



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

COMPARACION DE PROTEINAS RIBOSOMALES DE TRIGO, CENTENO Y TRITICALE

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO

p r e s e n t a :

REBECA GARCIA MACEDO

1977



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.

H-169

CLAS: Yes
ADQ. Ht. 161
FECHA 1977
PROC. 1977



QUIMICA

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Prof. ALEJANDRO BLANCO LABRA.
VOCAL	Prof. GUADALUPE VELEZ PRATT.
SECRETARIO	Prof. CYNTHIA A. COWGILL.
1er. SUPLENTE	Prof. RUTH ROMAN PALACIOS.
2o. SUPLENTE	Prof. MAGDALENA OLIVA DE GARCIA.

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, DIVISION
DE ESTUDIOS SUPERIORES,
FACULTAD DE QUIMICA U.N.A.M.

Sustentante:

Rebeca García Macedo
REBECA GARCIA MACEDO

Asesor del tema:

Cynthia Ann Cowgill
Dra. CYNTHIA A. COWGILL

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Ribosomas.....	3
Proteínas ribosomales.....	5
MATERIALES.....	15
METODOS.....	17
Separación de germen.....	17
Obtención de ribosomas.....	17
Pureza de los ribosomas.....	19
Extracción de proteínas ribosomales.....	21
Ensayo de Lowry para cuantificar las proteínas ribosomales.....	22
Preparación de los geles de poliacrilamida en una dimensión.....	23
Análisis densitométrico de los patrones de proteínas ribosomales en geles de una dimensión.....	26
Determinación teórica de la cantidad de proteínas ribosomales.....	27
RESULTADOS.....	29
Separación y rendimiento de germen.....	29
Pureza de los ribosomas.....	30
Determinación teórica de la cantidad de proteínas ribosomales.....	32

	PAG.
Cantidad de proteínas ribosomales extraídas.....	33
Análisis de las proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión.....	33
Análisis densitométrico de los patrones de proteínas ribosomales en geles de una dimensión.....	36
DISCUSION.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	65

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

El interés constante por el mejoramiento de las semillas ha llevado a investigar la organización de su genoma y la regulación de su expresión. El propósito del presente trabajo tiene -- que ver con lo último.

Tomando como base que el ácido ribonucléico y las proteínas son los productos funcionales de los genes, el estudio de la presencia, ausencia o alteración de esas macromoléculas puede servir para la determinación de los genes.

Nosotros tratamos de comparar de una manera indirecta la expresión de los genes para proteínas ribosomales de los siguientes tres tipos de semillas: trigo, centeno y el híbrido formado por estos dos, el triticale. Esperábamos encontrar diferencias entre los patrones electroforéticos de las proteínas ribosomales de las semillas mencionadas, debido a que taxonómicamente pertenecen a géneros diferentes y además presentan entre sí distintos grados de haploidía.

En realidad este trabajo consistió en aislar tanto los ribosomas como las proteínas ribosomales de las siguientes variedades de semillas: Triticum aestivum variedades Potamo y Tobari,-

Triticum durum var. Cocorit, Secale cereale var. Snoopy Bulk, cen-
teno de varias variedades mezcladas y Triticale Maia I, también -
se trataron de establecer los criterios de pureza de los riboso--
mas, y principalmente comparar los patrones de las proteínas ribo--
somales, por medio de la técnica de electroforé-sis en geles de po--
licrilamida en una dimensión.

Se sabe que las proteínas que migran separadamente en -
electroforesis en geles de poliacrilamida, son consistentemente -
diferentes, y pueden diferir en los amino ácidos que las componen,
en la secuencia de los mismos, en su conformación o en su estado--
de agregación, todo ello como consecuencia de los diferentes ge--
nes que las regulan.

Sin embargo, dos proteínas con igual movilidad electro--
forética no necesariamente van a ser idénticas, esto se presenta--
cuando se tiene un patrón complejo como el de las proteínas ribo--
somales. Por lo tanto, el número de bandas presentes en un gel--
puede ser menor que el número de proteínas diferentes en un ribo--
soma. Por estas razones, la electroforé-sis en una dimensión es -
un criterio aproximado para encontrar homologías o falta de ellas,
en mezclas complejas de proteínas, pero aún así, se pueden hacer--
comparaciones entre los patrones electroforéticos de las proteínas
ribosomales que pertenecen a diversas especies. Como ejemplos te--
nemos los estudios de Sun et al.(1) con bacterias y de Littleton--
(2) con algunas especies de plantas, en tales estudios las dife--
rencias o similitudes pudieron detectarse rápidamente.

A N T E C E D E N T E S

A continuación se expone un examen detallado de los ribosomas que se encuentran en organismos procariotes y eucariotes y enseguida se presentan los estudios que se han realizado hasta la fecha, con los componentes protéicos de este tipo de organelos.

Ribosomas

La síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas, los cuales son organelos pequeños que se encuentran en todos los organismos; en procariotes (bacterias y algas azul-verdes) los ribosomas son más pequeños (su coeficiente de sedimentación es igual a 70S) que los ribosomas de citoplasma de células eucarióticas (animales y plantas, con coeficientes de sedimentación de 80S), mientras que los ribosomas de cloroplastos y mitocondrias, tienen aproximadamente, el mismo tamaño que los ribosomas de procariotes (2, 5, 21).

Todos los ribosomas contienen dos subunidades de tamaño diferente, cada una con proteínas diferentes 1 ó 2 moléculas de ARN (33), las subunidades de los ribosomas 80S sedimentan a 40S y 60S y las de los 70S sedimentan a 30S y 50S, la síntesis de las proteínas puede ocurrir solamente cuando las subunidades están --

asociadas o combinadas con ARN mensajero. (8, 11, 16).

La composición de las dos clases de ribosomas es muy si milar, la mayoría están formados por un 50-55% de ARN y un 45-50% de proteínas (2, 3).

El ácido ribonucléico ribosomal consta de tres clases - de moléculas, con coeficientes de sedimentación en un rango de -- 16-19S y de 23-28S y una pequeña cantidad de 5S (2, 4, 5).

En algunos aspectos hay mayor similitud entre los ribosomas de cloroplasto y de bacteria, que entre los ribosomas de -- cloroplasto y citoplasma de una misma planta, por ejemplo, en sus concentraciones de magnesio óptimas para la incorporación de amino ácidos y para mantener su integridad (6), en su sensibilidad - hacia inhibidores de síntesis de proteínas como cloranfenicol, lincomicina y estreptomycin (5, 7, 8), pero difieren de los ribosomas de procariotes en las estructuras primarias de los ARN's y -- proteínas que los componen (5).

Los ribosomas bacteriales (70S) a bajas concentraciones de iones divalentes (principalmente Mg^{++}) se disocian reversiblemente formando las subunidades 50 y 30S (9, 10). Los ribosomas - de células eucarióticas se disocian similarmente formando las subunidades 40 y 60S con concentraciones de iones divalentes todavía menores (3). Se dice que estas subunidades así formadas son arte

factos que surgen fuera del rango requerido para la síntesis de proteínas (11).

Los estudios de constitución de subunidades ribosomales 80S de Escherichia coli con varias proteínas de Bacillus subtilis, sugieren que la organización estructural y funcional de los ribosomas puede ser la misma en todos los organismos procariotes. Sería interesante saber si los ribosomas de eucariotes tienen la misma organización estructural básica que la que presentan los procariotes (12).

Proteínas ribosomales

No hay una definición exacta de las proteínas que pertenecen a un ribosoma, pero para preparar ribosomas puros se requiere la separación de ciertas proteínas que se encuentran débilmente unidas al ribosoma, esta fracción de proteínas debe ser, cuantitativamente al menos, de poca importancia con respecto al total de proteínas que se mantienen fuertemente unidas a la estructura ribosomal, de tal manera que para poder hacer comparaciones entre los componentes protéicos de los ribosomas, se requiere que éstos se encuentren puros, se ha aceptado que esto se logra, lavando los ribosomas con sales como KCl, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una concentración de 0.5M (25,52); en los estudios que se describen a continuación se ha controlado este aspecto.

Las diferencias en las constantes de sedimentación que-

muestran los ribosomas bacteriales, animales y los de cloroplasto, mitocondria y citoplasma de las plantas pueden deberse a diferencias en la cantidad o en el peso molecular de las proteínas o del ARN que los componen, o pueden deberse al número de proteínas ribosomales que contienen, esto ha sugerido por ejemplo, hacer comparaciones entre los componentes protéicos de varias especies; se han llevado a cabo estudios comparando las proteínas ribosomales de algunas especies de bacterias, animales y plantas, por medio de las técnicas electroforéticas (en una y dos dimensiones) e inmunológicas.

Analizando electroforéticamente las proteínas ribosomales, se ha encontrado que son específicas del organismo, se trate de bacterias, animales o plantas (14, 17, 22). También hay una gran diferencia con respecto al número de proteínas ribosomales entre procariotes y eucariotes, en general, en los eucariotes, se ha encontrado un mayor número de proteínas ribosomales que en procariotes. Hasta la fecha no se sabe qué papel desempeñan las proteínas "extras" que se encuentran en los eucariotes, puede ser que estén involucradas en la unión de los ribosomas a membranas o en mecanismos de control de traducción que no se encuentren en bacterias (23).

En todos los casos la mayoría de las proteínas son básicas (se encuentran cargadas positivamente), pero algunas veces -- también se han encontrado proteínas ácidas (cargadas negativamente), las cuales no se separan de los ribosomas después de lavarlos

con sales, como NH_4Cl 0.5M (20,22,25). En ribosomas de Escherichia coli se han detectado 11 proteínas ácidas, y se han establecido los puntos isoeléctricos y los pesos moleculares de todas ellas (22, 26).

Las proteínas ribosomales ácidas no se pudieron detectar durante algún tiempo en los ribosomas 80S de animales y plantas superiores (27,28) y aún se había considerado que este tipo de proteínas era exclusivo de los ribosomas 70S de procariotes, solamente después de la introducción de una cantidad muy grande de proteínas, en un análisis electroforético, se pudieron detectar de 1 a 5 proteínas ácidas en ribosomas de animales (19,29).

Existe controversia en cuanto a las proteínas ribosomales ácidas de plantas, algunos reportes indican que existen de 6- a 21 proteínas de este tipo en varias especies de plantas superiores e inferiores (25,30,31) y en otros reportes no aparecen tales proteínas (15,32,33). En vista de la inconsistencia de los datos con respecto al contenido de proteínas ácidas en los ribosomas de plantas, las comparaciones entre los ribosomas de diversas especies, se dirigen preferentemente hacia las proteínas básicas.

Por otro lado, en los ribosomas de bacterias, animales superiores y cloroplastos, se ha demostrado que la composición protéica de cada una de las subunidades es estrictamente específica (1,13,24,26,17,34-41).

No se ha realizado un estudio consistente a este respecto con ribosomas citoplásmicos de plantas. Algunos trabajos iniciales han indicado que todas las proteínas ribosomales que se encuentran en los monosomas 80S se encuentran también presentes en la subunidad 60S, y que la subunidad 40S solamente difiere de la 60S en algunas proteínas que le hacen falta (20,28), en cambio, en otros reportes se han establecido que los ribosomas citoplásmicos de plantas superiores, se comportan de manera similar a los ribosomas de bacterias, en lo que se refiere a la distribución de sus proteínas en las dos subunidades (32).

Se ha determinado el grado de homología entre las proteínas ribosomales de varias especies de bacterias por medio del análisis electroforético, en una y dos dimensiones. Se encontró que había una mayor similitud entre los patrones protéicos de las especies taxonómicamente más relacionadas, y que la similitud era progresivamente menor para especies menos relacionadas entre sí. Así tenemos que las proteínas ribosomales de diferentes bacterias que pertenecen a una misma familia, resultaron muy similares en sus pesos moleculares y en sus propiedades electroforéticas, como lo muestran los estudios realizados con especies de las familias: Bacillaceae y Enterobacteriaceae, a esta última pertenece la especie Escherichia coli, una de las más estudiadas (13, 17, 1, 42, 43)

En cuanto a las proteínas aisladas de ribosomas de algunos tejidos diferenciados de un mismo origen animal, cuando se --

analizaron en geles de poliacrilamida en una dimensión, se encontró que presentaban patrones electroforéticos similares (18, 20, 44), sin embargo, Di Girolamo (20) encontró algunas diferencias entre las proteínas aisladas de las subunidades ribosomales pequeñas de hígado y reticulocito de conejo.

Cuando se realizó el análisis de ese mismo tipo de proteínas, en geles de poliacrilamida en dos dimensiones, se pudieron observar diferencias, como las encontradas entre los ribosomas de hígado, riñón, reticulocito y apéndice fecal de conejo (45) por un lado, y entre ribosomas de hígado y cerebro de ratón por otro lado (46).

Las proteínas aisladas de un mismo tejido, pero de especies de animales que pertenecen a distintos órdenes y géneros, -- dieron origen a patrones electroforéticos diferentes. Las diferencias que se presentaron resultaron menores entre especies diferentes de un mismo género (por ejemplo entre mamíferos)(18,15,47).

Se han realizado estudios de evolución de los ribosomas, en los cuales se han tomado a los mamíferos como referencia y se han comparado las proteínas ribosomales de éstos, con otras especies, en geles de poliacrilamida en dos dimensiones. Encontrándose se que los patrones electroforéticos de las proteínas ribosomales de mamíferos, pájaros y reptiles fueron sorprendentemente similares, partiendo de que, los pájaros y reptiles surgieron hace --

aproximadamente 240 millones de años, y los mamíferos hace 60 millones de años; las proteínas ribosomales de estas especies no han evolucionado grandemente, a menos que las sustituciones de amino ácidos estuvieran restringidas a aquellos que no cambian la carga neta de las proteínas, y se sabe que este tipo de mutaciones ocurre frecuentemente.

También se encontraron algunas similitudes electroforéticas entre las proteínas ribosomales de mamíferos, peces y anfibios, mientras que las similitudes fueron todavía menores entre mamíferos y animales inferiores, como crustáceos y moluscos, y plantas superiores. Sin embargo, se puede decir que algunas proteínas ribosomales son comunes a todos los ribosomas eucarióticos (15).

Analizando los reportes anteriores, no es posible establecer exactamente el grado de similitud o diferencia, que se encuentra entre los patrones electroforéticos de las diversas especies y tejidos, debido a que, en los trabajos publicados se han seguido diferentes técnicas electroforéticas para la determinación de las proteínas ribosomales y también porque en la mayoría de ellos no se ha cuantificado el número de proteínas ribosomales, por ejemplo, no se ha realizado un estudio en el cual muestren las diferencias que se encuentran entre los distintos tejidos de un mismo organismo, sean menores que las encontradas entre un mismo tejido de especies diferentes.

Se han realizado estudios previos encaminados a comparar las proteínas ribosomales de citoplasma, cloroplastos y mitocondrias de las plantas, y se ha querido conocer la especificidad de estas proteínas entre diversas especies de plantas y diferentes tejidos de una misma planta; como son: hojas, tallos y semillas. Los resultados de esos estudios, se describen a continuación.

Los patrones electroforéticos de ribosomas de cloroplastos, citoplasma y mitocondria de una misma planta, resultaron consistentemente diferentes (2, 6-8, 14, 21, 33, 48, 49).

Los patrones de diferentes tejidos de una misma planta presentaron la misma distribución de proteínas ribosomales citoplásmicas (2).

La composición protéica de los ribosomas citoplásmicos depende de cada especie. Se han estudiado los patrones electroforéticos de plantas que pertenecen a diferentes subclases, diferente orden dentro de la misma subclase; diferentes especies de un mismo género, diferentes especies de una misma familia y variedades de un mismo género. Encontrándose, en general, que las plantas taxonómicamente menos relacionadas, mostraban patrones electroforéticos con mayores diferencias (2,14,21,30). Nagabhushan y colaboradores, encontraron que, aun entre dos variedades de una misma especie, se podían detectar algunas diferencias entre sus patrones electroforéticos en geles de policrilamida en dos dimensiones (30).

Los ribosomas de cloroplastos de frijol y espinaca y -- los de Escherichia coli, que pertenecen al mismo tipo 70S y que -- tienen algunas propiedades en común, como se mencionó anteriormen-- te, no presentaron patrones electroforéticos similares (21).

Hasta el presente, se han reportado únicamente dos tra-- bajos en los cuales, muestran una cierta relación entre el mate-- rial genético que codifica para proteínas ribosomales y el número de proteínas ribosomales básicas que se separan electroforética-- mente. En el primer trabajo se muestra que, a un mayor contenido de las bases nitrogenadas, citosina y guanidina, en los ADN's de algunas especies de bacterias, le corresponde un mayor número de proteínas ribosomales básicas (1). Y en el segundo trabajo se -- muestra que, las especies de plantas que contienen un mayor número de cromosomas, presentan a su vez un mayor número de proteínas ribosomales básicas (30).

Además de los estudios electroforéticos con proteínas -- ribosomales, también se han realizado estudios inmunológicos y és-- tos han consistido en producir anticuerpos contra varias clases -- de organismos, como bacterias, plantas y mamíferos, y después se han probado contra especies heterólogas, por ejemplo entre levadu-- ras y mamíferos.

Los resultados indicaron una fuerte reacción inmunológi-- ca entre anticuerpos contra proteínas individuales de Escherichia

coli, también entre varios eucariotes, por ejemplo: entre ribosomas de hígado de rata y ribosomas de levadura (50), o entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (33), mientras que la reacción inmunológica entre las proteínas ribosomales de algunas enterobacterias fue muy débil o no existió, a pesar de que presentan similitudes electroforéticas (13).

Los ribosomas de cloroplasto y citoplasma presentaron entre sí reacciones inmunológicas muy débiles y fueron relativamente menores que las que se detectaron entre ribosomas citoplasmáticos de plantas lejanamente relacionadas (33).

No hubo correlación inmunológica entre proteínas ribosomales de cloroplasto y de bacterias, ni entre ribosomas 80S y los de bacterias (33).

Tal parece que la evolución ha perpetuado aquellos componentes ribosomales que, probablemente ofrecen una ventaja positiva de fidelidad y eficiencia en la traducción del mensaje genético, bajo ciertas condiciones de medio ambiente intra y extracelular.

La determinación de las secuencias de amino ácidos de las proteínas ribosomales de diferentes organismos, permitirían conclusiones más directas y cuantitativas, acerca de su homología. Pero este tipo de información desafortunadamente se limita a muy-

pocas bacterias, entre las cuales se ha visto que existe un alto grado de secuencia homóloga entre algunas de sus proteínas ribosomales, pero todavía es menor para otra (22).

En conclusión, la estructura de los ribosomas ha cambiado durante la evolución a tal grado que hay poca homología entre los ribosomas de procariotes y los de eucariotes, aun cuando, en la biosíntesis de proteínas, la función principal de los ribosomas, existen varias etapas, éstas resultan ser las mismas en todos los organismos.

M A T E R I A L E S

I. Semillas

Triticum aestivum var. Potamo (6X)

Triticum aestivum var. Tobarí (6X) (Hari)

Triticum durum var. Cocorit (4X) (5-XII-73)

Secale cereale var. Snoopy Bulk (2X) (13-V-73)

Centeno varias variedades

Triticale Maia I (8X)

II. Reactivos

KCl (Merck)

MET = 2- mercaptoetanol (Merck)

MgCl₂ · 6H₂O (Merck)

Tris = Tris (hidroximetil)-aminometano (Merck)

HCl (Merck)

Sacarosa (Merck)

AcOH = ácido acético glacial (Técnica Química, S.A.)

NaCO₃ (Merck)

CuSO₄ (Merck)

Tratrato doble de sodio y potasio (Merck)

ABS = albúmina de suero bovino (Nutritional Biochemicals Corporation).

Reactivo de Folin, Reactivo de Fenol, (Folin-Ciocalteu) (Merck)

KOH (Merck)

TEMED = N, N, N', N',-tetrametiletilendiamina (Eastman Organic --
Chemicals)

Urea (Merck, reactivo para fines bioquímicos)

Acrilamida (Eastman Organic Chemicals, reactivo recristalizado)

MBA = N, N'-metilendiacrilamina (Eastman Organic Chemicals, reac-
tivo recristalizado).

Riboflavina (Merck)

APS = peroxidisulfato de amonio (Merck)

β - alanina (Fluka AG. Buchs SG)

Rojo de pironina

Amido black (Eastman Kodak Company)

Carbón activado

M E T O D O S

Separación de germen

Las semillas enteras se embebieron en agua destilada - (10 g de semilla en 30 ml de agua), aproximadamente durante dos - horas, después de lo cual se procedió a separar el germen de las- mismas disectándolo con un bisturí. Todo el procedimiento se efec- tuó sobre hielo, a 4°C. El germen se almacenó en un desecador a temperatura ambiente, hasta su posterior utilización.

El procedimiento que se siguió fue el mismo para los -- tres tipos de semillas: trigo, centeno y triticale.

Obtención de ribosomas

Se siguió el método reportado por Roberts, et al. (51), con algunas modificaciones:

Soluciones:

Solución de KCl 2.5 M.

Buffer TKM, el cual contiene lo siguiente:

KCl 5 mM

MET 5 mM

MgCl.6H₂O 10 mM

Tris-HCl 50 mM, pH=7.6

Sacarosa 0.5 M

En un mortero previamente enfriado a 4°C se pulverizó - en seco 1 g de germen, y después se homogenizó con 16 ml de buffer TKM. Este homogenado se centrifugó en tubos de 50 ml de capacidad, en un rotor JA-20 en una centrífuga Beckman modelo J-21 a -- 18 000 rpm (30 000 x g, y un radio promedio de 7.0 cm) durante 20 min a 5°C.

Se descartó el sedimento, el cual estaba constituido -- principalmente por núcleos, mitocondrias y membranas, se descartó también la capa de lípidos que se encontraba en la parte superior del sobrenadante.

El sobrenadante se centrifugó en tubos de 3.5 ml de capacidad, con las mismas condiciones mencionadas anteriormente, para lograr que se aclarara un poco más.

Se descartaron el sedimento y la capa de lípidos que se obtuvieron de nuevo. Al sobrenadante se le añadió la cantidad necesaria de KCl (2.5M) para hacerlo 0.5 M con respecto a KCl y obtener de esta manera ribosomas "puros" (52), y se centrifugó en un rotor SW-56 en una ultracentrífuga Beckman-Spinco modelo L, a -- 50 000 rpm (269 000 x g, y un radio promedio de 8.7 cm) durante 1 hora a 5°C.

Se descartó el sobrenadante. El sedimento de esta última centrifugación corresponde a los ribosomas, los cuales se resuspendieron en buffer TKM sin sacarosa y se guardaron congelados.

Pureza de los ribosomas

Los dos criterios que se tomaron para determinar la pureza de los ribosomas se describen a continuación.

Gradientes de sacarosa

Uno de los criterios para determinar la pureza de los ribosomas fue la determinación de su absorción en gradientes de sacarosa al 15 y 30%. En cada uno de los tubos que se muestran en la figura 1, se colocaron 1.9 ml de la solución de sacarosa de la concentración correspondiente (15 ó 30%), se introdujo aire en el tubo de la izquierda para mezclarlas, se abrió la llave de paso y se dejó caer el gradiente en un tubo de centrífuga de 3.9 ml de capacidad, permitiendo que bajara por las paredes del mismo.

Sobre el gradiente ya formado, se colocaron cuidadosamente de 2 a 6 D.O. de la suspensión de ribosomas. Se centrifugó en un rotor SW-56 en una ultracentrífuga Beckman-Spinco modelo L, a 50 000 rpm (269 000 x g, y un radio promedio de 8.7 cm) durante 1 hora a 5°C.

Terminada la centrifugación se perforaron los tubos por

la parte inferior con una aguja hipodérmica (1 1/4"), la cual estaba conectada a una bomba peristáltica (Buchner Instruments) para extraer el gradiente de esta manera. El análisis del mismo se efectuó a una longitud de onda de 254 nm, en la región del UV. en un espectrofotómetro LKB modelo Unicord II acoplado a un graficador Beckman, la escala que se usó fue la lineal, obteniéndose directamente el perfil de los ribosomas.

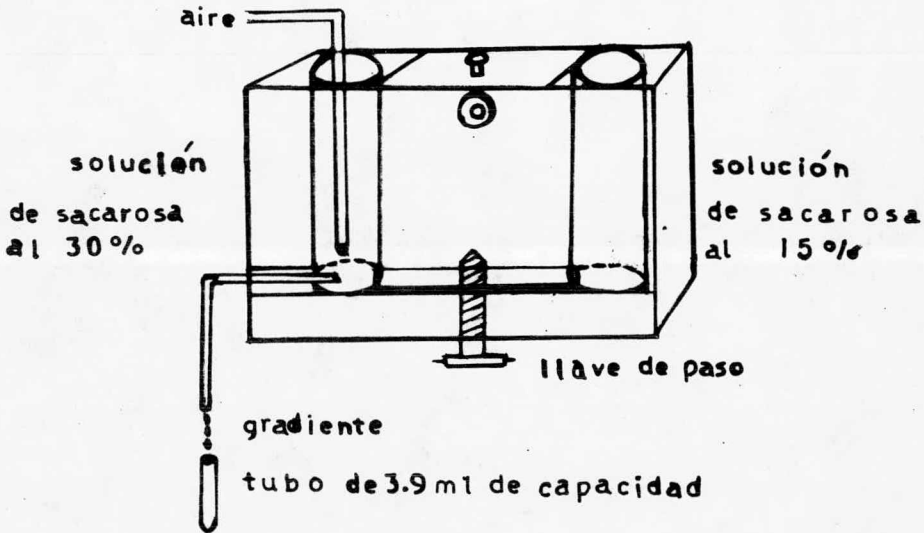


Fig. 1.- Aparato para preparar gradientes de sacarosa.

Absorbancia de los ribosomas

El segundo criterio para saber si los ribosomas estaban puros, fue la determinación de las siguientes relaciones de absorbancia; A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{280} ; para ello se tomaron 5 μ l de la suspensión de ribosomas, se añadió 1 ml de Buffer TKM sin sacarosa y se hicieron correspondientes lecturas de absorbancia, en la región del UV. en un espectrofotómetro Carl Zeiss, en celdas de cuarzo - de 1 cm de paso de luz.

Extracción de proteínas ribosomales

Se siguió el método de Hardy, et al. (53).

Se adicionó a un volumen de muestra de ribosomas 0.1 volumen de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 M y 2 volúmenes de ácido acético glacial, la mezcla se agitó durante 45 min a 5°C.

El precipitado formado, que correspondía al ARN, se separó centrifugando la mezcla en un rotor JA-20 en una centrífuga-Beckman modelo J-21 a 10 000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se separó y se guardó, el sedimento se resuspendió en buffer TKM sin sacarosa y se hizo la extracción -- por segunda vez.

Los sobrenadantes se reunieron y se dializaron a tempe-

ratura ambiente durante una noche en 1 litro de ácido acético glacial al 10%, el cual contenía 50 ul de 2 mercaptoetanol. Finalmente la muestra se liofilizó.

Ensayo de Lowry para cuantificar las proteínas ribosomales (54).

Soluciones:

- A. NaCO_3 al 2%
- B. CuSO_4 al 1%
- C. Tartrato doble de sodio y potasio al 2%
- D. ABS (albúmina de suero bovino) 1 mg/ml en solución de urea 8 M.

Se mezclaron 50 ml de la solución A con 0.5 ml de la solución C y 0.5 ml de B, de aquí, se tomaron 5 ml y se mezclaron con 1 ml de una solución que contenía una cantidad estimada de 5 a 1 000 μg de proteína ribosomal o ABS (como standard) en urea 8 M, se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 0.5 ml de reactivo de Folin diluído 1:1 con agua (rápidamente y con cuidado). La mezcla se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente y se hizo la lectura en un espectrofotómetro Carl Zeiss a 750 nm en la región del visible.

El ensayo se llevó cabo para algunas muestras de ABS de concentración conocida. Las unidades de absorbancia se graficaron contra cantidades conocidas en microgramos.

Las cantidades desconocidas de proteína ribosomal se de terminaron usando la curva standard.

Preparación de los geles de poliacrilamida en una dimensión.

El análisis de las proteínas ribosomales, de las tres - especies de semillas, se realizó en geles de poliacrilamida en - una dimensión. Se siguió la técnica reportada por Kurland, et al. (55) para proteínas ribosomales.

I. Preparación de las soluciones:

A. KOH, 1N	12.0 ml
AcOH	4.3 ml
TEMED	1.0 ml
Urea	12.0 g
Aforar con agua a 25 ml.	

B. KOH, 1N	12.0 ml
AcOH	0.72 ml
TEMED	0.12 ml
Urea	12.0 g
Aforar con agua a 25 ml.	

C. Acrilamida	3.325 g
MBA	0.05 g
Urea	12.0 g
Aforar con agua a 25 ml	

D. Acrilamida 1.25 g

MBA 0.312 g

Aforar con agua a 25 ml.

E. Riboflavina 0.5 mg en 25 ml

de urea 8 M.

II. Otros reactivos:

1. APS al 0.93% en una solución de urea 8 M, se prepara el día --
que se usa.

2. Buffer 5 X.

β- alanina 15.6 g

AcOH, la cantidad necesaria para ajusta el pH a 4.5

Aforar con agua a 500 ml.

III. Preparación de los geles.

i. Para el gel inferior se mezclaron:

1 parte de A (1 ml)

6 partes de C (6 ml)

1 parte de APS (1 ml)

Mezcla 1.2 ml/tubo.

ii. Para el gel superior se mezclaron:

1 parte de B (0.25 ml)

4 partes de D (1 ml)

3 partes de E (0.75 ml)

Mezcla 0.1 ml/tubo.

Procedimiento

Se usaron tubos de vidrio de 13.5 ml de longitud y 0.5-cm de diámetro interno, previamente lavados con siliclad, uno de los extremos del tubo se selló con parafilm y se llenó con los siguientes volúmenes de gel: 1.2 ml de gel inferior y 0.1 ml de gel superior, cada uno se cubrió con agua para evitar la formación de meniscos, ya polimerizados se les quitó el agua.

Los tubos se insertaron en el aparato de electroforé^sis que se muestra en la figura 2, en las cubas se colocó el buffer - 5X diluido 1:4 con agua destilada, sobre el gel se colocó la muestra de proteínas ribosomales, aproximadamente 250 µg, disueltos - en un volumen de 10 a 20 µl de una solución de urea 8M, adicionán^dole una gotita de rojo de pironina disuelto en glicerol, para in^dicar el frente del disolvente.

La electroforé^sis se llevó a cabo a temperatura ambiente, a un pH de 4.5 y una corriente de 3 mA/tubo, durante 2 horas- (tiempo que tarda el colorante en llegar a la parte inferior del- tubo). El cátodo se colocó en la parte inferior y el ánodo en la parte superior del aparato.

Al finalizar la corrida, se sacaron los geles de los tu^bos inyectán^doles cuidadosamente agua con una jeringa hipodé^rmica. Enseguida se tiñeron durante 30 min en una solución de amido black al 1% en ácido acético glacial al 7.5%.

Los geles se destiñeron aproximadamente durante 24 horas en ácido acético glacial al 5%, recirculando esta solución a través del carbón activado, usando para ello una bomba de acuario.

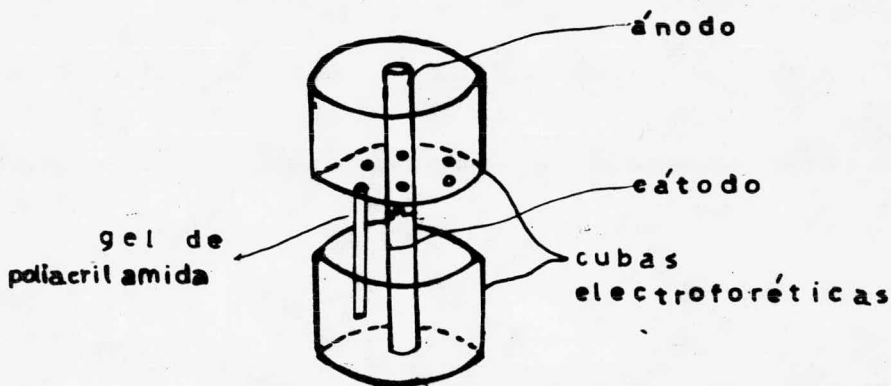


Fig. 2.- Aparato de electroforesis para geles de una dimensión.

Análisis densitométrico de los patrones de proteínas ribosomales en geles de una dimensión.

Habiendo teñido los geles con amido black, como se indica en la sección anterior, se procedió a analizarlos en un densitómetro ISCO modelo UA-S, a una longitud de onda de 540 nm en la región del visible, con un rango de absorbancia de 2 D.O. De aquí se obtuvieron directamente las gráficas de la distribución e intensidad de las bandas de proteínas ribosomales en cada uno de los geles.

Determinación teórica de la cantidad de proteínas ribosomales.

Primero se determinó la cantidad de ribosomas, que se encontraban en suspensión, a partir de su absorbancia a 260 nm en el ultravioleta, usando la siguiente relación:

$$\text{concentración de ribosomas en mg/ml} = A_{260\text{nm}} \times 86 \times 10^{-3} \quad (1)$$

El factor 86 se calculó en base al coeficiente de extinción de los ribosomas $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115$ reportado por Wolfe y Kay (3) - para germen de trigo, sabiendo que se cumple lo siguiente:

$$A = c \cdot E_{1\text{cm}}^{1\%} \quad (2)$$

donde:

A = absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda a la cual se calcula el coeficiente de extinción.

E = coeficiente de extinción.

c = concentración de la muestra en g/100 ml.

Despejando c de la fórmula 2 y haciendo la transformación a mg/ml de muestra, tenemos:

$$c = \frac{A_{260\text{nm}}}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \frac{1000}{100} \times \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = A_{260\text{nm}} \times 86 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

de ribosomas

Tomando en cuenta el volumen (v) de buffer TKM, en que-

se resuspendieron los ribosomas y además que éstos se diluyeron - 200 veces para hacer las lecturas de absorbancia, tenemos que:

$$\text{cantidad de ribosomas en mg} = A_{260\text{nm}} \times 86 \times v \times 200 \times 10^{-3} \quad (3)$$

Sabiendo que la absorbancia de los ribosomas a 260 nm - corresponde principalmente al ácido ribonucléico (ARN) que contiene, podemos asumir que la cantidad teórica de ARN en mg, está dada también por la fórmula 3.

Para determinar la cantidad teórica de proteínas se hace uso de las siguientes fórmulas generales:

$$\text{cantidad de ARN en mg} = \left[\begin{array}{l} \% \text{ de ARN en} \\ \text{los ribosomas} \end{array} \right] \left[\begin{array}{l} \text{x cantidad total de} \\ \text{ribosomas en mg} \end{array} \right] \quad (4)$$

$$\text{cantidad de proteínas en mg} = \left[\begin{array}{l} \text{x cantidad total de} \\ \text{ribosomas en mg} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{cantidad de} \\ \text{ARN en mg} \end{array} \right] \quad (5)$$

Si los ribosomas están compuestos por un 50% de ARN y un 50% de proteínas, podemos calcular la cantidad teórica de proteínas, de igual manera que la cantidad teórica de ARN, y así tenemos que:

$$\text{cantidad teórica de proteínas en mg} = A_{260\text{nm}} \times 86 \times v \times 200 \times 10^{-3} \quad (6)$$

R E S U L T A D O S

Separación y rendimiento de germen.

Se escogió la separación de germen por el método de disección, porque con éste se obtiene un rendimiento mayor (20 mg de germen/g de semilla) comparado con el que se logra por los métodos de flotación y separación "a ojo" de Johnston, et al. (56) cuyo rendimiento es aproximadamente de 6 mg de germen/g de semilla). - Los resultados se pueden ver en la tabla 1.

Por otra parte, la separación del germen se realizó a 4° C para evitar la síntesis de proteínas "de novo", la cual se inicia a los 30 min de imbibición de la semilla en agua, como ha reportado Marcus, et al. (57), y la síntesis de proteínas es muy baja - si las semillas se ponen en contacto con el agua en frío, también - reportado por Marcus, et al. (58).

La duración de la imbibición de nuestras semillas varió de 1 a 2 horas dependiendo del tipo de semilla; fue de 1 hrs. para trigo, 1.30 hrs para centeno y 2 hrs. para triticale.

Pureza de los ribosomas.

Gradientes de sacarosa.

En las figuras 3 a la 6 se pueden observar los patrones de absorbancia a 254 nm (UV) en gradientes de sacarosa el 15 y 30%, - que se obtuvieron para cada una de las preparaciones ribosomales - de las variedades estudiadas. Para la preparación de los gradientes ver el capítulo de materiales y métodos.

Las gráficas son similares a las que presentan Jones y - colaboradores (8) para ribosomas 80 S de hojas de trigo, también - se puede observar en los distintos patrones (figs. 3-6), que las - suspensiones ribosomales practicamente no presentaban contaminación ya que la absorbancia en la superficie del gradiente es mínima en todos los casos, por lo se decidió trabajar con los ribosomas tal- y como se obtuvieron al centrifugar con KCl 0.5 M a 269 000 x g, -- sin efectuar una purificación posterior.

Determinación de las relaciones de absorbancia de las preparaciones ribosomales.

El segundo criterio para determinar la pureza de los ribosomas fue la determinación de las siguientes relaciones de absorbancia: A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , como se indica en materiales y métodos.

Los resultados de las absorciones a 230, 260 y 280 nm, -

así como las relaciones respectivas de los ribosomas y el sobrenadante de cada muestra se presentan en la tabla 4.

En la literatura se han reportado las relaciones que se presentan a continuación para ribosomas puros:

A_{260}/A_{235}	1.74 y
A_{260}/A_{280}	2.0 reportadas por Jones et al. (8) para ribosomas 80 S de hojas de trigo, lavados con NH_4Cl 0.5 M.
A_{260}/A_{230}	1.2 y
A_{260}/A_{280}	1.71 Reportadas por Domínguez (59) para ribosomas de coleóptilo de trigo.
A_{260}/A_{230}	1.48 y
A_{260}/A_{280}	1.86 Reportadas por Castañeda, et al. (60) para ribosomas de eucariotes.

En las tablas 2 y 3 se presentan las relaciones de absorbancia (A_{260}/A_{280}) reportadas por Delaunay, et al. (45, 15) para ribosomas de diversos tejidos en una gran variedad de eucariotes. En general, este autor consideró que las preparaciones de los ribosomas estaban puras cuando la relación A_{260}/A_{280} estaba entre 1.7- y 1.9.

Como se puede apreciar los valores para las relaciones de absorbancia de los ribosomas varían dependiendo de la especie y del tejido que se trate, considerándose que la pureza de los ribo-

somas varían dependiendo de la especie y del tejido que se trate, considerándose que la pureza de los ribosomas es materia de definición operacional, ya que se requiere para la preparación de ribosomas la adaptación de técnicas específicas para cada caso.

En el presente estudio, se consideró que los ribosomas tenían una pureza aceptable cuando la relación A_{260}/A_{230} nm se encontraba cercana a 1.1 y la relación A_{260}/A_{280} nm se encontraba en un rango de 1.5 a 1.7. Ver los resultados en la tabla. 4.

Determinación teórica de la cantidad de proteínas ribosomales.

La determinación teórica de proteínas, se basó en la absorbancia de los ribosomas a 260 nm y se asumió, que los mismos, -- contenían un 50% de ARN y un 50% de proteínas, como se indicó en materiales y métodos.

La cantidad de proteínas ribosomales se calculó usando la fórmula 6 que se muestra a continuación:

$$\text{Cantidad teórica de proteínas en mg} = A_{260 \text{ nm}} \times 86 \times 200 \times v \times 10^{-3}$$

Los resultados para las tres especies de semillas y sus variedades, se presentan en la tabla 5, en la cual se indican: el volúmen en que fueron resuspendidos los ribosomas, la cantidad to-

tal de proteína esperada en mg, así como el rendimiento de proteínas ribosomales expresado como la cantidad de proteínas en mg por gramo de tejido (germen).

Cantidad de proteínas ribosomales extraídas.

Para la determinación de la cantidad de proteínas extraídas a partir de los ribosomas, se usó un método muy sensible como es el de Lowry (para su preparación ver el capítulo de Materiales y Métodos). Se usó albumina de suero bovino para preparar la curva standard, pudiendose lograr resultados aceptables aún cuando el contenido de amino ácido de albúmina es muy diferente al que se encuentra en los ribosomas.

La figura 7 muestra la curva standard de proteínas, y en la tabla 6 se presentan las cantidades de proteínas extraídas de los ribosomas de cada variedad de semilla, así como también, el rendimiento expresado en mg de proteínas extraídas por gramo de germen.

Análisis de las proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión.

La electroforesis da una idea acerca de la composición de las sustancias que se estudian y también de la homogeneidad y pureza de una preparación. La movilidad electroforética es una propiedad altamente específica, y aún proteínas muy similares a menudo se pueden diferenciar por electroforesis.

Con base en lo anterior, se analizaron las proteínas ri bosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión a un pH de 4.5 (para su preparación ver el capítulo de Materiales y Métodos). A este pH solamente migran las proteínas básicas, las mismas que se compararon entre las siguientes variedades de semillas: Triticum aestivum var. Potamo (6X), Triticum aestivum var. Tobarí -- (6X), Secale cereale var. Snoopy Bulk (2X), Triticale Maia I Centeno de varias variedades mezcladas.

Se hizo una única extracción de las proteínas ribosomales de cada una de las variedades estudiadas.

Se analizaron dos corridas electroforéticas separadas, en ellas se controlaron el tamaño de cada uno de los geles, la -- cantidad de muestra colocada, aproximadamente, y el tiempo de corrida, de tal manera que todas las preparaciones se pudieran comparar.

En las figuras 8 a la 10 se pueden observar las fotogra -- fías y las representaciones diagramáticas de los patrones protéicos de las diferentes variedades de semillas.

Las representaciones diagramáticas de los patrones de -- la primera corrida electroforética, que se muestran en la figura- 9, corresponden a los geles que aparecen en la figura 8a, con -- excepción de la preparación de Triticale Maia I que corresponde a la segunda corrida electroforética.

Las representaciones diagramáticas de los patrones electroforéticos de la segunda corrida, que se muestran en la figura-10, corresponden a los geles que aparecen en la figura 8b.

En dichas figuras se puede observar que se realizaron dos corridas electroforéticas diferentes para las proteínas ribosomales de las variedades Tobari, Cocorit y Snoopy Bulk. La distribución de las bandas es la misma de una corrida a otra, pero varió un poco el desplazamiento total de las mismas. En cuanto al número de bandas se puede decir que prácticamente no varió en las dos corridas diferentes de cada uno de estos casos, ya que en la segunda corrida solo se tiene el aumento de una banda muy tenue, la cual se puede observar en la parte superior de cada uno de los geles (fig. 10). En base a lo anterior se pudieron comparar todos los patrones electroforéticos de las variedades de semillas que interesaban.

Estudiando detenidamente todos los patrones electroforéticos se puede ver que el número de bandas protéicas es prácticamente el mismo en las diferentes variedades de semillas, aunque en el caso del Centeno de varias variedades aparecen 14 bandas y en el caso de Triticale Maia I aparecen 16 bandas que se distinguen perfectamente, esto se debió principalmente a que en el primer caso se colocó una cantidad de muestra menor a la de las demás preparaciones y por lo tanto no se logran distinguir las bandas muy tenues que se encuentran en la parte superior de los - -

otros geles, en el segundo caso se tenía una cantidad de muestra mayor, en la fotografía de la figura 8b, se puede observar que todas sus bandas se encuentran muy teñidas y por lo mismo no se logró la resolución de algunas bandas tenues, se puede observar -- que la distribución general de todas las bandas protéicas es muy similar entre todas las variedades estudiadas.

Análisis densitométrico de los patrones de proteínas ribosomales en geles de una dimensión

Para observar más claramente las diferencias o similitudes electroforéticas de las proteínas ribosomales, de las variedades estudiadas, se procedió al análisis de los geles teñidos con amido black, determinando su absorción a 540 nm en la región del visible, en un densitómetro. Los resultados se muestran en las figuras 11 a la 15.

Las figuras 11 a la 13 corresponden a los geles de la primera corrida electroforética (representaciones diagramáticas, figura 9).

Los patrones electroforéticos de *T. aestivum* var. Tobarí, Triticale, Maia I y *S. cereale* var. Snoopy Bulk de la segunda corrida (representaciones diagramáticas, figura 10), se muestran en las figuras 14 y 15. Solo se muestra una preparación para triticale, ya que las dos resultaron idénticas.

Por medio de este análisis se puede observar también -- que la distribución de las bandas protéicas, es muy similar entre las diferentes variedades estudiadas.

Se puede apreciar que las dos corridas electroforéticas separadas, de las proteínas ribosomales de las variedades Tobarí y Snoopy Bulk, resultaron prácticamente idénticas.

Las únicas diferencias notables entre los distintos trazos densitométricos, se encuentran en la proporción relativa de cada una de las bandas en un mismo gel.

Semilla	Cantidad de semilla (g)	Cantidad de germen (g)	Rendimiento mg de germen /g semilla
<u>T. aestivum</u> -Potamo	25.0	0.5	20
<u>T. aestivum</u> -Tobari	50.1	0.826	16
<u>T. durum</u> -Cocorit	24.9	0.385	15
Centeno varias variedades	--	0.7	--
<u>Secale cereale</u> -Snoopy	34.44	1.33	38
<u>Triticale</u> Maia I	19.68	0.4	20
		Promedio	21.8

Tabla 1.- Rendimiento de germen separado por disección

Especies y tejido	A_{260}/A_{280}
Ternera (hígado adulto)	1.67
Ternera (hígado fetal)	1.70
Carnero (hígado adulto)	1.72
Carnero (hígado fetal)	1.65
Conejo (reticulocito)	1.90
Conejo (hígado)	1.80
Conejo (riñón)	1.60
Conejo (apéndice fecal)	1.75
Pollo (hígado)	1.80

Tabla 2. Relaciones de absorbancia reportadas por Delaunay et al. (45).

Especies y tejido	A_{260}/A_{280}	
Humano (placenta)	1.74	
Puerco de guinea (hígado)	1.75	
Ratón (hígado)	1.70	
Lagarto (hígado)	1.52	} contaminación con glicógeno
Rana (hígado)	1.56	
Perca (hígado)	1.50	
Arenque (hígado)	1.77	
Macarela (hígado)	1.83	
Cangrejo (hepatopancreas)	1.88	
Ostra (hepatopancreas)	1.75	
Frijol (puntas de raíz)	1.8	
Lenteja (puntas de raíz)	1.7	
Maíz (puntas de raíz)	1.85	

Tabla 3.- Relaciones de absorbancia reportadas por Delaunay et al. (15). de los ribosomas de varias especies.

Semillas	Absorbancia (nm)			Relaciones de Absorbancia	
	230	260	280	A_{260}/A_{230}	$A_{260}/280$
<u>T. aestivum-Potamo</u>					
ribosomas	0.341	0.408	0.244	1.09	1.67
sobrenadante	0.216	0.23	0.449	0.51	1.06
<u>T. aestivum-Tobari</u>					
ribosomas	0.81	0.89	0.57	1.09	1.53
sobrenadante	0.49	0.294	0.225	0.60	1.30
<u>T. durum-Cocorit</u>					
ribosomas	0.459	0.53	0.35	1.15	1.55
sobrenadante	0.361	0.17	0.08	0.47	2.12
<u>Centeno varias variedades</u>					
ribosomas	1.15	1.30	0.85	1.13	1.52
sobrenadante	0.365	0.186	0.14	0.05	1.32
<u>Secale cereale</u>					
<u>Soopy Bulk</u>					
ribosomas	0.91	0.86	0.569	0.94	1.53
sobrenadante	0.329	0.146	0.114	0.44	1.28
<u>Triticale Maia I</u>					
ribosomas	0.364	0.475	0.272	1.30	1.74
sobrenadante	0.261	0.127	0.02	0.40	1.25

Tabla 4.- Absorbancia de los ribosomas y del sobrenadante, los cuales se obtuvieron al centrifugar a 269 000 x g durante 1 h. a 5°C, para más detalles ver el capítulo de Materiales y Métodos.

Semillas estudiadas	v (ml)	proteínas ribosomales (mg)	rendimiento (r)
<u>T. aestivum</u> var. Potamo	0.25	1.75	3.50
<u>T. aestivum</u> var. Tobari	0.5	7.65	9.26
<u>T. durum</u> var. Cocorit	0.25	2.27	5.90
Centeno varias variedades	0.25	5.70	7.90
<u>Secale cereale</u> var. Snoopy Bulk	0.5	3.70	2.80
<u>Triticale</u> Maia I	0.25	2.04	5.10

Tabla 5.- Cantidad teórica de proteínas ribosomales calculada por medio de la fórmula 6 que se muestra en el capítulo de Materiales y Métodos.

Nota: v = volumen de buffer TKM usado para suspender los ribosomas.

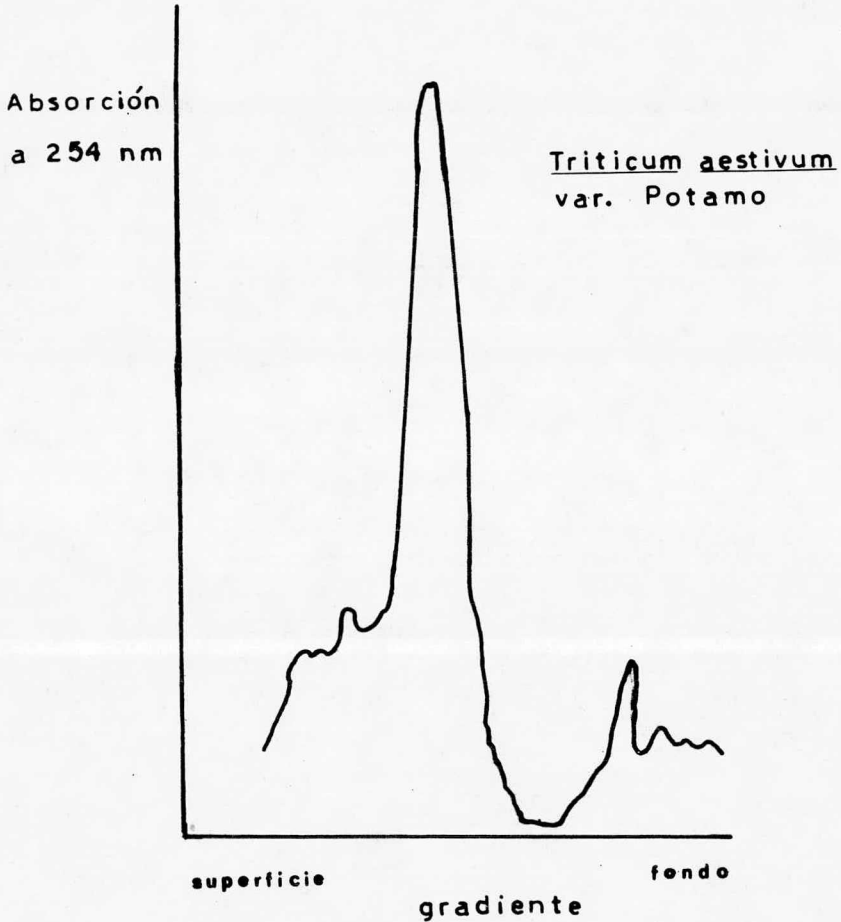
r = rendimiento expresado en mg de proteína/g de tejido.

T = Triticum.

Semillas estudiadas	Proteínas ribosomales extraídas en mg	rendimiento
<u>T. aestivum</u> var. Potamo		----
<u>T. aestivum</u> var. Tobarí	1.30	0.63
<u>T. durum</u> var. Cocorit	0.90	0.42
<u>Secale cereale</u> var. Snoopy Bulk	1.84	0.72
<u>Triticale</u> Maia I	0.59	0.67
Centeno varias variedades	----	----

Tabla 6.- Determinación de la cantidad de proteínas ri
bosomales extraídas, se usó el método de --
Lowry. El rendimiento está dado en mg de --
proteínas ribosomales extraídas por gramo de
germen.

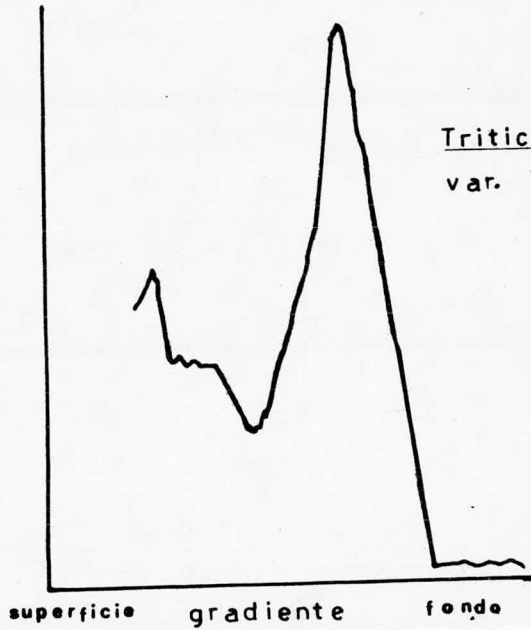
fig. 3



En las figuras 3 a la 6 se muestran los perfiles de absorción de los ribosomas de las variedades de semillas estudiadas en gradientes de sacarosa al 15 y 30 % (para su preparación ver el capítulo de Materiales y Métodos).

fig. 4

Absorción
a 254 nm



Absorción
a 254 nm

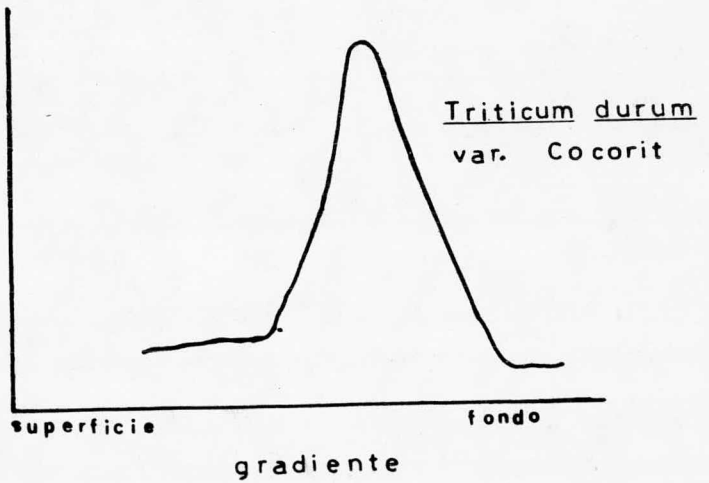


fig. 5

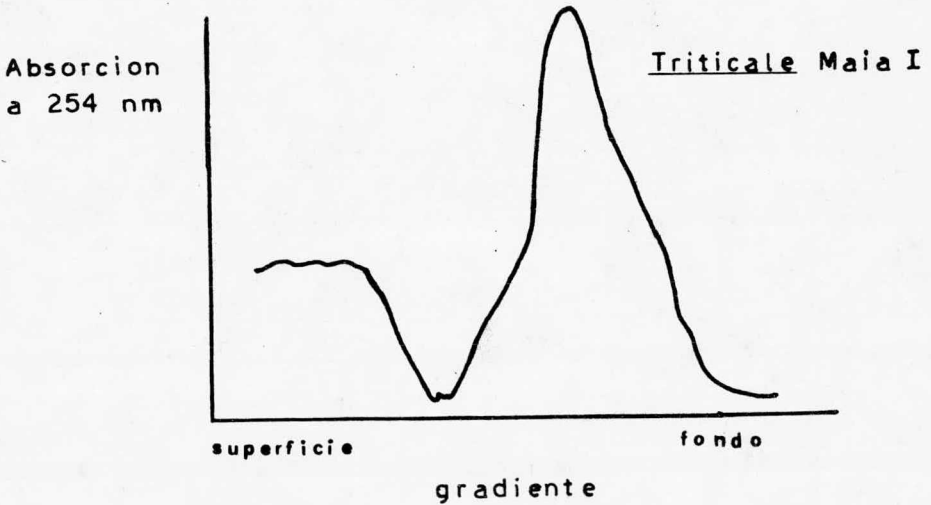
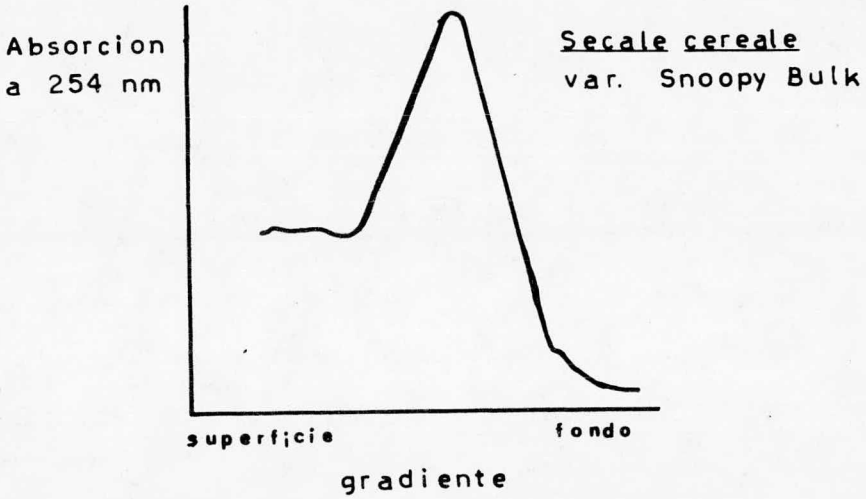


fig. 6

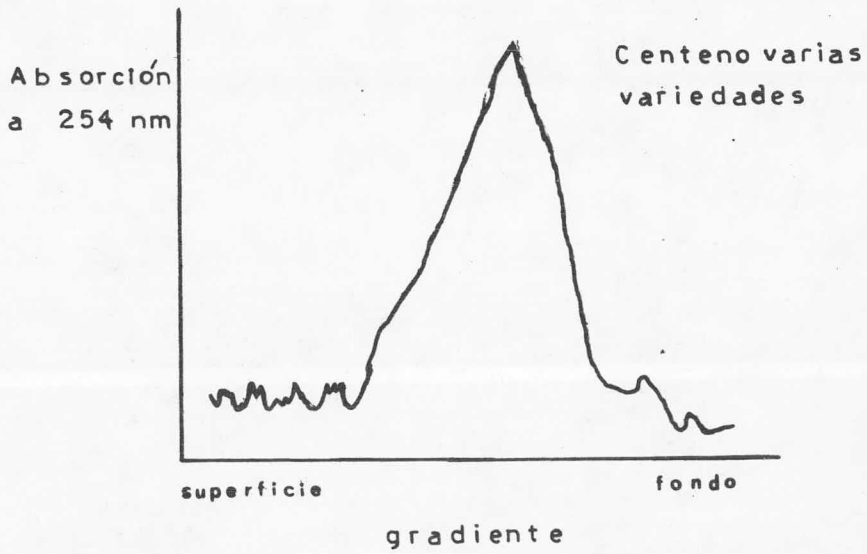


Fig. 7

Determinación de Proteínas
Ribosomales por el Método
de Lowry

Curva Standard

D.O.
750 nm

0.4

0.3

0.2

0.1

5

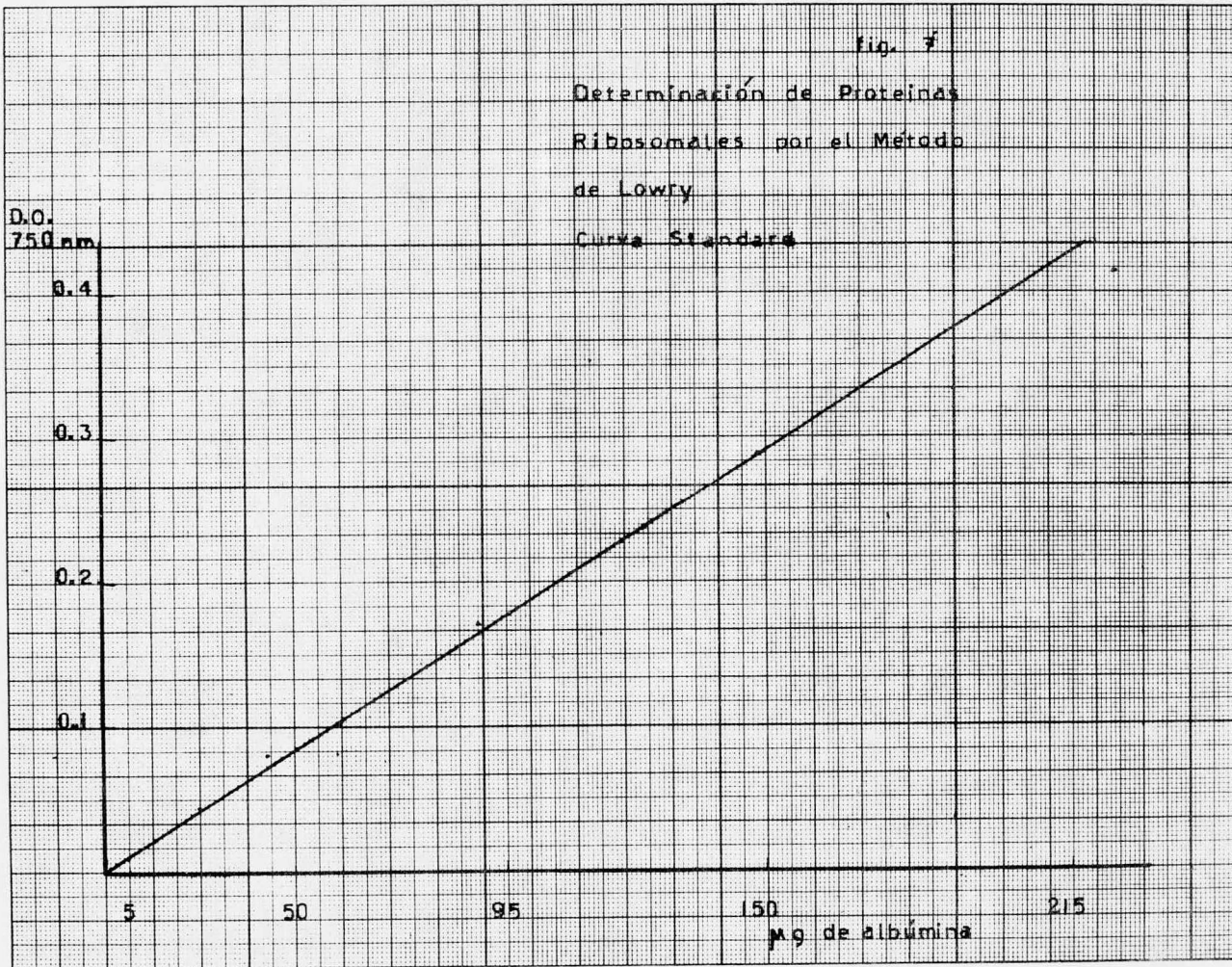
50

95

150

215

µg de albúmina



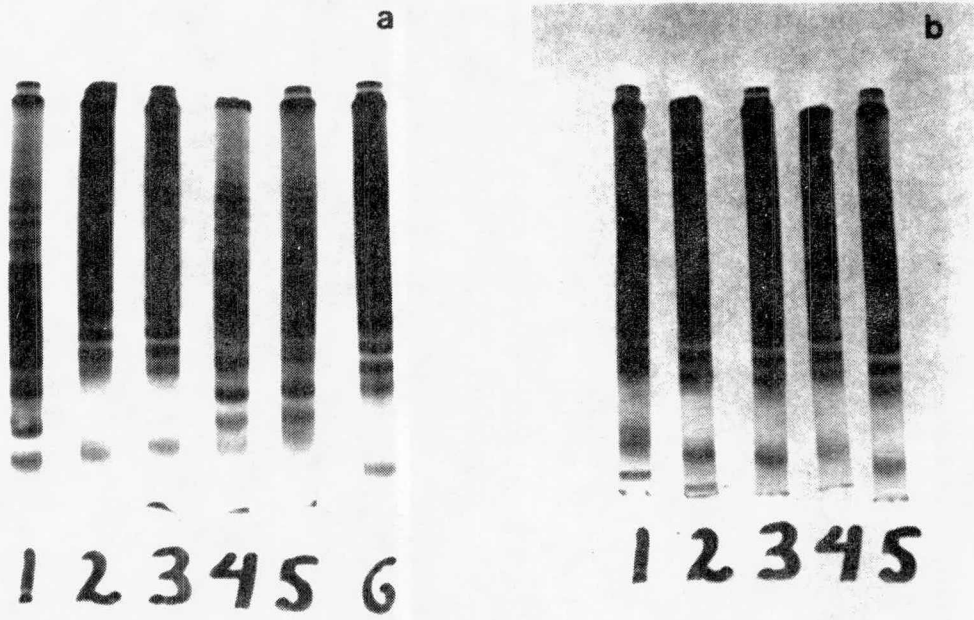
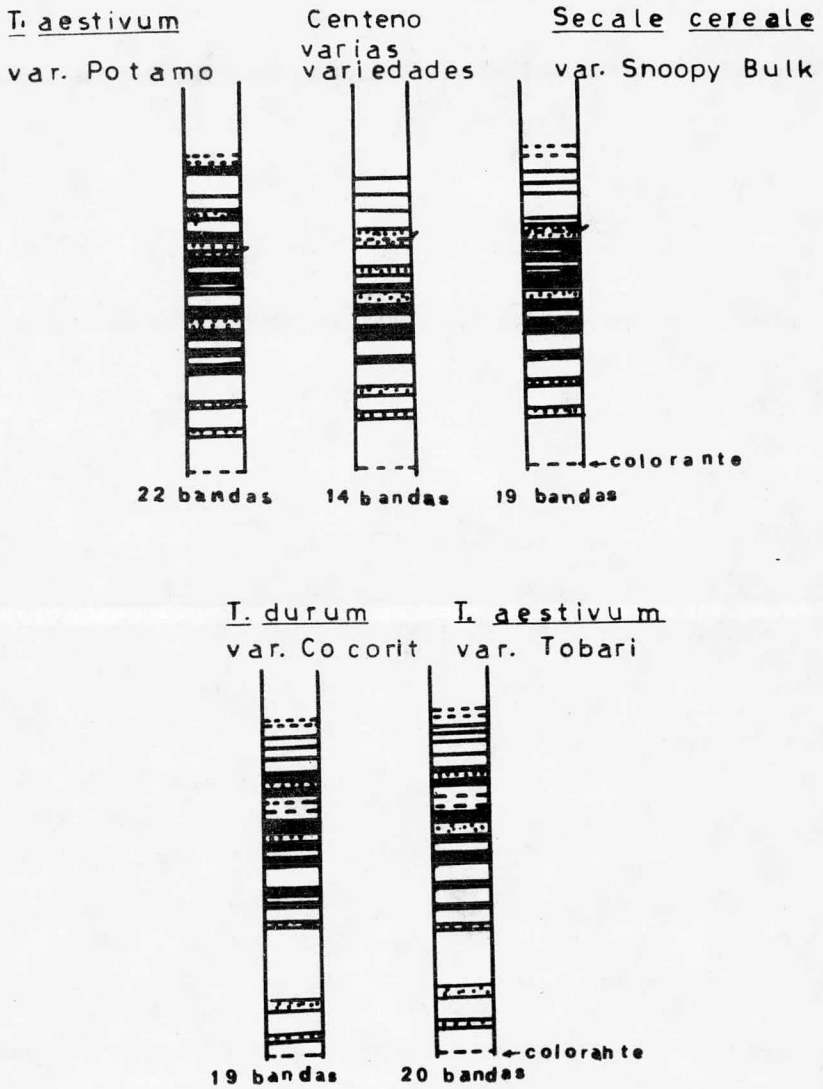
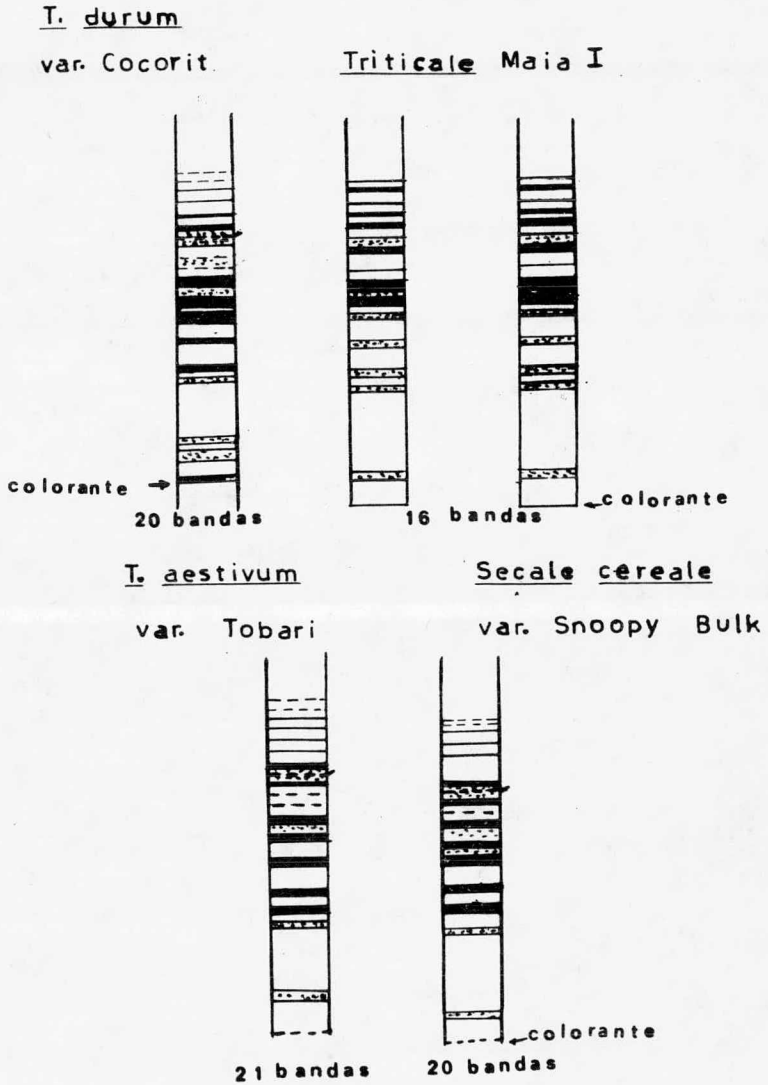


fig. 8 Análisis de las proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión. a) 1-T. aestivum var. Potamo, 2-T. durum var. Cocorit, 3-T. aestivum var. Tobari, 4-S. cereale var. Snoopy Bulk, 5-Centeno varias variedades. b) 1-T. durum var. Cocorit, 2-y 3-Triticale Maia I, 4-T. aestivum var. Tobari, 5-S. cereale var. Snoopy Bulk. T = Triticum, S = Secale.

fig. 9

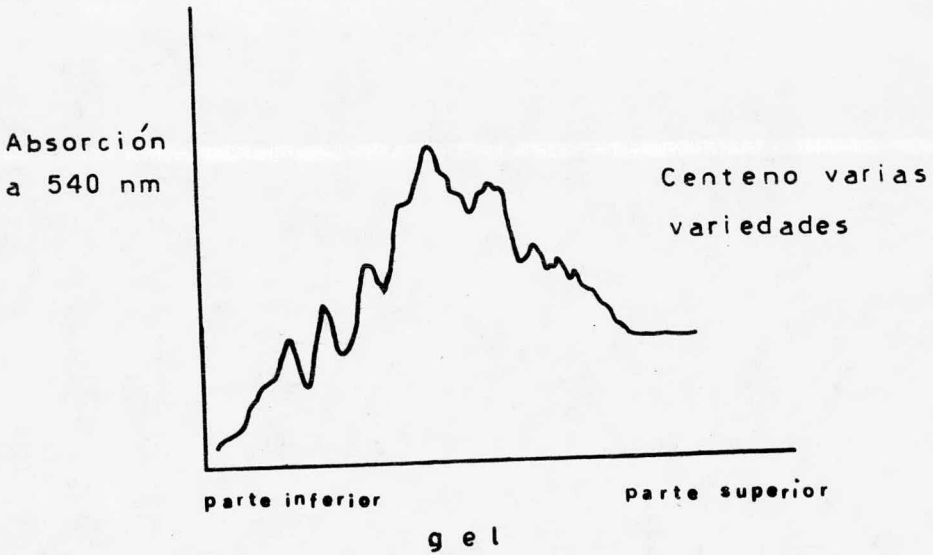
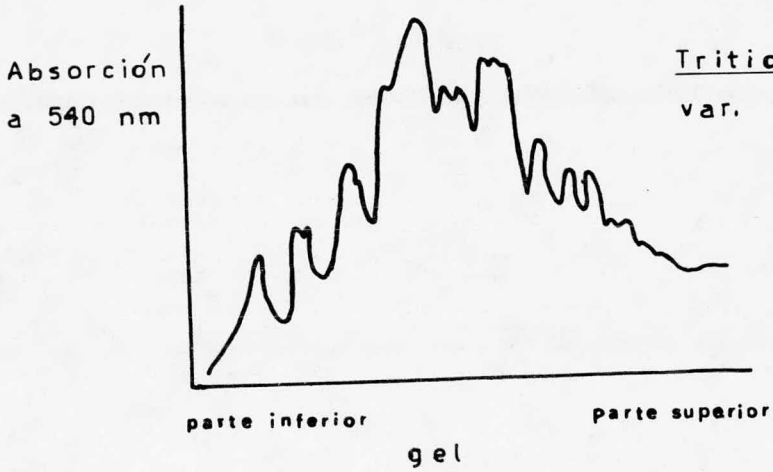


Análisis de las proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión. pH = 4.5. Representación diagramática.



Análisis de las proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión. pH = 4.5. Representación diagramática.

fig. 11

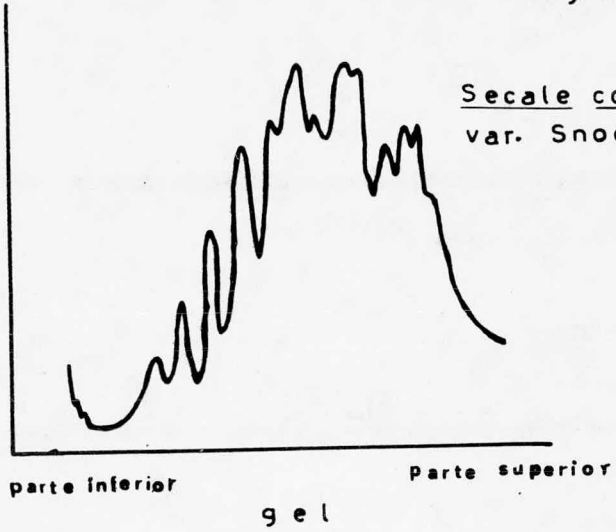


En las figuras 11 a la 15 se muestra el análisis densitométrico de las proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en una dimensión, teñidos con amido-black. Se determinó la absorción de los geles a 540 nm en la región del visible.

fig. 12

Absorción
a 540 nm

Secale cereale
var. Snoopy Bulk



Absorción
a 540 nm

Triticum durum
var. Cocorit

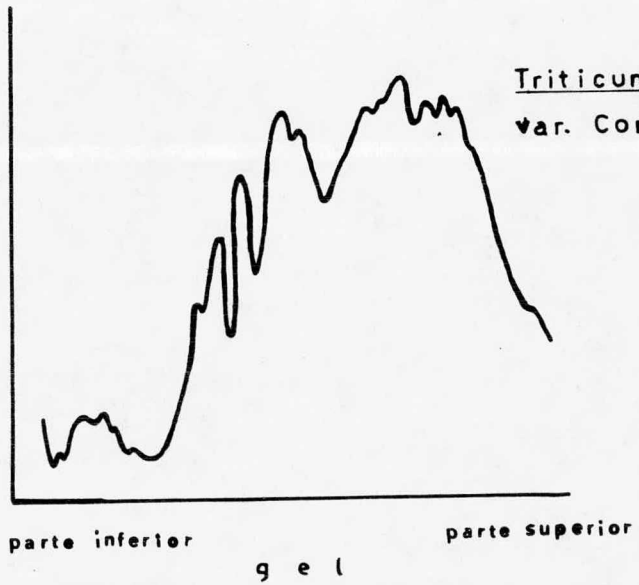


fig. 13

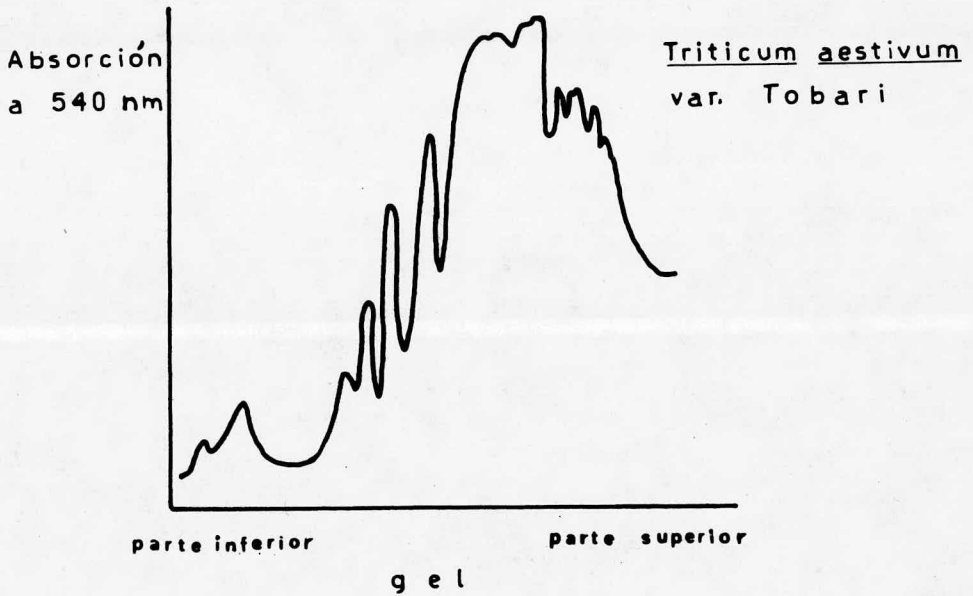
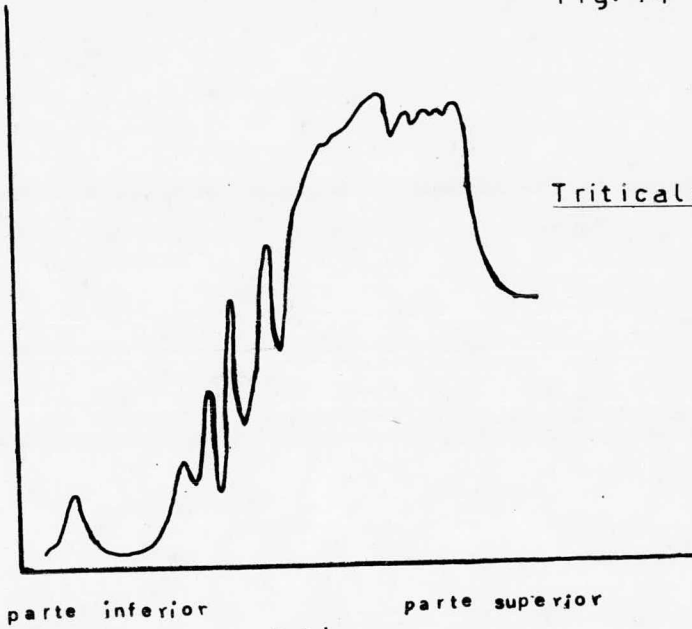


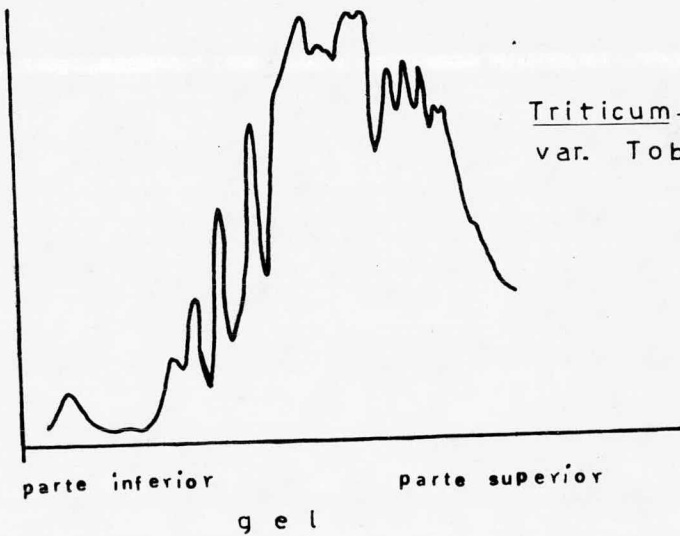
fig. 14

Absorción
a 540 nm



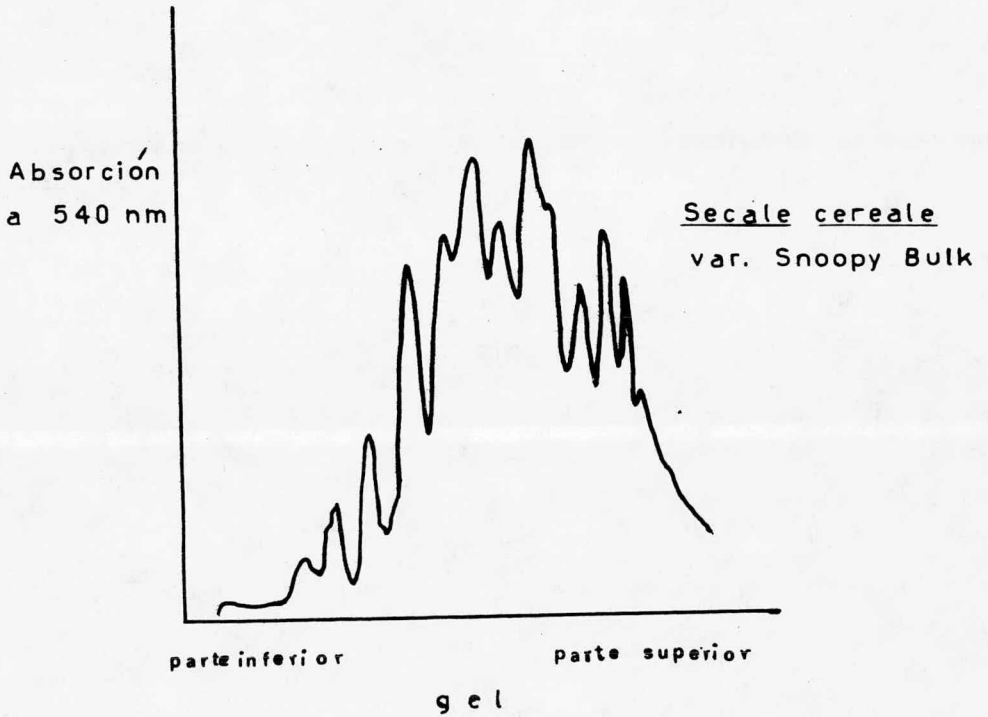
Triticale Maia I

Absorción
a 540 nm



Triticum-aestivum
var. Tobarí

fig. 15



D I S C U S I O N

El primer punto a tratar en este capítulo, es el relacionado con la separación del germen de las semillas de trigo, centeno y triticale, como se mencionó en un principio, el objeto de separar el germen embebiendolo en agua para después disectarlo fue para obtener un máximo rendimiento, mismo que afortunadamente se logró con los tres tipos de semillas (ver tabla 1).

Debido a que no existe evidencia de que, las proteínas-ribosomales que se sintetizan "de novo" sean idénticas a las que se encuentran almacenadas en la semilla, se trató de evitar la síntesis de tales proteínas, de manera que, el proceso de imbibición de las semillas estudiadas se efectuó a 4°C, esto con base en dos reportes de Marcus y colaboradores (57,58), en los cuales muestran que la síntesis de proteínas "de novo" se inicia a los 30 min. de imbibición de las semillas, además que ésta síntesis de proteínas es mínima en los ribosomas aislados de germen de trigo, el cual se había embebido en agua a 0 y 5°C, comparandola con la que se lleva a cabo en ribosomas aislados de germen de trigo embebido a 23 y 25°C. En ribosomas de germen de cacahuete se ha encontrado que ésto también ocurre (61). La síntesis de proteínas tan baja, durante la imbibición en frío, pudo deberse a un retra-

so en la formación de polisomas funcionales, a una lenta transición de monosomas a polisomas, a la falta de disponibilidad de ARNm o a la incapacidad de obtener la energía suficiente para que se llevara a cabo la síntesis de proteínas de una manera normal.

Pradet (62) ha demostrado que el ATP aumenta durante los primeros minutos de germinación en las semillas de lechuga. Además es sabido que, dicho proceso requiere de energía y por lo tanto depende de la respiración. En cotiledones de chícharo se ha observado un rápido incremento en la respiración durante los primeros 15 minutos de germinación; y que en semillas de lino la respiración disminuye al bajar la temperatura (63).

Con los datos anteriores se puede sugerir que, en el caso del germen de trigo, las temperaturas de imbibición tan bajas pudieron haber provocado también una disminución en su respiración y de esta manera los ribosomas no alcanzaron la energía suficiente para llevar a cabo la síntesis de proteínas de una manera normal, esto además, está apoyado por el hecho de que, por lo general la germinación de las semillas se evita a temperaturas muy altas o muy bajas.

Otro hecho importante es que, al parecer, la imbibición de las semillas y su posterior deshidratación no causan daño en su desarrollo, siempre y cuando el tiempo de imbibición sea menor a 48 hrs. (64).

Las evidencias anteriores sugieren que el metabolismo de las semillas, embebidas a bajas temperaturas, se encuentra reducido a su mínima expresión.

Como se ha mencionado, las semillas estudiadas en este trabajo se embebieron a 4°C durante 1 a 2 horas, y en este caso se puede considerar que, las proteínas ribosomales extraídas son las que se encontraban preformadas en las semillas, con base en las evidencias anteriormente indicadas.

Por otro lado, los ribosomas aislados de las diferentes semillas tenían una pureza aceptable, a juzgar por los perfiles tan limpios que se obtuvieron en gradientes de sacarosa (figs. 3-6), se encontró que eran similares a los de ribosomas citoplásmicos de hojas de trigo, reportados por Jones y colaboradores (8).- También las relaciones de absorbancia de los ribosomas se encontraron en un rango aceptable; A_{260}/A_{230} cercanas a 1.1 y A_{260}/A_{280} entre 1.5 y 1.7. Sin embargo, se pueden obtener ribosomas todavía mas puros, si se separan las fracciones que corresponden al pico principal o de monosomas, que aparece en cada uno de los perfiles en gradientes de sacarosa; y se deben determinar sus relaciones de absorbancia para asegurar que el grado de pureza ha aumentado.

En cuanto a las proteínas ribosomales extraídas, se obtuvo un rendimiento diez veces menor que el que se esperaba, se -

debe tomar en cuenta que el cálculo teórico de proteínas es solamente una aproximación de la cantidad que se debería obtener, debido a que no se determinó la cantidad de proteínas directamente en los ribosomas antes de la extracción, sino que se partió de la absorción de los mismos a 260 nm (UV.), como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos, pero aún así, el rendimiento real de las proteínas fue muy bajo, esto pudo deberse a una pérdida de proteínas por manipulaciones durante la extracción. También puede ser que, la cantidad de proteínas extraídas en realidad fue mayor que la mostrada por el método de Lowry, posiblemente debido a que se usó albumina de suero bovino como estándar, en lugar de -- usar una proteína más parecida a las ribosomales como es la lisozima.

Es importante mejorar el rendimiento de las proteínas ribosomales, porque se puede contar con una mayor cantidad de material, para llevar a cabo un mayor número de corridas electroforéticas separadas; lo que permitiría tener datos todavía mas confiables.

De los estudios de las proteínas ribosomales de trigo, centeno y triticale, en geles de poliacrilamida en una dimensión, se puede concluir lo siguiente: los patrones electroforéticos fueron reproducibles de una corrida a otra y como ejemplo tenemos los patrones de las variedades de trigo; Tobarí y Cocorit, y los-

patrones de Snoopy Bulk, variedad de centeno, se encontró que dos muestras de proteínas de una misma especie, en una misma corrida electroforética, dieron patrones idénticos, como los de triticale que se muestran en la figura 10, entre los patrones electroforéticos de todas las variedades estudiadas, se observaron diferencias, en cuanto a la aparición o desaparición de una o dos bandas protéicas, pero tales diferencias no son significativas, ya que estas también se presentaron entre dos corridas diferentes de proteínas ribosomales de una misma especie.

Como resultado del análisis densitométrico de cada uno de los patrones electroforéticos, se encontraron diferencias en las proporciones relativas de sus bandas protéicas, por ejemplo en las dos variedades de trigo se puede apreciar que, los tres últimos picos tienen la misma absorción (figs. 11-13), en cambio en la variedad Snoopy Bulk, uno de estos tres picos presenta una menor absorción que la que muestran los otros dos (fig. 12), en la parte media de los geles se aprecian de dos a tres picos principales, que presentan variaciones en sus absorciones, en el caso del triticale estos picos no se resolvieron debido a que las bandas protéicas se encontraban muy teñidas, porque se había colocado una mayor cantidad de muestra en estos geles, estas variaciones sugieren que, algunas semillas pudieran presentar una mayor cantidad de alguna o algunas proteínas, que presentan igual movilidad electroforética en geles de una dimensión; es necesario un análisis más fino para determinar si existen tales diferencias.

Como se mencionó en un principio, se esperaba que, entre las semillas estudiadas se presentaran diferencias muy notables, debido a que, su grado de haploidía era muy variado: de 2X para centeno, 4X y 6X para las variedades de trigo y 8X para triticale, sin embargo, como se ha podido apreciar, los patrones electroforéticos de todas las variedades estudiadas, resultaron muy parecidos entre sí, en cuanto al número y distribución de bandas proteícas, esto está de acuerdo con algunos reportes que indican haber encontrado patrones electroforéticos similares entre especies de plantas taxonomicamente muy relacionadas, por ejemplo, Littleton (2) encontró mayores similitudes entre los patrones electroforéticos en una dimensión de las proteínas ribosomales de especies que pertenecen a una misma familia, como chícharo y clavel y que las diferencias eran más marcadas entre especies de diferentes familias, como chícharo y tabaco, Janda y Wittmann (21) encontraron que, las similitudes eran mayores entre los patrones de frijol, chícharo y tabaco, y menores entre estas tres especies y germen de trigo, ellos puede reflejar diferencias taxonómicas entre dicotiledóneas (frijol, chícharo y tabaco) y monocotiledóneas (trigo), Gualerzi y Cammarano (14) encontraron diferencias entre especies que pertenecían a distintas subclases (taxonomicamente más relacionadas), como lechuga y espinaca y que las diferencias fueron menores entre distintos géneros (menos relacionadas), como betabel y espinaca. De los estudios de proteínas ribosomales en geles de poliacrilamida en dos dimensiones, tenemos los de Delaunay, et al. (15) y Nagabhusan, et al. (30), en el primero de ellos encontra-

ron que los patrones proteicos de dos papilionaceas, frijol y lenteja, no presentaban diferencias, pero si encontraron diferencia entre estas especies y una graminacea, el maíz, y en el segundo reporte encontraron que, en general, los patrones proteicos de haba, chícharo y espinaca eran muy parecidos entre sí, también encontraron similares los patrones de cebada y centeno, además establecieron claramente que el número de proteínas ribosomales básicas era diferente para cada especie, por ejemplo, encontraron que la cebada presentaba 31 proteínas básicas, el centeno 47, haba 54 chícharo 48 y espinaca 49.

Tomando en cuenta lo anterior, en la presente tesis no se puede concluir definitivamente que las mismas proteínas ribosomales básicas esten expresadas en las semillas de trigo, centeno y triticale, a pesar de las similitudes encontradas entre sus patrones proteicos; para llegar a esclarecer, si se encuentran mayores similitudes o diferencias entre estas proteínas, se hace necesario su estudio en geles de poliacrilamida en dos dimensiones, debido a que, por medio de esta técnica es posible distinguir cada proteína como una mancha separada, y se puede cuantificar el número de proteínas presentes en cada una de las variedades de semillas. Considero que de esta manera se observarían diferencias significativas y para ello me apoyo en el reporte de Nagabhushan, et al. (30), en el cual como he mencionado anteriormente, encontraron diferencias en el número de proteínas ribosomales básicas entre especies de plantas con distintos grados de haploidía. Un-

estudio de esta naturaleza aclararía, si en las semillas de trigo y centeno se encuentran expresados los mismos genes para proteínas ribosomales, y al estudiar el patrón protéico del anfiploide triticale, se podría establecer si es que existe una pérdida o un aumento del material genético, que codifica para sus proteínas ribosomales. Sin olvidar que, también existe la posibilidad de que las diferencias encontradas pudieran deberse a algún cambio en la expresión de los genes.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Sun, T.T., Bickle, T.A. y Traut, R.R., J. Bacteriol. 111; 474-480 (1972).
- 2.- Littleton, J.W., Biochim. Biophys. Acta. 154; 145-149 (1968)
- 3.- Wolfe, H.F. y Kay, C.M., Biochemistry. 6; 2853-2860 (1967)
- 4.- Loening, U.E. e Ingle, J., Nature. 215; 363 (1967)
- 5.- Boulter, D., Ellis, R.J. y Yarwood, A., Biol. Rev. 47; 113--143 (1972).
- 6.- Gualerzi, C. y Cammarano, P., Biochim. Biophys. Acta. 190; 170-186 (1969)
- 7.- Vasconcelos, A.C.L. y Bogorad, L., Biochim. Biophys. Acta. 228; 492-502 (1971).
- 8.- Jones, B.L., Nagabhushan, N., Tucker, E.B. y Zalik, s., Can. J. Biochem. 51; 686-693 (1973).
- 9.- Tissieres, A., Schlessinger, D. y Gros, F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 46; 1450 (1960).
- 10.- Lin, C.Y., Chia, S.L.L., Travis, R.L. y Key, J.L., Plant. - Physiol. 56; 39-43 (1975).
- 11.- Davies, B.D., Nature. 231; 153-157 (1971)

- 12.- Higo, K., Held, W., Kahan, N., y Nomura, N., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70; 944-948 (1973).
- 13.- Geisser, M., Stoffler, G., Tischendorf, G.W. y Wittmann, H.-G., Mol. Gen. Genet. 127; 113-128 (1973)
- 14.- Gualerzi, C. y Cammarano, P., Biochim. Biophys. Acta. 199; 203-213 (1970)
- 15.- Delaunay, J., Creusot, F. y Schapira, G., Eur. J. Biochem.--39; 305-312 (1973).
- 16.- Wittmann, H.G., Eur. J. Biochem. 61; 1-13 (1976)
- 17.- Otaka, e., Itoh, T. y Osawa, S., J. Mol. Biol. 33; 93-107 -- (1968).
- 18.- Mutolo, V., Giudice, G., Hopps, V. y Donatuti, G., Biochim. Biophys. Acta. 138; 214-217 (1967)
- 19.- Low, R.B. y Wool, I.G., Science. 155; 330-332 (1967)
- 20.- Di Girolamo, M. y Cammarano, P., Biochim. Biophys. Acta. 168; 81-194 (1968)
- 21.- Janda, H.G. y Wittmann, H.G., J. Mol. Gen. Genet. 103; 238-243 (1968).
- 22.- Yaguchi, M., Roy, C., Mathenson, A.T. y Visentin, L. P., Can. J. Biochem. 51; 1215-1217 (1973).
- 23.- Bickle, T.A. y traub, R.R., J. Biol. Chem. 246; 6828-6834 (1971).
- 24.- Wittmann, H.G., Fed. Eurp. Biochem. Soc. Proc. Eighth Meeting Amsterdam. pag. 213 (1972).

- 25.- Jones, B.L., Nagabhushan, N., Gulas, A. y Zalik, S., FEBS. -
letrs. 23; 167-170 (1972).
- 26.- Kurland, C.C., Donner, D. y Van Duin, J., Fed. Eur. Europ.
Proc. Eighth Meeting Amsterdam. pag. 225 (1972).
- 27.- Arglebe, C. y Hall, T.C., Plant. Cell. Physiol. 10; 171-182
(1969)
- 28.- Cammarano, P., Biochim. Biophys. Acta. 190; 170 (1969)
- 29.- Sherton, C.C. y Wool, I.G., J. Biol. Chem. 247; 4460-4467-
(1972)
- 30.- Nagabhushan, N., Gulas, A. y Zalik, S., Plant. Physiol. -
53; 516-519 (1974).
- 31.- Ochai, H., Kanda, F. y Iwabuchi, M., J. Biochem. 73; 163 -
(1973).
- 32.- Chumikina, L.V., Gumilevskaya, N.A. y Kretovich, V.L., Bio
chimiya. 40; 267-275 (1975).
- 33.- Gualerzi, C., Janda, H.G., Passow, H. y Stöffler, G., J. -
Biol. Chem. 249; 3347-3355 (1974).
- 34.- Waller, J. y harris, J.I., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. -
47; 78 (1961).
- 35.- Leboy, P.S., Cox. E.C. y Flacks, J.G., Proc. Nat. Acad. -
Sci. U.S.A. 52; 1367-1374 (1964).
- 36.- Traub, P., Nomura, T. y Tu., J. Mol. Biol. 24; 149 (1966)
- 37.- Traut, R.R., J. Mol. Biol. 24; 149-155 (1967).

- 38.- Gesteland, R.F., y Staehelin, T.S., J. Mol. Biol. 62;
403-405 (1971).
- 40.- Welfe, H., Stahl, J. y Bielka, N., FEBS. Letrs. 26; 228 -
(1972).
- 41.- Sherton, C.C. y Wool, I.G., J. Biol. Chem. 247; 4460-4467
(1972).
- 42.- Waller, J.P., J. Mol. Biol. 10; 319 (1964).
- 43.- Schaad, N.W., Inst. J. Syst. Bacteriol. 24; 42-53 (1974).
- 44.- Bielka, H. y Welfe, H., Mol. Gen. Genet. 102; 128-131(1968)
- 45.- Delaunay, J., Mathieu, C. y Schapira, G., Eur. J. Biochem.
31; 561-564 (1972).
- 46.- Mc. Innes, J.W., J. Mol. Biol. 65; 157-161 (1972).
- 47.- Huynh, V.T., Delaunay, J. y Schapira, G., FEBS. Letrs. 17;
163-167 (1971).
- 48.- Yurina, N.P. y Odinstova, M.S., Biochimiya. 39; 348-358 -
(1974).
- 49.- Freyssinet, G. y Schiff, J.A., Plant. Physiol. 53; 543-554
(1974).
- 50.- Stöffler, G., Wool, I. G., Alan lin y Pak, K.H., Proc. Nat.
Acad. Sci. U.S.A. 71; 4723-4726 (1974).
- 51.- Roberts, B.E., Payne, P.I. y Osborne, D.J., Biochem. J. -
131; 275-286 (1973).

- 52.- Martin, I.E., Rolleston, F.S., Low, R.B. y Wool, I.G., J.-
Mol. Biol. 43; 135 (1969).
- 53.- Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G., Biochem
8; 2897-2905 (1968).
- 54.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.,
J. Biol. Chem. 193; 265-275 (1951).
- 55.- Kurland, C.G. y Voynow, P., Biochem. 10; 517-524 (1967).
- 56.- Johnston, F.B. y Stern, H., Nature. 179; 160 (1957).
- 57.- Marcus, A., Feeley, D. y Volcani, T., Plant. Physiol. 41;-
1167-1172 (1966).
- 58.- Marcus, A., Spiegel, S. y Obendorf, R.L., Plant. Physiol.
56; 502-507 (1975).
- 59.- Domínguez, J.L.
El efecto del AIA sobre el metabolismo del
ácido ribonucléico citoplásmico en coleóptilo
de trigo.
Tesis de Maestría.
Méx. 1976.
- 60.- Castañeda, M. y Santiago, R.
Basic Life Sciences. Gene Expression
and its Regulation
Ed. Alexander Hollander.
N.Y. (1973).
- 61.- Marcus, A., Sym. Soc. Exp. Biol. 23; 143-160 (1969).

62.- Seed Biology

Ed. Koslowski, T.T.

Vol. 2, Cap. 2

1976

63.- Pradet, A., Armugokamud, N. y Verneersch, Plant.

Tissue. Bull Soc. Fr. Physiol. Veg. 14; 107 (1968).

64.- Chen, D., Sarid, S. y Katchalski, E., Proc. Nat.

Acad. Sci. U.S.A. 61; 1378 (1968)