Hilo cáñamo.
- e.- Licuadora (Waring Modelo 5011).
- f.- Cajas de plástico transparente de 28 x 38 x 16 cm.
- g.- Agrolita.
- h.- Papel Whatman poro fino.
- i.- Jeringa de 5 ml.
- j.- Aguja de acero para jeringa (No. 27).
- k.- Tamices del No. 10, 26 y 16 (Duvesa)
- l.- Tubos de nitrocelulosa (1 pulgada de diámetro x 3 pulgadas)(Beckman No 302236).

MÉTODOS EXPERIMENTALES.

1.- Selección de las semillas:

Las semillas se escogieron de acuerdo al tamaño, para lo cual se utilizaron tamices adecuados para cernirlas y separarlas de polvo, piedras pequeñas y otras impurezas, haciendo además una selección de acuerdo al grado de madurez y calidad física externa de la semilla.

2.- Siembra:

Las semillas, una vez seleccionadas, fueron sometidas a remojo en una solución de hipoclorito de sodio al 3%, (después de haberlas tenido una hora remojando en agua), durante 10 minutos.

Posteriormente se enjuagaron las semillas tres veces con agua destilada.

Los métodos de siembra utilizados fueron dos: Uno de ellos fue utilizando papel filtro Whatman de poro fino, al cual se le hicieron dobleces de tal forma que presentara una superficie adecuada para las semillas; Tanto el papel como las cajas también fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio al 3% y enjuagados varias veces con agua destilada antes de utilizarlos. Una vez hecho lo anterior, se coloca-

ron las semillas sobre la superficie del papel con ayuda de pinzas de acero, dejando un espacio de aproximadamente 1 cm entre cada semilla (máximo 600 semillas por caja) y agregando a cada caja la cantidad de agua suficiente para llevar a cabo la germinación, manteniendo un flujo de aire filtrado saturando así el ambiente con humedad.

El otro método fue sembrando las semillas desinfectadas y enjuagadas en la misma forma, en agrolita lavada con agua, y con la ayuda de pinzas de acero se acomodaron las semillas dejando un espacio de aproximadamente 1 cm entre cada semilla (600 semillas máximo por caja). Fue suficiente la humedad que contenía la agrolita, por lo que no se tuvo que adicionar más agua. Se pasó un flujo de aire filtrado para mantener un ambiente saturado de humedad.

3.- Germinación:

El período de germinación se seleccionó de 6 a 10 días de acuerdo a los datos obtenidos de la observación del crecimiento en varios lotes de siembra. (Ver FIGURA 3).

Tanto la temperatura ambiente como la intensidad de luz no fueron controladas durante el crecimiento de todas las variedades de semillas.

4.- Selección de raíces y tallos:

En este proceso fueron eliminadas las plántulas que presentaron contaminación de hongos ó bacterias en raíz ó tallo. Las plántulas sin contaminación, fueron cortadas en raíz y tallo-hoja, con separación del grano con ayuda de tijeras.

Una vez separados los tallos-hojas del resto de las plántulas, fueron almacenados en recipientes mantenidos en hielo; lo mismo se hizo con las raíces, solamente que éstas fueron conservadas en recipientes mantenidos en hielo seco.

Aquí cabe hacer la aclaración de que a la parte que se le denominó hoja de aquí en adelante, fue en realidad la parte "hoja-tallo" de la plántula.

5.- Ruptura de los tejidos:

a.- Raíces: Una vez obtenidas las raíces de acuerdo al paso anterior, se pesaron y se introdujeron éstas con ayuda de gasa, en un vaso que contenía dietiléter de 2 a 4°C, durante 45 segundos. Inmediatamente después, se procedió a secarlas con corriente de aire de 2 a 4°C, y congelarlas con hielo seco.

Posteriormente se procedió a triturarlas en un mortero pre-enfriado (hielo seco), hasta que se obtuvo un material de consistencia pastosa. Se adicionaron 10 volúmenes de SAS por peso de tejido, y con el

propósito de lograr una mayor ruptura de las raíces, se molió la suspensión anterior en una licuadora Waring a velocidad máxima durante 30 segundos.

b.- Hojas: Las hojas fueron sometidas al mismo tratamiento con dietiléter durante 15 segundos, secándolas con corriente de aire de 2 a 4°C; se molieron en licuadora Waring a velocidad máxima durante 15 segundos con 10 volúmenes de SAS por peso de tejido.

6.- Obtención de paquetes de tejido total roto:

La suspensión de organelos obtenidos después de la molienda en licuadora, tanto de raíz como de hoja por separado, se filtraron en el cuarto frío (2-4°C) a través de 8 capas de gasa y una malla de nylon de 47 micras de paso y las soluciones fueron centrifugadas a 2000rpm (880 x g) durante 10 minutos de 2 a 4°C. Al término de la centrifugación se decantó el sobrenadante y los paquetes contenidos en los tubos se suspendieron en la mínima cantidad de SAS, conservándolos en hielo.

7.- Obtención de paquetes nucleares:

a.- Raíz: Para la obtención del paquete nuclear de raíz se realizó el mismo procedimiento antes men-

cionado (paso 6) con la diferencia de que en este paso se resuspendieron los paquetes de raíz en SAS hasta un volumen final de 9 ml.

Esta suspensión fue colocada sobre un gradiente discontinuo de sacarosa, formado por 20 ml de una solución de 1.92 M de sacarosa - 3 mM de CaCl_2 y 10 ml de una solución 1 M de sacarosa - 3 mM de CaCl_2 , en tubos de nitrocelulosa mantenidos en hielo (3 ml de suspensión por tubo).

Se centrifugó en un rotor SW-25.1 preenfriado a 2°C, en una centrífuga Spinco L a 24'500 rpm (86'713 x g, r máximo = 12.9 cm), durante 60 minutos a una temperatura de 2°C. Los paquetes nucleares se obtuvieron eliminando por succión al sobrenadante. Estos paquetes nucleares se conservaron en hielo.

b.- Hoja: Al paquete obtenido del paso 6, se le agregó 0.9 ml de una solución de tritón X-100 al 20% (74) (disuelto en SAS) y se le adicionó SAS hasta un volumen final de 9 ml, resuspendiendo la muestra y conservando la muestra en hielo.

La resuspensión así obtenida fue colocada sobre tubos de nitrocelulosa (1 pulgada de diámetro por 3 pulgadas) conservados en hielo que contenían un gradiente discontinuo de sacarosa formado por 20 ml de una solución 1.92 M de sacarosa - 3 mM CaCl_2 , y 10 ml de una solución 1 M de sacarosa - 3 mM CaCl_2 , (3 ml

de suspensión por tubo), ultracentrifugando en un rotor SW-25.1 pre-enfriado (2°C), en una ultracentrifuga Spinco L a 24'500 rpm (86'713 x g) durante 60 minutos a una temperatura de 2°C, obteniéndose finalmente los paquetes nucleares de hoja eliminando por succión el sobrenadante.

Los paquetes nucleares se resuspendieron en 0.9 ml de tritón X-100 al 20% (sacarosa 1 M - 3 mM CaCl₂) y en una solución 1.61 M de sacarosa - 3 mM CaCl₂ hasta completar un volumen final de 9 ml. 3 ml de la solución que contiene a los núcleos fueron colocados sobre 30 ml de solución de sacarosa 1.92 M - 3 mM CaCl₂ por tubo de nitrocelulosa mantenidos en hielo. La ultracentrifugación se llevó a cabo en las mismas condiciones que la anterior.

c.- Obtención de la fracción cloroplásmica: Los paquetes obtenidos en el paso 6 correspondientes a hoja, se resuspendieron en SAS hasta un volumen final de 9 ml, conservándola en hielo. Esta suspensión fue colocada también sobre tubos de nitrocelulosa, conservados en hielo, los cuales contenían un gradiente discontinuo de sacarosa formado por 20 ml de una solución 1.92 M de sacarosa - 3 mM CaCl₂, y 10 ml de una solución 1 M de sacarosa - 3 mM CaCl₂, (3 ml de suspensión por tubo). Las condiciones de ultracentrifugación fueron las mismas que las empleadas en los pasos anterior-

res.

Después de la ultracentrifugación se succionaron cuidadosamente las fracciones cloroplásmicas que se encontraban en la interfase del gradiente discontinuo de sacarosa colocándolas en un matraz. Una vez eliminada esta fracción, se succionó el resto del sobrenadante para obtener los paquetes nucleares a los cuales se les agregó 0.9 ml de tritón X-100 al 20% (sacarosa 1 M - 3 mM CaCl_2) y solución de 1.61 M de sacarosa - 3 mM CaCl_2 hasta completar un volumen final de 9 ml, resuspendiendo la mezcla. 3 ml de la resuspensión fueron colocados sobre 30 ml de solución de sacarosa 1.92 M - 3 mM CaCl_2 por tubo de nitrocelulosa. La ultracentrifugación se llevó a cabo en las mismas condiciones que en los pasos anteriores.

8.- Extracción y precipitación de los ácidos nucleicos:

a.- Los tubos que contenían los paquetes totales y nucleares de raíz y hoja obtenidos de los pasos 7a y 7b, se les adicionó a cada tubo (3 tubos en total por muestra) 0.33 ml de SDS al 4% y 0.33 ml de solución amortiguadora de Tris 0.4 M, pH = 8.5, resuspendiéndolos y reuniéndolos en un matraz con una pipeta Pasteur. Se agitaron suavemente durante 10 minutos en un baño a 37°C. Después de esta incubación se les agregó 0.1 ml de EDTA-salino, 0.2 ml de CSC y 1.0 ml

de pronasa preincubada (75). Los matraces se sellaron con parafilm y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Después de este período se aumentó la temperatura del baño a 56-58°C y esta temperatura se mantuvo durante cuatro horas.

Estas suspensiones fueron adicionadas lentamente por las paredes de los recipientes respectivos que contenían 10 volúmenes de etanol frío (2°C) por volumen de suspensión. Se guardaron de 24 a 48 horas en el cuarto frío para permitir una mayor precipitación de los ácidos nucleicos.

b.- Al matraz que contenía la fracción cloroplás mica, se le adicionó 2 ml de solución SDS al 4% y 2 ml de solución amortiguadora de Tris 0.4 M, pH = 8.5, se agitó suavemente durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se le agregó 0.2 ml de EDTA - salino y 0.4 ml de CSC y 2 ml de pronasa preincubada (75), sellando el matraz con parafilm e incubando 18 horas a 37°C y después durante 4 horas a 56-58°C.

La precipitación de los ácidos nucleicos se efectuó en la forma descrita en el inciso 8a.

9.- Purificación con enzimas:

a.- Tanto los ácidos nucleicos que flotaron en forma de nata, como aquellos que precipitaron en el

fondo del recipiente, fueron tratados de la siguiente manera:

Las natas de los ácidos nucleicos fueron recogidos con varillas de vidrio y secadas a temperatura ambiente; los ácidos nucleicos que precipitaron en el fondo del recipiente fueron obtenidos decantando el etanol y secándolos con vacío a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos en forma de nata y los precipitados fueron tratados por separado en los pasos siguientes, no obstante provinieran de la misma precipitación inicial.

Se disolvieron en un volumen mínimo de DSC, se ajustó a pH = 6 con HCl y se agregó 1/5 de volumen de la mezcla de alfa- y beta-amilasas con respecto al volumen de DSC, y se incubó una hora a 37°C.

Después de este período, se ajustaron las concentraciones de iones con CSC para obtener una concentración final de SSC y un pH = 7. Se les adicionó una mezcla de ARNasas ajustando a una concentración final de éstas de 1:10 de su concentración original.

Las mezclas finales se incubaron durante una hora a 37°C, se les agregó una solución de pronasa ajustando a una concentración final de ésta de 1.32 mg/ml, (dilución 1:3 de una solución de pronasa de 4 mg/ml), incubándose durante 18 horas a 37°C; al final de esta incubación, se elevó la temperatura a 56-58°C y se incubó nuevamente durante cuatro horas.

Se sacaron los matraces con las mezclas y se enfriaron en hielo, se ajustaron las concentraciones de iones con NaClO_4 5M a 1M, se agregó un volumen de mezcla de Sevag a cada muestra y se agitó durante 10 minutos.

Las emulsiones obtenidas se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm (880 x g), se separaron las fases acuosas y se repitió este proceso de agitación de las fases acuosas con mezcla Sevag tantas veces fue necesario, hasta que la interfase proteínica fue mínima. La fase acuosa final se precipitó en 10 volúmenes de etanol frío de la misma manera como se hizo la primera precipitación antes mencionada.

Todo este proceso (inciso 9a) se repitió tantas veces se consideró necesario hasta obtener ADNs de un grado de pureza aceptable.

b.- El criterio de pureza fue controlado de la siguiente forma. Las natas y los precipitados obtenidos se secaron con vacío y se disolvieron en un volumen mínimo de DSC, de estas soluciones se tomaron alícuotas, las cuales se diluyeron con DSC y se determinó la pureza mediante las relaciones obtenidas de las absorbancias a 260nm/230nm y 260nm/280nm de cada una de las muestras, las cuales se consideraron aceptables cuando se obtuvieron valores de 2.2 ± 0.2 y 1.9 ± 0.1 respectivamente.

10.- Diálisis:

Las bolsas de diálisis y el hilo de cáñamo fueron lavados con agua destilada, después se hirvieron por separado en una solución de EDTA 1 mM durante 10 minutos, dejando enfriar y enjuagando varias veces con agua destilada, se prepararon las bolsas con las muestras respectivas y se dializaron contra 2 litros de una solución de DSC a 2°C efectuando 10 cambios en total a intervalos mínimos de una hora cada uno.

Se volvió a determinar la pureza de las muestras dializadas bajo los criterios mencionados en la sección 9b.

Las muestras de ADN disueltas en DSC fueron conservadas en tubos a los cuales se les adicionó 0.2 ml de cloroformo a cada uno, sellándolos bien y manteniéndolos entre 0-4°C.

11.- Características espectrofotométricas de los ADNs:

a.- Espectros de absorción: Los espectros de absorción de cada una de las muestras disueltas en DSC (25-100 microgramos de ADN / ml de solución) se trazaron en un graficador UNICAM AR-25 acoplado a un espectrofotómetro UNICAM SP 1800, utilizando un rango de longitudes de onda de 210 a 310 nm, y una velocidad de barrido de 0.5 nm/segundo.

De las lecturas de absorbancia determinadas a 260 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de paso, se pudo calcular la concentración de los ADN's en las soluciones, sabiendo que una unidad de densidad óptica corresponde a una concentración de 50 microgramos de ADN / ml, calculando de esta manera los rendimientos de cada una de las muestras.

De las lecturas de absorbancia obtenidas a 230, 260 y 280 nm, se calcularon las relaciones 260/230 y 260/280 para los criterios de pureza antes mencionados (inciso 9b).

b.- Determinación de las temperaturas medias de fusión (T_m): Estas determinaciones se efectuaron en un espectrofotómetro UNICAM SP 1800 acoplado a un graficador AR-25, a un programador de cambio automático de celdas UNICAM SP 1805 y a un programador de control de temperatura SP 876, bajo las siguientes condiciones:

Espectrofotómetro UNICAM SP 1800:
Longitud de onda fija a 260 nm; un portaceldas especial para el espectrofotómetro con regulación de temperatura y un termostato dentro de una celda UNICAM SP 877, en glicerina al 20%; un carrito del portador de celdas para cambiar las posiciones de las celdas.

Programador de control de temperatura UNICAM SP

876:

Aumento de temperatura de 1°C/minuto; temperatura inicial = 25°C; temperatura máxima = 110°C.

Programador de cambio automático de celdas UNICAM SP 1805:

Cambio y lectura de las celdas - cada minuto.

Graficador UNICAM AR-25:

Velocidad del papel = 2 minutos/cm; para una intensidad de 10 mv.

Celdas UNICAM SP 877:

Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz con tapón de teflón.

Las muestras de ADN's utilizadas para las determinaciones de Tms, fueron ajustadas con CSC a una concentración final de sales de SSC. Las concentraciones adecuadas de ADN para éstas determinaciones fueron entre 30-70 microgramos / ml.

Algunas de estas muestras fueron rotas haciéndolas pasar 20 veces a través de una aguja de acero del No. 27, antes de la determinación.

c.- Determinación de las cinéticas de reasociación:

Estas determinaciones se efectuaron con los mismos apa-

ratos antes mencionados (inciso 11b) con las modificaciones siguientes:

Programador de control de temperatura UNICAM SP
876:

Se mantuvo a una temperatura constante de 66°C.

Programador de cambio automático de celdas UNICAM
SP 1805:

Cambio y lectura de celdas - cada 5 minutos.

Graficador UNICAM AR-25:

Velocidad del papel - 5 minutos/cm.

Con las mismas muestras utilizadas en las determinaciones de Tms se llevaron a cabo las cinéticas de reasociación de la siguiente manera: Una vez alcanzada la temperatura de 106°C durante la determinación de los Tms, se sacaron las celdas con las muestras y se introdujeron rápidamente en un baño de agua a 66°C dejando ahí las celdas con las muestras el tiempo necesario para enfriar el portaceldas en el espectrofotómetro hasta una temperatura de 66°C; una vez calibrada esta temperatura (de 15 a 27 minutos), se colocaron las celdas en sus posiciones originales, iniciando en ese momento la graficación continuándola durante aproximadamente 20 horas. Estas cinéticas de

reasociación se determinaron a una longitud de onda de 260 nm.

Nota: En todas las determinaciones anteriores (sección 11a, b y c) se utilizaron los blancos correspondientes a cada una de ellas.

RESULTADOS.

1.- Germinación y rendimiento de tejido:

Se hicieron varias siembras con 60 semillas de *Triticum aestivum* variedad Torim y vulgar, con el propósito de determinar el período adecuado de crecimiento para la extracción del ADN. En la FIGURA 3 se observan los resultados obtenidos en los diferentes días de germinación con respecto al crecimiento (longitud en cm) del tallo-hoja y de la raíz. En la parte de la figura que corresponde a la plántula (*) se puede observar que del sexto al noveno día se inclinó la pendiente de la curva. Además se pudo observar que a partir del décimo día las hojas de la plántula empezaron a presentar coloración amarilla, debido a que no se les adicionó sales minerales esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Debido a las observaciones antes mencionadas, se decidió seleccionar el período de germinación de 6 a 10 días.

Con respecto al rendimiento de tejidos, se pudo observar que hubo variación entre las siembras correspondientes a las variedades de trigo, centeno y triticale estudiadas. Esta variación correspondió en parte al grado de contaminación en la siembra de cada lote y también del método utilizado para la germinación.

En el método en el cual se utilizó papel filtro como soporte de los granos, siempre se observó un crecimiento menor de raíz y una mayor contaminación si se compara con el método de siembra en el cual se utilizó agrolita, por lo cual se prefirió el último. Los datos correspondientes al rendimiento de los tejidos utilizados para la extracción de ADN de cada una de las variedades estudiadas se presentan en la TABLA 2.

2.- Obtención de núcleos:

Una de las observaciones que se deben tomar en cuenta con respecto al rendimiento de núcleos de raíz es la dificultad que presentaron éstas durante el proceso del rompimiento de tejido, lo cual en ocasiones fue la causa de un rendimiento bajo de núcleos y por consiguiente un rendimiento bajo de ADN correspondiente.

Una vez obtenidos los paquetes nucleares de raíz y hoja, (Sección 7a y 7b de Métodos Experimentales), se utilizó como control de pureza de cada una de las muestras obtenidas, la observación de los frotis correspondientes al microscopio, controlando así además la purificación de núcleos a través de los diferentes pasos de la extracción.

Para poder ilustrar este control, se utilizó la secuencia de purificación de los núcleos de raíz y ho-

ja de Triticale Armadillo obteniendo varias micrografías a partir de frotis hechos de la siguiente manera:

Una vez obtenidas las muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación de núcleos de hojas y raíz, se extendieron éstas sobre un portaobjetos y se fijaron con calor, enseguida se tiñeron con una solución de azul de metileno al 1% durante 3 segundos, lavando inmediatamente con bastante agua destilada y dejando secar a temperatura ambiente.

Estos frotis fueron fotografiados en un microscopio Carl Zeiss con cámara fotográfica adaptada utilizando una película Panatomic (grano fino) amplificando 250 a 500 veces.

La secuencia de las micrografías mostradas en las FIGURAS 4 a 9 es la siguiente:

En la FIGURA 4 se observan células rotas de raíz, algunas de las cuales contienen todavía su núcleo, y pelos absorbentes. Esta preparación fue obtenida del residuo que quedó en la malla de nylon con la que se eliminaron células enteras, pequeñas fracciones de tejido y fibras que lograron pasar por la gasa.

En la FIGURA 5 se muestran núcleos de raíz los cuales se obtuvieron de la solución filtrada a través de la malla, así como pelos absorbentes.

En la FIGURA 6 se observan núcleos de células de raíz los cuales fueron obtenidos de la purificación hecha a través de un gradiente discontinuo de sacarosa.

En la FIGURA 7 se observan núcleos de células de hojas con una gran cantidad de cloroplastos. Esta preparación fue obtenida de la suspensión de organelos después de haberla filtrado por la malla de nylon. En esta micrografía se puede apreciar claramente la diferencia de tamaño entre núcleos y cloroplastos. Sin embargo en la observación de la preparación se encontró que los núcleos se tiñeron de azul mientras que los cloroplastos presentaron su color original.

La FIGURA 8 corresponde a una preparación de cloroplastos sin previo tratamiento con tritón X-100 (74) (no teñida), obtenidos de la interfase formada en el gradiente discontinuo de sacarosa (Sección 7c). Esta micrografía fue tomada con contraste de fase.

En la FIGURA 9 se pueden observar núcleos tratados con tritón X-100 al 2% (74) de células de hoja purificados a través de dos gradientes de sacarosa discontinuos.

En cuanto a la pureza de los núcleos controlada por las observaciones al microscopio, se puede decir que el método de extracción utilizado aporta resultados muy satisfactorios.

3.- Espectros de absorción y criterios de pureza:

Todas las muestras de ADNs obtenidas de núcleos de células de raíz y hoja, así como las correspondien-

tes a cloroplasto y tejido total, fueron analizadas espectrofotométricamente para determinar su absorbancia de 210 a 310 nm utilizando un espectrofotómetro UNICAM SP 1800, graficando las curvas en un graficador UNICAM AR-25. Todos los espectros obtenidos de las diferentes muestras de ADN fueron similares, por lo cual sólo se muestra uno de ellos. En la FIGURA 10 se presenta el espectro de absorción de una muestra de ADN nuclear de hoja de Secale cereale variedad Snoopy disuelto en DSC.

Para la determinación de los criterios de pureza de las diferentes muestras de ADN, se utilizaron las siguientes relaciones: D.O. 260nm/D.O. 230nm y D.O. 260nm/D.O. 280nm.

Los valores reportados en la literatura (76) para los rangos de pureza son los siguientes:

$$\frac{\text{D.O. } 260 \text{ nm}}{\text{D.O. } 230 \text{ nm}} = 2.2 \pm 0.2$$

$$\frac{\text{D.O. } 260 \text{ nm}}{\text{D.O. } 280 \text{ nm}} = 1.9 \pm 0.1$$

4.- Rendimiento de ADNs:

Una vez que las muestras de ADN (dializadas) presentaron valores aceptables para los criterios de pureza establecidos, se llevaron a cabo los cálculos de rendimiento de las mismas, de la siguiente forma:

Se determinó la densidad óptica de cada una de las

muestras disuelta en DSC, en celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, a 260 nm; sabiendo que 1 D.O. determinada a esta longitud de onda corresponde a 50 microgramos de ADN/ml, se hicieron los cálculos correspondientes. Los resultados se muestran en la TABLA 3.

De los rendimientos obtenidos para ADN de raíz, se puede observar que fueron menores a los obtenidos para ADN de hoja, ésto es debido en parte como se mencionó anteriormente, a la dificultad que se presenta en el rompimiento del tejido de raíz, lo cual se trató de superar modificando las técnicas de ruptura de tejido y tratamiento con enzimas.

5.- Determinación de las temperaturas de fusión (T_m) de los ADNs:

Una de las propiedades físicas de los ácidos desoxiribonucleicos es su temperatura de fusión. En este proceso térmico se desenrollan las dobles hélices formando dos hélices sencillas. Para que ésto se pueda medir espectrofotométricamente, debe de estar el ADN en una solución amortiguada con un pH neutro, una concentración de sales adecuada y en celdas de cuarzo con tapones de teflón especiales, para que no haya pérdida de agua. La temperatura se aumenta gradualmente en el portaceldas, que contiene tanto a la celda con la muestra, como a aquella con el blanco y otra tercera que

contiene una solución de glicerina al 20% con un termopar, para poder medir la temperatura y poderla registrar en una escala exterior en el aparato. En la sección que corresponde a Métodos Experimentales se describen los aparatos utilizados en estos experimentos.

En las FIGURAS 11, 12 y 13 se muestran las curvas de T_m para los ADN de Triticum durum (4X) variedad Chapala, Secale cereale (2X) variedad Snoopy y ADN de cloroplasto de Triticum aestivum (6X) variedad Torim, respectivamente. El perfil de las curvas de T_m de las muestras de ADN analizado, es muy similar en todas ellas, a excepción de la de cloroplasto (FIGURA 13); el rango de transición térmica que presentan todas las otras curvas es de 80 a 90°C aproximadamente.

La TABLA 4 contiene los resultados correspondientes a las determinaciones de T_m s, así como las concentraciones de ADN utilizadas para las determinaciones, % de hipercromicidad, rango de transición térmica y contenido de G-C en mol% calculado a partir de la temperatura de T_m en la siguiente ecuación según Marmur y Doty (49):

$$T_m = 69.3 + 0.41 (G-C).$$

6.- Datos correspondientes a las cinéticas de reasociación:

Las muestras utilizadas para las cinéticas de rea-

sociación fueron las mismas que para las determinaciones de las temperaturas de fusión, como ya se había especificado en el inciso 11c de Métodos Experimentales. Todas las cinéticas de reasociación fueron determinadas a 260 nm y a una temperatura de 66°C, manteniendo ésta constante durante toda la determinación. Los parámetros bajo los cuales se graficaron las curvas de las cinéticas de reasociación, son los siguientes:

Cot contra % de reasociación.

Donde Cot = concentración molar del ADN expresado como mononucleótido de peso molecular promedio 327 por tiempo de incubación en segundos.

En la FIGURA 14 se muestra una comparación de las curvas de cinética de reasociación de ADNs rotos de Triticum aestivum vulgare, correspondiente a raíz total, núcleos de hoja y cloroplasto. Se puede observar que todas las curvas presentan una cinética de reasociación muy semejante hasta un Cot de 2×10^{-1} ; a partir de este valor las pendientes de las curvas de raíz total y núcleos de hoja se comportan de manera similar hasta un Cot de 1×10^1 . La pendiente de la curva de cloroplasto hasta un Cot de 3×10^{-1} se comporta de una manera semejante a la reportada por Wells y Birnsiel (59), las líneas interrumpidas marcadas en esta figura corresponden a una continuación aproximada de

la curva reportada por estos autores. En la curva de cloroplasto se puede observar también un quiebre a un Cot de 3×10^{-1} , siendo la pendiente a partir de este punto hacia $Cots$ mayores perpendicular a las otras curvas.

Los datos correspondientes a Cot y % de reasociación de los ADNs de raíz total, de núcleos de hojas y de cloroplastos se encuentran en las TABLAS 5, 6 y 7 respectivamente.

Una comparación de las curvas de cinética de reasociación correspondientes a ADNs nucleares de hoja de Triticum aestivum vulgare obtenidos de la misma precipitación uno en forma de nata y el otro en forma de precipitado, se muestran en la FIGURA 15. Se observa que ambas curvas son muy semejantes, y que la correspondiente a precipitado presenta un % de reasociación ligeramente menor al del ADN en forma de nata. Los datos correspondientes a estas curvas se encuentran resumidos en la TABLA 6 (para ADN en forma de nata) y en la TABLA 8 (para el ADN en forma de precipitado).

En la FIGURA 16 se pueden observar las curvas de cinética de reasociación de ADNs nucleares de hojas de Triticum durum variedad Chapala (4X) roto, Triticum aestivum vulgare (6X) roto, y Triticum monococcum variedad Einkorn (2X) no roto, tratándose de comparar los ADNs de trigos que presentan diferentes ploidías. En la región de $Cots$ localizada de 1×10^{-2} hasta

2×10^{-1} se puede observar una velocidad de reasociación ligeramente mayor en el ADN de trigo 6X que la que presentan los trigos di- y tetraploides. En la región localizada entre un Cot de 3×10^{-1} a un Cot de 7×10^0 , se observa que las curvas de Triticum aestivum (6X) y Triticum durum (4X) se sobreponen; la curva de Triticum monococcum (2X) corre paralelamente (en esta región) a las curvas antes mencionadas. Los datos de la curva correspondientes al trigo tetraploide se muestran en la TABLA 9, los correspondientes al hexaploide en la TABLA 6 y los correspondientes al diploide en la TABLA 10.

En la FIGURA 17 se encuentran graficadas las curvas de cinética de reasociación de ADN nucleares rotos de hojas de Triticales Armadillo y Chapala-Snoopy observándose que en la región que corresponde a un Cot de 8×10^{-3} a 1×10^{-1} el ADN nuclear de hoja de Chapala-Snoopy reasocia más rápido que el ADN nuclear de hoja de Armadillo; en la región de Cot correspondiente a 1×10^{-1} a 2.5×10^{-1} se observa una velocidad de reasociación mayor en el ADN de Armadillo que el observado en el ADN de Chapala-Snoopy; a partir del Cot 2×10^{-1} hasta 1×10^1 ambas curvas corren en formas o menos paralela, no obstante que Chapala-Snoopy presente un % de reasociación mayor. Los valores correspondientes a las curvas de ADN de Armadillo y de Chapala-Snoopy se encuentran en las TABLAS 11 y 12

respectivamente.

En la FIGURA 18 se pueden observar las curvas de cinética de reasociación correspondientes a centeno (2X), Triticum durum variedad Chapala (4X), Triticale Chapala-Snoopy (6X) y mezcla hecha "in vitro" con ADN nucleares rotos de hojas de Chapala (4X) y Secale cereale variedad Snoopy (2X) en proporción 4:2 respectivamente.

La curva de cinética de reasociación de centeno es parecida en su primera parte (hasta valores de Cot de 2×10^{-1}), a las de Chapala y a la mezcla hecha "in vitro" Chapala - Snoopy. La segunda parte de esta curva (Cot 7×10^{-1} hasta 1×10^1) presenta una pendiente diferente a la que presentan las otras curvas, observándose que el centeno reasocia más de 60% a valores de Cot de 1×10^1 .

Comparando las curvas de cinética de reasociación de ADN del híbrido F_1 Chapala-Snoopy con aquella de la mezcla hecha "in vitro", se puede observar que son diferentes entre valores de Cot de 2×10^{-2} hasta 3×10^{-1} , a partir de este valor para Cot hasta un valor de 3×10^0 hay una sobreposición de las curvas, observándose posteriormente una separación de las mismas.

En la TABLA 13 se muestran los valores correspondientes a las curvas de cinética de reasociación de ADN nuclear de hoja de Secale cereale variedad Snoopy (2X), en la TABLA 9 los correspondientes a Triticum durum variedad Chapala (4X), en la TABLA 12 los corres-

pendientes a Triticale Chapala-Snoopy y en la TABLA 14 los correspondientes a la mezcla "in vitro" de 4 partes de ADN de Chapala y 2 partes de centeno Snoopy.

7.- Curvas de cinética de reasociación invertidas:

A partir de los datos de cinética de reasociación se graficaron las correspondientes curvas invertidas con el objeto de visualizar las diferentes familias en los ADNs, las cuales se clasifican en secuencias de nucleótidos altamente repetitivas, medianamente y poco repetitivas y secuencias únicas. La enumeración de las pendientes de las curvas mostradas en las FIGURAS 19 a 22, se hará a partir del valor de tiempo cero siendo ésta la primera pendiente correspondiente a la familia de secuencias altamente repetitivas, y las siguientes pendientes corresponden a secuencias de nucleótidos medianamente y poco repetidas respectivamente; sin embargo no se graficaron las pendientes correspondientes a familias de secuencias únicas, debido a que el sistema utilizado para la medición de las cinéticas de reasociación explicada en Métodos Experimentales (Sección 11c) no permitieron observar χ de reasociación a Cots mayores de 1×10^1 .

Los parámetros utilizados para estas curvas son los siguientes; de acuerdo a Wells y Birnstiel (59) :

Tiempo (minutos) contra $1/(D.O._t - D.O._\infty)$

Donde $D.O._t$ corresponde a la densidad óptica a un tiempo t de incubación y $D.O._\infty$ es igual a la densidad óptica a un tiempo infinito de incubación (correspondiendo a la densidad óptica del ADN nativo).

En la FIGURA 19 se muestran las curvas de cinética de reasociación invertidas de ADNs de Triticum aestivum vulgare correspondientes a raíz total y cloroplasto; en raíz total se observan tres diferentes pendientes y en la curva respectiva a cloroplasto se pueden observar cuatro pendientes, (datos en TABLA 5 y 7 respectivos).

En la FIGURA 20 se muestran curvas de cinética de reasociación invertidas de ADNs nucleares de Triticum aestivum vulgare (hojas) correspondientes a natas y precipitados, observándose para la primera 5 pendientes, haciendo notar que la tercera pendiente probablemente sea un resultado de la influencia tanto de la segunda como de la cuarta pendiente, por lo que se indica con líneas punteadas la prolongación de las pendientes antes mencionadas. En cuanto a la curva correspondiente a ADN en forma de precipitado, se observan 4 pendientes bien definidas que parecen ser similares a las obtenidas para nata, si se toman en cuenta las prolongaciones hechas con las líneas punteadas. Los datos de estas curvas se muestran en las TABLAS 6 y 8 en el mismo orden antes mencionado.

Se pueden observar en la FIGURA 21 las curvas de cinética de reasociación invertidas correspondientes

a ADN's nucleares de hojas de trigos de diferentes ploidades, siendo éstos el Triticum monococcum variedad Einkorn (2X) no roto, cuya curva presenta 4 pendientes y Triticum durum variedad Chapala (4X) roto, con 5 pendientes, siendo la tercera pendiente el resultado probable de la influencia de las familias adyacentes. En la TABLA 9 se muestran los datos correspondientes a la curva invertida del ADN de Triticum durum variedad Chapala y en la TABLA 10 los correspondientes a Triticum monococcum variedad Einkorn.

En la FIGURA 22 se encuentran graficados los datos correspondientes a las curvas de cinética de reasociación invertidas de ADN's nucleares rotos de hojas de Secale cereale (2X), Triticum durum variedad Chapala (4X), Triticale F₁ Chapala-Snoopy (6X) y la mezcla "in vitro" de 4 partes de ADN de Triticum durum variedad Chapala (4X) con 2 partes de ADN de Secale cereale variedad Snoopy (2X). En esta figura se compararon las curvas obtenidas para un triticale y sus progenitores respectivos. Para poder visualizar mejor el comportamiento del híbrido, se comparó su cinética de reasociación con la de una mezcla "in vitro" de ADN's de los progenitores en la proporción antes mencionada. La curva invertida de centeno muestra 4 pendientes al igual que la del Triticale Chapala-Snoopy. Pero la curva correspondiente a la mezcla "in vitro" sólo presenta 3 pendientes muy marcadas pareciéndose la pri-

mera y la segunda a las correspondientes del Triticale Chapala-Snoopy. Los datos correspondientes a la curva de Secale cereale (2X) se muestran en la TABLA 13, los de Triticum durum variedad Chapala (4X) en la TABLA 9, los de Triticale F₁ Chapala-Snoopy (6X) en la TABLA 12, y los de la mezcla "in vitro" de los progenitores del triticale en la proporción antes mencionada se encuentran reportados en la TABLA 14.

8.- Cálculos para corregir las pendientes:

La pendiente de las curvas graficadas en las FIGURAS 19 a 22, correspondientes a la constante de velocidad de la reacción de reasociación del ADN siendo ésta una constante de 2º orden (k_2). Sin embargo las pendientes, por el hecho de estar presentes las familias de nucleótidos con diferentes velocidades de reasociación, éstas están afectadas no dan valores reales, por lo tanto se tienen que corregir los valores de las pendientes dando resultados aproximativos para aquellos obtenidos de un experimento en el cual se hubiesen separado a las familias con otras técnicas (53) dejando reasociar a las cadenas simples de una familia dada.

Para corregir las pendientes de las curvas de cinética de reasociación invertidas de las diferentes muestras de ADNs, con el objeto de obtener valores de las pendientes aproximados (k_2'') a aquellos de las constantes de segundo orden verdaderos, se resta el valor de la delta de hipercromicidad (de aquella pendiente extrapolada a $t=0$ de la familia menos repetitiva inme-

diata) al valor del delta de hipercromicidad de la familia que se va a corregir en sus diferentes puntos, regraficando estos valores contra tiempo (minutos), obteniéndose así la k_2'' (o sea el valor de la pendiente corregida), (59).

El valor de k_2' de las pendientes correspondientes a las familias de ADN's poco repetitivos (la última pendiente en las gráficas), no fueron corregidos debido a que estas pendientes casi no se ven influenciadas por las familias anteriores. En el caso de que la última pendiente fuera la correspondiente a familias de secuencias únicas, esta no se corregiría, ya que representaría valores reales para k_2' .

Los valores obtenidos para las pendientes de las curvas mostradas en las FIGURAS 19 a 22 (k_2') y los valores corregidos de las mismas pendientes (k_2'') se encuentran resumidos en la TABLA 15.

9.- Cálculos para la determinación de la cantidad de pares de nucleótidos en cada familia:

A partir de los valores obtenidos para k_2'' , se pueden calcular las cantidades de pares de nucleótidos que corresponden a cada familia, de acuerdo a la fórmula obtenida por Britten y Kohne (77):

$$\text{Cot}_{1/2} k_2'' = 1$$

siendo por definición: $k_2' = 2 k_2''$ (k_2' =cte. de velocidad
y por lo tanto: de 2° orden según el

$$\text{Cot}_{1/2} = \frac{2}{k_2'} \quad \text{método de hidroxipapirato (53)).}$$

Los valores obtenidos para $\text{Cot}_{1/2}$ se interpolaron en la gráfica reportada por Britten y Kohne (53), determinando de esta manera los pares de nucleótidos correspondientes a cada familia. Estos valores obtenidos se muestran en la TABLA 15.

10.- Contenido de pares de nucleótidos por genoma:

El contenido de pares de nucleótidos por genoma de cada una de las gramíneas estudiadas se calculó a partir de los datos reportados por Bennett (78) de la siguiente forma:

La cantidad de ADN reportada en picogramos se dividió entre el número correspondiente de cromosomas, obteniéndose así la cantidad de ADN (en pg) por genoma haploide. Este valor se dividió entre el peso molecular promedio de los mononucleótidos (327) y se transformó en moles. Los datos obtenidos se muestran en la TABLA 16.

11.- Repetición de cada familia en el genoma:

Para obtener los datos aproximativos correspon-

dientes a la repetición de cada familia en el genoma, se hicieron los siguientes cálculos:

Se dividió el número de pares de nucleótidos por genoma entre el número obtenido de la extrapolación en la Tabla presentada por Britten y Kohne (53) para $Cot\ 1/2$. Los valores obtenidos de esta forma caen dentro del rango de valores reportados para eucariotes (53). Los datos obtenidos para la frecuencia de repetición de cada familia se reportan en la TABLA 17.

12.- Porcentaje de contribución de cada familia en el genoma:

Los porcentajes correspondientes a la contribución de cada una de las familias en el genoma de cada una de las gramíneas estudiadas, se calcularon mediante la extrapolación de las pendientes de las curvas de cinética de reasociación invertidas hasta $t=0$ obteniendo de esta forma $1/(D.O._t - D.O._\infty)$. Las recíprocas de estos valores corresponden al delta de hipercromicidad, es decir $D.O._t - D.O._\infty$. El delta de $(D.O._t - D.O._\infty)$ entre dos pendientes (en D.O.), es la cantidad con que contribuyó cada familia en el genoma. Tomando como 100% la hipercromicidad total del ADN en cuestión, se puede calcular el porcentaje con que contribuyó una familia dada en el genoma a estudiar. Los porcentajes obtenidos por familia se muestran en la TABLA 17.

T A B L A 2
RENDIMIENTO DE TEJIDOS

Variedad de Semillas	Días de Germinación	Número de Granos	Gramos de Hoja	Gramos de Raíz	Rendimiento en μ g de ADN/g de tejido fresco	
					Hoja	Raíz
T.aestivum Var.	7	120	12	6.2	---	---
Vulgare:	7	1200	62	30	56.8	22.5
T.aestivum Var. Torim	9	1200	59.5	26	81.5	65.7
T.durum Var. Chapala	10	530	54.4	--	94.8	--
T.monococcum Var. Einkorn	10	1600	71.3	--	70.1	--
S.cereale Var. Snoopy	10	3600	51.5	--	4.75*	--
Triticale Chapala-Snoopy	10	500	64.0	--	85.9	--
Triticale Armadillo	10	1600	116.0	83.3	51.4	15.7

* Rendimiento bajo debido a una modificación en el método de extracción.

Nota: T. = Triticum

S. = Secale

ug = microgramos

T A B L A 3
RENDIMIENTO DE ADN Y CRITERIO DE PUREZA

(Det. en espectrofotómetro Carl Zeiss).

Origen	Rendimiento ug totales	Relación 260/230	Relación 260/280
T.aestivum	H=312.0	2.23	1.81
vulgare	R=225.5	1.94	1.76
T.aestivum	H=430.0	2.16	1.85
Torim	Rt=720	1.56*	1.63*
	Cl=1037	2.02	1.83
T. durum	H=5160	2.01	1.81
Chapala			
T. monococcum	H=500	1.83	1.74
Einkorn			
S.cereale			
Snoopy	H=348	2.35	1.85
Triticale	H=1460	2.07	1.83
Chapala- Snoopy			
Triticale	H=1315	2.03	1.80
Armadillo			
T.aestivum	H= nata	2.38	1.83
vulgare	H= precipitado	2.26	1.80

Abreviaciones: T.= Triticum; S.= Secale; H= núcleos de
hojas; R= núcleos de Raíz; Rt= Raíz to-
tal; Cl= fase cloroplásmica.

*no incluidos en el promedio.

T A B L A . 4

RESULTADOS DE LAS CURVAS DE FUSION DE LOS ADN_s NATIVOS

Origen	Concentra- ción de ADN en μ g/ml	T _m (°C)	% de hi- percro- micidad	Rango Trans. Térmica	Cont. G-C (mol %)
T.aestivum					
vulgare:Hnr	52.25	84.8	34.92	78-91°C	37.8
:Hpr	48.50	85.0	34.02	78-91°C	38.3
:Hnr	45.00	86.0	31.30	78-95°C	40.73
:Rnr	40.25	79.0*	21.36	50-95°C	23.7
T.aestivum					
Torim:					
:Cl r	59.50	86.0	21.42	48-97°C	40.7
T.monoco- cum					
Einkorn:Hnr	36.5	85.0	34.93	79-93°C	38.3
T.durum					
Chapala:Hn r	37.25	85.5	32.60	78-93°C	39.5
	58.00	85.1	32.03	78-93°C	38.5
S.cereale					
Snoopy:Hn nr	30.50	86.0	32.20	78-94°C	40.73
:Hn r	30.50	86.1	30.90	80-94°C	40.97
:Hn r	56.35	86.3	31.60	80-94°C	41.46
Triticale					
Chapala- Snoopy:Hn r	40.25	86.0	36.02	78-93°C	40.73

CONTINUACION DE LA T A B L A 4

Origen	Concentra- ción de ADN en ug/ml	Tm (°C)	% de hi- percromi cidad	Rango Trans. Térmica	Cont. G-C (mol %)
Triticale					
Armadillo:					
Hn r	60.50	84.5	31.96	80-92°C	37.09
Mezcla					
"in vitro"					
4 partes					
Chapala-					
2 partes					
Snoopy:					
Hn r	50.60	85.5	30.00	76-95	39.51

Nota: T.= Triticum
 S.= Secale
 H = Hoja (núcleo)
 n = nata
 p = precipitado
 r = roto
nr = no roto
 Cl = fase cloroplásmica
 Rt = Raíz total

* Este valor es muy bajo debido a impurezas, por lo que no se tomó en cuenta para las consideraciones hechas.

T A B L A 5

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN DE RAIZ TOTAL DE
Triticum aestivum Variedad Vulgare

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.172	5.813	7.38×10^{-3}	0.58
4	0.170	5.882	2.95×10^{-2}	1.16
10	0.165	6.060	7.38×10^{-2}	4.06
16	0.160	6.250	1.18×10^{-1}	6.97
22	0.155	6.451	1.623×10^{-1}	9.88
28	0.150	6.666	2.066×10^{-1}	12.79
57	0.145	6.896	4.206×10^{-1}	15.69
107	0.140	7.142	7.896×10^{-1}	18.60
142	0.135	7.407	1.047×10^0	21.51
217	0.130	7.692	1.601×10^0	24.41
377	0.128	7.812	2.782×10^0	27.32
1067	0.123	8.130	7.874×10^0	30.23
1152	0.120	8.333	8.501×10^0	33.13
1307	0.115	8.695	9.645×10^0	36.04
1537	0.110	9.090	1.134×10^1	38.95

Nota: Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros correspondientes a tiempo de 1-27 min, los cuales se encuentran resumidos en las tablas 5-14, fueron determinados por extrapolación sobre las gráficas correspondientes en las cuales se empezó a graficar la reasociación a tiempo cero.

T A B L A 6

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO EN FORMA DE
NATA DE NUCLEOS DE HOJA DE *Triticum aestivum* Variedad
Vulgare

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/Δ D.O.	Cot	% de reasociación
1	0.350	2.857	9.582×10^{-3}	4.10
4	0.340	2.941	3.832×10^{-2}	6.84
7.5	0.330	3.030	7.186×10^{-2}	9.58
11	0.320	3.125	1.054×10^{-1}	12.32
14.5	0.310	3.225	1.389×10^{-1}	15.06
17.5	0.300	3.333	1.676×10^{-1}	17.80
21	0.290	3.448	2.012×10^{-1}	20.54
32	0.285	3.508	3.066×10^{-1}	21.91
47	0.280	3.571	4.503×10^{-1}	23.28
62	0.275	3.636	5.940×10^{-1}	24.65
82	0.270	3.703	7.857×10^{-1}	26.02
97	0.265	3.773	9.294×10^{-1}	27.39
117	0.260	3.846	1.121×10^0	28.76
142.0	0.255	3.921	1.360×10^0	30.13
152	0.253	3.952	1.456×10^0	30.68
162	0.251	3.984	1.552×10^0	31.23
172	0.250	4.000	1.648×10^0	31.50
202	0.245	4.081	1.935×10^0	32.87
242	0.240	4.166	2.318×10^0	34.24
275	0.238	4.201	2.635×10^0	34.79
317	0.235	4.255	3.037×10^0	35.60
342	0.233	4.291	3.277×10^0	36.13
362	0.232	4.310	3.468×10^0	36.43
382	0.231	4.329	3.660×10^0	36.71
397	0.230	4.347	3.804×10^0	36.98
602	0.225	4.447	5.768×10^0	38.35
887	0.220	4.545	8.499×10^0	39.72

T A B L A 7

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO DE LA FASE
GELOPLASMICA DE HOJA DE Triticum aestivum Variedad
Terim

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.250	4.000	1.092x10 ⁻²	1.96
4	0.245	4.081	4.365x10 ⁻²	3.92
6	0.240	4.166	6.546x10 ⁻²	5.88
8	0.235	4.255	8.728x10 ⁻²	7.84
10	0.230	4.347	1.091x10 ⁻¹	9.80
12	0.225	4.444	1.309x10 ⁻¹	11.76
14	0.220	4.545	1.527x10 ⁻¹	13.72
16	0.215	4.651	1.745x10 ⁻¹	15.68
18	0.210	4.761	1.963x10 ⁻¹	17.64
20	0.205	4.878	2.182x10 ⁻¹	19.60
22	0.200	5.000	2.400x10 ⁻¹	21.56
24	0.195	5.128	2.618x10 ⁻¹	23.52
26	0.190	5.263	2.836x10 ⁻¹	25.49
28	0.185	5.405	3.054x10 ⁻¹	27.45
37	0.180	5.555	4.036x10 ⁻¹	29.41
75	0.175	5.714	8.182x10 ⁻¹	31.37
105	0.170	5.882	1.145x10 ⁰	33.33
120	0.165	6.060	1.309x10 ⁰	35.29
150	0.160	6.250	1.636x10 ⁰	37.25
240	0.155	6.451	2.618x10 ⁰	39.21
340	0.150	6.666	3.709x10 ⁰	41.17
410	0.145	6.896	4.473x10 ⁰	43.13
485	0.140	7.142	5.291x10 ⁰	45.09
675	0.135	7.407	7.364x10 ⁰	47.05
900	0.130	7.692	9.819x10 ⁰	49.01
1110	0.125	8.000	1.211x10 ¹	50.98

T A B L A 8

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO EN FORMA DE
PRECIPITADO DE NUCLEOS DE HOJA DE *Triticum aestivum*
Variedad Vulgare

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.320	3.125	8.899×10^{-3}	3.03
3	0.315	3.174	2.669×10^{-2}	4.54
5.5	0.310	3.225	4.894×10^{-2}	6.06
9	0.305	3.278	8.909×10^{-2}	7.57
11.5	0.300	3.333	1.023×10^{-1}	9.09
13.5	0.295	3.389	1.200×10^{-1}	10.60
16	0.290	3.448	1.423×10^{-1}	12.12
18	0.285	3.508	1.601×10^{-1}	13.63
20	0.280	3.571	1.779×10^{-1}	15.15
22	0.275	3.636	1.957×10^{-1}	16.66
27	0.270	3.703	2.402×10^{-1}	18.18
47	0.265	3.773	4.182×10^{-1}	19.69
67	0.260	3.846	5.962×10^{-1}	21.21
87	0.255	3.921	7.742×10^{-1}	22.72
102	0.250	4.000	9.076×10^{-1}	24.24
117	0.247	4.048	1.041×10^0	25.15
137	0.245	4.081	1.219×10^0	25.75
182	0.240	4.166	1.619×10^0	27.27
242	0.235	4.255	2.153×10^0	28.78
292	0.230	4.347	2.598×10^0	30.30
417	0.225	4.444	3.710×10^0	31.81
537	0.220	4.545	4.778×10^0	33.33
697	0.215	4.651	6.202×10^0	34.84
847	0.210	4.761	7.537×10^0	36.36
887	0.208	4.807	7.893×10^0	37.87

T A B L A 9

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO EN FORMA DE
 RATA DE NUCLEOS DE HOJA DE *Triticum durum* Variedad
 Chapala

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.318	3.144	9.444×10^{-3}	0.62
1.75	0.315	3.174	1.652×10^{-2}	1.56
3.5	0.310	3.225	3.305×10^{-2}	3.12
5.50	0.305	3.278	5.194×10^{-2}	4.68
7.5	0.300	3.333	7.083×10^{-2}	6.25
9.5	0.295	3.389	8.971×10^{-2}	7.81
11.5	0.290	3.448	1.086×10^{-1}	9.37
13.5	0.285	3.508	1.274×10^{-1}	10.93
15.5	0.280	3.571	1.463×10^{-1}	12.50
17.5	0.275	3.636	1.652×10^{-1}	14.06
19.5	0.270	3.703	1.841×10^{-1}	15.62
21.5	0.265	3.773	2.030×10^{-1}	17.18
23.5	0.260	3.846	2.219×10^{-1}	18.75
30	0.255	3.921	2.833×10^{-1}	20.31
48	0.250	4.000	4.533×10^{-1}	21.87
60.5	0.245	4.081	5.713×10^{-1}	23.43
78	0.240	4.166	7.366×10^{-1}	25.00
93	0.235	4.255	8.782×10^{-1}	26.56
113	0.230	4.347	1.067×10^0	28.12
125	0.228	4.385	1.183×10^0	28.75
138	0.225	4.444	1.308×10^0	29.68
183	0.220	4.545	1.723×10^0	31.25
228	0.215	4.651	2.158×10^0	32.81
273	0.210	4.761	2.573×10^0	34.37
300	0.209	4.784	2.836×10^0	34.68
353	0.205	4.878	3.331×10^0	35.93
438	0.200	5.000	4.136×10^0	37.50
843	0.195	5.128	7.961×10^0	39.06
1285	0.193	5.181	1.213×10^1	39.69

T A B L A 10

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN NO ROTO EN FORMA DE PRECIPITADO DE NUCLEOS DE HOJA DE *Triticum monococcum* Variedad Einkorn

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.253	3.952	6.696x10 ⁻³	0.78
3	0.250	4.000	2.008x10 ⁻²	1.96
6	0.245	4.081	4.017x10 ⁻²	3.92
10	0.240	4.166	6.696x10 ⁻²	5.88
14	0.235	4.255	9.374x10 ⁻²	7.84
18	0.230	4.347	1.205x10 ⁻¹	9.80
22	0.225	4.444	1.473x10 ⁻¹	11.76
32	0.220	4.545	2.143x10 ⁻¹	13.72
57	0.215	4.651	3.816x10 ⁻¹	15.68
82	0.210	4.761	5.490x10 ⁻¹	17.64
112	0.205	4.878	7.499x10 ⁻¹	19.60
140	0.202	4.950	9.374x10 ⁻¹	20.78
172	0.200	5.000	1.151x10 ⁰	21.56
200	0.198	5.050	1.339x10 ⁰	22.35
247	0.195	5.128	1.653x10 ⁰	23.52
452	0.190	5.263	3.026x10 ⁰	25.49
667	0.185	5.405	4.466x10 ⁰	27.45
812	0.180	5.555	5.437x10 ⁰	29.41
885	0.179	5.586	5.925x10 ⁰	31.37

T A B L A 11

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO EN FORMA DE NATA DE NUCLEOS DE HOJA DE Triticale Armadillo

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
0.5	0.388	2.577	5.595x10 ⁻³	0.51
1.0	0.387	2.583	1.119x10 ⁻²	0.76
1.5	0.383	2.597	1.678x10 ⁻²	1.79
3	0.380	2.631	3.357x10 ⁻²	2.56
7	0.370	2.702	7.833x10 ⁻²	5.12
11	0.360	2.777	1.230x10 ⁻¹	7.69
15	0.350	2.857	1.678x10 ⁻¹	10.25
19	0.340	2.941	2.126x10 ⁻¹	12.82
22	0.330	3.030	2.461x10 ⁻¹	15.38
33	0.325	3.076	3.692x10 ⁻¹	16.66
42	0.320	3.125	4.699x10 ⁻¹	17.94
122	0.310	3.225	1.365x10 ⁰	20.51
192	0.300	3.333	2.148x10 ⁰	23.07
267	0.290	3.448	2.987x10 ⁰	25.64
402	0.280	3.571	4.498x10 ⁰	28.20
462	0.275	3.636	5.170x10 ⁰	29.48
532	0.270	3.703	5.953x10 ⁰	30.76
717	0.265	3.773	8.023x10 ⁰	32.05
902	0.260	3.846	1.009x10 ¹	33.33
1422	0.250	4.000	1.591x10 ¹	35.89

T A B L A 12

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO EN FORMA DE NATA DE NUCLEOS DE HOJA DE Triticale F₁ Chapala-Snoopy

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/ΔD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.285	3.508	7.380x10 ⁻³	1.72
2	0.280	3.571	1.476x10 ⁻²	3.44
3	0.275	3.636	2.214x10 ⁻²	5.17
4	0.270	3.731	2.952x10 ⁻²	6.89
5	0.265	3.773	3.690x10 ⁻²	8.62
6	0.260	3.846	4.428x10 ⁻²	10.34
8	0.255	3.921	5.904x10 ⁻²	12.06
10	0.250	4.000	7.380x10 ⁻²	13.79
13	0.245	4.081	9.594x10 ⁻²	15.51
15	0.240	4.166	1.107x10 ⁻¹	17.24
35	0.235	4.255	2.583x10 ⁻¹	18.94
55	0.230	4.347	4.059x10 ⁻¹	20.68
85	0.225	4.444	6.273x10 ⁻¹	22.41
120	0.220	4.545	8.856x10 ⁻¹	24.13
150	0.215	4.651	1.107x10 ⁰	25.86
200	0.210	4.761	1.476x10 ⁰	27.58
260	0.205	4.878	1.918x10 ⁰	29.31
320	0.200	5.000	2.361x10 ⁰	31.03
360	0.198	5.050	2.656x10 ⁰	31.72
410	0.195	5.128	3.025x10 ⁰	32.75
605	0.190	5.265	4.464x10 ⁰	34.48
750	0.185	5.405	5.535x10 ⁰	36.20
895	0.180	5.555	6.605x10 ⁰	37.93
1040	0.175	5.714	7.675x10 ⁰	39.65
1085	0.173	5.780	8.007x10 ⁰	41.37



QUÍMICA

T A B L A 13

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE ADN ROTO EN FORMA DE NATA DE NUCLEOS DE HOJA DE Secale cereale Variedad

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	Snoopy		% de reasociación
		1/ΔD.O.	Cot	
1	0.325	3.076	1.009x10 ⁻²	4.41
4	0.315	3.174	4.036x10 ⁻²	7.35
7	0.305	3.278	7.063x10 ⁻²	10.29
11	0.295	3.389	1.110x10 ⁻¹	13.23
14	0.285	3.508	1.412x10 ⁻¹	16.17
17	0.275	3.636	1.715x10 ⁻¹	19.11
21	0.265	3.773	2.119x10 ⁻¹	22.05
24	0.255	3.921	2.421x10 ⁻¹	25.00
27	0.245	4.081	2.724x10 ⁻¹	27.90
35	0.240	4.166	3.531x10 ⁻¹	30.88
55	0.235	4.255	5.549x10 ⁻¹	32.30
65	0.230	4.347	6.558x10 ⁻¹	33.82
80	0.225	4.444	8.072x10 ⁻¹	35.29
100	0.220	4.545	1.009x10 ⁰	36.76
120	0.215	4.651	1.210x10 ⁰	38.23
140	0.210	4.761	1.412x10 ⁰	39.70
165	0.205	4.878	1.664x10 ⁰	41.17
190	0.200	5.000	1.917x10 ⁰	42.64
210	0.195	5.128	2.119x10 ⁰	44.11
245	0.190	5.263	2.472x10 ⁰	45.58
290	0.185	5.405	2.926x10 ⁰	47.05
330	0.180	5.555	3.329x10 ⁰	48.52
370	0.175	5.714	3.733x10 ⁰	50.00
415	0.170	5.882	4.187x10 ⁰	51.47
455	0.165	6.060	4.590x10 ⁰	52.94
550	0.160	6.250	5.549x10 ⁰	54.41
680	0.155	6.451	6.861x10 ⁰	55.88
810	0.150	6.666	8.172x10 ⁰	57.35
955	0.145	6.896	9.635x10 ⁰	58.82
1150	0.140	7.142	1.160x10 ¹	60.29
1285	0.136	7.352	1.296x10 ¹	61.47

T A B L A 14

RESULTADOS DE LA REASOCIACION DE UNA MEZCLA "IN VITRO" DE ADN_s ROTOS EN FORMA DE NATAS DE NUCLEOS DE HOJAS DE *Triticum durum* Variedad Chapala Y *Secale cereale* Variedad Snoopy EN UNA PROPORCION DE 4 : 2 RESPECTIVAMENTE

Tiempo (min)	D.O. _t -D.O. _∞	1/AD.O.	Cot	% de reasociación
1	0.305	3.278	9.633×10^{-3}	3.17
3	0.300	3.333	2.889×10^{-2}	4.76
5.5	0.295	3.389	5.298×10^{-2}	6.34
8	0.290	3.448	7.706×10^{-2}	7.93
10.5	0.285	3.508	1.011×10^{-1}	9.52
13	0.280	3.571	1.252×10^{-1}	11.11
15.5	0.275	3.636	1.493×10^{-1}	12.69
18	0.270	3.703	1.733×10^{-1}	14.28
20.5	0.265	3.773	1.974×10^{-1}	15.87
23	0.260	3.846	2.215×10^{-1}	17.46
25.5	0.255	3.921	2.456×10^{-1}	19.04
27	0.252	3.968	2.600×10^{-1}	20.00
31	0.250	4.000	2.986×10^{-1}	20.63
52.5	0.245	4.081	5.057×10^{-1}	22.22
80	0.240	4.166	7.706×10^{-1}	23.80
110	0.235	4.255	1.059×10^0	25.39
147.5	0.230	4.347	1.420×10^0	26.98
185	0.225	4.444	1.782×10^0	28.57
440	0.220	4.545	4.238×10^0	30.15
650	0.215	4.651	6.261×10^0	31.74
1015	0.210	4.761	9.777×10^0	33.33
1285	0.207	4.830	1.237×10^1	34.28

T A B L A 15

VALORES DE LAS PENDIENTES (k_2') DE LAS CURVAS INVERTIDAS DE LAS CINÉTICAS DE REASOCIACION, VALORES APROXIMATIVOS (k_2'') Y CANTIDAD DE NUCLEOTIDOS POR CADA FAMILIA

Origen	Familia	k_2' (1/mol.seg)	k_2'' (1/mol.s)
<u>T.aestivum</u>	i	3.1120	601.28
Variedad	ii	0.3822	176.60
Vulgare:	iii	0.2593	131.29
Hn, n, r.	iv	0.1361	70.74
	v	0.0481	0.0481
T.aestivum	i	5.4466	741.97
Variedad	ii	0.6808	575.45
Torim:	iii	0.2984	116.43
Cl, r.	iv	0.1452	0.1452
T.durum	i	8.7140	1047.7
Variedad	ii	0.5440	247.04
Chapala:	iii	0.2448	231.72
Hn, n, r.	iv	0.1523	23.51
	v	0.0189	0.0189
T.monococcum	i	3.2520	4516
Variedad	ii	0.4222	606.1
Einkorn: Hn, p,	iii	0.1831	305.35
<u>nr.</u>	iv	0.0778	0.0778
Triticale	i	2.2930	2978.2
Armadillo:	ii	0.1567	423.60
Hn, n, r.	iii	0.1117	68.50
	iv	0.0365	0.0365

CONTINUACION DE LA T A B L A 15

Origen	Familia	k_2^I (1/mol.seg)	k_2^{II} (1/mol.seg)
Triticale	i	4.5388	1186.7
Chapala-	ii	0.3631	960.5
Snoopy:	iii	0.2223	121.2
Hn, n, r.	iv	0.1063	0.1063
S.cereale	i	4.0345	229.7
Variedad	ii	0.6051	145.5
Snoopy:	iii	0.3932	15.56
Hn, n, r	iv	0.1631	0.1631
Mezcla "in vitro"	i	2.7230	312.05
	ii	0.2940	50.76
4 partes	iii	0.0449	0.0449
Chapala-			
2 partes			
Snoopy:			
Hn, n, r.			

Nota: T. = Triticum

S. = Secale

Hn. = núcleos de hoja

n. = ADN en forma de nata

r. = ADN roto con jeringa y aguja N°. 27

Cl. = fase cloroplásmica

nr. = ADN no roto

p. = ADN en forma de precipitado.

T A B L A 16

CONTENIDO DE PARES DE NUCLEOTIDOS POR GENOMA

Origen	Contenido de ADN por célula (pg)	Contenido de ADN por genoma (pg) haploide.	Contenido de pares de nucleótidos por genoma haploide.
Triticum aestivum L.(6X)	54.3	1.29	3.94×10^9
Triticum durum Desf.(4X)	37.9	1.35	4.12×10^9
Triticum monococcum L. (2X)	21.0	1.50	4.58×10^9
Secale cereale L.(2X)	28.4	2.02	6.17×10^9
Triticale (8X)	82.7	1.47	4.49×10^9
Mezcla "in vitro" 4 partes Chapala - 2 partes Snoopy			4.80×10^9 (*)
Cloroplasto a partir de $Cot_{1/2} = 10^{-1}$ Ref: (102)			5.00×10^4

* Valor obtenido a partir de los datos mostrados arriba.

T A B L A 17

REPETICION DE CADA FAMILIA EN EL GENOMA Y PORCIENTO DE
CONTRIBUCION DE CADA FAMILIA EN EL GENOMA

Origen	Familia	Repetición en el genoma	% de contribución en el genoma
T.aestivum	i	2.6×10^6	15.87
Variedad	ii	1.1×10^6	4.69
Vulgare	iii	9.9×10^5	5.34
Hn, n, r.	iv	2.0×10^5	5.49
	v	2.0×10^2	v+otras 68.61
T.aestivum	i	5.0×10^1	25.76
Variedad	ii	(1.6×10^1)	(6.62)
Torin	iii	(-)	(7.29)
Cl, r.	iv	(-)	(iv+otras60.33)
T.durum	i	3.7×10^6	16.03
Variedad	ii	8.2×10^5	6.60
Chapala	iii	8.0×10^5	3.90
Hn, n, r.	iv	8.2×10^4	8.78
	v	6.8×10^1	v+otras 64.69
T.monococcum	i	4.6×10^7 ★	10.62
Variedad	ii	2.8×10^6	5.68
Einkorn	iii	9.2×10^3	3.71
Hn, p, nr.	iv	4.6×10^2	iv+otras 79.99
Triticale	i	1.5×10^7 ★	16.48
Armadillo	ii	1.5×10^6	2.64
Hn, n, r.	iii	2.2×10^5	8.25
	iv	2.2×10^2	iv+otras 72.63

CONTINUACION DE LA T A B L A 17

Origen	Familia	Repetición en el genoma	% de contribución en el genoma
Triticale F ₁	i	4.5 x 10 ⁶	17.93
Chapala-	ii	2.2 x 10 ⁶	2.75
Snoopy	iii	4.5 x 10 ⁵	6.41
Hn, n, r.	iv	5.6 x 10 ²	iv+ otras 72.91
S.cereale	i	1.1 x 10 ⁶	26.11
Variedad	ii	6.8 x 10 ⁵	6.73
Snoopy	iii	6.8 x 10 ⁴	13.20
Hn, n, r.	iv	8.8 x 10 ²	iv+ otras 53.96
Mezcla "in vitro"	i	1.2 x 10 ⁶	16.53
	ii	2.4 x 10 ⁵	8.39
4 partes	iii	2.4 x 10 ²	iii+ otras 75.08
Chapala - 2 partes			
Snoopy			
Hn, n, r.			

Nota: T. = Triticum

S. = Secale

Hn. = núcleos de hoja

n. = ADN en forma de nata

p. = ADN en forma de precipitado

r. = ADN roto con jeringa y aguja N°. 27

Cl. = fase cloroplásmica

nr. = ADN no roto

+ otras = otras familias menos repetitivas y la única.

★Valores muy elevados debido a que las correcciones son aproximativas.

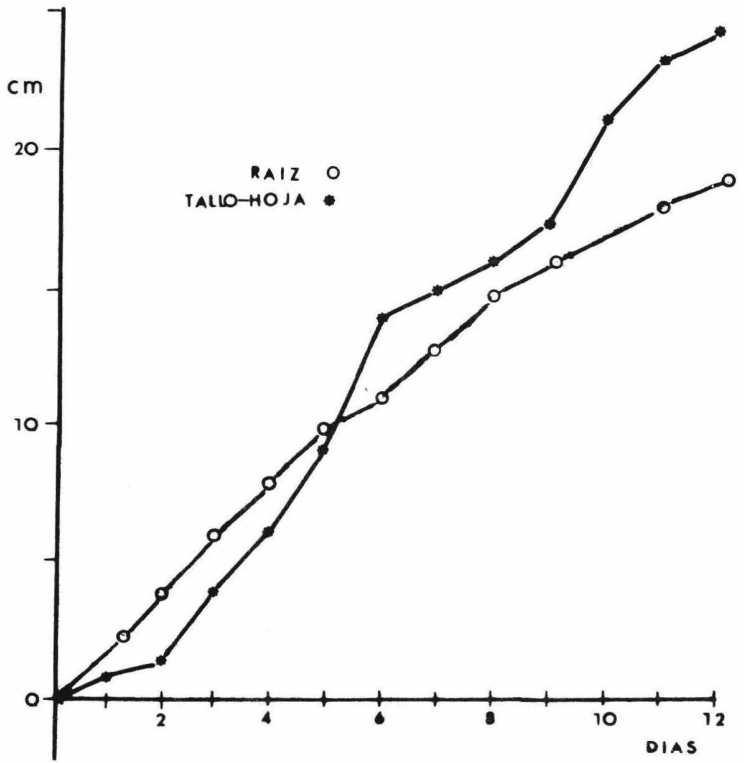
T A B L A 18

COMPARACION DE LAS SEMEJANZAS DE LAS FAMILIAS DE ADN's
REPETITIVOS ENTRE DIFERENTES CEREALES

<u>Origen</u>	<u>Familia</u>		<u>Comparación</u>	<u>Familia</u>
Triticum	i	=	T.aestivum (6X)	i
durum	ii	=	T.aestivum (6X)	ii
Variedad	iii	=	T.aestivum (6X)	iii
Chapala	iv	= \pm	T.aestivum (6X)	iv
(4X)	v	= \pm	T.aestivum (6X)	v
Triticale	i	=	T.durum (4X)	i
F ₁	ii	= \pm	T.durum (4X)	ii
Chapala-	iii	= \pm	S.cereale (2X)	ii
Snoopy (6X)	iv	=	S.cereale (2X)	iv
Mezcla "in	i	=	S.cereale (2X)	i
vitro" de	ii	=	T.durum (4X)	iv
4 partes	iii	=	T.durum (4X)	v
Chapala-				
2 partes				
Snoopy				
Triticale	i	=	-----	
Armadillo	ii	= \pm	T.aestivum (6X)	entre i y ii
(6X)	iii	=	T.aestivum (6X)	iv
	iv	=	T.aestivum (6X)	v

Nota: T.aestivum (6X) = Triticum aestivum Var. vulgare
T.durum (4X) = Triticum durum Variedad Chapala
S.cereale (2X) = Secale cereale Variedad Snoopy

FIGURA 3.- Curvas de Germinación de *T. aestivum* vulgare.



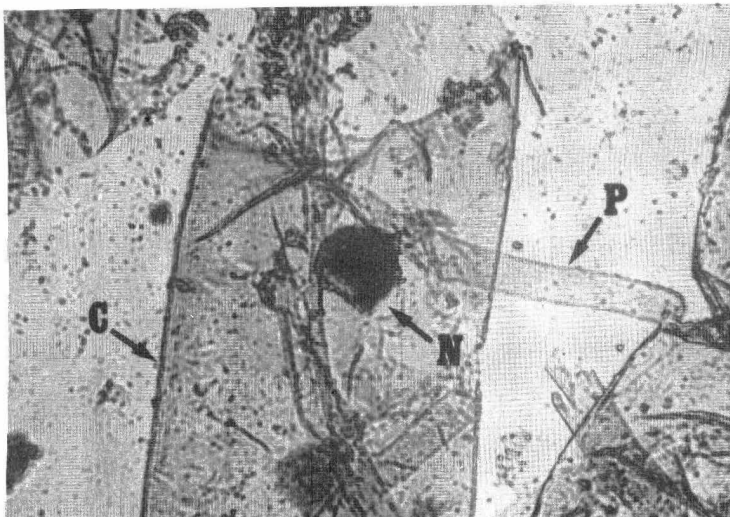


FIGURA 4._ Células Rotas de Raíz (C), Con Núcleos (N) y Pelos Absorbentes (P). X 500

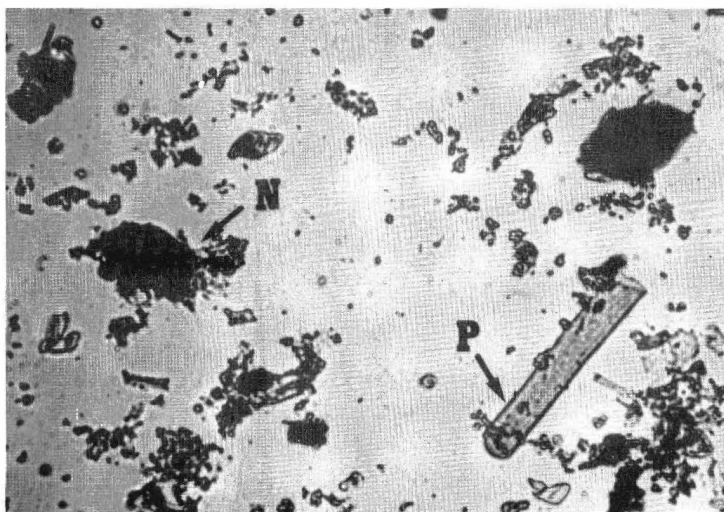


FIGURA 5._ Núcleos (N), y Pelos Absorbentes (P) de Células de Raíz. X 500

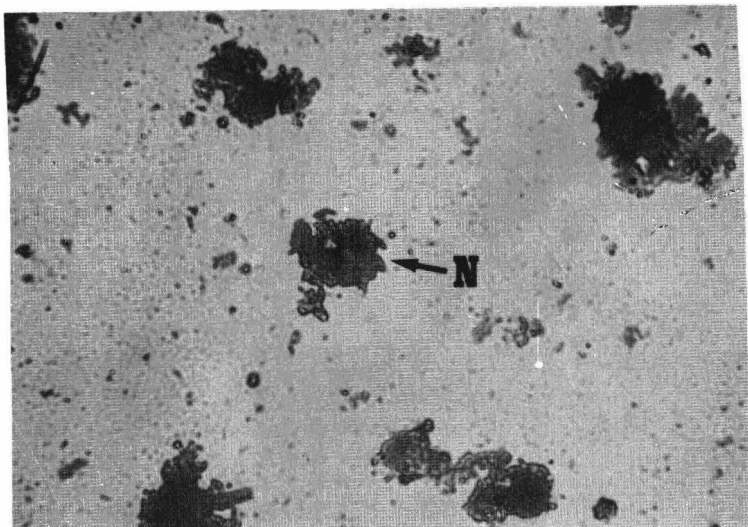


FIGURA 6. - Núcleos de Células de Raíz (N) Purificados, X 500

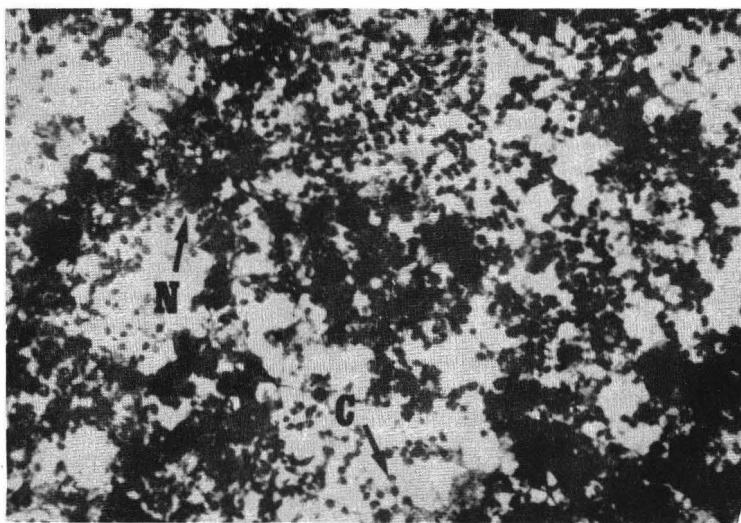


FIGURA 7. - Núcleos (N) y Cloroplastos (C) de Células de Hoja X 250

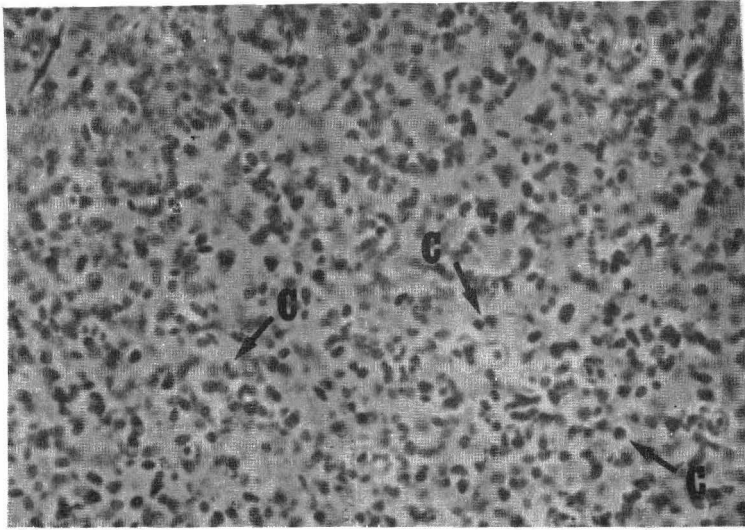


FIGURA 8._ Cloroplastos de Células de Hoja (C). X 500

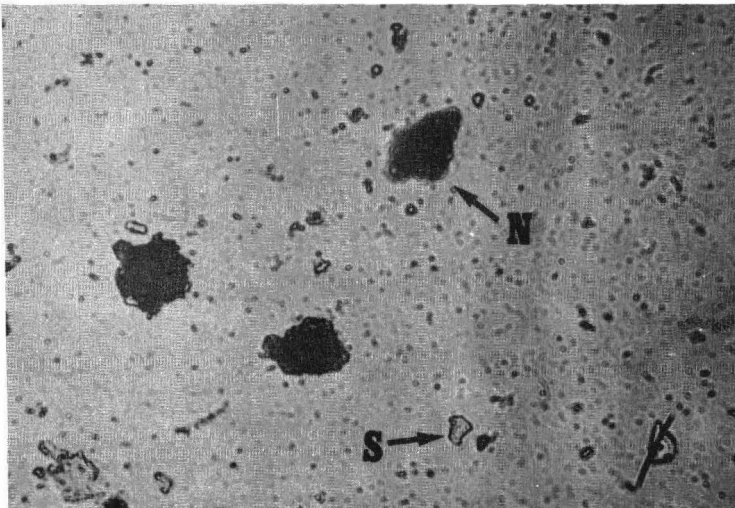


FIGURA 9._ Núcleos de Células de Hoja Purificados (N),
y Cristales de Sacarosa. (S). X 500

FIGURA 10 ... Espectro de Absorción de ADN Nuclear de Hoja de S.cereale.

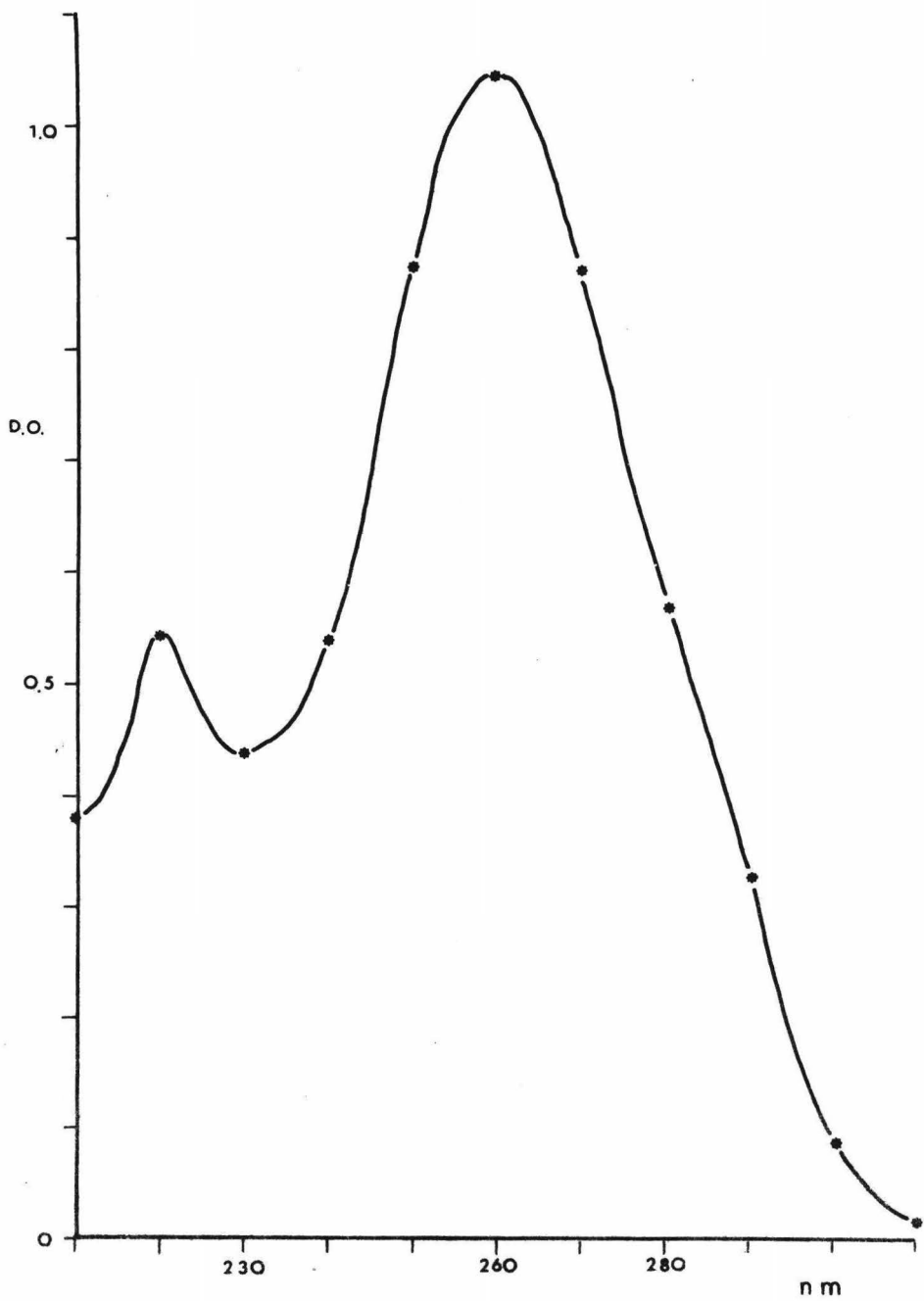


FIGURA 11.- Curva de Temperatura de Fusión de ADN Nuclear Roto de Hoja de *T. durum* Variedad Chapala.

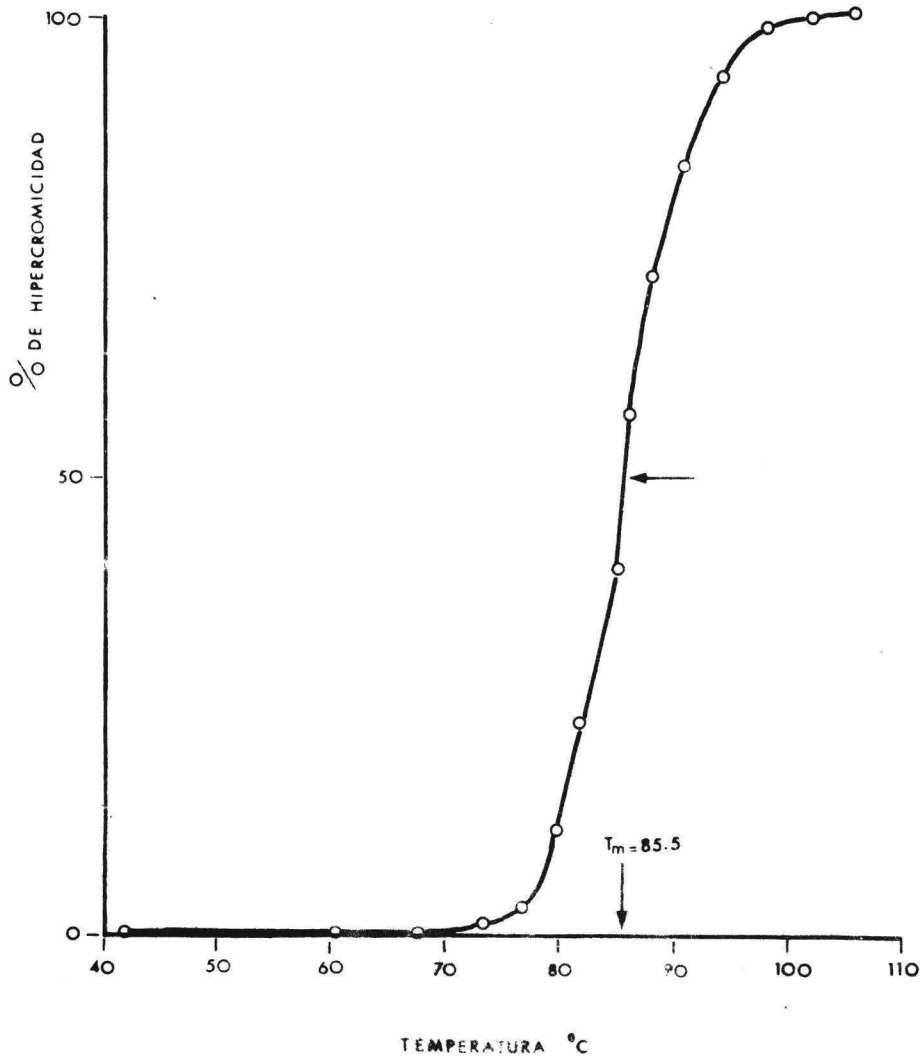


FIGURA 12_Curva de Temperatura de Fusión de ADN Nuclear Roto de Hoja de *S. cereale* Variedad Snoopy.

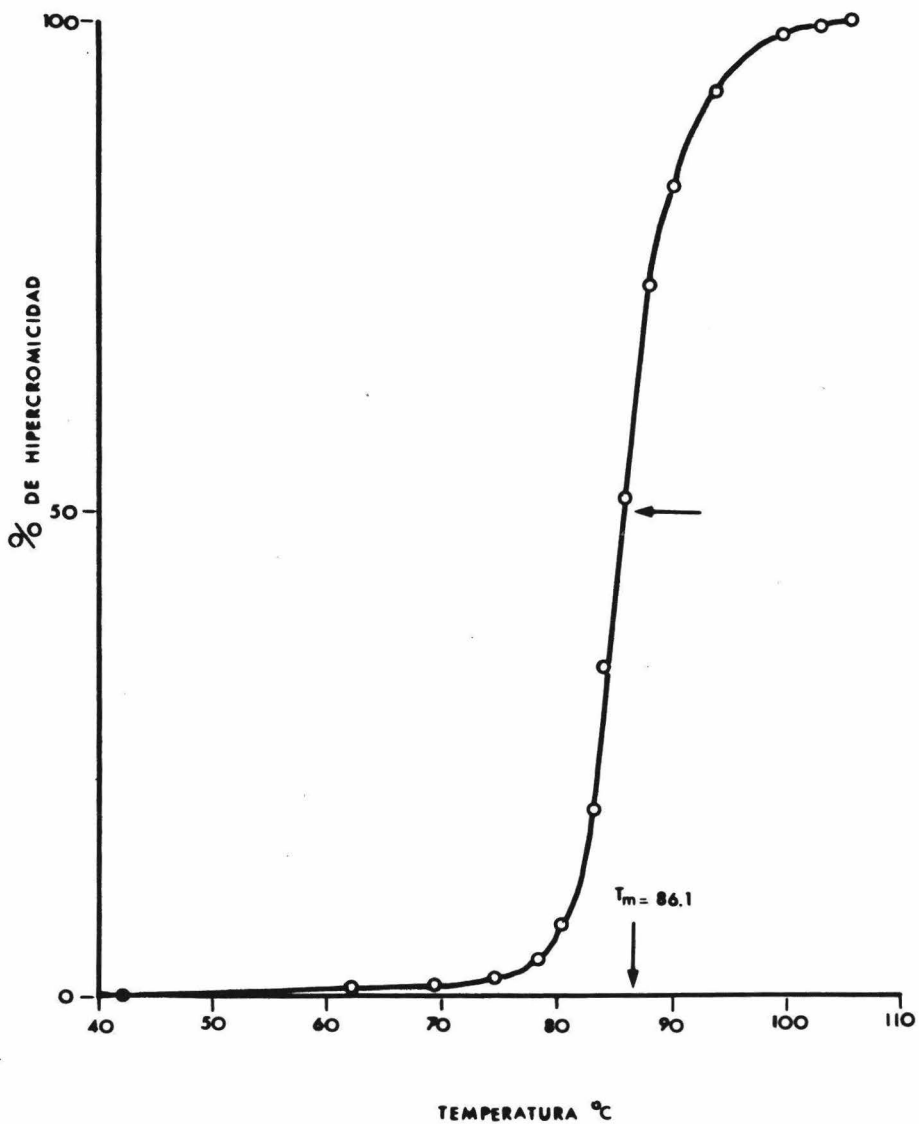


FIGURA 13.— Curva de Temperatura de Fusión de ADN Roto de Cloroplasto de Hoja de *T.aestivum* Variedad Torim.

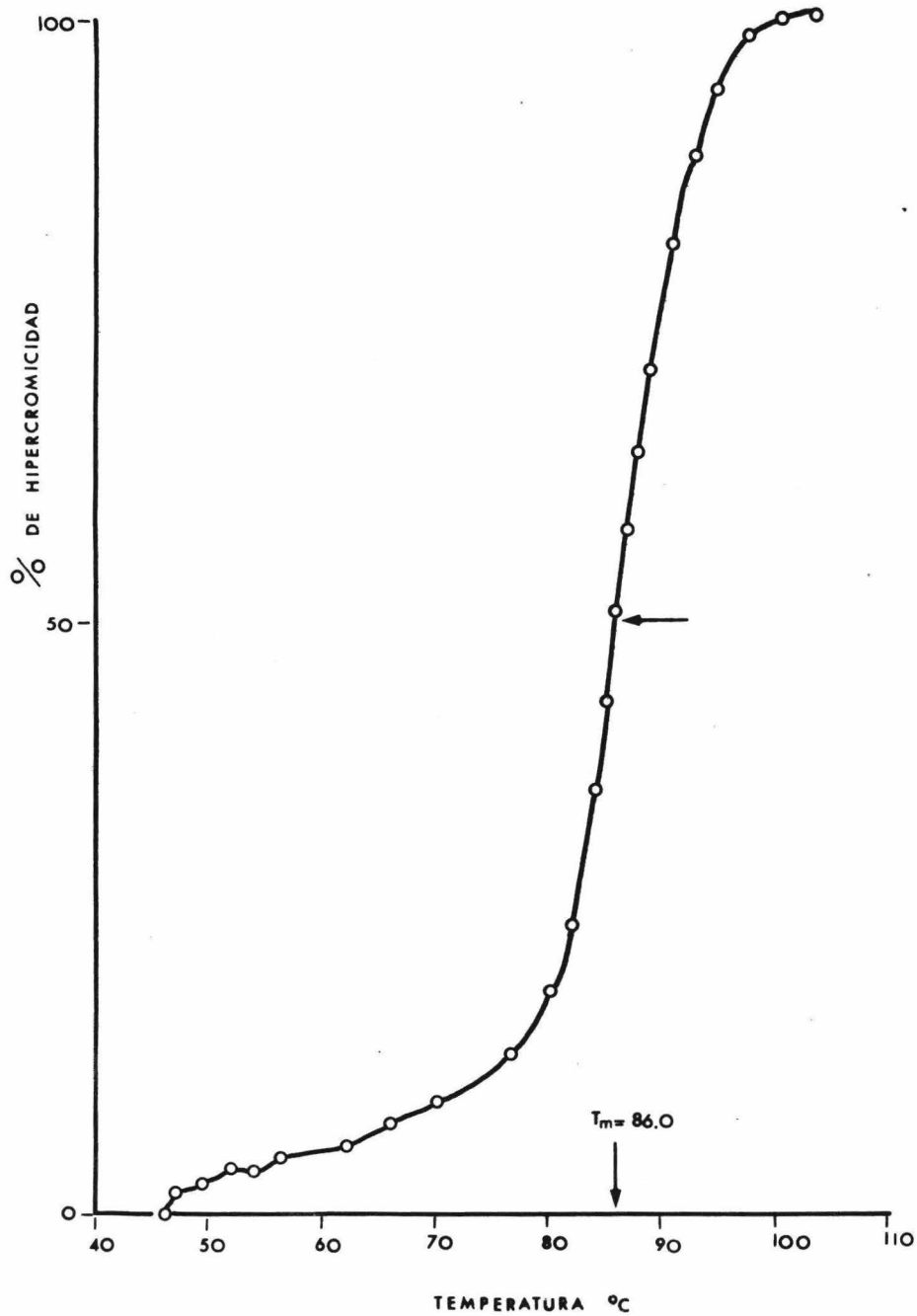


FIGURA 14. Comparación de Curvas de Cinética de Reasociación de ADN, Rotos de *T.aestivum vulgare*; Raíz Total (○), Núcleos de Hoja (★), y Cloroplasto (⊙).

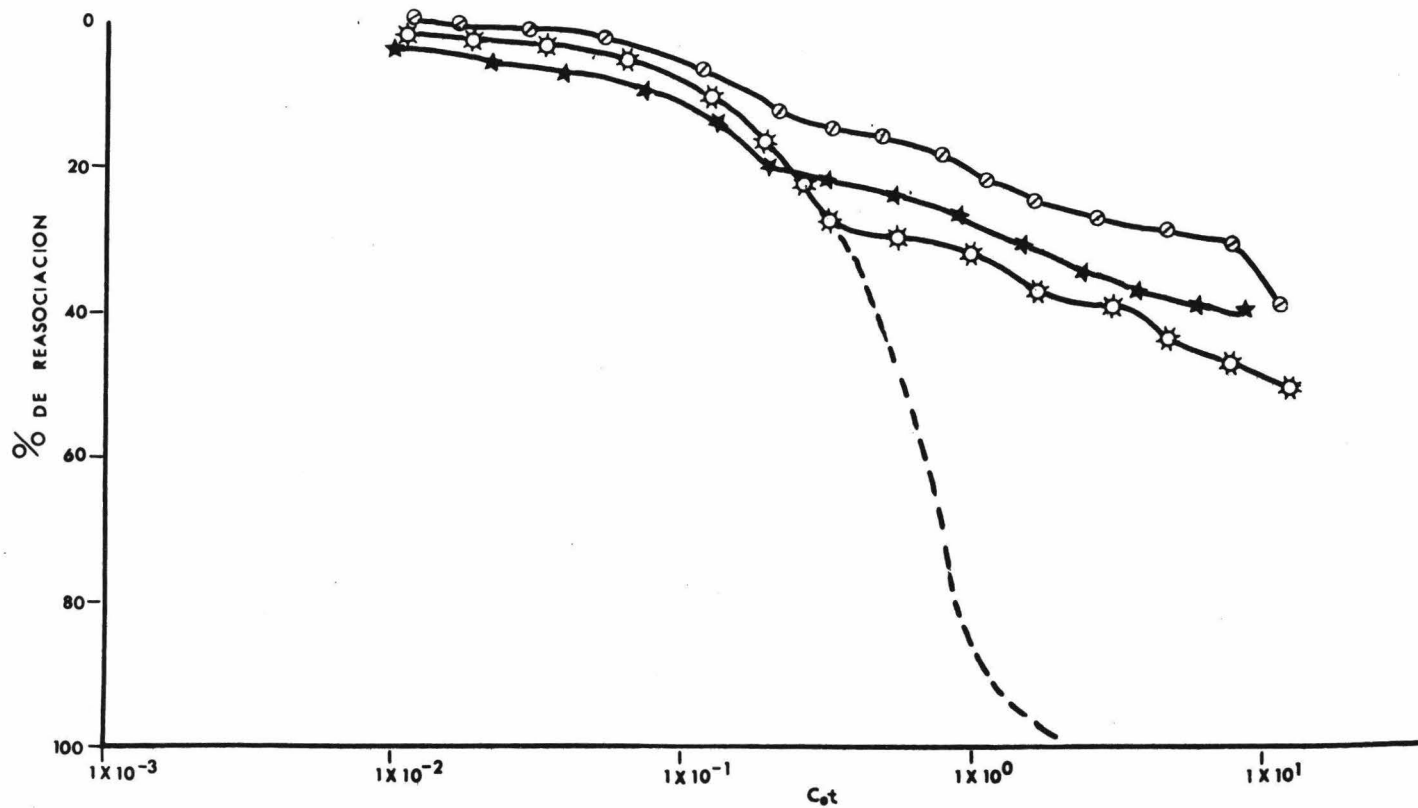


FIGURA 15... Curvas de Cinética de Reasociación de ADN Nuclear de Hoja, Obtenido en Forma de Nata (O) y Precipitado (*), de *T.aestivum* vulgare.

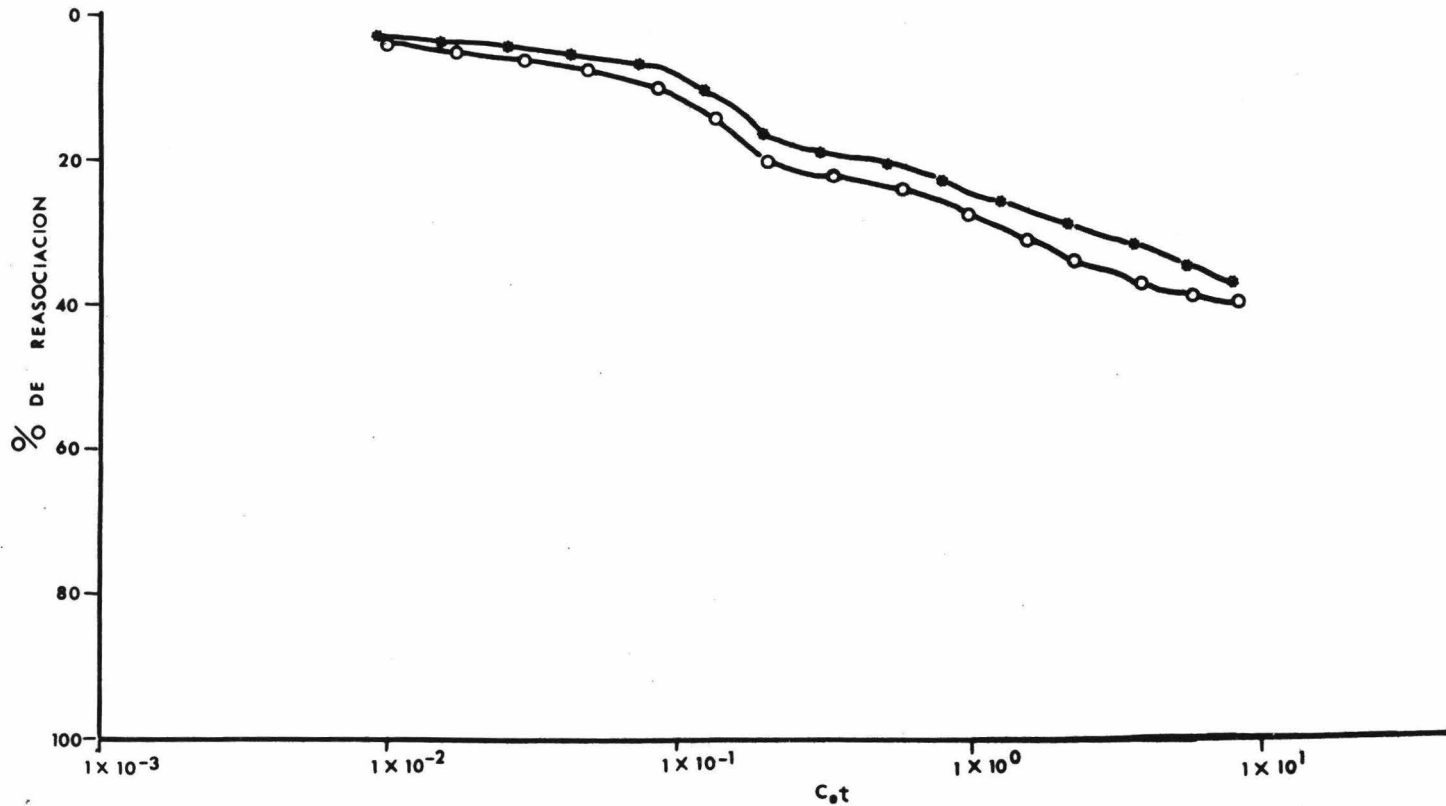


FIGURA 16.- Curvas de Cinética de Reasociación de ADN_s Nucleares de Hojas de *T. durum* Var. Chapala 4X (Roto) \circ , *T. aestivum* vulgare 6X (Roto) \star y *T. monococcum* Var. Einkorn 2X (No Roto) \star .

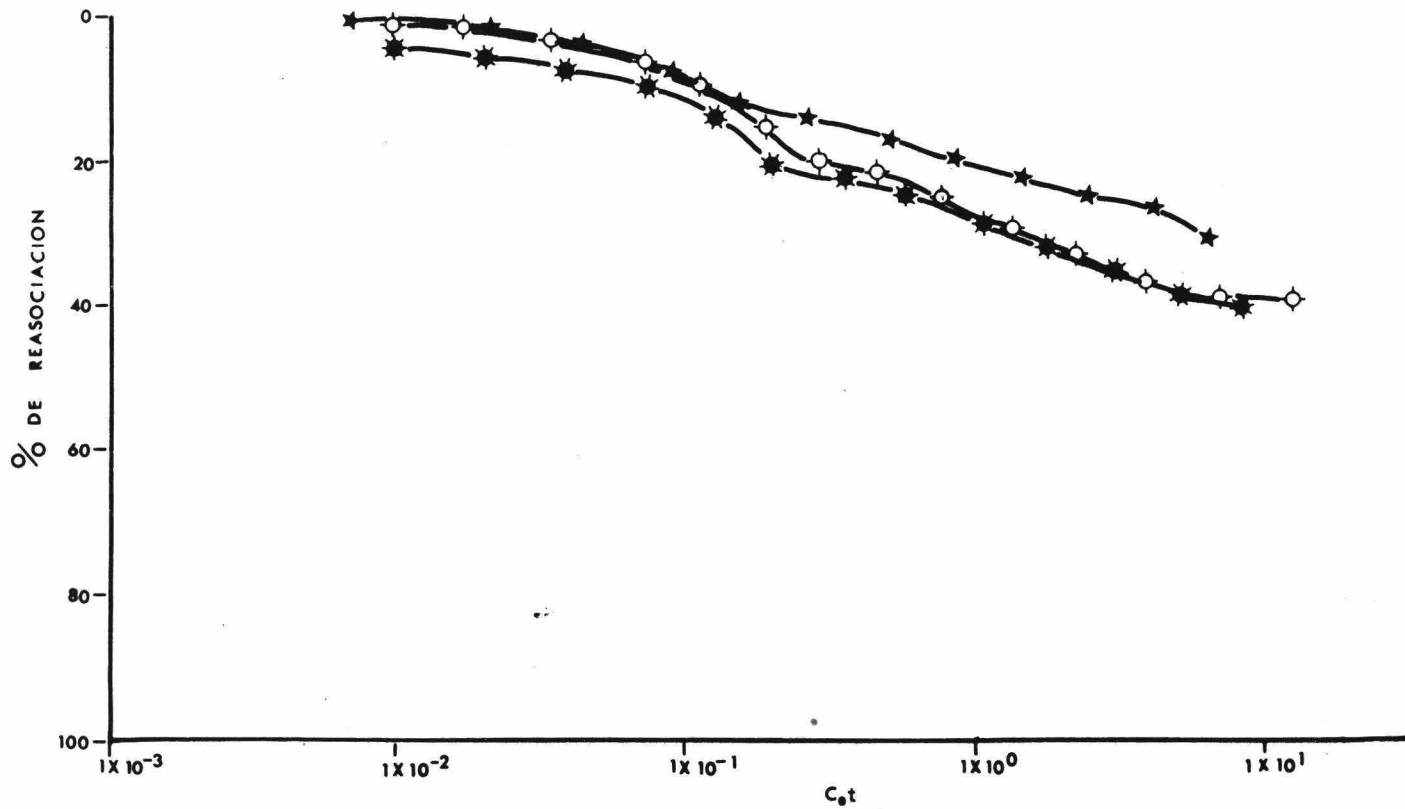


FIGURA 17.- Curvas de Cinética de Reasociación de ADN_s Nucleares Rotos de Hojas de Triticales Armadillo (○) y Chapala-Snoopy (●).

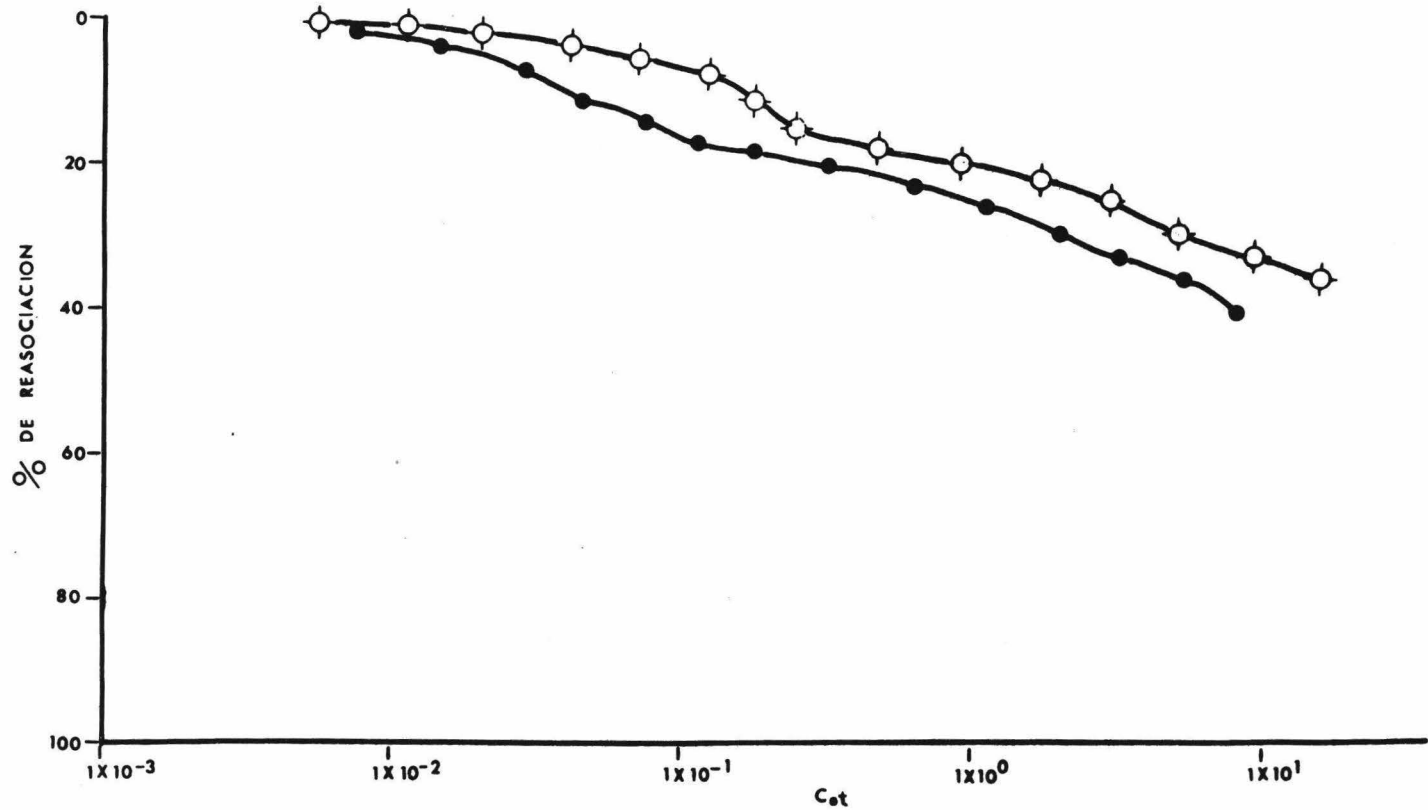


FIGURA 18.- Curvas de Cinética de Reasociación de ADN_s Nucleares Rotos de Hojas de Centeno 2X (O), Chapala 4X (●), Chapala-Snoopy 6X (X) y Mezcla Hecha "in vitro" Con ADN_s de Chapala 4X y Centeno 2X Nucleares de Hoja Rotos, Proporción 4:2 Respectivamente (●).

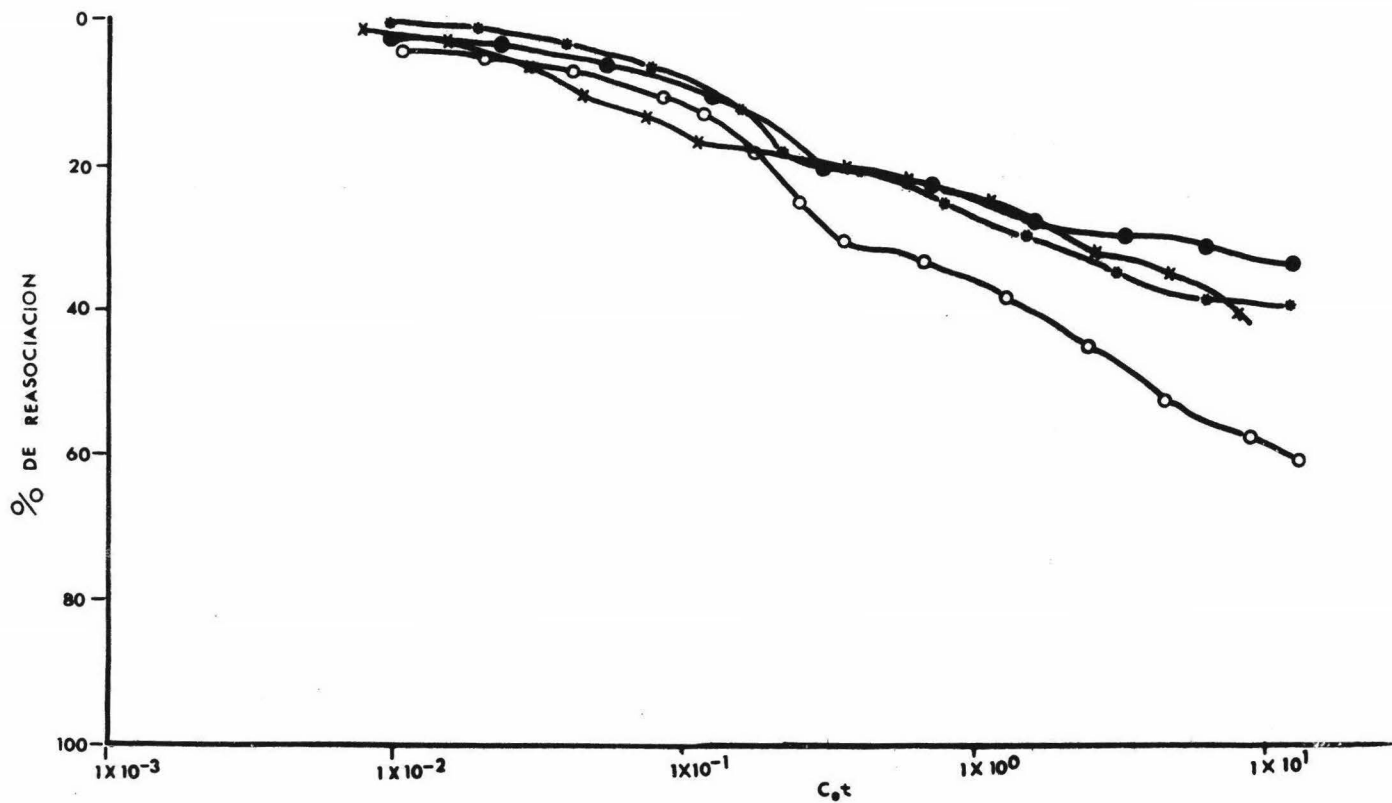


FIGURA 19.- Curvas de Cinética de Reasociación invertidas de ADN_s de *T aestivum* vulgare, Raíz Total (O) y Cloroplasto (●).

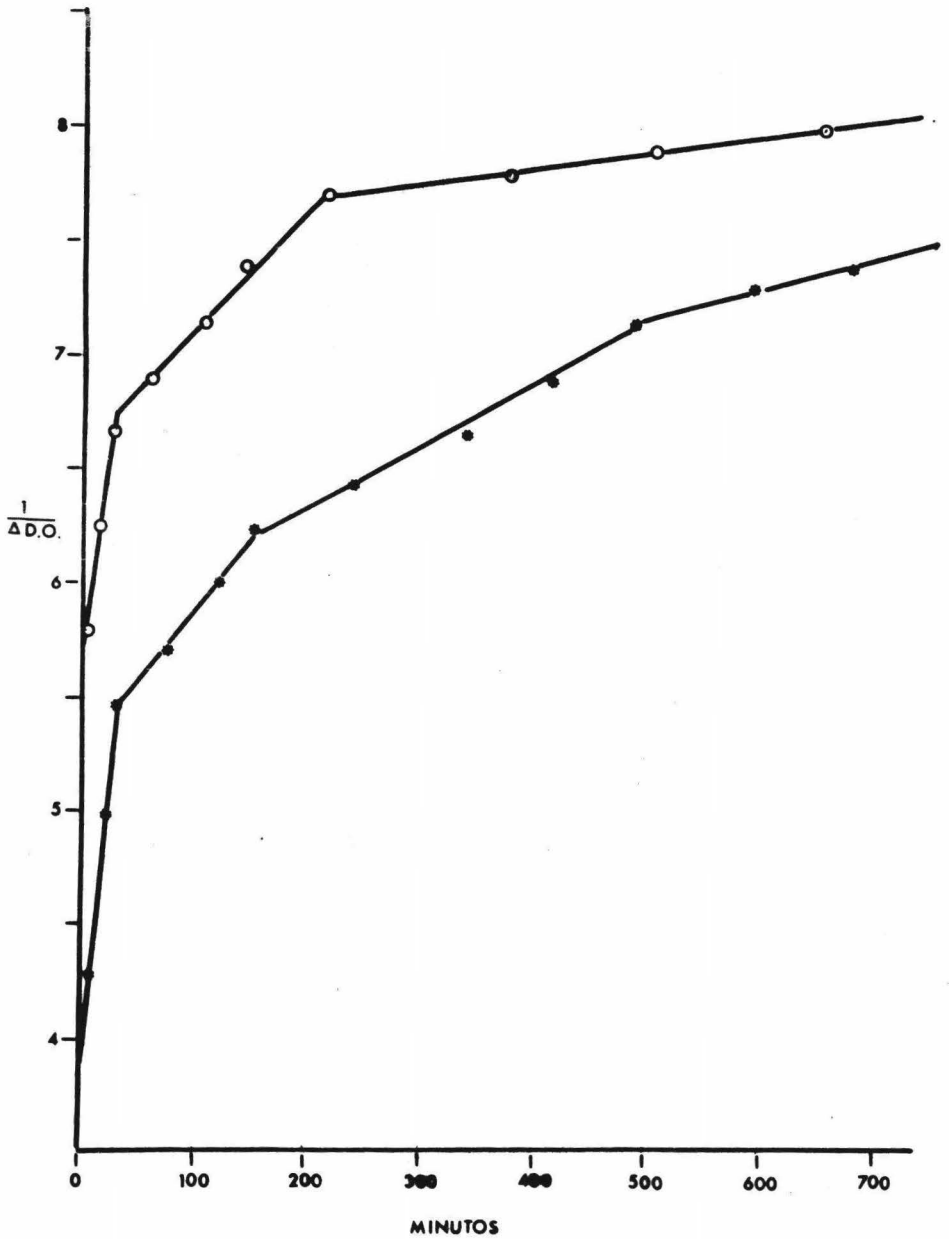


FIGURA 20.- Curvas de Cinética de Reasociación Invertidas de ADN_s Nucleares de *T.aestivum* vulgare Rotos: Precipitado (★) y Nata (☉).

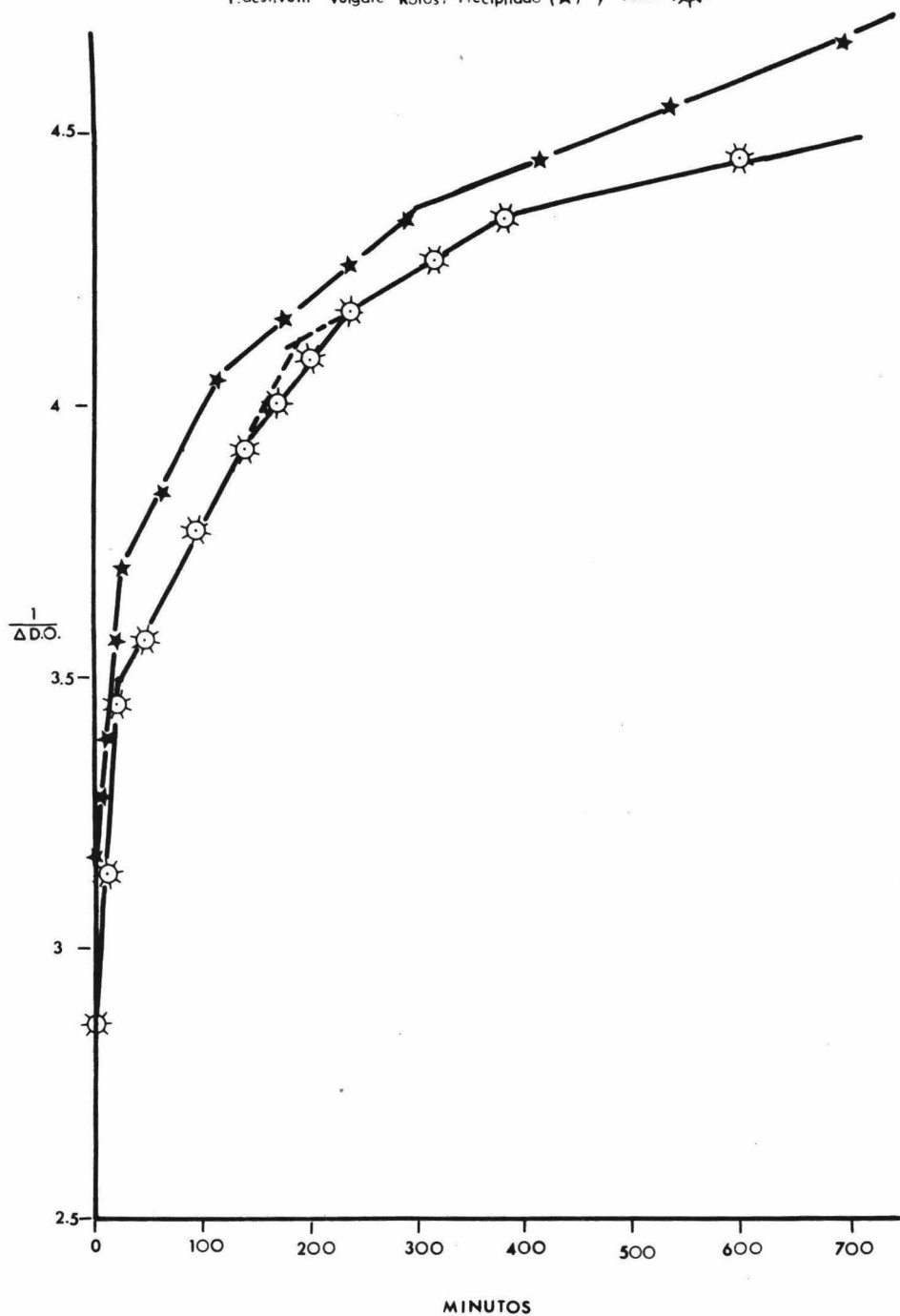


FIGURA 21. Curvas de Cinética de Reasociación Invertidas de ADN_s Nucleares de Hojas de *T. durum* Var. Chapala (4X) Roto (O) y *T. monococcum* Var. Einkorn No Roto (2X) Δ.

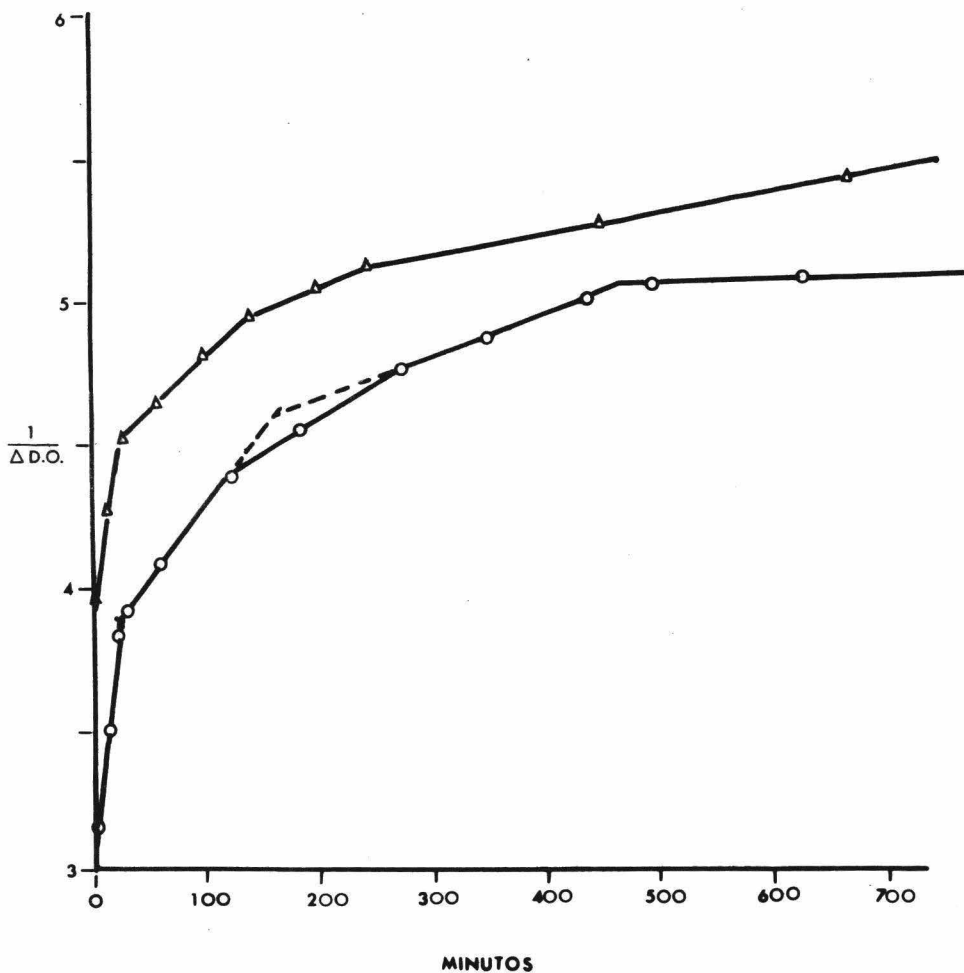
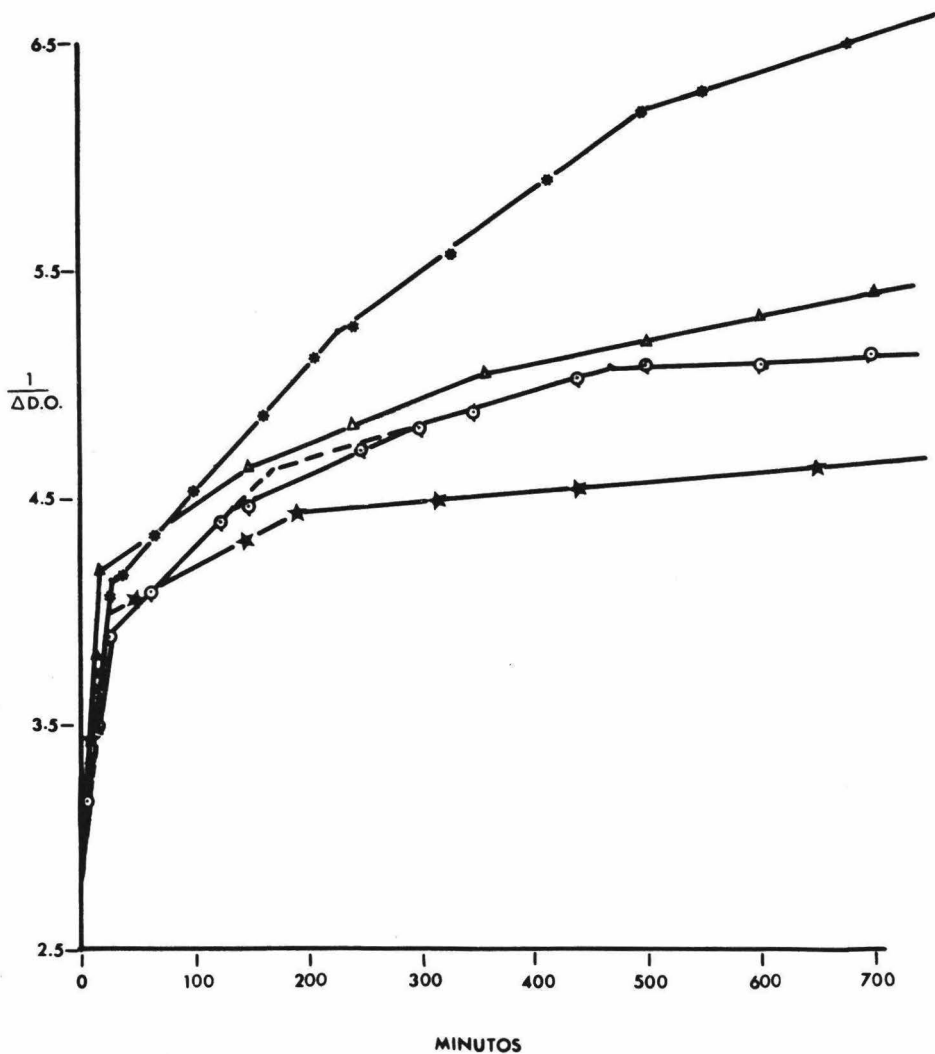


FIGURA 22. - Curvas de Cinética de Reasociación Invertidas de ADN_s Nucleares

Ratos de Hojas de Centeno 2X (●), Chapala 4X (○), Chapala-Snoopy 6X (Δ)
 y Mezcla "in vitro" de Chapala 4X y Centeno 2X en Proporción 4:2
 Respectivamente (★).



DISCUSION.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el rendimiento de ADN de núcleos de hojas (75 ug de ADN de núcleos de hojas / g = promedio tomado de la tabla 2) es bastante satisfactorio si se comparan con los reportados en la literatura (79), en donde obtienen 800 ug de ADN/g de gérmenes de trigo; pero tomando en cuenta que el tejido fresco está constituido de aproximadamente 90% de agua y el germen de \pm 2%, los rendimientos son comparables.

Tomando en cuenta los criterios de pureza (anotados en la TABLA 3), también se puede afirmar que éstos son aceptables en su mayoría para los ADNs nucleares de hojas, sobre todo los últimos obtenidos debido a la mayor experiencia para desarrollar esta técnica. Los criterios de pureza de ADNs de raíz no fueron aceptables, aparte de que los rendimientos fueron menores, debido a contaminaciones, menor ruptura de tejido, sin permitir por esta razón una purificación posterior.

Se puede decir en general, que el método propuesto en este trabajo para la purificación de núcleos de hojas de cereales y la extracción posterior de ADNs, es positivo para los propósitos que se plantearon al iniciar estos experimentos.

Analizando las curvas obtenidas para los puntos

de fusión de los ADNs, éstas se presentan en su forma característica (en forma de S) teniendo un rango de transición térmica de 14.5°C (promedio tomado de 12 muestras de ADN nuclear de hojas enumeradas en la TABLA 4). Estos datos concuerdan con aquellos reportados en la literatura para ADNs de eucariotes (53), (80), con los ADNs de timo de carnero con pesos moleculares de 620'000 y 8'000'000 siendo casi iguales para ambos casos (49); con aquellos reportados de ADN total de embriones germinados de trigo (81) y con aquellos de ADNs totales de plántulas de trigo di-, tetra- y hexaploides (66), indicando ésto heterogeneidad en el genoma con respecto al contenido de G-C. Como se había mencionado ya en la Sección 4 de Antecedentes, Huguet y Jouanin (69) se basaron en la amplitud de la transición térmica (60 a 90 °C) para afirmar sobre la gran heterogeneidad presente en ADN "nuclear" de trigo. Sin embargo esa curva se parece más a la presentada en este trabajo para ADN de la fase cloroplásmica, FIGURA 13, lo cual sugiere una contaminación importante con ADN nuclear y citoplásmico.

En lo que se refiere al T_m y contenido de G-C, se puede decir que los valores obtenidos para ADN nuclear de hojas de Triticum aestivum Var. Vulgare coinciden con aquellos reportados en la literatura (81), siendo éste de 84.5°C y el contenido de G-C de 38.0% para ADNs de trigos germinados y 86.5 a 87°C y conte-

nido de G-C de 40.5 a 41.5% para trigos no germinados. Comparando los resultados de los valores de T_m con los reportados por Bendich y McCarthy (66), los cuales fueron obtenidos de muestras de ADN disueltos en formamida al 70%, obteniendo temperaturas de fusión de 6 ± 2 C menores que los enlistados en la TABLA 4 de Resultados para los ADNs correspondientes. Aquellos reportados por los mismos autores en otro trabajo (65) si concuerdan con los datos obtenidos en esta Tesis que son los siguientes: T_m de ADN de centeno 86.4°C y 42% de G-C; y T_m de ADN de trigo = 85.2°C y 39% de G-C, estando estos ADNs disueltos en formamida al 50% (65). Este valor de T_m de ADN de trigo (85.2°C) es marcadamente menor que el reportado por Marmur y Doty (49) para germen de trigo (T_m 88.5°C). Comparando el % de G-C de ADN de cloroplasto reportado por Wells e Ingle (60) de 37 a 38%, con los obtenidos en este trabajo de 40.7% (TABLA 4), se puede asumir que el ADN de la fase cloroplásmica está contaminado con ADN tanto citoplásmico como nuclear, explicando de esta manera el resultado de un rango de transición térmica grande (49 C).

En una comparación efectuada entre contenidos de ADNs de trigo, centeno y el anfiploide trigo-centeno (ó Triticale) correspondiente (83), se encontró que el Triticale contiene 15% menos ADN por núcleo (4C),

que la suma total de sus padres Secale cereale Prolific y Triticum durum Stewart, cuyos contenidos de ADN estaban a razón de 2:3. El mismo autor en otro trabajo (84) compara el contenido de ADN de triticales hexaploides Rosner y Armadillo, siendo el contenido de ADN del segundo ligeramente mayor ($\pm 10\%$), sin tener relación alguna el contenido de ADN con el ciclo mitótico, sino mas bien la diferencia en la mitosis se deba probablemente a las temperaturas donde crecen estos triticales, (Canadá y México, respectivamente).

Todos los experimentos anteriores se hicieron como una base preliminar al estudio de híbridos de trigo-centeno (triticales), de los cuales se escogieron al Chapala-Snoopy y Armadillo. Para poder contestar varias preguntas que surgen acerca de la organización ó pérdida de información genética en estos híbridos, se tendría que separar cada una de las familias repetitivas del ADN, y utilizando marcaje con radioisótopos para uno de los padres viendo la contribución de éste en los híbridos.

En lo que respecta a la curva de la fase cloroplás-mica, se puede asumir que la primera parte de ésta (hasta $Cot = 3 \times 10^{-1}$) corresponde a ADN de cloroplasto; transformando estos datos de esta primera parte de la curva en la tabla 7 hasta $t = 28$ minutos, se nota claramente que esta parte corresponde a la primera familia altamente repetitiva de la curva de cinética de

reasociación invertida (FIGURA 19). Tomando en cuenta el contenido de pares de nucleótidos por genoma haploide mostrado en la TABLA 16, solo se puede asumir un valor para la repetición de esta familia de alrededor de 50 veces y un 25.8% de contribución en el genoma. Las otras familias de repetición encontradas en el transcurso de la reasociación, se piensa que provengan de otros ADNs aparte del cloroplásmico (citoplásmico y nuclear).

Haciendo la comparación de las cinéticas de reasociación de ADNs en forma de nata (0.2 a 0.5% de proteína) (49) y precipitado, los resultados fueron los que se esperaban y es lógico pensar que el ADN más impuro (el que precipitó en el fondo del matraz), por tener más proteína, reasoció con más dificultad por estar interaccionando con estas moléculas. En este caso, los datos obtenidos para T_m (84.8 y 85.0°C respectivamente) concuerdan con aquellas observaciones hechas por Marmur y Doty (49), donde sólo se ven pequeñas variaciones en el T_m de ADNs con diferentes contenidos de proteínas.

El ADN roto en forma de nata de núcleos de hoja de Triticum aestivum Vulgare presentó 5 pendientes en las curvas invertidas, dudándose de que si la segunda y la tercera son en realidad una sola; esto se pensó a partir de los datos de complejidad del genoma en la TABLA 17.

Los datos presentados para la complejidad de las

familias de ADN no pretenden ser exactos debido a que la fórmula de Wells y Birnstiel (59) utilizada para éstos cálculos da únicamente resultados aproximativos, sin embargo éste trabajo nos ilustra como interpretarlos y manejarlos. No obstante se tendría que hacer uso de otro método de análisis del ADN, utilizando columnas de hidroxapatita para separar las familias y de esta forma poderlas comparar y caracterizar.

Otro punto de complementación a éste trabajo sería el análisis de la intercalación de zonas repetitivas de ADN en el genoma siguiendo las bases propuestas por Davidson et al (82), de acuerdo a los pesos moleculares de los polinucleótidos.

Analizando los datos obtenidos para los ADNs de trigo, centeno y triticales, encontramos que los genomas correspondientes son altamente complejos hasta Cots de 1×10^1 , formados en ésta región por un mínimo de 3 familias y un máximo de 5. Sin embargo, debido a que no existen datos reportados en la literatura correspondientes a curvas de reasociación invertidas, no se puede establecer un punto de comparación. Se considera que el presente trabajo contribuirá a un mayor conocimiento de los genomas de trigo, centeno y triticales.

CONCLUSIONES.

Revisando todos los datos del trabajo realizado para esta Tesis se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- El método para extracción y purificación de núcleos de hojas de gramíneas es bueno.
- 2.- La purificación con enzimas del ADN de núcleos de hojas de trigos y centeno condujo a la obtención de polinucleótidos con criterios de pureza aceptables, pudiéndose por esta razón efectuar experimentos para calcular constantes fisicoquímicas con estos ADNs.
- 3.- Los Tms de las gramíneas estudiadas fueron muy similares en casi todos los casos ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- 4.- Las cinéticas de reasociación de ADNs de diferentes cereales, tienen patrones similares representando varias fracciones repetitivas siendo éstas un 25% o más del genoma.
- 5.- Las fracciones repetitivas están formadas como mínimo por tres familias con grados diferentes de repetición en cada genoma.

- 6.- Los híbridos de trigo y centeno contienen familias de ADN's repetitivos tanto de uno como del otro padre.

- 7.- En una mezcla con cantidades equimoleculares de ADN's de los padres, para reproducir al híbrido "in vivo", se obtuvieron datos diferentes con respecto a la representación de las familias del híbrido F₁ Chapala-Snoopy y sus padres, no obstante que presentan el mismo número de familias.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Rodríguez, R., et al; *World Farming* 8, 36-39 (1966)
- 2.- Evans, L.E., Jenkins, B.C., *Can. J. Genet. Cytol.* 2
205-215 (1960)
- 3.-Singh, K.B., Singh, J.K., *Euphytica* 20, 586-590 (1971)
- 4.- Harlan, J.R., y deWet, J.M.J., *Taxon* 20, 509-517 (1971)
- 5.- Harlan, J.R., et al; *Evolution* 27, 311-325 (1973)
- 6.- Rees, H; *Nature* 198, 108-109 (1963)
- 7.- Harlan, J.R., *Euphytica* 14, 173-176 (1965)
- 8.- Siddiqui, K.A., *Hereditas* 73, 45-50, (1973)
- 9.- McFadden, E.S., Sears, E.R., *Res.Genet. Soc. Amer.*
13, 26 (1944)
- 10.- Kihara, H; *Agric. Hort. Japan*, 19, 889 (1944)
- 11.- Kimber, G., Athwal, R.S; *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*,
69, 912-915 (1972)
- 12.- Sarkar, D., Stebbins, G.L., *Amer. J.Bot.* 43, 297-
304 (1956)
- 13.- Riley, R; Unrau, J. y Chapman, V; *J. Hered.* 49, 90-
98 (1969)
- 14.- Riley, R. y Chapman, V.
Chromosome Manipulation and Plant Genetics
Ed. Riley, R. y Lewis, K.R.
Edimburgh (1966)
- 15.- Johnson, B.L. y Hall, O., *Acta Agr. Scand.* 16, 222-
224 (1966)
- 16.- Stutz, H.C., *Amer. J. Bot.* 59, 59-71 (1971)

- 17.- Sears, E.R., Mo. Agr.Exp. Sta. Res. Bull., N° 572, 58, (1954)
- 18.- Morris, R., Wheat News Letters, 16, 8-13 (1969)
- 19.- Gupta, P.K., Wheat.Inf. Serv. 27, 13-15 (1968)
- 20.- Sybenga, J., Wolters, A.H.G., Genetica 43, 453-465 (1972)
- 21.- Sarma, N.P., Natarajan, A.T; Hereditas 74, 233-238 (1973)
- 22.- Tsuchiya, T., Larter, E.N., Euphytica 20, 591-596 (1971)
- 23.- Waninge, J., Euphytica 14, 249-250 (1965)
- 24.- Love, H.H., Craig, W.T., J. Hered. 10, 195-207 (1919)
- 25.- Gaines, E.S. y Stevenson, S.J., J. Hered. 13, 81-90 (1922)
- 26.- Leighty, C.E., J. Am. Soc. Agron. 7, 209-216 (1915)
- 27.- Leighty, C.E., J. Hered. 7, 420-427 (1916)
- 28.- Maan, S.S., Lucken, K.A., J. Hered. 62, 353-355 (1971)
- 29.- Tschermak, E., Zeitschr. indukt. Abstam. -u. Vererbungslehre Suppl. 2, 1495-1498 (1927)
- 30.- Bledsoe, R.P., J. Hered. 23, 181-186 (1932)
- 31.- Robbelen, G., Smukupt, S., Wheat Inf. Serv. Japan, 27, 10-13 (1968)
- 32.- Sapra, V.T. Heyne, E.G; Crop Sci. 13, 301-303 (1973)
- 33.- Riley, R. y Chapman, V., J. Agr.Sci. 49, 246-250 (1957)
- 34.- Bhatt, G.M; Austral. J. Agric. Res. 24, 457-465 (1973)
- 35.- Brink, R.A. y Cooper, D.C; J. Hered. 35, 67-75 (1944)
- 36.- Smith, D.C., J. Hered. 35, 218-224 (1944)

- 37.- Briggie, L.W., Crop Sci. 9, 197-202 (1969)
- 38.- Garrish, E.E., Maize Gen. Coop. News Letter 11, 26-28 (1967)
- 39.- Mock, J.J., Loescher, W.H., Egyptian J. of Genet. Cytol. 2, 331-337 (1973)
- 40.- Kruse, A., Hereditas 73, 157-161 (1973)
- 41.- Siddiqui, K.A., Hereditas 69, 263-273 (1971)
- 42.- Baum, B.R., Euphytica 20, 302-306 (1971)
- 43.- Mirsky, A.E., Scientific Amer. 218, 78-88 (1968)
- 44.- Lehninger, A.L.
Biochemistry
Worth Publishers, Inc.
New York (1970)
- 45.- Mahler, H.R. y Cordes, E.H.
Biological Chemistry
Harper & Row
New York (1971)
- 46.- Watson, J.D. y Crick, F.H.C., Nature 171, 737-738 (1953)
- 47.- Wilkins, M.H.F. y Randall, J.T., Biochim. et Biophys. Acta 10, 192 (1953)
- 48.- Wilkins, M.H.F., et al; Nature 172, 759-762 (1953)
- 49.- Marmur, J. y Doty, P., J. Mol. Biol. 5, 109 (1962)
- 50.- Wetmur, J.G. y Davidson, N., J. Mol. Biol. 31, 349-370 (1968)
- 51.- Bálsamo, J; Hierro, J.M; Birnstiel, M.L. y Lara, F.J.S.
Gene Expression and Its Regulation
Vol. I, págs. 101-122
Plenum Press
New York (1973)

- 52.- Britten, R.J. y Kohne, D.E., *Scientific Amer.* 222,
24-31 (1970)
- 53.- Britten, R.D. y Kohne, D.E., *Science* 161, 529-540 (1968)
- 54.- Reifer, I. y Strazalka, K; *Bull. Acad. Polon. Sci.* 20
75-80 (1972)
- 55.- Green, B.R., *Biochim. et Biophys. Acta* 277, 29-34 (1972)
- 56.- Marmur, J., *J. Mol. Biol.* 3, 208-218 (1961)
- 57.- Miksche, J.P., Hotta, Y., *Chromosoma* 41, 29-36 (1973)
- 58.- Shah, D.M. y Levings, C.S., *Maize Genet. Corp. News
Letters* 47, 161-163 (1973)
- 59.- Wells, R. y Birnstiel, M., *Biochem. J.* 112, 777-786
(1969)
- 60.- Wells, R. e Ingle, J., *Plant Physiol.* 46, 178-179 (1970)
- 61.- Baxter, R. y Kirk, J.T.O., *Nature* 222, 272-273 (1969)
- 62.- Borst, P., *Ann Rev. Biochem.* 41, 333 (1972)
- 63.- Thornburg, W. y Siegel, A., *Biochim. et Biophys. Acta*
312, 211-214 (1973)
- 64.- Ohyama, K., Gamburg, O.L. y Miller, R.A., *Plant
Physiol.* 50, 319-321 (1972)
- 65.- Bendich, A.J. y McCarthy, B.J., *Genetics* 65, 545-
565 (1970)
- 66.- Bendich, A.J. y McCarthy, B.J., *Genetics*, 65, 567-
573 (1970)
- 67.- Mitra, R. y Shatia, C.R., *Heredity* 31, 251-262 (1973)
- 68.- Bendich, A.J. y Bolton, E.T., *Plant Physiol* 42, 959-
967 (1967)
- 69.- Huguet, P. y Franlin, L., *Biochim. et Biophys. Acta*

262, 431-440 (1972)

- 70.- Hotta, Y., Bassel, A. y Stern, H., J. Cell Biol. 27
451-457 (1965)
- 71.- Huguet, T. y Jouanin, L., Biochem. Biophys. Res. Comm.
46, 1169-1174 (1972)
- 72.- Ingle, J., Pearson, G.G. y Sinclair, J., Nature New
Biol. 242, 193-197 (1973)
- 73.- Ranjekar, P.K. y Lafontaine, J.G., J. Cell Biol. 59,
(2), 556 (1973)
- 74.- Sadowski, P.D. y Steiner, J.W., J. Cell Biol. 37,
147 (1968)
- 75.- Bartels, P.G. y Hyde, A., Plant Physiol. 46, 825-830
(1970)
- 76.- Britten, R.D. y Davidson, E.H., Develop. Biol. 25,
445 (1971)
- 77.- Britten, R.D. y Kohne, D.E., Yearb. Carnegie Instn,
pág. 78, (1967)
- 78.- Bennett, M.D., Proc. R. Soc. Lond. B. 181, 109-135 (1972)
- 79.- Privat de Garilhe, M.
Enzymes in Nucleic acid Research
Herman Publishers in Arts and Science
Paris (1970)
- 80.- González Herrera, J.L.
Tesis Profesional UNAM.
México, D.F. (1973)
- 81.- Chen, D. y Osborne, D.J., Nature 225, 336-340 (1970)

- 82.- Davidson, E.H., Hough, B.R., Amenson, C.S. y
Britten, R.J., J. Mol. Biol. 77, 1-23 (1973)
- 83.- Kaltsikes, P.J., Can. J. Genet. Cytol. 13, 656-
662 (1971)
- 84.- Kaltsikes, P.J., Caryologia 25, 537-542 (1972)