

66  
29.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## EFECTO DE LA BENCILADENINA EN LA TRANSCRIPCION DEL GEN HOMOLOGO DE *cdc2* DE MAIZ.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

IVONNE ANTONIETA HERRERA TEIGEIRO



MEXICO, D. F.,

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

# Índice.

## Introducción.

<b>Maíz.</b>	1
<b>Semillas.</b>	
a)Estructura.	3
b)Composición.	3
c)Desarrollo.	4
<b>Germinación.</b>	
a)Definición.	5
b)Proceso.	6
c)Metabolismo durante la germinación.	7
d)Metabolismo de los ácidos nucleicos durante la germinación.	9
ADN	
ARN	
e)Metabolismo de proteínas durante la germinación.	10
<b>Fitorreguladores.</b>	
a)Definición.	11
b)Generalidades, síntesis y localización.	
Auxinas.	14
Giberelinas.	14
Citocininas.	15
Acido abscísico.	16
Etileno.	16
c)Efectos de los fitorreguladores.	
Auxinas.	16
Giberelinas.	18

Citocininas.	20
Acido abscísico.	22
Etileno.	24
d) Interacción hormonal.	25
Ciclo celular.	25
Ciclo celular en plantas.	31
Germinación y ciclo celular.	31
Ciclo celular y fitohormonas.	32
<b>Antecedentes.</b>	34
<b>Hipótesis.</b>	36
<b>Objetivos.</b>	36
<b>Materiales.</b>	37
<b>Métodos.</b>	43
<b>Resultados.</b>	58
<b>Discusión.</b>	83
<b>Referencias.</b>	87

# Introducción.

La formación de las semillas es esencial para la supervivencia y dispersión de la mayoría de las especies vegetales.

Aproximadamente un 70% del alimento humano viene directamente de las semillas.

Las semillas más importantes cultivadas por el hombre para la alimentación como fuente de carbohidratos son los cereales, como el maíz.

## Maíz (*Zea mays*):

Planta gramínea monóica de la familia de las angiospermas, de tallo macizo, flores masculinas en racimos terminales y flores femeninas en espigas, con granos gruesos y amarillos.

Originaria de América del Sur, la composición del grano de maíz es la siguiente:

### Principales aminoácidos presentes:

Lípidos	4%	Ac. glutámico	26%
Proteínas	8%	Leucina	19%
Almidón	74%	Alanina	10%

Su grano es muy nutritivo y además utilizado industrialmente, su aceite se utiliza en la alimentación y en la preparación de barnices, margarina y jabones, por su alto contenido de almidón se utiliza como materia prima para su obtención y para la producción de alcohol.

Por esto la importancia de realizar estudios en torno de él.

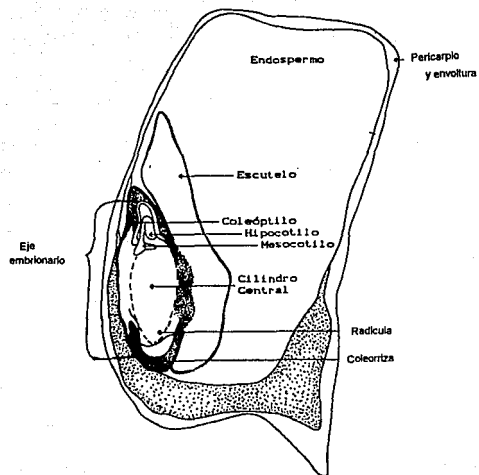


Figura #1: Estructura de una semilla de maíz.

## Semillas.

### a) Estructura (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989 (a)).

Una semilla verdadera es morfológicamente compleja, conteniendo tejidos de diferente composición genética.

Existen tres estructuras básicas: embrión, endospermo y testa (Figura #1).

La testa forma la barrera entre el embrión y su medio ambiente, su permeabilidad al agua y a gases le da un papel importante para que se lleve a cabo la germinación, ya que si se bloquea la entrada de agua, la germinación no puede ocurrir.

El endospermo puede persistir como tejido de almacenamiento, que contiene materiales que utilizará el embrión durante la germinación; o alternativamente puede degenerar parcial o totalmente, quedando como un tejido rudimentario particularmente en aquellos casos en los que los cotiledones sirven como órganos de almacenaje.

El embrión está constituido por el eje embrionario que se desarrollará en la nueva planta, y por hojas seminales o cotiledones; en el caso de las monocotiledóneas como el maíz cuentan con un cotiledón, que forma el escutelo alrededor del cual se encuentra una capa de células denominada aleurona, la cual es muy importante durante la germinación de la semilla; en un extremo del embrión se encuentra la radícula que formará la raíz de la planta; el otro extremo, la plúmula, formará el tallo y las hojas.

### b) Composición (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989 (b)).

Los principales materiales de reserva acumulados en los tejidos de almacenaje de las semillas son: carbohidratos (azúcares, oligo y polisacáridos), proteínas, lípidos y minerales, especialmente fosfatos.

Los carbohidratos se almacenan de diferentes maneras:

• Como granos de almidón, en leucoplastos; • como componentes de la pared celular; • como hemicelulosa y otros polisacáridos.

Las proteínas de reserva se acumulan en cuerpos proteicos.

Muchas semillas almacenan lípidos como reserva principal de carbono y energía.

El fosfato almacenado por las semillas se encuentra como fitina, que es la sal de calcio y magnesio del hexafosfato de inositol. Esta se acumula en los cuerpos proteicos. El fósforo es liberado de la fitina por hidrólisis enzimática, esta hidrólisis además libera calcio y magnesio (Reddy et al., 1982).

Además de los compuestos principales mencionados, las semillas contienen una gran cantidad de otras sustancias como alcaloides, pigmentos, compuestos fenólicos, vitaminas y fitohormonas.

#### c) Desarrollo (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989 (c)).

El desarrollo de una semilla inicia con la fertilización del óvulo y sigue una serie de eventos embriogénicos que finalmente formarán una semilla.

Se distinguen cuatro etapas en el desarrollo de una semilla: 1) Histodiferenciación. En la cual se forma la semilla; 2) Maduración. Durante la cual el embrión alcanza su tamaño máximo y se acumulan la mayoría de los materiales de reserva; 3) Deseccación; 4) Quiescencia. La semilla está lista para germinar.

La maduración de las semillas está estrechamente relacionada con la desecación. La mayoría de las semillas maduras contienen de un 5 a un 10% de agua; el embrión es aparentemente tolerante a la desecación.

La mayoría de las semillas maduras (al final del segundo estado) no germinarán si no pasan por una etapa de desecación previa. Este cambio de comportamiento después de la desecación, está acompañado por un cambio en la naturaleza de las proteínas sintetizadas, por lo tanto el periodo de desecación parece ser en muchas semillas una etapa esencial para el desarrollo (Kermode & Bewley, 1986).



## Germinación.

### a) Definición.

La germinación fué definida por Evanari (1957) como un proceso limitado por la inanición de la hidratación y el inicio de la elongación radicular. Esta definición ha sido adoptada por aquellos fisiólogos que están de acuerdo en que una semilla ha germinado cuando su radícula ha atravesado los recubrimientos de la semilla y en el caso de los embriones aislados, cuando han empezado a elongarse.

Varios autores (Rollin, 1975; Tissacui and Côme, 1975) han mostrado que el proceso total de la germinación tiene lugar en tres fases sucesivas: imbibición, germinación *sensu stricto* y crecimiento.

Los primeros dos eventos, imbibición y germinación *sensu stricto* son considerados eventos tempranos de la germinación y el crecimiento como evento tardío.

La imbibición corresponde a la toma de agua por las semillas y está determinada por tres factores: la composición de la semilla, la permeabilidad de las cubiertas de la semilla y la disponibilidad de agua en el medio; la toma de agua es rápida durante los primeros sesenta minutos y ocurre tanto en semillas viables como en no-viables; después de este tiempo la actividad metabólica del embrión aumenta y el consumo de agua es por lo tanto resultado de esta actividad (Vertucci et al., 1987). El aumento de humedad reestablece la actividad fisiológica de organelos, entre ellos sistemas membranales, mitocondrias, núcleo, polisomas, macromoléculas, ácidos nucleicos y enzimas necesarias para que la respiración, la cual en semillas secas es mucho más lenta, se incremente produciendo por lo tanto el ATP necesario para los eventos germinativos y de crecimiento. La velocidad de entrada de agua es muy importante para que la reestructuración de los componentes del embrión sea de una manera ordenada y controlada, evitándo así daños durante el proceso (Duke, et al., 1986).

La germinación *sensu stricto* es la verdadera fase de germinación. Es un proceso de activación del embrión, el cual no está acompañado por ningún cambio morfológico aparente; más sin embargo, varios eventos ocurren, como síntesis de proteínas, de RNA y reparación del ADN nuclear.

El crecimiento está marcado por el principio de la elongación de la radícula y por un cambio significativo en el estado fisiológico que es resultado de la expansión celular, replicación del ADN y por lo tanto de las divisiones celulares y movilización de reservas (Osborne, 1983). En algunas semillas la división celular precede a la elongación, mientras que en otras se ha observado lo contrario (Berlyn, 1972).

Ha sido claramente mostrado (Côme, 1980/1981, 1982) que la germinación *sensu stricto* y el crecimiento son fenómenos de diferente naturaleza y que no involucran los mismos mecanismos regulatorios.

Cada uno de los eventos anteriormente nombrados presenta etapas potenciales de control, en las cuales pueden operar deferentes sistemas de regulación.

La fase crucial del proceso de germinación, es la germinación *sensu stricto*, ya que de esta fase depende que se pueda dar el crecimiento y finalmente se forme una planta.

El momento exacto en el cual termina la germinación y comienza el crecimiento es difícil de establecer; esto ha provocado diferencias en la definición de germinación, principalmente por que se asocia con la protrusión de la raíz en la semilla, el cual es en realidad un resultado del crecimiento.

Nuestro grupo de investigación considera a la germinación como todos los procesos que se llevan a cabo en una semilla desde la toma de agua (imbibición) hasta el momento previo a la aparición de las primeras divisiones celulares, es decir la germinación *sensu stricto*.

#### b) Proceso.

El que se dé o no la germinación y el cómo se dé está regulado tanto externa como internamente.

Externamente influyen factores ambientales apropiados, como la disponibilidad de agua, luz, oxígeno, algunos químicos y la temperatura. Estas condiciones varían de acuerdo con la especie y variedad de planta y están determinadas tanto por las condiciones que prevalecieron durante la formación de la semilla como por factores hereditarios.

Internamente la germinación está influenciada por los siguientes controles:

• **Genético:** Selección de la información que se va a expresar.

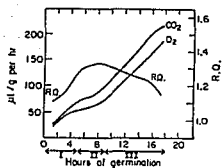
• **Organismico:** Mediado por estímulos generados como resultado de la organización que han alcanzado las células en un organismo; • **Otros controles:** Capacidad de respuesta de las células a diferentes estímulos, balance entre las concentraciones de sustancias estimuladoras e inhibidoras (fitohormonas) externas e internas en su sitio de acción.

La germinación es un proceso complejo que involucra la interacción de varios tejidos diferentes y de distintos procesos bioquímicos y biofísicos en estos mismos tejidos.

#### c) Metabolismo durante la germinación.

Inicialmente las semillas durante la imbibición pierden muchas sustancias incluyendo electrolitos, compuestos de bajo peso molecular y aún proteínas. Esta pérdida cesa gradualmente, debido aparentemente a la reparación de las membranas celulares (Marbach & Mayer, 1985).

El metabolismo y por lo tanto la tasa de respiración de una semilla seca es muy bajo y aumentan paulatinamente mientras la semilla se va hidratando (figura # 2) (Spragg & Yemm, 1959). La germinación es un proceso que requiere energía y es por lo tanto dependiente de la respiración. Este proceso es fácilmente observable durante la germinación.



**Figura #2.** Tasa de respiración y cociente respiratorio (RO) de semillas de trigo germinando a 20°C. I, II, III - Diferentes estados de respiración, los cuales se relacionan con los estados de hidratación  $\text{ml H}_2\text{O/g hr}$ . (Levari, 1960).

#### d) Metabolismo de los Ácidos Nucleicos durante la germinación.

##### ADN

Las propiedades del ADN aislado de semillas secas difiere del extraído de embriones germinados (Chen & Osborne, 1970). El ADN de las semillas secas es muy resistente a condiciones adversas como calor o deshidratación. Poco se sabe hasta ahora de sus propiedades.

La relación histonas/ADN cambia durante la germinación en embriones de cacahuete (Grellet et al., 1977); estos cambios podrían estar relacionados con los cambios propuestos en la actividad transcripcional durante la germinación.

Durante la germinación se presentan también cambios cuantitativos y cualitativos de proteínas no-histonas en la cromatina.

Aunque la síntesis duplicativa del ADN se detecta primordialmente tarde durante la germinación, (aproximadamente a las 15 horas después del inicio de la imbibición en ejes embrionarios de maíz (Vázquez-Ramos & López, 1987)), se observa una síntesis apreciable de ADN anterior a la síntesis de proteínas (Mary et al., 1972). Esta síntesis temprana es debida a la reparación del ADN que se dañó durante el almacenaje de las semillas (Osborne et al., 1984; Vázquez-Ramos & Osborne, 1986; Elder et al., 1987). Por ésta razón esta reparación inmediatamente después de la imbibición, es de gran importancia en los procesos posteriores de división celular y crecimiento.

Esta reparación involucra la actividad de una ADN-ligasa, esta actividad aumenta muy rápido inmediatamente después de la imbibición en embriones frescos de arroz y es la misma que posteriormente trabaja durante la duplicación del ADN (Elder et al., 1987). Además, durante la germinación se incrementa la actividad de la ADN-polimerasa.

##### ARN

Las semillas maduras contienen ARN mensajeros de larga vida formados durante la embriogénesis, cuya traducción no se llevó a cabo en ese momento, probablemente por regulación hormonal (Ihle & Dure, 1972). Algunos de estos ARN mensajeros almacenados son degradados rápidamente, mientras que otros son traducidos (Dommes & Van de Walle, 1983).

Sólo unas pocas enzimas de las involucradas en el metabolismo del ARN han sido estudiadas en detalle. Una de ellas la ARN-polimerasa parece estar presente en semillas secas, y se ha encontrado que su actividad aumenta anteriormente a la síntesis de ARN en la germinación (Sugita, & Sasaki, 1982).

La síntesis de ARN y la formación de polisomas ocurren muy temprano durante la germinación (Waters, & Dure, 1966).

Otras formas esenciales de ARN para la síntesis de proteínas como ARN ribosomales y ARN de transferencia se encuentran en semillas secas y son formados también muy rápidamente en el inicio de la germinación (Galau, & Dure, 1980/81).

Se ha demostrado que durante la germinación se aumenta la actividad de las aminoacil-tARN sintetasas (Anderson & Powden, 1970).

#### e) Metabolismo de proteínas durante la germinación.

Sánchez-Martínez *et al.*, (1986) siguieron la regulación de la expresión genética en embriones en desarrollo de maíz desde los veinte días después de la polinización hasta la total maduración y durante los estados tempranos de la germinación. Ellos identificaron tres grupos de polipéptidos:

==Polipéptidos presentes en el embrión en desarrollo, algunos de los cuales no pueden ser detectados en semillas maduras secas, mientras otros persisten aún durante las primeras dos horas de imbibición y desaparecen después de ocho horas.

==Polipéptidos ausentes en embriones jóvenes, pero que se formaron durante su maduración. Algunos de estos son de vida corta y no se encuentran en la semilla seca, mientras otros persisten por diferentes tiempos durante las etapas iniciales de la germinación.

==El grupo de polipéptidos que están ausentes en el embrión en desarrollo y en la semilla seca y están presentes solamente durante la germinación.

Pero, ¿cuáles son las señales que determinan que los ARN mensajeros pre-existentes sean o no traducidos y cuales las que promuevan la transcripción y traducción específica de genes de germinación?. No se conoce aún, pero, hay evidencias que indican que el paso de desecación previo a la imbibición juega un papel importante para el cambio en el patrón de síntesis de proteínas de uno de proteínas de reserva a aquél de proteínas características de la germinación (Bewley, 1982; Kermodo et al., 1986).

## **Fitorreguladores.**

Las células de vegetales superiores son capaces de interactuar de diversas formas; estas interacciones son mediadas por diferentes mensajeros químicos, como los fitorreguladores (Letham, 1978).

### **a) Definición.**

Los fitorreguladores o fitohormonas son compuestos que se comportan como activadores, inhibidores y/o comunicadores que actúan generalmente de manera indirecta regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo vegetal de modos específicos y a muy bajas concentraciones (Moore, 1979).

Estos compuestos son moléculas relativamente simples, particularmente comparadas con los esteroides activos en tejidos animales. Contienen relativamente muy poca información intrínseca como para ejercer el amplio espectro de efectos que han sido observados en la germinación y en el metabolismo vegetal, por lo que se piensa que deben interactuar con otras moléculas y modificarlas, generando cascadas de eventos que finalmente produzcan respuestas pleiotrópicas; aunque algunas pueden actuar directamente a nivel genético, como inductores o represores de la transcripción de algunos genes.

Las fitohormonas tienen diferentes efectos en distintos tejidos, a diferentes tiempos y concentraciones, por lo que su disponibilidad en determinado momento se relaciona con su actividad; esta disponibilidad está regulada de diversas maneras: por síntesis, por transporte hacia o desde un

lugar, por modificaciones, almacenaje o destrucción. Así que los efectos de los fitorreguladores están mediados por el metabolismo y por la capacidad de las células para responder a estos en determinado momento. Esta capacidad de respuesta depende de la sensibilidad de las células y puede variar durante el desarrollo y como respuesta a señales externas (Trewavas, 1982).

Existe suficiente evidencia para establecer que las fitohormonas son muy importantes para el control de la germinación.

Las fitohormonas consideradas como inductoras o inhibidoras de la germinación de semillas son las auxinas, giberelinas, ácido abscísico (ABA), citocininas y el etileno (Figura #3).

Se han reportado proteínas que unen a las fitohormonas específicamente, estas proteínas podrían actuar como sus receptores (Libbeng et al., 1985; Stoddart, 1986; Hornberg & Weller, 1984; Venis, 1985; Hall, 1986).

La búsqueda del mecanismo molecular por el cual estas fitohormonas actúan, ha llevado al encuentro de otras moléculas involucradas en su acción de lo cual se han desarrollado dos propuestas:

Una es que las poliaminas, las cuales se incrementan en tejidos de plantas tratadas con auxinas, giberelinas y citocininas, podrían actuar como "segundos mensajeros" de estas hormonas (Galston, 1983).

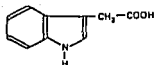
La segunda propuesta es que la pequeña proteína calmodulina esté de alguna manera involucrada en el mecanismo de acción de las hormonas, esta proteína cuando forma complejos con calcio, estimula la actividad de una gran cantidad de enzimas de células eucarióticas. En plantas esta proteína se ha encontrado en el citoplasma, cloroplastos y en el núcleo asociada a la cromatina (Jarrett et al., 1982; Matsumoto et al., 1983).

Han comenzado a surgir reportes que relacionan al complejo calcio-calmodulina con la secuencia de eventos entre la acción primaria de las fitohormonas y la expresión morfológica de los efectos reguladores hormonales. Sin embargo, se necesita más investigación para definir claramente la intervención del complejo calcio-calmodulina en el mecanismo hormonal en las plantas.

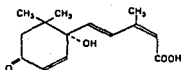




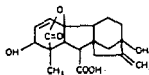
Etileno



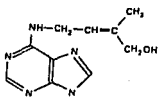
Acido indolacético (IAA)



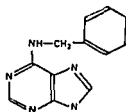
Acido abscísico (ABA)



Acido giberélico. GA<sub>3</sub> (Giberelina 3).



Zeatina (Citocinina natural)



6 - bencil amino purina (BA)  
(Citocinina sintética)

**Citocininas.**

**Figura #3.** Sustancias que actúan como fitohormonas.

## b) Generalidades, síntesis y localización.

### Auxinas:

La auxina más importante es el ácido indolacético (IAA), el cual se sintetiza de varias maneras, iniciando con la ruta del shikimato (Miflin & Lea, 1977), por síntesis *de novo* del anillo indol (Mockaitis *et al.*, 1973), o a partir de triptofano, con la triptamina y el indol-3-acetaldehído como intermediarios (Miflin & Lea, 1977).

El IAA en las semillas se encuentra libre y conjugado formando ésteres: arabinósido de IAA, IAA-mio-inositol, arabinósido de IAA-mio-inositol (Epstein, *et al.*, 1980). Estos compuestos son considerados como precursores del IAA activo, el cual durante la germinación es liberado enzimáticamente y probablemente transportado a la punta del coleoptilo. El IAA libre y el IAA-inositol son metabólicamente interconvertibles (Hangarter & Good, 1981).

El nivel de IAA en las semillas es regulado por transporte desde el endospermo, hidrólisis de los conjugados y por su oxidación; además de sintetizarse *de novo* durante la germinación.

### Giberelinas:

Las giberelinas son una gran familia de ácidos diterpénicos; hasta ahora se conocen 72 diferentes giberelinas de las cuales 61 han sido encontradas en plantas superiores y más de la mitad en semillas (Albone, *et al.*, 1984). Además se han identificado una gran cantidad de sus conjugados. El nivel de giberelinas fluctúa durante el desarrollo de una semilla, así que es difícil relacionar directamente el desarrollo con un nivel dado de giberelinas.

Su síntesis ha sido bien estudiada; existen tres rutas separadas para su síntesis que comprenden diferentes giberelinas intermediarias, de las cuales algunas son activas y otras no (Crozier, 1983). Las semillas tienen la capacidad de interconvertir las diferentes giberelinas; esto les permite regular el nivel de giberelinas activas cuando sea necesario.

Las giberelinas más activas en plantas superiores son GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>.

### Citocininas:

Las citocininas se definen como aquellos compuestos que en presencia optima de auxinas, inducen la división celular o citocinesis, de donde se deriva su nombre (Miller et al., 1955).

La primera citocinina identificada fué la zeatina, extraída de semillas de maíz (Letham, et al., 1964). Las citocininas hasta ahora caracterizadas son adeninas sustituidas: zeatina, isopentenil adenina, isopentenil-adenosina y sus derivados; estos se encuentran como conjugados: De ribosa: ribosil-zeatina, ribosil-dihidrozeatina (ZHR); de glucosa: glucósido de zeatina; y de ambos azúcares: ribosil-zeatin-glucósido. Otras más son producto de la reducción de la zeatina, como la dihidro-zeatina.

En el metabolismo de las citocininas hay dos enzimas principales: la AMP-A<sup>3</sup>-isopentenil-transferasa o citocinin-sintetasa que actúa durante su síntesis y la citocinin-oxidasa que interviene en la degradación de la zeatina a adenina y adenosina (Whitty & Hall, 1974).

Los sustituyentes O-glucosídicos de las formas conjugadas evitan la degradación por la citocinin-oxidasa de la cadena isoprenoide sustituyente (Parker et al., 1978).

Las citocininas son interconvertidas de sus formas inactivas (conjugadas) a sus formas activas por mecanismos desconocidos (Van Staden, 1973) y el equilibrio entre estas difiere en diferentes estados del desarrollo (Hewett & Waring, 1973).

Además se han identificado algunas citocininas en algunos tipos de ARN de transferencia de los que se liberan por hidrólisis (Burrows et al., 1971).

Existen derivados sintéticos de la cinetina donde el grupo furfurilo es remplazado por otros grupos, como la benciladenina, los cuales tienen también actividad de citocininas.

Las citocininas son secretadas por el eje embrionario (Ilan & Gepstein, 1981).

Los niveles de citocinas se incrementan marcadamente durante el desarrollo de las semillas, principalmente cuando los tejidos están creciendo muy activamente (Pinfield, & Stobart, 1972). Este efecto es consistente con la idea del papel de estas en el control del crecimiento celular.

#### ABA (ácido abscísico):

La presencia de ABA ha sido reportada en muchas semillas y frutas. Ha sido obtenido también de diferentes semillas inmaduras, en forma libre y conjugada como glucosil-éster y glucósido. Tanto la forma libre como las formas conjugadas se encuentran en el embrión y en el endospermo (Millborrow, 1974).

Su concentración aumenta durante el desarrollo de la semilla, alcanzando uno o dos picos, y declina rápidamente durante la desecación de la semilla.

La ruta de síntesis involucra la transformación de ácido mevalónico e isopentenil-pirofosfato a ABA (Popják & Cornforth, 1966).

El metabolismo de ABA es complejo y comprende su conjugación, su interconversión y degradación (Walton, 1980/81).

#### Etileno:

Las semillas son capaces de producir etileno; su producción aumenta durante la imbibición. Su síntesis se lleva a cabo teniendo como precursor metionina, la cual es convertida a S-adenosil metionina y posteriormente a ácido 1-amino ciclopropano-1 ácido carboxílico (ACC) por la ACC-sintetasa; este ACC es el intermediario inmediato del etileno (Adams & Yang, 1979).

El etileno es metabolizado en las semillas, pero no es claro si este metabolismo es indispensable para que pueda actuar como una hormona (Sanders et al., 1986).

#### c) Efectos de los fitorreguladores.

##### Auxinas:

Los efectos de hormonas del tipo IAA en la germinación han provocado desde hace tiempo controversia. Numerosos estudios han proporcionado

resultados ambiguos, observándose estimulación o inhibición dependiendo de la concentración de IAA y del tipo de semilla usada.

Las auxinas se caracterizan por su habilidad de promover la elongación de embriones crecidos en la oscuridad.

Según Jones y Prasad, 1992; durante los primeros minutos después del tratamiento con auxinas se aprecian dos respuestas medibles. Una de estas es la acidificación del espacio intermedio entre la pared celular y la membrana plasmática, esta acidificación está estrechamente correlacionada con los cambios en la extensibilidad de la pared celular. La otra respuesta rápida es un cambio en el nivel de algunos transcritos. Ambos procesos son importantes para la elongación:

**Cambios en la pared celular:** El mecanismo bioquímico de ruptura de la pared celular durante la elongación no es claro; sin embargo, las auxinas modulan la actividad de la ATPasa asociada a membrana. La inducción de esta actividad tiene dos consecuencias: Hiperpolarización de la membrana, y la disminución del pH del espacio entre la pared celular y la membrana plasmática; esta acidificación puede provocar la ruptura de la pared celular por dos mecanismos:

a) Que los protones directamente rompan los enlaces sensibles a pH bajo con o entre los polímeros de la pared.

b) Que la disminución del pH active enzimas hidrolíticas que rompan estos enlaces.

Ninguna de estas suposiciones pueden ser apoyadas por evidencia experimental directa.

**Activación genética:** El segundo efecto inmediato de las auxinas es la estimulación de la transcripción de algunos genes; este efecto puede tener como finalidad mantener la pared celular para evitar adelgazamientos de esta durante la elongación, esto podría llevarse a cabo a través de la síntesis de enzimas importantes en el metabolismo de la pared celular, y de otras proteínas como: proteínas ribosomales, protein-quinasas, calmodulina, proteínas de unión a auxinas (ABP's), etc.

En la mayoría de los casos el papel de estas proteínas en el crecimiento se desconoce; sin embargo, las características de las secuencias que codifican para algunos de estos mensajes los agrupan en una familia de genes involucrados en el crecimiento mediado por auxinas, los cuales se han denominado SAUR (pequeñas secuencias estimuladas por auxinas).

Es probable que además del crecimiento celular, algunos de estos genes estén también involucrados en otros eventos como citocinesis y diferenciación celular (Gee *et al.*, 1991; Van der Zaal *et al.*, 1987).

Jones & Prasad (1992) explican la diversidad de los fenómenos desencadenados por el tratamiento con auxinas mediante la acción de receptores específicos, uno nuclear y otro localizado en la membrana plasmática que desencadena la acidificación de la pared celular.

La anterior hipótesis se apoya en el descubrimiento de dos proteínas de unión a auxinas (ABP) que pueden actuar como sus receptores, una de 22-kilodaltones (kDa) que se localiza preferencialmente en el retículo endoplásmico y en membrana plasmática; y otra proteína de 65-kilodaltones que tiene una localización nuclear.

En la elongación pueden participar ambas ABPs, mientras que en la maduración y diferenciación puede estar involucrada la ABP de 65-kDa principalmente. Esto hace pensar también en una modulación de la respuesta por fluctuaciones en la cantidad y localización de receptores.

Hay una interrelación entre el calcio y el mecanismo de acción de las auxinas ya que la concentración endógena de calcio está regulada por éstas. La aplicación exógena de auxinas provocan la salida de calcio de los microsomas hacia el citoplasma, lo que produce un cambio en la velocidad de las reacciones dependientes de calcio y calcio-calmodulina (proteína acarreadora de calcio).

#### Giberelinas:

El ácido giberélico estimula la germinación de las semillas en la oscuridad (Khan *et al.*, 1956). Aunque los efectos del ácido giberélico (GA) parecen ser similares a aquellos producidos por la luz, algunas evidencias apoyan la idea de que su modo de acción no es idéntico (Ikuma & Thimann, 1960).

Las giberelinas son capaces de romper la latencia en algunas semillas. Durante la interrupción de la dormancia, se ha reportado frecuentemente un aumento en el nivel de giberelinas (Frankland & Wareing, 1966).

El tratamiento de semillas de cereales con GA induce rápidamente la hidrólisis de almidón en el endospermo, la hidrólisis de proteínas en la capa de aleurona y la aparición de fosfato libre (Paley, 1962).

Por mucho tiempo el punto de vista aceptado del modo de acción de las giberelinas en la germinación de cereales era que estos compuestos son transportados del escutelo o del eje embrionario a la aleurona donde es percibido a nivel de membrana plasmática, de aquí se transfiere la información por transducción de señales para que finalmente se desencadenen los diferentes efectos en las células; entre los principales efectos encontrados se encuentra la estimulación de la síntesis de enzimas específicas activas durante la germinación (Weiler & Wleczorek, 1981).

De entre las enzimas estimuladas por el tratamiento con GA, la  $\alpha$ -amilasa ha sido la más estudiada. El trabajo de Varner et al., (1965) llevó al importante descubrimiento de que GA controla la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa; este efecto es a nivel transcripcional, ya que puede suprimirse con inhibidores de la síntesis de ARN.

Posteriormente, se encontró que las giberelinas eran sintetizadas en la aleurona también en respuesta a algún factor originado en el embrión (Jacobsen & Chandler, 1987).

Ou-Lee et al., (1988) demostraron la presencia de un factor originado en el embrión por el tratamiento con GA que se une a una región promotora del gen de la  $\alpha$ -amilasa; esta región está conservada entre diferentes especies de plantas y se propone que de esta manera el tratamiento con GA promueva la expresión de este gen y finalmente la estimulación de la cantidad de  $\alpha$ -amilasa.

Pollard en 1969 estudió la aparición secuencial de varias actividades enzimáticas como efecto del tratamiento con GA. Enzimas como la  $\beta$ -1,3-glucanasa, la fosfo-monoesterasa, la ATPasa y otras se vuelven activas antes del inicio de la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa; este aumento en la actividad es independiente de la síntesis de proteínas. En estos casos, el efecto de GA<sub>3</sub> puede ser mimetizado por AMP<sub>c</sub> (Newton & Brown, 1986), lo que apoya la hipótesis del mecanismo por transducción de señales.

Debe subrayarse que si bien la formación de la  $\alpha$ -amilasa es un marcador conveniente para identificar el efecto de GA y ha sido usada para esclarecer la naturaleza de los efectos inducidos por esta hormona, la síntesis de  $\alpha$ -amilasa ocurre después de la germinación.

No obstante, las giberelinas, endógenas o exógenas son consideradas como factores necesarios en la inducción de la germinación, aunque su papel exacto no esté aún entendido.

#### Citocininas:

Miller en 1958 mostró que la cinetina promueve la germinación de semillas. Posteriormente se aisló y caracterizó una citocinina natural de semillas de maíz (zeatina), que actuaba de la misma manera que la cinetina (Letham et al., 1964). Los ribótidos y ribósidos de zeatina presentes en semillas, son menos eficientes en la estimulación de la germinación que la zeatina libre (Van Staden, 1973).

En el caso de semillas de manzana el aumento en el nivel de citocininas coincide con el inicio de la liberación de la latencia (Kopecky et al., 1975), ABA antagoniza este efecto.

Algunos efectos provocados por las citocininas son:

- Inducen la iniciación del brote meristemático e inhiben la formación de raíces adventicias.
- Provoca un aumento en el contenido total de proteínas Klämbt, (1976). Trabajando con cotiledones de pepino, Gwózdź (1979) sugiere que el mecanismo por el cual las citocininas estimulan la síntesis de proteínas es a nivel traduccional, activando a los polirribosomas anteriormente formados o incrementando su número al aumentar la afinidad de los ribosomas por el templado. En cotiledones de frijol se ha observado un aumento en la cantidad de algunas enzimas como la isocitrato-liasa y enzimas proteolíticas (Penner & Ashton, 1967).
- Incrementa la actividad específica de algunas enzimas como: Endopeptidasas, pirofosfatasa, fosfoenol-piruvato-carboxilasa



(Karavalko et al., 1978), ribulosa-bifosfato-carboxilasa (Harvey et al., 1974), ARN-polimerasa (Kulaeva, 1981), ADN-polimerasa (Vázquez-Ramos & Reyes, 1990).

- Produce un aumento en la cantidad de ácidos nucleicos.

ADN: En cortes de raíces de cacahuete se observa un aumento en el contenido de ADN previo a la división celular con la subsecuente citodiferenciación (Simpson & Torrey, 1977; Simard, 1971; Tsuji et al., 1979); en ejes embrionarios de maíz tratados con benciladenina se advierte un aumento en la cantidad de ADN total por célula (Vázquez-Ramos & Reyes, 1990).

ARN: El tratamiento provoca un aumento en todas las especies de ARN: ribosomal, mensajero y de transferencia (Mathysse & Abrahams, 1970), aumentándose por lo tanto la cantidad de polirribosomas (Muren & Fosket, 1977).

Retarda la senescencia; la primera indicación de senescencia o deterioro vegetal es la disminución en el contenido de ARN (Osborne, 1962; Naito et al., 1978). La acción primaria de la bencil-adenina (citocinina sintética), es mantener o incrementar el contenido de ARN retardando de esta manera la senescencia (Yokoyama et al., 1980).

- Estimulación de la transcripción de algunos genes como aquellos que codifican para la subunidad pequeña de la ribulosa-bifosfato-carboxilasa (rbcS) y cab que codifica para las proteínas de unión a Clorofila a y b.
- Estimula el número de cloroplastos por célula, su diferenciación y la síntesis de clorofila (Fletcher & McCullagh, 1971; Tsuji et al., 1979).

Las citocininas son reconocidas como factores involucrados en la división celular (Fosket & Short, 1973). El tratamiento con citocininas induce la entrada a mitosis de células de meristemas apicales de *Sinapis alba*, (Bernier et al., 1977).

Su modo de acción en el control de la división celular no se conoce aún.

Originalmente se pensó que la cinetina sustitua a la luz roja en la germinación. Posteriormente se demostró que sensibiliza a las semillas, de manera que una pequeña dosis de luz pueda inducir su germinación.

Además de la interacción con la luz, las citocininas también interactúan con otros compuestos aplicados exógenamente como ABA, GA, etileno y auxinas.

Se han sugerido algunos posibles mecanismos de acción de las citocininas. En base a su presencia en algunos ARN de transferencia, se ha sugerido que actúan controlando el metabolismo proteico a nivel traduccional, pero la evidencia está lejos de ser convincente (Skoog & Armstrong, 1970; Thomas, 1977). Otra sugerencia involucra un efecto sobre el AMP<sub>c</sub> o en la permeabilidad de membranas (Thomas, 1977). Desafortunadamente ninguna de estas sugerencias contesta la pregunta de cuál es el mecanismo por el cual actúan las citocininas y cuáles son sus sitios de acción.

#### ABA:

Existe una correlación inversa entre la concentración de ABA en el embrión de frijol de soya y su habilidad para germinar (Walton, 1980/81). Los efectos de ABA son dependientes de su presencia continua.

Cuando ABA es aplicada exógenamente previene la germinación de semillas de muchas especies.

La mayoría de las semillas en desarrollo no germinarán hasta que el proceso de desecación se lleve a cabo; esta desecación coincide con una disminución considerable en el nivel de ABA. Si el contenido de ABA es reducido artificialmente por lavado de los embriones, estos son capaces de germinar y el porcentaje de germinación estará correlacionado con el tiempo de lavado (Ackerson, 1984).

ABA induce la síntesis de proteínas de reserva e inhibe la síntesis de carboxipeptidasa C, la cual es considerada como una "enzima específica" de la germinación (Dure, 1985). Aunque ABA no parece ser la señal crítica que determine el apagado de los genes responsables del desarrollo, se

ha sugerido sin embargo, que previene la germinación prematura de embriones durante su desarrollo (Dure, 1985).

ABA interactúa con otros fitorreguladores, particularmente con citocininas y ácido giberélico (GA). Cuando la capa de aleurona de embriones de cebada es tratada con ABA, la síntesis de la mayoría de las proteínas inducidas por GA es bloqueada, pero también se induce la formación de muchos nuevos polipéptidos. ABA bloquea la acumulación de ARN mensajero de la  $\alpha$ -amilasa (Higgins et al., 1977). Ahora es claro que GA y ABA regulan la síntesis de  $\alpha$ -amilasa.

ABA controla negativamente la cantidad de la subunidad pequeña de la Rubisco (ribulosa-bisfosfato-carboxilasa) a nivel transcripcional, y es necesario en embriones inmaduros de trigo para mantener el gen *rbc* silenciado; esta inhibición no es anulada por luz lo que indica que la represión mediada por ABA involucra un mecanismo diferente al de la activación de estos genes por luz.

Los efectos de ABA en el metabolismo son variados. Hay evidencia que sugiere que ABA interfiere con el metabolismo de los ácidos nucleicos -ADH y ARN- (Villiers, 1968). La síntesis de proteínas por sí misma no es directamente inhibida por ABA (Ihle & Dure, 1972).

Además, ABA produce efectos en la transpiración, ya que inhibe la apertura de estomas (Tucker & Mansfield, 1971).

La inhibición de la síntesis de algunos sistemas enzimáticos por el tratamiento con ABA no parece suficiente para explicar el efecto de inhibición de la germinación. Aparentemente la síntesis de algunas proteínas clave está siendo suprimida.

La idea de que ABA es responsable de encender o apagar genes que regulan la latencia se ha sugerido repetidamente. Esto se apoya en la comprobación de que la deshidratación durante los estadios tardíos del desarrollo de las semillas está acompañada por la acumulación de ABA.

Parece ser que ABA juega un papel importante en la habilidad de las plantas para regular cambios en la expresión genética en respuesta a la pérdida de agua, ya que muchos de los genes expresados en tejidos marchitos se expresan también durante los estadios tardíos de la embriogénesis, cuando el nivel de ABA aumenta. Estudios de secuenciación de proteínas sugieren que estos genes codifican para polipéptidos que protegen a los tejidos de plantas durante periodos de pérdida de agua.

Durante el estrés salino y el de bajas temperaturas, se elevan los niveles de ABA endógena, aunque a menor nivel que el observado después de la deficiencia de agua, por lo que ABA puede ser un mediador común para la inducción de la expresión genética en respuesta a diferentes presiones ambientales (Hasson, & Poljakoff-Mayber, 1980/81).

ABA también actúa en la regulación de la movilización de iones cambiando los potenciales de membrana, ya que inhibe la extrusión de protones y la toma de iones potasio (Denti & Cocucci, 1979).

#### Etileno:

El conocimiento del papel del etileno en la germinación de semillas es muy pobre.

El etileno tiene un amplio rango de efectos, desde unos fuertemente estimulantes hasta otros muy inhibitorios. De manera general se le clasifica como una hormona inhibitoria, pero aunque no se conocen totalmente sus efectos, estos son tan variados que desafía una clasificación superficial.

Durante la imbibición la producción de etileno aumenta. Se ha observado que el etileno estimula la germinación de algunas especies (Esashi, 1976); estimula la maduración de frutos y la abscisión o deterioro de las hojas. Estos efectos parecen ser el resultado de la estimulación de algunos procesos de síntesis, así que sus efectos inhibitorios pueden deberse en gran parte a un efecto de estimulación en la síntesis o actividad de enzimas hidrolíticas (Ketring, 1977).

El etileno afecta el nivel de otras hormonas y a su vez su producción puede ser afectada por ellas; se sabe que el IAA estimula la producción de etileno (Liebermann, 1979). Existe una serie de interacciones intrincadas entre el etileno, otras hormonas y factores ambientales (Schonbeck & Egley, 1980).

El etileno inhibe la elongación de tallos y promueve el crecimiento de raíces. Esta inhibición está acompañada por la inhibición de la biosíntesis de GA<sub>1</sub> (la giberelina más activa); sin embargo, no se sabe si esta inhibición es resultado de un efecto directo o indirecto del etileno. El tratamiento de hipocotilos de maíz con etileno inhibe el crecimiento, esta inhibición no puede ser explicada totalmente por la disminución en la cantidad

de giberelinas, ya que al agregar giberelinas activas a hipocotilos tratados con etileno el efecto inhibitorio se revierte sólo parcialmente (Pearce et al., 1991).

Se ha demostrado la existencia de una protefina de membrana que une etileno y se ha sugerido que podría actuar como su receptor, aunque esto no ha sido comprobado.

### Interacción Hormonal.

La investigación en germinación, indica que los niveles de los fitorreguladores varían antes y durante la germinación. El balance o interacción de las fitohormonas, más que la suma de sus acciones individuales, es lo que determina el desarrollo integral de una planta (Trewavas, 1982).

Todo el problema de la síntesis, modo y sitio de acción de las fitohormonas no está ni por mucho resuelto, pero la relevancia de este tema en la germinación es obvia.

### Ciclo Celular.

El ciclo de división celular eucariótico constituye una serie de procesos interrelacionados que se han desarrollado para crear dos células hijas genéticamente idénticas de una célula madre.

La función principal de este ciclo es la replicación fiel del genoma y su empaquetamiento en los cromosomas.

El ciclo celular puede ser dividido en cuatro fases:  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$  y  $M$ . En la fase  $G_1$ , o fase de "gap" o brecha, que comienza inmediatamente después de una división celular, no se observa ninguna modificación citológica, aunque se realizan diversos procesos preparativos para entrar a la fase  $S$ , o fase de síntesis, que es el estado de mayor actividad sintética, durante el cual se duplica el ADN; después de esta sigue la fase  $G_2$ , donde diferentes procesos metabólicos y de crecimiento se llevan a cabo, a la vez que los preparativos para la entrada a mitosis ( $M$ ), etapa de división celular. Las fases  $G_1$ ,  $S$  y  $G_2$ , constituyen la interfase.

En ciertas condiciones, las células no son estimulables, y permanecen en un estado de reposo o  $G_0$ . Para que las células salgan de este estado, es necesario que sean modificadas por factores de crecimiento.

La síntesis de macromoléculas como ADN, ARN y proteínas, está regulada de un modo característico durante el ciclo celular. El ADN y las histonas componentes de la cromatina se sintetizan sólo durante la fase S y no durante las fases  $G_1$  o  $G_2$ . En contraste, el ARN, las proteínas citoplasmáticas y los organelos son sintetizados continuamente durante toda la interfase. Sin embargo, durante la mitosis cesa toda síntesis de ADN, ARN y la síntesis proteica se reduce considerablemente.

La sucesión de las diferentes fases del ciclo celular necesitan de la acción de diversos factores reguladores que gobiernan el paso y tiempo por las diferentes etapas.

Los estudios sobre la regulación del ciclo celular se han concentrado en eventos rápidos post-traduccionales, en particular fosforilaciones y desfosforilaciones. Es claro que los procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas son los mecanismos principales que controlan o asisten una variedad de eventos en la interfase y en mitosis (Chiatante et al., 1987; Trewavas & Blowers, 1990).

La mayor parte del conocimiento de la regulación del ciclo celular viene de estudios hechos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse, 1990). Sin embargo, datos recientes han mostrado la existencia de un mecanismo universal de control común a todas las células eucarióticas. Un participante importante en este mecanismo es un complejo proteico llamado cinasa de la fase M que tiene una actividad de serin-treonin-cinasa; está formado por una fosfoproteína llamada ciclina y otra fosfoproteína con actividad catalítica llamada p34<sup>cdc2</sup> con un peso molecular de 34 KDa. Este complejo proteico es activado en las fases mitótica y meiótica.

La cinasa de la fase M tiene diferentes nombres dependiendo del sistema en que se ensaya su actividad; MPF o factor promotor de la meiosis, nombrado así por estimular a los oocitos de *Xenopus* para entrar a meiosis o cinasa de H1 porque fosforila a la histona H1 *in vitro*.

Una característica importante de la subunidad catalítica del complejo es su alto grado de conservación entre especies filogenéticamente distantes. Los genes *cdc2* de *S.pombe* y su contraparte en *S.cerevisiae*, *CDC28*, son funcionalmente intercambiables (Beach., 1982); más aún, el homólogo humano

de *cdc2* puede complementar una mutante *cdc2* defectuosa de *S.pombe* (Lee & Nurse, 1987). La secuencia de aminoácidos de todos los homólogos funcionales de *cdc2* muestran regiones de conservación total, las cuales son probablemente esenciales para su interacción con otros componentes de la maquinaria del ciclo celular.

El producto del gen *cdc2/CDC28* tiene una función central en la regulación del progreso del ciclo celular. Es requerido en los puntos de decisión de las fases *G<sub>1</sub>* y *G<sub>2</sub>*, para la entrada a *S* y *M* respectivamente (Nurse & Bisset, 1981).

La subunidad p34 es por sí misma una cinasa en condiciones *in vitro*; *in vivo* su actividad está regulada por interacciones con diferentes proteínas y por diferentes modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones y desfosforilaciones en sitios particulares y dependientes del ciclo celular.

Entre las proteínas que interaccionan con esta proteína se encuentran:

- a) **Las Ciclinas.** Estas proteínas fueron primeramente identificadas por su acumulación característica durante la interfase, seguida por una destrucción abrupta en la mitosis (Draetta et al., 1989); actúan como subunidad reguladora para la activación de la cinasa y para la selección apropiada de sus sustratos (Murray & Kirschner, 1990).

Las ciclinas son también fosforiladas para regular tanto su asociación como la actividad de p34<sup>cdc2</sup> (Félix et al., 1990).

Las ciclinas se clasifican en tipo A (tres diferentes), B (dos diferentes), C, D, y E; debido a diferencias a nivel de secuencia, localización subcelular, tiempo de acumulación, de destrucción y por su participación en diferentes tiempos durante el ciclo celular (Minshull et al., 1990; Hunt, 1991).

- b) El producto del gen *sucl* en *S. pombe*, interacciona físicamente con p34<sup>cdc2</sup> y esta interacción contribuye a regular su actividad; además el producto de *sucl* parece ser necesario para la salida de *M* (Nurse, 1990).

- c) El producto del gen *wee1* es una proteína-cinasa que funciona como inhibidor de la actividad de p34, al fosforilarla (Russel & Nurse, 1987). El producto de *mik1* es también una cinasa que actúa como homólogo redundante de *wee1* (Lundgren et al., 1991).
- d) El producto del gen *cdc25* (p80), el cual es un inductor de la mitosis dosis dependiente, que funciona en oposición a los productos de *wee1* y *mik1* (Lundgren et al., 1991), activa a p34 durante la transición G<sub>2</sub>/M al desfosforilar directamente sus residuos; parece ser que interactúa físicamente con la ciclina B y promueve así la desfosforilación de p34<sup>cdc2</sup> (Millar & Russell, 1992).
- e) El producto del gen *nima* tiene actividad de cinasa y fosforila al producto del gen *wee1* y lo inhibe; por lo tanto *nima* revierte la inhibición de la actividad de la cinasa p34 por el producto de *wee1*.

Durante el ciclo celular de animales y para que la división celular se inicie se necesita la activación de diferentes cinasas, las cuales van a actuar desencadenando diferentes respuestas. La cantidad de proteína p34<sup>cdc2</sup> es constante a lo largo del ciclo celular, las proteínas ciclinas las cuales se acumulan sólo durante la interfase van a ser fosforiladas y estas fosforilaciones van a estimular su asociación con p34<sup>cdc2</sup>. Dependiendo de la etapa del ciclo celular, esta asociación se llevará a cabo con ciclinas tipo B (durante G<sub>2</sub>/M) o bien con ciclinas E o ciclinas A (durante G<sub>1</sub>/S); esta unión va a provocar la fosforilación de p34 en diferentes sitios dependiendo de la ubicación de la célula dentro del ciclo celular. Durante G<sub>1</sub> va a estar principalmente fosforilada en serina-277; esta fosforilación disminuye marcadamente al avanzar la célula hacia la fase S. Al llegar a la fase S y durante G<sub>2</sub>, ocurren otra serie de fosforilaciones en la proteína p34: treonina-14, tirosina-15, y treonina-167, estas fosforilaciones van a mantener a la cinasa de la fase M inactiva y por lo tanto van a detener la entrada a mitosis (Solomon et al., 1990; Kirschner, 1992).

Una vez que la célula está apta para entrar a mitosis se lleva a cabo una activación abrupta de *cdc2*. Esta activación está asociada con la desfosforilación de los residuos en tirosina-15 y treonina-14 por



p80<sup>cdc25</sup> (Gould & Nurse, 1989). Al final de la mitosis, la actividad de *cdc2* es abolida por un sistema de proteasas que destruye la subunidad de ciclina del complejo (Glutzer et al., 1991).

En células de vertebrados la ciclina A puede unir a una de dos cinasas: p34<sup>cdc2</sup> y una proteína relacionada, p33<sup>cdc2</sup> (cinasa 2 ciclina-dependiente), que tiene un 65% de homología en secuencia con p34<sup>cdc2</sup>; este complejo parece estar involucrado en la promoción de la duplicación del ADN nuclear y además interviene en tiempos posteriores en el ciclo celular (Pines & Hunter, 1990). Esto sugiere que además de eucariontes inferiores como levaduras, en eucariontes superiores también existen complejos diferentes y específicos para los pasos decisivos del ciclo celular G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M favoreciendo con esto niveles diferentes de regulación (Dirick & Nasmyth, 1991).

La cinasa p34<sup>cdc2</sup> fosforila proteínas clave del ciclo celular; esta fosforilación desencadena los cambios asociados con los eventos específicos de la fase M, incluyendo condensación cromosomal, ensamblaje del huso mitótico, re-organización del citoesqueleto, ruptura de la envoltura nuclear y cambios en la forma celular (Doré, 1990).

Entre los sustratos *in vitro* de esta cinasa hasta ahora identificados se encuentran:

- ↪ La lámina nuclear (B2).
- ↪ Vimentina (proteína del anillo de contracción celular).
- ↪ Caldesmon (inhibidor de ATPasa).
- ↪ p60<sup>src</sup> (proto-oncogen que interviene en el re-arreglo del citoesqueleto y en el anclaje de las células al basamento).
- ↪ Nucleolina (proteína organizadora del nucleolo).
- ↪ El antígeno T de SV40 (promoviendo la proliferación viral).
- ↪ p53, fosfoproteína nuclear que está implicada en la regulación del ciclo celular y en la transformación neoplásica (Lane & Benchamol, 1990).
- ↪ La ARN polimerasa III.
- ↪ La subunidad 1 $\gamma$  del factor de elongación 1 del aparato traduccional.
- ↪ La ciclina B.
- ↪ La ADN polimerasa  $\alpha$

Mientras que el mecanismo básico que controla la división celular es universal, la regulación de este mecanismo durante el crecimiento puede variar entre diferentes organismos (Krek & Nigg, 1989). En *S.pombe*, por ejemplo, el nivel de ARN mensajero del gen *cdc2* no varía apreciablemente, aún en células detenidas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Durkacz *et al.*, 1986); sin embargo, la estimulación de células quiescentes de ratón en cultivo provoca una inducción significativa de la síntesis del mensaje de *cdc2* (Lee *et al.*, 1988). En células de animales por lo tanto, la cinasa p34<sup>cdc2</sup> parece estar regulada a nivel transcripcional y por lo tanto hay una correlación entre la abundancia del mensaje y el estado proliferativo de un tejido (Krek & Nigg, 1989).

Se ha comprobado la existencia de proteínas parecidas a p34, pero codificadas por genes diferentes (Colasanti *et al.*, 1991), las cuales forman una familia de proteínas relacionadas estructuralmente, pero no equivalentes en función (Jimenez *et al.*, 1990); esto abre la posibilidad de que haya otro nivel de regulación del gene *cdc2* en el cual diferentes proteínas p34 lleven a cabo diferentes funciones durante el ciclo celular y sean utilizadas en diferentes programas de desarrollo, por ejemplo, adulto contra juvenil o meiosis contra mitosis.

El hecho de que la actividad de la cinasa de la fase M sea regulada por fosforilación y desfosforilación ha enfocado la atención en un mecanismo de cascada de cinasas y fosfatasas que parecen ser claves en el ciclo celular. Estas actividades, junto con otros factores, proporcionan un balance de inductores y activadores que pueden liberar a la célula para que pueda pasar un límite o retardarla hasta que algunas condiciones intrínsecas o extrínsecas se satisfagan.

Actualmente se considera que el ciclo celular consiste de transiciones de un estado regulatorio a otro. Estas transiciones son controladas por mecanismos regulatorios mediante los cuales la célula verifica su estado para poder entrar al siguiente.

¿Para qué existen controles celulares en múltiples puntos del ciclo celular?. Existe un control de tamaño celular, probablemente en G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M para asegurar que la división produzca dos células hijas lo suficientemente grandes para ser viables. Existe otro control que monitorea la duplicación y asegura que el ADN ha sido totalmente duplicado antes que la célula se divida. Se sospecha que p34 interviene entre las señales de tamaño

celular y la regulación de los tiempos del ciclo celular (Enoch & Nurse, 1990).

Todos los genes conocidos que intervienen en el paso de G<sub>1</sub> a M parecen estar ampliamente conservados en la evolución.

### Ciclo celular en plantas.

El análisis del ciclo celular y su regulación en plantas superiores no está tan avanzado como lo está el de animales y microorganismos.

Ensayos inmunológicos usando un anticuerpo contra p34<sup>cdc2</sup>, han indicado la presencia de una proteína de 34 KDa en el alga verde *Chlamydomonas*, así como en *Arabidopsis* y avena (John et al., 1989). Esta fué la primera indicación de la existencia de un homólogo de p34<sup>cdc2</sup> en plantas superiores. Más recientemente, se han identificado y aislado los homólogos de otras plantas como cacahuete, maíz, alfalfa, chícharo, zanahoria (Colasati et al., 1991; Feller & Jacobs, 1990; Ferreira et al., 1991; Hirt et al., 1991), las cuales se identificaron además como homólogos funcionales, al complementar mutantes *cdc2* de levaduras.

### Germinación y ciclo celular.

Durante el desarrollo y maduración de los cotiledones de zanahoria se presenta una detención de la división celular que está acompañada de una disminución de 16 veces en el nivel de la proteína p34. El tratamiento de cotiledones maduros de zanahoria con auxinas provoca que las células se dediferencien en callos; esta dediferenciación está acompañada por la restauración del nivel de p34<sup>cdc2</sup> (Grost et al., 1991), lo que sugiere que al igual que en animales, los cambios en el nivel de la proteína p34 están relacionados con el camino que una célula vegetal tomará, iniciar la proliferación o la diferenciación (John et al., 1990); sin embargo, no se puede concluir si p34<sup>cdc2</sup> está regulando los momentos iniciales, durante el

encendido para la diferenciación o si es consecuencia del encendido mismo. Se ha observado que cuando la división de células de zanahoria se detiene artificialmente por limitación nutricional, se siguen detectando niveles altos de p34, lo que indica que la detención de la división celular durante la diferenciación no es resultado directo e inevitable de la disminución en la cantidad de p34<sup>cdc2</sup>, sino que esta respuesta es el resultado de la interacción de diferentes factores.

Se ha probado que el ARN mensajero de *cdc2* de maíz es abundante en tejidos dividiéndose activamente, en células no-diferenciadas como meristemas apicales y hojas inmaduras, pero está casi ausente en tejidos compuestos de tejidos terminales diferenciados como hojas maduras (Colasanti et al., 1991), aunque no se ha analizado cómo se correlaciona la cantidad de ARN mensajero de p34, con la cantidad de proteína y con su actividad.

### Ciclo celular y fitohormonas.

Las fitohormonas como auxinas y citocininas tienen una función importante en la regulación del desarrollo y crecimiento, en parte a través de afectar la división celular (Gorst et al., 1991).

Como primer paso para entender los efectos de las auxinas y citocininas en la división celular, tenemos que entender los pasos regulatorios básicos que controlan la división celular de las plantas y cómo las hormonas los afectan.

En células en cultivo de tabaco, al estudiarse los niveles de citocininas (zeatina y robosil-zeatina) durante el ciclo celular, se encontró que su cantidad y actividad aumentan de cuatro a cinco veces en el límite entre las fases G<sub>1</sub> y M. Estos niveles de incremento no se presentan en otras etapas del ciclo celular, por lo que se piensa que las citocininas aplicadas exógenamente ejercen sus efectos específicos en la fase G<sub>1</sub>, como anteriormente se había sugerido (Fosket, 1977).

Cómo es que las fitohormonas participan en la regulación del ciclo celular es todavía materia de especulación.

Ya que se ha comprobado que los controles regulatorios básicos de la división celular están evolutivamente conservados en plantas y dada la

facilidad con la cual son generadas plantas transgénicas en comparación con la dificultad de obtener animales transgénicos, las plantas ofrecen un sistema experimental excelente para estudiar el control de la división celular durante el desarrollo de un organismo multicelular.

## Antecedentes.

En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio del metabolismo del ADN durante la germinación de semillas especialmente de maíz. Trabajamos con ejes embrionarios de maíz, ya que ofrecen la ventaja sobre otros cereales de tener un periodo de más de 10 horas antes que la síntesis duplicativa de ADN inicie, por lo que se cuentan con estas horas para estudiar lo que sucede durante la germinación *sensu stricto*, es decir antes de que suceda la primera división celular.

Las citocininas estimulan la germinación de las semillas así como la síntesis de ADN y la división celular (Miller *et al.*, 1956; Van Staden, J. 1983; Galli, 1984), por lo que estudiamos los efectos de una citocinina sintética - benciladenina - (BA) en el metabolismo del ADN durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

Alrededor de este modelo nuestro grupo de trabajo ha obtenido resultados interesantes que involucran a esta fitohormona sintética en el metabolismo del ADN y en el progreso del ciclo celular; entre estos se encuentran los siguientes:

- BA estimula la síntesis de ADN de tipo reparativo en ejes embrionarios  $\gamma$ -irradiados y cambia el patrón de síntesis de ADN de ejes embrionarios no-irradiados de uno indefinido a uno netamente reparativo; esto sugiere que benciladenina estimula de alguna manera la reparación del ADN en el inicio de la germinación (Zaraín *et al.*, 1987 ; Vázquez-Ramos *et al.*, 1988).
- Se comprobó que el tratamiento con BA estimula la actividad de una ADN polimerasa nuclear (Vázquez-Ramos & Reyes, 1990).

= La adición de benciladenina a ejes embrionarios de maíz provoca que la duplicación del ADN nuclear ocurra antes que en los ejes control, e incrementa hasta tres veces el índice mitótico. Estos resultados podrían indicar que la benciladenina estimula la iniciación de eventos del ciclo celular en tiempos más cortos con respecto a los controles (Reyes et al., 1991).

Esto lo podría realizar al promover la actividad de proteínas que modulan el ciclo celular, entre las que se podrían encontrar cinasas importantes como la proteína p34<sup>cdc2</sup>, ya que se observó que el tratamiento con benciladenina estimula la fosforilación de proteínas totales y la actividad de cinasas independientes de calcio (Reyes, Tesis de maestría 1991). Esto podría sugerir que la cinasa p34<sup>cdc2</sup> (cinasa independiente de calcio), la cual se ha demostrado en otros sistemas como esencial para la entrada a mitosis, sea en parte responsable de los efectos producidos por benciladenina.

Por lo anterior nos interesa estudiar si la benciladenina desencadena o es responsable de los efectos sobre el metabolismo del ADN y el ciclo celular observados anteriormente regulando transcripcionalmente la expresión de *cdc2*.

## **H**ipótesis:

Se postula que la benciladenina acelera los eventos del ciclo celular y la germinación estimulando la transcripción del gen homólogo de *cdc2* de maíz.

## **O**bjetivos:

### **Objetivo general:**

Establecer una relación entre el acortamiento del ciclo celular por el tratamiento con benciladenina y la estimulación de la transcripción del gen homólogo de *cdc2* en semillas de maíz a lo largo del tiempo de germinación y crecimiento.

### **Objetivos particulares:**

#### **1) Aprender a manejar las técnicas para:**

- El aislamiento de ARN íntegro de ejes embrionarios de maíz (germinados con y sin benciladenina).
- La separación de ARN total en geles desnaturalizantes.
- Las hibridaciones tipo Northern.
- Las hibridaciones tipo Southern.

**2) Utilizando las anteriores metodologías, establecer si el tratamiento con benciladenina estimula la transcripción del gen homólogo de *cdc2* en ejes embrionarios de maíz.**



# Materiales.

## Material Biológico.

- Semillas de maíz (*Zea mays linneaus*), variedad chalqueño. De estas se disectaron a mano los ejes embrionarios y se guardaron hasta su uso en desecadores a 4°C.
- Cepa MC 1061 de *E. coli*.  
hesR mcrB araD139  $\Delta$ (ara ABC-leu)7679  
 $\Delta$ lacX74 galU galK rpsL thi

## Sustancias o Reactivos.

### → Soluciones para la incubación:

#### • Amortiguador de imbibición:

Tris-HCl, pH 7.6	50mM
KCl	50mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
Sacarosa	2%
Cloranfenicol	10 $\mu$ g/ml

#### • Solución de benciladenina ( $10^{-3}$ M)

Esta solución se diluye con amortiguador de imbibición, hasta una concentración de  $10^{-4}$  M.

### → Soluciones para la determinación de la actividad de benciladenina:

#### • Amortiguador de homogenización (pH 7.5)

NaCl	0.15
EDTA	0.10M
SDS	0.5%

#### • Solución de lavado

Citrato de sodio 1%

Timidina 20µg/ml

→Soluciones para la extracción de ARN total.

•Amortiguador de extracción.

Bromuro de Cetiltrimetilamonio(CTAB)	2%
Tris·HCl pH8	100mM
Acido etilendiaminotetraacético(EDTA)	20mM
Cloruro de sodio(NaCl)	1.4M
β-mercaptoetanol	1%

•Solución de precipitación.

CTAB	1%
Tris·HCl pH 8	50mM
EDTA	10mM
β-mercaptoetanol	1%

•Solución de CsCl 1M

Tris·HCl pH	50mM
EDTA	5mM
NaCl	50mM
CsCl	1M

•Solución de CsCl 5.7M

Tris·HCl pH8	50mM
EDTA	5mM
NaCl	50mM
CsCl	5.7M

•Solución de resuspensión.

Tris·HCl 1M	10µl
EDTA 0.5M	2µl
β-mercaptoetanol	10µl
Agua	c.b.p. 1ml

•Isotiocianato de Guanidina(26).

Isotiocianato de guanidina	8M
MES pH 7	20mM
EDTA	20mM
Esterilización por filtración. Antes de usarse agregar:	
$\beta$ -mercaptoetanol	50mM

•LiCl-Urea (4M-8M). Esterilización por filtración.

•Cloroformo : Alcohol isoamílico (C:AI) 24 : 1

•Fenol equilibrado con Tris-HCl(0.1M) pH8 tratado con DEPC.  
Guardar en frasco ámbar a 4°C.

→Soluciones para la extracción de ARN total de células HeLa:

•Amortiguador PBS

NaCl	15mM
KCl	3mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2mM

•Solución de lisis.

EDTA pH8	10mM
SDS	0.5%

•Solución de precipitación.

Acetato de Sodio pH 5.2	0.1M
EDTA pH8	10mM

→Soluciones para la separación de ARN poliadenilado, en columna de oligo(dT)-celulosa.

•Amortiguador de carga.

NaCl	0.5 M
Tris-HCl pH 7.5	20mM
EDTA	1mM
•KOH	0.1M

•Amortiguador de lavado.

NaCl	0.1M
Tris-HCl pH 7.5	20mM
EDTA	1mM

•Amortiguador de elución.

Tris-HCl pH 7.5	10mM
EDTA	1mM

→Soluciones para geles desnaturalizantes de ARN.

•Amortiguador de carga 10X.

Glicerol	50%
EDTA	1mM
Azul de bromofenol	0.4%
Xilén-cianol	0.4%

•Amortiguador de fosfato de Sodio 0.5M, pH 7

Solución 1 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	39ml
Solución 1M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61ml
Agua	100ml

•Amortiguador de electroforesis 10X

Amortiguador de fosfato de sodio pH 7	100mM
EDTA	10mM

•Solución concentrada de bromuro de etidio 10mg/ml de agua.

→Soluciones para northern.

Prehibridación e Hibridación:

•Reactivo de Denhardt 100X.

Folivinil pirrolidona (PVP)	2%
Albúmina bovina	2%
Ficoll - 400	2%

Esta solución no se esteriliza.

•Solución concentrada de ADN fragmentado de esperma de salmón  
10mg/ml.

•SDS 10%

**Transferencia:**

•Solución SSC 20X pH 7

NaCl	0.15M
Citrato de Sodio	0.015M

→ Soluciones para preparación de columna de Sephadex:

•TE pH 7.6

Tris·HCl (pH7.6)	10mM
EDTA pH8	1mM

→ Soluciones para transformación y expresión.

•Solución concentrada de CaCl<sub>2</sub> 1M. Esterilización por filtración.

•Solución concentrada de Ampicilina (50mg/ml). Esterilización  
por filtración

•Solución concentrada de isopropiltio β-D-galactósido(IPTG)  
0.2g/ml. Esterilización por filtración

•Solución concentrada de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil -β-D-  
galactósido (X-gal) 20mg/ml.

→ Soluciones para la obtención de plásmidos (lisis alcalina).

•Solución I

Glucosa	50mM
---------	------

Tris·HCl pH8	25mM
EDTA	10mM
*Solución II	
NaOH	0.2N
SDS	1.0%
*Solución III	
Acetato de potasio 5M pH4.8	60ml
Acido acético glacial	11.5ml
Agua	28.5ml
*Solución para el gradiente de CsCl.	
STE	9ml
CsCl	5.8M
Bromuro de etidio (10mg/ml)	0.5 ml
*Solución STE.	
NaCl	10mM
Tris pH7.5	10mM
EDTA	1mM

# Métodos.

## → Preparación de solución de benciladenina:

Pesar lo suficiente para preparar 5-10 ml de benciladenina  $10^{-4}M$ , disolver en HCl 1N (100-150 $\mu$ l) aforar con agua desionizada. Esterilizar por filtración. Para la imbibición diluir esta solución con el amortiguador de imbibición a una concentración final de  $10^{-4}M$ .

## → Solución control.

Prepararla de igual manera que la solución anterior, pero sin benciladenina.

## → Prueba de actividad para la solución de benciladenina:

- 1) Lavar 20 ejes embrionarios de maíz con una solución al 0.1% de hipoclorito de sodio por un minuto. Enjuagar abundantemente con agua estéril.
- 2) Dividir los ejes embrionarios en dos cajas petri estériles y adicionar para la imbibición 100 $\mu$ l de amortiguador de imbibición con 20 $\mu$ Cl/ml de timidina tritiada (una caja con amortiguador control y otra con amortiguador con BA). Incubar 24 horas a 25°C.
- 3) Terminado el tiempo de incubación lavar los ejes embrionarios con 10ml de citrato de sodio al 1%.
- 4) En mortero triturar y homogenar con 1.2ml de amortiguador de homogenización. Filtrar en gasa.
- 5) Pasar a un tubo y añadir 1ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, dejar una hora a 4°C. Filtrar al vacío, lavar con TCA al 5%, etanol y secar los filtron.
- 6) Determinar las cuentas por minuto (cpm) en contador de centelleo.

→Imbibición:

- 1) Lavar 1g de ejes embrionarios de maíz con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% por un minuto. Enjuagar abundantemente con agua estéril.
- 2) Secar los ejes embrionarios en un papel filtro estéril y colocarlos en una caja Petri estéril entre dos hojas de papel filtro. Adicionar 5ml de amortiguador de imbibición (control o con benciladenina). Incubar por el tiempo necesario a 25°C.
- 3) Al terminar la incubación, enjuagar con agua estéril y congelar con nitrógeno líquido hasta su uso.

→Extracción de ARN.

Precauciones.

Para evitar que el material con el cual se trabajará para la extracción y manipulación de ARN sea fuente de ARNasas, se tratará de la siguiente manera:

Material de vidrio y metal:

- Lavar con jabón y enjuagar.
- Enjuagar con  $H_2SO_4$  concentrado, enjuagar bien con agua.
- Hornear a 170°C por 12 - 24 horas.

Material de plástico:

- se utilizará nuevo y estéril.

Soluciones y agua desionizada:

- Adicionar a la solución o al agua 0.1% de DEPC, agitar toda la noche a 37°C.
- Esterilizar en autoclave a 15 libras/pulg<sup>2</sup> una hora o esterilizar por filtración a través de filtros con un diámetro de poro de 0.2 $\mu$  en el caso de que las soluciones no puedan ser esterilizadas por autoclave.

Trabajar en todo momento con guantes.



#### Aislamiento de ARN de plantas.

##### •Aislamiento con detergente catiónico(Taylor & Powell, 1982).

- 1)Congelar con nitrógeno líquido una cantidad conocida de tejido vegetal en un mortero y moler hasta tener un polvo fino. Transferir a un tubo siliconizado. Resuspender en amortiguador de extracción hirviendo, aproximadamente 10-12 ml/g de tejido. Agitar bien, pasar rápidamente a un baño maría a 55°C. Incubar una hora, agitar ocasionalmente.
- 2)Añadir un volumen de C:AI, agitar suavemente. Centrifugar a 13,000xg por diez minutos.
- 3)Transferir la fase acuosa a otro tubo. Añadir 1/10 de volumen de la solución de CTAB al 10% y repetir la extracción con C:AI el total de veces que sea necesario para eliminar la interfase de proteínas.
- 4)Transferir la fase acuosa a otro tubo. Añadir un volumen de amortiguador de precipitación. Mezclar y dejar a temperatura ambiente una hora.
- 5)Centrifugar a 2,000xg. Retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur, secar al vacío. Resuspender en CsCl 1M. Colocar en tubos sobre un colchón de CsCl 5.7M y centrifugar de 12 a 14 horas a 120,000g a 20°C.
- 6)Retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur y resuspender el botón que corresponde al ARN en solución de resuspensión.
- 7)Precipitar con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y dejar para precipitación total 30 minutos a -70°C. Centrifugar a 12,000xg por 10 minutos a 4°C. Resuspender en agua.

##### •Extracción de ARN utilizando isotiocianato de guanidina.

- 1)Congelar un gramo de ejes embrionarios de maíz y macerar en mortero hasta tener un polvo fino.
- 2)Colocar el polvo en un tubo siliconizado con solución Z6 (10ml/g de tejido) enfriada en hielo por 5 minutos. Agitar.
- 3)Eliminar proteínas por extracción con un volumen de fenol-C:AI; agitar, centrifugar a 10,000rpm por 30 minutos. Repetir

la extracción de la fase acuosa hasta la eliminación de la interfase proteica.

- 4) Vaciar la fase acuosa de la extracción en otro tubo siliconizado y agregar 1/10 de volumen de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de etanol absoluto frío. Dejar 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; centrifugar a 10,000rpm por 10 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ .
- 5) Lavar dos veces con etanol al 70% frío.
- 6) Lavar con acetato de sodio 3M pH5.2 (10ml/g de tejido). Centrifugar a 10,000rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 7) Lavar dos veces con etanol al 70%; secar al vacío y resuspender en agua.
- 8) Precipitar con un volumen de solución de cloruro de litio; incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por dos horas. Centrifugar a 15,000xg por 20 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ , descartar el sobrenadante y lavar con etanol al 70% frío dos veces. Resuspender en agua en el menor volumen posible.

•Extracción de ARN total de células de mamífero (HeLa).

- 1) Centrifugar las células a 1,300xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , descartar el sobrenadante. Lavar con diez volúmenes de PBS frío centrifugando cada vez de la misma manera.
- 2) Resuspender en EDTA-SDS (10 ml/ml de células).
- 3) Agregar acetato de sodio-EDTA (10 ml/ml).
- 4) Eliminar proteínas por extracción con un volumen de fenol-C:AI, agitar y centrifugar a 5,000xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  las veces que sea necesario. Transferir la fase acuosa a un tubo con 11% de Tris-HCl pH8 y 4.5% de NaCl.
- 5) Agregar dos volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar y dejar para precipitación total una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; centrifugar a 5,000xg por 30 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ . Lavar con etanol al 70%, secar el botón al vacío y resuspender en agua.

→Purificación de ARN poliadenilado.

- 1) Resuspender la resina de oligo-dT celulosa en amortiguador de carga (300mg/ml).

2) Llenar una columna de 1ml con la resina. Lavar la columna en el siguiente orden con cinco volúmenes de columna:

- Agua
- KOH 0.1M
- Agua

3) Lavar la columna con cinco volúmenes de columna con amortiguador de carga, hasta que el pH del efluente sea menor de 8.

4) Calentar el ARN disuelto en agua a 65°C por cinco minutos, enfriar inmediatamente en hielo hasta temperatura ambiente.

5) Ajustar la solución de ARN a la concentración del amortiguador de carga. Adicionarlo a la columna.

6) Colectar el eluido, calentar a 65°C por 5 minutos y aplicar nuevamente a la columna; colectar el eluido.

7) Lavar la columna con 10 volúmenes de amortiguador de carga, colectando fracciones de 1 ml.

8) Checar la fracción en que eluye el ARN no poliadenilado colocando 5µl de cada fracción sobre un papel celofán y agregarle a cada gota 5 µl de una solución de bromuro de etidio y observar fluorescencia en el transiluminador de ultravioleta.

9) Lavar abundantemente la columna con amortiguador de lavado.

10) Eluir el ARN poliadenilado que se haya pegado a la resina con 2-3 volúmenes de columna de amortiguador de elución en alícuotas de 400µl. Determinar las fracciones con ARN poliadenilado de igual manera que para el ARN no poliadenilado.

11) Mezclar todas las fracciones de ARN poliadenilado, precipitar con 1/20 de volumen de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Dejar para precipitación total 30 minutos a -70°C.

12) Centrifugar a 10,000xg por 15 minutos a 4°C, lavar con etanol al 70%, secar al vacío y resuspender en agua.

→ Determinación de la concentración de ARN.

**Espectrofotométricamente:**

Considerando que  $100_{260}$  contiene aproximadamente 40 $\mu$ g de ARN por mililitro, determinar la densidad óptica de cada muestra y calcular la concentración con la anterior relación. Determinar la densidad óptica de cada muestra a 280nm; la relación  $DO_{260}/DO_{280}$  da una estimación de la pureza de ácidos nucleicos con respecto a la cantidad de proteínas; valores entre 1.8 y 2 indican una muestra pura en ácidos nucleicos.

**Por electroforesis en minigeles de agarosa:**

Debido a que en los extractos de plantas existen compuestos aromáticos que se detectan a 260nm, la determinación espectrofotométrica de la concentración de ácidos nucleicos no es tan precisa, por lo que para igualar la cantidad de ARN cargado en los geles desnaturalizantes de ARN, se tienen que realizar minigeles de agarosa, además de que con esta prueba se determina su integridad.

**→ Separación de fragmentos de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa.**

**• Desnaturalización con formaldehído y formamida (Sambrook 1990).**

- 1) Preparar una solución de agarosa con agua para tener al final con el formaldehído y el amortiguador de electroforesis un gel al 1%. Fundir en autoclave.
- 2) Preparar la cámara de electroforesis y sus accesorios de la siguiente manera:
  - Lavar con extrán, enjuagar con agua abundantemente.
  - Enjuagar con etanol y dejar secar.
  - Llenar con una solución de  $H_2O$ , al 3% y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
  - Enjuagar abundantemente con agua tratada con DEPC.
- 3) Una vez lista la agarosa se deja enfriar hasta 50°C, se le agrega el formaldehído y el amortiguador de electroforesis 10X para tener concentraciones de 6% y 1X respectivamente. Decantar en la cámara de electroforesis.
- 4) Dejar gelificar por 30 minutos.
- 5) Preparar las muestras de la siguiente manera:

ARN	4.5 $\mu$ l
Amortiguador de electroforesis 10X	2.0 $\mu$ l

Formaldehído 37%	3.5µl
Formamida 100%	10.0µl

Incubar a 55°C por 15 minutos para desnaturalizar; colocar rápidamente en hielo, dar un pulso de centrifugación, y agregar amortiguador de carga 10X hasta una concentración final de 1X.

- 6) Sumergir el gel con amortiguador de electroforesis 1X y precorrerlo por 5 minutos al voltaje que se va a utilizar durante la corrida del gel.
- 7) Colocar las muestras en el gel. Aplicar un voltaje de 3-4V por centímetro de separación entre los electrodos.
- 9) Al final de la corrida, teñir el gel con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5µg/ml. Observar el gel con un transiluminador de ultravioleta y medir las distancias de migración de los ARN ribosomales (23S y 16S). Enjuagar el gel en agua tratada con DEPC hasta la transferencia.

• **Electroforesis de ARN después de la desnaturalización con glioxal y dimetilsulfóxido (DMSO), (Sambrook et al., 1990).**

- 1) En tubos eppendorf colocar:

Glioxal 6M	5.4µl
DMSO	16.0µl
Amortiguador de fosfato de sodio(pH7)0.1M	3.0µl
ARN	5.4µl

Mezclar, incubar por una hora a 50°C. Colocar inmediatamente en hielo.

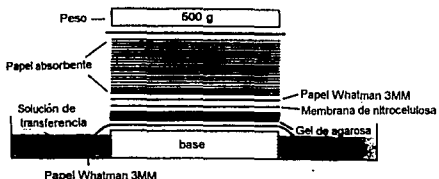
- 2) Preparar la cámara de electroforesis de la misma manera que en el método anterior.
- 3) Disolver la cantidad de agarosa necesaria para tener una solución al 1% en amortiguador de fosfatos 10mM (pH7) en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y vaciar en la cámara de electroforesis. Dejar gelificar por 30 minutos. Sumergir el gel con amortiguador de electroforesis 1X. Precorrer el gel por 5 minutos.
- 4) Agregar amortiguador de carga a cada muestra; cargar al gel. Aplicar un voltaje de 3-4V por centímetro de separación de

los electrodos. Recircular el amortiguador de electroforesis durante toda la corrida.

- 5) Cuando el azul de bromofenol del amortiguador de carga haya migrado 3/4 partes del gel, teñir con bromuro de etidio (0.5µg/ml) por 30-45 minutos. Determinar la distancia de migración de los ARN ribosomales. Dejar enjuagando en agua tratada con DEPC hasta la transferencia.

→ Transferencia por capilaridad de ARN separado en geles de agarosa hacia soportes sólidos.

- 1) Enjuagar el gel en la solución de transferencia por 15 minutos.
- 2) Instalar la cámara de transferencia de la siguiente manera:



Sumergir los papeles Whatman 3MM y el filtro de nylon o de nitrocelulosa en agua desionizada hasta hidratación total, posteriormente sumergirlos en SSC 20X por 10 minutos.

Colocar las capas de papel y el soporte evitando la formación de burbujas.

- 3) Dejar transferir por 12 horas como mínimo. Una vez terminada la transferencia sacar el filtro, dejarlo secar al aire y finalmente hornearlo por dos horas a 80°C en un horno al vacío.

→ Preparación de Filtros para Slot-blot.

- 1) Lavar el aparato de slot de la misma manera como se hace para la cámara de electroforesis.
- 2) Preparar las muestras de la siguiente manera:

Formamida 100%	20µl
Formaldehído 37%	7µl
SSC 20X	2µl
- 3) Cortar el filtro de nylon del tamaño adecuado al número de muestras, sumergirlo en agua desionizada estéril hasta hidratación total, posteriormente sumergir en SSC 20X por 1 hora. Colocar el filtro en el aparato de slot; colocar las muestras, accionar el vacío y dejar que se filtre toda la solución.
- 4) Secar el filtro al aire y hornearlo 2 horas a 80°C en horno al vacío.

→ Preparación de la sonda.

• Digestiones con endonucleasas de restricción.

- 1) Colocar en un tubo Eppendorf estéril el ADN a cortar (0.2-1µg), agregar la cantidad suficiente de agua para tener 18µl totales.
- 2) Agregar 2µl del amortiguador comercial (10X) adecuado para la endonucleasa a utilizar, mezclar.
- 3) Agregar 1-2 unidades de la endonucleasa de restricción, mezclar. Incubar a la temperatura apropiada.
- 4) Checar los cortes en un minigel de agarosa al 0.8%.
- 5) Si la segunda enzima de restricción trabaja con el mismo amortiguador que la primera enzima agregar a la mezcla de reacción anterior 1-2 unidades de la segunda endonucleasa de restricción; incubar a la temperatura adecuada por el tiempo necesario; volver a checar en un minigel de agarosa al 0.8%.
- 6) Detener la reacción agregando EDTA 0.5M (pH8) a una concentración final de 10mM.

•Purificación de los fragmentos de ADN restringidos.

- 1) Separar las reacciones de digestión en un minigel de agarosa al 0.8%.
- 2) Teñir con bromuro de etidio (0.5µg/ml) por 15 minutos, observar con lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga y verificar si las diferentes bandas han logrado una buena separación.
- 3) Cortar el fragmento de agarosa que contiene la banda de ADN que se utilizará como sonda, colocarlo en un tubo eppendorf(0.5ml) con pelo de ángel y una perforación en el fondo. Colocar este tubo dentro de otro tubo Eppendorf(1.5ml) y centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm.
- 4) Agregar 100 µl de TE y centrifugar de nuevo colectando en el mismo tubo; llevar a 400µl con TE. Extraer con fenol-C:AI una vez y otra con cloroformo.
- 5) La fracción acuosa de la última extracción se precipita con 1/10 de volumen total de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío; dejar a -20°C por dos horas. Centrifugar a 12,000xg por 30 minutos a 4°C.
- 6) Lavar el botón con etanol al 70% y resuspender en STE (pH 7.6) en el menor volumen posible. Calcular la concentración en base a la cantidad de ADN cortado inicialmente.

•Marcaje. Extensión por "Random Primer" (Feingberg & Volgestein; 1984).

El marcaje se realiza con paquetes comerciales de extensión, los cuales contienen todos los reactivos necesarios.

En el marcaje por "random primer" se utiliza una mezcla de hexanucleótidos que sirven como "primer" para que el ADN que va a servir como molde pueda ser utilizado por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Este fragmento carece de actividad de exonucleasa 5'→3', además de tener una actividad de exonucleasa 3'→5' muy disminuida por el pH de la reacción (6.6), lo que evita perder radiactividad incorporada. Uno de los dNTP para la polimerización es radiactivo ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP).



- 1) Desnaturalizar el ADN linearizado en baño de ebullición por 5 minutos y colocar inmediatamente en hielo. Centrifugar.
- 2) Adicionar los siguientes reactivos del paquete de extensión en un tubo Eppendorf:
  - 6µl de Amortiguador de extensión 5X
  - 6µl de mezcla de dNTPs sin dCTP.
  - La cantidad de ADN desnaturalizado a marcar.
  - La cantidad suficiente de  $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ dCTP para tener 50µCi.
  - 1µl de enzima Klenow.
  - Agua para completar 30µl
- 3) Mezclar, centrifugar y dejar a temperatura ambiente por aproximadamente 5 horas.
- 4) Detener la reacción agregando 3µl de EDTA 0.5M

• Separación de la marca no incorporada (columnas de Sephadex G-50).

*-Preparación de la resina:*

- 1) Agregar lentamente la resina a agua desionizada estéril (1g/16ml), dejarla reposar, tirar el agua y repetir esto unas 5 veces.
- 2) Decantar el agua del último paso de lavado y equilibrar con TE (pH 7.6), esterilizar en autoclave a 10 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos y guardar a temperatura ambiente.

*-Preparación de la columna.*

- 1) Empacar la resina en una columna de aproximadamente 1ml de volumen con pelo de ángel estéril en el fondo (jeringa de insulina estéril). Lavar dos veces con aproximadamente 100µl de STE por centrifugación a 1,600xg cuatro minutos a temperatura ambiente.

*-Separación.*

- 1) Agregar a la reacción de marcaje STE para tener 200 µl finales. Mezclar y tomar 1 µl en un tubo Eppendorf, colocarlo en un vial para contador de centelleo.

- 2) Cargar la solución a la columna, centrifugar a 1,600xg 4 minutos a temperatura ambiente. Colectar el eluido en un tubo Eppendorf, de este eluido tomar 1 ml y colocarlo en un tubo Eppendorf y éste en un frasco para contador de centelleo.
- 3) Determinar las cuentas por minuto (cpm) Cerenkov de las muestras de los dos lavados; calcular con estos datos el porcentaje de incorporación de la marca radiactiva y la actividad específica de la sonda.
- 4) Agregar 0.1 volúmenes de NaOH 1N, calentar a 37°C por cinco minutos.

→ Hibridación tipo Southern y northern.

-Prehibridación e Hibridación:

- 1) Preparar la solución de prehibridación conforme a las especificaciones del experimento (aproximadamente 0.2ml/cm<sup>2</sup>).
- 2) Sumergir el filtro de nitrocelulosa a hibridar en SSC 6X hasta que esté completamente húmedo.
- 3) Colocar el filtro dentro de una bolsa de plástico para hibridación, agregar la solución de prehibridación. Sellar la bolsa sin que se formen burbujas y sumergir en un baño de agua por una a dos horas como mínimo a la temperatura determinada para cada experimento.
- 4) Terminado el tiempo de prehibridación, agregar la sonda desnaturalizada a la misma solución en el caso de filtros de nitrocelulosa; para filtros de nylon cambiar la solución por la solución de hibridación y agregar la sonda. Sellar la bolsa sin que se formen burbujas e incubarla sumergida en baño de agua el tiempo y a la temperatura determinada por el experimento.
- 5) Una vez terminado el tiempo de hibridación, retirar la bolsa del baño de incubación, eliminar la solución de hibridación en un contenedor para radiactividad y sumergir inmediatamente el filtro en la solución de lavado y

proceder a lavar según las especificaciones de cada experimento.

- 6) Monitorear con contador geiger los pasos de lavado; cuando se considere limpio, preparar para autorradiografía.

**-Autorradiografía.**

- 1) Colocar el filtro aún húmedo en un soporte entre dos hojas de egga-pack.
- 2) En cuarto oscuro poner el filtro en un cassette para autorradiografía, colocarle encima una película para rayos X y poner ambos entre dos pantallas intensificadoras de tungstenato de calcio. Guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por el tiempo necesario.
- 3) Revelar la película de la siguiente manera:
  - Sumergir la película en la solución reveladora por 5 minutos.
  - Enjuagar abundantemente con agua.
  - Sumergir la película en solución fijadora por cinco minutos.
  - Enjuagar abundantemente con agua.

**→ Transformación de E.coli.**

- 1) Tomar 4 ó 5 colonias de E.coli MC1061, e inocular 3 ml de medio Luria líquido. Incubar toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación fuerte.
- 2) Inocular con  $300\mu\text{l}$  del cultivo anterior 30ml de medio Luria líquido. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación fuerte y dejar crecer hasta la fase logarítmica ( $\text{D.O.}_{100}$  de 0.2).
- 3) Enfriar en hielo por diez minutos. Centrifugar a 5K por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Resuspender el botón celular en la mitad del volumen inicial de  $\text{CaCl}_2$  100mM. Dejar reposar 30 minutos en hielo.
- 4) Adicionar a  $200\mu\text{l}$  de esta suspensión celular aproximadamente 50ng de ADN (plásmidos con los que se quieren transformar las células: pRK172 y p10a) en un volumen no mayor de  $10\mu\text{l}$ .

- 5) Incubar en hielo por 30 minutos, calentar a 42°C por dos minutos y colocar en hielo inmediatamente.
- 6) Agregar 0.8ml de medio Luria a este tubo Eppendorf e incubar a 37°C por 45 minutos.
- 7) Colocar en placas de medio Luria con Ampicilina (50µg/ml de medio) 40µl de la solución concentrada de X-gal y 4µl de la solución concentrada de IPTG, esparcirlos, dejar absorber y sembrar las células transformadas y un control sin transformar. Incubar toda la noche a 37°C.

→ Purificación de plásmido por lisis alcalina

- 1) Tomar entre 4 y 5 colonias de células transformadas, inocularlas en 30 ml de medio Luria con ampicilina (50µg/ml) e incubar a 37°C con agitación fuerte hasta fase logarítmica (D.O.<sub>550</sub> ~ 0.6).
- 2) Inocular 500ml de medio Luria con ampicilina 50µg/ml con 25 ml del cultivo anterior. Incubar 2.5 horas a 37°C con agitación fuerte. Centrifugar 15 minutos a 13,000rpm a 4°C.
- 3) Resuspender el botón celular en 10ml de Solución I conteniendo 5mg/ml de lisozima.
- 4) Transferir a tubos de centrifuga. Incubar a temperatura ambiente por cinco minutos.
- 5) Agregar 20ml de Solución II fresca. Mezclar y colocar en hielo por 10 minutos.
- 6) Agregar 15 ml de una solución fría de acetato de potasio (solución III). Mezclar e incubar en hielo por cinco minutos.
- 7) Centrifugar a 70,000xg por 20 minutos, a 4°C.
- 8) Transferir el sobrenadante a tubos siliconizados y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol. Mezclar y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 9) Centrifugar a 12,000g por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Lavar el botón con etanol al 70%. Disolver el botón en STE para preparar un gradiente de CsCl.

→ Gradiente de CsCl:

- 1) Medir el volumen de la solución de ADN. Agregar 1g de CsCl por cada mililitro y disolver totalmente.
- 2) Agregar 0.8ml de una solución de bromuro de etidio (10mg/ml) por cada 10 ml de la solución de ADN/CsCl. Mezclar. La densidad final de la solución deberá ser de 1.55g/ml (índice de refracción = 1.3860) y la concentración de bromuro de etidio de 740µg/ml.
- 3) Centrifugar la solución a 60,000rpm por 24 horas a temperatura ambiente.
- 4) Colectar la banda correspondiente al ADN plasmídico con una jeringa estéril de 1ml en un tubo estéril.
- 5) Eliminar el bromuro de etidio con lavados de alcohol isoamílico. Agregar tres volúmenes de agua y dos de etanol absoluto frío. Incubar 15 minutos a 4°C. Centrifugar a 10,000xg por 15 minutos a 4°C. Lavar con etanol al 70% tres veces. Disolver el ADN precipitado en TE pH8.

→ Incubación de células de E.coli MCI061 para expresión de plásmido p10a:

- 1) De las células transformadas con p10a, tomar una colonia e incubar en medio Luria líquido a 37°C toda la noche con agitación.
- 2) Inocular en otro matríz con medio Luria con Ampicilina (50µg/ml) un volumen tal de esta suspensión celular para lograr una dilución de 100 veces. Incubar en presencia de IPTG hasta una densidad óptica de aproximadamente 0.7.
- 3) Extraer de esta suspensión el ARN total.

# Resultados.

## Northern-blot

Esta técnica comprende la hibridación de ARN inmovilizado en soportes sólidos como nitrocelulosa o nylon, con una sonda de ADN en solución (Alwine et al. 1979).

El desarrollo de esta técnica involucra los siguientes puntos:

- 1) Extracción de ARN total del tejido a estudiar.
- 2) Separación del ARN extraído por cromatografía en geles desnaturizantes de agarosa.
- 3) Transferencia de los ARN separados a un soporte sólido de nylon o nitrocelulosa.
- 4) Pre-hibridación e hibridación con la sonda de interés.

## Extracción de ARN total.

Para la obtención del ARN total de ejes embrionarios de maíz se siguieron básicamente dos protocolos que se fueron adaptando hasta establecerse el método que satisface los requisitos para obtener un ARN íntegro y con un alto grado de pureza.

En el primer protocolo, la lisis celular para la extracción del ARN se hace con ayuda del detergente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), EDTA y  $\beta$ -mercaptoetanol. Esta solución además de lisar las células, desnaturiza proteínas entre las que se podrían encontrar ARNasas (Taylor & Powell, 1982).

Los ARN extraídos por este método no mostraban evidencias claras de estar degradados al observarse en geles de agarosa; sin embargo, otro método de extracción presentaba algunas ventajas sobre el primero. Entre estas:

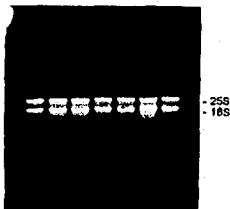
- \*Menor tiempo de incubación en el extracto celular total. Esto es una ventaja, debido a que entre mayor tiempo se incuba el extracto celular total se favorece la interacción de algunas ARNasas que no

hayan podido ser desnaturalizadas con la solución de extracción, incrementándose la posibilidad de degradación del ARN.

■ Menor manipulación durante la eliminación de ADN, la cual en el primer protocolo se realiza por un gradiente de cloruro de cesio y en el segundo mediante precipitaciones diferenciales.

■ El uso de agentes caotrópicos (isotiocianato de guanidina y clorhidrato de guanidina), los cuales junto con el  $\beta$ -mercaptoetanol como reductor actúan como agentes desnaturalizantes potentes que eliminan la estructura secundaria de las proteínas y por lo tanto inactivan totalmente a las ARNasas (Cox 1968).

Los ARN obtenidos con este protocolo de extracción mostraron un alto grado de pureza y de calidad. Lo que se puede apreciar en los gels de agarosa de estas muestras:



Electroforesis de ARN total de ejes embrionarios de maíz.

## Electroforesis en geles de agarosa.

Para esto se probaron fundamentalmente dos procedimientos de desnaturalización del ARN: uno que utiliza 2.2M de formaldehído (Thomas, 1980), y otra técnica que utiliza Glioxal 6M y Dimetilsulfoxido (DMSO) (McMaster & Carmichael, 1977).

Aunque el poder de resolución de ambos sistemas es aproximadamente el mismo (Miller 1987), se probó el segundo método ya que en la literatura se reporta que las señales detectadas por northern de los ARN en geles de glioxal y DMSO son más finas, además de evitarse la molestia y el riesgo de trabajar con formaldehído.

## Transferencia.

La transferencia de las muestras se realizó hacia dos soportes: primeramente nitrocelulosa y posteriormente nylon. Este cambio se hizo debido a que el segundo soporte es menos frágil y por lo tanto más fácil de manipular.

## Hibridaciones.

Para la realización de la prehibridación e hibridación, existen diferentes protocolos que varían según las características de la sonda utilizada y de su homología con las muestras a hibridar.

Estos protocolos difieren en los siguientes aspectos:

- La temperatura y el solvente utilizados (por ejemplo 68°C en solución acuosa o 42°C en 50% de formamida).
- El volúmen del solvente, y el tiempo de hibridación (grandes volúmenes por periodos largos hasta de tres días o volúmenes mínimos por periodos tan cortos como 4 horas).
- El grado y método de incubación durante la hibridación (con agitación continua o estacionaria).
- El uso de agentes diferentes para bloquear los filtros antes de ser hibridados.



- La concentración de la sonda marcada radiactivamente y su actividad específica.
- El uso de compuestos como sulfato de dextrán (Wahl *et al.*, 1979) o polietilenglicol (Amasino, 1986) los cuales incrementan la tasa de reasociación de ácidos nucleicos.
- La intensidad de los lavados después de la hibridación.

Para las hibridaciones primeramente se utilizó el plásmido pRK-172 como sonda para hibridar ARN de maíz. Este plásmido contiene un ADNc del homólogo funcional humano de *cdc2* (Lee & Nurse). Este plásmido al utilizarlo como sonda para hibridar muestras de maíz será una sonda no homóloga, por lo que la hibridación se debe realizar en condiciones de poca severidad para favorecer la hibridación de la sonda con el ARN de maíz.

Para esto la primera estrategia a seguir fué y disminuir la temperatura de hibridación.

Tomando en cuenta la homología entre la sonda y el ARN mensajero correspondiente de maíz, que es del 63%, (Lee & Nurse, 199) la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para el híbrido formado entre la sonda y el ARN mensajero es de 37°C, la cual es muy baja para usarla en el experimento, ya que favorece mucho las hibridaciones inespecíficas aumentando la relación fondo/señal, lo que hace difícil identificar una señal positiva de entre las señales de fondo.

La temperatura para una hibridación 100% homóloga es de 68°C (Sambrook *et al.* ;1989). considerando una homología del 63%, se trabajó primeramente con una temperatura de 55°C, es decir 13 grados centígrados menos que la temperatura utilizada para sondas con 100% de homología.

Los primeros filtros contenían por carril aproximadamente 20µg de ARN total de ejes embrionarios de maíz incubados por diferentes horas con y sin benciladenina. Las primeras horas estudiadas fueron: 0, 3, 6, 9 y 15 horas después del inicio de la imbibición. Estas muestras fueron separadas electroforéticamente en geles desnaturalizantes de formaldehído, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Las condiciones de hibridación que se utilizaron fueron:

**Prehibridación:**

Tiempo: 4 horas

Temperatura: 55°C.

Solución:

• SSC	5X
• SDS	5X
• Reactivo de Denhardt	5X
• Amortiguador de fosfatos	50mM
• ADN de espermatozoos de salmón	200µg/ml

Hibridación:

Tiempo: 24 horas

Temperatura: 55°C

Solución:

La misma que la de la prehibridación, a la que se le añade la sonda marcada radiactivamente.

Porcentaje de incorporación de la marca: 42%

Actividad específica de la sonda radiactiva:  $7 \times 10^7$  cpm/µg ADN.

De estos primeros intentos, no se obtuvo ninguna señal de hibridación, así que se continuaron haciendo modificaciones a las condiciones de hibridación:

Se disminuyó la temperatura en diez grados centígrados de 55°C a 45°C, para aumentar la probabilidad de una hibridación. Al disminuir la temperatura las hibridaciones inespecíficas aumentan, así que los lavados se van a realizar de manera más severa, para eliminar en lo más posible el fondo inespecífico que se pudiera encontrar bajo estas condiciones.

Se realizaron las siguientes hibridaciones manteniendo el mismo tiempo y las mismas soluciones de prehibridación e hibridación. La prehibridación se realizó a 55°C y la hibridación a 45°C. El lavado se hizo de la siguiente manera:

15 minutos, una vez, a temperatura ambiente, con una solución de SSC 2X, SDS 0.1% y dos veces con una solución de SSC 0.2X, 0.1% SDS.

Con estas condiciones de hibridación tampoco se obtuvo ninguna señal de hibridación.

Posteriormente se probaron algunos aspectos que se consideraron importantes:

- Que la sonda esté bien desnaturalizada antes de agregarla al buffer de hibridación. En la literatura, se recomienda un método de desnaturalización de la sonda con una solución de sosa IN (0.1 volúmenes), calentando a 37°C por cinco minutos (Sambrook et al; 1989). En adelante se desnaturalizaron de esta manera las sondas para las hibridaciones.
- Incluir un control positivo de hibridación ADN-ADN. Para este se cargó un carril con ADN del plásmido, en una cantidad tal que se pueda apreciar bien una banda de hibridación (100pg).
- Incluir un control positivo de hibridación de ADN-ARN. Para esto se cargó un carril con ARN total humano; así la sonda sería 100% homóloga al ARN, favoreciéndose con mucho la obtención de señales de hibridación. Para este punto se extrajo ARN total de células HeLa.
- Obtener y utilizar ARN de ejes incubados por más horas (24, 48 y 72 horas), debido a que entre mayor sea el tiempo de incubación habrá mayor número de mitosis y por lo tanto más ARN mensajero de p34<sup>cdc2</sup>, ya que el gen se estaría transcribiendo en un mayor número de células. Se sabe que en tiempos menores de doce horas de incubación, el número de mitosis es insignificante en ejes embrionarios de maíz (Baiza et al; 1986).
- Aumentar la cantidad de plásmido a marcar y por lo tanto de sonda durante la hibridación, de 50ng a 100ng, ya que está reportado que para detectar ARN mensajeros de baja abundancia se debe de usar al menos 100ng de sonda cuya actividad específica exceda  $2 \times 10^6$ cpm/ $\mu$ g de ADN (Sambrook et al; 1989). Aunque no se sabía en ese momento qué tan abundante era este mensaje, se trabajó como poco abundante para favorecer las probabilidades de hibridación.

- Modificar las soluciones de prehibridación e hibridación; se recomienda para ARN mensajeros de baja abundancia la siguiente solución: SSC 6X o SSPE 6X (cuando se usa formamida), reactivo de Denhardt 5X, SDS 0.5%, ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado 100 µg/ml (Sambrook et al; 1989).

Los filtros hibridados considerando los puntos anteriores contenían las siguientes muestras: plásmido pRK172 (100pg), ARN total humano (20µg), ARN total (20µg) de ejes embrionarios de maíz incubados por 24 y 48 horas con y sin benciladenina.

Las condiciones de hibridación fueron las siguientes:

#### Prehibridación:

Temperatura: 45°C.

Tiempo: 24 horas.

Solución:

- SSC 6X
- Reactivo de Denhardt 5X
- SDS 0.5%
- Amortiguador de fosfatos 50mM
- ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml

#### Hibridación:

Tiempo: 24 horas

Temperatura: 45°C

Solución:

La misma que la de la prehibridación, a lo que se le añade la sonda marcada radiactivamente.

Porcentaje de incorporación de la marca: 45%

Actividad específica de la sonda:  $1.6 \times 10^3$  cpm/µg de ADN.

De estos ensayos sólo se obtuvo señal en el carril donde se encontraba la sonda, lo que indicaba que la sonda sí estaba hibridando contra sí misma, y por consiguiente estas condiciones son las correctas para la

hibridación ADN-ADN, pero en el caso del ARN humano donde se esperaba una señal positiva, no se encontró ninguna. Esto estaba indicando que algo estaba fallando en la hibridación ARN-ADN, lo que se estaba reflejando en la falta de señal de hibridación en las muestras de ARN de maíz.

Se probaron otras modificaciones en las condiciones de hibridación, entre ellas:

- Incluir en la mezcla de hibridación Sulfato de Dextrán como agente concentrador; este polímero aniónico excluye el agua, concentra la sonda y favorece por lo tanto la hibridación.
- Enriquecer los carriles con ARN mensajeros. Purificar el ARN total en columna de oligo-dT celulosa, con la cual se separan los ARN mensajeros poli-adenilados. Esto se hizo para las muestras de ARN humano.
- Incluir ARN de tejidos de maíz que se estén dividiendo activamente, para favorecer la cantidad de células en división y por lo tanto si este gen es regulado transcripcionalmente durante la división celular la cantidad de este mensaje para la hibridación también estará favorecida.

Para esto se trabajó con mesocotilos, debido a que en estos tejidos la mayoría de las células se están dividiendo.

Los filtros contenían las siguientes muestras: ARN polIA<sup>+</sup> humano, ARN polIA<sup>-</sup> humano, ARN total humano, ARN total de mesocotilo, plásmido pRK 172. Algunos de estos se hibridaron con las siguientes condiciones:

**Prehibridación:**

Tiempo: 5 horas.

Temperatura: 45°C

Solución:

- SSC 6X
- Reactivo de Denhardt 5X
- Amortiguador de fosfatos 50mM

- SDS 0.5%
- ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml

**Hibridación:**

Tiempo: 24 horas  
 Temperatura: 45°C.  
 Solución:

La misma que la de prehibridación, más la sonda radiactiva.  
 Actividad específica de la sonda:  $1 \times 10^6$  cpm/µg de ADN.

Otros filtros se hibridaron con las mismas condiciones excepto que contenían 10% de sulfato de dextrán extra.

En estos filtros encontramos solamente señal de hibridación en el carril con el ADN de plásmido, por lo que se consideró que ni el sulfato de dextrán, ni la separación de ARN mensajeros por la columna de oligo-dT celulosa daban alguna ventaja; así pues se siguió trabajando con ARN total y la mezcla sin sulfato de dextrán.

Posteriormente se trabajó con el inserto del plásmido correspondiente a la secuencia del ADNc del homólogo de p34<sup>cdc2</sup> humano como sonda, ya que de esta manera se evita que todo el vector se marque radiactivamente y por lo tanto, la radiactividad se utiliza para marcar solamente aquello que se va a hibridar con el mensaje que nos interesa; de esta manera también se favorece la cantidad de sonda radiactiva específica que se hibride con el ARN mensajero.

Para esto se cortó el plásmido con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI, de las cuales según el mapa de restricción de el plásmido pRK-172, (figura #4) se obtenían dos fragmentos, uno de 591 pares de bases que correspondía al 73% del inserto el cual se utilizaría como sonda, y otro segmento de 2.47 Kb que corresponde al vector y a un segmento de 225 pares de bases del inserto.

Además se varió otro factor, al incluir formamida en la hibridación.

La formamida actúa como agente desnaturalizante durante las hibridaciones separando los híbridos de ácidos nucleicos formados, por lo que

cuando se trabaja con ella para favorecer condiciones de alta especificidad, la temperatura que se utiliza es de 42°C y no de 68°C como la que se utiliza en condiciones sin formamida. Esto se hizo, ya que anteriormente en el laboratorio se habían realizado hibridaciones con estas condiciones para genes de histonas de maíz obteniéndose buenos resultados.

Partiendo de las condiciones para 100% de homología reportadas en los manuales (Sambrook et al; 1989), y considerando una homología entre la sonda y el ARN mensajero del homólogo de *cdc2* de maíz del 63%, se establecieron las siguientes condiciones de hibridación:

- 42°C con 50% de formamida. Estas condiciones se realizan para hibridaciones severas de 100% de homología; se utilizaron considerando las muestras de ARN humano en los filtros.
- 55°C. Esta la usamos también como condición de alta severidad, sin formamida.
- 40°C con 47% de formamida. Estas condiciones son para hibridaciones de menor severidad.

Los filtros utilizados para estos experimentos procedieron de un mismo gel que contenía las siguientes muestras: plásmido pRK172, ARN total humano (20µg), ARN total de ejes embrionarios de maíz incubados por 24 y 48 horas con y sin benciladenina (20µg).

Las condiciones con que se trabajaron estos filtros fueron las siguientes:

#### Prehibridación:

Tiempo: 3 horas

Temperatura: la indicada para cada experimento.

#### Solución:

- |                            |      |
|----------------------------|------|
| • SSC                      | 6X   |
| • SDS                      | 0.5% |
| • Amortiguador de fosfatos | 50mM |
| • Reactivo de Denhardt     | 5X   |

•ADN de esperma de salmón 100 µg/ml  
Más la cantidad de formamida en los experimentos donde se  
incluyó ésta.

**Hibridación:**

Tiempo: 24 horas

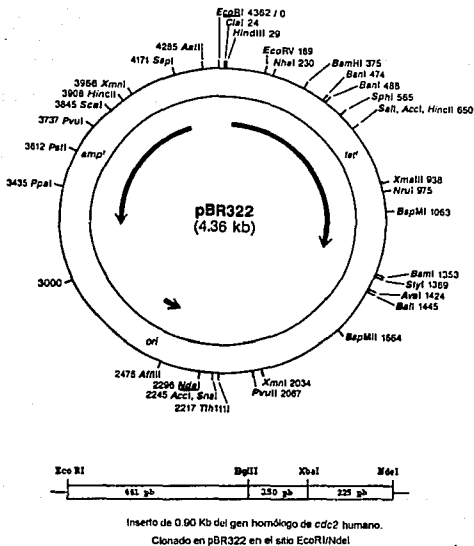
Temperatura: La indicada para cada experimento.

**Solución:**

La misma que para la prehibridación de cada ensayo diferente.

El resultado mostró que en todos los filtros hibridados la única  
señal fué la de la sonda; el ARN humano no estaba hibridando con la sonda.





**Figura#4.** Mapa de restricción del plásmido pRK-172 (Nurse & Bisset, 1981).

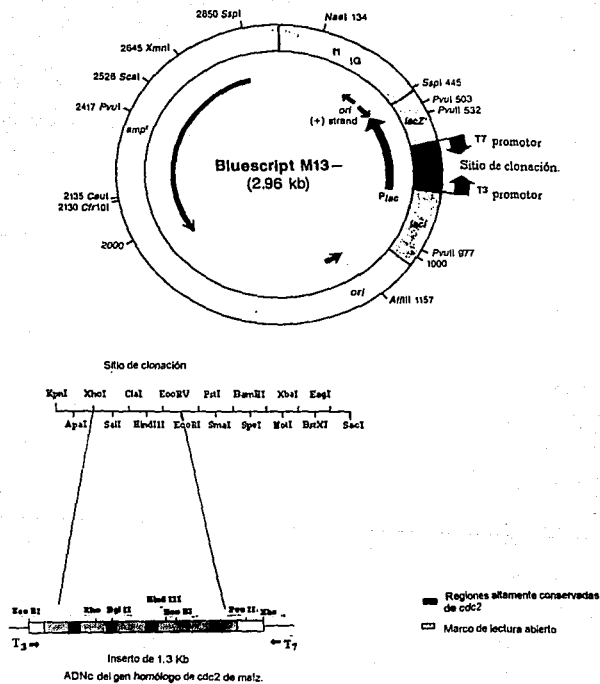


Figura #5. Mapa de restricción del plásmido p10a (Colasanti *et al.*, 1991).

Para entonces nos llegó el plásmido p10a que contiene el ADNc del gen homólogo de *cdc2* de maíz (Colasanti et al., 1991), el que se utilizaría como sonda 100% homóloga. Esto aumenta de manera crítica la probabilidad de hibridación y debido a que las hibridaciones de muestras de maíz con esta sonda se pueden llevar a cabo bajo condiciones de alta severidad, se favorece la detección de señales sobre el ruido de fondo.

De este plásmido se extrajo el inserto correspondiente al ADNc de *cdc2* con las enzimas de restricción SmaI y KpnI, lo que según el mapa de restricción (figura #5) nos daba dos fragmentos de ADN: uno de 1.4kb que correspondía al inserto, y otro de 2.8Kb que correspondía al vector. El inserto es el que se utilizó para todas las siguientes hibridaciones.

Con este inserto como sonda se realizó primeramente un Southern-blot.

El filtro hibridado contenía 7 muestras: ADN de maíz y ADN humano cortados con EcoRI, Hind III y Bam HI cada uno; además ADN de *Arabidopsis thaliana* cortado con Eco RI.

Este filtro se hibridó con las siguientes condiciones:

**Prehibridación:**

Tiempo: cinco horas

Temperatura: 65°C.

Solución (0.2ml/cm<sup>2</sup> de filtro):

- SSC 6X
- Denhardt's 5X
- SDS 0.5%
- Buffer de fosfatos 50mM
- ADN de espermatozoos de salmón 100µg/ml

**Hibridación:**

Tiempo: 24 horas.

Temperatura: 65°C.

**Solución:**

La misma que la de prehibridación, más la sonda radiactiva.  
Porcentaje de incorporación de marca radiactiva: 50%  
Actividad específica de la sonda:  $2.3 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g ADN.

**Lavados:**

Tiempo	Temperatura	Solución
•15 minutos	ambiente	SSC 2X, SDS 0.1%
•15 minutos	ambiente	SSC 0.2X, SDS 0.1%
• 1 hora	60°C	SSC 0.2X, SDS 0.1%

Exposición: cinco días (figura #6).

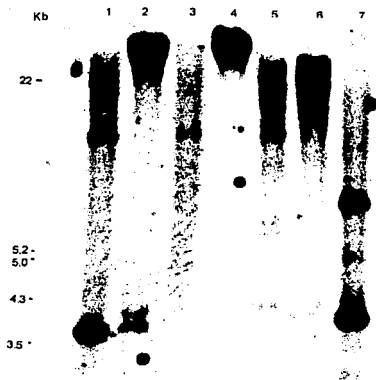
Se pueden apreciar señales de hibridación en todas las muestras, lo que demuestra la alta homología y conservación que guardan los genes homólogos a *cdc2* de los diferentes organismos, considerando que con la sonda de maíz observamos señales en todas las muestras; anteriormente se realizó un Southern-blot utilizando la sonda derivada del plásmido PRK172, en este experimento se analizaron las mismas muestras, y se observaron también hibridación en todas ellas (resultado no mostrado).

Las bandas observadas se encuentran en diferentes pesos moleculares, algo esperado debido a la diferente disposición de este gen en los genomas de los respectivos organismos.

Aunque con este ensayo no podemos estimar el número de copias de este gen, se puede apreciar que se encuentra poco representado, dado la presencia de pocas bandas de hibridación.

Esta misma sonda se utilizó para estudios de northern.

La cantidad del ARN mensajero buscado en el carril de muestra afecta de manera directa la probabilidad de hibridación de la sonda; esta cantidad de ARN mensajero puede estar variando por alguno de los siguientes factores: que el tejido tenga de por sí poco del ARN mensajero que estamos buscando o que se esté degradando en alguno de los pasos de manipulación, desde su extracción hasta la hibridación.



**Figura #6.** Southern-blot de ADN de ejes embrionarios de maíz cortado con Eco RI, Hind III y Bam HI (carril 1, 3 y 5 respectivamente); de ADN de linfocitos humanos cortado con Eco RI, Hind III y Bam HI (carril 2, 4 y 6 respectivamente); y ADN de *Arabidopsis thaliana* cortado con Eco RI (carril 7).

Para eliminar la posibilidad de degradación del ARN durante la extracción se adquirieron paquetes de extracción comerciales.

En estos ensayos se consideraron por lo tanto los siguientes aspectos:

- Muestras de ARN de alta calidad.
- Sonda 100% homóloga.

El primer filtro que se hibridó, tenía las siguientes muestras: ARN total de ejes embrionarios de maíz incubados por 0, 15 y 24 horas con y sin benziladenina (20µg por carril), y se transfirieron a filtro de nylon.

Las condiciones que se probaron para estas hibridaciones fueron las siguientes:

#### Prehibridación:

Tiempo: 3 horas

Temperatura: 65°C

Solución:

- |                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| • SSC                            | 6X       |
| • SDS                            | 0.5%     |
| • Amortiguador de fosfatos       | 50mM     |
| • Denhardt's                     | 5X       |
| • ADN de espermatozoos de salmón | 100µg/ml |

#### Hibridación:

Tiempo: 24 horas

Temperatura: 65°C

Solución:

La misma que la de la prehibridación, pero sin reactivo de Denhardt; más la sonda radiactiva.

Porcentaje de incorporación de la marca: 45%

Actividad específica de la sonda:  $1.23 \times 10^6$  cpm/µg de ADN.

De esta hibridación se obtuvo una señal muy tenue en el carril que corresponde a la muestra de 24 horas de incubación tratada con benciladenina (Resultado no mostrado).

La distancia de migración donde se ubica esta señal corresponde a un peso molecular aproximado de 1.4 kb, lo que corresponde con el peso molecular reportado para el mensaje del gen homólogo de *cdc2* de maíz (Colasanti et al., 1991).

Para aumentar la intensidad de la señal se consideró aumentar la cantidad de ARN total en los geles, para favorecer así la cantidad de mensaje a ser hibridado, por lo que para cada muestra se cargaron 100µg de ARN total.

Se realizó primeramente un Northern slot-blot, ya que como es un método más rápido que el northern-blot nos ayudaría a establecer las condiciones óptimas de hibridación en menor tiempo y una vez establecidas estas, se realizarían los northern-blot.

El northern slot-blot contenía las siguientes muestras:

ARN total de ejes embrionarios de maíz, incubados por 0, 6, 15, 20, 24, 36, y 48 horas con y sin benciladenina (100 µg por carril), ADN de maíz como control positivo de hibridación, ADN del fago lambda como control negativo de hibridación. Las muestras fueron transferidas a filtro de nylon y el filtro se hibridó con las siguientes condiciones:

#### Prehibridación:

Tiempo: Toda la noche.

Temperatura: 65°C.

La solución se hizo con las mismas concentraciones que en la anterior hibridación.

#### Hibridación:

Tiempo: 24 horas.

Temperatura: 65°C.

**Solución:**

La misma que para la prehibridación, con la diferencia que no contiene reactivo de Denhardt por ser filtro de nylon, y además la sonda radiactiva.

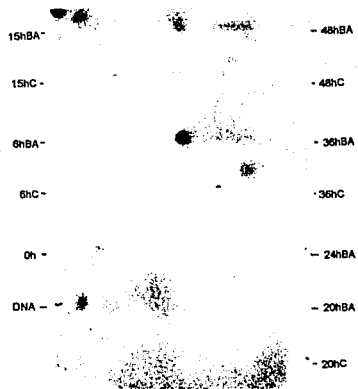
Porcentaje de incorporación de marca radiactiva: 38%

Actividad específica de la sonda:  $1 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g de ADN.

De este ensayo se pueden observar señales de hibridación (Figura #7), sobre todo en muestras de tiempos más largos de incubación (24 y 48 horas); estas señales son mayores en las muestras tratadas con benciladenina, especialmente en las de 24 y 48 horas. Además se aprecia que las señales aparecen antes en las muestras tratadas con benciladenina que en sus respectivos controles.

La técnica de northern slot-blot puede favorecer la aparición de señales inespecíficas de hibridación, ya que si en las muestras había una cantidad considerable de ADN contaminante, se hibridará con la sonda y la señal obtenida por la hibridación no corresponderá entonces directamente a los niveles del ARN mensajero; además, aunque las muestras se desnaturalizan antes de ser incorporadas al filtro, el ARN de las diferentes muestras no se expone a la sonda de igual manera, sobre todo en filtros con tanta cantidad de ácidos nucleicos (100 $\mu$ g) y esto puede influir en la hibridación.





**Figura #7.** Northern-slot de ARN total de ejes embrionarios de maíz incubados por diferentes horas y con diferentes tratamientos utilizando una sonda del homólogo de *cdc2* de maíz (BA: benciladenina, C: control, DNA: DNA de maíz).

Por lo tanto se decidió realizar los siguientes experimentos en geles desnaturalizantes de agarosa, es decir realizar northorn-blot; esta técnica, además de superar las anteriores desventajas, no indica el tamaño del mensaje.

Además en estos ensayos se incluyó un control de ARN. Para esto se aprovechó que el plásmido p10a es un vector de expresión, con el cual al infectar células de *E. coli* se puede inducir la expresión de la secuencia clonada, ya que se encuentra bajo el control de un promotor inducible, en este caso el promotor de lactosa. Al crecer las células transformadas en presencia de isopropilico  $\beta$ -D-galactósido (IPTG), se induce la transcripción de la secuencia clonada, en este caso del ADNc del gen homólogo de *cdc2* de maíz. Por lo tanto al transformar las bacterias con p10a y al incubarlas en presencia de IPTG se va a sintetizar una gran cantidad de ARN mensajero de esta secuencia; este ARN mensajero será idéntico a la sonda, por lo que será un buen control positivo de hibridación ARN-ADN.

Para esto, se comprobó primero que efectivamente al incubar células transformadas con p10a, en presencia de IPTG se induce la expresión de la secuencia clonada; y se establecieron las condiciones de hibridación para este ARN mensajero, mediante un ensayo de northorn-blot.

Esta hibridación se realizó a un filtro de nitrocelulosa que contenía las siguientes muestras: ARN total de células transformadas e inducidas con IPTG, ARN total de células transformadas no inducidas, y otro carril con 10ng de sonda.

Las condiciones de hibridación para este filtro fueron las siguientes:

**Prehibridación:**

Tiempo: tres horas.

Temperatura: 65°C.

**Solución:**

- |                            |      |
|----------------------------|------|
| • SSC                      | 6X   |
| • Amortiguador de fosfatos | 50mM |
| • Reactivo de Denhardt     | 5X   |

- SDS 0.5%
- ADN de esperma de salmón 100µg/ml

**Hibridación:**

Tiempo: 24 horas.

Temperatura: 65°C.

**Solución:**

La misma que para la prehibridación, pero sin reactivo de Denhardt y más la sonda radiactiva.

Porcentaje de incorporación: 54%

Actividad específica de la sonda:  $2 \times 10^8$  cpm/µg de ADN.

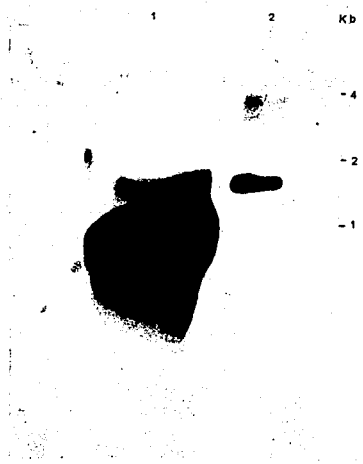
**Lavados:**

Tiempo	Temperatura	Solución
•15 minutos	Ambiente	SSC 2X, SDS 0.1%
•30 minutos	40°C	SSC 0.2X, SDS 0.1%
•1 hora	55°C	SSC 0.2X, SDS 0.1%

Exposición: dos días.

La figura #8 presenta el resultado de esta hibridación; se observan bandas de hibridación tanto en el carril con la sonda, como en el carril con el ARN total de las células transformadas e inducidas.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



**Figura #8.** Northern - blot de ARN total de *E. coli* transformada con p10a e inducidas con IPTG (Carril 2), Control positivo con plásmido p10a (Carril1).

Para el caso del ARN de células, se observan dos bandas, una de menor migración que corresponde al plásmido, y una de mayor migración que corresponde al mensajero del ADNc de *cdc2*; esta señal no se encuentra en la misma distancia de migración que la sonda, es decir del inserto extraído, pues este mensaje además del ADNc de *cdc2*, tiene un segmento de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, ya que el inserto clonado está fusionado a un segmento del gen para esta proteína, y se transcribe como un mensajero de mayor tamaño.

Con este experimento se pudo comprobar que el método de northern-blot estaba funcionando bien, por lo que tal vez lo que estaba afectando a los resultados para las muestras de maíz fuera la cantidad de mensaje, el cual probablemente sea bastante escaso en ejes embrionarios de maíz.

Las condiciones para la hibridación de este mensaje con la sonda eran buenas, por lo que se utilizaron para los posteriores ensayos de northern-blot.

Los filtros contenían las siguientes muestras: ARN total de células bacterianas transformadas con p10a e inducidas con IPTG, ARN total de células transformadas con p10a sin inducir, ARN total (100µg por carril) de ejes embrionarios de maíz de 0, 24 y 48 horas de incubación con y sin benziladenina.

En la figura #9 se muestra uno de estos filtros hibridados con las condiciones antes mencionadas. El tiempo de exposición para este filtro fué de 6 días.

Se encontraron señales de hibridación en todos los carriles y con aproximadamente igual intensidad a una distancia de migración de 1.4kb la cual corresponde al tamaño molecular reportado para el ARN mensajero homólogo de p34<sup>cdc2</sup> en maíz (Colasanti et al., 1991).

Por lo tanto en todas las horas de incubación de los ejes embrionarios con presencia o ausencia de BA, se encontró igual cantidad aproximada de mensaje desde las cero horas hasta las 48 horas.



**Figura #9.** Northern-blot de ARN total de: *E.coli* transformadas con p10a e inducidas con IPTG y de *E. coli* sin inducir (carriles 1 y 2 respectivamente), de ejes embrionarios de maíz incubados por 0, 24 y 48 horas con y sin benciladenina (carriles 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente).

## **D**iscusión.

Los diferentes protocolos para la hibridación de diferentes sondas buscan favorecer la tasa de hibridación mediante la manipulación de algunas variables, entre ellas: temperatura, volumen de la solución, concentración de la sonda, fuerza iónica, tiempo de hibridación, y condiciones de lavado.

El porcentaje de homología entre la sonda y el ácido nucleico buscado, afecta directamente la tasa de hibridación. En el caso de la hibridación entre el ARN mensajero del homólogo de *cdc2* de maíz y la sonda derivada del plásmido pRK172, las diferentes manipulaciones de las variables anteriores durante la hibridación no redundaron en ningún resultado positivo; la baja homología entre la sonda y el ARN mensajero, del 63%, afectó de manera determinante los resultados; esto se demuestra posteriormente al utilizar una sonda 100% homóloga derivada del plásmido p10a, con la cual se obtuvieron señales de hibridación.

La cinética de la reacción de hibridación es difícil de predecir a partir de consideraciones teóricas, en parte porque la concentración exacta del ácido nucleico inmovilizado y que está disponible a ser hibridado es desconocida. Esto se observó claramente en este caso, pues según los resultados parece ser que en ejes embrionarios de maíz existe una cantidad muy pequeña de este ARN mensajero, lo que dificultó más la obtención de señales de hibridación, aún utilizando una sonda totalmente homóloga.

Los resultados de los experimentos de Northern-blot nos indican lo siguiente (Figura #8):

- La señal de hibridación corresponde a un peso molecular de 1.4Kb, el cual es el reportado para el ARN mensajero del homólogo de *cdc2* de maíz (Colasanti et al., 1991).

•El mensaje de p34<sup>cdc2</sup> en ejes embrionarios de maíz es muy escaso, ya que se necesitó trabajar con 100µg de ARN total para poder detectar una señal de hibridación. La cantidad de este mensaje en ejes embrionarios de maíz, a diferencia de otros tejidos de maíz estudiados (Colasanti et al., 1991), podría ser independiente de la proliferación celular, o también podría deberse a que el número de células que se activan para proliferación sea comparativamente menor. Las células de tejidos meristemáticos de ejes embrionarios de maíz incubados por 24 y 48 horas se encuentran dividiéndose activamente. Sin embargo, la proporción de estas células en división activa es relativamente baja en cada tiempo, no mayor del 2%, (Baiza et al., 1989) lo que podría influir en la cantidad de mensajes de productos relacionados con el control del ciclo celular.

•El ARN mensajero de p34<sup>cdc2</sup> se encuentra desde las cero horas; esto indica que las células no necesitan transcribir este gen para tener la cantidad de proteína necesaria para la primera división celular, ni para las subsiguientes, comportándose como si fuera un mensajero de vida media larga, sugiriendo de esta manera que forma parte de los ARN mensajeros almacenados en la semilla durante el periodo de desecación anterior a la germinación. Por lo anterior se puede pensar que en ejes embrionarios de maíz el gen *cdc2* no está siendo regulado transcripcionalmente.

•El tratamiento con la benciladenina no parece estimular la cantidad de este ARN mensajero.

El experimento de Northern-blot se hizo por triplicado, obteniéndose los mismos resultados en todos los experimentos; sin embargo, el resultado del experimento de Northern-slot (Figura #7), nos indica resultados contrarios, ya que se observa claramente cómo el



tratamiento con benciladenina estimula la aparición de la señal de hibridación antes que en los controles sin benciladenina, principalmente en muestras de tiempos largos de incubación: 24 y 48 horas. Aunque los experimentos de Northern-slot favorecen la aparición de señales positivas falsas por el ADN contaminante que puedan tener las muestras, debe hacerse notar que en ninguna de las otras muestras se encuentran señales de la magnitud de las de 24 y 48 horas con benciladenina, lo que nos indica que se debe seguir trabajando al respecto para poder establecer con certeza la expresión transcripcional de este gen durante la germinación de ejes embrionarios de maíz y el posible efecto de la benciladenina.

Esto no excluye sin embargo la posibilidad de que las citocininas ejerzan su acción a través de la proteína p34, estimulando su cantidad y/o su actividad; esto se apoya en algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales se demuestra que el tratamiento con benciladenina de ejes embrionarios de maíz, produce un incremento en la actividad de cinasas totales, y más específicamente de cinasas independientes de calcio, entre las que se podría encontrar la proteína p34 (Reyes, J., Tesis de maestría).

La estimulación de la entrada a mitosis de las células de ejes embrionarios de maíz tratados con benciladenina podría ser por lo tanto el resultado de la estimulación de la actividad de esta enzima, para lo cual se deben seguir realizando experimentos que lo demuestren.

Además de levaduras y vertebrados, se han descubierto homólogos funcionales de p34<sup>cdc2</sup> en diferentes plantas lo que demuestra que esta proteína se encuentra muy conservada a lo largo de la escala filogenética; esto puede observarse en el experimento tipo Southern (Figura #6), donde se observan señales de hibridación en todos los carriles, los cuales contienen muestras de ADN de maíz, *Arabidopsis thaliana* y humano; lo que indica que por lo menos hay cuatro copias del gen en maíz o que existe más de un gen que codifique para proteínas homólogas de p34, ya que en el trabajo de Colasanti et al., (1991), encuentran por lo menos dos genes *cdc2* distintos, pero muy relacionados que guardan una homología del 96% entre sí.

Finalmente, aunque la hipótesis no pudo ser comprobada con certeza, los objetivos particulares en los cuales se planeaba aprender a manejar las técnicas que en esta tesis se utilizaron fueron cubiertos, el establecer si existe una relación entre el acortamiento del ciclo celular por el tratamiento con benciladenina y la estimulación de la transcripción del gen homólogo de *cdc2* en semillas de maíz a lo largo de la germinación y crecimiento necesita de más trabajo que en este momento se realiza en nuestro laboratorio.

# Referencias.

- Ackerson, R.C. (1984) *J. Exp. Bot.* **35**, 411.
- Albone, K.S., Gaskin, P., MacMillan, J. & Sponsel, U.M. (1984) *Planta* **162**, 560.
- Anderson, J.W., & Fowden, L. (1970) *Biochem. J.* **119**, 677.
- Balza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M., & Sánchez de Jiménez, E.. (1989). *J. Plant Physiol*, **135**, 416-421.
- Beach, D., Durkacz, B. & Nurse, P. (1982. *Nature* (London): **300** : 706-709.
- Berlyn, G.P. (1972). En: *Seed Biology*, vol 1, p.223 (Ed. T.T. Kozłowski), Academic Press, New York.
- Bewley, J.D. & Black, M. (1982). En: "*Physiology and biochemistry of seeds*", vol. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Burrows, W.J., Armstrong, D.J., Kamínek, M., Skoog, F., Bock, R.M., Hecht, S.M., Dammann, L.G., Leonard, N.J. and Occolowitz, J. (1970). *Biochemistry* **9**, 1867-1872.
- Chen, C.M. & Petschow, B. (1978). *Plant. Physiol.* **62**, 871-874.
- Chen, D., & Osborne, D.J. (1970) *Nature* **225**, 336.
- Chialante, d., Levi, M., Sgorbati, S: & Sparvoli, E. (1987). *Plant Science* **53**: 271-279.
- Colasanti, J., Tyers, M. & Sundaresan, V. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3377-3381.
- Come, D. (1980/81) *Is. J. Bot.* **29**, 145.
- Dommes, J. & Van de Walle, C. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 270.
- Doré, M. (1990). *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 269-273.
- Duke, S.H., Kafekuda, G., Henson, C.A., Loeffler, N.L. & van Hulle, N.M. (1986) *Physiol. Plant.* **68**, 525.
- Durkacz, B., Carr, A., & Nurse, P. (1986) *EMBO J.* **5**, 369-373.
- Elder, R.H., Dell' Aquila, A., Mezzina, M., Sarasin, A., & Osborne, D.J. (1987) *Mutation Res.* **181**, 61.
- Enoch, T., Nurse, P. (1990). *Cell* **60**, 665-673.
- Epstein, E., Cohen, J.D. & Bandurski, R.S. (1980) *Plant Physiol.* **65**, 415.
- Esashi, Y., Kotaki, K., & Ohhara, Y. (1976) *Planta* **129**, 109.
- Evenari, M., Klein, S., Anchoritt. & Feinbrunn, N. (1957). *Bull. Res. Council, Israel* **6D**, 33.
- Feller, H.S., Jacobs, T.W. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5397-5401.
- Ferreira, P.C.G., Hemeryk, A.S., Villarroel, R., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1991) *Plant Cell* **3**, 531-540.

- Frankland, B. & Wareing, P.F. (1966) *J. Exp. Bot.* **17**, 596.
- Galau, G.A. & Dure, L.S. (1980/81) *Is. J. Bot.* **29**, 81.
- Gallego, P., Hernández-Nistal, J., Martín, L., Nicolas, G., & Villalobos, N.. (1991). *Plant Science*, **77**, 207-221.
- Gee, M.A., Hagen, G. & Guilfoyle, T.J. (1991). *Plant Cell* **3**, 419-430.
- Gould, K.L., Nurse, P. (1989) . *Nature* **342**, 39-45.
- Grellet, F., Delseny, M., & Guillon Y. (1977) *Nature* **267**, 724.
- Grey, J.E. & Bryant, J.A. (1984) *Phytochemistry* **23**, 477.
- Grey, J.E., & J.A., Bryant, (1984). *Phytochemistry*; **23**, 477.
- Grierson, D., Chambers, S.E., & Penniket, L.P.. (1977). *Planta*, **134**, 29-34.
- Grost, J., John, P.C.L., & Sek, F. J. (1991). *Planta*, **185**, 304-310.
- Hall, M.A. (1986). En: *Hormones, receptors and cellular interactions in plants*, Eds. C.M. Chadwick & D.R. Garrod, Cambridge University Press, Cambridge, 69-89.
- Hangarter, R.P. & Good, N.E. (1981). *Plant. Physiol.* **68**, 1424-1427.
- Harvey, B.M.R., Lu, B.C., Fletcher, R.A., (1974). *Can. J. Bot.*: **52** : 2481- 2486.
- Hasson, E. & Poljakoff-Mayber A. (1980/81) *Is. J. Bot.* **29**, 98.
- Hewett, E.W., & Wareing, P.F. (1973) *Physiol. Plant.* **28**, 393.
- Higgins, J.T.V., Zwar, J.A. & Jacobsen, J.V. (1977). *Colloques International CNRS* No. **261**, 48.
- Hirt, H., Páy, A., Györgyey, J., Bakó, L., Németh, K., Bögre, L., Schweyen, R. J., Heberle-Bros, E. & Dudits, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1636-1640.
- Hornberg, C & Weller, E.W. (1984) . *Nature* (London) **319**, 321-324.
- Hunt, T. (1991). *Nature*: **350** : 462-463.
- Ihle, J.W., & Fowden, L. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5048.
- Ihle, J.N. & Dure, L.S. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5048.
- Ikuma, G. & Stobart, A.K (1960) *Plant Physiol.* **35**, 557.
- Ilan, I., & Gepstein, S. (1980/81) *Is Bot.* **29**, 193.
- Jacobsen, J.V. & Chandler, P.M. (1987). En: *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, p. 164 (Ed. P.J. Davies ), Nijhoff, Dordrecht.
- Jimenez, J., Alphey, L., Nurse, P. & Glover, D.M. (1990) *EXIBO J.* **9**, 3565-3571.
- John, P.C.L., Sek, F.J., Carmichael, J.P., & McCurdy, D.W. (1990). *J.of Cell Sci.*, **97**, 627-630.
- John, P.C.L., Sek, F.J., Lee, M.G. (1989) . *Plant Cell* **1**, 1185-1193.
- Jones, A.M., & Prasad, P.V., (1992). *BioEssays*: **14**: 43-47
- Karavaiko, N.N., Krawiarz, K., Khokhlova, V.A., Kulaeva, O.N., (1978). *Fiziol. Rast.*: **25** : 83.
- Kermode, A.R., Bewley, J.D., Dasgupta, J. & Misra, S. (1986) *Hort. Sci.* **21**, 1113.

- Ketring, D.L. (1977) en: *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, p. 157 (Ed. A.A. Kahn), North-Holland, Amsterdam.
- Kopecky, F., Sebanek, J. & Blazkva, J. (1975) *Biol. Plant.* **17**, 81.
- Krek, W. & Nigg, E.A. (1989) *EMBO J.* **8**, 3071-3078.
- Krek, W. & Nigg, E.A. (1989) *EMBO J.* **8**, 3071-3078.
- Krek, W., & Nigg, E.A.. (1991). *The EMBO J.*, **2**, 305-316.
- Kulaeva, O.N., (1981). En: *Metabolism and molecular activities of cytokinins*. (Ed. J. Guern and C. Peaud Lenoel). Sping-Verlag, Berlin.
- Lee, M.G., Norbury, C.J., Spurr, N.K. & Nurse, P. (1988) *Nature (London)* **333**, 676-679.
- Lee, M.G., Nurse, P. (1987) . *Nature* **327**, 31-35.
- Letham, D.S. (1978). *Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise*, Eds. D.S. Letham, P.B. Goodwin and T. J. V. Higgins, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, vol 1, pp. 205-263.
- Letham, D.S., Shannon, J.S., & McDonald, I.R. (1964) *Proc. Chem. Soc.* p.230.
- Libbenga, K.R., Maan, A.C., Van der Linde, P.C.G. & Mennes, A.M. (1986). En: *Hormones, receptors and cellular interactions in plants*, Eds. C.M. Chadwick & D.R. Garrod, Cambridge University Press, Cambridge, 1-68.
- Lieberman, M. (1979) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30**, 533.
- Marbach, I., & Mayer, A.M. (1985) *J. Exp. Bot.* **36**, 353.
- Mary, Y.Y., Chen, D., & Sarid, S. (1972) *Plant Physiol.* **49**, 20.
- Matthysse, A., & Abrams, M.. (1970). *Biochem. et Biophys. Acta.*, **199**, 511-518.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. (c) (1989). *The germination of seeds*. Pergamon Press. pp. 3-13.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. (b) (1989). *The germination of seeds*. Pergamon Press. pp. 23-37.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. (a) (1989). *The germination of seeds*. Pergamon Press. pp.1-3.
- Mifflin, B.J. & Lea, P.J. (1977). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 299-329.
- Milliborrow, B.V. (1974) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 259.
- Miller, C.O., Skoog, F., Salitza, M.H. von & Strong, F.M. (1955). *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1329.
- Miller, C.O. (1958) *Plant Physiol.* **33**, 115.
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J. V., Wu, M., & Hunt, T. (1989). *J. Cell Sci. Suppl.* **12**, 77-97.
- Momolani, E., Kinoshita, I., Yokomura, E., & Tsuji, H. (1990). *Plant Cell Physiol.*, **5**, 621-625.
- Murray, A.W., & Kirschner, M.W. (1990) *Science* **246**, 614-621.
- Naito, K., Tsuji, H., & Hatakeyama, I.. (1978). *Physiol. Plant.*, **43**, 367-371.

- Newton, R.P. & Brown, G.E. (1986) En: *Hormones, receptors and cellular interactions in plants*, p. 1115 (Eds. C.M. Chadwick and D.R. Garrod), Cambridge University Press, Cambridge.
- Nishinari, N., & Syono, K.. (1986). *Plant Cell Physiol.*, **27**, 147-153.
- Nishinari, N., & Syono, K..(1980). *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 383-393.
- Nurse, P. (1990) . *Nature* **344**, 503-508.
- Nurse, P., Fantes, P. (1981) En: *The cell cycle*, pp. 85-98, John, P.C.L., ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Nurse, P., Bisset, Y. (1981). *Nature*: **292** : 448-460.
- Osborne, D.J. (1983) *Can. J. Bot.* **61**, 3568.
- Osborne, D.J., Dell'Aquila, A. & Elder, R.H. (1984) *Folia Biologica (Praha)* Special Publication, 155.
- Paleg, L.G. (1962) *Plant Physiol.* **37**, 798.
- Parker, C.W., Letham, D.S., Gollnow, B.I., Summons, R.E., Duke, C.C., and MacLeod, J.K. (1978). *Planta*, **142**, 239-251.
- Penner, D., & Ashton, F.M. (1967) *Plant Physiol.* **42**, 791.
- Pinfield, N.J. & Stobart, A.K. (1972) *Planta* **104**, 134.
- Pollard, C.J. (1969) *Plant Physiol.* **44**, 1227.
- Popják, G. & Comforth, J.W. (1966). *Biochem. J.* **101**, 553-568.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K. & Salunkle, D.P. (1982) *Adv. Food Res.* **28**, 1.
- Reyes, J., Jiménez-García, L.F., Gonzalez, M.A. and Vázquez-Ramos J.M. (1991). *Seed Science Research* **1**,113-117.
- Reyes, J. (1991) *Tesis de maestría*.
- Sambrook, J., E.F., Fritsch; Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Sánchez-Martínez, D., Puigdomenech, P., & Pages, M. (1986) *Plant Physiol.* **82**, 543.
- Sanders, I.O., Smith, A.R., & Hall, M.A. (1986) *Physiol. Plant.* **66**, 723.
- Schonbeck, M.W., & Egley, G.H. (1980) *Plant Physiol.* **65**, 1149.
- Schonbeck, M.W. & Egley, G.H. (1980) *Plant Physiol.* **65**, 1149.
- Simpson, S.. (1977). *Plant Physiol.*, **59**, 4-9.
- Singh, S., Palni, L.M., & Letham, D.S.. (1992). *J. Plant Physiol.*, **139**, 279-283.
- Solomon, M.J., Glotzer,M., Lee, T.H., Philippe, M. & Kirschner, M.W. (1990). *Cell* **63**, 1013-1024.
- Spragg, S.P. & Yemm, E.w. (1959) *J. Exp. Bot.* **10**, 409.
- Stoddart, J.L. (1986). En: *Hormones, receptors and cellular interactions in plants*, Eds. C.M. Chadwick & D.R. Garrod, Cambridge University Press, Cambridge, 91-114.

- Sugita, M. & Sasaki, K. (1982) *Physiol. Plant.* **54**, 41.
- Summons, R.E., Entsch, B., Leham, D.S., Gollnow, B.I. and MacLeod, J.K. (1980). *Planta* **147**, 422-434.
- Sussex, I., Clutter, M., & Walbot, V. (1975). *Plant Physiol.*, **56**, 575-578.
- Thomas, T.H. (1977) En: *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, p.111 (Ed. A.A. Khan), North-Holland, Amsterdam.
- Thomas, T.H. (1977). En: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, p.111 (Ed. A.A. Khan), North-Holland, Amsterdam.
- Trewavas, A.J. & Blowers, D.P. (1990). En: *Current topics in Plant Biochemistry and Physiology*, V. 9. Randall, D.D. & Bierins, O.G. (Eds.). The interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology program., Univ. Missouri. pp. 153-163.
- Trewavas, A.J: (1982) *Physiol. Plant.* **55**, 60.
- Tsuji, H., Naito, K., Hatakeyama, I., & Ueda, K.. (1979). *J. of Exp. Bot.*, **119**, 1145 - 1151.
- Tucker, D.J. & Mansfield, T.A. (1971). *Planta* **98**, 157-163.
- Van der Zaal, E.J., Mennes, A.M., Quint, A. and Libbenga, K.R. (1987). *Plant Mol. Biol.*: **10** : 145-157.
- Van Staden, J. (1973) *Physiol. Plant.* **28**, 222.
- Vamer, J.E., Ram Chandra, G., & Chrispeels, M.J. (1965) *J. Cell. Comp. Physiol.* **66** (suplem. 1), 55.
- Vázquez-Ramos, J.M., & Reyes, J.(1990). *Can. J. Bot.* **68**, 2590-2594.
- Vázquez-Ramos, J.M. & Osborne, D. J. (1986). *Aut. Res.* **166** : 39-47.
- Venis, M.A. (1985). *Hormone Binding in Plants*. Longman, New York and London.
- Vertucci, C.W. & Vertucci, F.A. & Leopold, A.C. (1987) *Plant. Physiol.* **84**, 887.
- Villiers, T.A. (1968) *Planta* **82**, 342.
- Walton, D.C. (1980/81) *Is. J. Bot.* **29**, 168.
- Walton, D.C. (1980/81) *Is. J. Bot.* **29**, 168.
- Waters, L.C. & Dure, L.S. (1966) *J. Mol. Biol.* **19**, 1.
- Weller, E.W. & Wiczorek, U. (1981) *Planta* **152**, 159.
- Yokoyama, M., Naito, K. and Suzuki, H. (1980). *Ann. Bot.*; **45** : 649-653.
- Zarain, M., Bernal-Lugo, Irma, & Vázquez-Ramos, J.M..(1987). *Mutation Research*, **181**, 103-110.
- Zwar, J.A.. (1973). *J. of Exp. Bot.*, **81**, 701-710.