

00361  
12  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EXPRESION DE LOS GENES DE LAS  
HISTONAS H3 Y H4 DURANTE LA  
GERMINACION DEL EMBRION DE  
MAIZ.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A**

**CARLOS LUNA FERNANDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. J. FERNANDO MONTIEL A.**

**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.

## **AGRADECIMIENTOS.-**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas, gracias.
- A la Facultad de Ciencias por permitirme realizar la Maestría en Ciencias, gracias.
- A la Facultad de Química por permitirme permanecer y realizar la presente investigación, gracias.
- Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por darme la oportunidad de desarrollar la tesis, gracias.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber apoyado económicamente el proyecto de investigación, gracias.
- Al Dr. J. Fernando Montiel Aguirre por permitirme participar en el proyecto, apoyarme escrupulosamente y de manera desinteresada en las actividades y sin fin de circunstancias de la maestría y de la investigación y el de ser un excelente director, consejero, maestro, hombre y amigo, sinceramente gracias.
- Al Dr. Jorge Vazquez R. por apoyarme y asesorarme en la investigación, gracias.
- Al Dr. Guillermo Alfaro por permitirme trabajar en el laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología en momentos críticos de esta investigación bajo la asesoría de Venancio Ortega, Marcela Lizano, Rodolfo Benjamín y demás compañeros, gracias.
- A la Dra. Rocio Vargas del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM por asesorarme en las técnicas desarrolladas durante esta investigación, gracias.
- Al personal académico y administrativo de la Facultad de Química por permitirme desarrollar esta investigación sin complicaciones de consideración, gracias.
- Al M. en C. Sergio Lopez M. por su amistad y apoyo para la culminación de esta tesis, gracias.
- A mis profesores de la Facultad de Ciencias por tener la paciencia, amabilidad y desinterés por formarme, gracias
- A mi jurado por la lectura de la tesis, sus sugerencias, sus críticas y recomendaciones, gracias.
- A todos los compañeros, alumnos y técnicos del Departamento de Bioquímica por auxiliarme en muchos momentos de esta investigación y desde luego por su amistad, gracias.

- A los compañeros Edgar Vázquez, Rafael Cervantes, Eleazar Martínez, Fernando Díaz de León, Raquel Ortega, Cecilia Tortajada, Rogelio Rodríguez, Margarita Mendoza, Carmen Parra, Raúl Aguilar, Elpidio García, Felipe Cruz, Samuel Meléndez, Elisa Valenzuela, Alicia Gamboa, Jose Juan Zuñiga, Jorge Reyes, Patricia Coello, Jose Luis Busto, Ana Maria Velasco, Herminia Loza, Laura Camarena, Cristina Garcia y demás personas que me dieron su amistad y apoyo, gracias.

- A las señoritas Maria Vidal y Rocio Santos por su ayuda y amistad, gracias.

## **DEDICATORIA**

- A mis padres, Sabino Luna y Victoria Fernández por formar en mí el espíritu de lucha, de no rendición, de humildad, de perseverancia y amor, sinceramente gracias.

- A mi tutor, Dr. Fernando Montiel por haber creído en mí y no desesperar, gracias.

- A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma de Sinaloa por darme la prestancia y paciencia por el tiempo para la culminación de la maestría , gracias.

- A la UNAM por haberme dado algo de ella para la terminación de este paso en mi vida, gracias.

- A mi esposa, IRMA B. GRAVE por soportarme en todo momento y apoyarme bajo cualquier circunstancia. Sin ella, la culminación de este trabajo no hubiera sido alcanzado. Ella es la persona más importante para mí. Desde lo más hondo de mi corazón, gracias.

- A mis hijos, Carlos Alberto y Karla Isis Deyanira por soportar y perseverar la ausencia de su padre que se ha esforzado por buscarles lo mejor, un beso y abrazo para ellos, gracias.

- A mis familiares y amistades por apoyarme de mil formas y maneras tanto en lo personal como en lo familiar, gracias.

- A todas aquellas personas que por alguna razón se vieron involucradas en el desarrollo y culminación de esta carrera, gracias.

**ALGO DE MI...**

**El halo de vida, es prestado**

**el disfrute depende de ti**

**el gozo no debe ser aniquilado**

**la vida es bella, cuidarla es lo máspreciado.**

**La perseverancia es la base en la persona del éxito**

**defendiendo ideales se forman los pueblos**

**las personas, forman las culturas**

**las personas son los pueblos.**

**La obtención de de un beneficio**

**sea éste el que fuera, diverso o único**

**será alcanzado en base al esfuerzo, diverso o único**

**para la humanidad en su beneficio.**

**La humanidad espera de cada ser**

**la perseverancia, humildad, dignidad y esfuerzo**

**para que este planeta nuestro,**

**sea de nuestros hijos, un ser.**

## ABREVIATURAS

**ADN.-** Acido desoxirribonucleico.

**ARN.-** Acido ribonucleico.

**ARNm.-**Acido ribonucleico mensajero.

**ARNr.-**Acido ribonucleico ribosómico.

**ARNt.-**Acido ribonucleico de transferencia.

**pb.-** Un par de bases nitrogenadas.

**kd.-** Mil pares de bases nitrogenadas.

**HMG.-** Siglas del inglés *high mobility group* que significa grupo de proteínas con alta movilidad electroforética.

**ARS.-** Siglas del inglés *autonomous replication sequences* que significa secuencias con replicación autónoma.

**UTRs.-** Siglas del inglés *untranslated regions* que significa regiones no traducidas.

## **LISTA DE CUADROS.-**

**Cuadro 1.- Niveles de compactación del ADN.**

**Cuadro 2.- Organización de los genes de histonas.**

**Cuadro 3.- Bloques de homología 5' de los genes de las histonas.**

**Cuadro 4.- Bloques de homología 3' de los genes de las histonas.**

**Cuadro 5.- Niveles de ARNm de histonas de ratón durante el desarrollo embrionario temprano.**

**Cuadro 6.- Actividad de los polisomas de embriones de trigo durante la germinación.**



## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1a.- Modelo esquemático de los niveles de organización en el cromosoma eucariontico.
- Fig. 1b.- Cromosoma al microscopio electrónico durante la mitosis.
- Fig. 2.- Mapas moleculares de la unidad repetida de los genes de las histonas de tres especies de erizo de mar y *Drosophila melanogaster*.
- Fig. 3.- Comparación de secuencias de ADN de la región líder de los genes de histonas de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Psammechinus miliaris*.
- Fig. 4.- Arreglo de la región codificante de los 5 genes de histonas.
- Fig. 5a.- Ejemplos estructurales de varias semillas.
- Fig. 5b.- Esquema morfológico de plántulas.
- Fig. 6.- Síntesis de ADN y proteínas durante el ciclo celular de hamster.
- Fig. 7.- Mapa de restricción de los plásmidos pMS201 (pH<sub>1</sub>) y pBR-mu-hi-1-H4-Himf<sup>r</sup> (pH<sub>2</sub>)
- Fig. 8.- Gel preparativo de agarosa con los plásmidos pH<sub>1</sub> y pH<sub>2</sub>.
- Fig. 9.- Electroforesis de ARN en gel no desnaturalizante de agarosa
- Fig. 10.- Autoradiografía de filtro con ARN de maíz extraído de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos.
- Fig. 11.- Patrón autoradiográfico de ARN de maíz extraído de ejes embrionarios durante diferentes tiempos de la germinación.

Fig. 12.- Autoradiografía de filtro con ADN genómico de maíz y ratón digeridos con la enzima de restricción Eco RI.

Fig. 13.- Autoradiografía de filtro con ARN de maíz extraído a partir de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos.

Fig. 14.- Gráfica para el cálculo de la longitud de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Fig. 15.- Autoradiografía de filtros con ARN de maíz extraído a diferentes tiempos de imbibición.

Fig. 16.- Autoradiografía del filtro de la figura 15, rehibridado con  $pH_1$ .

Fig. 17.- Gel de ARN de maíz extraído de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos.

Fig. 18.- Autoradiografía del filtro correspondiente al gel de ARN desnaturizante descrito en la figura 17.

Fig. 18a.- Análisis densitométrico de la autoradiografía descrita en la figura 18.

Fig. 19.- Gel de ARN de maíz extraído de ejes embrionarios imbibidos por diferentes tiempos y de ARN de ratón.

Fig. 20.- Autoradiografía del filtro correspondiente al gel desnaturizante de ARN descrito en la figura 19.

Fig. 21.- Electroforesis en gel desnaturizante de ARN de maíz.

Fig. 22.- Autoradiografía del filtro correspondiente al gel de ARN descrito en la figura 21.

Fig. 23.- Electroforesis de ADN de maíz.

Fig. 24.- Autoradiografía del filtro del gel de ADN genómico descrito en la figura 23.

**Fig. 25.-** Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de maiz, *Lycium brevipes* y ratón.

**Fig. 26.-** Autoradiografía del filtro del gel de ADN genómico descrito en la figura 25.

**Fig.27.-** Autoradiografía de filtro de un gel de agarosa no mostrado de ADN genómico de maiz y ratón.

# C O N T E N I D O

## RESUMEN

1.- INTRODUCCION.	1
2.- ANTECEDENTES.	
2.1.- NUCLEOSOMA.	3
2.2.- LAS HISTONAS. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.	9
2.3.- LA ESTRUCTURA DE LAS HISTONAS.	10
2.3.1.- HISTONA H <sub>1</sub> .	11
2.3.2.- HISTONA H <sub>2</sub> A.	15
2.3.3.- HISTONA H <sub>2</sub> B.	18
2.3.4.- HISTONA H <sub>3</sub> .	21
2.3.5.- HISTONA H <sub>4</sub> .	24
2.4.- LOS GENES DE LAS HISTONAS. ORGANIZACION ESTRUCTURAL.	28
2.4.1.- LOS GENES DE LA HISTONA H <sub>1</sub> .	32
2.4.2.- LOS GENES DE LA HISTONA H <sub>2</sub> A.	34
2.4.3.- LOS GENES DE LA HISTONA H <sub>2</sub> B.	37
2.4.4.- LOS GENES DE LA HISTONA H <sub>3</sub> .	39
2.4.5.- LOS GENES DE LA HISTONA H <sub>4</sub> .	45
2.5.- LA EXPRESION DE LOS GENES DE LAS HISTONAS. CICLO CELULAR.	52
2.6.- LA GERMINACION. ASPECTOS GENERALES. LA GERMINACION DEL EMBRION DE MAIZ.	57
2.6.1.- DEFINICION DE SEMILLA.	57
2.6.2.- ALGUNAS DEFINICIONES DE GERMINACION.	59
2.6.3.- VIABILIDAD Y VIDA MEDIA DE SEMILLAS.	60

2.6.4.- EL VIGOR DE SEMILLAS.	61
2.6.5.- FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACION.	61
2.6.6.- METABOLISMO DE LA GERMINACION DE SEMILLAS.	64
2.6.7.- LA SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS , Y LA GERMINACION DEL EMBRION DE MAIZ.	65
3.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	73
3.1.- GENERALES.	
3.2.- PARTICULARES.	
4.- MATERIALES Y METODOS.	74
4.1.- MATERIALES.	
4.1.1.- MATERIAL BIOLOGICO.	74
4.1.2.- MATERIALES DE LABORATORIO.	74
4.2.- SOLUCIONES BASICAS.	75
4.3.- MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>E. coli</i> Y SOLUCIONES PARA LA TRANSFORMACION GENETICA CON PLASMIDOS RECOMBINANTES.	75
4.4.- SOLUCIONES PARA LA AMPLIFICACION Y AISLAMIENTO DE PLASMIDOS A PARTIR DE <i>E. coli</i> POR EL METODO DE LISADO CLARO (CLEWELL Y HELINSKI, 1969).	76
4.5.- SOLUCIONES PARA LA AMPLIFICACION Y AISLAMIENTO DE PLASMIDOS A PARTIR DE <i>E. coli</i> POR EL METODO DE LISIS ALCALINA DESARROLLADO POR BIRNBOIM Y DOLY (1979) Y MODIFICADO POR HOROWICZ (1981).	77
4.6.- SOLUCIONES PARA EL AISLAMIENTO DEL INSERTO DEL PLASMIDO.	77
4.7.- SOLUCIONES PARA AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ADN Y ARN DE HIGADO DE RATON	

( U OTRO TEJIDO) POR EL METODO REPORTADO POR KRIEG <i>et al.</i> , 1983a.	79
4.8.- SOLUCIONES PARA AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ARN TOTAL Y ADN DE ALTO PESO MOLECULAR A PARTIR DE TEJIDOS, ORGANOS Y SEMILLAS DE PLANTAS. POR EL METODO DE EXTRACCION CON CTAB, DESARROLLADO POR TAYLOR Y POWELL, 1982.	79
4.9.- SOLUCIONES PARA LA ELABORACION DE ELECTROFORESIS DE ADN, METODO DESARROLLADO POR JOHNSON Y GROSSMAN, 1977 Y MODIFICADO POR SMITH <i>et al.</i> , 1983.	81
4.10.- SOLUCIONES PARA LA ELABORACION DE ELECTROFORESIS DE ARN REPORTADO POR LEHRACH <i>et al.</i> , 1977 Y MODIFICADO POR THOMAS, 1980; GOLBERG, 1980.	82
4.11.- SOLUCIONES PARA LA TRANSFERENCIA DE GELES DE AGAROSA (ADN Y ARN) A SOPORTE SOLIDO (NYLON O NITROCELULOSA).	83
4.12.- SOLUCIONES PARA EL PROCESADO DE MARCADO DE LA SONDA CON p32.	83
4.13.- SOLUCIONES PARA PREHIBRIDACION E HIBRIDACION DE FILTROS DE ADN-ARN CON SONDAS RADIATIVAS.	84
4.14.- SOLUCIONES PARA REVELADO DE PLACAS DE AUTORADIOGRAFIA.	84
4.15.- SOLUCIONES PARA LA ELIMINACION DE RADIATIVIDAD INCORPORADA EN FILTROS, PARA SER REUTILIZADOS EN ENSAYOS DE HIBRIDACION (SEGUN MANIATIS <i>et al.</i> ,1982).	85
4.16.- METODOLOGIAS.	86
I.- TRANSFORMACION GENETICA DE <i>E. coli</i> CON UN PLASMIDO DETERMINADO .	86

II.- AMPLIFICACION Y AISLAMIENTO DE PLASMIDO A PARTIR DE E. coli TRANSFORMADA, POR EL METODO DE LISADO CLARO .	87
III.- AMPLIFICACION Y AISLAMIENTO DE PLASMIDO A PARTIR DE E. coli POR EL METODO DE LISIS ALCALINA .	89
IV.- AISLAMIENTO DE LA BANDA DE INTERES DE PLASMIDOS .	90
V.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ADN Y ARN DE CELULAS ANIMALES.	92
VI.- AISLAMIENTO DE ARN TOTAL Y ADN DE ALTO PESO MOLECULAR DE PLANTAS .	94
VII.- DIGESTION DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR Y ADN PLASMIDICO POR ENZIMAS DE RESTRICCION .	96
VIII.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.	96
IX.- TRANSFERENCIA A SOPORTE SOLIDO DE LOS GELES DE AGAROSA .	99
X.- MARCADO DE SONDA RADIOACTIVA A UNA ALTA ACTIVIDAD ESPECIFICA.	100
XI.- PREHIBRIDACION E HIBRIDACION DE FILTROS .	101
XII.- ELIMINACIÓN DE SONDAS RADIOACTIVAS DE FILTROS DE NITROCELULOSA Y NYLON .	103
5.- RESULTADOS.	104
6.- DISCUSION.	113
7.- CONCLUSIONES.	120
8.- REFERENCIAS.	121

## R E S U M E N

La germinación de las semillas es un evento primordial en la vida de las plantas. Se inicia con la imbibición y culmina con la protusión de la raíz. Los mecanismos que se ven involucrados entre estos dos eventos (la imbibición y la protusión) no son del todo claros. Sin embargo, dentro de los eventos que ocurren durante el período de germinación, toman relevante importancia la síntesis de proteínas, la replicación del material genético y la división celular. Se ha observado que estos eventos guardan una relación y un patrón de aparición característicos. Así, tenemos que la síntesis de proteínas es un evento previo a la replicación nuclear y por consiguiente a la división celular. La síntesis de proteínas en general, y en particular la de histonas, son un prerrequisito para que se verifique la replicación en las semillas en germinación. Se ha observado que la síntesis de histonas ocurre en las horas iniciales de la germinación, por lo que se piensa que esta síntesis temprana se puede deber a la existencia de ARNm almacenados en el embrión, o bien a la transcripción *de novo* de mensajes.

Por ello, en este trabajo se buscó conocer el momento en que ocurre la expresión de los genes de las histonas  $H_3$  y  $H_4$  y su organización en el genoma de maíz. Para ello, se estableció la siguiente estrategia:

- 1.- Aislamiento de ARN total de ejes embrionarios de maíz imbibidos a diferentes tiempos para su transferencia a soporte sólido.
- 2.- Identificación del momento de expresión por medio de hibridación con sondas heterólogas.
- 3.- Determinación de la organización de los genes de las histonas  $H_3$  y  $H_4$  de maíz por medio de restricción de ADN de alto peso molecular, transferido a soporte sólido e hibridado con sondas heterólogas.

La expresión de los genes de la histona  $H_4$  parece ocurrir **12 horas** después de iniciada la imbibición, aumentando gradualmente hasta las 48 horas y disminuyendo hacia las 72 horas; mientras que la transcripción de  $H_3$  parece ocurrir hacia las 36 horas, aumentando hacia las 48 horas, con un claro descenso hacia las 72 horas de iniciada la imbibición. Más que indicar expresión a tiempos diferentes durante la germinación de los genes de las histonas  $H_3$  y  $H_4$ , estos resultados podrían explicarse considerando que el ARN fue extraído de



diferentes lotes de semillas los cuales presentaron diferentes porcentajes de viabilidad y vigor. Ello puede ocasionar un desfase en los eventos moleculares durante la germinación, ya que semillas con baja viabilidad, presentan un retardamiento en los eventos moleculares ( síntesis de proteínas y replicación nuclear, entre otros). Lo anterior indica que la síntesis de proteínas histonas  $H_3$  y  $H_4$  se debe a la síntesis **de novo** de ARNm en los momentos iniciales de la germinación del embrión de maíz, como lo demuestra esta investigación y se apoya con otras en diferentes sistemas vegetales ( trigo y chícharo, entre otros).

Por lo que respecta a la organización de los genes de las histonas  $H_3$  y  $H_4$  en el genoma de maíz, nuestros resultados muestran la presencia de bandas dispersas en los experimentos de Southern, lo cual es indicativo de genes dispersos en el genoma de maíz. Además, se pudo observar que el patrón de dispersión en maíz es menor que en el de ratón.

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

Hoy en día uno de los mayores problemas que enfrenta el ser humano es el hambre; el acelerado crecimiento de la población y la injustificada distribución de la riqueza que han contribuido al enriquecimiento de unos pocos y a la aniquilación por hambre y desnutrición de millones de personas en el mundo. Aunado a lo anterior, la pérdida de la biodiversidad ( plantas y animales ) ha convertido paraísos en inhóspitos desiertos.

Por ello, el conocimiento profundo de la biodiversidad es primordial para preservar la vida y por ende nuestro habitat. Puesto que la alimentación es una necesidad de primer orden, ella debe de estar basada en productos que permitan un crecimiento y desarrollo armónico y saludable. Las distintas culturas han establecido criterios para su alimentación y han seleccionado de entre una gran diversidad vegetal y animal los fundamentales para su dieta. De este modo, los granos se han constituido como el alimento básico, lo cual ha llevado a la implementación día con día de nuevas formas de explotación, producción, almacenamiento, transportación, distribución, consumo e investigación. Esto último cobra mayor fuerza en la actualidad debido al exorbitante deterioro de la diversidad genética. Con ello, parte de la investigación que se realiza en la actualidad se halla encaminada a conocer a fondo los aspectos de la germinación, crecimiento y desarrollo de los granos de mayor importancia alimenticia. La germinación de semillas es primordial para el establecimiento en campo de la planta y con ello poder obtener una producción que satisfaga la alimentación. De esta manera, es necesario tener un conocimiento completo de los eventos que se verifican durante la germinación tales como el rompimiento de la dormancia, la viabilidad, la toma de agua, la respiración, la imbibición, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, la elongación y división celular, entre otros.

Durante la germinación, la síntesis de proteínas en general y la de histonas en particular juegan un papel importante en la reorganización del genoma. Se ha observado que ocurre una síntesis de proteínas histonas en los periodos tempranos ( 0-12 horas ) de imbibición, en donde esta se ha caracterizado como un evento previo para la reprogramación del genoma. Se piensa que dicha síntesis podría ser a partir de ARNm almacenado durante el desarrollo

embrionario de la semilla o bien a la síntesis *de novo* de mensajes ( Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Weck y Marcus, 1971; Zatlanova e Ivanov, 1988; Baiza *et al.*, 1989).

En animales, durante los estadios tardíos de la espermatogenesis la transcripción de los genes de las histonas se verifica antes de cada replicación del ADN nuclear y por ende antes de cada división celular, lo cual hace que la síntesis de histonas no sea simultanea con respecto a la del ADN. Sin embargo, la generalidad de las células animales muestran una expresión simultanea a la de los genes de histona durante la fase S del ciclo celular. Además, se han observado distintos niveles de expresión en otros estados del ciclo de vida (tanto en el número de transcritos como en la presencia de variantes) tales como en el desarrollo embrionario, crecimiento y diferenciación celular ( Arceci y Gross, 1977; Maxon *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1983).

Esta investigación se llevó a cabo con el fin de esclarecer el momento del inicio de la expresión de los genes de las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>, así como para discernir si en las primeras horas de la germinación la síntesis de histonas es dirigida por la existencia de ARNm de origen materno o bien si ocurre por síntesis *de novo*. Se partió de la hipótesis de que el inicio de la transcripción de los genes de las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> de maíz ocurre durante las fases tempranas de la germinación del embrión y se estableció la siguiente estrategia. Se obtuvieron geles de agarosa con ARN total de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos ( 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas ) el ARN fue transferido a soportes sólidos e hibridado con sondas heterólogas radiactivas de los plásmidos pH<sub>3</sub> y pH<sub>4</sub>. Además, para determinar que tipo de organización presentan los genes de histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> en el genoma de maíz se obtuvo y analizó ADN de alto peso molecular de maíz, ratón y *Lycium* restringido con diferentes enzimas.

En vegetales, la transcripción de los genes de las histonas ha sido caracterizada como un evento previo a la replicación del ADN y a la división celular en un gran número de especies ( Zarain *et al.*, 1987; Zatlanova *et al.*, 1987; Baiza *et al.*, 1989; Maxon *et al.*, 1983).

## E L N U C L E O S O M A

La estructura de la cromatina está basada en una unidad repetitiva denominada nucleosoma, formada por un conjunto de 8 moléculas de proteínas, las histonas, unidas por una secuencia de 146 pares de bases de ADN. El conjunto de las 8 histonas consiste de 2 moléculas de cada una de los cuatro tipos: H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub>. Además, una quinta proteína histona, la H<sub>1</sub>, se encuentra asociada con nucleosomas de muchos, pero no de todos, los tipos celulares. El ADN componente de los nucleosomas consta de un "núcleo" de 146 pares de bases, número que es altamente conservado y un "linker" (ADN de unión o ADN catenario) el cual varía de 10-100 pares de bases (pb), dependiendo del tipo de célula. El ADN se enrolla al conjunto de las histonas, formando una estructura esférica de cerca de 100 Å de diámetro. Estas estructuras se observan a lo largo de la fibra de 10 nm de la cromatina como cuentas ensartadas espaciadas de una manera regular (Kornberg y Klug, 1981). Las histonas fueron descubiertas en eritrocitos de ganso (Kossel, 1884; citado por Brachet y Mirsky, 1961) y en la glándula de timo de muchos vertebrados (Lillienfeld, 1894; citado por Brachet y Mirsky, 1961).

Kossel (1928) consideró a las histonas estar presentes en "el núcleo de algunas clases de células de tejidos". Sin embargo, Mirsky y Pollister (1942), haciendo extracciones de nucleohistonas con NaCl 1M, demuestran que las histonas se encuentran en el núcleo de muchos tejidos e incluso en núcleos somáticos de vertebrados. Estas, también fueron encontradas en plantas (Mirsky y Pollister, 1946; Belozerkii y Vryson, 1958). Por otro lado, Zubay y Watson (1959) reportaron que en bacterias las proteínas enlazadas al ADN no son histonas. Por lo tanto, tenemos que en el núcleo (desde las levaduras hasta el hombre) el material genético -ADN- forma una estructura denominada cromatina. En términos generales, consiste en una cantidad igual en peso de ADN y un grupo de proteínas básicas de bajo peso molecular, las histonas y además de una proporción variable de un grupo diverso de otras proteínas las cuales por conveniencia han sido llamadas "proteínas cromosomales no histonas". De este modo, la cromatina es virtualmente el material genético de los organismos superiores, con el ADN como material codificante de la información genética mientras que el conjunto de proteínas (histonas y no histonas) cromosomales son responsables del empaquetamiento, compactación y regulación de la actividad génica de dicho ADN.

El estudio de la cromatina por métodos de aislamiento se ha realizado desde 1959 (para revisión ver Fellenberg, 1974) pero no es sino

hasta 1974 ( Kornberg, 1974 ) cuando nuestro conocimiento de la misma se vuelve más claro en cuanto a su estructura, dado que anteriormente el punto de vista generalmente aceptado era que el ADN se enrollaba alrededor del conjunto de proteínas histonas y no histonas. En base a una amplia gama de evidencias, Kornberg propone un modelo basado en torno a una subunidad de cromatina, la cual esta formada de unidades repetidas, cada una constituida de un filamento de ADN de doble hélice de aproximadamente 146 pares de bases nitrogenadas y de dos de cada una de las moléculas de histonas H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>, las cuales forman una estructura octamérica constituida por un tetramero (H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>) y dos dímeros ( H<sub>2</sub>A-H<sub>2</sub>B). El ADN se encuentra alrededor del núcleo de histonas, promediando 1.75 vueltas alrededor de dicho núcleo. La presencia de una quinta histona, la H<sub>1</sub>, la cual interactúa con un segmento de ADN de aproximadamente 20 pares de bases, permite completar 2 vueltas del ADN alrededor del núcleo de histonas; esta última histona interactúa con ADN de unión o catenarío el cual tiene una longitud variable de 10-100 pares de bases ( para revisión ver Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1977; Lij-Eckhardt, 1977; Busch, 1978; Callan y Klug, 1978; Fenselfeld, 1978; Stein et al., 1978; Nicolini, 1979a y 1979b; Sonnerbichler, 1979; Taylor, 1979 ).

Para conocer lo anterior se tuvo que recurrir a una amplia gama de técnicas experimentales que permitieran entender el nivel de organización de la cromatina.

La organización del ADN presenta varios niveles en los organismos eucarióticos; ésta es dada por el nivel de condensación de la cromatina ( Sedat y Manuelidis, 1977; Bak et al., 1979a );

El primer nivel de organización del ADN se encuentra determinado por la formación de una estructura que da la apariencia de una cuerda o cordón con un conjunto de cuentas o esferas ensartadas con un espaciamento bien delimitado. A dicha estructura se le denominó cuerpos  $\nu$  ( la  $\nu$  es una letra griega que significa cuerpo esferoidal; Olins y Olins, 1974 ) o bien como nucleosoma (Oudet et al., 1975 ). Este presenta una estructura de 110 A de diámetro y 57 A de alto (Finch et al., 1977). Cabe aclarar que esta estructura es la resultante de la unión del ADN y el núcleo de histonas.

El segundo nivel esta representado por el plegamiento o enlazado de nucleosomas de manera regular formando una fibra de 30 nm con una frecuencia de 34 nucleosomas/nm (Woodcock, 1973; Olins y Olins 1973, 1974; Langmore y Wooley, 1975; Oudet et al., 1975; Foe et al., 1976). Esta fibra altamente condensada se encuentra en una íntima relación con la histona

H<sub>1</sub>, la cual es requerida para la formación de las estructuras en forma de rosarios o extendidos de nucleosomas. A esta estructura se le denomina **solenoides**, la cual presenta de 6 o 7 nucleosomas por vuelta (Finch y Klug, 1976; Thomas y Koller, 1981). La agregación de nucleosomas para formar el solenoide (estructura superior de la cromatina) parece ser un paso crucial en la represión de la expresión génica de ciertas áreas de la cromatina en células diferenciadas y este proceso parece ser condicionado por la fosforilación de H<sub>1</sub> (Weintraub, 1985) lo cual indica que puede actuar como un represor eucariótico (Wolffe, 1989; Sun et al., 1989).

Un tercer nivel de organización está representado por los cromosomas en su forma extendida, dado que las fibras de 30 nm están plegadas o agrupadas en "asas" o dominios dando lugar a estructuras que tienen en promedio 300 nm de longitud.

El cuarto nivel se refiere a una estructura que presenta en promedio 700 nm de diámetro y esta representada por cromatina altamente condensada la cual se puede observar en un segmento de una cromátida de un cromosoma en metafase.

El último nivel corresponde a un cromosoma completo en metafase (formado por dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero) el cual tiene en promedio 1400 nm de diámetro. En el cuadro 1 se muestran algunas otras características de las diferentes jerarquías o niveles de compactación del ADN.

Cuadro 1. Niveles de compactación del ADN.

NIVEL DE CONDENSACION	DIAMETRO (nm)	REQUERIMIENTO MOLECULAR	COMPACTACION DEL DN,	
			PARCIAL	TOTAL
I.-DNA	2-3	H <sub>1</sub>	7	7
Fibra de nucleosoma	10-11			
II.- Fibra de nucleosoma	10-11	Mg <sup>2+</sup>	6-12	42-84
Fibra solenoidal	25-50	(Ca <sup>2+</sup> , <i>in vitro</i> )		
III.- F. solenoidal	30	Mg <sup>2+</sup> pH <sub>1</sub> <sup>(1)</sup>	17.8/40	784-3360
Tubo/f. unitaria	200/400			
IV.- Tubo/fibra unitaria	300	NH <sub>p</sub> <sup>(2)</sup>	6.3/5	4710/16800
Cromosomas	>600			

Referencias. Sedat y Manuelidis, 1977; Bak et al., 1979a.

(1) Requiere que se fosforile H<sub>1</sub>.

(2) Requiere la presencia de proteínas cromosomales no histonas.

El nucleosoma ha sido generalmente aceptado como la subunidad de la cromatina, la cual como ya se dijo, se encuentra formada de la unión de ADN-Histonas en una relación estrechamente cercana de 1:1 y además de una pequeña cantidad de proteínas no histonas (las cuales pueden ser diferentes en relación al estado diferencial o funcional del núcleo ) que no sobrepasa la relación de 1:1 de ADN-Histonas.

En términos generales, la proporción de proteínas no histonas con ADN es de 0.6:1 y por otro lado la relación de ARN-ADN es de 0.1:1 ( Paulson y Laemmli, 1977 ).

Con base en las observaciones de la existencia de nucleosomas y de que cada nucleosoma está formado por segmentos de ADN de 200 pb, unidos estos por ADN de unión asociado a  $H_1$  (10-100 pb), se ha sugerido que un gen eucariótico de 10,000 nucleótidos podría estar asociado con 50 nucleosomas. De la misma manera, cada célula humana con  $6 \times 10^9$  nucleótidos de ADN tendría  $3 \times 10^8$  nucleosomas ( Kornberg y Klug, 1981; McGhee y Felsenfeld, 1980; Richmond et al., 1984 ).

Las proteínas cromosomales no histonas presentan una alta variedad de pesos moleculares. La mayoría de sus componentes son similares en una variedad de tipos de cromatina (Elgin y Bonner, 1970 ) mientras que otras son altamente específicas en células, órganos, tejidos y especies (Olson et al., 1974; Bonner 1979a y 1979b ). Las dos principales categorías de estas proteínas son:

\*Proteínas de empaquetamiento de ARNhn (Martin et al., 1973).

\*Proteínas diversas (Douvas et al., 1975 ).

Además, el 50% de las proteínas no histonas representan componentes estructurales de la cromatina y el 50% restante representan enzimas y proteínas ácidas involucradas en la actividad génica del núcleo ( Sevall et al., 1978; Wang y Kostraba, 1978 ). Se sabe que las HMG (HMG son la siglas en inglés de *high mobility group* que significa grupo de proteínas con alta movilidad electroforética ) se encuentran preferencialmente asociadas con regiones de cromatina activa (Weisbrod y Weintraub, 1979 ). Además, se menciona que las HMG-14 y HMG-17 enlazan con nucleosomas activados ( Weisbrod et al., 1980 ).

El modelo de Kornberg ( 1974 ) se haya apoyado en base a dos líneas experimentales : observaciones de la cromatina por microscopía electrónica y estudios bioquímicos y de difracción de rayos X (ver fig 1a-1d).

Por microscopía electrónica ( Olins y Olins, 1975 ) la cromatina se observa como una fibra de aproximadamente 100 Å de diámetro y que se conecta con segmentos de ADN de unión o ADN catenado. Lo anterior



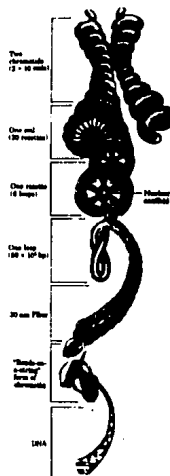


Figura 1a.- Modelo esquemático de los niveles de organización en el cromosoma eucariótico. Tomado de Lehninger et al., 1993.



Figura 1b.- Cromosoma al microscopio electrónico durante la mitosis. Tomado de Lehninger et al., 1993.

demuestra que la cromatina es una cadena de partículas esféricas que son separadas por regiones flexibles. Además, técnicas de difracción de rayos X permiten observar esta estructura como un cuerpo de dimensiones de  $110 \times 110 \times 55$  Å y formada por dos capas en donde los 146 pares de bases de ADN están alrededor del núcleo de histonas ( octámero ) formando una estructura superhelicoidal que le da 1.75 vuelta y presenta un grado de elevación entre hebra y hebra de ADN de 28 Å ( Finch et al., 1977 ).

La digestión con nucleasas ( DNAasa I y nucleasas micrococales ) ha permitido observar múltiples de monómeros de aproximadamente 200 pares de bases sobre un gel en el que el patrón electroforético muestra ( en función de la colección de fracciones en un gradiente de sacarosa ) la presencia de bandas claras monoméricas que representan a los nucleosomas ( Finch et al., 1975 ). Por otro lado, la reconstitución o reensamblado *in vitro* de nucleosomas ha demostrado la veracidad del modelo. Se sabe que una fibra de cromatina puede ser formada *in vitro* por adición de histonas al ADN de una variedad de organismos. También, se ha comprobado que la cantidad de ADN asociado con un nucleosoma en sistemas reconstituyentes *in vitro* es de aproximadamente 200 pb. Además, es necesaria la presencia en cantidades equimolares de  $H_2A$ ,  $H_2B$ ,  $H_3$  y  $H_4$  para la reconstitución del nucleosoma. Tal parecería que la histona  $H_4$  no es requerida en este sistema para permitir la reconstitución del nucleosoma ( Germond et al., 1979; Gilkin et al., 1984; Laskey et al., 1977; Mertz et al., 1982; Nelson et al., 1979; Sergeat et al., 1984; Sillman, 1986; Germond et al., 1975 ).

Las observaciones de Suda e Iwai ( 1979 ) en cuanto al arreglo del núcleo de histonas en el nucleosoma sirvieron de base para que Kornberg y Klug ( 1981 ) sugiriesen de manera concluyente que el tetrámero de  $H_3/H_4$  se encuentra ubicado en la parte central del nucleosoma y una de cada una de las histonas  $H_2A$  y  $H_2B$  se ubican a los extremos, cubriendo así a las histonas  $H_3$  y  $H_4$ .

## LAS HISTONAS. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.-

De manera general las histonas comparten un número variable de características, las cuales han permitido comprender cual es su estructura y con base en ella inferir ciertos aspectos de su actividad. Así, tenemos que el peso molecular es de 11,3 kd para  $H_1$ ; 15,3 kd -  $H_2$ ; 13,8 kd -  $H_2B$ ; 14,5 kd -  $H_2A$  y 21,0 kd -  $H_3$  (revisado por Isenberg, 1979). Presentan un alto contenido de cadenas laterales cargadas positivamente, donde aproximadamente uno de cada cuatro aminoácidos que las componen son lisina o arginina. Además, presentan distintas modificaciones postranscripcionales, las cuales dependen del estado funcional de la célula. Tales modificaciones pueden ser: acetilación, metilación, fosforilación y ADP-ribosilación y ubiquitinación. Estas proteínas están altamente conservadas a nivel de su secuencia de aminoácidos, siendo las más conservadas las histonas  $H_1$  y  $H_3$  (Isenberg, 1979).

Para determinar el grado de evolución de una determinada proteína se ha utilizado un parametro denominado UNIDAD DE PERIODO EVOLUTIVO (es el tiempo requerido para cambiar el 1% de una secuencia de aminoácidos después de la diversificación entre plantas y animales). Así, la unidad evolutiva de  $H_1$  y  $H_3$  es de 300 y 600 millones de años respectivamente, lo cual indica que la unidad referida es mucho mayor en estas proteínas comparada contra otras. Por ejemplo, el citocromo C requiere de 20 millones de años, la hemoglobina 6 millones de años y los fibrinopéptidos 1 millón de años (Darnell y Doolittle, 1986).

Asimismo, la alta conservación de la estructura de  $H_1$  y  $H_3$  sugiere que estas presentan una función crítica en el nucleosoma y que por ello han permanecido prácticamente invariables.

## LA ESTRUCTURA DE LAS HISTONAS.

Las histonas han sido divididas en tres grupos:

El grupo de la H<sub>1</sub>.- Este grupo se haya representado por un conjunto de variantes de H<sub>1</sub> que son muy ricas en lisina.

El grupo de H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B.- De la misma forma se encuentran variantes las cuales son moderadamente ricas en lisina.

El grupo de H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>.-Están más conservadas y son ricas en arginina.

Al ser fraccionadas por extracción parcial ( por incremento de la temperatura, reduciendo la concentración de NaCl, con la aplicación de urea o hidrocloreuro de guanidina a baja concentración y bajando el pH a menos de 7 o subiéndolo por arriba de 10 ), precipitación, cromatografía y electroforesis (Davison y Butler, 1954; Crampton et al., 1955; Daly y Mirsky, 1955; Moore, 1959) se ha descubierto que los tres grupos pueden asociarse en dos clases mayores (revisado por Brachet y Mirsky, 1961 ).

1.- Histonas ricas en lisina.- Donde la lisina aporta el 40% del nitrógeno, la alanina el 20% y la arginina el 5%.

2.- Histonas ricas en arginina.- Donde la arginina aporta el 28% del nitrógeno, la alanina el 7% y la lisina el 16%.

## HISTONA H<sub>1</sub>.

Es un grupo de histonas con peso molecular aproximadamente de 21,500 con 205 aminoácidos en promedio y una relación lisina/arginina aproximada de 1:4. Estas moléculas presentan tres distintos dominios estructurales:

1).-Una secuencia aleatoria enrollada en el segmento N-terminal que se ubica entre el residuo 1 al 39 de la cadena de aminoácidos.

2) Una región central globular de aproximadamente 2.8 nm de diámetro que se extiende del residuo 39 al 116, la cual es rica en aminoácidos no polares pero que contiene muchos de los residuos de aminoácidos ácidos.

3) Una región altamente básica, con un dominio conservado en el segmento C-terminal que contiene cerca del 40% de moléculas de lisina (Chapman et al., 1976); éste último segmento se enlaza fuertemente con ADN.

La unión de H<sub>1</sub> ( en el extremo C-terminal ) con el ADN de unión permite el enrollamiento en una fibra de 10-11 nm siendo el primer nivel de condensación de la cromatina (Bradbury et al., 1973b). Se conoce que la longitud promedio del ADN de unión entre nucleosomas puede variar de una especie a otra ( Compton et al., 1976; Johnson et al., 1976; Lohr et al., 1977 ), de un tejido a otro ( Morris, 1976b) y en diferentes tipos células dentro de un tejido ( Thomas y Thompson, 1977; Todd y Garrard, 1977 ). La alta capacidad de modificación de H<sub>1</sub> permite encontrar una amplia gama de variantes estrechamente relacionadas (Pangin y Chalkley, 1969a y b; Hohmann, 1978 ) las cuales están presentes en varias proporciones en diferentes tejidos y sujetas a diferentes formas de fosforilación y ADP/ribosilación.

Se asume que una molécula de H<sub>1</sub> interactúa con el nucleosoma en dos partes: el C-terminal de H<sub>1</sub> con aproximadamente 20 pb del ADN de unión en un lado o extremo del nucleosoma y el N-terminal con otros 10 pb del ADN de unión en el otro extremo cercano a la entrada del nucleosoma. La región globular (más conservada) de H<sub>1</sub> no interactúa íntimamente con el núcleo de histonas; la interacción se da con mayor fuerza con H<sub>2</sub>A (Boulikas et al., 1980).

Además, H<sub>1</sub> esta involucrada en el superenrollamiento de la cromatina para formar el solenoide (25/30 nm diámetro) el cual presenta de 8-10 nucleosomas por vuelta; la H<sub>1</sub> se localiza en el interior de los

solenoides formando así un esqueleto helicoidal, lo cual revela que la H<sub>1</sub> puede participar en la formación de la superestructura de la cromatina ( Elgin y Weintraub, 1975).

La evidencia que existe indica que H<sub>1</sub> es la histona menos conservada ( Cole, 1977; Isenberg, 1979 ) en la escala evolutiva y que su alta tasa de modificación permite que enlace preferencialmente con secuencias de ADN repetitivo en heterocromatina ( Blumenfeld et al., 1977 ). Ello sugiere que H<sub>1</sub> podría tener un papel multifuncional-estructural en la condensación y descondensación de la cromatina (Griffith y Christensen, 1977; Renz et al., 1977; Thoma y Koller, 1977; Worcel y Benyajati, 1977).

Con el descubrimiento de la fosforilación de las histonas en 1966 ( Kleinsmith et al., 1966a; Ord y Stucken, 1966 ) y de las observaciones simultáneas de que la fosforilación de proteínas nucleares es significativa durante los estados tempranos de la activación génica (Kleinsmith, 1966b) como posible factor en el control de la transcripción y de la compactación de cromosomas en la mitosis ( Kornberg y Klug, 1981), se ha sugerido que este proceso está jugando un papel regulatorio en los periodos iniciales de activación génica, dado que se ha observado que las histonas se fosforilan justo antes de que se dé el proceso de compactación de los cromosomas. Esto podría indicar que este proceso actúa como un disparador de la condensación de la cromatina en el inicio de la profase (Kornberg y Klug, 1981; Bradbury, 1974 ).

La H<sub>1</sub> y las HMG parecen ser las proteínas más altamente fosforiladas en el núcleo (Elton y Reeves, 1986; Lund et al., 1985; Palvino y Linnala-Kankkunen, 1989 ).

La fosforilación de H<sub>1</sub> es evidente por la presencia de varios sitios de fosforilación, uno de ellos claramente dependiente de AMPc (Langan, 1971). Este, se da en el residuo 37 de serina en timo de conejo y en la posición 38 en timo de ternera.

De este modo, las modificaciones de H<sub>1</sub> por AMP cíclico dependiente de cinasas parecen tener una relevancia para el control de la transcripción *in vivo*. La significancia fisiológica de la modulación de la estructura de la cromatina por una fosforilación dependiente de AMPc de H<sub>1</sub> se reafirma por el hecho de que una enzima específica para la desfosforilación de serina 37 ha sido detectada y aislada ( Meisler y Langan, 1969 ).

Además del tipo de fosforilación mediada por AMPc (Langan, 1978 ), existe otro que ha sido designado como "asociado al crecimiento". Este tipo se verifica en sitios de las regiones amino y carboxilo terminales de

la proteína. De acuerdo a la secuencia de H<sub>1</sub> de timo de conejo (Cole, 1977) y de timo de trucha (Macleod et al., 1977), los residuos que son fosforilados son Thr 143, Thr 162, Ser 189 y Thr 16.

Matsumoto et al., (1980) observan que en células cancerosas de ratón, la línea mutante en la cual se encuentra deficiente la fosforilación de histonas (y principalmente H<sub>1</sub>) también muestra una deficiencia en la condensación de la cromatina en fase S.

Otras evidencias indican la alta heterogeneidad de la histona H<sub>1</sub>. Se sabe que en varios tejidos de plantas se han identificado formas alternas de esta proteína (Nadeau et al., 1977). En maíz, se han encontrado 4 subfracciones de H<sub>1</sub> que son electroforéticamente distintas y el modo de herencia de sus genes indica que ellos resultan de alelos diferentes localizados en distintos cromosomas (Stout y Phillips, 1973). Esta alta heterogeneidad de H<sub>1</sub> ha sido confirmada recientemente y tal parece que forma una familia de isoproteínas (Cole, 1984). Estos subtipos de H<sub>1</sub> difieren en su capacidad para condensar ADN o cromatina (Roche, et al., 1985).

Otros investigadores como Ivanchenko et al., (1987) han demostrado que la histona H<sub>1</sub> en maíz presenta al menos 6 distintas isoformas y sugiere que al menos existen 5 a 6 genes de H<sub>1</sub>. Estos resultados son complementarios a las observaciones hechas por Hurley y Stoot (1980), en el sentido de la existencia de una heterogeneidad de H<sub>1</sub> en maíz en base a las observaciones obtenidas por secuenciación parcial de la banda superior encontrada en un gel ácido acético/urea, lo cual sugiere que las dos bandas están estrechamente relacionadas y son producto de diferentes genes.

Otro de los procesos postranscripcionales que se presentan en las histonas es el de acetilación (proceso que neutraliza la carga positiva de residuos de lisina, dando lugar a una reducción de la carga neta positiva en el extremo N-terminal del núcleo de histonas en el nucleosoma) (Doenecke y Gallwitz, 1982).

Se ha observado que la acetilación de H<sub>1</sub> no ocurre *in vivo* (Nelson, 1982; Zhang y Nelson 1986). Sin embargo, se ha observado acetilación reversible de residuos internos de lisina en proteínas no histonas HMG-1 y HMG-2 de timo de ternera (Sternier et al., 1979) y HMG-14 y HMG-17 de eritrocitos de pato (Sternier et al., 1981). La acetilación *in vitro* se ha observado en H<sub>1</sub> con la utilización de drogas que permiten la acetilación de residuos de lisina (Wong y Marushige, 1976; Mannironi y D'Incalci, 1988).



Por otro lado, la metilación de H<sub>1</sub> tampoco ocurre *in vivo*; sin embargo, una distorsión del estado normal de la cromatina, inducido por la adición de policationes cuando se aíslan núcleos de hígado de rata, permite observar una metilación aberrante de H<sub>1</sub> para producir ε-N-monometil-lisina (Byvoet et al., 1978).

Por último, el proceso de ADP-ribosilación ha sido observado tanto en histonas como en proteínas no histonas (Veda et al., 1975; Wong et al., 1977; Giri et al., 1978a). Las modificaciones sufridas en H<sub>1</sub> por la ADP-ribosilación se han observado *in vivo* (Veda et al., 1975). En estos casos, el polímero se une covalentemente a una de las dos histonas H<sub>1</sub> del complejo dimerico cuando se presenta este proceso (Byrne et al., 1978).

Aún no se conoce a ciencia cierta que están originando estos procesos postranscripcionales en H<sub>1</sub>; *in vitro* se ha observado que forman estructuras aberrantes.

## HISTONA H<sub>1</sub>A

Esta histona, junto con H<sub>1</sub>B forma el conjunto de proteínas cuya constitución química es medianamente rica en residuos de lisina. La H<sub>1</sub>A presenta un peso molecular promedio de 13,960 con aproximadamente 129 residuos de aminoácidos y una relación lisina/arginina de 1.7 (Elgin y Weintraub, 1975; Sautiere et al., 1975). Comparaciones de estructura primaria demuestran que entre la ternera, la rata, la trucha y el erizo de mar existen pequeñas diferencias, muchas de ellas conservativas, esto es, que no afectan la carga o que no modifican la estructura secundaria (Elgin y Weintraub, 1975).

De la misma manera, la H<sub>1</sub>A presenta variaciones limitadas en cuanto a su estructura en diferentes estados del desarrollo y en tejidos específicos (Blankstein y Levy, 1976; Cohen et al., 1975). También presenta una serie de modificaciones postranscripcionales ( para revisión vease a Reeves, 1984 ), incluyendo la unión con péptidos de ubiquitina (Goldknopf et al., 1980). Estas modificaciones son consideradas como moduladores del control de la expresión génica durante el desarrollo del erizo de mar, lo cual resulta en la síntesis de diferentes variantes determinadas a lo largo del período embrionario de rápida división celular y morfogénesis de tejidos ( revisado por Maxson et al., 1983 ).

West y Bonner (1980a) demostraron que en mamíferos la H<sub>1</sub>A presenta más formas variantes que todas las demás histonas del octámero. En el pollo, se han encontrado 4 variantes de ésta, las cuales pueden ser clasificadas en 2 grupos: dos variantes homeomórfas H<sub>1</sub>A.1 y H<sub>1</sub>A.2 ; y dos variantes heteromórfas H<sub>1</sub>A.x y H<sub>1</sub>A.z. Estas últimas están siempre representadas por 5 a 20% del total de las histonas H<sub>1</sub>A en células de mamíferos .

La ubiquitinación es un evento postranscripcional que consiste en la unión de un péptido de ubiquitina a proteínas citoplasmáticas, las cuales son blancos de degradación en ciertos momentos del ciclo de vida de los organismos (revisado por Reeves, 1984). Varios estudios han asociado el ubiquitinado de histona H<sub>1</sub>A (uH<sub>1</sub>A) con cromatina activa, como ha sido demostrado por las observaciones en eritrocitos de pollo que contienen complejos uH<sub>1</sub>A (Goldknopf et al., 1980).

Por otro lado, la acetilación de histonas parece tener un importante papel en la regulación de la transcripción génica (Reeves,

1984 ). La acetilación es un proceso que permite que un aminoácido (específicamente una lisina ) cambie su carga neta positiva en su extremo N-terminal a carga neta negativa por la incorporación de un grupo acilo por la acción enzimática mediada por acetilasas. El cambio, reversible en algunos casos por la entrada de agua y catalizado por una deacetilasa, permite que el aminoácido adquiera carga neta positiva.

La evidencia que indica que el proceso de acetilación presenta un papel importante en la regulación de la transcripción génica considera el hecho de que este proceso representa un enorme potencial para la variación de la estructura y producción de isómeros estructurales del núcleo de histonas del nucleosoma. Además, es posible la acetilación de un número diferente de nucleosomas localizados en las distintas regiones de la cromatina, con lo cual se pueden observar distintos patrones cuando son comparados entre sí diferentes especies, líneas celulares y situaciones fisiológicas (Csordas, 1990 ).

El término hiperacetilación se refiere a un nivel de acetilación por arriba de aquel encontrado habitualmente y que es adquirido por el tratamiento de las células con butirato. Por otra parte, el término "altamente acetilado" se refiere a un patrón no aleatorio dado por una situación fisiológica; por ejemplo, cuando se da el desplazamiento de histonas por protaminas durante el estado tardío de la espermatogénesis en la trucha (Christensen et al., 1984 ) donde las histonas tienden a ser acetiladas en un alto grado ( Csordas, 1990 ).

Por último, existe una extraordinaria gama de evidencias de que la acetilación postsintética de histonas está íntimamente asociada con la activación de la cromatina para la transcripción genética en eucariotes (Allegra et al., 1987; Johnson et al., 1987; Sterner et al., 1987 ). Además, se ha sugerido que la acetilación puede ser una señal específica para :

- a).- Remoción de las histonas durante la replicación del ADN (dado que se ha observado la ausencia de éstas durante este proceso).
- b).- Reemplazamiento de histonas en los procesos de diferenciación ( protaminas por histonas ).
- c).- H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B son removidas durante la transcripción al igual que H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> ( Loidl, 1988 ).

La fosforilación, al igual que la acetilación también se presenta en la histona H<sub>2</sub>A, pero en menor grado comparado con la H<sub>2</sub>. Esta fosforilación es constante a través del ciclo celular, lo que la hace diferente con respecto a las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>, en que estas se hayan fosforiladas en ciertos estados específicos (por ejemplo, la máxima

fosforilación de H<sub>1</sub> es en fase S y en momentos específicos durante la embriogénesis del erizo de mar (Cohen et al., 1975). Se cree que la fosforilación de H<sub>1A</sub> a lo largo del ciclo celular está íntimamente relacionada con la condensación de la heterocromatina (Gurley et al., 1978).

Durante el crecimiento temprano de plántulas de trigo y alfalfa, la fosforilación de las variantes H<sub>1A</sub> ocurre en el extremo C-terminal el cual presenta una región rica en aminoácidos básicos, con algunos hidroxiaminoácidos, prolina y alanina (Brandt et al., 1986; Rodrigues et al., 1985 y Rodrigues et al., 1988). Dicha región presenta unos tetrapéptidos de 2-3 serina-prolina (*sp*) unidos y adyacentes a un par de aminoácidos básicos; estos tetrapéptidos *sp* son conocidos como sitios de fosforilación en la región C-terminal de H<sub>1</sub> de vertebrados (Poccia et al., 1987). Se piensa que la alta fosforilación de H<sub>1A</sub> es una señal para la disociación del nucleosoma, ya que se ha observado que las H<sub>1A</sub> y H<sub>1B</sub> son las primeras histonas en disociarse del nucleosoma cuando se entra a un estado activo de transcripción de la cromatina (Spiker et al., 1987).

Por otra parte, en H<sub>1A</sub> no ocurre la metilación *in vivo* (Izenberg, 1979). Además, la ADP-ribosilación ocurre a muy bajo nivel; está dada a nivel postranscripcional y la función biológica de ambos procesos no es conocida (Izenberg, 1979).

Existen diferencias a nivel de la composición de aminoácidos y de movilidad electroforética entre las histonas H<sub>1A</sub> y H<sub>1B</sub> de animales y plantas. Se ha observado que las H<sub>1A</sub> de plantas presentan una menor movilidad respecto a su contraparte animal lo cual es atribuible a diferencias en estructura primaria (Spiker, 1982). En trigo se ha observado que H<sub>1A</sub> presenta 3 variantes cuyo peso molecular varía de 16,000 a 19,000 daltons, y su presencia en proporción es equimolar (Spiker, 1982).

La composición de aminoácidos de las diferentes variantes de H<sub>1A</sub> en plantas se caracteriza por una alta concentración de glicina y leucina y una baja proporción de serina (Spiker, 1982).

## HISTONA H<sub>2</sub>B

Al igual que H<sub>4</sub>, la H<sub>2</sub>B forma parte del conjunto de proteínas cromosomales que son moderadamente ricas en lisina. Esta presenta un peso molecular de 13,774 daltones con aproximadamente 125 aminoácidos y una relación lisina/arginina de 2.5 (Elgin y Weintraub, 1975). Al igual que H<sub>4</sub>, la secuencia de su estructura primaria presenta un alto nivel de conservación, ya que comparaciones entre varias especies indican que los pequeños cambios observados son conservativos (no modifican la carga neta o no se altera su estructura secundaria). En solución acuosa y a baja concentración iónica la estructura secundaria de H<sub>2</sub>B en la mayoría de los casos estudiados muestra una alta correlación con  $\alpha$ -hélice cuando las cargas positivas son neutralizadas con la adición de sal (Tuan y Bonner, 1969). A nivel de secuencia de aminoácidos existe una mayor asimetría que en el caso de H<sub>4</sub>, ya que en la H<sub>2</sub>B la relación de lisina/arginina es del orden de 1.6 veces superior al de H<sub>4</sub> (Elgin y Weintraub, 1975). Además, la presencia de aminoácidos ácidos es menor en porcentaje al de H<sub>4</sub>; en H<sub>2</sub>B es de 13% (en H<sub>4</sub> es de 15%) (Isenberg, 1979).

Gracias al modelo de Kornberg y Klug (1981) se sabe que en la región de aminoácidos básicos de H<sub>2</sub>B se ubican los sitios que enlazan con ADN y que la región central hidrofóbica interactúa con las otras proteínas (histonas y no histonas), lo cual sugiere importantes interacciones que permiten que la estructura y función del nucleosoma se mantenga (Wu y Bonner, 1984).

Las variaciones en estructura primaria en H<sub>2</sub>B se han observado en diferentes especies de vertebrados (Alfageme et al., 1974; Cohen et al., 1975; Franklin y Zweidler, 1977; Isenberg, 1979; Wu et al., 1982) y también entre diferentes estados de desarrollo embrionario del erizo de mar (Cohen, et al., 1975; Poccia y Hinegardner, 1975).

Por otro lado, en trigo se ha observado que H<sub>2</sub>B presenta 6 formas (isoproteínas) las cuales eluyen diferencialmente en cromatografía de exclusión y de acuerdo a su distinta movilidad en geles de poliacrilamida/SDS, se han estimado pesos moleculares de 15,300 a 19,000 daltones (Spiker, 1982).

Dentro de los mecanismos postraduccionales que se observan con mayor frecuencia en H<sub>2</sub>B se hayan la acetilación reversible, la cual ocurre en el grupo  $\epsilon$ -amino de residuos específicos internos de lisina localizados

en el dominio altamente básico N-terminal del núcleo de histonas (Reeves, 1984). El carácter altamente conservado de las proteínas histonas sugiere que la secuencia entera de la cadena del polipéptido es indispensable y se piensa que la alta conservación de posiciones de acetilación es fundamental para el correcto funcionamiento de las células eucarióticas dado que las múltiples acetilaciones en el núcleo de histonas representan una gran variedad de estructuras e isoformas. La acetilación, como ya se dijo, se verifica en el dominio N-terminal. En el caso de H<sub>2</sub>B este dominio es menos conservado y muestra una mayor divergencia (Vanfleteren et al., 1987).

Como se mencionó líneas arriba, la H<sub>2</sub>B acetilada ha sido relacionada con genes activos en la cromatina, ya que secuencias específicas de genes activos co-purifican con histonas altamente acetiladas (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub>B) (Allegra et al., 1987). Esto es apoyado por la idea de que la acetilación es un prerrequisito para la activación transcripcional, ya que H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B parecen ser las primeras histonas en ser desplazadas de los nucleosomas de genes transcribiéndose activamente (Baer y Rhodes, 1983).

Por otro lado, parecería ser una constante que el número de sitios de acetilación de histona H<sub>2</sub>B de trucha, pollo, ternera y humano son semejantes a los de plantas ya que en erizo se ha observado que se acetilan 4 sitios de lisina y uno más se fosforila en serina, en cambio en alfalfa los 5 sitios son acetilados. (Waterborg et al., 1989).

Otro de los procesos que se presenta en H<sub>2</sub>B es la ubiquitinación. Como ya se mencionó anteriormente en la sección sobre H<sub>2</sub>A, la ubiquitinación es un proceso en que una molécula de ubiquitina se une por el extremo C-terminal con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de histona (posición 120 en H<sub>2</sub>B) (Thorne et al., 1987). Esta proteína de 76 residuos de aminoácidos de 8.5 kd altamente conservada en la escala evolutiva se ha observado enlazada a histonas. La ubiquitinación se puede observar a nivel individual; esto es, una molécula de la histona H<sub>2</sub>B unida a una molécula de ubiquitina; o bien, puede ocurrir también de manera múltiple, o sea, una molécula de la proteína H<sub>2</sub>B unida a una cadena de ubiquitinas. La ubiquitina difiere a nivel de secuencia de aminoácidos en 3 residuos entre levadura y el hombre (West y Bonner, 1980b; Nickel et al., 1989). Se sabe que H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B y sus variantes pueden ser ubiquitinadas en proporciones de 10:1 (Nickel et al., 1989). Además, la desaparición de uH<sub>2</sub>B en metafase indica que estas proteínas deben de ser

deubiquitinadas para permitir el evento de empaquetamiento ( Muller et al., 1985; Raboy et al., 1986).

En H<sub>2</sub>B el proceso de fosforilación se presenta tanto inmediatamente después de la síntesis de la histona como en estados tardíos. Lo anterior indica que la fosforilación se mantiene a lo largo del ciclo celular y que, además, ésta se mantiene íntimamente asociada con la condensación de la heterocromatina. La fosforilación de H<sub>2</sub>B ocurre en menor proporción con respecto a H<sub>1</sub> y no se presenta durante estados específicos de la diferenciación celular, pero sí a lo largo del ciclo celular (Gurley et al., 1978 ).

## HISTONA H<sub>1</sub>

La histona H<sub>1</sub> forma parte de un grupo de proteínas ricas en residuos de arginina. Esta proteína presenta un peso molecular de 15,342 daltones y tiene 135 residuos de aminoácidos. Su composición de aminoácidos es de 10% de lisina, 13% de arginina ( como aminoácido básico ) y 13% de aminoácidos ácidos, presentando una relación de aminoácidos básicos/ácidos de 1.8 y siendo la relación de lisina/arginina de 0.72. Se conoce la secuencia de aminoácidos de una gran variedad de especies, en función de las cuales se ha descubierto una alta conservación evolutiva. Así por ejemplo, comparaciones a nivel de la estructura primaria entre la H<sub>1</sub> del chicharo y el timo de ternera demuestran la existencia de 4 sustituciones ( Patthy et al., 1973; Isenberg, 1979 ). Se han identificado diferencias a nivel de aminoácidos entre un número variable de mamíferos en la H<sub>1</sub> (Franklin y Zweidler, 1977 ). Los cambios observados entre ternera y chicharo así como entre otras especies permite afirmar que la H<sub>1</sub> junto con la H<sub>2</sub> son las proteínas más conservadas en la escala evolutiva. El alto grado de conservación en la secuencia de H<sub>1</sub> se da fundamentalmente en el extremo amino-terminal en los residuos 1 al 36 (Waterborg et al., 1983).

De la misma manera, la H<sub>1</sub> presenta 3 dominios estructurales en su secuencia de aminoácidos; una región altamente conservada de aminoácidos básicos agrupados en el extremo N-terminal con una pequeña proporción de éstos en la parte C-terminal y una región central altamente hidrofóbica. Es en ésta última región donde ocurren la mayor parte de las sustituciones puntuales, un poco más frecuentemente que en la región del extremo C-terminal ( Isenberg, 1979 ).

En mamíferos la histona H<sub>1</sub> presenta regularmente tres variantes electroforéticas denominadas H<sub>1.1</sub>, H<sub>1.2</sub> y H<sub>1.3</sub>; las cuales difieren en 1 o 2 aminoácidos entre sí (Urban et al., 1979). La histona H<sub>1</sub> es la única de las histonas en presentar residuos de cisteína. La cantidad de cada una de las variantes puede variar de una célula a otra y de un tejido a otro (Franklin y Zweidler, 1977 ). Wu et al. (1983a) reportaron que la H<sub>1.3</sub> es la mayor variante de H<sub>1</sub> en linfocitos quiescentes de humano. Ello indica que las variantes de histonas H<sub>1</sub>, H<sub>1A</sub> y H<sub>1B</sub> en mayor grado, así como H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> en menor proporción, están involucradas en la modulación de la transcripción de la cromatina (Reeves, 1984 ).



De la misma manera, las histonas H<sub>1</sub> ( y sus variantes ) están sujetas a una serie de modificaciones postraduccionales, las cuales modulan las características de la estructura globular de ellas ejerciendo cierta influencia en su comportamiento en el nucleosoma y por tanto en la cromatina.

Así, uno de los procesos que mayormente se presenta en H<sub>1</sub> es la acetilación reversible. Esta se ha observado *in vivo* en varios sistemas incluyendo levadura, eritrocitos de pollo, células HeLa y otras células humanas (Nelson, 1982; Zhang y Nelson, 1986).

La acetilación que sufre H<sub>1</sub> ( y otras histonas ) recién sintetizada y que es reversible después de organizarse en nucleosomas no parece ser prerequisite para el proceso de conformación de los mismos (Cousens y Alberts, 1982; Chalkley y Shires, 1985).

La acetilación *in vivo* de histonas correlaciona con varios niveles de condensación de la estructura de la cromatina tales como aquellos que acompañan a la transcripción ( Doenecke y Gallwitz, 1982; Chahal et al., 1980; Waterborg y Matthews, 1983; Loidl et al., 1984; Reeves, 1984; Hirose et al., 1985; Zhang y Nelson, 1988; Hebbes et al., 1988 ), al acoplamiento de histonas durante la replicación de ADN (Waterborg y Matthews, 1983; Chambers y Shaw, 1984; Giancotti et al., 1984; Allis et al., 1985 ), el desplazamiento de histonas durante la espermatogénesis (Christensen et al., 1984; Oliva y Mezquita, 1982; Oliva y Mezquita, 1986; Couppez et al., 1987 ) o durante la esporulación en *Physarum* ( Loidl y Grobner, 1986; Loidl y Grobner, 1987; Loidl, 1988 ).

Hasta ahora no se conoce si la metilación de las histonas H<sub>1</sub> tiene algún papel en el mantenimiento de la estructura abierta de cromatina de genes transcripcionalmente competentes (Hendzel y Davie, 1989). Se ha observado este proceso en muchas especies; en eritrocitos de pollo el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina 9 y 27 de la histona H<sub>1</sub> pueden ser metilados (Wu et al., 1986; Sung et al., 1977) formando N<sup>ϵ</sup>-mono-metil-lisina, N<sup>ϵ</sup>-dimetil-lisina y N<sup>ϵ</sup>-trimetil-lisina ( Wu et al., 1986 ). La metilación de histonas es una modificación relativamente estable que tiene una baja tasa de reversibilidad ( Wu et al., 1986 ). Esta serie de modificaciones se da después de la síntesis de ADN y del ensamblado de la cromatina, sugiriendo que no está involucrada en el proceso de ensamblado de la misma. La metilación podría jugar un papel en la condensación de la cromatina y/o mitosis ( Honda et al., 1975 ). Además, otros estudios han indicado que existe una relación entre la metilación de histonas y la transcripción (Desrosiers y Tanguay, 1985; Desrosiers y Tanguay, 1988 ).

Por otro lado, se ha indicado que la reducción en la metilación de  $H_1$  y  $H_2$  que se da por la activación de otros genes por choque calórico correlaciona con la represión de la expresión de algunos genes (Desrosier y Tanguay, 1985 ).

Se sugiere que las actividades de las acetiltransferasas y de las metiltransferasas de  $H_1$  pueden coexistir en la misma región de la cromatina sin competir entre sí por los sitios de enlace; los papeles funcionales de estas enzimas podrían ser para mantener los estados acetilados y metilados de las histonas asociadas con dominios de cromatina transcripcionalmente activos ya que estas modificaciones podrían alterar al nucleosoma y a la superestructura de la cromatina, lo cual permitiría o facilitaría el proceso de elongación de la transcripción (Hendzel y Davie, 1989 ).

La fosforilación de histonas durante la progresión de la mitosis observada en células sincronizadas de la línea celular CHO de hamster ocurre de manera específica en  $H_1$  durante la preprofase y en la mitosis como tal ( profase, metafase y anafase ). Cuando los cromosomas están altamente condensados, se verifica una superfosforilación de la histona  $H_1$ , lo que no ocurre en preprofase. Al salir de la anafase y entrar en telofase,  $H_1$  es defosforilada, al igual que  $H_2$ . Lo anterior demuestra que la fosforilación de  $H_1$  y de  $H_2$  son eventos estrictamente mitóticos y que ocurre sólo cuando los cromosomas están fuertemente condensados (Gurley et al., 1978 ).

Las evidencias que apoyan la presencia defosforilación de  $H_1$  en plantas es escasa; sin embargo, se ha logrado observar un nivel significativo de fosforilación a lo largo del ciclo celular de plántulas de trigo y de alfalfa, lo cual indica que probablemente esté jugando un papel similar al observado en células animales (Brandt et al., 1988; Rodrigues et al., 1985 y 1988 ).

## HISTONA H<sub>4</sub>

Dentro de la familia de proteínas de histonas, la H<sub>4</sub> es la más altamente conservada en la escala evolutiva. Esto es derivado de estudios estadísticos en torno a la comparación de secuencias de H<sub>4</sub> de un gran número de organismos desde las levaduras hasta el hombre. ( Darnell y Doolittle, 1986 ).

A nivel de comparación de secuencia de aminoácidos entre varias especies existen variaciones mínimas lo que demuestra el alto grado de conservación en la estructura primaria de H<sub>4</sub>. Así por ejemplo, se ha observado que entre el chicharo y el timo de ternera existen únicamente 2 variaciones o sustituciones a nivel de secuencia ( De Lange et al., 1969a ).

La H<sub>4</sub> es una proteína rica en aminoácidos de arginina con un peso molecular de 11,282 daltones, con 102 residuos de aminoácidos y cuya composición es de 14 % de arginina y 11% de lisina ( como aminoácidos básicos ) y un 10% de aminoácidos hidrofóbicos/ácidos; presenta una relación de aminoácidos básicos/ácidos de 2.5 y una relación lisina/arginina de 0.79. Al igual que la H<sub>3</sub>, la H<sub>4</sub> presenta tres dominios estructurales en su secuencia primaria y, por ende, determinan regiones específicas en la estructura secundaria y terciaria de la proteína.

Al igual que las otras histonas, la H<sub>4</sub> no escapa a la acción de los mecanismos de modificación postraduccional, donde la acetilación, metilación, ADP-ribosilación y fosforilación se presentan con mayor frecuencia. Así, tenemos que la acetilación se presenta tanto en forma irreversible ( Phillips 1963 ) como reversible, ocurriendo esto último con mayor frecuencia ( Allfrey et al., 1964; Doenecke y Gallwitz, 1982; Reeves, 1984; Oliva et al., 1990; Waterborg et al., 1989; Turner et al., 1990; Bresnick et al., 1991). Al igual que en las otras histonas, la acetilación de H<sub>4</sub> se presenta en el grupo  $\epsilon$ -amino de residuos específicos internos de lisina localizados en el dominio altamente básico N-terminal por la enzima acetil transferasa, lo cual cambia la carga neta positiva por negativa por la incorporación de un grupo acilo a este extremo (Reeves, 1984).

Usualmente, H<sub>4</sub> es la histona más acetilada con el 40% de las moléculas de células típicas de mamíferos presentando de 1-4 grupos acetato bajo circunstancias normales como las encontradas durante la replicación de la cromatina ( Turner et al., 1990 ). No se presenta al azar,

sino que es altamente específica, lo que sugiere que está relacionada con la actividad transcripcional en diferentes momentos tales como: estados tardíos de la espermatogénesis de la trucha (Sung y Dixon, 1970; Cándido y Dixon, 1972), cuando ocurre síntesis *de novo* de  $H_1$  (Louie y Dixon, 1972), durante estados específicos de la maduración de los eritrocitos de pollo (Ruiz-Carrillo et al., 1974), en eritrocitos de pato (Ruiz-Carrillo et al., 1975), etc.

Se ha observado que la incorporación de nuevas histonas a la cromatina ocurre de diferente manera. Por ejemplo, en eritrocitos inmaduros de pollo,  $H_1$  ( $H_1$ ) es incorporada aleatoriamente dentro de la cromatina; en cambio, las histonas del núcleo y con mayor frecuencia  $H_1$  se encuentran preferencialmente en fragmentos de cromatina de genes transcripcionalmente activos y en genes competentes, las cuales están altamente acetiladas. Además, las regiones de la cromatina con genes activos/competentes pueden ser remodeladas donde  $H_1$  se encuentra acetilada. También se ha observado que  $H_1$  acetilada se encuentra ausente en genes que se hayan reprimidos. Lo anterior sugiere que la acetilación está jugando un papel en la regulación de la transcripción (Hendzel y Davie, 1990).

Tal parecería que la acetilación intensa (hiperacetilación) de histonas promueve la eficiente reconstitución de los nucleosomas (Cotten y Chalkley, 1985), ya que está último se correlaciona con niveles de acetilación de  $H_1$  (Norton et al., 1989). Lo anterior permite sugerir que la neutralización de cargas positivas en el extremo N-terminal de residuos de lisina en histonas del núcleo y principalmente en  $H_1$ - $H_1$ , favorece la estabilización del octámero y la formación del nucleosoma como tal (Csordas, 1990).

Utilizando técnicas de marcado con anticuerpos específicos para  $H_1$ , se ha logrado determinar la distribución de la acetilación de  $H_1$  en cromosomas en interfase. Los datos revelan que en el cromosoma politénico de *Chironomus* y otros dípteros existen "islas" o regiones definidas que están enriquecidas en  $H_1$  acetiladas y que guardan una estrecha relación con el empaquetamiento de la cromatina y la actividad transcripcional de ciertos genes (Turner et al., 1990). Sin embargo, los niveles de acetilación de  $H_1$  podrían no ser requeridos *in vivo* para el paso de la polimerasa II a través de la región codificante de los genes ya que experimentos *in vitro* apoyan la idea de que la hiperacetilación de  $H_1$  no es requerida para la transcripción (Turner et al., 1990).

La hiperacetilación diferencial de  $H_1$  se observa cuando células de alfalfa (*Medicago sativa*) son expuestas a diferentes

concentraciones de sales. Ello sugiere que la acetilación va correlacionada con el estado de expresión génica diferencial con el cual la célula hace frente a condiciones de estrés salino para sobrevivir ( Gulick y Dvorak, 1987; Sachs y Ho, 1986 ). De este modo, podría considerarse a la hiperacetilación de histonas ( en particular  $H_1$  y  $H_4$  ) como uno de los procesos que responden a un incremento en la concentración de sales en el medio ambiente celular; esto es, un reportero o "sensor" in vivo. Esta es la primera vez que se reporta que tal sensibilidad al cambio es inducida por la acetilación de histonas ( $H_1$ ). Ello podría representar una estrategia de tipo adaptativo a nivel intramolecular para permitir una respuesta de expresión génica diferencial y por ende una respuesta biológica adaptativa del organismo ( Waterborg et al., 1989 ). Esto apoya, una vez más, la idea de que la acetilación de histonas podría jugar un papel importante en el control de la transcripción, en unión con un conjunto de factores y elementos transcripcionales que permitan el desenrollamiento o descompactamiento de la cromatina para el acceso de polimerasas que culminen con el proceso de transcripción ( Norton et al., 1989; Tsao et al., 1989 ).

Al igual que en las otras histonas, en  $H_1$  la metilación ocurre en el grupo  $\epsilon$ -amino terminal de los residuos de lisina ( 9 y 27 en  $H_1$  y en el 20 en  $H_4$  ) de la mayoría de las especies eucarióticas superiores estudiados ( Wu et al., 1986; Sung et al., 1977 ). Dichos residuos de lisina pueden ser metilados para formar  $N^{\epsilon}$ -monometil-lisina,  $N^{\epsilon}$ -dimetil-lisina y  $N^{\epsilon}$ -trimetil-lisina.

El proceso de metilación de histonas es una modificación relativamente estable que presenta una muy baja tasa de reversión (Wu et al., 1986 ). Por lo general, la metilación de histonas ocurre después de la síntesis de ADN y el ensamblado de la cromatina. Además, se ha encontrado una correlación directa entre el decremento de la metilación de  $H_1$  y  $H_4$  en células en cultivo de *Drosophila* que previamente fueron tratadas con calor y la actividad transcripcional, la cual decrece de manera característica en respuesta al choque calórico ( Camato y Tanguay 1982 ; Arrigo, 1983 ). Ello sugiere que la reducción en la metilación de  $H_1$  y  $H_4$  correlaciona con la represión de la expresión de genes activos como respuesta al choque calórico (Desrosiers y Tanguay 1985 ).

La fosforilación es otro de los procesos postraduccionales que se presenta en las histonas. La fosforilación de  $H_1$  se presenta con menor frecuencia durante el ciclo celular; el mayor índice de fosforilación de  $H_1$  se verifica durante la fase S y en ocasiones como respuesta a

estímulos externos ( Isenberg 1979 ). También se ha detectado este proceso en el desarrollo de las células de testículos de trucha, *Xenopus*, mamíferos, etc. ( Sung y Dixon, 1970; Louie y Dixon, 1972), así también durante la maduración de células de eritrocitos de aves (Tobin y Seligy 1975; Sung et al., 1971 ).

Se ha conjeturado mucho acerca del papel de la fosforilación de histonas. Se piensa que representa un mecanismo para la modulación de su actividad; sin embargo, en el caso de  $H_1$  no se ha logrado determinar (tan bien como con  $H_2$ ) su papel durante el ciclo celular (Trewavas, 1976). La fosforilación de  $H_1$  ha sido observada a muy bajo nivel junto con la de  $H_2$  durante la condensación de la cromatina para la formación de los cromosomas metafásicos ( Shibata et al., 1990 ). A pesar de lo anterior, aún no queda del todo claro cual es el papel definitivo de la fosforilación de  $H_1$  durante la condensación de la cromatina (Shibata et al., 1990).

## LOS GENES DE LAS HISTONAS. ORGANIZACION ESTRUCTURAL

Las histonas son producto de un conjunto de genes transcritos a lo largo de la división celular. Estos se encuentran estrechamente agrupados (clustered) en una variedad de organismos (Kedes, 1979). Los genes de las histonas del erizo de mar han sido los más extensamente estudiados y han servido de modelo/prototipo para el estudio en otras especies. En este organismo, los genes se encuentran marcadamente repetidos, agrupados y alineados uno tras el otro y en donde las regiones codificantes para las 5 proteínas están entrelazadas con secuencias espaciadoras de ADN no codificante (Kedes, 1979). Se ha observado, por medio de ensayos de hibridación, que los genes de histonas se repiten varios cientos de veces en el genoma del erizo de mar (Kedes y Birnstiel, 1971).

Los genes de las histonas, al igual que otros, se encuentran catalogados como de familias multigénicas ubicados entre los medianamente repetitivos (Hood et al., 1975). Los genes de las histonas presentan especial interés debido a que ellos representan ADN repetitivo codificante para proteínas que se encuentran íntimamente asociadas con el material genético responsable de la vida de los organismos superiores (Kedes, 1976).

Se ha observado que el ADN de histonas es rico en secuencias G-C y con la utilización de endonucleasas de restricción, específicamente la Hind III, el ADN es cortado en fragmentos uniformes de 6-7 Kb de largo. Estos fragmentos, al ser hibridados con todos los ARNm de las 5 clases de histonas, hibridan una sola vez, lo cual hace suponer que cada uno de los genes de histonas ( $H_1$ ,  $H_2$ ) está en el cúmulo dentro de la unidad repetida de 6-7 Kb de largo (Kedes et al., 1975). Sobre esta unidad, se ha mostrado la posición relativa en la hebra codificante con respecto a la secuencia de los genes de histonas en dos especies estudiadas de erizo de mar, la cual se representa de la siguiente manera:  $H_1$ ,  $-H_2B$ ,  $-H_2$ ,  $-H_2A$ ,  $-H_1$  (Kedes 1976; Kedes 1979; Hentschel y Birnstiel, 1981). La unidad repetida de 6-7 Kb representa el total del cúmulo, pero sólo se requiere de 2 Kb para codificar a los 5 genes de histonas. Como lo sugiere Schaffner et al., (1976), existen secuencias espaciadoras entre los genes de las histonas; dichas secuencias espaciadoras se han delimitado con la ayuda de las

técnicas de microscopía electrónica, las cuales han revelado la existencia de 4 regiones con lo cual en la unidad de 6-7 Kb existe un gen de cada histona ( Wu et al., 1976; Portman et al., 1976 ).

La composición de secuencia de nucleótidos en las unidades repetidas de los cúmulos de histonas indica la existencia de secuencias espaciadoras ricas en AT entremezcladas con una cantidad aproximadamente igual de las secuencias codificantes de histonas ricas en G-C. Dichas secuencias codificantes representan cerca del 0.2 % del total del ADN del erizo de mar; sin embargo, la combinación de regiones codificantes y espaciadoras puede ser de 0.5 % o más del genoma haploide del erizo ( Birnstiel et al., 1974; Cohn et al., 1976; Kedes et al., 1975; Portmann et al., 1976; Schaffner et al., 1976; Wu et al., 1976; Kedes, 1976 ).

La organización de los genes de histonas inicialmente fue explorada utilizando las endonucleasas de restricción ( Cohn et al., 1976; Weinberg et al., 1975; Gross et al., 1976, Holmes et al., 1977 ). Por medio de técnicas de mapeado con enzimas de restricción y microscopía electrónica se ha logrado localizar cada una de las secuencias codificantes de las histonas dentro de la unidad repetida ( Schaffner et al., 1976; Wu et al., 1976 ). Todos los genes de histona del erizo presentan la misma polaridad ( en donde una de las dos hebras sirve como patrón o molde para la síntesis de los 5 ARNm de histonas ) y el mismo orden relativo ( de 5'-3'): H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>A ( Kedes, 1979 ) ( Ver figura 2 ).

La topología de los genes de histona de varias especies de erizo de mar que se separaron a lo largo de la evolución ( por ejemplo *Strongylocentrotus purpuratus* y *Psammachinus miliaris* que se separaron en algún momento hace  $6 \times 10^7$  a  $16 \times 10^7$  años ), es marcadamente conservada ( Durham, 1966, citado por Kedes, 1979; Hentschel y Birnstiel, 1981 ver cuadro 2 ).

La comparación de las secuencias de los ARNm que no se traducen a proteína ( regiones 5' y 3' ) toman importancia por su relativa conservación y por el hecho de que son importantes en la definición de funciones regulatorias ( Kedes, 1979 ). Se ha observado que la región 3' es menos conservada que la región 5' y que presenta una proporción de secuencias ricas en A-T inmediatamente después del codón de terminación en el ARNm.

Una comparación de la secuencia de nucleótidos en la región líder de los mensajeros de *S. purpuratus* y *P. miliaris* se muestra en la figura 3 ( datos de Grunstein y Grunstein, 1977; Schaffner et al., 1978; Sures et al., 1978 ), la cual muestra una alta similitud en la región



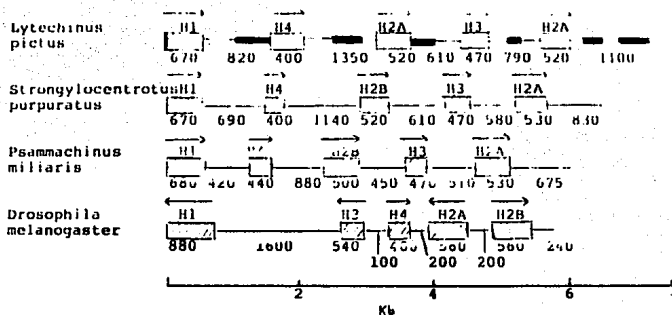


Figura 2.- Mapas moleculares de la unidad repetida de los genes de histonas de tres especies de erizo de mar y la mosca de la fruta. Las flechas indican la polaridad de la transcripción. Tomado de Kedes, 1979.

CARDW. S. *Genes Histonas y Histonas*, 1981

ESPECIE CON CUATRO HISTONAS EN ACRILAMINADO DE 18 GENES	TIPO DE GENES (CLONAS)	FRECUENCIA APROXIMADA DE REPLICACION	LONGITUD APROXIMADA (Kb)	ORGANIZACION DE GENES
<b>ORGANIZACION DE GENES EN ACRILAMINADO DE 18 GENES</b>				
<b>ORGANIZACION DE GENES EN ACRILAMINADO DE 18 GENES</b>				
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	H1 H4 H3 Sp17/2 PC1 DC2	15-10 5-10 100	6.5 6.5 6.5 6.5 6.5	H1 H2 H3 H4 H5 H6
<i>Paramechinus lividus</i>	ph70	400	7.0	
<i>Echinus esculentus</i>	Ee55	varios clones	7.0	
<i>Lytechinus pictus</i>	LpA LpB/C		7.2 7.2	variante espaciada no atípica de LpA con regiones de completa div.
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dm500 Dm505 Dm504	100	4.8 5.0 5.0	H1 H2 H3 H4 H5 H6 presenta variantes espaciadas en cuatro veces más sobre Dm500; no entra mezcladas.
<b>ESPECIES CON OTRA ORGANIZACION DE LOS GENES DE HISTONAS</b>				
<i>Xenopus laevis</i>	X1-h1-1 X1h1	20-50	5.8 15	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7A H7B H8 H9 H10 (considerable heterogeneidad en agrupamientos; variegado orden genico).
<i>Notophthalmus viridescens</i>	Nv51	600-800	9.0	H1 H2 H3 H4 H5 H6 (agrupamientos homogéneos con DNA satélite 10-50kb entremezclado).
Pollo	CH01 CH1a CH2e CH3d	10	14 10 10 10	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45 H46 H47 H48 H49 H50 H51 H52 H53 H54 H55 H56 H57 H58 H59 H60 H61 H62 H63 H64 H65 H66 H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75 H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H83 H84 H85 H86 H87 H88 H89 H90 H91 H92 H93 H94 H95 H96 H97 H98 H99 H100
Ratón	Hase-h1-1	10-20	5.2	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45 H46 H47 H48 H49 H50 H51 H52 H53 H54 H55 H56 H57 H58 H59 H60 H61 H62 H63 H64 H65 H66 H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75 H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H83 H84 H85 H86 H87 H88 H89 H90 H91 H92 H93 H94 H95 H96 H97 H98 H99 H100
Humano	Hh1, Hh2, Hh3 Hh3, Hh7	10-20	4.0	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45 H46 H47 H48 H49 H50 H51 H52 H53 H54 H55 H56 H57 H58 H59 H60 H61 H62 H63 H64 H65 H66 H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75 H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H83 H84 H85 H86 H87 H88 H89 H90 H91 H92 H93 H94 H95 H96 H97 H98 H99 H100
Levedura	HMO1 HYS1 HYS2	1 1 1	6 11 11	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45 H46 H47 H48 H49 H50 H51 H52 H53 H54 H55 H56 H57 H58 H59 H60 H61 H62 H63 H64 H65 H66 H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75 H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H83 H84 H85 H86 H87 H88 H89 H90 H91 H92 H93 H94 H95 H96 H97 H98 H99 H100

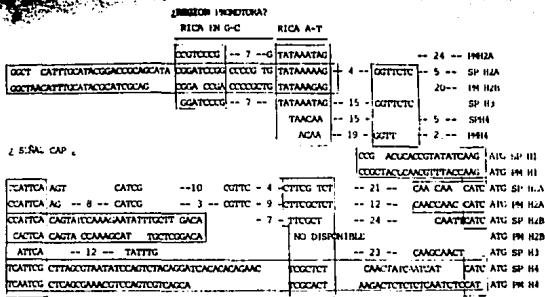


Fig. 3.- Comparación de secuencias de ADN de la región líder de los genes de las histonas de *E. purpuratus* y *P. miliaris*. Las regiones homólogas fueron encuadradas; los cuadros verticales forman secuencias topológicamente homólogas; los horizontales delimitan secuencias homólogas en ambos genes. Los números en secuencia significan bases no conocidas y que no muestran ninguna homología. Tusedo de Grunstein y Grunstein, 1977.

promotora de diferentes organismos ( Maxson et al. , 1983 ). En estudios de comparación de la secuencia en la región promotora de varios organismos se han localizado secuencias específicas que probablemente son señales regulatorias. De la misma forma, en la región cercana al codón de terminación en los distintos genes de histonas se han ubicado algunas secuencias conservadas ( ver cuadros 3 y 4 , Hentschel y Birnstiel, 1981 ).

En el cuadro anterior se da un panorama general de la organización de los genes de las histonas y de él se deducen tres formas generales de organización ( según Hentschel y Birnstiel, 1981 ):

1.- Conjuntos o agregados de los 5 genes de histonas alineados uno tras el otro y repetidos muchas veces.

2.- Conjuntos o agregados de los 5 genes de histonas alineados de manera diferencial, con un patrón de transcripción diferente en función de la hebra codificante y repetidos muchas veces.

3.- Genes dispersos en el genoma, indicando que el agrupamiento no es esencial para la coordinada expresión génica.

Por otro lado, la comparación de secuencias de ADN de los genes de las histonas en *Drosophila* ( Golberg, 1979 ), levadura (Wallis et al.,1980 ), *Xenopus* ( Moorman et al.,1980 ), ratón (Seiler et al.,1981), humano ( Heintz et al., 1981 ) y pollo (Sugarman et al.,1983 ) muestra la ausencia de intrones, lo cual hace suponer que ello parece ser una característica de la familia multigénica de las histonas (Hentschel y Birnstiel, 1981 ). Además, estos estudios de secuenciación han indicado la ausencia de una señal específica de poliadenilación en el extremo 3' en una gran mayoría de los organismos estudiados. Sin embargo, existen excepciones, tales como: algunas clonas del ARNm de la histona H<sub>1</sub> de *Xenopus laevis* (Zernik et al.,1980 ) y en el gen H<sub>1</sub> de levadura existe una secuencia AATAAA cerca de 40 nucleótidos después del codón de terminación, la cual se piensa que es una posible señal de poliadenilación, ya que a diferencia de los ARNm de los genes de histona de los organismos superiores, los ARNm de levadura son típicamente poliadenilados (Fahrner et al.,1980 ).

Las unidades repetidas en tandem muestran varias características comunes a nivel de organización :

1).-Las unidades repetidas contienen genes para las 5 clases distintas de histonas.

2).-Los genes no están tan cerca uno del otro sino que se hallan mezclados con segmentos de ADN no codificante.

CUADRO 3.- BLOCOS DE REPETICIÓN DEL EXTREMUS 5' DE LOS GENES DE HISTONAS

GENE	CAJA CUAR	CAJA TRES	CAJA CIN
<u>H1</u>			
h22	ATCC- 8-	TCACAAATAC-2-	TTAATCC-52-CATATG
h19	ATCC- 8-	TTAACAAATAC-2-	TCATTCG-58-ATATATG
Sp17 2	ATCC- 9-	TTAACAAATAC-2-	TCATTCG-57-ATATATG
Dm500		CTATAAATAG-21-	TTACTTC-44-AAAATG
mus-h1-1	GTCC- 9-	ATATATTATG-20-	TCACCAI-21-ACTATG
<u>H2</u>			
h22	GACCAATCA-34-	CATCC-10-GTATAAATAG-21-	TCATCCA-46-ACCATG
h19	GACCAATCA-34-	CATCC-10-ATATTAATAG-20-	TCATCCA-47-ACCTATG
Sp17 2	GACCAATCA-24-	CATCC- 8-ATATAAATAG-20-	TCATCCA-45-ACCTATG
Ph70	GACCAATCA-34-	CATCC-10-ATATAAATAG-20-	TCATCCA-46-ACCATG
Dm500	CGTCAAATG-42-	CGTCC- 9-ATATAAATAG-20-	TTATTCG-52-AGAGATG
X1-h1-1	ATCCAGGG -45-	CTATAAATGTC-21-	ACAGAGG-83-CACTATG
h801		GTTC- 6-CTATAAATA-20-	CTACTTT-18-CCGAATG
<u>H2A</u>			
h22	GGCAATTCG-29-	CATCC- 9-CTATAAATAG-24-	CCATCCA-61-CATCATG
h19	GGCAATTCG-26-	CATCC- 9-CTATAAATAG-22-	CCATCCA-61-CATCATG
Sp17 2		GTATAAATAG-22-	CCATCCA-60-CATCATG
Dm500	ACTCAATTC -48-	GTATAAATAT-21-	GGATTCG-41-CAAAATG
Ch01	ACCCG- 9-	TTATAAATAG-19-	CGATTC-137-TCCGATG
<u>H2B</u>			
h22	AGCAATCA-50-	CA CC- 9-CTATAAAGAG-20-	GCATCA-67-CACCATG
h19	GGCAATCA-45-	CATCC-10-GTATAAAGAG-16-	CCATCCA-70-CATCATG
Sp17 2	GACCAATCA-44-	CATCC- 8-GTATAAAGAG-16-	CAATCCA-68-CATCATG
Dm500		GTATAAAGGT-11-	CCATTCG-37-AACCAATG
Ch01	CACCAATCA -39-	CTATAAATA-21-	CCATCCA-41-CACTATG
<u>H1</u>			
h22		ATATAGCTCA-18-	TCATTCG-29-CAATATG
h19		GTATATCGAT-19-	TTATTCG-29-CAAGATG
Sp17 2		CATCC- 5-TTADATTCAG-17-	TTATTCG-29-CAAGATG
Ch01	CACCAATCA-39-	CATCC- 5-TTADATTCAG-17-	TCATTCG-29-CAAGATG

Genes h22, h19, Sp17|2 y Ph70 son de origen de mar. Dm500 es de Drosophila, X1-h1-1 es de Blattella, mus-h1-1 es de ratón, h801 es de humano y Ch01 es de pollo. Tomado de Buzanich y Birmaher, 1961.

CUADRO 2.- BLOQUES DE HOMOLOGÍA DEL EXTREMO 3' DE LOS GENES DE HISTONAS.

GENE	SINCRITIA DIADA SEPARADA POR GUIONES.
b22	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
b19	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
Sp17/2	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
pH1b4	ATAAGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa-PolyA
pH1b4c1	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa-PolyA
pH1b4V1	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa-PolyA
huc-h1-1	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa-10b -CAGGAGAGC
<b>H1</b>	
b22	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
b19	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
Sp17/2	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
Ph70	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
h3500	ATGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa- Bb -CAATGAGAT
H1-h1-1	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
<b>H2a</b>	
b22	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
b19	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
Sp17/a	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
CRD1	AA AGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa- Bb -CAGGAGACT
<b>H2b</b>	
b22	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
b19	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
Sp17/2	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
CRD2	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
<b>H1</b>	
h-22	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
b19	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAaacccttCAGCAAAAGA
h3500	ACAAGTCTTTTCAGAGCCAGCAa- Bb -CAGGAGAAA
<b>COB-</b>	
SEMO6	AAAGGCGCTTTTCAGAGCCAGCAa 3' CAAGAAA

Cuadro 4.- Bloques de homología 3' de los genes de histonas de varias especies. Ver cuadro 3 para designación, además K10c es un cDNA de *X. laevis*, el igual que p1110d. El p1110f es un cDNA de *X. borealis*. Las secuencias de genes son alineadas por la máxima homología e inicio 23-47 bases antes del codón de terminación. Lo subrayado es una supuesta deficiencia de base. La presunta posición del extremo 3' se muestra en la secuencia consensuada, tomado de Hontela et al., Bittner et al., 1981.

3) .-El número de genes de histonas en varias especies con arreglo en tandem repetidos son similares tanto en orden como en magnitud. Así por ejemplo, los mayores agregados de genes en *Drosophila*, erizo de mar y en el nematodo *Caenorhabditis* contienen aproximadamente 150, 400-1000 ( Kedes, 1979 ) y 700 copias, respectivamente ( Roberts et al., 1989 ).

4) .-Las unidades repetidas de tales agrupamientos son extremadamente homogéneas, exhibiendo solamente ocasionales diferencias menores en longitud y secuencia de nucleótidos ( Overton y Weinberg, 1978 ).

Los ARNm de histonas fueron identificados por vez primera por Borun et al., (1967) y Gallwitz y Muller (1969a y b) durante la fase S del ciclo celular en células de mamíferos en cultivo, los ARN 9S fueron asociados con polirribosomas que sintetizaron proteínas histonas. De este modo, los ARNs 9S fueron inicialmente identificados como mensajeros de histonas en función de su tamaño y en la aparición de estos durante aquellos periodos del ciclo celular cuando las histonas eran sintetizadas ( Borun et al., 1967; Butler y Muller, 1973; Jacobs et al., 1973; Perry y Kelley, 1973; Breindl y Gallwitz, 1974; Borun et al., 1975 ). Durante el período posterior a la fertilización en el erizo de mar, la síntesis de proteínas nucleares ocurre hasta en un 60 % del total de síntesis de proteínas en un lapso de 10-12 horas y las histonas representan de manera general la mitad de este porcentaje. La mayor clase prevaleciente entre los ARNm asociados a polisomas fueron los de histonas ( Kedes y Gross, 1969; Nemer y Lindsay, 1969 ).

## GENES DE LA HISTONA H<sub>1</sub>

Los genes de histonas H<sub>1</sub> han sido aislados de muchas especies. Los primeros sistemas caracterizados fueron los de tejidos embrionarios de erizo de mar y de *Drosophila* (Maxson et al., 1983). Estos genes de expresión temprana están repetidos varios cientos de veces y el alto número de copias podría ser necesario para proveer suficientes histonas para la rápida división celular que ocurre durante la embriogénesis temprana. Sin embargo, los genes de expresión tardía de las histonas H<sub>1</sub> tanto de eucariontes superiores (mamíferos y aves) como los de levadura están presentes en un menor número de copias (Maxson et al., 1983).

La organización de los genes de histona en el pollo presenta un patrón disperso en donde se observan los 4 genes del núcleo de histonas y el de H<sub>1</sub> (Engel y Dogson, 1981; Harvey et al., 1981). Estas observaciones fueron obtenidas gracias al entendimiento de la relación de los genes del núcleo de histonas y H<sub>1</sub> con el gen H<sub>2</sub>, este último expresado solamente durante la maduración de eritrocitos. El gen de la histona H<sub>2</sub> es un gen tejido específico y no se encuentra estrechamente relacionado con los otros genes de histonas (Krieg et al., 1983). Ensayos de digestión de ADN de pollo con diferentes enzimas de restricción y electroforesis en gels de acrilamida y su transferencia e hibridación con sondas mostró un patrón diferencial que indica que los genes de histona de pollo se encuentran dispersos en el genoma y que el número de copias de cada uno de los genes de las histonas es en promedio de 6 a 8 para el gen de H<sub>1</sub>, 8 a 10 para el gen de H<sub>2A</sub>, 8-10 para el gen de H<sub>2B</sub>, 8-10 para el gen de H<sub>2</sub> y 6-8 para el gen de H<sub>3</sub> (Ruiz-Carrillo et al., 1983; Crawford et al., 1979).

La información anterior demuestra que de los genes de histona en el pollo no se encuentran duplicados en "tandem", como ocurre en otros organismos (Hentschel y Birnstiel, 1981; Engel y Dogson, 1981; Sugarman et al., 1983).

Estudios de secuenciación realizados por Smith y Birnstiel (1976) indican que la región codificante del gen de la histona H<sub>1</sub> no está interrumpido por intrones; además, se ha observado que la región 5' de H<sub>1</sub> es similar a la de otros genes que son transcritos por la ARN polimerasa II, dado que en esta región se ha encontrado una caja TATA a -33 nucleótidos antes del sitio de iniciación de la transcripción. Antes de ésta caja (-80) no se ha encontrado ninguna caja tipo CCAAT; sin embargo, esta secuencia



canónica aparece en posición -57. También se ha observado una secuencia semejante a la caja GATCC la cual se ubica a -43. Además, también se han encontrado otras dos secuencias poco comunes, donde la primera es un hexámero GCGGGG que se repite 2 veces, una a -108 y la otra a -79 (Sugarman et al., 1983). Este hexámero es similar a la secuencia GGGGGG encontrada como una señal de control en el gen de la timidín cinasa de HSV (McKnight y Kingsbury, 1982). El segundo segmento es un monómero que se encuentra en el gen de la histona H<sub>1</sub> del erizo de mar *S. purpuratus* (Levy et al., 1982), el cual consiste de una secuencia 5'... CGCANCAAT ...3' y se localiza en posición -61 de la secuencia estructural del gen H<sub>1</sub> del pollo, y en contraste con la del erizo de mar la cual se ubica 40 pb antes del sitio CAP (Sugarman et al., 1983).

Por otro lado, en la región 3' se han logrado identificar algunas secuencias características de esta región, tales como: una secuencia con simetría diada de 44 nucleótidos de largo después del codón de término y una secuencia monomérica conservada de 72 pb después del codón de terminación. Análisis de los ARNm de histonas de pollo expresados durante el desarrollo, determinó que la mayoría de los genes de histona en las 15 clonas recombinantes son expresados en el estado temprano del desarrollo y que la longitud de los transcritos es de 700 pb para la H<sub>1</sub> (Sugarman et al., 1983).

Las características estructurales observadas en los genes de la histona H<sub>1</sub> en pollo, también se han encontrado en diferentes organismos, tales como: *Xenopus* (Zernick et al., 1980), erizo de mar (Kedes, 1979; Overton y Weinberg, 1978), y en *Drosophila* (Chernyshev et al., 1980). En maíz, se han encontrado al menos 7 variantes del gen de la histona H<sub>1</sub> (Ivanchenko et al., 1987).

Recientemente, Heintz (1991) ha hecho una revisión de la literatura en cuanto al proceso de la regulación de la expresión de los genes de las histonas y ha observado que existen factores (generalmente proteínas que se unen a regiones específicas en el promotor) específicos para promover la transcripción de los genes de las histonas. Así tenemos que en H<sub>1</sub> se han encontrado hasta 4 factores transcripcionales distintos que se unen específicamente con regiones definidas del promotor. La correcta unión de los factores y las secuencias que reconocen del promotor determinan el nivel de transcripción de estos genes durante el ciclo celular.

## GENES DE LA HISTONA H<sub>2</sub>A

En erizo de mar los genes de la histona H<sub>2</sub>A son transcritos a una tasa alta solamente durante estados específicos del periodo de fertilización y hasta el estado de blástula (Cohen et al., 1975); sin embargo, se ha reportado un estado basal mínimo de transcripción (Kedes, 1979). Los datos de Cohen et al., (1975) sugieren que existe una alta especificidad en cuanto a la expresión de formas  $\alpha$  de H<sub>2</sub>A desde el inicio de la fertilización hasta el estado de blástula y las otras formas ( $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ ) se ven expresadas preferencialmente a partir del estado de blástula. Lo anterior sugiere que aunque la cromatina de todos los estados embrionarios contiene histonas con el característico peso molecular de H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B, diferentes formas de estas histonas son sintetizadas en diversos estados (Cohen et al., 1975).

Por otro lado, el nivel de conservación de los genes de la histona H<sub>2</sub>A (a nivel de codones) en dos especies de erizo es menor que el de H<sub>1</sub> (Kedes, 1979). De la misma manera, la comparación de secuencias de H<sub>2</sub>A entre las dos especies mayores de erizo de mar ha mostrado que las regiones regulatorias 5' y 3' presentan características similares en cuanto al grado de similitud incluso cuando se compara con los genes de H<sub>2</sub>A de otras especies (Kemler y Busslinger, 1986).

En erizo de mar existen dos familias de genes de histonas que codifican para variantes de ARNm tempranos y tardíos y que son expresados diferencialmente en el embrión (Hentschel y Birnstiel, 1981; Maxson et al., 1983).

Los genes tempranos de histonas están organizados en unidades repetidas uno tras otro y contienen uno de cada uno de los 5 tipos de genes de histonas. Estos genes son poco activos durante la maduración del oocito, lo cual resulta en la presencia de una considerable poza de ARNm de origen materno en el huevo (Angerer et al., 1984) pero son activamente transcritos después de la fertilización hasta el estado de blástula. Durante este periodo de rápida división celular el nivel de ARNm tempranos de histonas es incrementado cerca de 10 veces (Maxson y Wilt, 1982). Cuando está por terminar el estado de blástula la poza de ARNm tempranos inicia un rápido decaimiento debido a la inactivación transcripcional (Bryan et al., 1983) al tiempo que ocurre un incremento en los niveles de ARNm de otros genes, que son generalmente tardíos (Maxson y Wilt, 1982). Dichos

genes tardíos, a diferencia de los genes tempranos, están irregularmente arreglados en copias individuales (Childs et al., 1982) las cuales codifican para diferentes variantes estructurales de H<sub>4</sub>A y otros genes de histonas (Cohen et al., 1975; Newrock et al., 1978).

En la mayoría de los eucariontes superiores los genes de H<sub>4</sub>A se encuentran cerca de los de H<sub>2</sub>B separados por regiones espaciadoras de ADN no codificante (Maxson et al., 1983). En arroz (*Oriza sativa*), se ha observado que el gen de la histona H<sub>4</sub>A se encuentra contiguo al de la histona H<sub>2</sub>B. Ambos están separados por una región de ADN no codificante de aproximadamente 1.2 kb y su transcripción es contraria a la del gen de la histona H<sub>2</sub>B, ya que análisis de secuenciación de H<sub>4</sub>A y H<sub>2</sub>B indican que estos dos genes se encuentran en un extremo 5' de una de las dos hebras de ADN y el gen de la histona H<sub>2</sub>B en el extremo 5' de la hebra complementaria (Tomas y Padayatty, 1983).

En pollo se ha observado que los genes de la histona H<sub>4</sub>A se encuentran formando pares con H<sub>2</sub>B y están duplicados e invertidos alrededor de un gen de la histona H<sub>2</sub>B. Esto es, un par de H<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>B se encuentra a la izquierda y derecha de manera invertida del gen H<sub>2</sub>B. Cada par es una unidad de 2.1 Kb y ambos pares presentan un 97 % de similitud (figura 4, Wang et al., 1985). Además, la transcripción es bidireccional en los dos pares (H<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>B) similar a la encontrada en arroz (Thomas y Padayatty, 1983). En el pollo el número de copias de los 4 genes de las histonas del núcleo es de alrededor de 10 y de 6 para el gen de la histona H<sub>4</sub>, lo que indica que el número de genes está relativamente balanceado a pesar de la diversidad del arreglo génico (D'Andrea et al., 1985). Este arreglo de 2 pares de H<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>B alrededor de un gen de H<sub>2</sub>B central se ubica en un fragmento de 8.4 kb obtenido de clonas de una biblioteca genómica de  $\lambda$  (D'Andrea et al., 1985) y secuenciado (Wang et al., 1985).

A pesar del arreglo de los genes de histona en el pollo, se ha observado que todos presentan un alto grado de similitud a nivel de secuencias regulatorias en los extremos 5' y 3' (Wang et al., 1985).

Al igual que en muchos organismos, no es claro si la presencia de variantes de las histonas están jugando un papel distinto en la estructura y/o función de la cromatina. La asociación específica de la variante H<sub>4</sub>A.2 de *Drosophila* con las interbandas de cromosomas politénicos (Donahue et al., 1986) y la presencia selectiva de variantes de H<sub>4</sub>A (hvl) de *Tetrahymena* en los macronúcleos transcripcionalmente activos (Allis et al., 1986) son los datos más importantes en favor de

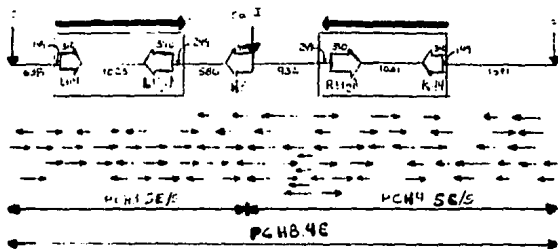


Figura 4.- Arreglo de la región codificante de los 5 genes de histonas y su dirección de transcripción en el fragmento clonado en pollo pCH8.4E. Números representan pares de bases, las pequeñas flechas -- indican secuencias generadas de clones de M13. Según Wang et al., 1985.

un papel funcional específico de la diversidad de variantes de los genes de las histonas.

En levadura, los niveles de ARNm de histonas son finalmente regulados durante el ciclo de división celular, siendo preferencialmente acumulados durante la fase S ( Hereford et al.,1981 ). Los genes de las histonas son transcritos periódicamente durante el ciclo de división celular y además, la activación y terminación de la transcripción pueden ser distinguidas una de la otra por su virtual dependencia de eventos temporalmente separados durante el ciclo celular (Hereford et al., 1982). Se ha observado que la activación de la transcripción ocurre en el estado tardío o parte final de la fase G1, poco antes de la replicación de los cromosomas, mientras que la terminación de la transcripción ocurre en el inicio de la fase S. También se ha demostrado que la síntesis periódica de los ARNm de histonas es regulada por el ciclo de replicación del ADN; de este modo, se ha sugerido que los cambios en la estructura de la cromatina que preceden a de la iniciación de la síntesis de ADN son suficientes para activar la transcripción de los genes de histonas mientras que la terminación de la transcripción ocurre por la iniciación de la síntesis replicativa del ADN ( Hereford et al.,1982 ).

## GENES DE LA HISTONA H<sub>2</sub>B

Los genes de la histona H<sub>2</sub>B de levadura han sido bien estudiados desde su primera caracterización por Hereford et al., (1979). De éste gen sólo existen dos copias por genoma haploide y estas copias no están repetidas en tandem dado que se encuentran separadas por una región espaciadora de aproximadamente 35-60 kb. También se ha determinado el nivel de similitud entre las dos copias de este gen el cual ha resultado ser alto; su transcripción es divergente y la región espaciadora codifica para proteínas adicionales no histonas (Hereford et al., 1979). De la misma manera, como se mencionó anteriormente, el ARNm del gen de la histona H<sub>2</sub>B es poliadenilado en su extremo 3' (Fahrner et al., 1980).

Durante el ciclo celular de la levadura, los niveles de los ARNm de las histonas son regulados transcripcional y postranscripcionalmente (Hereford et al., 1982). Los niveles de ARNm de H<sub>2</sub>B decrecen cuando ocurre la inhibición de la síntesis de ADN y es debido a mecanismos regulatorios transcripcionales y no a mecanismos postranscripcionales (Lycan et al., 1987).

Lo anterior permite hacer la aseveración de que la regulación postranscripcional de los genes de las histonas durante el ciclo celular en la levadura puede ser determinada por la vida media del mensajero maduro y no por la eficiencia en la maduración de los mensajeros, como parece ser el caso en los eucariontes superiores (Xu et al., 1990).

En humanos las secuencias regulatorias 5' del gen de la histona H<sub>2</sub>B han sido identificadas con mayor precisión con respecto a las de 3' (Sive et al., 1986). En la región 5' se observan las secuencias regulatorias desde la posición -21 a la -118 en relación al sitio de inicio de la transcripción, encontrándose una caja CCAAT, una caja TATA, una secuencia hexamérica específica y una secuencia consenso de 15 pb. Cualquier tipo de delección en alguna de estas secuencias es deleterea para la transcripción (Sive et al., 1986). En humanos, los genes de la histona H<sub>2</sub>B con transcripción dependiente de la replicación del ADN no contienen intrones (Stein et al., 1984), sus ARNm no son poliadenilados (Hentschel y Birnstiel, 1981) y presentan una estructura característica en el extremo 3' de asa (Stein et al., 1984). Estos genes son coordinadamente expresados durante el ciclo celular y su expresión está acoplada con la síntesis de ADN (Baumbach et al., 1984; Pauli et al., 1987; van Wijnen et al., 1988). La tasa

de regulación de la transcripción se ve incrementada de 2-5 veces entre las fases G1/S y un retorno a nivel basal durante la fase S ( Baumbach et al., 1987 ). La regulación postranscripcional de estos genes involucra una rápida y selectiva desestabilización de los ARNm hacia el final de la fase S o durante la inhibición de la síntesis de ADN ( Baumbach et al., 1984 ).

De este modo, la abundancia de los ARNm de histonas es regulado a nivel transcripcional y postranscripcional (Schumperli, 1986 ). Por el contrario, los genes de histonas de sustitución pueden contener intrones ( Brush et al., 1985; Wells y Kedes, 1985; Wells et al., 1987 ) y sus ARNm son poliadenilados y frecuentemente contienen largas secuencias en sus extremos 5' y 3' y son estructuralmente más complejos que sus contrapartes dependientes de la replicación ( Brush et al., 1985; Chaubet et al., 1988; Ernst et al., 1987; Hatch y Bonner, 1988; Wells et al., 1987 ). Se ha logrado describir varios genes de histona H<sub>2</sub>B dependientes de replicación en humanos (Heintz et al., 1983; Plumb et al., 1983a y 1983b; Stein et al., 1984; Zhong et al., 1983 ) pero ningún gen de sustitución o tejido específico de H<sub>2</sub>B ha sido reportado ( Collard et al., 1991 ).

Por otro lado, en el pollo la secuencia nucleotídica completa del gen de la histona H<sub>2</sub>B ha sido determinada ( Grandy et al., 1982 ), junto con sus secuencias flanqueantes 5' y 3' y su posición en el genoma se encuentra muy cercana a dos genes de histona H<sub>2</sub>. Este gen difiere a nivel de la proteína que codifica en 5 de los 125 aminoácidos de la secuencia del gen de timo de ternera (Iwai et al., 1970). Las características estructurales de las secuencias flanqueantes del gen H<sub>2</sub>B de pollo son extremadamente similares con las de otros genes de H<sub>2</sub>B de una gran variedad de organismos. Dichas regiones presentan en el extremo 5' elementos regulatorios tales como los sitios TATA y CAAT ( esta última 2 veces, una a -104 y la otra a -162 ) y otras como GATCC ( que en el pollo es GATTT y se haya a -84 ). En el extremo 3' se encuentra una región con simetría diada con una secuencia al centro de 4 residuos de T (esta secuencia diada está compuesta de dos conjuntos de 5 pares de bases repetidas invertidas ) ( Hentschel y Birnstiel, 1981 ). En pollo, antes de la secuencia diada no se encuentra la secuencia CAAGAAAGA en la posición 440. Sin embargo, en H<sub>2</sub>B esta posición presenta una secuencia más comunmente asociada con mensajes poliadenilados AATAA (Proudfoot y Brownlee, 1976 ). En pollo el gen de H<sub>2</sub>B no contiene intrones ( Grandy et al., 1982 ).

## GENES DE LA HISTONA H<sub>3</sub>.

En la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se ha determinado la secuencia de bases de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> (Smith y Andresson, 1983). Dichos genes están agrupados en dos conjuntos no alélicos y organizados en 4 pares no ligados y compuestos de H<sub>3</sub>A/H<sub>3</sub>B, H<sub>3</sub>/H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>B/H<sub>3</sub>A y H<sub>1</sub>/H<sub>3</sub> (Hereford et al., 1979). Además, cada par de genes son transcritos divergentemente y están separados uno del otro por aproximadamente 600-700 pb de ADN espaciador que no se transcribe; también se sabe que los 8 genes son transcritos (Hereford et al., 1979) y probablemente traducidos (Kolodrubetz et al., 1982). La transcripción del gen de la histona H<sub>3</sub> ocurre en una hebra de derecha a izquierda, mientras que el gen de la histona H<sub>1</sub> se transcribe en la otra hebra en sentido inverso (Smith y Andresson, 1983). Las dos copias no alélicas del gen H<sub>3</sub> son transcritas (Smith y Murray, 1983) y su expresión genética está acoplada al ciclo de división celular (Hereford et al., 1981).

Por otro lado, la composición de bases del gen de la histona H<sub>3</sub> es aproximadamente 31% A (adenina), 20% G (guanina), 17% C (citosina) y 32% T (timina) y en ambos extremos 5' y 3' existen regiones de ADN particularmente ricas en AT que equivalen al 70-80% de la composición de bases. En el extremo 5' de H<sub>3</sub> se ha observado una secuencia similar a la secuencia CAT de otros genes. Esta secuencia 5' C-py-T-T-C-py- 3' y otras como la caja TATA, la caja 5' GGT/CAATCT 3' también se encuentran presentes (Smith y Andresson, 1983). Además, estas secuencias han sido encontradas en la misma posición (o similar) de las de genes de otros organismos, como los de erizo de mar (Hentschel et al., 1980; Sures et al., 1980). En el extremo 3' se han encontrado ciertas secuencias que son características de genes eucarióticos superiores, tales como: 5' -AATAAA- 3' la cual es precedida por el sitio de poliadenilación en 13-30 pb (Proudfoot et al., 1976). Esto indica que los ARNm de levadura en su extremo 3' son poliadenilados (Fahrner et al., 1980; Hentschel y Birnstiel, 1981).

En el caso de pollo, los genes de la histona H<sub>3</sub> se encuentran en agrupamientos pero no en unidades repetidas (Engels y Dodgson, 1981). De este gen existen 10 copias contra 6 de H<sub>1</sub> (D'Andrea et al., 1985). Las secuencias regulatorias en los extremos 5' y 3' en los genes de H<sub>3</sub> de pollo son bastante similares con algunas pocas excepciones. Así, tenemos que en la región 5' se observan las siguientes secuencias: una caja TATA que



Estado de Desarrollo	ARNm por huevo o embrión, fg			Moléculas, $10^{-3}$ (por célula)
	H3	H2A	H2B	
Huevo	167 ± 9	146 ± 6	152 ± 8	610
Celulas en cigoto				
1	155 ± 6	ND	ND	570
2	59 ± 7	ND	ND	220
2	23 ± 7	23 ± 6	27 ± 4	82
2	16 ± 4	19 ± 4	20 ± 6	60
4	20 ± 6	ND	ND	75
8	41 ± 6	45 ± 4	60 ± 6	150
32	149 ± 14	146 ± 15	142 ± 12	550

Cuadro 5.- Niveles de ARNm de histonas de ratón durante el desarrollo embrionario temprano. Las cifras densitométricas fueron calculadas mediante análisis de manchas autoradiográficas comparadas contra una curva estandar usando al gene de la  $\beta$ -globina como patrón, tomada de Graves et al. ( 1985 ).

se haya en la posición 3827 del fragmento de 8.4 kb obtenido de clonas de una biblioteca genómica de  $\lambda$  ( D'Andrea et al.,1985) y posteriormente secuenciado ( Wang et al.,1985); cinco posibles cajas CAAT a 23, 51, 113, 124, y 137 pb antes de la caja TATA, las cuales tienen una secuencia 5' CAATGAGANA/T 3'; además, existe una secuencia 5' TTATTTTAAACTTCCGAA 3' que se ubica entre la tercera y cuarta caja CAAT, la cual puede actuar como una secuencia de replicación autónoma (ARS) dada su alta similitud con la encontrada en levadura ( Montiel et al., 1984 ).

En el caso de la región 3' se ha observado una secuencia con simetría diada y una secuencia denominada "elementos asociados del extremo 3'" los cuales contienen los nucleótidos GCT y unida a ésta, una secuencia AATAA que en otros ARNm ha sido asociado con un correcto procesado del extremo 3' para formar ARNm poliadenilados (Fitzgerald y Shenk 1981; Montell et al., 1983 ). Sin embargo, no han sido encontradas formas poliadeniladas de ARNm de H, en pollo ( Wang et al.,1985 ).

H<sub>1</sub> se encuentra en medio de 2 pares de H<sub>2</sub>A-H<sub>2</sub>, en donde dichos pares presentan una transcripción divergente con respecto al gen H, (Wang et al.,1985).

Los genes de la histona H<sub>1</sub> de humano también presentan variantes. Así tenemos que existen 3 genes que codifican para ARNm similares, los cuales cambian en unas pocas bases conservadoramente y las regiones 5' y 3' son mucho más largas que las del gen preferentemente expresado (Heintz et al.,1981 ). Además, por lo general las variantes del gen H<sub>1</sub> presentan intrones en la región 5' y los ARNm que codifican no presentan ningún segmento con simetría diada y son poliadenilados (Wells y Kedes, 1985).

La región no transcrita 5' (UTRs 5' , siglas del inglés *untranslated regions*) del gene la histona H<sub>1</sub> de humano parece presentar una capacidad acoplante para la estabilidad del ARNm con la replicación del ADN, ya que un reemplazamiento de los primeros 20 nucleótidos de la región 5' en genes quiméricos ocasiona que ocurra una desestabilización de los mensajeros y no hay un acoplamiento con la replicación del ADN (Morris et al.,,1986 ).

De la misma manera que en el caso de los genes de las histonas en animales, en las plantas la información de la organización de estos genes y de los niveles de los ARNm está limitada a pocas especies (Chaubet et al., 1986 ). Tal es el caso de algunas gramíneas y *Arabidopsis thaliana* (revisado por Gigot, 1988 ).

El análisis del ADN ha mostrado que no todos los genes de la histona H<sub>1</sub> se encuentran estrechamente enlazados con H<sub>2</sub>, lo que sugiere

que las 5 clases de los genes de histonas en trigo no forman unidades repetidas ( Tabata et al., 1984 ) como los encontrados en el erizo de mar ( Cohn y Kedes, 1979 y 1979a ) y en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ( Lifton et al., 1977 ). Con respecto al número de copias del gen H, en el genoma de trigo, se ha demostrado por densitometría de placas de autoradiografía que existen de 80-100 copias de este gen por genoma hexaploide (Tabata et al., 1984 ). Por lo que respecta a las secuencias regulatorias que se encuentran en las regiones no traducida 5' y 3', el gen de la histona H, de trigo presenta cierta similitud con respecto a los genes de animales. Así tenemos, por ejemplo, que existe una caja TATA que se encuentra a -96 del sitio de inicio de la transcripción y antes de esta se encuentra una secuencia 5'-GCTCC-3' que es muy similar a la secuencia 5'-GATCC-3' generalmente encontrada en los genes de las histonas de animales (Hentschel y Birnstiel, 1981 ) y la secuencia 5'-CCAAAACCCAAA-3' la cual parece corresponder a la caja CCAAT de la mayoría de los genes eucarióticos de la clase II (Efstradiadis et al., 1980 ) la cual se ubica a -134. Lo anterior permite concluir que en la región 5' se encuentran las tres secuencias características de la mayoría de los genes eucarióticos (Tabata et al., 1984 ).

La dirección de la transcripción de H, en trigo es la misma para la del gen de la histona H, (Tabata et al., 1984).

Recientemente se ha reportado la existencia de dos secuencias más en las regiones 5' de los genes H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> de trigo, las cuales parece que son reconocidas por proteínas que se unen al ADN y que se sabe que actúan como factores de transcripción (Mikami et al., 1989 ). Dichas secuencias son: una secuencia hexamérica ACGTCA altamente conservada y una secuencia octamérica CGCGGATC las cuales se ubican entre -150 y -250 pb antes del inicio de la transcripción ( Mikami et al., 1989 ), y las cuales también han sido encontradas en los genes de maíz y de *Arabidopsis* (Chaubet et al., 1986; Phillipps et al., 1986; Chaboute et al., 1987; Mikami et al., 1987 ). Por otro lado, se ha demostrado que a dicha secuencia hexamérica se une de manera muy específica una proteína nuclear HBP-1 (siglas del inglés *Hexameric bound protein -1* ) (Mikami et al., 1987), la cual cubre aproximadamente 20 pb hacia el centro de la secuencia hexamérica y que probablemente permita actuar como factor de control en la transcripción de los genes de histonas de trigo (Mikami et al., 1989 ). Además, se ha observado que la proteína que interacciona con la secuencia hexamérica presenta varias características:

- 1.- Es una proteína(s) nuclear.

2.- Es más abundante en células con división activa, tales como en embriones germinando comparados con embriones quiescentes de trigo (Mikami et al., 1987 ).

3.- La eficiencia en la transcripción del gen H<sub>1</sub> disminuye aproximadamente 30% cuando la secuencia es eliminada ( Mikami et al., 1987 ).

Lo anterior sugiere que la interacción de la secuencia hexamérica de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> de trigo ( más que la secuencia octamérica ) con la proteína(s) nuclear HBP-1 esta permitiendo un control de la transcripción y que este control podría ser análogo al encontrado en el mecanismo de transcripción regulado por ATF ( siglas del inglés *activating transcription factor*) encontrado en adenovirus (Hurts y Jones, 1987; Lee et al., 1987 ).

Por otro lado, en maíz, a diferencia de la mayoría de los genes de las histonas estudiados en otros organismos, los de la histona H<sub>1</sub> parecen estar dispersos en el genoma, lo cual fue observado por experimentos de hibridación que mostraron un patrón de bandas muy diverso; el número de copias del gen es de unas 60-80 copias por genoma diploide ( Chaubet et al., 1986 ).

La comparación de secuencias de varios genes de histonas H<sub>1</sub> de maíz y trigo así como de animales sólo ha mostrado algunas diferencias en la posición 90 de una serina por una alanina; otros datos indican que entre H<sub>1</sub> de maíz y la de trigo existe un 92% de similitud ( Tabata et al., 1984 ) y un 79% con respecto a chicharo (Patthy et al., 1973 ).

A nivel de la secuencia de la región regulatoria 5' se ha observado que H<sub>1</sub> contiene las mismas secuencias TATA y CAAT; esta última difiere un poco de la canónica encontrada en los genes eucarióticos de la clase II. Además de estas secuencias, también se ha observado una secuencia octanucleotídica 5'-CGCGGATC-3' ( Chaubet et al., 1986 ).

En el caso de la región 3', se ha observado que existe una limitada similitud. Solamente se ha encontrado una secuencia tetramérica análoga a la región rica en purina localizada 10 a 20 nucleótidos después del codón de terminación en histonas animales ( Birnstiel et al., 1985 ).

Los ARNm de histonas en la mayoría de los eucariotes superiores han mostrado ser transcritos cortos y no poliadenilados ( Kedes, 1979 ). Sin embargo, existen ARNm que presentan largos UTRs 3' de 150-190 nucleótidos, en donde la existencia de una señal para poliadenilación no ha sido localizada; tal es el caso del H<sub>1</sub> de trigo (Tabata et al., 1986 ).

Por otro lado, utilizando técnicas para clonar ADNc del gen H<sub>1</sub> de cebada y chicharo se ha observado que dichas clonas presentan largos UTRs en la región 3' mayores de 250 nucleótidos, así como una posible señal de poliadenilación (Gantt y Key, 1987).

En maíz, los ARNm de H<sub>1</sub> que fueron extraídos de plántulas mostraron largos UTRs en el extremo 3' y una posible señal de poliadenilación; dichos UTRs, de 160-250 nucleótidos de longitud presentan las secuencias características de los ARNm que son poliadenilados en tejidos embrionarios animales, como los genes tardíos del embrión del erizo de mar (Kedes, 1979) y en tejidos durante el proceso de la diferenciación, como los encontrados durante la espermatogénesis de varios organismos (Seyedin y Kistler, 1979). En los eucariontes inferiores (como levadura y *Tetrahymena*) los ARNm son poliadenilados y sus UTRs 3' son similares entre dichos organismos y además se observa la ausencia de una clásica región repetida invertida rica en GC (secuencia palindrómica), la cual es una región que precede a una supuesta señal de poliadenilación; en maíz los ARNm de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> presentan las mismas características anteriores. Estos ARNm son poliadenilados, existen en diferentes estados del desarrollo de la planta y se encuentran asociados con polisomas, lo que indica que ellos no representan formas de ARNm almacenados, tal y como han sido encontrados en oocitos no fertilizados de *Xenopus* (Maxson et al., 1983). Aunque no se ha identificado alguna señal de poliadenilación en el gen de la histona H<sub>1</sub> de maíz, se sugiere que dicha señal podría localizarse dentro de la secuencia octamérica 5' -ATG(G)AAATG- 3' la cual ha presentado cierta similitud de posición con otras secuencias H<sub>1</sub> de cebada (Chojewski, 1986; citado por Chaubet et al., 1988) y en el de petunia (Dean et al., 1986), entre otros. Dicha secuencia se ubica de 17 a 27 nucleótidos después del extremo 3' del ARNm (Chaubet et al., 1988).

Recientemente, se ha mostrado que las familias multigénicas del gen de la histona H<sub>1</sub> y la de todos los demás genes de histona de maíz se encuentran organizados en subfamilias (Chaubet et al., 1989). Comparaciones a nivel de secuencia codificante entre los genes de histona H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> de varios organismos animales y vegetales ha mostrado una alta similitud aunque la región regulatoria 5' puede ser variable en longitud. Sin embargo, presenta una alta conservación a nivel de las secuencias regulatorias específicas. Con la utilización de esta región 5' como un marcador molecular se ha logrado determinar un patrón electroforético que nos indica que existen de 8 a 10 subfamilias y que los genes de cada subfamilia presentan una posición específica y el número de copias es variable (4 a 16) de una

subfamilia a otra; estas subfamilias son conservadas en diferentes líneas de maíz, así como también con varias especies con genomas relacionados como teozintle, sorgo y caña de azúcar (Chaubet et al., 1989 ). En otros términos, lo anterior quiere decir que la presencia de subfamilias de los genes de histona en maíz representa la existencia de variantes génicas que se expresan de manera diferencial (Chaubet et al., 1989 ).

## GENES DE LA HISTONA H<sub>4</sub>

Las proteínas codificadas por la familia multigénica de H<sub>4</sub> tanto de animales como de plantas son las que presentan los mas altos niveles de conservación en la escala evolutiva ( Kedes, 1979; Maxson et al., 1983; Darnell y Doolittle, 1986 ).

En levadura, los genes de las histonas H<sub>2</sub> y H<sub>4</sub> se han localizado en 2 loci diferentes cada uno y las proteínas que codifican cada par equivalente de loci son idénticas. Estos dos genes se encuentran separados entre sí por un segmento de 646 pb y en el otro por 676 pb y ambos loci presentan una transcripción divergente ( Smith y Andresson, 1983). El número de copias del gen H<sub>4</sub> de levadura es de 2 por genoma haploide. Las diferencias que existen entre la proteína codificada por H<sub>4</sub> en levadura y la de otros organismos se observa en la región C-terminal, por lo que sus cambios no alteran la actividad funcional de la proteína ( Hentschel y Birnstiel, 1981; Smith y Andresson, 1983 ). Comparaciones a nivel de las regiones 5' y 3' de ambos loci de los genes H<sub>2</sub> y H<sub>4</sub> revelan que la composición de bases es aproximadamente de 70 a 80% rica en AT y entre la secuencia intergénica de H<sub>2</sub> y H<sub>4</sub> de cada loci se encuentra una alta concentración de GC ( Smith y Andresson, 1983). El análisis de secuencia de nucleótidos en la región UTRs 5' de los genes de H<sub>4</sub> de los 2 loci ha mostrado cierta similitud por lo que respecta a la presencia de algunas señales regulatorias, las cuales muestran algunos cambios: sustitución de una base o modificación en su localización o posición con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Así, tenemos que la putativa caja TATA en el gen H<sub>4</sub> de levadura se encuentra entre los nucleótidos 20 al 30 antes del sitio de inicio de la transcripción del ARNm. En el caso de la caja CAT de H<sub>4</sub>, esta se encuentra a 41 pb de la caja TATA; además, otra secuencia que se observa en 5' de levadura es 5'-GGC/TCAATCT-3', la cual se localiza entre 40 y 50 pb del lado 5' de la caja TATA ( Breathnach y Chambon, 1981).

Por otro lado, en el extremo UTRs 3' se ha encontrado una señal de poliadenilación 5' -AATAAA- 3' de 13 a 30 pb de donde se inicia la secuencia de poli (A). Quizá porque existe la señal de poliadenilación no sea necesario la presencia de la secuencia invertida repetida para un correcto procesado del ARNm de H<sub>4</sub> de levadura (Breathnach y Chambon, 1981).

En función de la información anterior se sugiere que los ARNm de las histonas de levaduras son poliadenilados; esto podría representar un mecanismo para evitar la degradación acelerada de los mismos, ya que se ha reportado que los mensajeros no poliadenilados de mamíferos son más

susceptibles al ataque de exonucleasas específicas en comparación con los ARNm poliadenilados ( Ross y Kobs, 1986 ).

Por otro lado, la organización de los genes de histona de levadura presenta un arreglo diferente con respecto a la mayoría de los eucariontes superiores: la presencia de agrupamientos específicos parciales (existencia de algunos pero no todos los genes H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>A y H<sub>3</sub>B; no presenta H<sub>4</sub>) y la existencia de loci alélicos dispersos de pares H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>A-H<sub>3</sub>B (Smith y Murray, 1983).

Los genes de las histonas de pollo se encuentran organizados en agrupamientos en el genoma con arreglo independiente es decir, no forman unidades repetidas ( Engel y Dodgson, 1981 ); además el número de copias de cada gen de histona es de 10 por genoma haploide ( Crawford et al., 1979 ). El gen de la histona H<sub>4</sub> de pollo presenta en la región UTRs 5' las secuencias canónicas regulatorias TATA y CCAAT en posición relativamente diferente con respecto al sitio de inicio de la transcripción de otros genes de histonas; otras dos secuencias han sido observadas en el gen H<sub>4</sub> de pollo y son similares a las observadas en el de erizo de mar que no habían sido encontradas en otros organismos. Estas secuencias son: 5'-TCCAG-3' la cual se encuentra a -115 y la secuencia 5'-TTCAATC-3' a -59 del sitio de inicio de la transcripción ( Grunstein et al., 1981; Seiler-Tuyns y Birnstiel, 1981 ). Además, hay una secuencia de 34 nucleótidos (-94 a -60) en la región UTRs 5' 92% rica en GC ( Sugarman et al., 1983 ).

En la región UTRs 3' de los genes de histona H<sub>4</sub> de este organismo se observan secuencias características de genes que codifican para ARNm no poliadenilados. De este modo, se encuentra una secuencia con simetría diada (análoga a las estructuras de asa) 5' -GGCTCTTTCAGAGCC- 3' y otra secuencia nanométrica 5' -CAACAAAGA- 3' ( a +386 y +415 nucleótidos, respectivamente después del codón de terminación). Como los ARNm de H<sub>4</sub> no son poliadenilados es claro que no existe una señal de poliadenilación en el extremo 3' ( Proudfoot, 1982 ).

Los genes de las cuatro clases mayores de las histonas se expresan primariamente al inicio del desarrollo embrionario del pollo. De este modo, como el desarrollo embrionario es de 21 días ( Romanoff, 1967: citado por Sugarman et al., 1983 ) la expresión, transcripción y la traducción de los ARNm de las histonas tiene lugar en los primeros 5 días después de la fertilización, con lo cual se tiene la cantidad necesaria de los diferentes ARNm de histonas que permite la alta tasa de división celular en la que se vé envuelto el embrión para formar un nuevo ser en 21 días.



Después de estos 5 días la tasa de transcripción de los genes de histonas disminuye a un nivel basal de aproximadamente 10% del total alcanzado durante el período de máxima transcripción ( Sugarman et al., 1983 ).

En el ser humano la organización de los genes de las histonas se encuentra en agrupamientos dispersos en unidades claramente repetida ( Heintz et al., 1981 ). Dicho arreglo presenta cuatro tipos de disposición diferente en el genoma:  $H_2B-H_1$ ,  $H_1-H_2-H_1-H_2A$ ,  $H_2B-H_2A-H_1$  y  $H_1-H_1-(H_2A,H_1)-H_1$ ; los cuales se expresan diferencialmente durante el ciclo celular ( Sierra et al., 1982 ). Ensayos de hibridación en células HeLa han indicado que el ARNm de  $H_1$  se encuentra presente durante la fase S y no en G1 del ciclo celular ( Detke et al., 1979 ). La región UTRs 5' de los genes de la histona  $H_1$  de humano ha mostrado las siguientes secuencias regulatorias: dos cajas CAAT una tras otra a -116 y -78 pb antes del sitio de inicio de la transcripción; una caja TATA a -57 pb; una caja GGTC a -72 pb; una serie de secuencias repetidas GC; una corta secuencia de 21 nucleótidos conteniendo solamente residuos de GA (-173-153) y una posible secuencia 5' -CCACAAA- 3' a -30 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción ( Benoist et al., 1980; Chrysogelos et al., 1985 ). En el caso de la región UTRs 3' de  $H_1$  solamente se ha encontrado una secuencia denominada asa o simetría diada a 22 nucleótidos después del sitio de término de la transcripción ( Busslinger et al., 1979; Ross y Kobs, 1986; Ros et al., 1986 ).

Lichtler et al. (1977 y 1980) han reportado la presencia de al menos dos tipos de ARNm que codifican para la histona  $H_1$  en células HeLa S3. La presencia de estos diferentes ARNm podría deberse a que son el resultado de diferentes genes que han divergido en función de cambios en su secuencia nucleotídica (existen de 20-40 copias de cada gen de histona por genoma haploide en células humanas ( Wilson y Melli, 1977 ) o bien por una maduración diferencial de un mismo transcrito primario ( Maxson et al., 1983 ).

Sin embargo, Lichtler et al. (1982) han reportado además de lo anterior que existen al menos otros 5 ARNm distintos de  $H_1$ , los cuales codifican para proteínas idénticas.

El nivel de transcripción de los genes  $H_1$  en humano se ve regulado por el enlace específico de distintos factores de transcripción a dos regiones bien definidas del promotor o UTR 5'. Dichos factores, el H4TF-1 y el H4TF-2 reconocen específicamente una secuencia entre -80 y -110 pb antes del sitio CAT y una secuencia inmediatamente contigua antes de la caja TATA ( Dailey et al., 1986 ).

En las plantas, la información acerca de los genes de histonas H<sub>1</sub> se basa en los de algunas gramíneas y en *Arabidopsis thaliana*, en donde se conoce la secuencia nucleotídica del gen, el cual muestra una organización diferente a la encontrada en el erizo de mar. El número de copias se considera bajo con respecto a los encontrados en erizo y nemátodo (revisado por Gigot, 1988; citado por Chaubet et al., 1989).

En arroz, se ha encontrado que la organización de los genes de las histonas presenta conjuntos de H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B en una hebra y el gen de H<sub>1</sub> en la otra hebra, lo que hace a la transcripción de éstos divergente. El par de H<sub>2</sub>A-H<sub>2</sub>B se encuentra separado por una región rica en AT de 3.1Kb. Este tipo de arreglo es diferente al encontrado en erizo, pero presenta mucha similitud con los de otros genes de histonas ( Thomas y Padayatty, 1983 ).

En el trigo de manera general, el gen de H<sub>1</sub> se encuentra adyacente al gen H<sub>2</sub>, pero no parece formar unidades repetidas, sino más bien parecería, al igual que en maíz ( Phillips et al., 1986; Chaubet et al., 1986 ), que los genes se encuentran como elementos dispersos en el genoma ( Tabata et al., 1983 ). El gen de la histona H<sub>1</sub> de trigo ha sido clonado y secuenciado y su secuencia nucleotídica indica que los aminoácidos de la proteína ( en función del marco de lectura abierta y en fase ) son idénticos a los encontrados en chícharo ( De Lange et al., 1969a ).

El número de copias de H<sub>1</sub> fue definido por análisis tipo Southern de ADN de embriones digerido con Hind III; las autoradiografías obtenidas mostraron la existencia de múltiples bandas, lo cual supone que la organización de los genes de histona en trigo es de manera dispersa y no en un arreglo de unidades repetidas. Asumiendo que cada banda del patrón de hibridación representa de 3 a 10 copias por genoma hexaploide (análisis densitométrico) y realizando una suma aritmética de todas las bandas se determinó que el número total de copias del gen H<sub>1</sub> de trigo se encuentra entre 100 a 125 por genoma hexaploide ( Tabata et al., 1983 ).

Las secuencias regulatorias de las UTRs 5' y UTRs 3' del gen de H<sub>1</sub> de trigo fueron deducidas por mapeo con nucleasa SI. Los resultados indican que ambas regiones presentan una alta similitud con las encontradas en otros genes análogos. Así, tenemos que en UTRs 5' existe una secuencia con cierta similitud con la caja TATA ( Krieg et al., 1983 ). Esta supuesta caja TATA presenta una secuencia 5' -TTTAAGA- 3' que se haya 98 pb antes del sitio de inicio de la transcripción. Además, se ha encontrado otra secuencia 5' -GACCC- 3' a sólo 2 nucleótidos antes de la

putativa caja TATA, la cual es similar a la secuencia 5' -GATCC- 3' que es característica de genes de histonas de varios géneros de plantas ( Hentschel y Birnstiel, 1981 ). Otras secuencias tales como: 5' -CCAT- 3' y 5' -CCAAT- 3' son similares a la caja 5' -CCAAT- 3' ( Efstratiadis et al., 1980 ), la cual se localiza en genes de la clase II ubicándose a 46 nucleótidos antes de la supuesta caja TATA.

En el caso de la UTRs 3' de los genes H<sub>1</sub> de trigo, se han localizado dos secuencias : una secuencia con simetría diada 5' -ACTGTTTAGT- 3' a 70 nucleótidos después del sitio de la terminación y una posible señal de poliadenilación 5' -AACAAA- 3' a 116 nucleótidos después del codón de término; ambas presentan similitud con las respectivas secuencias canónicas encontradas en esta región (Proudfoot y Brownlee, 1976). Sin embargo, a pesar de la presencia de la supuesta señal de poliadenilación no se ha encontrado ARNm alguno con características de estar poliadenilado; de tal modo que la función biológica de dicha secuencia encontrada en el gen H<sub>1</sub> de trigo no es conocida ( Tabata et al., 1983 ).

En trigo se ha reportado el primer ejemplo de que existe una variante del gen H<sub>1</sub>, dado que se ha observado un cambio de base en segunda posición en el cuarto codón después del sitio de inicio de la traducción, el cual cambia de glicina a asparagina. La variante que presenta el aminoácido asparagina no es eficientemente transcrita *in vivo* comparada con la alta eficiencia de transcripción *in vivo* de la variante que presenta glicina en este codón; además, estas dos variantes no presentan una perfecta similitud en sus extremos UTRs 5' y UTRs 3'. De este modo, estas dos variantes del gen H<sub>1</sub> en trigo parecen ser el primer ejemplo de variación en este gen en eucariontes superiores (mamíferos y aves e incluso plantas) (Tabata e Iwabuchi, 1984 ).

El estudio de los genes de las histonas en maíz se ha centrado en los genes de la histona H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, los cuales poseen una organización del tipo de la de elementos dispersos en el genoma como se ha observado en la mayoría de los organismos superiores ( revisado en Hentschel y Birnstiel, 1981 ).

Dentro de las UTRs 5' y UTRs 3' de los ARNm de H<sub>1</sub> de maíz se han encontrado ciertas secuencias similares a las encontradas en trigo (Tabata et al., 1983 ). En la UTRs 5' se encuentra una posible caja TATA localizada a -109 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción; además, 24 nucleótidos antes de la putativa caja TATA se encuentra la secuencia 5' -GCTCC- 3' la cual es similar a la secuencia consenso pentamérica 5' -GATCC- 3' ; no se ha encontrado ninguna secuencia típica 5' -CCAAT- 3'. De particular interés es una secuencia octanucleotídica

5' -CGCGG(C)ATC- 3' encontrada en la región UTRs 5' de maíz y otros genes de H<sub>1</sub> de plantas, la cual se encuentra a 90 nucleótidos antes de la caja TATA y que parece ser una secuencia específica de los genes de histonas de plantas (Gigot et al., 1987).

En el caso de UTRs 3' no se ha encontrado ninguna analogía con las secuencias características en esta región en otros genes de histona de H<sub>1</sub> (Ross y Kobs, 1986). Sin embargo, se han encontrado otras secuencias como una repetida invertida (diferente a la secuencia que determina una estructura de asa o de simetría diada) aproximadamente 20 nucleótidos después del codón de terminación y que presenta la siguiente secuencia: 5' -CCAGCTGCTGCTGG- 3'; esta estructura es seguida por una secuencia corta rica en AG: AGAAG (Phillips et al., 1986).

Los genomas de maíz y trigo no son los únicos casos en donde se ha encontrado la presencia de los genes de histona H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> como elementos dispersos, ya que los genes tardíos del erizo de mar que se expresan durante el desarrollo embrionario, también están distribuidos como elementos dispersos (revisado por Kedes, 1979; Childs et al., 1979).

Por otro lado, se sabe que la regulación de la expresión de los genes de histonas ocurre a varios niveles en animales: transcripción, traducción y degradación de ARNm (Maxson et al., 1983).

A nivel de embriones secos de varias plantas existe una cierta cantidad de ARNm de histonas almacenados, similar a la poza de ARNm encontrada en el huevo de erizo de mar, el cual es traducido durante la etapa temprana de la germinación (Ahmed y Padayatty, 1982; citado por Gigot et al., 1987).

La presencia de ARNm poliadenilados ha sido observada en levadura (Fahrner et al., 1980), *Tetrahymena* (Bannon et al., 1983) y también en variantes de genes tardíos de histonas de erizo de mar (Ernst et al., 1987), en genes de histonas independientes del ciclo celular y/o tejido específico en pollo (Harvey et al., 1983; Engel et al., 1982), en humano (Wells y Kedes, 1985; Wells et al., 1987) y, en ratón (Bird et al., 1985).

En el caso de plantas son pocos los ejemplos donde se ha encontrado una región característica UTRs 3' relativamente larga que posea una posible señal de poliadenilación; sin embargo, en trigo, los ARNm de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> poseen largas UTRs 3' de 150-190 nucleótidos (Tabata e Iwabuchi, 1986), pero no se ha observado una señal de poliadenilación.

En maíz, en los ARNm de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> se han encontrado algunos UTRs 3' largos de 160-250 nucleótidos y además se ha observado la

ausencia de una clásica señal de poliadenilación (Chaubet et al., 1988).

Lo anterior fue confirmado por la separación por medio de una cromatografía de columna de oligo d(T) de ARN poli (A)+ y ARN poli (A)- a partir de ARN extraído a las 48 y 96 hrs. después de iniciada la inhibición de embriones. Las fracciones obtenidas mostraron que los ARNm de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> de maíz fueron poliadenilados, además se demostró por densitometría que el 99% de los mensajeros son poliadenilados (Chaubet et al., 1988).

La poliadenilación de los mensajeros de histona de maíz (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>) puede considerarse como un estado transitorio, específico en estos tejidos durante la germinación (tejido meristemático con una alta síntesis de ADN). Lo anterior sugiere que se puede considerar equiparable con los reportes en donde se ha observado la poliadenilación de los ARNm de genes tardíos, como los encontrados en erizo de mar y los tejido-específicos o durante la espermatogénesis de otros organismos (Maxson et al., 1983). La poliadenilación de los ARNm de H<sub>1</sub> (y de H<sub>2</sub>) de maíz ocurre en diferentes estados de desarrollo de la planta y se hayan asociados con los polisomas, lo cual indica que no representan ARNm almacenados como se ha observado en oocitos no fertilizados de *Xenopus* (Maxson et al., 1983).

La posible señal de poliadenilación en ARNm de H<sub>1</sub> de maíz ha sido localizada dentro de la secuencia octanucleotídica 5' -ATG(G)AAATG- 3' ubicada entre el nucleótido 17 y el 27 después del codón de terminación (Chaubet et al., 1988).

## LA EXPRESION DE LOS GENES DE LAS HISTONAS.

### CICLO CELULAR.

Han pasado más de dos décadas desde que Robbin y Borun (1967) descubrieron que las proteínas histonas son sintetizadas en tasas significativas solamente durante la fase S del ciclo celular. Actualmente se sabe que existe una estrecha correlación en la expresión de los genes de las histonas, la cual se encuentra íntimamente simultánea con la síntesis del ADN en la mayoría de los casos estudiados ( Hentschel y Birnstiel, 1981; Chaubet et al., 1989; Heintz, 1991 ), aunque, como ya se ha mencionado, existen alguna excepciones , como por ejemplo embriones tempranos de erizo de mar (Arceci y Gross, 1977) o en maíz ( Zatlanova e Ivanov, 1988). Lo anterior indica que existe una expresión génica diferencial de los genes de las histonas, la cual se manifiesta en función del estado funcional de la célula ( Maxson et al., 1983 ). De esta manera, existe una amplia evidencia experimental que indica que la síntesis de las histonas durante la fase S del ciclo celular es el resultado de un incremento en la concentración de los ARNm de las histonas debido probablemente a los procesos transcripcionales y postranscripcionales que se verifican durante la expresión de los genes (Borun et al., 1975 ).

El aislamiento de clonas de genes de histonas de una gran variedad de especies animales y algunas especies vegetales ha permitido confirmar el hecho de que la acumulación de ARNm de histonas es regulada por ambos procesos y que estos mecanismos son dinámicos y pueden ser activados rápida y reversiblemente múltiples veces durante una fase S particular ( Sittman et al., 1983; Heintz et al., 1983 ). El incremento de aproximadamente 20 veces observado durante la fase S ocurre en una variedad de eucariontes desde las levaduras hasta el hombre (Heintz, 1991).

La regulación de la tasa de incremento en la transcripción de los genes de las histonas durante la fase S es dada por las secuencias dentro de la región regulatoria o promotora y su relación con los factores de transcripción. Así, los análisis de las modificaciones de los promotores de histonas H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>2B</sub> y H<sub>4</sub> en células animales han establecido claramente que cada una de estas clases de genes requieren de su UTRs 5' completa para la correcta transcripción durante la fase S ( Capasso y Heintz, 1985, Artischvsky et al., 1985 y 1987; Dalton y Wells, 1988; Hwang et al., 1990). Estas regiones promotoras presentan secuencias o elementos consenso específicos, los cuales son altamente conservados en

posición, orientación y secuencia dentro de una familia específica de genes de histonas de una variedad de organismos eucarióticos ( Wells, 1986 ).

Los elementos o secuencias consenso que se encuentran en la región promotora de la mayoría de los genes eucarióticos presentan particularmente 3 regiones, las cuales se ubican antes del sitio de inicio de la transcripción de la siguiente manera ( Heintz, 1991 ):

a).- Un núcleo promotor ( C P; por las siglas del inglés *core promoter* ), la cual consiste de una secuencia mínima necesaria y suficiente para el propio inicio de la acción de la RNA polimerasa II. Esta región, de manera general, comprende la caja TATA y el elemento iniciador; ambos son indispensables para la iniciación de la transcripción, dado que deleciones en esta región pueden presentar efectos dramáticos en la iniciación de la transcripción *in vitro* ( Hanly et al., 1985 ).

b).- Una región de subtipos específicos de secuencias consenso (SSCS; siglas del inglés *subtype specific consensus sequences*) la cual es requerida para un correcto control de la inducción de la transcripción de los genes de las histonas al entrar a la fase S (Artischvsky et al., 1987; Hwang et al., 1990; Dalton y Wells, 1988 ). Mutaciones en esta región evitan que no se de una correcta programación de la inducción de la transcripción durante la fase S, por lo que los SSCS de los genes de las histonas son considerados como elementos de simultaneidad con el ciclo celular ( Heintz, 1991 ).

En función de lo anterior, se piensa que esta región está directamente involucrada con la inducción de la transcripción de los genes de las histonas en la fase S del ciclo celular ( Heintz, 1991 ).

c).- Una región denominada dominio distal activador ( DAD; siglas del inglés *distal activating domain* ), la cual presenta secuencias que se encuentran 70 pb antes del sitio de iniciación de la transcripción y presentan cierta variabilidad entre miembros individuales de una familia de genes dados. Se ha observado que deleciones en esta región provocan un decremento de hasta 20 veces en la tasa de transcripción ( La Bella et al., 1989 citado por Heintz, 1991 ). Dentro de esta región existen secuencias que son requeridas para un correcto control de la regulación de la transcripción durante el ciclo celular; así tenemos, por ejemplo a la caja GC y la caja AC en el gen de la histona H<sub>1</sub> de algunos mamíferos ( Dalton y Wells, 1988 ). Se piensa que el papel más importante de la región DAD es la de determinar cual de los miembros o genes diferentes de una familia de genes de histonas debe ser el mayor productor de mensajeros de histona en cada tipo de células ( Hanly, 1989; citado por Heintz, 1991 ). Lo anterior es

confirmado por la presencia de variaciones en DAD en las diferentes copias de cada uno de los genes de las histonas que codifican para cada uno de los subtipos de las proteínas de histonas y el cual puede determinar que subtipo de gen es sobreexpresado en una población mayoritaria de las células con división activa en una variedad de organismos eucarióticos (Heintz, 1991).

En términos generales, se puede sugerir que estas tres regiones son necesarias para una correcta regulación de la transcripción de los genes en la fase S. Lo anterior es confirmado por la amplia gama de evidencias experimentales en las que se ha encontrado que ciertas proteínas (consideradas comúnmente como factores de transcripción) interactúan de manera específica con estas regiones y permiten una inducción coordinada de la transcripción génica en la fase S. La mayoría de estas proteínas actúan como cofactores transcripcionales y son proteínas de alto peso molecular. Por ejemplo se puede mencionar a OTF1 (siglas del inglés *origin transcription factor one*) el cual es una proteína de 90-95 kDa presente en extractos nucleares de células HeLa, la cual enlaza con el octámero en H<sub>2</sub>B en la región de SSCS y específicamente estimula la transcripción de este gen hasta 20 veces en un sistema *in vitro*, comparado en el mismo sistema cuando no se encuentra unido a la región SSCS el OTF1 (Fletcher et al., 1987). Otro de los factores caracterizados es H1TF2 (siglas del inglés *transcription factor of histone H1-2*) el cual es una proteína de aproximadamente 45 kDa y que enlaza preferencialmente dentro de la región SSCS de la histona H<sub>1</sub> en la secuencia 5' -CCAAT- 3'. Se ha reportado que esta proteína no es activa en ensayos de transcripción *in vitro*, ya que para ser activa parece requerir de un polipéptido adicional que no ha sido identificado. Los elementos 5' -CCAAT- 3' tienen un carácter multimérico, queriendo esto decir que no son específicamente enlazados con H1TF2 sino que se han observado otros factores como los H1NFB (Van Wijnen et al., 1988) y H1TF1 (Gallinari et al., 1989) los cuales también enlazan con la caja CCAAT de la región promotora del gen de la histona H<sub>1</sub> (Heintz, 1991).

Por otro lado, para el gen de la histona H<sub>4</sub> se ha encontrado otro elemento regulatorio de la transcripción en la fase S, el cual es H4TF2 y es una proteína de aproximadamente 60 kDa que enlaza específicamente en la región SSCS permitiendo una estimulación *in vitro* de la transcripción de dicho gen (Dailey et al., 1988, citado por Heintz, 1991).

En humanos, se ha encontrado otro factor análogo que permite el control de la transcripción del gen de la histona H<sub>4</sub> durante el ciclo celular. Este factor, H1NF-D, al igual que H1NF-A y H1NF-C interactúa en



dos sitios dentro de la región DAD, específicamente en los sitios I ( que se localiza del nucleótido -128 al -152 ) y en el sitio II (del nucleótido 64 al -91 ) antes del sitio de inicio de la transcripción (Pauli et al., 1987; Dailey et al., 1986 ).

Es evidente que el control de la expresión no se sustenta exclusivamente en estos y otros posibles factores, dado que evidencias experimentales indican que otros procesos tales como modificaciones transcripcionales y postrcripcionales están ejerciendo un papel importante; también se tiene que tomar en consideración que la inducción de la transcripción en la expresión de los genes de alguna manera se ve críticamente influenciada por el estado funcional de la célula y de los mismos eventos de crecimiento y desarrollo del nuevo individuo ( Heintz, 1991).

La expresión de los genes de las histonas se haya pues sujeta a una estricta regulación a lo largo del ciclo celular puesto que como ya se mencionó, se ha evidenciado que existe un acoplamiento temporal y funcional entre la síntesis de proteínas de histonas y sus niveles de ARNm con la síntesis de ADN (revisado en Stein et al., 1984 citado por Van Wijnen et al., 1991 ). Lo anterior ha sido demostrado en varios sistemas de cultivo de tejidos de mamíferos utilizando células derivadas de tejidos normales diploides, transformadas y tumorigénicas ( Holthuis et al., 1990; Ito et al., 1989; Sharma et al., 1989; Gallinari et al., 1989; Kroeger et al., 1987 ). De este modo, la regulación de los genes de las histonas seguramente es mediada por múltiples mecanismos transcripcionales y postrcripcionales involucrando secuencias del promotor y factores de transcripción que se unen al promotor (Pauli et al., 1987; Dalton y Wells, 1988; Van Wijnen et al., 1989), en la actividad de procesamiento del extremo 3' de los ARNm (Stauber y Schumperly, 1988; Vasserot et al., 1989; Liu et al., 1989 ), en la degradación de los ARNm (Ross et al., 1986; Peltz y Ross, 1987; Morris et al., 1991 ) y en la localización subcelular de los ARNm ( Zambetti et al., 1987; Zambetti et al., 1990 ).

Se sabe que el procesamiento selectivo y la desestabilización de los ARNm de histonas contribuye significativamente a los niveles celulares de los mismos en células que se dividen activamente (Stein et al., 1989; Owen et al., 1990 ).

La mayoría de la información relacionada con la expresión de los genes de las histonas ha sido obtenida a partir de sistemas animales

tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* ( Van Wijnen et al., 1991 ); en el caso de plantas, esta información es bastante escasa.

## LA GERMINACION. ASPECTOS GENERALES.

### LA GERMINACION DEL EMBRION DE MAIZ

#### Definición de semilla.

Una semilla es el producto maduro de un óvulo fertilizado. Esta estructura es morfológicamente compleja y contiene tejidos de diferente composición cromosómica. El embrión, en la mayoría de los casos es diploide, excepto para las especies apomicticas; el endospermo es la principal fuente o compartimiento de almacenaje de reservas y es triploide ( Wilkins, 1984 ). La formación del embrión se realiza de la manera siguiente :

Una célula megaspora madre se desarrolla en el óvulo, la cual, por medio de divisiones meióticas, forma 4 células-núcleos homólogas, las megasporas hijas. De éstas, tres degeneran mientras que la cuarta se desarrolla dentro del saco embrionario. El núcleo haploide de la célula del saco embrionario pasa por 3 divisiones sucesivas resultando en una estructura con 8 núcleos, en donde tres de ellos se sitúan en la región micropilar y uno de éstos, por medio de diferenciación, pasará a ser el óvulo (gameto femenino). Los otros 3 núcleos se sitúan en el extremo contrario y otros dos más se ubican en la parte central del saco embrionario formando estos un núcleo fusionado ( $2n$ ).

La fertilización ocurre de la siguiente manera: dos núcleos generativos del grano de polen ( gameto masculino ) se introducen al interior del saco embrionario a través del tubo polínico formado por un núcleo del grano de polen en donde uno de los núcleos generativos fecunda al núcleo del óvulo para formar una célula diploide que posteriormente será el embrión, en tanto el otro núcleo generativo fecundará al núcleo fusionado ( $2n$ ) para formar una estructura con 3 núcleos ( $3n$ ) el cual, por divisiones sucesivas formará el tejido de almacenaje de la semilla -el endospermo -. Este, en los estados tempranos del desarrollo de la semilla rodea al embrión. Por otro lado, los integumentos del óvulo se desarrollan dentro de la cubierta de la semilla o testa (Mahershware, 1950; citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989). De este modo la semilla presenta 3 estructuras básicas (Fahn, 1982):

- a).-Un embrión del cual resultará la futura planta.
- b).-El endospermo, generalmente conocido como tejido de reserva, que nutrirá al embrión durante su crecimiento inicial hasta que alcance el estado de plántula, en la que el desarrollo de hojas y raíces permitirá la independencia desde el punto de vista nutricional.
- c).-una cubierta seminal que encierra a las dos partes anteriores, la cual puede ser suave, gelatinosa o dura, esta última encontrada

en la mayoría de las semillas. Dicha estructura presenta una alta importancia dado que forma una barrera entre el embrión y el medio ambiente inmediato. La cubierta de la semilla está formada por los integumentos seminales y la propiedad más clara de esta es de la establecer la permeabilidad selectiva al agua y gases. La impermeabilidad de la cubierta de la semilla al agua contribuye a mantener el estado de dormancia o quiescencia.

Lo anterior sugiere que la semilla es una estructura que después de que alcanza su madurez fisiológica ( o comercial desde el punto de vista agronómico ) se encuentra en reposo, dado que se haya fuertemente deshidratada y compuesta principalmente de tejidos de reserva y un embrión rodeados de una cubierta por lo general impermeable al agua y a los gases. En ella, los procesos metabólicos se encuentran muy reducidos, lo cual la hace presentar un estado de vida latente, ya que la ausencia de consumo de oxígeno así lo demuestra (Bidwell, 1979 ).

La variabilidad entre semillas se manifiesta de manera externa en el tamaño y la forma; esta, de manera general depende de la forma del ovario, las condiciones bajo las cuales la planta parental crece durante la formación de las semillas, el tamaño del embrión, la cantidad de endospermo presente y la especie, entre otros. La existencia de variación entre semillas de la misma especie se conoce como polimorfismo y este se caracteriza por diferencias en forma, color, tamaño, comportamiento durante la germinación y la dormancia (Fahn, 1982).

El embrión consiste de una radícula, una plúmula, uno o más cotiledones y un hipocotilo el cual conecta la radícula y la plúmula. Se sabe que la cubierta de la semilla juega un papel sumamente importante en el transporte de sustancias de reserva de las partes productoras de la planta al embrión ( Murray, 1987 ). La maduración de semillas está estrechamente relacionada con el proceso de desecación, ya que muchas semillas maduras contienen solamente de 5 a 10 % de agua. Además, el periodo de desecación parece ser, en muchas semillas, un estado esencial del desarrollo a manera de característica previa a la germinación ( Kermodé y Bewley, 1986; Kermodé et al., 1986; Quatrano, 1987; citados por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ) (ver figura 5a y 5b).

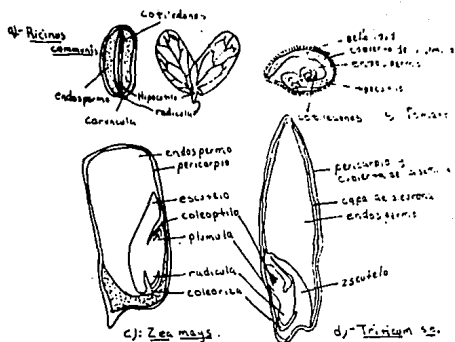


Figura 5a. Ejemplos estructurales de varias semillas (Tomado de Meyer y Poljakoff-Mayber, 1989).

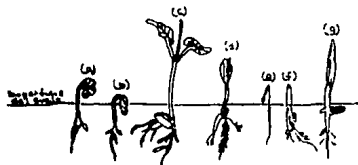


Figura 5b. Ejemplos morfológicos de plántulas. a).- *Ricinus communis*, b).- *Phaseolus vulgaris*, c).- Cebolla con epigeal; d).- *F. mulliflorus*, e).- *Zea mays*, y f).- *Tradescantia virginiana* con hipogeal. Tomado de Meyer y Poljakoff-Mayber, 1989.

### **Algunas definiciones de germinación.**

La germinación de la semilla se inicia con la imbibición o toma de agua y culmina con la protrusión de la radícula la cual en la mayoría de los casos comprende solamente la elongación celular y no necesariamente la división celular, dado que la toma de agua por la semilla rápidamente incrementa o elonga las vacuolas hasta que estas se ubican en una parte central de la célula ( Bewley y Black, 1978 ). Desde el punto de vista fisiológico, Bidwell, (1979) define a la germinación como el proceso en que se inicia la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento.

Se menciona que la germinación de una semilla ocurre cuando la radícula protruye a través de su cubierta. Puesto que la división celular se inicia cercanamente a la elongación ( Wilkins, 1984 ), algunos fisiólogos de semillas toman estos eventos como la terminación de la germinación (Toole et al., 1956 ).

Mayer y Poljakoff-Mayber, (1989) definen a la germinación de semillas de plantas superiores como aquellos eventos a partir de los cuales semillas secas quiescentes presentan una respuesta a la toma de agua, para mostrar un incremento en su actividad metabólica general y que permite iniciar la formación de una plántula a partir del embrión. Por ello, resulta difícil definir el estado preciso en el cual la germinación termina y se inicia el crecimiento ( Wilkins, 1984 ).

Todas las definiciones de la germinación incluyen a la división celular como parte del fenómeno. La división celular es usualmente seguida por un alargamiento o elongación de las células hijas embrionarias. A pesar de lo anterior, todavía existe cierta controversia acerca de cual proceso es primero (la división o la elongación celular) durante el inicio del proceso de germinación. De este modo, en algunas semillas la división celular podría ocurrir primero seguida por la elongación y en otros casos ocurriría lo contrario ( Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ).

### Viabilidad y vida media de semillas.

Las semillas retienen su capacidad para germinar en función de su estado de desecación mientras que el tiempo por el cual pueden mantenerse viables es determinado genética y ambientalmente. De esta manera, la viabilidad es mantenida por mayor tiempo cuando las semillas se mantienen bajo condiciones que permitan un estado metabólico quiescente (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989).

La pérdida de viabilidad de semillas puede ser debida a varios factores. Entre ellos se tienen: un prolongado periodo de almacenaje, el cual podría provocar, entre otras cosas lesiones en su ADN. En *Secale*, por ejemplo, se ha observado que durante la imbibición las lesiones sufridas en el ADN durante el almacenaje son reparadas muy tempranamente (Osborne et al., 1980; Osborne et al., 1981; citados por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989). Además, tales lesiones en el ADN parecen ocurrir también durante la dormancia. Es claro que la rehabilitación del genoma es esencial para una efectiva germinación (Osborne et al., 1984 citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989).

La pérdida de viabilidad durante el almacenaje también se acompaña por varios cambios químicos, como por ejemplo los cambios inducidos en lípidos por procesos peroxidativos, donde los radicales libres generados pueden atacar proteínas de membrana causando daños a la estructura de la misma (hacerla más frágil, por ejemplo) (Bewley, 1986).

Por otro lado, se sabe que la mayoría de las semillas de plantas superiores son desecadas durante el estado de maduración. Este proceso de desecación, como ya se dijo, es a menudo considerado como un paso o condición necesaria de la semilla para su subsecuente germinación; otras semillas, por el contrario pierden su viabilidad si son desecadas. A estas últimas se les considera como recalcitrantes y a las primeras como ortodoxas (King y Roberts, 1979; citado por Bewley y Black, 1986).

### **El vigor de semillas.**

Se denomina vigor al potencial de la tasa de crecimiento de la plántula y se relaciona con la emergencia de la misma. La pérdida de vigor no necesariamente implica una inhabilidad absoluta para germinar y desarrollar una planta completa y normal, aunque esto está frecuentemente acompañado o relacionado con la represión de eventos bioquímicos tempranos durante la germinación. Generalmente el término vigor toma mayor importancia en la práctica de la agricultura comercial, ya que es un medio para estimar la emergencia de plántulas en el campo, lo cual lo hace en ocasiones tan importante como el porcentaje mismo de germinación ( Heydecker, 1972; citado por Khan, 1982 ).

### **Factores que afectan la germinación.-**

La toma de agua por el embrión de la semilla es el primer proceso que ocurre durante los momentos iniciales de la germinación. Esta toma de agua es dada por la imbibición y su terminación está determinada por 3 factores principales: la composición de la semilla, la permeabilidad de la cubierta de la semilla o fruto al agua y gases, y la disponibilidad del agua en forma líquida o gaseosa en el medio ambiente. Este proceso físico está relacionado con las propiedades de los coloides de manera que no existe ninguna relación absoluta con la viabilidad de las semillas, ocurriendo de igual manera en semillas vivas ó en semillas muertas por calor u otro procedimiento ( Bewley y Black, 1978 ). Durante el proceso de imbibición las moléculas del agua entran en contacto con las sustancias de la semilla las cuales tienden a hincharse, causando con ello una saturación de las partículas coloidales y en adición, ocupando los espacios capilares e intracelulares . La hinchazón del coloide resulta en la producción de una considerable presión de imbibición, la cual puede provocar el rompimiento de la cubierta de la semilla, con lo cual se permite que el embrión emerja proporcionando además un espacio en el suelo para el desarrollo de la planta. Además, la magnitud de la presión de imbibición es también una indicación del poder de retención de agua por la semilla y por lo tanto determina la cantidad de agua requerida para la rehidratación de los tejidos de la semilla durante la germinación. ( Bewley y Black, 1978; Murphy y Noland, 1982 ).

La disponibilidad de agua para la imbibición depende de la composición del medio en el cual la germinación toma lugar. La captación final de agua podría ser determinada por el potencial de agua



circundante a la cubierta de la semilla determinando su grado máximo de imbibición. (Nikolaeva, 1969; citada por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ).

Otro de los factores que afecta la germinación de las semillas es la composición de la atmósfera ambiental; la mayoría de las semillas germinan bajo condiciones aeróbicas ( atmósfera conteniendo 20% de oxígeno y 0.3% de CO<sub>2</sub> y otros gases en distintas concentraciones ) y unas pocas bajo condiciones anaeróbicas ( Kennedy et al., 1980 ).

La temperatura también juega un papel importante. Así, tenemos que la mayoría de las semillas secas son bastante resistentes a temperaturas extremas, pero, de manera general, las semillas presentan una temperatura óptima en la cual se alcanza el más alto porcentaje de viabilidad y por lo tanto de germinación en el menor tiempo posible. El rango de temperatura dentro del cual diferentes semillas germinan es determinado por el origen de la semilla, por las diferencias genéticas entre una especie dada y por la edad de la semilla.

La luz es otro de los factores que afectan la germinación de las semillas. Las semillas han sido clasificadas en 3 grupos dependiendo del efecto que este agente físico tiene sobre ellas: semillas cuya germinación es favorecida por la luz; semillas cuya germinación es favorecida por la oscuridad y aquellas semillas que son indiferentes a la luz o a la oscuridad ( Kinzel, 1926; citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ). La luz en general no es la que influye en la germinación de las semillas; es una longitud de onda en particular. El espectro de luz menor a 290 nm inhibe la germinación de algunas semillas, entre 290-400 nm el efecto no es del todo claro; en el rango de luz visible, de 400-700 nm y particularmente entre 560 y 700 nm ( la luz roja ) se promueve la germinación; la luz azul la inhibe (Everani et al., 1957; citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989).

La dormancia de la semilla es un estado de quiescencia en donde el metabolismo se encuentra reducido a un mínimo, lo que le permite al embrión mantener su viabilidad y poder en un momento determinado, cuando las condiciones ambientales lo permitan, reiniciar su actividad metabólica y germinar para formar una nueva planta ( Vegis, 1964 ). De este modo, las plantas que crecen en regiones con periodos estacionales pronunciados, han desarrollado un mecanismo que les permite sobrevivir en periodos no favorables para su germinación, donde el crecimiento podría estar comprometido por bajas temperaturas o condiciones de estrés de agua u otros factores ambientales (Wilkins, 1984 ).

Una gran cantidad de especies ( principalmente granos ) presentan una dormancia innata después de que han sido cosechadas,

mientras que otras semillas presentan una dormancia inducida por condiciones adversas del medio ambiente como la temperatura ( Bothwick y Robbins, 1929; citado por Wilkins, 1984 ), tensión reducida de oxígeno (Edwards, 1969) o estrés por agua (Khan, 1960). La dormancia termina en una semilla cuando esta es provista de suficiente agua, oxígeno para su metabolismo aeróbico y una temperatura óptima.

La pérdida de la dormancia en semillas secas almacenadas se da principalmente por la falta de un estado completamente maduro de la semilla el cual es alcanzado durante su desarrollo embrionario, así como también por altas temperaturas que pueden presentarse durante la maduración de la semilla ( Wilkins, 1984 ).

## Metabolismo durante la germinación de semillas.

Las semillas secas se caracterizan por una baja tasa de metabolismo, dado que la maquinaria enzimática se encuentra prácticamente paralizada. Al rehidratarse la semilla durante la imbibición, la toma de agua activa a las proteínas permitiendo con ello una elevación de la tasa de la actividad metabólica durante el período de germinación (Bewley y Black, 1978). Las semillas secas presentan una baja tasa de respiración y conforme estas se van rehidratando durante la imbibición, la respiración aumenta.

Durante la toma inicial de agua ( imbibición ) en la germinación y durante el crecimiento inicial, la respiración requiere de sustratos disponibles, los cuales derivan de la hidrólisis de sustancias de reserva, principalmente carbohidratos ( Wilson y Bonner, 1971).

De este modo, los cambios químicos que ocurren al inicio de la germinación consisten de tres tipos principales :

a).-La degradación de ciertos materiales de reserva en la semilla.  
b).-El transporte de los productos de dicha degradación de una parte de la semilla a otra, especialmente del endospermo al embrión o de los cotiledones a las partes en crecimiento.

c).- La síntesis de nuevos materiales.

Además, es de especial importancia la iniciación de la síntesis de proteínas durante la germinación y su relación con el metabolismo de los ácidos nucleicos ( Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989).

Los estados iniciales de la germinación están, consecuentemente, acompañados por una pérdida neta de peso seco debido a la oxidación de diferentes moléculas. Este se vuelve a recuperar cuando las plántulas se han formado, esto es, cuando una raíz ha emergido y toma minerales del medio y los cotiledones de las primeras hojas están expuestos a la luz y son capaces de realizar fotosíntesis ( Wilkins, 1984 ).

## La síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y la germinación del embrión maíz .

Durante la germinación, la síntesis de proteínas es esencial para que emerja la radícula; esta síntesis, que comienza después de la imbibición, puede ser independiente de la síntesis de ARN. Sin embargo, para que la germinación se complete, es necesario que se presente la síntesis de novo de ARN ( Bewley y Black, 1986 ).

Así, la actividad y cantidad de polisomas ( aquellos ribosomas asociados con ARNm ) es usualmente muy baja en semillas secas o bien es completamente nula. Durante la germinación de trigo, los polisomas aparecen rápidamente en embriones ( cuadro 6, Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ). En algunos casos, los ribosomas pueden ser sintetizados inmediatamente al inicio de la germinación, mientras que en otros casos existen suficientes ribosomas en el embrión para la formación temprana de polisomas. De esta manera, en algodón la formación de ribosomas y la síntesis de ARN ocurren durante los estados iniciales de la germinación ( Delseny et al., 1980 y 1981; citados por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ).

En semillas secas, la ausencia de polisomas es clara. La aparición e incremento de los mismos se ve favorecida cuando las semillas son hidratadas; además, se observa una disminución en el número de ribosomas libres o no unidos, dado que estos están siendo reagrupados para la formación de los complejos de síntesis de proteínas. De este modo, conforme se incrementa la cantidad de polisomas, la actividad de síntesis de proteínas aumenta (Brooker et al., 1978 ).

Se sabe que la síntesis de proteínas se inicia minutos después de iniciada la imbibición o hidratación de las semillas, cuando algunos de los ARNm almacenados durante la embriogénesis son directamente utilizados. La síntesis de proteínas continúa con los ARNm sintetizados de novo con lo cual es posible que se verifiquen los eventos posteriores que dan paso a la germinación de la semilla ( Payne et al., 1978 ).

Por otra parte, se han investigado algunos de los procesos que regulan la continuación del crecimiento y diferenciación durante la germinación de semillas, estudiando la actividad transcripcional de conjuntos de genes, los cuales se expresan en un estado específico de la embriogénesis y en eventos postgerminativos *in vivo* ( Comai y Harada, 1990 ).

Durante la embriogénesis se ha detectado una actividad transcripcional alta en unos 15,000 a 30,000 genes diferentes y la complejidad de los ARNm se incrementa significativamente conforme avanza el desarrollo del embrión empezando a decaer cuando se inicia la desecación, hasta quedar sólo

Periodo de Imbibición	Actividad de ribosomas com/mg ARN	Contenido de polisomas unidades O.D.
0	268	0.01
15 minutos	6680	0.16
30 minutos	23200	1.61
1.5 hr	31900	2.42
6 hr	56300	3.66

**Figura 6.**— Actividad de los polisomas de embrión de trigo durante la germinación. Los embriones de trigo fueron imbibidos durante los tiempos señalados en la columna de la izquierda y los polisomas aislados. La actividad se determinó midiendo la incorporación de leucina radiactiva. Tomado de Mayer-Poljakoff y Mayer, (1989) en base a los experimentos de Marcus, 1969.

activos unos cuantos genes ( Goldberg, 1986; Dure, 1985 ). En el frijol soya se ha observado que desde la etapa media de la maduración del embrión existen de 7 a 10 genes para proteínas de reserva que se expresan y cuyos mensajeros son almacenados en los cotiledones, lo cual representa cerca del 50% del total de los ARNm presentes ( más de 10,000 copias ) en las células de los cotiledones. La expresión de estos genes empieza a decaer conforme la semilla se deshidrata (Goldberg 1981a; Goldberg, 1986 ). En chicharo ( *Pisum sativum*, L.) se han detectado 3 grupos de genes de la leg-globulina ( globulina 11 S) los cuales se ubican en cromosomas diferentes: dos en el cromosoma 1 y el otro en el cromosoma 7. Estos genes se expresan diferencialmente durante el desarrollo del embrión; por ejemplo, los provenientes del cromosoma 1 se expresan muy tempranamente durante la embriogénesis y conforme avanza ésta, la presencia de estos transcritos decrece, apareciendo los del cromosoma 7, los cuales prevaleceran hasta el final de la embriogénesis ( Domoney y Casey, 1985).

En función de lo anterior, se puede decir que el desarrollo embrionario y postgerminativo de plantas se haya generalmente separado por un período de latencia, el cual es consecuencia de la deshidratación ( 4-5% de contenido de agua en semillas de nabo y maíz, respectivamente (Bewley y Black, 1983; Harada et al., 1988). Durante muchos años se consideró a dicho período de latencia como sinónimo de inactividad metabólica. Sin embargo, recientemente se han encontrado resultados sumamente interesantes en núcleos aislados de semillas secas de *Brassica napus*, L. (cero horas) en donde se observó que estos son transcripcionalmente activos, aunque sólo en un 8% del valor máximo obtenido durante la embriogénesis temprana (Comai y Harada, 1990). Asumiendo que la tasa de elongación de la transcripción es constante en núcleos aislados, los resultados indican que la actividad de los complejos de ARN polimerasa está reducida en semillas secas (McKnight y Palmiter, 1979; Groudine et al., 1981; Darnell, 1982). Además, hay estudios acerca de la cantidad de genes que se expresan durante el proceso de embriogénesis, algunos de los cuales son activos tanto en embriones secos como en plántulas y en plantas adultas (Goldberg et al., 1989 ). De la misma manera, se tienen evidencias que indican que la expresión diferencial de genes y la acumulación de sus productos (ARNm) se observa exclusivamente durante la embriogénesis, mientras que otros son prevalecientes en plántulas y estos mismos no son detectados en embriones secos ( Harada et al., 1988; Hughes y Galau, 1989).

Por otro lado, estudios sobre el efecto de la desecación prematura en embriones en desarrollo han sugerido que este proceso es una señal requerida para el cambio del programa de expresión génica de embriogénico a

postgerminativo ( Bewley et al., 1989 ); la comparación de los transcritos de embriones, semillas secas y plántulas sugiere que el tiempo de cambio de la expresión del patrón embriogénico a uno de tipo postgerminativo ocurre después de que las semillas son rehidratadas ( Comai y Harada, 1990 ).

Haciendo una evaluación de la competencia transcripcional de los genes de núcleos aislados de semillas secas, se ha observado que solamente aquellos genes que son transcripcionalmente activos durante la embriogénesis tardía, son competentes para ser transcritos en semillas secas; al contrario de genes expresados específicamente en plántulas o en embriones inmaduros y plántulas pero que no son transcritos en núcleos aislados de semillas secas, sino que son activos en embriones 15 horas después de iniciada la imbibición. Lo anterior indica que la rehidratación inicia un cambio de un patrón de expresión génico embriogénico a uno postgerminativo ( Comai y Harada, 1990 ).

Con lo anterior podemos sugerir que la rehidratación es el disparo de la expresión de muchos genes, pero es también claro que durante el estado seco de las semillas, la transcripción de muchos de ellos disminuye pero no desaparece (Comai y Harada, 1990).

De la misma manera, en estudios de la caracterización de la población de los ARNm presentes en ejes embrionarios de *Phaseolus* se mostró que ciertos mensajeros se encuentran presentes sólo en el desarrollo embrionario; mientras que otros fueron característicos de ejes en germinación ( Misra y Bewley, 1985 ). Algunos de los ARNm fueron almacenados en las semillas secas, mientras que otros fueron degradados cuando los ejes fueron rehidratados. En ejes embrionarios aislados de maíz fueron formados nuevos ARNm luego de ser iniciada la imbibición y traducidos dentro de las primeras 24 h. Aparentemente estos nuevos mensajeros fueron formados aún antes de ser terminada la toma de agua por el embrión y se mueven rápidamente dentro del citoplasma antes de que los ARNr sean movilizados ( Dommes y Van de Walle, 1983 ).

Los ARNm almacenados presentes en los embriones de semillas de rábano fueron formados durante la embriogénesis y muchos de éstos codifican aparentemente para proteínas involucradas en la misma embriogénesis (Aspart et al., 1984). Así, la conclusión de los estudios de caracterización de los ARNm almacenados en semillas, es la de que muchos de éstos son degradados muy tempranamente durante la germinación, pero no se excluye la posibilidad de que antes de que se inicie la degradación generen algunas proteínas que podrían ser funcionales durante el inicio del proceso de germinación. Sin embargo, es muy probable que los nuevos mensajeros que

se sintetizan inicialmente son los requeridos para permitir el correcto avance de la germinación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989).

De esta manera, Sánchez-Martínez et al., (1986) estudiando la población de polipéptidos expresados durante el desarrollo de embriones de 20 días después de la polinización hasta la maduración y durante los estados iniciales de la germinación de maíz, observaron 3 grupos de polipéptidos :

1).- Polipéptidos presentes en embriones en desarrollo, algunos de los cuales no pueden ser detectados en las semillas secas maduras, mientras que otros persisten aún durante las primeras dos horas de iniciada la imbibición, pero se encuentran ausentes después de las 8 horas;

2).- Polipéptidos ausentes en muchos embriones jóvenes, pero que son formados durante la maduración. Algunos de éstos son de vida corta y están ausentes en semillas secas, mientras que otros persisten por un período variable de tiempo durante los estados iniciales de la germinación y,

3).- Polipéptidos que están ausentes en embriones en desarrollo y en semillas secas y sí o están presentes durante la germinación.

Lo anterior nuevamente apoya la presencia de ARNm almacenados en la semilla seca durante el desarrollo embrionario (Peumans et al., 1992).

Por otro lado, se sabe que la elongación y división celular se verifican durante la germinación, lo cual hace obvio que se de la necesidad de sintetizar proteínas y ácidos nucleicos.

Así, la división celular requiere, entre otras cosas, de ADN íntegro. De este modo, durante la primera hora de la imbibición en embriones de arroz  $\gamma$ -irradiados y en maíz se ha observado que la síntesis de ADN es de tipo reparativo (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Vázquez-Ramos et al., 1988). Esto último es apoyado por los trabajos de Zarain et al., (1987) en las que trabajando con ejes embrionarios de maíz  $\gamma$ -irradiados e imbibidos en presencia de benzil-adenina/<sup>3</sup>H timidina y comparados con controles (sin irradiar y sin benzil-adenina) y con los embriones sin irradiar e imbibidos con benzil-adenina, observaron que en las 3 primeras horas de iniciada la imbibición la incorporación de timidina tritriada es mayor en ejes irradiados e imbibidos en benzil-adenina que en los no irradiados, lo cual sugiere que se verifica una síntesis de ADN de tipo reparativo.

Se ha observado la síntesis de ADN horas después de iniciada la imbibición de la semilla; sin embargo, una apreciable síntesis de esta molécula se observa antes de la síntesis de proteínas. Además, se ha detectado síntesis antes y después de la división celular y esta es a



menudo, pero no siempre, un prerequisite para la protusión de la radícula (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989 ).

De este modo, durante la germinación de semillas ocurren múltiples cambios en el núcleo durante la transición de estados quiescentes a estados activos de la semilla. Estos cambios incluyen una dispersión de la cromatina y una vacuolización de los núcleos. Durante el ciclo celular la mitosis es seguida por el crecimiento durante el cual no existe síntesis de ADN. En este estado el contenido de ADN del núcleo es el de un complemento (2C); posterior a G1 se presenta un período de síntesis de ADN (S) donde el material genético se duplica (4C); al término de S se presenta un segundo período de crecimiento denominado G2 en el cual se sientan las bases para dar paso a la mitosis. Durante el desarrollo nuclear previo a la quiescencia en las semillas de dicotiledóneas, estas son detenidas en el estado latente de la fase G1 ; por el contrario, en maíz y trigo (monocotiledóneas) el ciclo celular puede ser o no ser tan sincronizado en este estado en cuanto al inicio de la quiescencia; ha sido observado que unas semillas son detenidas en G1 mientras que otras lo son en G2. Con el inicio de la imbibición y el consiguiente disparo de la actividad metabólica, algunas de las células en la semilla proceden hacia la división celular y crecimiento. Sin embargo, la replicación del ADN podría no iniciarse inmediatamente en todos los tipos celulares ( Deltour, 1985 ).

Así, durante la imbibición de semillas, la síntesis temprana de proteínas probablemente está basada en buena medida en los ARNm almacenados (Weeks y Marcus, 1971; Caers et al., 1979; Bray y Smith, 1985 ), además de los generados por la transcripción que ha sido detectada a estos tiempos de la germinación (Delseny et al., 1981). Como ya se mencionó se ha observado la existencia de ARNm almacenado en embriones en diferentes especies de semillas quiescentes (Brooker et al., 1978; Payne, 1976; Sánchez de Jiménez, 1981 ). Con base en esto, se ha postulado que estos ARNm son requeridos básicamente para la rápida actividad metabólica que se observa en las primeras horas (0-6) posteriores a la imbibición semillas ( Brooker et al., 1978; Martín y Northcode, 1981 ); otros apoyan la idea de que estos ARNm son requeridos para que continúe la actividad de síntesis de otras proteínas necesarias para la correcta germinación ( Jendrisak, 1980). Algunas de las nuevas proteínas sintetizadas se requieren para reiniciar la división celular en los tejidos embrionarios. En trigo, entre las nuevas proteínas sintetizadas en la germinación, las proteínas ribosomales aparecen primero (Lane y Tumaitis-Kennedy, 1981 ) y en maíz las histonas aparecen poco después (Van de Walle y Deltour, 1974 ) simultáneamente con la iniciación de la

división celular ( Bryan et al., 1983; Plumb et al., 1984), por lo que las histonas han sido involucradas en la regulación del ciclo de división celular (D'Anna et al., 1982; Wu et al., 1982).

De este modo, en maíz se ha demostrado que la poza de aminoácidos en las primeras 24 horas y específicamente entre las 18 y 24 horas de iniciada la imbibición aumenta en forma general de 3.5 a 9.7 veces ( Aguilar y Sánchez de Jiménez, 1984). Lo anterior refuerza lo observado por Brooker et al. (1977) en el sentido de que la síntesis de proteínas se lleva a cabo en este período y de que estas proteínas sintetizadas tempranamente son esenciales para el posterior crecimiento y desarrollo (Jendrisak, 1980; Datta et al., 1983).

En este sentido, durante la germinación de las semillas, la existencia de síntesis temprana de proteínas en general y la de histonas en particular, son procesos que tienen una interesante relación con el inicio de la replicación del ADN y la división celular ( Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

En función de lo anterior, la síntesis de proteínas específicas que toma lugar durante la imbibición de semillas parece ser sustentada parcialmente en un conjunto de ARNm almacenados (Weeks y Marcus, 1971; Caers et al., 1979; Bray y Smith, 1985). Así, en las primeras horas de imbibición la síntesis de proteínas ocurre a una tasa muy baja y ello podría ser respaldado por ARNm sintetizado en la embriogénesis tardía y por ARNms transcritos de novo (Spiegel y Marcus, 1975; Martin y Northcode, 1981; Datta et al., 1983; Sánchez de Jiménez, 1984; Masumori et al., 1992) los cuales quizá sean los encargados de reorganizar al genoma. Esto se ve reforzado en modelos animales donde la existencia de pre-ARNm se ha encontrado en huevos de *Xenopus* (Adamson y Woodland, 1974), en erizo de mar (Arceci y Gross, 1977), en *Spisula sp.* (Gabrielli y Baglioni, 1975), y en *Triturus viridescens* (Levenson y Marcus, 1976; Ruderman y Pardue, 1976).

Esto sugiere que la formación de nuevos núcleos de histonas (nucleosomas) podría permitir reestructurar al genoma en períodos tempranos de la germinación de semillas, dado que la síntesis de proteínas histonas durante la imbibición ocurre unas horas antes del inicio de la duplicación del ADN nuclear. En maíz, la síntesis de novo de proteínas histonas se detectó a las 6 horas y se observa una tasa máxima a las 12 horas; posteriormente, a las 15-16 horas, toma lugar la síntesis replicativa en núcleos de células meristemáticas de embriones imbibidos (Zatlanova e Ivanov, 1988; Baiza et al., 1989; Vazquez-Ramos y Osborne, 1986; Zatlanova et al., 1987). Por otra parte, en algunas células de animales la reparación y la duplicación del ADN son eventos posteriores a la expresión de los genes de las histonas, como ha sido

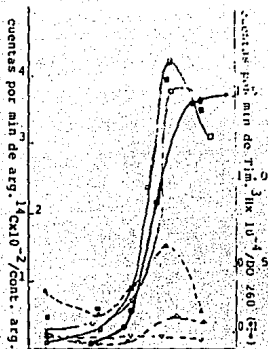


Figura 6.- Síntesis de ADN Y PROTEÍNAS durante el ciclo celular en células de Hamster. Los símbolos corresponden a: ADN (●); proteínas H2A 1y2 (○); H2B (■); H4 (□); HMG 14 (▲); H2A.2 (△); G2 (●); Mitosis (○). G1= 0-3.5 h.; S= 3.5-8h. Tomado de W. Bonner, 1981.

demostrado durante el desarrollo temprano de huevos de erizo de mar, en donde la síntesis de histonas es dirigida por ARNm de origen materno y esta ocurre antes de los primeros 20 minutos donde se verifica el primer ciclo de duplicación del ADN nuclear, prosiguiendo así, de esta manera no coincidente (síntesis de histonas y ADN nuclear) al menos durante los primeros 4 ciclos (Arceci y Gross, 1977).

En este sentido, se ha demostrado que el inicio de la síntesis de ADN nuclear en embriones de maíz durante la germinación se verifica de manera no simultánea con la síntesis de histonas; esto es, la síntesis de histonas es un evento previo de la síntesis de ADN nuclear, ya que se ha observado que durante las primeras 8 horas de iniciada la imbibición de maíz hay síntesis de ADN. Esta síntesis parece ser de tipo reparativo y organelar (Zarain et al., 1987; Zatlanova et al., 1987) mientras que la síntesis duplicativa ha sido detectada hasta las 16 horas de iniciada la imbibición. Lo anterior fue concluido con base en la alta incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en los núcleos de células meristemáticas de embriones de maíz (Baiza et al., 1989).

La aparición de las primeras figuras mitóticas se observa en núcleos de células de mesocotilo (conjunto de células que se encuentran en lo que se denomina coleoriza en la región de la cofia del embrión) a las 12 horas, con una máxima manifestación a las 28 horas, siguiendo en células del nudo escutelar (células que se encuentran entre la región de la cofia y el ápice caolinar y coleóptilo del embrión maduro de la semilla) y por último en células de raíces seminales y primarias (células que conforme avance el proceso de división serán las que den origen a la raíz primaria, las raíces secundarias, las adventicias y las de sostén) a las 32 y 36 horas, respectivamente. Los tres tipos de tejidos alcanzan un máximo valor estacionario a las 36 horas y es cuando se alcanza además el 80% de germinación determinada por la protusión de la radícula (Baiza et al., 1986 y 1989). El hecho de que aparezcan las primeras figuras mitóticas no indica que es en la totalidad del embrión donde está ocurriendo la división celular, sino más bien que son algunas pocas células las que están manifestando este proceso y la generalización del fenómeno al resto del embrión se verificará a partir de las 28 horas (Baiza et al., 1989).

En función de todo lo anterior podemos destacar que en células somáticas de animales la síntesis de histonas se haya temporalmente simultánea a la del ADN (sólo ocurre durante la fase S del ciclo celular) (Robins y Borun, 1967; Breindl y Gallwitz, 1974; figura 6 Wu y Bonner, 1981). Por el contrario, durante la maduración en oocitos y en el desarrollo temprano de *Xenopus* no existe simultaneidad (Adamson y Woodland, 1974), así como tampoco

existe en embriones de erizo de mar (Arceci y Gross, 1977). En plantas, existen diferencias importantes entre estos dos procesos. En maíz se ha observado que la síntesis de histonas presenta un gran pico entre 4 a 12 horas posteriores a la imbibición disminuyendo ligeramente hacia las 16 y aumentando gradualmente hacia las 40 horas cuando el 80% de la germinación ocurre vía protusión de radícula. Por otro lado, en el lapso de 4 a 12 horas no se manifiesta de manera activa y total la síntesis de ADN, sino que esto ocurre hasta las 16-18 horas, alcanzando un estado estacionario alrededor de las 24 horas de iniciada la imbibición. Ello sugiere fuertemente que la síntesis de histonas y la del ADN no se encuentran simultáneas durante la germinación de maíz ( Zlatanova e Ivanov, 1988; Baiza et al., 1986). Esta falta de simultaneidad se ve apoyada por los trabajos de Fukuei et al. (1978) y Kato et al. (1982), en embriones de *Vicia faba*.

Durante la germinación del embrión de maíz, han sido observados dos períodos bien definidos: la elongación temprana de la radícula, que es facilitada por la traducción de los ARNm almacenados y un período de crecimiento sostenido que requiere de la presencia de los nuevos ARNm (Datta et al., 1983; Galli et al., 1981, Jendrisak, 1980 ). Además, se han observado dos características distintivas en estos dos períodos: el primero ( 0-6 hrs ) se ha caracterizado por ser el período de imbibición, cuando los embriones realmente reinician la actividad metabólica después de un período de quiescencia y el segundo ( 18-24 hrs ) cuando los ejes embrionarios inician la protusión de la radícula y se inicia la división celular permitiendo la culminación del proceso de germinación del embrión de maíz ( Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984 ). De este modo, la radícula crece hacia abajo a través de la cubierta seminal hendida para formar la raíz primaria , a la cual siguen la formación de raíces secundarias y/o adventicias y conforme se desarrolla el tallo van apareciendo otros dos tipos de raices de los primeros nudos, las de sostén y la aéreas; mientras que el vástago ( apice vegetativo ) encerrado en su vaina protectora y el coleóptilo, crecen hacia la superficie (Secretaría de Educación Pública, 1990 ).

En conclusión, no se sabe si la síntesis de histonas que tiene lugar entre las 4 y 12 horas posteriores al inicio de la imbibición ocurre por la presencia de los ARNm almacenados de origen materno en ejes embrionarios o si estos son transcritos *de novo* durante las primeras horas de la imbibición, lo cual contrasta con la información obtenida a partir de modelos animales.

Por ello, para contestar esta pregunta se plantea la siguiente hipótesis general de trabajo:

**Hipótesis:**

El inicio de la transcripción de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub> de maíz ocurre durante las fases tempranas de la germinación del embrión.

Para abordar dicha hipótesis, se establecen los siguientes objetivos:

**Objetivos Generales :**

- 1.- Determinar si la síntesis de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub> durante la germinación del embrión de maíz se basa en ARNm almacenado de origen materno o bien en mensajes sintetizados *de novo*.
- 2.- Determinar si la transcripción de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub> del embrión de maíz es simultánea a la división celular durante la germinación.
- 3.- Determinar la posible organización general de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub> en el genoma de maíz.

**Objetivos Particulares:**

- 1.- Montar la técnica de Southern para sondear al genoma de maíz con los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub>.
- 2.- Extraer ARN total de embriones de maíz imbibidos a diferentes tiempos en medio MS sin fitoreguladores.
- 3.- Extraer ADN de alto peso molecular de embriones de maíz.
- 4.- Montar la técnica de Northern para sondear a ARN total de embriones de maíz con los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub>.

## 4.- MATERIALES Y METODOS.-

### 4.1.- MATERIALES.-

#### 4.1.1.- Material biológico.-

4.1.1.1.- Las semillas de maíz ( *Zea mays* L. ) que se utilizaron fueron de la variedad Chalqueño, las cuales fueron proporcionadas por PRONASE ( Productora Nacional de Semillas, Coyoacán, México ) al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

4.1.1.2.- Los ratones utilizados para la extracción de ADN genómico y ARN total a partir de hígado fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

4.1.1.3.- Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

El plásmido pBR-mus-hi-1-H4-Himf (pH<sub>1</sub>) donado por el Dr. Roy S. Wu (de Biotech Research Laboratories, Inc., Rockville, Maryland 20850. Laboratory of Molecular Pharmacology, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda Maryland 20205) a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

El plásmido pMS201 (pH<sub>2</sub>) donado por la Dra. Isaura Meza (del Departamento de Genética del Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México) al Dr. Fernando Montiel Aguirre de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

4.1.1.4.- Cepas bacterianas de *E. coli* C-600 y SF-8, donadas por la Dra. Aurora Brunner (del Instituto de Investigaciones en Fisiología Celular de la U.N.A.M.).

#### 4.1.2.- Materiales de laboratorio.-

Toda la cristalería empleada en la manipulación de los ácidos nucleicos fue lavada previamente con jabón simple, luego con ácido sulfúrico concentrado (96%); posteriormente, enjuagada con agua destilada y después con agua deionizada y secada en un horno a 100° C. Se esterilizó 20 minutos a 15 psi., 120° C.

Todas las soluciones fueron colocadas en frascos ámbar previamente lavados con ácido sulfúrico y esterilizadas. Aquellas soluciones que no se pueden esterilizar por calor se pasaron por un filtro Millipore de 0.45  $\mu$  utilizando un porta filtro Nalgene.

Las pipetas fueron enjuagadas en agua corriente 5-10 minutos y colocadas en mezcla crómica por 24 horas; posteriormente, fueron

lavadas con agua corriente y destilada y luego con agua desionizada, secadas y esterilizadas.

En todos los experimentos se utilizaron guantes desechables para cirujano, de latex.

Se utilizaron reactivos grado analítico para la preparación de medios y soluciones.

#### 4.2.- Soluciones básicas.-

4.2.1.- Tris base/HCl pH 7, 7.5 y 8.0	1M
Sigma # T-1503.	
4.2.2.- NaCl	5M
J.T.Baker # 9084.	
4.2.3.- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid- disodium salt) pH 7.5 y 8.5	0.5M
Sigma # ED255.	
4.2.4.- MgCl <sub>2</sub>	1M
J.T.Baker # 2444.	
4.2.5.- CaCl <sub>2</sub>	0.05M
J.T.Baker #1332.	
4.2.6.- Solución amortiguadora STE	
Tris base pH 7.5	10mM
NaCl	10mM
EDTA pH 8.5	1mM
4.2.7.- Mezcla Crómica.	
Dicromato de potasio	120g
Ac. sulfúrico	1600ml
agua	1000ml

#### 4.3.-Medio de cultivo para el crecimiento de *E. coli* y soluciones para la transformación genética con plásmidos recombinantes.

4.3.1.- Medio Luria ( Roth, 1970 ).

Líquido:

-Triptona	10g/l.
Difco 0123-01(743635)	
-Extracto de levadura	5g/l.
Difco 0127-01-7	
-NaCl	5g/l.



-Timidina	50mg/l.
Sigma T-5018	
Sólido:	
-Agar ( Bacto agar )	12g/l.
Difco 0140-01	
-Antibiótico (cuando sea requerido)	20mg/l.
Sigma A-0140 (ampicilina)	
4.3.2.- Solución de CaCl <sub>2</sub> /timidina	50mM/50mg/ml
4.3.3.- Solución de glicerol 15%.	
Merck # 4094	
4.3.4.- Solución Tris base pH 7.5	10mM

**4.4.-Soluciones para amplificación y aislamiento de plásmidos a partir de *E. coli* por el método de lisado claro (Crewell y Helinaki, 1969).**

4.4.1.-Medio Luria.	
4.4.2.-Solución STE.	
4.4.3.-Lisozima	10mg/ml
4.4.4.-Solución amortiguadora Tris-sacarosa:	
-Tris base pH 8	0.05 M
-Sacarosa	25 %
Sigma # S-9378	
4.4.5.- Solución Triton X-100, EDTA, Tris base/fría:	
-Triton X-100	0.1%
Sigma T-6878	
-EDTA pH 8.5 0.5M	12.5%
-Tris base pH 7.5 1M	5%
-Agua cbp	100%
4.4.6.- Solución saturada fenol/STE.	
4.4.7.- Solución de acetato de sodio	3M
Sigma # S-8750	
4.4.8.- Solución de cloruro de cesio	0.75g/ml
Cabot	
4.4.9.- Solución de bromuro de etidio	10mg/ml
Sigma # E-8751	
4.4.10.- Solución saturada NaCl/STE-isopropanol.	
4.4.11.- Etanol absoluto.	
Merck # 15853	

**4.5.- Soluciones para la amplificación y aislamiento de plásmido a partir de *E. coli* por el método de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (1979) y modificado por Ish-Horowicz (1981):**

4.5.1.- Medio Luria líquido.	
4.5.2.-Solución 1.	
-Glucosa	50mM
-Tris base pH 8	25mM
-EDTA pH 8.5	10mM
4.5.3.- Lizosima	5mg/ml
4.5.4.- Solución 2. (recien preparada).	
-NaOH	0.2N
Sigma # 505-8	
-SDS (sodium dodecyl sulfate- sodium salt)	1%
Sigma # L-5750	
4.5.5.- Solución 3.	
-Acetato de potasio pH 4.8	5M
Sigma # p-1147	
-Acido acético glacial.	11.5%
Merck 1/15850	
-Agua cbp	100%
4.5.6.- Isopropanol puro.	
J.T.Baker # 9084	
4.5.7.-Etanol absoluto.	
4.5.8.-Solución STE.	
4.5.9.-Soluciones requeridas para elaboración de gradientes de CsCl.	

**4.6.-Soluciones para aislamiento del inserto del plásmido.**

**Procedimiento A.-**

Por medio de gel de agarosa de bajo punto de fusión tipo VII (Sigma A-4018) (Reportado por Maniatis et al.,1982).

4.6.1.-Sol. amortiguadora Tris-acetato pH 8.2	10X
-Tris base	0.4M
-Acetato de sodio	0.2M

-EDTA pH 7.5 0.01M

A partir de este amortiguador 10X, por medio de una dilución de 1/10 se obtiene un amortiguador 1X, el cual es utilizado para la elaboración de los geles de agarosa preparativos para aislamiento del inserto o bien para comprobar la integridad de ARN total o ADN genómico cuando es digerido con enzimas de restricción.

-Sol. amortiguadora Tris-borato 5X

-Tris base 54g

-Acido Bórico 27.5g

(Sigma B-6768)

-EDTA 20ml de EDTA 0.5M

-Agua cbp 1000 ml.

De la misma forma, a partir de 5X se obtiene 1X para elaborar el gel preparativo.

#### Procedimiento B.-

Por medio de gel de agarosa tipo I (Sigma A-0169) (Schleif y Wensik, 1981). Al igual que en el procedimiento A se requiere de los amortiguadores mencionados, además de glicerol 50%/tris borato 1X.

4.6.2.- Solución amortiguadora para restricción de ácidos nucleicos con enzimas de restricción.

4.6.2.1.- Solución amortiguadora para restricción con enzimas que requieren una baja concentración de sales.

-NaCl 6 mM

-Tris-HCl pH 7.5 10mM

-MgCl<sub>2</sub> 10mM

4.6.2.2.- Solución amortiguadora de mediana concentración de sales.

-NaCl 60mM

-Tris-HCl pH 7.5 50mM

-MgCl<sub>2</sub> 7mM

4.6.2.3.- Solución amortiguadora de alta concentración de sales.

-NaCl 160mM

-Tris-HCl pH 7.5 20mM

-MgCl<sub>2</sub> 7mM

4.6.3.- Solución amortiguadora para carga de ácidos nucleicos en los geles de agarosa.

4.6.3.1.- Solución amortiguadora para carga de ADN en gel de agarosa:

-Sacarosa 37g

-EDTA 50mM

-Azul de bromofenol	0.1%
(Sigma B-5525)	
-SDS	0.1%
-Agua cbp	cantidad a elaborar

agarosa:

4.6.3.2.-Solución amortiguadora de carga de ARN en gel de	
-Glicerol	50%
-EDTA	1mM
-Azul de bromofenol	0.4%
-Xilol-cianol	0.4%
-Agua cbp	cantidad a elaborar

#### 4.7.- Soluciones para aislamiento y purificación de ADN y ARN de hígado de ratón (u otro tejido) por el método reportado por P. Krieg *et al*, 1983a.

4.7.1.-Solución de fenol/acetato de sodio/hidroxiquinoleina.	
-Fenol (Sigma P-1037)	50ml
-Acetato de sodio 0.3M pH 7.5	50ml
-Hidroxiquinoleina 1% (Merck 7098)	0.5g
-Equilibrada durante toda la noche a temperatura ambiente.	

4.7.2.- Solución de acetato sodio/SDS/EDTA	
-Acetato sodio pH 7.5	0.3M
-SDS	0.5%
-EDTA	5mM

4.7.3.- Solución cloroformo/alcohol iso-amílico ( 24:1)	
-Cloroformo	24
J.T. Baker 9190-62	
-Alcohol iso-amílico	1
Merck # 979	

4.7.4.- Solución de cloruro de litio	4M
(Sigma L-0505).	

4.7.5.- Solución de MgCl <sub>2</sub>	5mM
---------------------------------------	-----

4.7.6.- Solución de DNAasa I (grado I)	20mg/ml.
--	----------

4.7.7.- Etanol 70%	
--------------------	--

4.7.8.- Solución de TE	
-Tris base/HCl pH 7.5	20mM
-EDTA pH 7.5	1mM

4.7.9.- Solución de RNAasa tipo I-A	5mg/ml
(Sigma R-9005 pancreas bovino).	

4.8.-Soluciones para aislamiento de ARN total y ADN de alto peso molecular a partir de tejidos, órganos y semillas de plantas. Método de extracción con CTAB, desarrollado por Taylor y Powell (1982).

4.8.1. Medio sólido Murashige-Skoog/sin reguladores.

Soluciones stock de sales

Solución A:		
	Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	44g/l
Solución B:		
	Nitrato de potasio $\text{KNO}_3$	190g/l
	Nitrato de amonio $\text{NH}_4\text{NO}_3$	165g/l
Solución C:		
	Yoduro de potasio $\text{KI}$	0.08g/l
	Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.0024g/l
Solución D:		
	Fosfato de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4$	17g/l
	Acido bórico $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.62g/l
	Molibdato de sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0248g/l
Solución E:		
	Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37g/l
	Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.688g/l
	Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86g/l
	Sulfato cúprico $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0024g/l
Solución F:		
	Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784g/l
	EDTA	3.724g/l
Solución stock de vitaminas:		
	Inositol	10g/l
	Tiamina	100mg/l
	Ac. nicotínico	100mg/l
	Piridoxina	100mg/l
Aminoácidos		
	Glicina	1000mg/l
Fuente de carbono:		
	Sacarosa	30g/l
Soporte:		
	Agar	8.9g

Preparación:

Para 1 litro de M-S mezclar en el siguiente orden las soluciones a partir de las soluciones stock:

Solución A	10ml
B	30ml
C	10ml
D	10ml
E	10ml
F	10ml
Inositol	10ml
Piridoxina	5ml
Tiamina	1ml
Ac. nicotínico	5ml
Glicina	20ml
Sacarosa	30g
Ajustar a pH 7.5	
Agar	8g (calentar)
Aforar	1000ml
Vaciar a frascos de cultivo (gerbers) y esterilizar.	

4.8.2.- Solución amortiguadora de extracción	2X:
-CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)	2g
Sigma C-9127	
-Tris base/HCl pH8.0	100mM

	-EDTA pH 7.5	20mM
	-NaCl	1.4mM
	-Agregar directamente al tubo:	
	-β-Mercaptoetanol	2%
	Sigma N-6250	
	4.8.3.- Solución de CTAB	10%
	-NaCl	0.7M
	-CTAB	10%
concentración de	4.8.4.- Solución amortiguadora de precipitación para ácidos nucleicos:	
	-CTAB	1%
	-Tris base/HCl pH 8.0	50mM
	-EDTA pH 7.5	10mM
	-β-mercaptoetanol	1%
	4.8.5.-Solución de cloruro de cesio	1M
	-Tris base/HCl pH. 8.0	50mM
	-EDTA pH 7.5	5mM
	-NaCl	50mM
	-CsCl	1M
	Sigma C-3032	
	4.8.6.-Solución de cloruro de cesio	5.7M
	-Tris base/HCl pH 8.0	50mM
	-EDTA pH 7.5	5mM
	-NaCl	50mM
	-CsCl	5.7M
gradiente CsCl:	4.8.7.- Solución para resuspender al ARN después del	
	-Tris base/HCl pH 7.6	10mM
	-EDTA pH 7.5	1mM
	-β-mercaptoetanol	1%
sobrenadante del	4.8.8.- Solución para extracción de ADN a partir del gradiente de CsCl.	
	El sobrenadante se diluye 2 veces con:	
	-Tris base/HCl pH 8.0	50mM
	-EDTA pH 7.5	5mM
	-NaCl	50mM
	-Bromuro de etidio	200µg/ml
	Sigma E-8751	
	Ajustar a un índice de refracción de 1.390 con CsCl1M.	
saturada de isopropanol/NaCl/citrato de sodio.	4.8.9.- Solución saturada de isopropanol/STE/NaCl o solución saturada de isopropanol/NaCl/citrato de sodio.	
	4.8.10.- Solución de acetato de sodio	0.3M
	<b>4.9.- Soluciones para la elaboración de electroforesis de ADN. Método desarrollado por Johnson y Grossman, 1977 y modificado por Smith <i>et al</i>, 1983.</b>	
	4.9.1.-Solución amortiguadora tris borato	1X.
	4.9.2.-Solución amortiguadora de carga para ADN.	

**4.10.- Soluciones para la elaboración de electroforesis de ARN reportado por Lehrach *et al*, (1977) y modificado por Thomas (1980) y Golberg (1980).**

4.10.1.-Solución amortiguadora para la elaboración del gel de agarosa para ARN:

-Agua desionizada	58.20%
-Formaldehido Solución 37%	21.73%
-Solución amortiguadora de electroforesis 10X	10%
(Amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0 100mM)	
Stock A	
Fosfato de sodio monobásico	0.2 M
Stock B	
Fosfato de sodio dibásico	0.2 M

Ya elaboradas las 2 soluciones stock, para el amortiguador de electroforesis 10X se toma:

Stock A	39ml	0.2M
Stock B	61ml	0.2M
EDTA	20ml del 0.5M	10mM

4.10.2.- Amortiguador para mantener desnaturalizado muestras de ARN total a correr en electroforesis (volumen promedio por muestra pocillo/30µl):

-Formamida desionizada pH 7.0	50%
Merck-9684	
Proceso de deionizado: Mezclar (estandarizado):	
-100ml formamida	
-4 grs. resina Bio-Rad Ag 501-x8 Amberlite MB-1A	
(Sigma A-7393)	
-Revolver durante 1hr. oscuridad	
-filtrar y guardarla a -70° C	
-Formol comercial	16%
Merck # 15858	
-Amortiguador electroforesis 10x	10%
-Muestra a correr	24%

#### 4.11.- Soluciones para la transferencia de geles de agarosa (ADN-ARN) a soporte sólido (nylon-nitrocelulosa).

4.11.1.-Solución desnaturalizante para ADN en geles de agarosa.

-NaCl	1.5M
-NaOH	0.5M

Merck 6498

4.11.2.-Solución neutralizante para ADN en gel de agarosa:

-NaCl	3M
-Tris base/HCl	0.5M

Ajustar a pH 7.0

4.11.3.-A partir del amortiguador SSC 20X se prepara por dilución los amortiguadores 10, 6, 5, 3 y 2X.

-Solución amortiguadora SSC	20X
NaCl	3M
Citrato trisodio pH 7.0	0.3M

Nylon (transferir) Nitrocelulosa (transferir)

Amortiguador 10X Amortiguador 20X

Amortiguador 5X (enjuagar)

#### 4.12.- Soluciones para el proceso de marcado de la sonda con P<sup>32</sup>.

4.12.1.- Se utilizó un Kit random primer extensión.

(Biotechnology Systems Dupont NEP-103)

4.12.2.- Sephadex G-50, modo de preparación:

-disolver 5g de sephadex en 100ml STE, se esteriliza y se deja enfriar.

4.12.3.-Acido tricloro acético 10%

4.12.4.-Soluciones para contador de centelleo (tolueno)

2,2'-p-fenilen-bis	0.1g
(S-feniloxazol)POPOP, Merck	0.19
2,5-difeniloxa 201	5g
POPOP, Merck	
Tolueno	1l



#### 4.13.- Soluciones para prehibridación e hibridación de filtros de ADN-ARN

##### con sondas radiactivas.

4.13.1. Mezcla de prehibridación:	
-Formamida deionizada	50%
-SSC 5X 0 SSPE 5x	25%
-Solución Denhardt 5x	10%
-Agua destilada (variable)	13.9%
-SDS	0.1%
-ADN acarreador (ADN de esperma de salmón 100mg/ml fragmentado).	1.0%
	TOTAL 100 %
SSPE	5x
NaCl	0.9 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50mM
EDTA pH 7.0	5mM
Solución Denhardt	5x
PVP 40-T (Polivinilpirrolidona)	0.1%
BSA (suero de albumina bovina)	0.1%
Ficoll	0.1%
ADN de esperma de salmón 100mg/ml 100 mg ADN fragmentado de esperma /10ml H <sub>2</sub> O Sigma-D-6898 o D-1626	

-Diferentes combinaciones de sales y detergente en función del grado de severidad que se requiera para lavar los filtros después del proceso de hibridización:

-SSC 2X + SDS 0.1% , SSC 1X + SDS 0.1% y otras.

#### 4.14.-Soluciones para el revelado de placas de autoradiografía.

Solución reveladora y reforzadora Kodak G-BX

Se diluye 4.6 veces/ con agua.

Solución fijadora y reforzadora.

Se diluye 4.6 veces/ con agua.

**4.15.- Solución para eliminación de radioactividad incorporada en filtros,  
para ser reutilizados en ensayos de hibridación (según Maniatis, *et al*, 1982).**

A) Tris/HCl (pH 8.0)	0.001M
EDTA (pH 8.0)	0.001M
S. Denhardt	0.1%
B) SSC	0.05X
EDTA pH 8.0	0.001M
SDS	0.1X

#### 4.16. METODOLOGIAS. -

##### I.- Transformación genética de *E. coli* con un plásmido determinado (Dagert y Ehrlich, 1979; Schleif y Wensink, 1981; Hanahan, 1983).

1.- Crecer *E. coli* (cepa C-600 o SF-8) en una caja de Petri con medio de cultivo no selectivo toda la noche a 37° C.

2.- Inocular medio Luria líquido con C-600 o SF-8 toda la noche a 37° C.

3.- Inocular medio Luria líquido con una dilución 1/50, del cultivo anterior incubar a 37° C toda la noche con agitación hasta tener una concentración de  $5 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  células/ml.

4.- Centrifugar a 4000g: 5 minutos a 4° C (antes de centrifugar poner el cultivo por 5 minutos en una cubeta con hielo).

5.- Decantar el tubo y colocarlo en hielo 5 minutos y el botón se resuspende con 1/2 del volumen original de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 50mM; colocar el tubo en hielo.

6.- Centrifugar 10 min a 4° C a 3000 r.p.m. Decantar el sobrenadante. Resuspender (1/15 volumen original) en una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 50mM. Incubar a 4° C por 24 horas.

De aquí se pueden seguir dos vías:

1a.- Para congelarlas y almacenarlas (células competentes).

1.- Agregar glicerol estéril (1.2 ml) hasta una concentración final de glicerol al 15% (vol/vol), mezclando suavemente.

2.- Depositar a las células en tubos eppendorf de 1.5 ml en alicuotas de 0.2 ml.

3.- Congelar a las células colocandolas en un baño de hielo seco y etanol o nitrógeno líquido.

4.- Almacenar a -70° C a las células, las cuales son viables hasta por 2 meses.

2da.- Para utilizarse inmediatamente.

1.- Agregar ADN plasmídico 1  $\mu$ l (0.01-0.1  $\mu$ g ADN del plásmido) en un volumen de 100  $\mu$ l de Tris-base pH 7.5 10 mM.

2.- Incubar a las células en hielo por 25 min.

3.- Colocar a las células a 37° C por 5 min (choque térmico).

4.- Bajar la temperatura de manera drástica colocando el tubo con células en hielo por 10 min.

5.- Colocar el contenido del tubo a un tubo para centrifuga y agregar 3 ml de medio Luria líquido.

6.- Incubar a las células una hora (para expresar resistencia a un antibiótico determinado) o dos horas (para expresión de un marcador autotrófico) a 37° C sin agitación.

7.- Centrifugar a las células 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente.

8.- Decantar el sobrenadante y resuspender en el líquido remanente suavemente.

9.- Esparcir 10-30 gotas (o el contenido del tubo) en cajas Petri con medio Luria sólido con antibiótico. Al término de 24 horas de incubación a 37° C pueden aparecer las colonias. Aquellas que aparezcan serán las que hayan adquirido el plásmido.

10.- Aislar colonias individuales en tubos con medio Luria líquido y hacer mini preparaciones para el aislamiento del plásmido por el método de lisado claro desarrollado por Clewell y Helinski, (1969).

## **II. Amplificación y aislamiento de plásmido a partir de *E. coli* transformada, por el método de lisado claro ( Clewell y Helinski, 1969).**

1.- Crecer en medio Luria (500 ml) a *E. coli* (SF-8) con el plásmido de interés durante 15-18 horas a 37°C con agitación (200 revoluciones promedio/min).

2.- Centrifugar en frascos para centrifuga J2-21 en rotor JA-14 (Beckman) 10' a 5000 rpm a 0° C.

3.- La pastilla celular se resuspende y lava en STE frío 2 veces con centrifugaciones intermedias para obtener la pastilla.

4.- Se prepara lisozima 10 mg/ml

5.- Se decanta el tubo; la pastilla se disuelve completamente con 6 ml Tris/sacarosa (0.05M/25%) frío y se deja reposar 5' en hielo sin que se formen agregados (agitación continua).

6.- Se agregan 2-3 ml de lisozima (10 mg/ml), se disuelve bien y se deja reposar 5'en hielo. Conforme transcurre el tiempo se observa viscosidad, de no observarse esto se suspende los demás pasos (dado que no hubo rompimiento celular).

7.- Se agregan 2 ml de EDTA 0.5 M frío (pH 8.5) dejándose reposar por espacio de 10-15 min. en hielo.

8.- Se agregan 10 ml de solución Triton X-100-EDTA 0.5 M-Tris 1 M fría (detergente). Con el Triton la solución se torna viscosa. Se deja reposar por un tiempo mínimo de 2-3 horas en frío.

9.- Centrifugar 60' a 15000 g's 0° C.

10.- Rescatar el sobrenadante y extraerlo con 4ml STE/fenol, agitar.

11.- Centrifugar 10' 10,000 g's 0° C.

12.- Recuperar el sobrenadante y agregar 1/20 volumen de acetato Na 3M y 2 volumen etanol frío, mezclar vigorosamente (existe ARN citoplasmático, ADN bacteriano y ADN plasmidico).

13.- Guardar a -70° C, 30' o -20° C toda la noche.

14.- Centrifugar 60' a 10 000 g's a -10° C.

15.- Resuspender el botón en 14.4 ml de STE.

16.- Agregar 15 g cloruro cesio sólido y 0.6 ml de una solución bromuro de etidio 10 mg/ml a concentración final de CsCl 0.75 g/ml o sea a una densidad de 1.55 g/cm<sup>3</sup>. Dividir la mezcla perfectamente en 2 tubos de polialomero para ultracentrifuga Beckman LS-75. Llenar los tubos con parafina líquida sin dejar burbujas.

17.- Ultracentrifugar 38 000 rpm 15° C 36-48 horas en rotor 50Ti (según Radloff et al, 1977). O bien a 45,000 rpm 20°c 12 horas pero en este caso la densidad deberá de ser menor a 1.55g/cm<sup>3</sup>. Esto se consigue agregando 14.8 g CsCl.

18.- Detener la corrida y retirar el rotor de la ultracentrifuga con sumo cuidado de manera de que el gradiente de densidad se mantenga y con ello lograr que las bandas permanezcan estables y se pueda extraer a la banda plasmídica de interés.

19.- Visualizar las bandas con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga (365 nm). Abrir el tapón con cuidado y coleccionar la banda de interés con una pipeta Pasteur de punta larga o bien picar con una jeringa estéril de 1 ml y aguja del # 14 por debajo de la banda de interés para coleccionar la banda. El contenido de la pipeta o jeringa se deposita en un tubo corex de 25 ml, despacio.

20.- Remover el bromuro de etidio con STE/isopropanol saturado en NaCl, agitar y esperar a que se separen las fases, repetir ésto por lo menos 2 veces.

21.- Diluir con 5 volúmenes de agua estéril (para diluir las sales) y agregar 2 volúmenes de etanol frío, mezclar y guardar 30'-70°C o 12-24 hrs. -20°C.

22.- Centrifugar 60' 10,000 g's, 10° C.

- 23.- Decantar, secar los tubos a vacío.
- 24.- Resuspender cada tubo en la mitad del volumen para tener el botón en 0.4 ml de STE. Transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 25.- Agregar 1.0 ml de etanol frío, mezclar y guardar 30' a  $-70^{\circ}\text{C}$  o de 12-24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 26.- Centrifugar a 10,000 rpm por 10' a  $4^{\circ}\text{C}$  en microfuga.
- 27.- Decantar, secar tubos y resuspender el plásmido puro en 0.4 ml STE para tener una concentración de ADN de  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
- 28.- Tomar  $1\ \mu\text{l}$  y digerirlo con la enzima apropiada y revisarlo en un gel. La concentración del plásmido puede ser calculada visualmente en el gel o espectrofómicamente asumiendo que  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA de cadena doble en una solución acuosa tiene una absorbencia de 1 a una longitud de onda de 260 nm.

### III. Amplificación y aislamiento de plásmido a partir de *E.coli* por el método de lisis alcalina (reportado por Birnboim y Doly 1979; modificado por Ish-Horowitz, 1981).

- 1.- Crecer en medio Luria (500 ml) a *E.coli* (SF-8) transformada con el plásmido de interés durante 15-18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 200 rpm.
- 2.- Cosechar a las células por centrifugación en rotor JA-14 10 minutos a 5000 rpm  $0^{\circ}\text{C}$ .
- 3.- Resuspender el botón celular en 15 ml de solución I conteniendo 5 mg/ml de lisozima.
- 4.- Transferir la mitad del volumen a 2 tubos de centrifuga para el rotor SW-27 (columpio).
- 5.- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 6.- Agregar 20 ml de la solución II recién preparada entre los 2 tubos.
- 7.- Mezclar vigorosamente y guardar en hielo por un tiempo mínimo de 10 minutos.
- 8.- Agregar solución III fría hasta equilibrar los 2 tubos hasta un llenado aproximado de 0.2 cm del borde del tubo.
- 9.- Poner papel parafilm al tubo y mezclar cada uno.
- 10.- Centrifugar en el rotor SW-27 a 20 000 rpm, 20 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ .

11.- Transferir el sobrenadante a tubos a los que se agregará 0.6 volúmenes de isopropanol, de tal forma que el líquido total quede en el menor número de tubos para no disgregar demasiado la pastilla.

12.- Mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente 15 minutos.

13.- Centrifugar 12,000 g's 30 minutos a temperatura ambiente.

14.- Lavar el botón 1-2 veces en etanol 70%/STE

15.- Disolver el botón en 14.4 ml STE.

16.- Elaborar el gradiente de CsCl. Agregar 15 g CsCl granulado y 0.6 ml de bromuro de etidio 10 mg/ml.

17.- Ultracentrifugar 38,000 rpm, 15° C, 36-48 hrs en rotor 50 Ti (según Radloff et al., 1977), o bien, 45,000 rpm, 20° C, 18 horas pero cuidando que la densidad sea menor de 1.55 g/cm .

18.- Se continúa como en el método de lisado claro.

Se hace una extracción con fenol/STE, se centrifuga 10' a 10000 rpm en microfuga, se recupera la fase acuosa y se precipita con 2 volúmenes de etanol frío. Se guarda a -70° C, 30 minutos o bien de 2 a 3 horas o bien toda la noche a -20° C. Se centrifuga 10' en microfuga y se resuspende el botón en el menor volumen posible de STE.

#### IV. Aislamiento del fragmento de interés del plásmido (Reportado por Maniatis et al, 1982).

A).-Aislamiento a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

1.- Elaborar un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma tipo VII) al 1% en amortiguador tris borato 1X o tris acetato 1X.

2.- Poner a digerir de 3-5 µg de ADN plasmídico en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, con una unidad de enzima de restricción específica para el plásmido en cuestión, en amortiguador 10X con la concentración de sales requerida para la enzima e incubar a 37° C por 1 hora.

3.- Sacar el tubo donde se hace la restricción y colocarlo en un baño maria a 70° C por 10 min para desnaturalizar las 2 cadenas.

4.- Se coloca el tubo en hielo, y se le agrega amortiguador de carga (37% sacarosa, 50 mM EDTA, 0.1% azul de bromofenol, 0.1% SDS) y se agita.

5.- Se da un pulso en centrifuga, se toma el contenido del tubo, se coloca en un pocillo del gel y se inicia la corrida de electroforesis.

6.- Cuando el azul de bromofenol se encuentre en el límite del gel, la corrida se detiene y se quitan los cables de la cámara de electroforesis.

7.- Se tinte el gel con bromuro de etidio (1µg/ml) y se lava con agua destilada.

8.- Se visualiza el gel con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga. La banda de interés se corta con un bisturí.

9.- Se coloca la banda en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (pesado previamente).

10.- Se agrega 1.5 ml de agua estéril por cada gramo de agarosa; se pone a ebullición para disolver la agarosa y se determina la concentración en un espectrofotómetro. Para ensayos de marcado esta deberá ser de 2.5-5 ng ADN (banda de interés)/µl como concentración óptima.

**B).-Aislamiento en gel de agarosa tipo I (Sigma) (Schleif y Wensink 1981, reportado por Maniatis et al., 1982).**

1.- Elaborar un gel de agarosa tipo I al 1% en amortiguador tris borato 1x o tris acetato 1x.

2.- Poner en un tubo Eppendorf de 1.5ml de 3-5µg de ADN plasmídico con enzima de restricción en un amortiguador adecuado a 37°C durante 1 hora.

3.- Poner a ebullición los tubos 10 min.

4.- Colocar los tubos en hielo por 5 min.

5.- Agregar buffer de carga 10 X, y colocar en el pocillo.

6.- Se inicia la corrida y cuando el azul de bromofenol se encuentre a la mitad del gel, ésta se detiene.

7.- Se tinte el gel con bromuro de etidio. Observar con una lámpara de luz ultravioleta y hacer una hendidura por abajo de la banda de interés.

8.- Dicha hendidura se llena con glicerol al 50% (tris-borato 1X) y se vuelve a iniciar la corrida. Se sigue observando con la lámpara viendo cómo entra la banda de bromuro al glicerol.

9.- Se toma el glicerol con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo Eppendorf.



10.- Se vuelve a colocar glicerol al 50% y se reinicia la corrida, esto se hace hasta que se deje de visualizar la banda de interés.

11.- Se hacen 2-3 extracciones al glicerol con fenol/STE y 1-2 con cloroformo/fenol y una con cloroformo.

12.- Se precipita el ADN con 2 volúmenes de etanol frío y se guarda 30 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

13.- Se visualiza de nueva cuenta en un gel para cuantificar y calcular la concentración espectrofotométrica.

#### V. Aislamiento y purificación de ADN y ARN de hígado de ratón (Krieg *et al.*, 1983a).

1.- Congélese el tejido donador en hielo seco o nitrógeno líquido. Pulverícese en mortero (esterilizado) previamente enfriado con hielo seco o nitrógeno líquido.

2.- Por cada 0.5 gr. de tejido agregar 5 ml de fenol saturado, acetato de sodio 0.3 M pH 7.5 e hidroxiquinoleína al 1% (equilibrado durante toda la noche) y 5ml de una solución de acetato de sodio 0.3 M, SDS 0.5% y EDTA 5mM.

3.- Agítese suavemente por 5 minutos.

4.- Agréguese 5 ml de cloroformo alcohol-isoamílico (24:1).

5.- Agítese suavemente por 5 minutos; equilíbrense los tubos.

6.- Separar las fases por centrifugación, 5 minutos, 5000 rpm  $4^{\circ}\text{C}$ .

7.- Rescatar la fase acuosa (sin perturbar la fase intermedia) y reextraerla con cloroformo alcohol-isoamílico (24:1). Agitar nuevamente; hacer ésto las veces necesarias para eliminar a la fase intermedia y una última con cloroformo.

8.- A la fase acuosa se le agregan 2 volúmenes de etanol frío y se incuba  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos o mayor tiempo (toda la noche).

9.- Centrifugar a 10000 g's, 60 minutos a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Decantar.

10.- Resuspender el precipitado en el menor volumen posible (1ml por tubo es más que suficiente) de agua estéril.

11.- Agregar 1 volumen de cloruro de lito 4M e incubar por un tiempo mínimo de 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

12.- Centrifugar a 10,000 g's, 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

13.- En el sobrenadante queda el ADN e impurezas contaminantes tales como ARNt. Decantar, resuspender el botón, agregar 2 volúmenes de etanol y precipitar al ARN a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos durante 1 hora. El precipitado (ARN y un poco de ADN de bajo peso molecular), se lava con etanol al 70% 1 o 2 veces y se resuspende en agua estéril en el menor volumen posible. Para eliminar el ADN contaminante se agrega  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM más 50-100  $\mu\text{l}$  de ADNasa I grado I en concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; incubar 20-60 minutos a temperatura ambiente, detener la reacción agregando 2 volúmenes de etanol frío incubando al menos 1 hora a  $-70^{\circ}\text{C}$  y centrifugar 20 minutos a 10,000 g's,  $0^{\circ}\text{C}$ . La pastilla se resuspende en el menor volumen posible (5 -100  $\mu\text{l}$ ) para alcanzar la máxima concentración.

14.- Centrifugar el sobrenadante que contiene el ADN a 10,000 g's, 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

15. Lavar el botón con etanol frío al 70% y resuspender en STE en el menor volumen posible o bien en TE (20 mM Tris/HCl pH 7.5 y 1mM EDTA).

16. El ADN pudiera estar contaminado con aproximadamente 10% de ARNt el cual puede ser eliminado por un tratamiento con RNAasa (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) incubando 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se hace una extracción con fenol, otra con fenol/cloroformo y una última con cloroformo. El sobrenadante se precipita con 2 volúmenes de etanol frío y se guarda  $-70^{\circ}\text{C}$ , 30 minutos o bien  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Se centrifuga 10 minutos en microfuga (10000 rpm) y se resuspende en el menor volumen posible de agua estéril.

## VI.- Aislamiento de ARN total y ADN de alto peso molecular de plantas por el método de Taylor y Powell (1982).

1.- Partiendo de semillas de maíz, se extraen los embriones o ejes embrionarios y se guardan en un desecador a 4°C.

2.- Sembrar en frascos de cultivo (gerber), 1 gramo de ejes, libres de escutelo, en medio sólido M-S sin reguladores por el tiempo requerido. Los embriones se desinfectaron colocándolos en una solución de hipoclorito de sodio (concentración comercial al 37% de Cloralex Sigma # 570 al 15%) al 3%, más 2-3 gotas Tween 20 (Sigma # P-1379) por 3 min. a temperatura ambiente. Se enjuagan 4 veces con agua destilada estéril y se colocan en el frasco gerber con medio M-S sólido; todo lo anterior bajo condiciones de esterilidad. Los frascos se colocan en una cámara por el tiempo requerido a 25°C.

3.- Colocar los embriones en un mortero estéril y enfriado (previamente pesado).

4.- Moler bajo nitrógeno líquido hasta dejar un polvo fino.

5.- Transferir el polvo fino a un tubo colocado en hielo.

6.- Agregar  $\beta$ -mercaptoetanol al 2% y 1 volumen (10 ml x c/gramo de tejido) de amortiguador de extracción 2x hirviendo. Agitar vigorosamente, abriéndolo y cerrándolo para evitar acumulación de presión.

7.- Se coloca el tubo en un baño maría a 55-60°C por espacio de 2-3 horas o más tiempo con agitación ocasional.

8.- Agregar 1 volumen de cloroformo/alcohol-isoamílico (24:1); agitar vigorosamente liberando periódicamente el material volátil.

9.- Se transfiere el contenido a un tubo Corex.

10.- Centrifugar a 10,000 g's, 10 minutos a 4°C (2 veces con extracciones de cloroformo/alcohol-isoamílico).

11.- Recuperar la fase acuosa y agregar a esta 1/10 volumen CTAB 10%; además, agregar 1 volumen de cloroformo/alcohol-isoamílico. Agitar y extraer.

12.- Centrifugar a 10,000 g's, 10 minutos a 4°C.

13.- Rescatar la fase acuosa y agregar 1 volumen de amortiguador de precipitación. Si la solución no se torna lechosa (precipitación de ácidos nucleicos) agregar agua estéril hasta alcanzar la máxima precipitación.

14.- Dejar reposar por más de 2 horas (o toda la noche).

15.- Centrifugar a 2500 g's, 10' a T.A.

16.- Decantar y resuspender en 1.7 ml de CsCl 1M (se ajustaron las condiciones de centrifugación al rotor TLS-55 de la ultracentrifuga TL-100).

17.- Preparar un gradiente de CsCl. Se coloca como colchón 0.5 ml de CsCl 5.7M en un tubo; por arriba de éste, con sumo cuidado se coloca 1.7 ml de CsCl 1M con los ácidos nucleicos.

18.- Centrifugar a 37,000 rpm, 20° C, 14 horas en ultracentrifuga Beckman TL-100 rotor TLS-55.

19.- El ADN flota justo abajo de la interfase de 1.0/5.7 M de CsCl, el cual será procesado después del botón de ARN.

20.- El botón de ARN se resuspende en Tris 10mM, EDTA 1mM y  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% y se coloca en un tubo Eppendorf en volúmen de 0.5 ml. Se agrega 1 ml de etanol frío.

21.- Se guarda 30 minutos a -70° C o toda la noche a -20° C.

22.- Centrifugar 10 minutos, 4° C, 10,000 rpm en microfuga.

23.- Decantar el tubo y secar a vacío y resuspender en 50-100  $\mu$ l de agua estéril.

23a.- Obtener la concentración espectrofotométricamente y elaborar un gel para comprobar la integridad de los ARN ribosomales 25 S y 18 S.

23b.- El ADN que se encuentran en el sobrenadante puede ser procesado de 2 maneras distintas.

#### Procedimiento A.

El sobrenadante (donde se haya el ADN) se disuelve en 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol y se agrega acetato de sodio 0.3 M. Se guarda 30' a -70° C o toda la noche a -20° C.

Se centrifuga por 60' a 10,000 rpm 4° C; el botón se resuspende en el menor volúmen posible de agua estéril y se observa en un gel preparativo digerido por enzima de restricción.

#### Procedimiento B.

Ajustar la solución de ADN en CsCl a un índice refractivo de 1.390 con CsCl 1M. Lo anterior se alcanza diluyendo al menos 2 veces con Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM, conteniendo 20  $\mu$ g/ml de bromuro de etido.

Centrifugar a equilibrio como se indica en el paso #18. El ADN se visualiza como una banda nítida con una lámpara de luz ultra violeta de onda

larga. Dicha banda se recupera con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo corex estéril.

Se extraerá el bromuro de etidio con isopropanol equilibrado con NaCl 3M/STE varias veces.

La solución de ADN puede ser dializada para remover el CsCl o bien diluida de 2 a 5 veces con agua destilada estéril y reprecipitada con 1-2 volúmenes de etanol frío, dejando precipitar por 30 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$  o más de 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (o toda la noche).

Se continúa como en el último paso del procedimiento A.

## VII.- Digestión de ADN de alto peso molecular y ADN plasmídico por enzimas de restricción (Reportado por Maniatis *et al*, 1982).

1.-En un tubo Eppendorf se coloca en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ :

-10 a 20  $\mu\text{g}$  de ADN (volumen aproximado 10-20  $\mu\text{l}$ )

-5  $\mu\text{l}$  de amortiguador de restricción 10 X

-Dependiendo de la enzima de que se trate será la concentración que se utilice del amortiguador.

-1-2  $\mu\text{l}$  de enzima de restricción.

-El resto para cubrir 50 $\mu\text{l}$  final de agua estéril.

2.- Se incuba por espacio de 12-18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

3.- Se calienta a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10' y se enfría en hielo.

4.- Se agrega 5  $\mu\text{l}$  amortiguador de carga 10x.

5.- De este tubo se toman de 1 a 2  $\mu\text{l}$  y se llevan a un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , se carga un gel y se observa el patrón electroforético.

6.- El resto ( 50  $\mu\text{l}$ ) se correrá en un gel que se utilizará para transferencia a soporte sólido que posteriormente será utilizado en ensayo de hibridación.

## VIII.- Electroforesis en geles de agarosa (reportado en Maniatis *et al*, 1982).

### Para electroforesis de ADN (Johnson y Grossman, 1977, Smith *et al*, 1983).

1.- Se prepara un gel de agarosa tipo I al 1%, no desnaturizante en amortiguador Tris borato 1X.

2.- Las muestras a correr se restringen y se desnaturizan a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos y se enfrían en hielo.

- 3.- Se agrega amortiguador de carga 10X (1-3  $\mu$ l)
- 4.- Se colocan en los pocillos y se deja corriendo toda la noche a un voltaje de 15-20 mA.
- 5.- El gel se tñe con bromuro de etidio (1 $\mu$ g/ml).
- 6.- Se lava perfectamente con 2-3 lavados de agua destilada (de preferencia estéril).
- 7.- Se visualiza en un transiluminador (luz ultravioleta de onda corta) midiéndose las distancias en cms de las bandas del marcador de peso ( restringido con una o dos enzimas de restricción) con respecto al pocillo. El tiempo que lleva realizar las medidas sirve a la vez para romper a los ácidos nucleicos por la luz ultravioleta de onda corta generada por el transiluminador.
- 8.- Se coloca el gel en una solución desnaturalizante por una hora con un cambio.
- 9.- Se lava el gel con agua destilada (preferentemente estéril).
- 10.- Se coloca en una solución neutralizante por 1 hora o más tiempo con un cambio.
- 11.- Se lava con agua varias veces.
- 12.- Se prepara para su transferencia.

**Para electroforesis de ARN (reportado por Thomas, 1980; Golberg, 1980; Lebrach *et al.*, 1977).**

- 1.- Se prepara un gel desnaturalizante de la siguiente manera: (para gel de 13x17 cm con volúmen de 150ml).
  - Agarosa al 1% (1.5 grs).
  - Agua desionizada 102.4 ml.
  - Calentar en autoclave
  - Agregar después de enfriar a una temperatura de unos 60° C:
    - 32.6 ml formaldehído sol. comercial 37%.
    - 15 ml de amortiguador de electroforesis 10X.
  - mezclar, con lo que se alcanza una concentración de formaldehído del 6% en el volúmen final de 150 ml.
- 2.- Se vacía a la placa de gelificación (previamente esterilizada).
- 3.- El gel se coloca en la cámara de electroforesis después de haber gelificado.

4.- Se procesan las muestras de ARN a correr en el orden siguiente:

- a) 15  $\mu$ l de formamida desionizada.
- b) 5  $\mu$ l de formol.
- c) 3  $\mu$ l amortiguador electroforesis 10X.
- d) 20-30  $\mu$ g de ARN por pocillo (volumen aproximado 7  $\mu$ l). Volumen final 30 $\mu$ l.
- e) Se incuba 15' a 55°C a baño maria o en una estufa calibrada.

5.- Enfriar a los tubos colocandolos en hielo.

6.- Se colocan 2-3  $\mu$ l amortiguador de carga 10X (1  $\mu$ l x 10  $\mu$ l de mezcla).

7.- Se da un pulso en microfuga.

8.- Se toma cada muestra y se coloca en un pocillo. Además de las muestras, se coloca en algún pocillo 1 $\mu$ g de ADN de  $\lambda$  digerido con enzima de restricción y procesado de igual forma que el ARN, agregando además 1  $\mu$ l de EDTA 0.25 M (para evitar degradación del ADN en el gel desnaturalizante).

9.- Se llena la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida 1X de tal manera que quede a nivel de la superficie del gel.

10.- Se inicia la corrida a un voltaje de 80mA, por espacio de unos 15-20 minutos en los que la banda del colorante xilen-cianol se habrá separado completamente de la línea de pocillos. Se interrumpe la corrida y se cubre completamente el gel con amortiguador de corrida 1x sin que las varillas laterales queden sumergidas.

11.- Se reinicia la corrida con una diferencia de potencial de 10-25 volts (45 mA) toda la noche o 12-15 horas.

12.- Al término de la corrida, se saca el gel de la cámara y se coloca en una charola con agua.

## IX. -Transferencia a soporte sólido de los geles (Southern, 1975).

1.- Se corta el gel sobre la línea de pocillos y se le corta en una esquina para identificar el lado izquierdo del derecho.

2.- Se corta de las mismas medidas del gel:

2 hojas de papel filtro 3M

1 hoja de papel de transferencia de nitrocelulosa o nylon.

Un paquete de hoja de papel absorbente (periódico o sanitas) de aproximadamente 15-20 cm de alto.

3.- Se corta de una medida 2 veces más que el largo del gel 2 hojas de papel filtro 3M.

4.- Dependiendo de la membrana (nitrocelulosa o nylon) será el procedimiento de estructuración del esquema de transferencia.

### Nylon

1. Mojar el filtro en H<sub>2</sub>O dest.

2. Enjuagar en amortiguador SSC 10X

3. Solución de transferencia SSC 10X

4. Después de dejarlo toda la noche, se hace lo siguiente:

1. Enjuagar en SSC 5X 5'

2. Secar a temp. amb.

3. Hornear a 80°C por 1-2h.

4. Se guarda en una bolsa de plástico con desecador y se

etiqueta.

### Nitrocelulosa

1. Hervir a los filtros 2' en agua destilada.

2. Enjuagar 30' en amortiguador SSC 20X.

3. Solución de transferencia SSC 20X

1. Secar a temp. amb. en medio de 2 hojas de papel filtro.

2. Hornear a 80°C 30-1h al vacío.

3. Se guarda en una bolsa de plástico con desecador y se etiqueta.



**X.- Marcado de sonda radiactiva a una alta actividad especifica ( Reportado por Feinberg y Vogelstein, 1983).**

1.- Se saca la marca o isótopo radiactivo del congelador para que se descongele colocándola en un lugar de trabajo para radiactividad.

2.- Se elabora la siguiente mezcla en un tubo Eppendorf (en el orden dado); para un volumen final de 30  $\mu$ l:

-6  $\mu$ l amortiguador RPE (5X).

-5  $\mu$ l de una dilución que contenga de 25 a 50  $\mu$ g de ADN del inserto a marcar (previa desnaturalización).

-6  $\mu$ l de mezcla de 3 nucleótidos no radiactivos (dATP, dGTP y dTTP).

-6  $\mu$ l agua destilada estéril (varia dependiendo de la vida media del nucleótido radiactivo).

-5  $\mu$ l de nucleótido radiactivo (30  $\mu$ Ci de dCTP o 5  $\mu$ m, 3000 ci/mmol).

-1  $\mu$ l fragmento Klenow (DNA polimerasa I, 2.5 unidades)

3.- Se deja incubar por 3 horas a temperatura ambiente.

4.- Se prepara una columna de Sephadex G50 (jeringa 1 ml).

5.- Se detiene la reacción de marcado agregando EDTA 0.5M (5  $\mu$ l).

6.- Se llevan los 36  $\mu$ l a 100  $\mu$ l con TE 1X; se da un pulso en la centrifuga y se inicia la purificación de la sonda marcada a través de una columna de Sephadex G-50.

7.- Antes y después de pasar por columna se cuenta la radiactividad presente en 1  $\mu$ l de la mezcla anterior en contador de centelleo y una actividad especifica superiores a  $1 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g de ADN es aceptable para ensayos de hibridación de genomas de organismos superiores.

8.- Se desnaturaliza la marca por ebullición durante 10 min.

9.- Se enfria en hielo y queda lista para la hibridación.

**XI. Prehibridación e hibridación de filtros (Wahl *et al.*, 1979, Tomas, 1980, Law *et al.*, 1984, Meinkoth y Wahl, 1984).**

1.- Se elabora la siguiente mezcla de prehibridación:

-Formamida	50%
-SSC 5X o SSPE 5X	25%
-Solución Denhardt 5X	10%
-Agua destilada	13.9%
-SDS	0.1%
-ADN de esperma de salmón	1.0%

(100 mg/ml, se desnaturaliza pasando la solución varias veces por una jeringa con su aguja, depositandola en frasco esteril).

2.- Dependiendo del área del filtro será la cantidad de solución de prehibridación. Esto es 0.2 ml/cm<sup>2</sup> del filtro.

3.- En función de las medidas del filtro (ancho y largo) se cortan 2 hojas de plástico transparente (o una bolsa de plástico) y se lavan en agua destilada.

4.- El filtro se enjuaga con SSC 2X, 2' y se coloca entre las 2 hojas de plástico y se sella por 3 lados.

5.- Se agrega la solución de prehibridación a la bolsa y se sella en el 4o. lado.

6.- Se incuba a diferente temperatura y tiempo dependiendo de si el filtro es de:

a) ARN (2-3 horas) 42°C.

b) Nivel de similitud entre la sonda (heteróloga u homóloga) y el material del filtro.

7.- Al término de la prehibridación se retira la solución de prehibridación, dejando solamente 0.05 ml/cm<sup>2</sup>. Previa desnaturalización de la sonda, ésta se vierte en la bolsa y se sella nuevamente colocándose por 24 horas a incubar a la temperatura requerida (baño maría).

8.- Al término de la hibridación se colecta la sonda en un tubo de vidrio con tapa y se congela o bien se desecha.

9.- Se realizan lavados con la finalidad de eliminar la radiactividad unida inespecíficamente al filtro, con solución para:

ARN

4 veces con SSC 2X  
+ 0.1% SDS temp.amb., 5'

monitoreo

1 a 2 veces con SSC 1X + SDS 0.1%  
15', 42°C con agitación.

ADN

2 veces con SSC 2X + 0.1% SDS 15' t.a.

monitoreo

2 veces con SSC 1X + SDS 0-1% 30', 42°C  
con agitación.

10.- Se monitorea con un contador de radiactividad y dependiendo de la radiactividad se definirá el tiempo de exposición para revelarse.

11.- Se semiseca entre 2 hojas papel absorbente.

12.- Se coloca entre 2 placas de autoradiografía (dentro de un cuarto oscuro) y se deja exponiendo según las cuentas por minuto.

13.- Después del tiempo pertinente, se revelan la placa superior de la siguiente manera:

-5' sumergida en solución reveladora s/agitación.

-Se enjuaga en agua limpia 30''.

-De 5-3' se sumerge en solución fijadora con agitación.

-Se enjuaga con agua limpia.

-Se seca al aire.

**XII.- Eliminación de sondas radiactivas de filtros de nitrocelulosa y nylon  
(Maniatis *et al.*, 1982).**

**Nitrocelulosa.**

1.- Calentar 100 ml de SSC 0.05X, EDTA 0.01M (pH 8.0) a ebullición. Remover el fluido de la estufa y agregar SDS a una concentración final 0.1%. Sumergir el filtro en esta solución por 15 minutos.

2.- Repetir lo anterior con solución fresca y calentándola a ebullición.

3.- Poner el filtro brevemente en SSC 0.01X a temperatura ambiente.

4.- Secar el filtro entre 2 hojas de papel y colocarlo después de secado en exposición con una película de rayos X.

5.- El filtro puede ser ahora secado y almacenado en una bolsa con o sin desecador hasta que sea reutilizado.

**Nylon**

1.- Cualquiera de las 2 alternativas siguientes:

a) Sumergir la membrana en 100 ml de Tris/HCl 1 M (pH 8.0), EDTA 1 mM (pH 8.0), solución Denhardt 0.1X por 2 horas a 75°C.

b) Sumergir la membrana en formamida 50%, SSPE 2X/1hr, 65°C.

2.- Poner la membrana brevemente en SSPE 0.1X a temperatura ambiente.

3.- Poner la membrana entre 2 hojas de papel y ponerle una placa de rayos X para checar que toda la radiactividad ha sido removida.

4.- La membrana puede ser secada y almacenada en una bolsa a temperatura ambiente hasta que sea utilizada.

## R E S U L T A D O S

La presente investigación estuvo encaminada a definir el momento del inicio de la expresión de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> durante la germinación del embrión de maíz ( *Zea mays*. L. ) variedad Chalqueño, así como su organización en el genoma.

En plantas, el conocimiento de la expresión de los genes de histonas durante la germinación es casi nula ( Chaubet et al., 1989 ). En función de lo anterior, se desarrolló un modelo experimental que permitiera estudiar la expresión de los genes de histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> durante la germinación del embrión de maíz, así como conocer la organización de los mismos en el genoma. De este modo, el estudio comprendió el establecimiento y estandarizado de las siguientes metodologías:

- \* Transformación genética de *Escherichia coli* con plásmidos recombinantes por el método desarrollado inicialmente por Dagert y Ehrlich (1979) y modificado por Schleif y Wensink (1981) y posteriormente, por Hanahan (1983).

- \* Amplificación y aislamiento de plásmidos a partir de *E. coli* por el procedimiento de lisado claro reportado por Clewell y Helinski (1969) y por el método de lisis alcalina diseñado por Birnboim y Doly, (1979); modificado por Horowicz (1981).

- \* Aislamiento del inserto del plásmido según Maniatis et al. (1982) y por el método diseñado por Schleif y Wensink, (1981).

- \* Aislamiento y purificación de ADN y ARN de hígado de ratón y otros tejidos animales por la metodología desarrollada por Krieg et al. (1983).

- \* Aislamiento y purificación de ARN total y ADN de alto peso molecular de tejidos vegetales, por el método desarrollado por Taylor y Powell (1982).

- \* Digestión de ADN de alto peso molecular con enzimas de restricción por el procedimiento reportado por Maniatis et al. (1982).

- \* Electroforesis de ADN y técnica de Southern (1975), de acuerdo a Johnson y Grossman (1977) y modificada por Smith et al. (1983).

- \* Electroforesis de ARN; técnica de Northern (Thomas, 1980) desarrollada por Lehrach et al. (1977) y adaptada por Thomas (1980) y Golberg (1980).

- \* Marcado de sonda con radiactividad a una alta actividad específica según Feinberg y Vogelstein (1983).

\* Prehibridación e hibridación de filtros por el procedimiento desarrollado por Wahl et al. (1979); el cual fue modificado por Thomas (1980); Meinkoth y Wahl (1984) y Law et al. (1984).

En la figura 7 se muestran los mapas de restricción de los plásmidos pMS201 y pBR-mus-hi-1-Himf<sup>1</sup> referidos, a partir de este momento como pH<sub>1</sub> y pH<sub>2</sub>, respectivamente.

En un inicio no se obtuvo un número satisfactorio de células transformadas. Después de varios ensayos de transformación se logró obtener, a partir de 10<sup>8</sup> células tratadas, 10<sup>4</sup> bacterias transformadas por µg de ADN plasmídico.

En el caso de la amplificación y aislamiento de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformada, la cantidad del ADN plasmídico fue corroborada por espectrofotometría, donde una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a 50 µg de ADN plasmídico (ADN de cadena doble) /ml de solución. Ambos procedimientos utilizados para el aislamiento de plásmidos permitieron obtener lotes de hasta 300 µg de plásmido por 500 ml de cultivo, tanto para pH<sub>1</sub>, como para pH<sub>2</sub>. A partir de estos lotes de plásmido se elaboraron geles preparativos de agarosa como el que se muestra en la figura 8, en donde se observa a los plásmidos pH<sub>1</sub> y pH<sub>2</sub> digeridos con Hind III y Eco RI, respectivamente (ver material y métodos). Dicho gel fue corrido por 2 horas a 20-25 volts y teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml) por 5 minutos. En el gel se muestran las dos bandas de cada uno de los plásmidos que se obtienen al ser digeridos con la enzima de restricción respectiva; las bandas inferiores corresponden a los insertos de los genes de las histonas: a la izquierda se tiene la banda con el fragmento de 2.6 kb con el gen completo de H<sub>1</sub> de levadura y a la derecha se tiene la banda con el fragmento de aproximadamente 0.7 kb con el gen completo de H<sub>1</sub> de ratón. Con lo anterior y con los datos de espectrofotometría se corrobora la cantidad e integridad de cada uno de los plásmidos, los cuales están listos para ser marcados y utilizados como sondas en ensayos de hibridación.

Por otro lado, los dos procedimientos descritos en material y métodos con respecto al aislamiento del inserto del plásmido para su posterior marcado radiactivo presentaron algunos problemas. Después de varios ensayos, en el caso del procedimiento descrito por Maniatis et al. (1982) se observó que al diluir en agua el fragmento de agarosa de bajo punto de fusión con la banda del inserto del plásmido en cuestión y realizar un ensayo de incorporación de marca en la sonda, la enzima ADN polimerasa no trabajaba correctamente. Posteriormente, se determinó que esto era debido a que la agarosa, al no ser extraída con fenol/cloroformo, cloroformo y

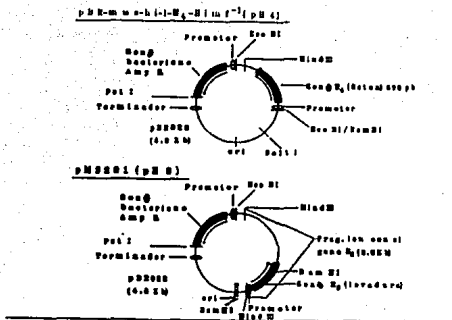


Figura 7.- Mapa de restricción de los plásmidos pMS201 (pH<sub>2</sub>) (Smith y Andresson, 1983) y pBR-mus-hi-1-H<sub>2</sub>-HimF<sup>-1</sup> (pH<sub>4</sub>) (Seiler-Tuyns y Birnstiel, 1981). La línea delgada representa ADN procariótico (plásmido pBR322) y la línea gruesa representa los insertos de ADN cromosómico eucariótico. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes en sus células de origen (*S. cerevisiae* y *M. musculus*, respectivamente). Los sitios de restricción más importantes están representados. Se muestran los marcadores genéticos funcionales en *E. coli*. (gen de resistencia a ampicilina); los promotores (tanto funcionales en *E. coli* como de los insertos) y el origen de duplicación del plásmido.

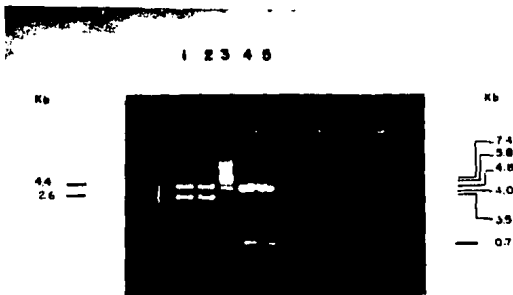


Figura 8.- Gel preparativo de agarosa. En esta figura se muestra un gel preparativo de agarosa con los plásmidos pH<sub>1</sub> y pH<sub>2</sub> y el ADN de  $\lambda$  como marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 2 se observa el patrón de digestión de pH<sub>1</sub> con Hind III, donde se presentan dos bandas, una superior de 4.4 kb que corresponde al vehículo pBR322 y una banda inferior que corresponde a un fragmento de 2.6 kb el cual contiene el gene completo de la histona H<sub>4</sub> de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); en el carril 3 se muestra ADN de  $\lambda$  digerido con Eco RI y en los carriles 4 y 5 se muestra el patrón de digestión de pH<sub>2</sub> con Eco RI en donde se observan dos bandas, una superior de 4.0 kb que corresponde al fragmento de pBR322 y una inferior de aproximadamente 0.7 kb que corresponde al gene completo de H<sub>4</sub> de ratón ( 690pb) con un fragmento adicional de 29 pb del vector.



precipitar al inserto con etanol, muy probablemente presentaba impurezas. Ello evitaba la obtención de una sonda que presentara una alta actividad específica ( $>10^7$  cpm/ $\mu$ g ADN) que a su vez permitiera obtener una buena señal de hibridación en el filtro de ADN (Southern) o ARN (Northern).

En el caso del procedimiento de Schleif y Wensink, (1981) el rendimiento en  $\mu$ g de inserto de ADN era relativamente inferior al alcanzado con el primer procedimiento. Ello era debido a que las múltiples extracciones con fenol/cloroformo, fenol/STE y cloroformo arrastraban cierta cantidad del ADN de interés (sonda) y al momento de precipitar con etanol el rendimiento se reducía. Sin embargo, por este procedimiento la pureza del inserto fue superior al primero.

Finalmente, una vez alcanzadas las condiciones de alta pureza y cantidad de ADN de los insertos, se obtuvieron rutinariamente lotes de fragmentos de ADN tanto de pH<sub>1</sub> como de pH<sub>2</sub> en concentraciones de hasta 10  $\mu$ g del inserto/ml.

El rendimiento en el aislamiento de ADN y ARN de ratón, nunca llegó a ser alto dado que sólo se lograba obtener (a partir de 2 gr de tejido) hasta 200-300  $\mu$ g tanto de ADN como de ARN. La integridad del ARN fue alta, puesto que su verificación en geles de agarosa mostró un excelente patrón en función de la presencia de los indicadores ribosomales 28S y 18S. En el caso del ADN, la mayoría de las veces presentó un poco de ARN contaminante de bajo peso molecular aún cuando el ADN fuera tratado con ribonucleasas.

Por otra parte, el establecimiento y estandarizado del procedimiento de aislamiento de ADN y ARN a partir de ejes embrionarios de maíz, presentó varios problemas que se mencionan a continuación.

El protocolo de desinfección de los ejes para mantenerlos libres de microorganismos (hongos y bacterias) durante los diferentes tiempos de incubación fue difícil de optimizar. Las condiciones iniciales que se estudiaron fueron las siguientes:

\* Etanol absoluto en varias diluciones: 1%, 2%, 3%, 10%; en donde los ejes fueron imbibidos por 8, 5, 3 y 1 minutos, respectivamente seguido de dos lavados con agua estéril.

\* Hipoclorito de sodio en diluciones: 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3% y 10%. Los ejes fueron imbibidos por 10 minutos para las 3 primeras concentraciones y 7, 3 y 1 minutos para las 3 restantes concentraciones seguido de 4 lavados con agua estéril para cada tratamiento.

De todos los tratamientos utilizados , el tratamiento con hipoclorito de sodio ( solución comercial-Cloralex al 37% o Sigma P-1379 al 15% ) al 3% e imbibición por 3 minutos con 4 lavados con agua estéril (todo ello bajo condiciones asépticas) fue el que presentó mejores resultados en cuanto a la eliminación de microorganismos, evitando al mismo tiempo efectos tóxicos para el embrión, lográndose mantener una alta viabilidad y vigor. Los ensayos de germinación de semillas y ejes embrionarios antes y después de la desinfección mostraron que los embriones mantenían entre un 90 y 95% de viabilidad.

La óptima extracción de ADN y ARN a partir de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos contempló los siguientes puntos:

La temperatura de incubación requerida para una correcta acción del CTAB (presente en el amortiguador de extracción), detergente que contribuye a un efectivo rompimiento de la pared celular del homogenado de embriones, debió aumentarse a 55-60° c. Además, el tiempo de incubación en el baño María fue aumentado a 4-6 horas para garantizar un mejor rompimiento de células.

En lugar de agitar suavemente el tubo con el homogenado durante el proceso en el que el cloroformo/alcohol-isoamílico (24:1) lleva a cabo la extracción de las proteínas, este debió ser agitado más activamente.

Los pasos de centrifugación para eliminar a las proteínas desnaturalizadas fueron repetidos por lo menos 2 veces más, acompañados de extracciones con cloroformo/alcohol-isoamílico y agitación vigorosa.

En el paso de precipitación de los ácidos nucleicos con el amortiguador de precipitación, fue necesario agregar mayor cantidad de agua destilada y desionizada estéril (unos 15-20 ml total ) para que ocurriera la precipitación. Además, en lugar de dejarse reposar por espacio de 30 minutos a temperatura ambiente se dejó 2-3 o más horas para alcanzar una máxima precipitación y mejor rendimiento.

Las condiciones de ultracentrifugación se adaptaron para la ultracentrifuga de mesa Beckman TL-100 en el rotor de columpio TLS-55, en lugar de las indicadas en la técnica original, la cual emplea rotores de mayor capacidad. En función de estos cambios fue necesario ajustar de igual manera las condiciones de resuspensión de los botones.

Optimizadas estas condiciones, se lograron tener rendimientos de 25-40 µg de ADN genómico de alto peso molecular y de 150-400 µg de ARN total de razonable pureza a partir de 1 g de ejes embrionarios, ya que en la mayoría de las extracciones efectuadas la relación

espectrofotométrica de 260/280 nm arrojó valores que iban desde 1.7 hasta 2.0.

En la figura 9 se muestra un gel no desnaturalizante de agarosa donde se observa la presencia de bandas bien definidas de los ARN ribosomales 25S y 18S, lo cual es indicativo de la integridad de los ARN extraídos de los ejes embrionarios de maíz además del ARN de ratón con sus ARN ribosomales 28S y 18S.

El marcado de la sonda también fue problemático en un inicio debido a la presencia de impurezas en la solución del inserto plasmídico. Corregido esto con manipulaciones más rigurosas, se obtuvieron rutinariamente sondas con una actividad específica de  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g de ADN.

Satisfechos estos puntos, se inició el procesado de filtros tanto de ADN como de ARN en ensayos de hibridación.

Como muestran las figuras 10, 11 y 12, en un inicio los filtros mostraron problemas de unión inespecífica de la sonda al filtro, esto es, mucho fondo o ruido (background).

En la autoradiografía de la figura 10 se observa que el fondo aparece tanto en la región correspondiente a los carriles del gel como en el resto de la superficie del filtro, lo cual indica que las condiciones de hibridación no eran aún las adecuadas y que los lavados tampoco fueron efectivos para eliminar la radiactividad adherida de manera inespecífica.

De la misma forma, en la autoradiografía de la figura 11 se observa que el ruido (background) se debe tanto a la unión inespecífica de la sonda al filtro (como lo muestra la mancha en forma de diagonal en la parte superior del filtro) como a la hibridación inespecífica de la sonda a los distintos carriles en donde se observa una mancha en forma de barrido.

Las dos autoradiografías descritas anteriormente son de filtros con ARN de maíz extraídos a diferentes tiempos, hibridados con pH<sub>1</sub>, el cual se marcó a una actividad específica de  $1.1 \times 10^8$  y  $1.4 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g de ADN, respectivamente.

La autoradiografía de la figura 12 muestra hibridación específica en los carriles 3 y 4 (ADN genómico de maíz digerido con Eco RI), lo cual permitió establecer mejores condiciones de hibridación y lavado para alcanzar resultados satisfactorios aún utilizando sondas heterólogas.

En la autoradiografía mostrada en la figura 13 puede observarse por vez primera evidencia indicativa de hibridación específica de la sonda con el ARN de maíz extraído a diferentes tiempos. Esta autoradiografía la relación señal/ruido es relativamente alta, pudiéndose observar bandas

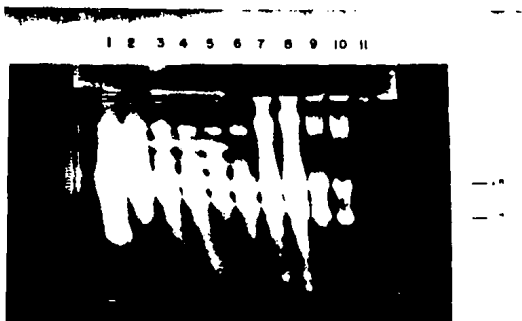


Figura 9.- Electroforesis de ARN en gel no desnaturalizante de agarosa. Se muestra ARN total extraído de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos de la germinación, ARN total de hígado de ratón y el plásmido completo. Este gel indica que los métodos de extracción de ambos ARNs se encuentran estandarizados. En los carriles 1 y 2 se observa ARN total extraído de ejes embrionarios sin imbibir (tiempo 0); en el carril 3 se tiene ARN total de maíz extraído a las 12 horas después de imbibir al embrión; en el carril 4 se tiene ARN total de maíz imbibido por 24 h; en los carriles 5 y 6 se tiene ARN de maíz imbibido por 36 h; en el 7 se tiene ARN de maíz a 48 h de imbibición; en el 8 se tiene ARN de maíz a 72 h de imbibición. Todas las extracciones se realizaron a partir de un gramo de ejes embrionarios sin escutelo (ver materiales y métodos) imbibidos en medio *Murashige-Skoog* sin fitoreguladores e incubados por el tiempo indicado a 25° C, según el método de extracción con CTAB desarrollado por Taylor y Powell, (1982). En todos los carriles con ARN de maíz se colocaron aproximadamente 20  $\mu$ g y en todos ellos se observan claramente los ARN ribosomales 25S y 18S. En los carriles 9 y 10 se observa ARN total extraído de hígado de ratón por el procedimiento desarrollado por Krieg et al, (1983). Se pueden apreciar los ARN ribosomales 28S y 18S; estos dos carriles fueron cargados con 20  $\mu$ g. En el carril 11 se colocaron 100 ng de pH.



Figura 10.- Autoradiografía de filtro con ARN de maíz extraído de ejes embrionarios a diferentes tiempos. Ambos geles desnaturalizantes de agarosa al 1% fueron transferidos a nitrocelulosa SS y fijados a 80 °C por una hora en vacío. La hibridación se realizó bajo las siguientes condiciones: formamida 50%, SSC 5X, Denhardt 5X, SDS 0.1%, ADN fragmentado de esperma de salmón 100 µg/ml; incubado a 40 °C por 24 horas con agitación. Los lavados consistieron en dos enjuagues con SSC 2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente por 30 minutos y dos veces con SSC 0.2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente, 15 minutos cada uno. La placa de rayos X se expuso durante 48 horas. El marcado de la sonda se llevó a cabo por el método desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). La actividad específica de la sonda pH, fue de  $1.1 \times 10^7$  cpm/µg de ADN. Ambos geles tienen en los carriles 1 al 6 30 µg de ARN total de cada uno de los tiempos de extracción (0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas, respectivamente).

1 2 3 4 5 6



Figura 11.- Patrón autoradiográfico de ARN de maíz extraído de ejes embrionarios a diferentes tiempos durante la germinación. La elaboración del gel de agarosa de tipo desnaturizante y su transferencia a soporte sólido, así como su fijación se describen en materiales y métodos. Las condiciones de hibridación fueron las mismas descritas en la figura 10, cambiando únicamente las condiciones de lavado, las cuales consistieron de 4 enjuagues con SSC2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente 15 minutos cada uno y 2 veces con SSC 0.2X + SDS 0.1% a 42 °C, 5 minutos cada uno. El filtro fue expuesto por 5 días. La actividad específica de la sonda (inserto pH. ) fue de  $1.4 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ g de ADN. En los cariles 1 al 6 hay ARN total extraídos a diferentes tiempos de germinación ( 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas, respectivamente ).

1 2 3 4 5

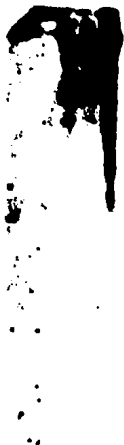


Figura 12.- Autoradiografía de filtro con ADN genómico de maíz y ratón digeridos con Eco RI. Se utilizó a pH<sub>8</sub> como sonda y las condiciones de hibridación fueron las mismas que se describen en la figura 11. Los lavados consistieron en dos enjuagues con SSC 2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente por 30 minutos cada uno y dos más con SSC 0.2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente por 30 minutos cada uno. El filtro se expuso por 48 horas. La actividad de la sonda fue de  $2.9 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g de ADN. En los carriles 1 y 2 se tienen diluciones de pH<sub>8</sub>, correspondientes a 100 y 10 pg, respectivamente; en los carriles 3 y 4 se colocaron 20  $\mu$ g de ADN genómico de maíz digerido con Eco RI y en el carril 5 se colocaron 20  $\mu$ g de ADN de hígado de ratón digerido también con Eco RI.



Figura 13.- Autoradiografía de filtro con ARN de maíz extraído a partir de ejes embrionarios imbibidos a diferentes tiempos. La hibridación se realizó con pH, bajo las siguientes condiciones: formamida 30%, SSC 5X, SDS 0.1%, Tris base 50 mM, Denhardt 5X, ADN de esperma de salmón 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 42 °C por 36 horas. Se lavó 4 veces con SSC 2X + SDS 0.1%, 15 minutos cada uno a temperatura ambiente y una vez con SSC 0.2X + SDS 0.1%, 15 minutos a 52 °C. La sonda de pH, alcanzó una actividad específica de  $1.6 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  de ADN. En cada uno de los carriles del 1 al 6 se hayaron 30  $\mu\text{g}$  de ARN total de maíz extraídos como se indica en materiales y métodos de los tiempos correspondientes a 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posteriores a la imbibición; en el 7 se colocaron 30  $\mu\text{g}$  de ARN total de hígado de ratón y en el 8 y 9 se colocaron diluciones correspondientes a 100 y 10 pg del plásmido pH.



específicas sobre un fondo con pocos gránulos o puntos de radiactividad dispersos sobre la superficie del filtro y muestra hibridación en los carriles 5 y 6 que corresponden a ARN total extraído a las 48 y 72 horas de iniciada la imbibición.

La figura 14 muestra el tipo de gráfica utilizada para el cálculo de la longitud de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) de interés, tomando como punto de referencia las longitudes bien conocidas de los fragmentos del ADN del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas Eco RI y Hind III. Para este tipo de cálculos, algunas veces también se tomaron como puntos de referencia la migración de los ARN ribosomales 28 S (6300 bases) y 18 S de ratón (Noller, 1984), 25 S de maíz (4160 bases) y 18 S de maíz (2260 bases) (Lokning, 1968), en los geles de agarosa, así como las marcas de hibridación de pH<sub>1</sub> y pH<sub>2</sub>.

La autoradiografía de la figura 15 muestra que la aparición de ARN complementario a la sonda pH<sub>1</sub> ocurre hacia las 36 horas posteriores al inicio de la imbibición, aumentando la cantidad del mismo hacia las 48 horas y observándose una pequeña disminución en la intensidad de la señal hacia las 72 horas posteriores a la imbibición. En la misma autoradiografía se observa, a manera de control, hibridación de la sonda contra sí misma.

La autoradiografía que se muestra en la figura 16 se originó a partir del mismo filtro con ARN de maíz mostrado en la figura 15, el cual fue lavado extensamente y rehibridado con la sonda pH<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos de esta figura muestran la existencia de hibridación inicial específica de pH<sub>1</sub>, también a las 36 horas posteriores a la imbibición.

En la figura 17 se muestra un gel de ARN en el cual se observa, como se mencionó anteriormente, la integridad del ARN de maíz extraído a diferentes tiempos.

La autoradiografía que se muestra en la figura 18 corresponde a un experimento independiente y demuestra por segunda ocasión que el inicio de la transcripción de H<sub>1</sub> en el maíz parece ocurrir hacia las 36 horas, continuando a las 48 horas y observándose nuevamente una pequeña disminución de la señal de hibridación hacia las 72 horas. Cabe mencionar que una autoradiografía de este filtro fue revelada inicialmente 8 días después de haber sido expuesta, observándose en esa placa evidencia sugestiva de hibridación específica, por lo cual se dejó en exposición una segunda placa por espacio de 14 días.

El análisis densitométrico confirma que la expresión del gen de la histona H<sub>1</sub> en maíz es diferencial con respecto al tiempo, dado que en la

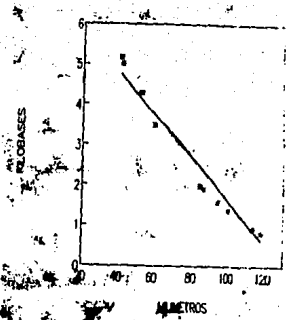


Figura 14.- Cálculo de la longitud de ácidos nucleicos en geles de agarosa. La gráfica muestra el desplazamiento de los fragmentos de ADN de  $\lambda$  digeridos con las enzimas de restricción de Eco RI y Hind III.

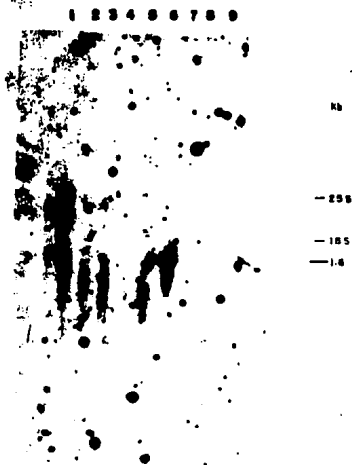


Figura 15.- Autoradiografía de filtro con ARN de maíz extraído a diferentes tiempos de imbibición. Los ácidos nucleicos en el gel desnaturizante de agarosa al 1% fueron transferidos a nitrocelulosa SS y fijados a 80 °C por una hora en vacío. Las condiciones de hibridación fueron las siguientes: formamida 50%, SSPE 5X, Denhardt 5X, SDS 0.1%, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, a 42 °C por 24 horas sin agitación y los lavados consistieron en 4 lavados con SSC 2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente por 5 minutos cada uno y 2 lavados con SSC 0.2X + SDS 0.1% a 52 °C por 15 minutos cada uno. El filtro fue expuesto por 13 días. La actividad específica de la sonda ( inserto de pH<sub>1</sub> ) fue de  $1.8 \times 10^7$  cpm/µg de ADN. En los carriles 1 al 6 se colocó ARN total extraído a los tiempos 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posteriores a la imbibición y cada uno fue cargado con 30 µg. En el carril 7 se colocaron 20 µg de ARN total de ratón; en los carriles 8 y 9 se colocaron diluciones de pH<sub>1</sub> ( 20 ng ) y pH<sub>1</sub> ( 10 ng ), respectivamente.

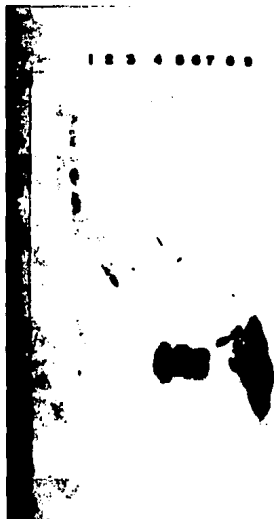


Figura 16.- Autoradiografía del filtro de la figura 15 rehibridado con pH. Este filtro originalmente fue sondeado con pH, y luego lavado para eliminar la radiactividad incorporada ( ver materiales y métodos ). El filtro lavado se hibridó y lavó bajo las mismas condiciones descritas en la figura 15. La incorporación de radiactividad en pH, fue de 63%. El filtro fue expuesto por 5 días.

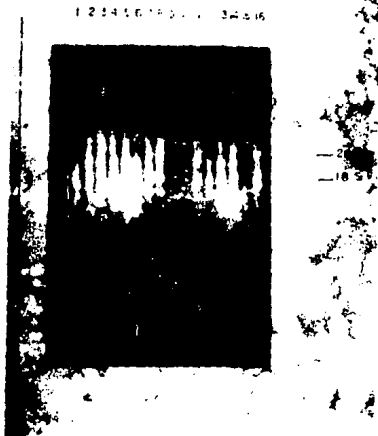


Figura 17.- Gel de ARN de maíz extraído de ejes embrionarios imbibidos por diferentes tiempos. El gel desnaturalizante se obtuvo como se indica en materiales y métodos. El carril 1 contiene 15  $\mu$ g de ARN total de maíz extraído a las cero hora; los carriles 2 y 11 contienen 20  $\mu$ g de ARN de maíz correspondiente a 12 horas de imbibición; los carriles 3 y 12 tienen 20  $\mu$ g de ARN de maíz de 24 horas de imbibición; los carriles 4 y 13 tienen 20  $\mu$ g de ARN de maíz extraído a 36 horas de imbibición; los carriles 5 y 14 tienen 25  $\mu$ g de ARN de maíz de 48 horas de imbibición; los carriles 6 y 15 tienen 15  $\mu$ g de ARN de maíz de 72 horas de imbibición; los carriles 7, 8 y 16 tienen 25  $\mu$ g de ARN total de ratón y los carriles 9 y 10 tienen 20 ng de pH<sub>1</sub> y 10 ng de pH<sub>2</sub>, respectivamente.

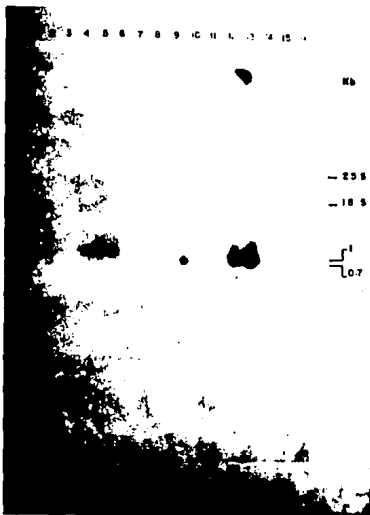


Figura 18.- Autoradiografía del filtro correspondiente al gel de ARN desnaturalizante descrito en la figura 17. Este filtro fue hibridado con la sonda pH, marcada como se indica en materiales y métodos. La hibridación se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en la figura 15. Se realizaron 4 lavados. El filtro fue expuesto por 22 días. La actividad específica de la sonda fue de  $2.2 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ g de ADN.

figura 18a se muestra que el área bajo el pico 2 es 19.24 veces mayor que la observada en el pico 1 y 8.26 veces mayor que la correspondiente al pico 3. Además, el área del pico 3 es 2.32 veces mayor que la del pico 1. Lo anterior indica que la presencia de los ARNm de la histona H<sub>1</sub> a las 36 horas (pico 1) es menor que la observada a las 48 horas (pico 2), sugiriendo que la expresión es mayor a este tiempo lo cual coincide con los máximos niveles de síntesis de histonas observados cuando más de un 80 % de la germinación de la semilla ocurre vía protusión de la radícula ( Zlatanova e Ivanov, 1988; Baiza et al., 1986) y disminuyendo la expresión a las 72 horas posiblemente debido a que la mayor parte de las células del embrión se encuentran en un estado transitorio de no división celular.

Después de haber obtenido los resultados mostrados en la autoradiografía de la figura 18, las condiciones de hibridación de nuevos filtros de ARN fueron cambiadas ligeramente ( la cantidad de la sonda a marcar fue de 75 ng con una actividad específica de  $1.6 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g ADN y con un tiempo de hibridación de 21 horas; la secuencia de lavados fue como se indica en la figura 20 ).

En la figura 19 se muestra un gel de agarosa de ARN de maíz, donde nuevamente se puede apreciar la integridad del mismo así como la presencia de ADN de  $\lambda$  digerido con Eco RI y Hind III.

En la autoradiografía que se muestra en la figura 20 se observa por vez primera evidencia que sugiere que el inicio de la transcripción de H<sub>1</sub> en maíz podría llevarse a cabo a partir de las 12 horas, dado que en los carriles 2 y 10 se aprecia una ligera señal de hibridación la cual aumenta hasta las 36 horas y empieza a disminuir a partir de las 48 y 72 horas.

Puesto que estas observaciones son indicativas de que la transcripción de los ARNm de la histona H<sub>1</sub> se da a las 12 horas y no a las 36 horas como se había observado en experimentos anteriores, se decidió comprobar este hallazgo.

En la figura 21 se muestra un gel desnaturalizante de ARN de maíz y ratón. A pesar de que se trato de cargar 25  $\mu$ g de ARN total en cada carril se observa una mayor cantidad de ARN en el carril 12.

En la autoradiografía que se muestra en la figura 22 se observa que la aparición de la marca de hibridación con pH<sub>1</sub> nuevamente ocurre en los carriles con ARN de maíz a las 12 horas de extracción, aumentando gradualmente a partir de este momento hasta las 48 horas y disminuyendo ligeramente hacia las 72 horas.

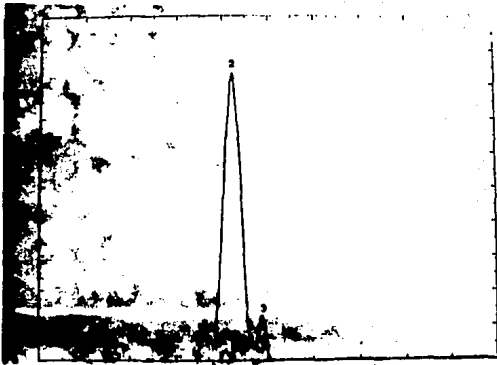


Figura 18a.- Análisis densitométrico de la placa de autoradigrafía mostrada en la figura 18. El análisis densitométrico se realizó para medir la densidad relativa de las manchas presentes; se empleó un densitometro automatizado Hoefler Scientific Instruments, modelo GS-300.



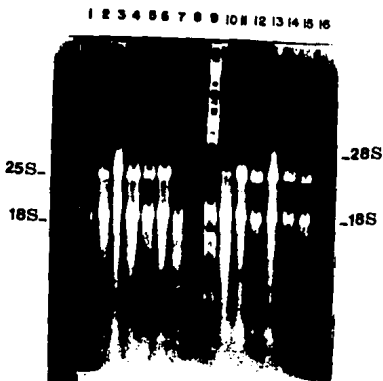


Figura 19.- Gel de ARN de maíz extraído de ejes embrionarios imbibidos por diferentes tiempos; ARN de ratón y ADN de  $\lambda$  como marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 10 se tiene ARN de maíz extraído de embriones sin imbibir (cero hora); en 2 y 11 se tiene ARN de maíz extraído a 12 horas de imbibición; en 3 y 12 se tiene ARN de maíz extraído 24 h despues de iniciada la imbibición; en los carriles 4 y 13 se tiene ARN de maíz extraído 36 horas de iniciada la imbibición; en 5 y 14 tenemos ARN de maíz extraído a las 48 horas de iniciada la imbibición; en 6 y 15 se tiene ARN de maíz extraído a las 72 horas de haber iniciado la imbibición; en los carriles 7 y 16 se tiene ARN de ratón; en todos los carriles arriba mencionados se colocaron 30  $\mu$ g de ARN total; en el carril 8 se tiene 5 ng de pH, El carril 9 tien 150 ng de ADN de  $\lambda$  digerido con Hind III.

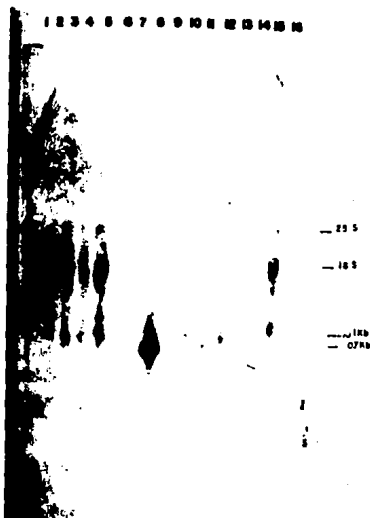


Figura 20.- Autoradiografía del filtro correspondiente al gel desnaturalizante de ARN descrito en la figura 19. Este filtro fue hibridado con la sonda pH<sub>1</sub> (inserto puro) como se indica en materiales y métodos. La hibridación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas en las figuras 15 y 18, con la única diferencia de que fue incubado por 21 horas y con una sonda reutilizada, cuya actividad específica fue de  $1.6 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ g de ADN. Los lavados consistieron en 4 enjuagues con SSC 2X + SDS 0.1% por 5 minutos a temperatura ambiente y un lavado con SSC 1X + SDS 0.1% por 15 minutos a 42 °C, con agitación.

Puesto que observaciones anteriores (Reyes et al., 1991) sugerían que la benciladenina (fitoregulador del tipo de las citocininas) actúan estimulando la duplicación del ADN durante el ciclo celular, de manera colateral se incluyó en este mismo gel ARN total de maíz extraído a las 27 horas como control y otro extraído a las 27 horas pero de ejes imbibido en presencia de bencil-adenina. Los resultados muestran que la señal de hibridación es más intensa en el carril 12 (27 horas con bencil-adenina) que la correspondiente al control (27 horas sin bencil-adenina) y a las de 24 y 36 horas. Además, los resultados de la figura 22 confirman que la aparición de ARNm para la histona H<sub>1</sub> en maíz es alrededor de las 12 horas.

Los resultados obtenidos hasta este momento sugieren que el inicio de la transcripción de los genes de la histona H<sub>1</sub> de maíz se verifica a partir de las 12 horas en los ejes embrionarios imbibidos mientras que en el caso de los genes para H<sub>2</sub>, la aparición de ARNm parecería ocurrir a partir de las 36 horas. Estas observaciones serán analizadas en la discusión.

Por lo que respecta a la organización de los genes de histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> en el genoma de maíz, para estudiar este aspecto se elaboraron geles de ADN genómico digerido con diferentes enzimas de restricción.

De este manera, en la figura 23 se muestra un gel de agarosa que contiene ADN de maíz y el ADN de ratón digeridos con tres diferentes enzimas de restricción (EcoRI, Hind III y BamHI). Esta figura muestra en todos los carriles pequeñas bandas discretas que sobresalen del barrido. Estas bandas representan secuencias repetidas de ADN. Además, en los carriles de ADN de ratón, al final del barrido se observa ARN degradado de bajo peso molecular. También, en el carril 9 parecería que no hubo una digestión completa del ADN de maíz tratado con Bam HI.

Debido a que en nuestro laboratorio se tienen proyectos para el conocimiento de los mecanismos y procesos que se verifican en plantas al ser estresadas y acondicionadas en medios salinos se decidió incluir ADN de *Lycium*. *Lycium brevipes* L (Solanaceae) es una planta que crece y se desarrolla satisfactoriamente bajo condiciones de salinidad y sequía y que se utiliza como planta forrajera en el Valle de Texcoco. El ADN de *Lycium*, extraído a partir de semillas, fue tratado bajo las mismas condiciones al de maíz y de ratón con respecto a las enzimas de restricción.

La autoradiografía resultante de la hibridación del filtro de este gel se muestra en la figura 24. Se observa que existe hibridación en

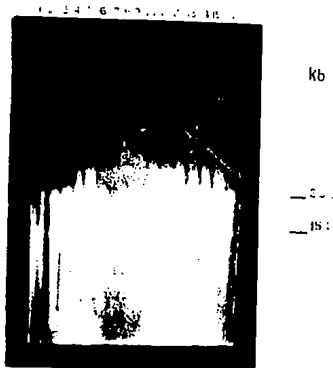


Figura 21.- Electroforesis de gel desnaturalizante de ARN de maíz. En el carril 1 se tiene ARN de maíz extraído a las 0 hora; en 2 y 10 hay ARN de maíz extraído a 12 horas de imbibición; en 3 y 13 hay ARN de maíz a 24 horas de imbibición; en 4 y 14 hay ARN de maíz extraído a 36 horas de imbibición; en 5 y 15 hay ARN de maíz extraído a 48 horas de imbibición; en 6 y 16 hay ARN de maíz obtenido a 72 horas de imbibición; en 7 se tiene ARN de ratón; en todos los carriles se colocaron 30  $\mu$ g de ARN total; en 8 se tienen 5 ng de pH; en 9 se tiene ADN de  $\lambda$  digerido con HindIII/Eco RI; en 11 se tiene ARN de maíz extraído de ejes embrionarios imbibidos por 27 horas en una solución de bencil-adenina a una concentración final de  $10^{-4}$  M ( ver materiales y métodos para detalles ).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

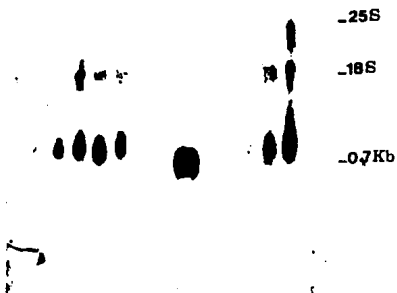


Figura 22.- Autoradiografía del filtro correspondiente al gel de ARN descrito en la figura 21. El filtro fue hibridado con el inserto purificado de pH<sub>4</sub>. Las condiciones de hibridación se llevaron a cabo como se describe en la figura 15 y los lavados se llevaron según las condiciones indicadas en la figura 20. La actividad específica de la sonda fue de 2.2x10<sup>4</sup> cpm/μg de ADN.



Figura 23.- Electroforesis de ADN en gel de agarosa. El gel no desnaturalizante se elaboró conforme a lo descrito en materiales y métodos. En los carriles 1 y 12 se colocó  $\lambda$  en una dilución correspondiente a 500 ng; en 2, 5 y 9 se colocaron 30  $\mu$ g de ADN de maíz digeridos con Eco RI, Hind III y Bam HI, respectivamente; en los carriles 3, 6 y 10 se colocaron 30  $\mu$ g de ADN de *Lycium brevipes* L. digeridos en el mismo orden descrito para el ADN de maíz; en 4, 7 y 11 se colocaron 45  $\mu$ g de ADN de ratón digeridos de la misma forma que los anteriores; en 8 se colocó 0.5  $\mu$ g de ADN de  $\lambda$  digerido con Hind III/Eco RI.

los carriles de ADN de maíz y de *Lycium* característica de un patrón de dispersión de los genes de la histona H<sub>1</sub>, aunque no se observa ninguna señal en los carriles con ADN de ratón al utilizar la sonda pH<sub>1</sub>. Esto último será analizado en la discusión.

En la figura 25 se muestra otro gel con ADN de maíz, así como de *Lycium*, de ratón y de  $\lambda$  como marcador de peso molecular. En este gel nuevamente se definen con claridad las secuencias repetidas de ADN y se observa una vez más una digestión no total en el caso de ADN digerido con la enzima Bam HI, así como la presencia de ARN de bajo peso molecular en los carriles con ADN de ratón ( ver pie de la figura ).

El gel descrito en la figura 25 se transfirió a nitrocelulosa. Este filtro fue hibridado como se indica en el pie de la figura 26 y se obtuvo una autoradiografía que muestra la presencia de varias bandas en los carriles de ADN genómico de maíz, de *Lycium* y ratón, así como señal evidente en los carriles que contienen ADN de pH<sub>1</sub>. Esta autoradiografía presenta evidencias indicativas del tipo de organización de los genes de la histona H<sub>1</sub> en maíz y corrobora la dispersión de dichos genes de histona H<sub>1</sub> en el ratón (ver la sección de la organización de los genes de las histonas, en antecedentes).

Los resultados anteriores permiten sugerir que el tipo de organización de los genes de la histona H<sub>1</sub> de maíz es el de elementos dispersos en el genoma. Se elaboró otro gel de agarosa y se transfirió a nitrocelulosa e hibridado con pH<sub>1</sub> como se indica en el pie de la figura 27.

Los resultados de la autoradiografía de la figura 27 de este filtro muestran claramente la presencia de una serie de bandas en el ADN de maíz y ratón. La presencia de bandas de hibridación en los carriles de ADN de maíz digerido con las enzimas Eco RI y Hind III indican que la dispersión de los genes de histona H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> es menor en este organismo que en ratón.



Figura 24.- Autorradiografía del filtro del gel de ADN genómico descrito en la figura 23. El filtro fue hibridado con el inserto purificado de pH. La hibridación se llevó a cabo de la siguiente manera: formamida 50%, SSPE 5X, Denhardt 5X, SDS 0.1%, ADN de esperma de salmón 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , además de 50  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5 M pH 7.5 colocados al momento de introducir la sonda para iniciar la hibridación, la cual se llevó a cabo por 24 horas a 42 °C, sin agitación. El marcado de la sonda se realizó según materiales y métodos con una modificación: en lugar de colocar 30  $\mu\text{Ci}$  se colocaron 60  $\mu\text{Ci}$  y 200 ng del inserto purificado en lugar de los 50-100 ng que habitualmente se colocaban. Además, los lavados consistieron de 2 enjuagues con SSC 2X + SDS 0.1%, 15 minutos a temperatura ambiente y 2 lavados con SSC 1X + SDS 0.1%, 30 minutos a 42 °C con agitación. El filtro fue expuesto por 15 días. La incorporación de radiactividad en la sonda fue del 72%.





Figura 25.- Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de maíz, *Lycium* y ratón. En carriles 1 y 12 se colocó pH, a una concentración correspondiente a 750 ng; en 2, 5 y 9 se colocaron 30  $\mu\text{g}$  de ADN genómico de maíz digeridos con Eco RI, Hind III y Bam HI, respectivamente; en 3, 6 y 10 se colocaron 30  $\mu\text{g}$  de ADN de *Lycium* digeridos de igual forma y en mismo orden que los de maíz; en 4, 7 y 11 se colocaron 45  $\mu\text{g}$  de ADN genómico de ratón igualmente digeridos y en 8 se colocó el ADN de  $\lambda$  digerido con Hind III/Eco RI a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}$ .

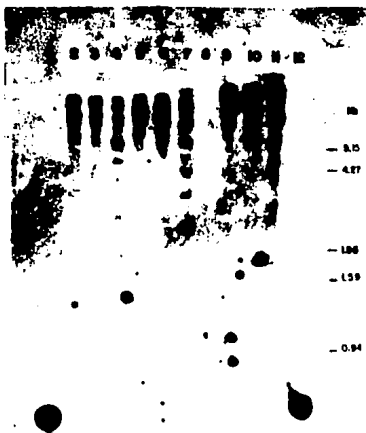


Figura 26.- Autoradiografía del filtro del gel de ADN genómico descrito en la figura 25. El filtro fue hibridado con la sonda pH, (inserto puro) como se describe en materiales y métodos. Las condiciones de hibridación, el marcado de la sonda y los lavados se llevaron a cabo como se indica en la figura 24. Se marcaron 300 ng de sonda, cantidad 3-6 veces superior a la que habitualmente se utiliza (50-100 ng). La actividad específica de la sonda fue de  $1.9 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ g de ADN. El tiempo de exposición fue de 5 días.

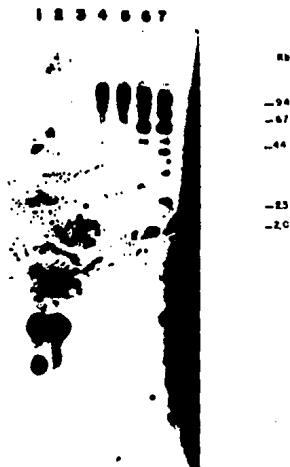


Figura 27.- Autoradiografía de un filtro de un gel de agarosa no mostrado con ADN genómico. El filtro fue hibridado con el inserto purificado del plásmido pH, como se describe en materiales y métodos. La hibridación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: formamida 30 %, Tris base (pH 7.8) 50 mM, Denhardt 5X, SDS 0.1%, ADN de esperma de salmón fragmentado 100 µg/ml, SSC 5X, a 42 °C por 36 horas, sin agitación. Se marcaron 50 ng de sonda. Los lavados consistieron en 2 enjuagues con SSC 2X + SDS 0.1%, 15 minutos a temperatura ambiente y 3 veces con SSC 0.2X + SDS 0.1%, 30 minutos a 52 °C. La actividad específica de la sonda fue de  $3.6 \times 10^1$  cpm/µg de ADN. El filtro fue expuesto por 9 días.

## D I S C U S I O N

La germinación de la semilla es un período en el ciclo de vida de la planta, en donde ésta pasa de un estado de "inactividad" metabólica a uno de intensa actividad como consecuencia de una activación del genoma, el cual se encuentra "latente o dormante" pero que, al ocurrir las condiciones apropiadas (rehidratación), se inicia una secuencia de eventos moleculares en cascada culminando con la producción de la raíz (germinación) y por lo tanto con el inicio de la formación de una nueva planta (Bewley y Black, 1983).

Puesto que, la semilla se encuentra en un estado de dormancia en la que la actividad metabólica se haya reducida a un mínimo, esto equivale a decir que la actividad enzimática en general se encuentra casi paralizada, con una síntesis de proteínas prácticamente ausente. Así, la semilla, al estar desecada, manifiesta un estado de quiescencia. En semillas ortodoxas, la actividad metabólica es casi nula pero pasando este estado y al presentarse las condiciones apropiadas (rehidratación), estas germinan. Por el contrario, cuando las semillas denominadas recalcitrantes sufren un estado de desecación, estas no germinan, lo que hace que este tipo de semillas no presente una clara separación entre el desarrollo embrionario y el período postgerminativo (Bewley y Black, 1983; Dure, 1985). Sin embargo, se sabe que a nivel morfológico y fisiológico existen diferencias entre los embriones y las semillas en germinación dadas como resultado de cambios en la actividad génica (Crouch, 1987; Harada et al., 1988 citados por Comai y Harada, 1990).

Actualmente se tiene conocimiento de que las semillas no son entes completamente inertes desde un punto de vista metabólico, dado que se han observado una serie de eventos moleculares que ocurren en este estado, por lo que la transición de la embriogénesis al estado de postgerminación en semillas provee de un excelente sistema para el estudio de la activación génica (Comai y Harada, 1990).

En relación a lo anterior, los datos de Comai y Harada (1990) demuestran que la actividad metabólica de los embriones secos (*Brassica napus*, L) no es nula, sino que existe una baja pero significativa actividad (8% del total alcanzada durante la embriogénesis temprana). La existencia de una alta tasa de expresión de varios genes de proteínas de reserva, de enzimas específicas de vías metabólicas, de proteínas ribosomales y de muchos otros genes durante la embriogénesis tardía ha sido caracterizada y se ha observado

que muchos de estos genes son activos en semillas secas aún en ausencia de rehidratación, por lo cual puede afirmarse que la expresión génica en semillas secas no es nula. Además, lo anterior indica que la presencia de cambios en la actividad de los genes es determinante para la transición de la embriogénesis a la postgerminación, cambios que son iniciados solamente después de que las semillas son rehidratadas y no durante el período de desecación (Harada et al., 1988; Goldberg et al., 1989; Comai y Harada, 1990).

En función de lo anterior podemos afirmar que los embriones de semillas secas no están completamente inactivos y ello lleva a pensar que en la actividad metabólica (enzimática) en los estados tempranos de la imbibición se verifican múltiples eventos moleculares que permiten preparar a las semillas para su correcta germinación y el establecimiento de nuevas plantas.

Por otro lado, en la mayoría de los organismos eucarióticos (principalmente animales) la síntesis de proteínas histonas se presenta de manera periódica durante los ciclos celulares y ello es un reflejo de que su síntesis es simultánea a la del ADN durante la fase S del ciclo celular (Robbins y Borum, 1967; Breindl y Gallwitz, 1974; Kedes, 1979). Lo anterior se apoya en una amplia gama de evidencias las cuales sostienen que el nivel de transcripción de los genes de las histonas se encuentra estrechamente coordinado con la síntesis de ADN (Borum et al., 1975; Hereford et al., 1979; Hereford et al., 1982; Sittman et al., 1983; Plumb et al., 1984; Alterman et al., 1984).

Durante el período embrionario en animales, se ha observado que la transcripción de los genes de las histonas se verifica antes de cada duplicación del ADN y por tanto, de cada ciclo de división celular (Maxson et al., 1983). Así también, se ha sugerido que los genes de histonas que primero se transcriben en pollo, erizo de mar, *Xenopus* y ratón, entre otros, son los de las histonas H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B continuado con H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> y por último H<sub>1</sub> (revisado en Heintz, 1991).

Sin embargo, además de la simultaneidad en la síntesis de las histonas y la del ADN nuclear, se han encontrado diferentes niveles de expresión en otros estados del ciclo de vida de las células animales (Sun et al., 1990). Estos niveles de expresión (tanto en el número de transcritos como en la presencia de variantes de los mismos) se delimitan importantemente por el estado funcional del desarrollo embrionario, de crecimiento y diferenciación celular de los organismos (Wu et al., 1983; Maxon et al., 1983; Franklin y Zweidler, 1977; Newrock et al., 1977; Urban y Zweidler, 1983; Wu y Bonner, 1981) y en algunos de ellos no existe simultaneidad con la síntesis del

ADN, como los observados en estados tardíos de la espermatogénesis en la trucha (Sung y Dixon, 1970) o durante los estados específicos de la maduración de eritrocitos de pollo (Ruiz-Carrillo et al., 1974).

De este modo, las evidencias indican que en general, en células animales existe una simultaneidad en la síntesis de histonas y del ADN nuclear durante el ciclo celular (fase S), aunque se sabe que en ciertos periodos del desarrollo embrionario y en estados específicos de la vida de los organismos se verifican eventos no simultáneos, los cuales son debidos a una expresión diferencial de los genes de las histonas (Isenberg, 1979).

Por otro lado, en plantas se ha observado que durante el inicio de la imbibición de embriones secos de maíz la síntesis temprana de las proteínas en general y de manera particular la de las histonas se verifica horas antes de la síntesis replicativa del ADN (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Así, la síntesis *de novo* de proteínas histonas en embriones de maíz imbibidos es detectada entre las 4 y 12 horas (Zlatanova e Ivanov, 1988) verificándose una tasa máxima a las 12 horas que se mantiene constante hasta la culminación de la imbibición-germinación (Baiza et al., 1986). En este sentido, la síntesis de histonas en plantas es un evento previo a la replicación del ADN nuclear, lo cual sugiere que la síntesis de histonas no es simultánea a la del ADN nuclear, puesto que se ha determinado que la síntesis replicativa del ADN se inicia hacia las 16 horas de iniciada la imbibición en núcleos de células meristemáticas de embriones de maíz (Baiza et al., 1989).

Por otra parte, como ya fue discutido, la síntesis de ADN que se observa a las 8 horas de iniciada la imbibición podría ser de tipo reparativo y organelar (Zarain et al., 1987; Zatlanova et al., 1987).

Lo anterior nos permite suponer que durante el desarrollo de un embrión animal la división simultánea de todas sus células requiere de una coincidencia entre la síntesis de histonas y la del ADN nuclear, dado que al estar todas las células en proceso de división activa se requiere de la presencia de estados de condensación y descondensación de la cromatina, la cual permitirá que se verifique de manera efectiva la mitosis. Pero también se requiere de la expresión diferencial de los genes necesarios para el establecimiento de los diferentes estados de diferenciación celular que dan origen a la formación de los distintos tipos de células, tejidos y órganos del organismo. Por otra parte, la síntesis también puede ser dirigida por ARNm de origen materno y ocurre antes de que se verifique el primer ciclo de replicación del ADN nuclear, prosiguiendo de esta manera no coincidente (síntesis de histonas primero y de ADN nuclear después) al menos durante los primeros ciclos (Arceci y Gross, 1977; Adamson y Woodland, 1974; Levenson y

Marcus, 1975; Ruderman y Pardue, 1977; Sung y Dixon, 1970; Candido y Dixon, 1972).

Por el contrario, en el embrión vegetal la activación de la división celular no se presenta simultáneamente en todas las células, sino que se ha encontrado la existencia de un orden progresivo de iniciación y/o activación. Los resultados de Baiza et al., (1986, 1989) demuestran que las primeras mitosis aparecen en células de mesocotilo de embriones de maíz a las 12 horas de haberse iniciado la imbibición, seguidas en algunas células del nudo escutelar a las 16-18 horas y finalmente en células de raíz seminal a las 18 horas, lo que podría contribuir a que la expresión de los genes de las histonas se verifique de manera no simultánea a la síntesis de ADN. Además, se han observado picos de síntesis de histonas desde las 6 horas de iniciada la imbibición y llega a mantenerse constante a partir de las 12 horas hasta que se inicia la protusión de la radícula.

La formación de nuevas proteínas histonas parece ser un requisito para que se dé la replicación del ADN y la división celular. Sin embargo estos dos últimos eventos son posteriores a la elongación celular, puesto que se ha observado que durante la germinación de ejes embrionarios de maíz dicho fenómeno (elongación celular) es un evento temprano que ocurre sin que se manifieste la división celular (Baiza et al., 1986), aún cuando algunas figuras mitóticas (en unas pocas células de la raíz y brote) pueden ser detectadas en los tejidos meristemáticos al tiempo (28 horas) en el que más del 50% de las semillas han germinado. Lo anterior indica que el papel de la duplicación del ADN y los eventos previos a este, tales como la síntesis de histonas, podría contribuir a que los tejidos meristemáticos participaran eficientemente en la germinación vía protusión de radícula para iniciar la formación de una planta completa (este trabajo; Baiza et al., 1989; Zlatanova et al., 1988; Zlatanova e Ivanov, 1988; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Zlatanova et al., 1987).

Por otra parte, las observaciones de Baiza et al., (1986, 1989) y las de Zlatanova et al., (1987, 1988) apoyan la existencia de la síntesis de las histonas como un evento temprano y previo a la del ADN nuclear e incluso a la replicación de tipo reparativo y organelar en embriones secos de maíz (Zarain et al., 1986; Zlatanova et al., 1987). Estas evidencias indican que la existencia temprana de las proteínas de las histonas a las 6 horas de iniciada la imbibición en contraste con la presencia de la síntesis de ADN nuclear hasta las 15 horas, podría interpretarse como un mecanismo utilizado por la célula vegetal para reorganizar al genoma (Baiza y Sánchez de Jiménez, 1989). La multiplicación celular parecería ocurrir en fases tardías de la germinación, por lo que la síntesis replicativa del ADN nuclear se observa en

niveles máximos a las 40-50 horas para luego decaer, correlacionándose esto con los valores máximos obtenidos de figuras mitóticas en el embrión de maíz a las 40-50 horas de iniciada la imbibición (Baiza et al., 1989).

En este sentido, el objetivo fundamental de este trabajo fue el de estudiar en que momento durante la imbibición-germinación de embriones disectados (libres de *escutelum*) de maíz variedad Chalqueño se inicia la transcripción de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> con el fin de determinar si la traducción de histonas se iniciaba a partir de ARNm de origen materno almacenado en el embrión o si éste era sintetizado *de novo*. Como se apuntó líneas arriba, observaciones de Baiza et al., (1986) y de Zlatanova et al., (1987, 1988) indican que hay una síntesis de histonas a partir de las 6 horas de iniciada la imbibición. Además, se manifiesta un pico de síntesis de estas proteínas a las 12 horas y a partir de este momento se mantiene más o menos constante hasta la protusión de la radícula. En este trabajo, utilizando embriones de maíz imbibidos a diferentes tiempos (0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas) se realizaron extracciones de ARN total que se estudió con ADNc heterólogo de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, lográndose caracterizar el inicio de la expresión de estos genes.

Mientras que para H<sub>1</sub> dicho inicio se observa a las 12 horas después de iniciada la imbibición, para el caso de H<sub>2</sub> aparentemente ocurrió hasta las 36 horas. Estos resultados podrían interpretarse asumiendo que no existe una coincidencia a nivel de la expresión de estos dos genes. Sin embargo, la literatura indica que al menos entre los dímeros de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> en maíz, trigo o arroz durante los estados iniciales de la germinación existe una expresión simultánea de ellos (Gigot, 1988; Chaubet et al., 1991; Lepetit et al., 1992; Koning et al., 1992). Una interpretación más realista de estos resultados debe de tomar en cuenta el hecho de que los experimentos para observar la cinética de expresión de H<sub>1</sub> fueron realizados con ARN extraído de material biológico que posteriormente se demostró que tenía un bajo vigor lo cual puede ocasionar que los eventos moleculares durante la germinación se vean retrasados y la expresión de los genes de histonas se vea consecuentemente afectada. Por el contrario, los resultados obtenidos para la expresión de H<sub>2</sub> se obtuvieron a partir de un lote de semillas nuevas con alta viabilidad y vigor. En este sentido, podríamos predecir que al realizar experimentos de este tipo a partir de un lote de semillas vigorosas (con alta viabilidad) lo más probable es que se encontrará una coorrelación en la expresión de ambos genes a las 12 horas de iniciada la imbibición.



Marcus, 1975; Ruderman y Pardue, 1977; Sung y Dixon, 1970; Candido y Dixon, 1972).

Por el contrario, en el embrión vegetal la activación de la división celular no se presenta simultáneamente en todas las células, sino que se ha encontrado la existencia de un orden progresivo de iniciación y/o activación. Los resultados de Baiza et al., (1986, 1989) demuestran que las primeras mitosis aparecen en células de mesocotilo de embriones de maíz a las 12 horas de haberse iniciado la imbibición, seguidas en algunas células del nudo escutelar a las 16-18 horas y finalmente en células de raíz seminal a las 18 horas, lo que podría contribuir a que la expresión de los genes de las histonas se verifique de manera no simultánea a la síntesis de ADN. Además, se han observado picos de síntesis de histonas desde las 6 horas de iniciada la imbibición y llega a mantenerse constante a partir de las 12 horas hasta que se inicia la protusión de la radícula.

La formación de nuevas proteínas histonas parece ser un requisito para que se dé la replicación del ADN y la división celular. Sin embargo estos dos últimos eventos son posteriores a la elongación celular, puesto que se ha observado que durante la germinación de ejes embrionarios de maíz dicho fenómeno (elongación celular) es un evento temprano que ocurre sin que se manifieste la división celular (Baiza et al., 1986), aún cuando algunas figuras mitóticas (en unas pocas células de la raíz y brote) pueden ser detectadas en los tejidos meristemáticos al tiempo (28 horas) en el que más del 50% de las semillas han germinado. Lo anterior indica que el papel de la duplicación del ADN y los eventos previos a este, tales como la síntesis de histonas, podría contribuir a que los tejidos meristemáticos participaran eficientemente en la germinación vía protusión de radícula para iniciar la formación de una planta completa (este trabajo; Baiza et al., 1989; Zlatanova et al., 1988; Zlatanova e Ivanov, 1988; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Zlatanova et al., 1987).

Por otra parte, las observaciones de Baiza et al., (1986, 1989) y las de Zlatanova et al., (1987, 1988) apoyan la existencia de la síntesis de las histonas como un evento temprano y previo a la del ADN nuclear e incluso a la replicación de tipo reparativo y organelar en embriones secos de maíz (Zarain et al., 1986; Zlatanova et al., 1987). Estas evidencias indican que la existencia temprana de las proteínas de las histonas a las 6 horas de iniciada la imbibición en contraste con la presencia de la síntesis de ADN nuclear hasta las 15 horas, podría interpretarse como un mecanismo utilizado por la célula vegetal para reorganizar al genoma (Baiza y Sánchez de Jiménez, 1989). La multiplicación celular parecería ocurrir en fases tardías de la germinación, por lo que la síntesis replicativa del ADN nuclear se observa en

de H<sub>1</sub>. Los resultados que obtuvimos indican que a las 27 horas de haberse imbibido los embriones de maiz en presencia de este fitoregulador la señal de hibridación es más fuerte en los embriones tratados que en los controles. Sin embargo, habrá que caracterizar los tiempos anteriores a 27 horas para verificar el efecto de la bencil-adenina sobre la transcripción de los genes de las histonas, dado que este es un resultado preliminar.

Por lo que respecta a la organización de los genes de la histona H<sub>1</sub> en el genoma de maiz, los resultados obtenidos muestran la presencia de múltiples bandas de diferentes pesos moleculares, lo cual es una clara evidencia de que los genes de la histona H<sub>1</sub> se encuentran como elementos dispersos en el genoma. Lo anterior correlaciona con los resultados obtenidos por Tabata et al., (1983) en trigo; con los de Chaubet et al., (1989) en maiz y con otros vegetales donde se demuestra la presencia de los genes de las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> como elementos dispersos en el genoma y además formando familias multigénicas.

## C O N C L U S I O N E S

Bajo condiciones normales (semillas con alto vigor), la expresión del gen de la histona H<sub>3</sub> ocurre 12 horas después de iniciada la imbibición. Es posible que ocurra transcripción de dicho gen antes de las 12 horas dado que en este trabajo no se exploró ningún momento previo a este tiempo. Sin embargo, los datos aquí reportados, sugieren que en el embrión de maíz no parece haber ARNm de origen materno almacenado ya que no fue posible observar ninguna señal al tiempo 0. Se requiere del empleo de técnicas más sensibles tales como la de protección al ataque por Nucleasa S1 o PCR para estar absolutamente seguros de esta posibilidad.

De manera interesante, pudo observarse que cuando el vigor de la semilla está disminuido, algunos eventos moleculares relacionados con la germinación, tales como la expresión de los genes de las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>, se ven afectados. Concretamente, en ejes embrionarios de maíz con bajo vigor debido a un período prolongado de almacenamiento, el momento de inicio de la transcripción de los genes de las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> se retrasó hasta 36 horas después de iniciada la imbibición. Por otra parte, la adición de benciladenina, parece incrementar la expresión del gene de la histona H<sub>3</sub>.

Puesto que la expresión del gen de la histona H<sub>3</sub> parece ocurrir 12 horas después de iniciada la imbibición, mientras que la síntesis replicativa del ADN no se inicia sino hasta las 16 horas, podemos afirmar que durante la germinación la expresión de este gen no es simultánea a la síntesis del ADN.

Finalmente, el análisis del patrón de hibridación de la sonda del gen de la histona H<sub>3</sub> con el ADN de maíz indica que dicho gen se encuentra repetido y disperso en el genoma de este organismo.

## REFERENCIAS

- Adamson, E.D. and Woodland, H.R. (1974). Histone synthesis in early amphibian development: histone are not coordinated. *J. Mol. Biol.*, **88**: 263-85.
- Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E. (1984). Amino acid pools protein synthesis in germinating maize embryos. *Plant Cell Reports*, **3**: 193-95.
- Ahmed, C.M.I. and Padayatti, J.D. (1982). Identification of individual histone mRNA from rice embryos. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **19**: 160-66, citado por Gigot et al., 1987.
- Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A. and Cohen, L.H. (1974). Histones of *Drosophila* embryos. *J. Biol. Chem.*, **249**: 3729-34.
- Allfrey, V.G., Faulker, R. and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**: 786-94.
- Allegra, P., Sterner, R., Clayton, D.F. and Allfrey, V.G. (1987). Affinity chromatographic purification of nucleosomes containing transcriptionally active DNA sequences. *J. Mol. Biol.*, **196**: 379-88.
- Allis, C.D., Chicoine, L.G., Richman, R. and Schulman, I.G. (1985). Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating *Tetraymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 8048-52.
- Angerer, L.M., Deleon, D.V., Angerer, R.C., Showman, M.R., Wells, E.D. and Raff, A.R. (1984). Delayed accumulation of maternal histone mRNA during sea urchin oogenesis. *Dev. Biol.*, **101**: 477-84.
- Arceci, J.R. and Gross, R.P. (1977). Non coincidence of histone and DNA synthesis in cleavage cycles of early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 5016-20.
- Arrigo, A.P. (1983). Acetylation and methylation patterns of core histone are modified after heat or arsenite treatment of *Drosophila* tissue culture cells. *Nucleic Acid Res.*, **11**: 1394-1404.
- Artishevsky, A., Graftsky, A. and Lee, A.S. (1985). Isolation of a mammalian sequence capable of conferring cell cycle regulation to a heterologous gene. *Science*, **230**: 1061-63.
- Artishevsky, A., Wooden, S., Shatma, A., Resendez, Jr.E. and Lee, A.S. (1987). Cell-cycle regulation sequences in a hamster histone promoter and their interactions with cellular factors. *Nature*, **328**: 823-29.

Aspart, L., Meyer, Y., Laroche, M. and Penon, P. (1984). Developmental regulation of the synthesis of proteins encoded by stored mRNA in radish embryos. *Plant Physiol.*, **76**: 664-73.

Baer, B.W. and Rhodes, D. (1983). Eukaryotic RNA polymerase II binding to nucleosome core from transcribed genes. *Nature*, **301**: 482-88.

Bak, A.L., Bak, P. and Zeuthen, J. (1979a). Higher levels of organization in chromosomes. *J. Theor. Biol.*, **76**: 205-17.

Baiza, A.M., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E. (1986). Histones and the first cell cycle in maize germination. *Physiol. Plant*, **68**: 259-64.

Baiza, A.M., Vazquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA synthesis and cell division in embryogenic maize tissue during germination. *J. Plant Physiol.*, **135**: 416-21.

Bannon, G.A., Calzone, F.J., Bowen, J.K., Allis, C.D. and Gorovski, M.A. (1983). Multiple, independently regulated, polyadenylated messages for histone H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> in *Tetrahymena*. *Nucl. Acid Res.*, **11**: 3903-17.

Baumbach, L.L., Marachi, F., Plumb, M., Stein, G. and Stein, J. (1984). Inhibition of DNA replication coordinately reduces cellular levels of core and H<sub>1</sub> histone mRNA: requirement for protein synthesis. *Biochemistry*, **23**: 1618-25.

Baumbach, L.L., Stein, G.S. and Stein, J.L. (1987). Regulation of human histone gene expression: transcriptional and posttranscriptional control in the coupling of histone messenger RNA stability with DNA replication. *Biochemistry*, **26**: 6178-87.

Belozerskii, A.N. and Vryson, S.O. (1958). *Biokhimiya*, **23**: 532. Citado en Stein et al., (1984).

Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, K. and Chambon, P. (1980). The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucl. Acid Res.*, **8**: 127-42.

Bewley, J.D. (1979). Dormancy breaking by hormones and other chemicals-action at the molecular level. In: *The Plant Seed: Development, Preservation and Germination*, eds J. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach, Academic Press, New York.

Bewley, J.D. (1982). In: *Encyclopaedia of Physiology Vol.14A* (D. Boutler and B. Parthier, eds), Springer, Berlin, Heidelberg p.p. 559-591. Citado por Bewley y Black, 1986.

Bewley, J.D. (1986). In: *Physiology of Seed Deterioration* (Eds. M.B. Mc-Donald Jr. and C.J. Nelson), Crop Science Society of America Special

Publication, No. 11 pp. 27 Madison, Wisconsin. Citado por Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1989).

Bewley, J.D. and Black, M. (1978). In: *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination*. Ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg New York.

Bewley, J.D. and Black, M. (1983). In: *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination* (Springer, Berlin), vol.1.

Bewley, J.D. and Black, M. (1986). In: *Seeds: Physiology of Development and Germination*...

Bewley, J.D., Kermodé, A.R. and Misra, S. (1989). Deseccation and minimal drying treatment of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA synthesis. *Ann. Bot.*, 63: 3-17.

Bird, R.C., Jacobs, F.A., Stein, G., Stein, J. and Sells, B.H. (1985). A unique subspecies of histone H<sub>1</sub> mRNA from rat myoblasts contain poly(A). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 6760-64.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.*, 7(6): 1513-22.

Birnstiel, M., Busslinger, M. and Strub, K. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in the site. *Cell*, 41: 349-59.

Birnstiel, M., Telford, J., Weinberg, E. and Stafford, D. (1974). Isolation and some properties of the genes coding for histone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 2900-04.

Blankstein, L.A. and Levy, S.B. (1976). Changes in histone f2a2 associated with proliferation of friends Leukaemic cells. *Nature*, 260: 638-40.

Blumenfeld, M., Orf, J.W., Siná, B.J., Kreber, R.A., Callahan, M.A. and Snyders, L.A. (1977). Satellite DNA, H<sub>1</sub> histone and heterocromatin in *Drosophila virilis*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, 42: 273-76.

Bonner, J. (1979a). Properties and composition of isolated chromatin. In: *Nicoline C.A. (ed) Chromatin structure and function, Part A Plenum, New York* pp.3-13.

Bonner, J. (1979b). Properties and composition of isolated chromatin. In: *Nicoline C.A. (ed) Chromatin structure and function, Part A Plenum, New York* pp.15-23.

Borun, T.W., Scharff, M.D. and Robbins, E. (1967). Rapidly labeled polyribosome associated RNA having the properties of histone messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 58: 1977-83.

- Borun, T.W., Gabrielli, F., Ajiro, K., Zweidler, A. and Baglioni, C. (1975). Further evidence of transcriptional and translation control of histone messenger RNA during the HeLa S3 cycle. *Cell*, 4: 59-67.
- Boulikas, T., Wiseman, J.M. and Garrad, W.T. (1980). Points of contact between histone H<sub>1</sub> and the histone octamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 127-131.
- Bortwick, H.A. and Robbins, W.W. (1929). Lettuce seed and its germination. *Higardia*, 3: 275-304. Citado por Wilkins, 1989.
- Brachet, J. and Mirsky, E.A. (1961). In: *The Cell Biochemistry, Physiology and Morphology*. (Ed) vol. II Cell and Their components parts, Acad. Press, New York and London.
- Brandt, W., Rodrigues, J. and Von Holt, C. (1988). The aminoacid sequence of wheat histone H<sub>1</sub>b(2). A core histone with a novel repetitive N-terminal extension. *Eur. J. Biochem.*, 173: 547-54.
- Bradbury, E.M., Inglis, R.J., Matthews, H.R. and Sarner, N. (1973b). Phosphorylation of very lysine-rich histone in *Physarum polycephalum* correlation with chromosome condensation. *Eur. J. Biochem.*, 33: 131-39.
- Bradbury, E.M., Inglis, R.J. and Matthews, H.R. (1974). Control of division by very lysine-rich histone (H<sub>1</sub>) phosphorylation. *Nature*, 247: 257-61.
- Bray, C.M. and Smith, C.A.D. (1985). Stored polyadenylated RNA and loss of vigor in germination wheat embryos. *Plant Sci.*, 38: 71-79.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 50: 349-83.
- Breindl, M. and Gallwitz, D. (1974). On the translational control of histone synthesis. *Eur. J. Biochem.*, 45: 91-97.
- Bresnick, H.E., John, S. and Hager, L.G. (1991). Histone hyperacetylation does not alter the positioning or stability of phased nucleosomes on the mouse mammary tumor virus long terminal repeat. *Biochemistry*, 30: 3490-97.
- Brooker, J.D., Cheung, C.P. and Marcus, A. (1977). In: Khan A.A. (ed) *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*. Elsevier North Holland Biomedical Press pp.347-356.
- Brooker, J.D., Tomaszewski, M. and Marcus, A. (1978). Preformed messenger RNAs and early wheat embryos germination. *Plant Physiol.*, 61: 145-49.

Brush, D., Dodgson, J.B., Choi, O.R., Stevens, P.W. and Engel, J. D. (1985). Replacement variant histone genes contain intervening sequences. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1307-17.

Bryan, P.N., Olah, J. and Birnstiel, M.L. (1983). Major changes in the 5' and 3' chromatin structure of sea urchin histone gene accompany their activation and inactivation in development. *Cell*, 33: 843-48.

Busch, H. (ed). (1978). *The cell nucleus vol. IV y V: Chromatin.* Acad. Press London New York.

Busslinger, M., Portmann, R. and Birnstiel, M.L. (1979). A regulatory sequences near the 3' end of sea urchin histone genes. *Nucl. Acid Res.*, 6: 2997-3008.

Butler, W.B. and Mueller, G.C. (1973). Control of histone synthesis in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 294: 481-96.

Byrne, R.H., Stone, P.R. and Kindwell, W.R. (1978). Effect of polyamines and divalent cations on histone H<sub>1</sub>-poly(adenosine diphosphate-ribose) complex formation. *Exp. Cell Rep.*, 115: 277-83.

Byvoet, P., Baxter, C.S. and Sayre, D.F. (1978). Displacement and aberrant methylation in vitro of H<sub>1</sub> histone in rat liver nuclei after half-saturation of chromatin with polycations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 5773-77.

Caers, L.C., Peumans, M.J. and Carlier, A.R. (1979). Preformed and newly synthesized messenger RNA in germinating wheat embryos. *Planta*, 144: 491-96.

Callan, H.G. Klung, A (eds) (1978). *Structure of eukaryotic chromosomes and chromatin.* Philos Trans. R. Soc. Ser. Biol., 283: 231-416.

Camato, R. and Tanguay, R.M. (1982). *EMBO J.*, 1: 1529-32. Citado en Davie y Murphy (1990).

Candido, E.P.M. and Dixon, G.H. (1972). Trout testis cells. III. Acetylation of histones in different cell types from developing trout testis. *J. Biol. Chem.*, 247: 5506-10.

Capasso, O. and Heintz, N. (1985). Regulated expression of mammalian histone H<sub>4</sub> genes in vivo requires a trans-acting transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 5622-26.

Chaboute, M.E., Chaubet, N., Philipps, G., Ehling, M. and Gigot, C. (1987). Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H<sub>1</sub> and H<sub>4</sub> genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.*, 8: 179-91.



Chahal, S.S., Matthews, H.R. and Bradbury, E.M. (1980). Acetylation of histone H<sub>4</sub> and its role in chromatin structure and function. *Nature*, 287: 76-79.

Chalkley, R. and Shires, A. (1985). The isolation of HTC variant cells which can replicate in butyrate. *J. Biol. Chem.*, 260: 7698-7704.

Chambers, S.M.A. and Shaw, B.R. (1984). Levels of histone H<sub>4</sub> diacetylation decrease dramatically during sea urchin embryonic development and correlate with cell doubling rate. *J. Biol. Chem.*, 259: 13458-63.

Chapman, G.E., Hartman, P.G. and Bradbury, E.M. (1976). Studies on the role and mode of operation of the lysin-rich histone H<sub>4</sub> in eukaryotes chromatin. *Eur. J. Biochem.*, 61: 69-75.

Chaubet, N., Philipps, G., Chaboute, M.E., Ehling, M. and Gigot, C. (1986). Nucleotide sequences of two corn histone H<sub>4</sub> genes. Genomic organization of the corn histone H<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> genes. *Plant Mol. Biol.*, 6: 253-63.

Chaubet, N., Chaboute, M.E., Clement, B., Ehling, M., Philipps, G. and Gigot, C. (1988). The histone H<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> mRNAs are polyadenylated in maize. *Nucl. Acid Research*, 16: 1295-1304.

Chaubet, N., Philipps, G. and Gigot, C. (1989). Organization of the histone H<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> multigenic families in maize and in related genomes. *Mol. Gen. Genet.*, 219: 404-12.

Chaubet, N., Clement, B., Philipps, G. and Gigot, C. (1991). Organ-specific expression of developing and adult maize. *Plant Mol. Biol.*, 17: 935-40.

Chen, Chi-ching, Smith, L.D., Bruegger, B.B., Halpen, M.R. and Smith, A.R. (1974). Occurrence and distribution of acid-labeled histone phosphate in regenerating rat liver. *Biochemistry*, 13(18): 3785-89.

Chernyshev, A.I., Bashkirov, B.A., Leibovith, B.A. and Khesin, R.B. (1980). Increase in the number of histone genes in case of their deficiency in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genetic*, 178: 663-68.

Childs, G., Maxson, R. and Kedes, L.H. (1979). Histone gene expression during sea urchin embryogenesis: Isolation and characterization of early and late messenger RNAs of *Strongylocentrotus purpuratus* by gene specific hybridization and template activity. *Development Biology.*, 73: 153-73.

Childs, G., Nocente-McGrath, C., Lieber, T., Holt, C. and Knowles, J.A. (1982). Sea urchin (*L. pictus*) late-stage H<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> genes: characterization and mapping of a clustered but nontandemly linked multigene family. *Cell*, 31: 383-93.

Chojecki, J. (1986). Identification and characterization of a cDNA clone for histone H<sub>1</sub> in barley. *Calsberg Res. Com.*, **51**: 211-17. Citado por Chaubet et al., 1988.

Christensen, E.M., Rattner, J.B. and Dixon, G.H. (1984). Hyperacetylation of histone H<sub>1</sub> promoter chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acid Res.*, **12**: 4575-91.

Chrysogelos, S., Riley, E.D., Stein, G. and Stein, J. (1985). A human histone H<sub>1</sub> gene exhibits cell cycle-dependent changes in chromatin structure that correlate with its expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 7535-39.

Clewell, D.B. and Helinski, D.R. (1969). Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**: 1159.

Cohn, R.H., Lowry, J.C. and Kedes, H.L. (1976). Histone genes of the sea urchin *S. purpuratus* cloned in *E. coli*: Order, polarity and strendedness of the five histone-coding and spacer regions. *Cell*, **9**: 147-61.

Cohn, R.H. and Kedes, L.H. (1979). Nonallelic histone gene clusters of individual sea urchins (*Lytechinus pictus*): Mapping of homologies incoding a spacer DNA. *Cell*, **18**: 855-64.

Cohn, R.H. and Kedes, L.H. (1979a). Nonallelic histone gene clusters of individual sea urchins (*Lytechinus pictus*): Polarity and gene organization. *Cell*, **18**: 865-74.

Cohen, L.H., Newrock, K.M. and Zweidler, A. (1975). Stage-specific switches in histone synthesis during embryogenesis of the sea urchin. *Science*, **190**: 994.

Cole, R.D. (1977). Special features of the structure of H<sub>1</sub> histones. In: Ts'o POP (Ed) *The molecular biology of mammalian genetic apparatus*. North-Holland, Amsterdam, pp. 91-104.

Cole, R.D. (1984). A minireview of microheterogeneity in H<sub>1</sub> histone and its possible significance. *Anal. Biochem.*, **136**: 24-36.

Collard, D., Ramsey-Ewing, A., Bortell, R., Lian, J., Stein, J. and Stein, G. (1991). Isolation and characterization of a cDNA from a human histone H<sub>2B</sub> gene which is reciprocally expressed in relation to replication-dependent H<sub>2B</sub> gene during HL60 cell differentiation. *Biochemistry*, **30**: 1610-17.

Comai, L. and Harada, J. (1990). Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **87**: 2671-74.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol. **42**: Chromatin (1977).

Compton, J.L., Bellard, M. and Chambon, P. (1976). Biochemical evidences of the variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**: 4382-86.

Cotten, M. and Chalkley, R. (1985). Hyperacetylated histones facilitate chromatin assembly in vitro. Nucleic Acid Res., **13**: 401-14.

Coupez, M., Martin-Ponthieu, A. and Sautiere, P. (1987). Histone H<sub>4</sub> from cuttlefish testis sequentially acetylated. J. Biol. Chem., **262**: 2854-60.

Cousens, L.S. and Alberts, B.M. (1982). Accessibility of newly synthesized chromatin to histone acetylase. J. Biol. Chem., **257**: 3945-49.

Crampton, C.F., Moore, S. and Stein, W.H. (1955). Chromatographic fractionation of calf thymus histone. J. Biol. Chem., **215**: 787-801.

Crawford, R.J., Krieg, P., Harvey, R.P., Hewish, D.A. and Wells, J.R.E. (1979). Histone genes are clustered with a 15-kilobase repeat in the chicken genome. Nature, **279**: 132-37.

Crouch, M.L. (1987). In: Developmental Biology: A comprehensive synthesis. (ed) Browder, L.W. (Plenum, New York) vol. 5 pp 367-404.

Csordas, A. (1990). On the biological role of histone acetylation. Biochem. J., **265**: 23-38.

Dagerts, M. and Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene, **6**: 23.

Dailey, L., Manly, M.S., Roeder, G.R. and Heintz, N. (1986). Distinct transcription factors bind specifically to two regions of the human histone H<sub>4</sub> promoter. Proc. Natl. Acad. Sci., **83**: 7241-45.

Dailey, L., Roberts, S.B. and Heintz, N. (1988). Purification of the human histone H<sub>4</sub> gene-specific transcription factors H<sub>4</sub>TF-1 and H<sub>4</sub>TF-2. Genes Dev., **2**: 1700-1712.

Daly, M.M., Mirsky, A.E. and Ris, H. (1951). The amino acid composition and some properties of histones. J. Gen. Physiol., **34**: 439.

Dalton, S. and Wells, J.R.E. (1988). Maximal binding levels of an H<sub>4</sub> histone gene-specific factor S-phase correlate with maximal H<sub>4</sub> gene transcription. Mol. Cel. Biol., **8**: 4576-78.

D'Andrea, J.R., Coles, S.L., Lesnikowski, C., Tabe, L. and Wells, J.R.E. (1985). Chromosomal organization of chicken histone genes: Preferred association and inverted duplications. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 3108-15.

D'Anna, J.A.Jr., Gurley, L.R. and Tobey, R.A. (1982). Synthesis and modulations in the chromatin contents of histone H<sub>4</sub> and H<sub>1</sub> during G<sub>1</sub> and S phases in chinese hamster cells. *Biochemistry*, **21**: 3991-4001.

Darnell, J.E.Jr. (1982). Variety in the levels of gene control in eukaryotic cells. *Nature*, **297**: 365-71.

Darnell, J.E.Jr. and Doolittle, W.F. (1986) Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 1271.

Datta, K., Marsch, L. and Marcus, A. (1983). Early growth of wheat embryonic axes and synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol.*, **72**: 394-97.

Davison, P.F. and Butler, J.A.V. (1954). The fractionation and composition of histone from thymus nucleoprotein. *Biochim et Biophys Acta*, **15**: 439.

DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. and Bonner, J. (1969a). Calf and Pea histone IV. II. The complete aminoacid sequence of calf thymus histone IV ; presence of  $\epsilon$  N-acetyllysine. *J. Biol. Chem.*, **244**: 319-34.

Delseny, R., Aspart, L. and Cooke (1981). Studies on ribonucleic acid during radish seed germinating: A search for potential regulatory mechanism. *Israel J. Bot.*, **29**: 246-58.

Deltour, R. (1985). Nuclear activation during early germinating of the higher plant embryo. *J. Cell Sci.*, **75**: 43-48.

Desrosiers, R. and Tanguay, R.M. (1985). The modifications in methylation patterns of H<sub>3</sub>B and H<sub>4</sub> after heat shock can be correlated with the inactivation of normal gene expression. *Biochem Biophys Res. Com.*, **133**: 823-29.

Detke, S., Lichtler, A., Phillips, I., Stein, J. and Stein, G. (1979) Reassessment of histone gene expression during cell cycle in human cells by using homologous H<sub>4</sub> histone DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 4995-99.

Doenecke, D. and Gallwitz, D (1982). *Mol. Cell. Biochem.*, **44**: 13. Citado en Reeves, (1984).

Dommes, J. and Van de Walle, C (1983). Newly synthesized mRNA is translated during the initial imbibition phase of germinating maize embryo. *Plant Physiol.*, **73**: 484.

Domoney, C. and Casey, R. (1985). Measurement of gene number for seed storage proteins in *Pisum*. *Nucl. Acids Res.*, **13**: 687-99.

Donahue, P.R., Palmer, D.K., Condie, J.M., Sabatini, L.M. and Blumenfeld, M. (1986). *Drosophyla* histone H<sub>2</sub>A.2 is associated with the interbands of polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 4744-48.

Douvas, A., Harrington, C.A. and Bonner, J. (1975). Major nonhistone protein of rat liver chromatin: preliminary identification of myosin, actin, tubulin and tropomyosin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72: 3902-06.

Dure, L. (1985). Embryogenesis and gene expression during seed formation. Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol., 2: 179-97.

Edwards, M.M. (1969). Dormancy in seed of Charlock. IV Interrelationships of growth oxygen supply and concentration of inhibitor. J. Exp. Bot., 20: 876.

Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Forget, B.G., Weissman, S.M., Slighton, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. and Proudfoot, N.J. (1980). The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. Cell, 21: 653-668.

Elgin, S.C.R. and Bonner, J. (1970). Limited heterogeneity of the major nonhistone chromosomal proteins. Biochemistry, 9: 4440-47.

Elgin, S.C.R. and Weintraub, H. (1975). Chromosomal protein and chromatin structure. Annu Rev. Biochem., 44: 725-74.

Elton, T.S. and Reeves, R. (1986). Purification and postsynthetic modification of friend erythroleukemic cell high mobility group protein HMG-1. Exp. Cell Res., 167: 127-34.

Engel, J.D. and Dodgson, J.B. (1981). Histone gene are clustered but not tandemly repeated in the chicken genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 2856-60.

Engel, J.D., Sugarman, B. and Dodgson, J.B. (1982). A chicken histone H<sub>2</sub> gene contains intervening sequences. Nature, 297: 434-36.

Ernst, S.G., Miller, H., Brenner, C.A., Nocente-McGrant, C., Francis, S. and McIssac, R. (1987). Characterization of a cDNA clone coding for a sea urchin histone H<sub>2</sub>A variant related to the H<sub>2</sub>A.F/2 histone protein in vertebrates. Nucleic Acid Res., 15: 4629-44.

Everani, M., Neuman, G. and Stan, G. (1957). Nature, 100: 609. citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.

Fahn, A. (1982) Plant Anatomy, 3rd. ed. Pergamon Press, Oxford.

Fahrner, K., Yarger, J. and Hereford, L. (1980). Yeast histone mRNA is polyadenylated. Nucleic Acid Res., 8: 5725-38.

- Fellenberg, G. (1974) Chromosomal proteine. Ulmer, Stutgard, Alemania.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, **132**: 6-13.
- Finch, J.T. and Klug, A. (1976). A Selenoidal model superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**: 1897-1901.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M. and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particle of chromatin. *Nature*, **269**: 29-36.
- Felsenfeld, G. (1978). Chromatin. *Nature*, **271**: 115-22.
- Fitzgerald, M. and Shenk, I. (1981). The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of Late SV-40 mRNAs. *Cell*, **24**: 251-60.
- Fletcher, C., Heintz, N. and Roeder, R.G. (1987). RNA polymerase II transcription factors H<sub>1</sub>TF-1 and H<sub>1</sub>TF-2 require metal to bind specific DNA sequences. *Mol. Cel. Biol.*, **7**: 4582-84.
- Foe, J.E., Wilkinson, L.E. and Laird, C.D. (1976). Comparative organization of active transcription units in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell* **9**: 131-46.
- Franklin, S.G. and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, and 3 in mammals. *Nature*, **266**: 273.
- Fukuei, K., Yakura, K. and Tanifuji, S. (1978). Non-coordinated histone synthesis with DNA replication and close temporal association of ribosomal proteins and rRNA synthesis in germinating *Vicia faba* embryos. *Biochim. Biophys Acta*, **510**: 390-400.
- Gabrielli, F. and Baglioni, C. (1975). Maternal messenger RNA and histone synthesis in embryos of the surf clam *Spisula solidissima*. *Devel. Biol.*, **43**: 254-63
- Galli, M.G., Levi, M. and Sparvoli, E. (1991) Lack of correlation between overall protein synthesis and the onset of cell elongation in germinating embryos of *Haplopappus gracillis*. *Physiol. Plant.*, **51**: 321-25.
- Gallinari, P., LaBella, F. and Heintz, N (1989). Characterization and purification of H1TF2, a novel CCAAT-binding protein that interacts with a histone H<sub>1</sub> subtype-specific consensus element. *Mol. Cel. Biol.*, **9**: 1562-75.
- Gallwitz, D. and Muller, G. C. (1969a). Histone synthesis *in vitro* by cytoplasmic microsomes from HeLa cells. *Science*, **163**:1351-53.

Gallwitz, D. and Muller, G.C. (1969b). Histone synthesis *in vitro* on HeLa cell microsomes. *J. Biol. Chem.*, **244**: 5947-52.

Gantt, J.J. and Key, J.L. (1987). Molecular cloning of a pea H<sub>1</sub> histone cDNA. *Eur. J. Biochem.*, **166**:119-25.

Germond, J.E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975). Folding the DNA double helix in chromatin-like structure from simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**: 1843-47.

Germond, J.E., Rouviere-Yaniv, Yaniv, M. and Brutlay, D. (1979). Nicking closing enzyme assembles nucleosome-like structure *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 37779-83.

Giancotti, V., Russo, E., Cristini, F., Graziosi, G., Micali, F. and Crane-Robinson (1984). Histone modification in early and late *Drosophila* embryos. *Biochem. J.*, **218**: 321-29.

Gigot, C., Chaubet, N., Chaboute, M.E., Ehling, M. and Phillip's, G. (1987). Nucleotide sequences of two histone H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> gene of corn. Further insight into the structure and organization of the histone gene in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **25**: 235-47.

Gigot, C. (1988). Histone gene in higher plants. In: Kahl, G. (ed) *Architecture of eukaryotic genes*. V.C.H. Verlagsge Sellschaft, Weinheim.

Gilkin, G.C., Roberti, I. and Worcel, A. (1984). Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: *in vitro* studies. *Cell*, **37**: 33-41.

Giri, C.P., West, M.H.P. and Smulson, M.E. (1978a). Nuclear protein modification and chromatin substructure. I. Differential poly(adenosine diphosphate) ribosylation of chromosomal protein in nuclei versus isolated nucleosome. *Biochemistry*, **17**: 3495-3500.

Goldberg, M.L. (1979). Ph.D. Thesis. Stanford Univ., Palo Alto Cal. Citado en Kedes, 1979.

Goldberg, D.A. (1980). Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 5794.

Goldberg, R.B., Hoschek, G., Ditta, G.S. and Breidnbach, R.W. (1981a). Developmental regulation of cloned superabundant embryos mRNA in soybean. *Develop. Biol.*, **83**: 218-31. Citado en Dennis y Turpin, 1990.

Goldberg, R.B. (1986). Regulation of plant gene expression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **314**, 343-53. Citado por Dennis y Turpin, 1990.

Goldberg, R.B., Baker, S.J., Perez-Gran, L. (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, **56**: 149-160.

Goldknopf, I.L., Wilson, G., Ballal, N.R. and Busch, H. (1980). Chromatin conjugate protein A24 is cleaved and ubiquitin is lost during chicken erythropoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 255: 10555-58.

Grandy, D.K., Engel, J.D. and Dodgson, J.B. (1982). Complete nucleotide sequence of chicken H<sub>2</sub>B histone gene. J. Biol. Chem., 257: 8577-80.

Graves, A.R., Marzluff, F.W., Giebelhaus, H.D. and Schultz, A.G. (1985a). Quantitative and qualitative changes in histone gene expression during early mouse embryos development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 5685-89.

Griffith, J.D. and Christensen, G. (1977). The multifunctional role of histone H<sub>1</sub> probed with the SV-40 minichromosome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 215-26.

Gross, R.W., Schaffner, W., Telford, J. and Birnstiel, M. (1976). Molecular analysis of the histone cluster of *P. miliaris*: III polarity and asymmetry of the histone coding sequences. Cell, 8: 479-84.

Groudine, M., Peretz, M. and Weintraub, H. (1981). Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. Mol. Cell Biol., 1: 281-88.

Grunstein, M. (1990). Histone function in transcription. Annu. Rev. Cell. Biol., 6: 643-78.

Grunstein, M. and Grunstein, J. (1977). The histone H<sub>1</sub> gene of *Strongylocentrotus purpuratus*: DNA and mRNA sequences at the 5' end. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 1083-92.

Grunstein, M., Diamonad, K.E., Knoppel, E. and Grunstein, J.E. (1981). Comparison of the early histone H<sub>1</sub> gene sequence of *Strongylocentrotus purpuratus* with maternal, early and late histone H<sub>1</sub> mRNA sequences. Biochemistry, 20: 1216-23.

Gulick, p. and Dvorak, J. (1987). Gene induction and repression by salt treatment in roots of the salinity-sensitive chinese spring wheat and the salinity tolerant chinese spring *Elytrigia elongata* amphiploid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84:99-103.

Gurley, L.R., Walters, R.A. and Tobey, R.A. (1974). Cell cycle specific changes in histone phosphorylation associated with cell proliferation and chromosome condensation. J.Cell. Biol., 60: 356-64.

Gurley, L.R., D'Anna, A.J., Barham, S.S., Deaven, L.L. and Tobey, A.R. (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in chinese hamsters cells. Eur. J. Biochem., 84: 1-15.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 166: 557-80.



Hanly, S.M., Bleeker, G.C. and Heintz, N. (1985). Identification of promoter elements necessary for transcriptional regulation of a human H<sub>2</sub> gene in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 4582.

Hanly, S.M. (1989). Ph.D. thesis. Rockefeller University. Cited in Heintz (1991).

Harada, J.J., Dietrich, R.A., Comai, L. and Baden, C.S. (1988). In: *Plant gene research, temporal and spatial regulation of plant genes*. eds. Verma, D.P.S. and Golberg, R.B. (Springer, Vienna) vol. 5 pp 27-39.

Harvey, R.P., Whiting, J.A., Coles, L.S., Krieg, P.A. and Wells, J.R.E. (1981). Non tandem arrangement and divergent transcription of chicken histone genes. *Nature*, 294: 49-53.

Harvey, R.P., Whiting, J.A., Coles, L.S., Krieg, P.A. and Wells, J.R.E. (1983). H<sub>2</sub>A F<sub>1</sub> and extremely variant histone H<sub>2</sub>A sequence expressed in chicken embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 2819-23.

Hatch, C.L. and Bonner, W.M. (1988). Sequences of cDNA for mammalian H<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, an evolutionarily diverged but highly conserved basal histone H<sub>2</sub>A isoprotein species. *Nucleic Acid Res.*, 16: 1113-24.

Hebbes, T.R., Thorne, A.W. and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.*, 7: 1395-1402.

Hendzel, M.J. and Davie, J.R. (1989). Distribution of methylated histones and histone methyltransferases in chicken erythrocyte chromatin. *J. Biol. Chem.*, 264: 19208-214.

Hendzel, M.J. and Davie, J.R. (1990). Nucleosomal histone of transcriptionally active-compitent chromatin preferentially exchange with newly synthesised histone in quiescent chicken erythrocytes. *Biochem. J.*, 271: 67-73.

Heintz, N., Zernik, M. and Roeder, G.R. (1981). The structure of the human histone genes: clustered but not tandemly repeated. *Cell*, 24: 661-68.

Heintz, N. (1991). The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088:327-39.

Heintz, N., Sive, H.L. and Roeder, R.G. (1983). *Mol. Cell. Biol.* 3: 539-50. Cited in Heintz, 1991.

Heintz, N. and Roeder, R.G. (1984). Transcription of human histone genes in extracts from synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 2713-17.

- Hentschel, C.C. and Birnstiel, L.H. (1981). The organization and expression of histone gene families. *Cell*, **25**: 301-13.
- Hentschel, C.C., Irminger, J.C., Bucher, P. and Birnstiel, M.L. (1980). Sea urchin histone mRNA termini are located in gene regions downstream from putative regulatory sequence. *Nature*, **285**: 147-51.
- Hereford, L.M., Fahrner, K., Woolford, J.Jr., Rosbash, M., Kabacki, D.B. (1979). Isolation of yeast histone genes H<sub>2</sub>A and H<sub>2</sub>B. *Cell*, **18**: 1261-71.
- Hereford, L.M., Bromley, S.B. and Osley, M.A. (1982). Periodic transcription of yeast histone genes. *Cell*, **30**: 305-10.
- Hereford, L.M., Osley, M.A., Ludwig, J.R. and McLaughlin, C.S. (1981). Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell*, **24**: 367-75.
- Hirose, M., Sarvi, K. and Sunagawa, A. (1985). Correlation between nuclear histone acetylation and casein messenger RNA induction in the mammary gland. *J. Biochemistry*, **97**: 781-89.
- Hohmann, P. (1978). The H<sub>1</sub> class of histone and diversity in chromosomal structure. In: *Subcellular biochemistry* (D.B. Roodyn, ed. vol. 5 pp 87-127) Plenu, New York.
- Holmes, D.S., Cohn, R.H., Kedes, H.L. and Davidson, N. (1977). Position of sea urchin (*S. purpuratus*) histone genes relative to restriction endonuclease site on the chimeric plasmids pSp2 and pSp17. *Biochemistry*, **16**: 1504-12.
- Holthuis, J., Owen, T.A., VanWijnen, A.J., Wright, K.L., Ramsey-Ewing, A., Kennedy, M.B., Carter, R., Cosenza, S.C., Soprano, K.L., Lian, J.B., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1990). Tumor cells exhibit deregulation of the cell cycle histone gene promoter factor H1NF-D. *Science*, **247**: 1454-57.
- Hood, L., Campbell, J.H. and Elgin, S.C.R. (1975). The organization, expression and evolution of antibody genes and other multigene families. *Annu. Rev. Genet.*, **9**: 305-53.
- Honda, B.M., Candido, E.P.M. and Dixon, G.H. (1975). Histone methylation. *J. Biol. Chem.*, **250**: 8686-89.
- Hughes, D.W. and Galau, G.A. (1989). Temporally modular gene expression during cotyledone development. *Genes Dev.*, **3**: 358-69.
- Hurley, K.C. and Stout, T.J. (1980). Maize histone H<sub>1</sub>: A partial structural characterization. *Biochemistry*, **19**: 410-16.
- Hurst, H.C. and Jones, N.C. (1987). Identification of factors that interact with the E1A-inducible adenovirus E3 promoter. *Gen Dev.*, **1**: 1132-46.

Hwang, I., Lim, K. and Chae, C.H. (1990). Characterization of the S-phase-specific transcription regulatory elements in a DNA replication-independent testis-specific H<sub>2</sub>B (TH2B) histone gene. *Mol. Cell Biol.*, 10: 585-92.

Isenberg, I. (1979). Histones. *Annu Rev. Biochem.*, 48:159-91.

Ish-Horowitz, D. and Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Res.*, 9: 2989.

Ito, M., Sharma, A., Lee, A.S and Maxson, R. (1989). Cell cycle regulation of H<sub>2</sub>B histone octamer DNA-binding activity in chinese hamster lung fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, 9: 869-73.

Ivanchenko, M., Georgieva, E., Uschewa, A. and Avramova, Z. (1987). A study on the heterogeneity of histone H<sub>1</sub> from dry maize embryos. *Eur. J. Biochem.*, 162: 339-44.

Iwai, K., Ishikawa, K. and Hayashi, H. (1970). Amino-acid sequence of slightly lysine-rich histone. *Nature*, 226: 1056-58.

Jacobs-Lorena, M., Gabrielli, F., Borun, T.W. and Baglioni, C. (1973). Studies on the translational control of histone synthesis. I. Transition of histone messenger RNA by heterologous cell-free systems prepared from cells inactive in DNA synthesis. *Biochem. Biophys Acta*, 324: 275-81.

Jendrisak, J. (1980). The use of  $\alpha$ -amanitin to inhibit *in vivo* RNA synthesis and germination in wheat embryos. *J. Biol. Chem.*, 255: 8529-33.

Johnson, P. H. and Grossman, L.I. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry*, 16: 4217.

Johnson, E.M., Littau, U.C., Allfrey, V.G., Bradbury, E.M. and Matteus, H.R. (1976). The subunit structure of chromatin from *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acid Res.*, 3: 3313-29.

Johnson, E.M., Sterner, R. and Allfrey, V.G. (1987). Altered nucleosomes of active nucleolar chromatin contain accessible histone H<sub>1</sub> in its hyperacetylated forms. *J. Biol. Chem.*, 262: 6943-46.

Kato, A., Fukuei, K. and Tanifuji, S. (1982). Histone synthesis during the early stages of germination *Vicia faba* embryonic axes. *Plant Cell Physiol.*, 23: 967-976.

Kedes, L.H. and Gross, P. (1969). Synthesis and function of messenger RNA during early embryonic development. *J. Mol. Biol.*, 42: 559-75.

Kedes, L.H. and Gross, P.C. (1969a). Identification in cleaving embryos of the RNA species serving as templates for the synthesis of nuclear proteins. *Nature*, 223: 1335-39.

Kedes, H. L. and Birnstiel, M.L. (1971). Reiteration and clustering of DNA sequences complementary to histone messengers RNA's. *Nature New Biol.*, **230**: 165-69.

Kedes, L.H., Chang, A.C.Y., Houseman, D. and Cohen, S.N. (1975). Isolation of histone gene from unfractionated sea urchin DNA by subculture cloning in *E. coli*. *Nature*, **225**: 533-38.

Kedes, L.H. (1976). Histone messenger and histone genes. *Cell*, **8**: 321-31.

Kedes, H.L (1979). Histone genes and histone messengers. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**: 837-70.

Kemler, I. and Busslinger, M. (1986). Characterization of two nonallelic pairs of late histone H<sub>4</sub>A and H<sub>4</sub>B gene of the sea urchin: Differential regulation in the embryo and tissue-specific expression in the adult. *Mol. Cel. Biol.*, **6**: 3746-54.

Kennedy, R.A., Barrett, S.C.H., Vander-Zee, D. and Rumpho, M.E. (1980). Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* ( barnyard grass). *Plant Cell Environ.*, **3**: 243-48.

Kermode, A.R. and Bewley, J.D. (1986). The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. *J. Exp. Bot.*, **37**: 1887.

Kermode, A.R., Bewley, J.D., Dasgupta, J. and Misra, S. (1986). *Hort Science*, **21**: 1113. Citado en Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989.

Khan, A.A. (1960). An analysis of dark-osmotic inhibition of germination of lettuce seed. *Plant Physiol.*, **35**: 1-7.

Khan, A.A. (1982). In: *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*. A.A. Khan ed. (c) Elsever Biomedical, Press.

King, M.W. and Roberts, E.H. (1979). The storage of recalcitrant seeds. Report for the international boarel for genetic resources secretariat, Rome, pp 96; citado por Bewley y Black, 1986.

Kinzel, W. (1926). *Frost und Licht, Neve, Tabellen*. Eugen Ulmer, Stuttgart; citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.

Kleinsmith, L.J., Allfrey, J.G. and Mirsky, A.E. (1966a). Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**:1182-89.

Kleinsmith, L.J., Allfrey, J.G. and Mirsky, A.E. (1966b). Phosphorylation of nuclear protein early course of gene activation in lymphocytes. *Science*, **154**: 780-81.

Kolodrubetz, D.R., Kowski, M.A. and Grunstein, M. (1982). Histone H<sub>4</sub>A subtypes associate interchangeably *in vivo* with histone H<sub>4</sub>B subtypes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 7814-18.

Koning, A.J., Tanimoto, E.Y., Kiehne, K., Rost, T. and Comai, L. (1991). Cell-specific expression of plant histone H<sub>4</sub>A genes. Plant Cell, 3:657-65.

Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA. Science, 184: 868-71.

Kornberg, R.D. and Klug, A. (1981). The nucleosome. Sci. Amer., 244(2):52-64.

Kossel, A. (1884) Z. Physiol. Chem., 8:511. Citado por Brachet y Mirsky, 1961.

Kossel, A (1928) The protamines and histones. Longman, Green, London.

Krieg, P.A., Robins, A.J., D'Andrea, R. and Wells, J.R.E. (1983). The chicken H<sub>4</sub> gene is unlinked to core and H<sub>1</sub> histone genes. Nucleic Acid Res., 11: 619-27.

Krieg, P., Amtmann, E. and Sauer, G. (1983a). The simultaneous extraction of high-molecular-weight DNA and RNA from solid tumors. Analytical Biochem., 134: 288-294.

Kroeger, P., Steward, C.S., Chaap, T., VanWijnen, A., Hirshman, J., Helms, S., Stein, G. and Stein, J. (1987). Proximal and distal regulatory elements that influence *in vivo* expression of cycle-dependent human H<sub>4</sub> histone gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 3982-86.

LaBella, F., Sive, H.L., Roeder, R.G. and Heintz, N. (1989). Genes Dev., 2:32. Citado en Heintz 1991 y en Osley, 1991.

Lacorre-Arescaldino, I., Wilhelm, L.M., Wilhelm, X.F. and Toublan, B. (1989). Levels of histone H<sub>4</sub> mRNA during spherulation and germination of *Physarum polycephalum*. Exp. Mycology, 13:105-08.

Lane, B.G. and Tumaitis-Kennedy, T.D. (1981). Comparative study of levels of secondary processing in bulk mRNA from dry and germination wheat embryos. Eur. J. Biochem., 114: 457-63.

Langan, T.A. (1971). Cyclic AMP and histone phosphorylation. Ann. New. Y. Acad. Sci., 185:166-80.

Langan, T.A. (1978). Methods for the assessment of site-specific histone phosphorylation. In: Methods Cell Biol., 19: 127-42.

Langmore, J.P. and Woodley, J.C. (1975). Chromatin architecture: Investigation of subunits of chromatin by dark-field electron microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72: 2691.

Laskey, R.A., Mills, A.D. and Finch, J.D. (1977). Assembly of SV-40 chromatin in a cell-free systems from *Xenopus* eggs. Cell, 10: 237-43.

Law, D.J., Frossard, P.M. and Rucknagel, D.L. (1984). Highly sensitive and rapid gene mapping using miniaturized blot hybridization: application to prenatal diagnosis. Gene, 28: 153.

Lee, K.A.W., Hai, T-Y., Siva-Roman, L., Thimmappaya, B., Hurst, H.C., Jones, N.C. and Green, M.R. (1987). A cellular protein activating transcription factor activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 8355-59.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L and Cox, M.M. (1993). Principles of Biochemistry. Second Edition, Worth Publishers, Inc. New York.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry, 16: 4743.

Lepetit, M., Ehling, M., Chaubet, N. and Gigot, C. (1992). A plant histone gene promoter can direct both replication-dependent and independent gen expression in transgenic plant. Mol. Gen. Genet., 231: 276-85.

Levenson, R. and Marcus, K. (1976). On the existence of polyadenylated histone mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. Cell, 9: 311-22.

Levy, S., Sures, I. and Kedes, L.H. (1982). The nucleotide and amino acid coding sequence of a gene for H<sub>1</sub> histone that interacts with euchromatin. J. Biol. Chem., 257: 9438-43.

Li, H. J. and Eckhardt, R. A. (1977). Chromatin and chromosome structure. Acad. Press. London New York.

Lichtler, A.C., Stein, G.S. and Stein, J.L. (1977). Isolation and characterization of two mRNAs from HeLa S<sub>2</sub> cells coding for histone H<sub>1</sub>. Biochem Biophys Res. Com., 77: 845.

Lichtler, A.C., Detke, S., Phillips, I.R., Stein, G.S. and Stein, J.L. (1980). Multiple forms of H<sub>1</sub> histone mRNA in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 1942.

Lichtler, A.C., Sierra, F., Claik, S., Wells, E.J.R., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1982). Multiple H<sub>1</sub> histone mRNAs of HeLa cells are encoded in different genes. Nature, 298: 195-98.

- Lifton, R.P., Goldberg, M.L., Karp, R.W. and Hogness, D.S. (1977). The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: Function and evolutionary implication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 1047-51.
- Lillienfeld, L. (1894) Z. Physiol. Chem., 18: 473. Citado por Brachet y Mirsky, 1961.
- Liu, T.J., Levine, B.J., Skoultschi, A.I. and Marzluff, W.F. (1989). The efficiency of 3'-end formation contributes to the relative levels of different histone mRNAs. Mol. Cel. Biol., 9: 3499- 08.
- Lohr, D., Corden, J., Tatchell, K., Kovacic, R.T. and Van Holde, K. (1977). Comparative subunit structure of HeLa, yeast and chicken erythrocyte chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 79-83.
- Loidl, P., Loidl, a., Puschendorf, B. and Grobner, P. (1984). RNA polymerase activity and template activity of chromatin after butyrate induced hyperacetylation of histone in *Physarum*. Nucleic Acid Res., 12: 5405-17.
- Loidl, P. and Grobner, P. (1986). Biosynthesis and posttranscriptional acetylation of histone during spherulation of *Physarum polycephalum*. Nucleic Acid Res., 14: 3745-62.
- Loidl, P. and Grobner, P. (1987). Postsynthetic acetylation of histone during the cell cycle: a general function for the displacement of histone chromatin rearrangements. Nucleic Acid Res., 15: 8351-66.
- Loidl, P. (1988). Towards an understanding of the biological function of histone acetylation. Febs Lett., 227: 91-95.
- Lokning, V.L. (1968). Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. J.Mol. Biol., 38: 355.
- Louie, A.J. and Dixon, G.H. (1972). Synthesis, acetylation and phosphorylation of histone IV and its binding to DNA during spermatogenesis in trout. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69: 1975-79.
- Lund, T., Holtlund, J. and Laland, S.G. (1985). On the phosphorylation of low molecular mass HMG (high mobility group) proteins in ehrlich ascites cells. Febs Lett., 180: 275-79.
- Lyncan, D.E., Osley, M.A. and Hereford, L.M. (1987). Role transcriptional and postranscriptional regulation in expression of histone genes in *S. cerevisiae*. Mol.Cel.Biol., 7: 614-21.
- Macleod, A.R., Wong, N.C.W. and Dixon, G.H. (1977). The amino-acid sequence of trout-testis histone H<sub>1</sub>. Eur. J. Biochem., 78: 281-91.
- Mahershwari, P. (1950). An introduction to the embryogenesis of plant, vol.I: The plant Cell (ed. N.E. Tobert) Academic, Press, N.Y. citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Martin, C.D. and Northcote, (1981). Qualitative and quantitative changes in mRNA of castor beans during the initial stages of germination. *Planta*, **151**: 189-97.
- Martin, T., Billings, P., Levey, A., Ozarslan, S., Quinlan, T., Swift, H. and Urbas, L. 1973. Cited in Bostock and Summer, 1978.
- Masumori, M., Yamamoto, N. and Sasak, S. (1992). Stored mRNA in pine seeds: prolonged preservation in dry seed and disappearance during germination. *Plant Cell Physiol.*, **33**: 485-88.
- Matsumoto, Y.L, Yasuda, H., Mita, S., Marunouchi, T. and Yamada, M.A. (1980). Evidence for the involvement of H<sub>1</sub> histone phosphorylation in chromosome condensation. *Nature*, **284**: 181-83.
- Maxson, R., Cohn, R., Kedes, H.L. and Mohun, T. (1983). Expression and organization of histone genes. *Ann. Rev. Genet.*, **17**: 239-77.
- Maxson, R.E. and Wilt, H.F. (1982). Accumulation of the early histone messenger RNAs during the development of *S. purpuratus*. *Dev. Biol.*, **94**: 435-40.
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1989). In: The germination of seeds. 4<sup>th</sup> edition Ed. Pergamon Press. England.
- McGhee, J.D. and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**: 1115-56.
- Mcknight, G.S. and Palmiter, R.D. (1979). Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chicken oviduct. *J. Biol. Chem.*, **254**: 9050-58.
- Megee, P.C., Morgan, B.A., Mittman, B.A. and Smith, M.M. (1990). Genetic analysis of histone H<sub>1</sub>: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science*, **247**: 841.
- Meisler, M.H. and Langan, T.A. (1969). Characterization of a phosphatase specific for phosphorylated histone and protamines. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4961-68.
- Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, **138**: 267.
- Mertz, J.E. (1982). Linear DNA does not form chromatin containing regulatory spaced nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **2**: 1608-18.
- Mikami, K., Tabata, T., Kawata, T., Nakayama, T. and Iwabushi, M. (1987). Nuclear protein(s) binding to the conserved DNA hexameric sequence



postulated to regulate transcription of wheat histone gene. *Febs Lett.*, **223**: 273-78.

Mikami, K., Nakayama, T., Takefumi, T., Kawata, T., Tabata, T. and Iwabushi, M. (1989). Specific interaction of nuclear protein HBP-1 with the conserved hexameric sequence ACGTA in the regulatory region of wheat histone gene. *Plant Cell Physiol.*, **30**: 107-19.

Mirsky, A.E. and Pollister, A.W. (1942). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **28**: 344. Citado en Brachet y Mirsky, 1961.

Mirsky, A.E. and Pollister, A.W. (1946). *J. Gen. Physiol.*, **30**:117. Citado en Brachet y Mirsky, 1961.

Mirsra, S. and Bewley, J.D. (1985). The messenger RNA population in the embryonic axes of *Phaseolus vulgaris* during development and following germination *J. Exp. Bot.*, **36**:1644-52.

Mohum, T., Maxson, R.E., Germenzano, G. and Kedes, L.H. (1985). Differential regulation of individual late histone gene during development of the sea urchin *S.purpuratus*. *Dev. Biol.*, **108**: 491-502.

Montell, C., Fisher, E.F., Carutjhers, M.H. and Berk, A.J. (1983). Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3' consensus sequences AAUAAA. *Nature*, **305**: 600-05.

Montiel, J.F., Norbury, C.J., Tuite, M.F., Dodson, M.J., Millis, J.S., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M. (1984). Characterization of human chromosomal DNA sequences which replicate autonomously in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.*, **12**: 1049-68.

Moorman, A.F.M., deLeaf, R.T.M., Destree, O.H.J., Telford, J. and Birnstiel, M.L. (1980). Histone genes from *Xenopus laevis*: molecular cloning and initial characterization. *Gene*, **10**: 185-93.

Morris, N.R. (1976a). Nucleosome structure in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, **8**: 357-63.

Morris, N.R. (1976b). A comparison of the structure of chicken erythrocytes and chicken liver chromatin. *Cell*, **9**: 627-32.

Morris, T., Marashi, F., Weber, L., Hickey, E., Greenspan, D., Bonner, J., Stein, J. and Stein, G. (1986). Involment of the 5'-leader sequence in coupling the stability of a human H<sub>1</sub> histone mRNA with DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 981-95.

Morris, T.D., Weber, L.A., Hickey, E., Stein, G.S. and Stein, J.L. (1991). Changes in the stability of a human H<sub>1</sub> histone mRNA during the HeLa cell cycle. *Mol. Cel Biol.*, **11**: 544-53.

- Moore, S. (1959). On the constitution of histones. XI Conseil de chimie (Tenu à l'université libre de Bruxelles).
- Mueller, R.E., Yasuda, H., Hatch, C.L., Bonner, W.M. and Bradbury, E. M. (1985), Identification of ubiquitinated histones 2A and 2B in *Physarum polycephalum*. *J. Biol. Chem.*, 260:5147-53.
- Murray, D.R. (1987). Nutritive role of seed coats in developing legume seeds. *Am. J. Bot.*, 74: 1120.
- Murray, R.D. (1984) Seed physiology vol. 2 Germination and reserve mobilization, pp 78. Ed. David R. Murray. Academic, Press Australia.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-97.
- Nadeau, P., Pallotta, D. and Lafontain, J.G. (1977). Comparative study of rye and thymus histones. Amino acid analysis and tryptic fingerprinting. *Can. J. Biochem.*, 55: 721-27.
- Nelson, T.R., Hsieh, T.S. and Brotlag, D. (1979). Extracts of *Drosophila* embryos mediate chromatin assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5510-14.
- Nelson, D.A. (1982). Histone acetylation in Baker's yeast. *J. Biol. Chem.*, 257: 1565-68.
- Nemer, M. and Lindsay, D.T. (1969). Evidence that the S-polysomes of early sea urchin embryos may be responsible for the synthesis of chromosomal histone. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 35: 156-60.
- Newrock, K.M., Alfageme, C.R., Nordi, R.V. and Cohen, L.H. (1978) Histone changes during chromatin remodeling in embryogenesis. *Cold Spring Harbord Symp. Quant. Biol.*, 42:421-31.
- Nicolini, C.A. (1979a). (ed) *Chromatin structure and Function*. Plenum, New York.
- Nicolini, C.A. (1979b). Chromatin structure from A to micron-leves, and its relationship to mammalian cell proliferation. In: Nicolini, C.A. (ed) *Chromatin structure and function*. Part. B. Plenum, New York. pp 613-66.
- Nickel, B.E., Allis, C.D. and Davie, J.R. (1989). Ubiquitinated histone H<sub>2</sub>B is preferential located in transcriptionally active chromatin. *Biochemistry*, 28: 958-63.
- Nikolaeva, M.G. (1969). Physiology of deep dormancy in seed. *Israel Program Sci. Trans. Jerusalem*. Citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.

- Noller, H.F. (1984). Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 119.
- Norton, V.G., Imai, B.S., Yau, p. and Bradbury, E.M. (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*, **57**: 449-57.
- Olins, A.L. and Olins, D.E. (1973). Spheroid chromatin units ( $\square$ -bodies). *J. Cell Biol.*, **59**: 252.
- Olins, A.L., Carlson, R.D. and Olins, D.E. (1975). Visualization of chromatin substructure  $\square$  bodies. *J. Cell Biol.*, **64**: 528-37.
- Olins, A.L. and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units ( $\square$ bodies) *Science*, **183**: 330-32.
- Oliva, R. and Mezquita, C. (1982). Histone H<sub>1</sub> hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acid Res.*, **10**: 8049-59.
- Oliva, R. and Mezquita, C. (1986). Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles *in vitro*. *Biochemistry*, **25**: 6508-11.
- Oliva, R., Bazett-Jones, D.P., Locklear, L. and Dixon, G.H. (1990). Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle. *Nucleic Acid Res.*, **18**: 2739-47.
- Olson, M.O. and Busch, H. (1974). Nuclear proteins. In: Busch H. (ed) *The cell nucleus vol. III* Acad. Press, London-New York, pp. 211-68.
- Ord, M.G. and Stocken, L.A. (1966). Metabolic properties of histones from rat liver and thymus gland. *Biochem. J.*, **98**: 888-97.
- Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai (1980). *Is. J. Bot.*, **29**:259. Citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.
- Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai (1981). Citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.
- Osbosne, D.J., Della'Aquita, A. and Elder. R.H. (1984). *Folia Biologica (Phaha) Special publications*. Citado por Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989.
- Oudet et al., 1975. Citado en Stein et al., 1984.
- Overton, C. and Weinberg, E. (1978). Length and sequence heterogeneity of the histone gene repeat unit of the sea urchin. *Cell*, **14**: 247-57.
- Owen, T.A., Holthuis, J., Markose, E., VanWijnen, A.J., Wolfe, S.A., Grimes, S.R., Lian, J.B. and Stein, G.S. (1990). Modifications of protein-DNA interactions in the proximal promoter of a cell-growth-regulated

histone gene during onset progression of osteoblast differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 5129-33.

Fangin, S. and Chalkley, R. (1969a). Higher resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arcl. Biochem. Biophys.*, 30: 337-46.

Fangin, S. and Chalkley, R. (1969b). A new histone found only in mammalian tissue with little cell division. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 37: 1042-49.

Palvino, J. and Linnala-Kankkunen, A. (1989). Identification of sites on chromosomal protein HMG-I phosphorylated by casein kinase II. *Febs Lett*, 257: 101-104.

Patty, L., Smith, E.L. and Johnson, J. (1973). Histone III. V. The amino acid sequence of pea embryo histone III. *J. Biol. Chem.*, 248: 6834-40.

Pauli, U., Chrysogelos, S., Stein, G., Stein, J. and Nick, H. (1987). Protein-DNA interactions *in vivo* upstream of a cell cycle-regulated human H<sub>4</sub> histone gene. *Science*, 236: 1308-11.

Pauli, U., Chiu, J.F., Ditullio, P., Kroeger, P., Shalhoub, V., Rowe, T., Stein, G. and Stein, J. (1989). *J. Cell Physiol.*, 139:320. Cited in Zlatanova 1990.

Paulson, J.R. and Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12: 817-28.

Payne, P.I., Dodrzanska, M., Barlow, P.W. and Gordon, M.E. (1978). The synthesis of RNA in imbibiting seed of rape ( *Brassica napus* ) prior to the onset of germination: A biochemical and cytological study. *J. Exp. Bot.*, 29: 77-88.

Peltz, S.W. and Ross, J. (1987). Autogenous regulation of histone mRNA decay by histone protein in a cell-free systems. *Mol. Cel. Biol.*, 7: 4345-56.

Perry, R.P. and Kelley, D.G. (1973). Messenger RNA turnover in mouse L cells. *J. Mol. Biol.*, 71: 681-96.

Peumans, W.J., Stinissen, H.M. and Carlier, A.R. (1982). Some aspects of the synthesis of long-lived messenger ribonucleoproteins in developing rye embryos. *Planta*, 144:485.

Phillips, D.M.P (1963). The presence of acetyl groups in histones. *Biochemistry J.*, 87:258-63.

Phillipps, G., Chaubet, N., Chaboute, M.E., Ehling, M. and Gigot, C. (1986). Genomic organization and nucleotide sequence of two corn histone H<sub>4</sub> gene. *Gene*, 42: 225-29.

Plumb, M., Stein, J. and Stein, G. (1983a). Coordinate regulation of multiple histone mRNA during the cell cycle in HeLa cells. *Nucleic Acid Res.*, **11**: 2391-10.

Plumb, M., Stein, J. and Stein, G. (1983b). Influence of DNA synthesis inhibition on the coordinate expression of core human histone genes during S-phase. *Nucleic Acid Res.*, **11**: 7927-45.

Plumb, M., Murashi, F., Green, L., Zimmerman, A., Zimmerman, S., Stein, J. and Stein, G. (1984). Cell cycle regulation of human histone H<sub>1</sub> mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 434-38.

Poccia, D.L. and Hinergardner, R.T. (1975). Developmental changes in chromatin protein of the sea urchin from blastula to mature larva. *Dev. Biol.*, **45**: 81-89.

Poccia, D.L., Simpson, M. and Green, G. (1987). Transitions in histone variants during sea urchin spermatogenesis. *Dev. Biol.*, **121**: 445-53.

Fortmann, R., Schaffner, W. and Birnstiel, M. (1976). Partial denaturation mapping of cloned histone DNA from the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Nature*, **264**: 31-34.

Prescott, D.M. and Goldstein, L. (ed) (1979). *Cell Biology: A comprehensive treatise vol.2. The structure and replication of genetic material.* Acad. Press New York-London.

Proudfoot, N.J. and Brownlee, G.G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, **263**: 211-14.

Proudfoot, N. (1982). The end of the message. *Nature*, **298**: 516-17.

Quatrano, R.S (1987). In: *Plant hormones and their role in plant and growth and development*, pp 494. (Ed P.J.Davies) Nijhoff. Citado por Mayber y Poljakoff-Mayber, 1989.

Raboy, B., Parag, H.A. and Kuka, R.G. (1986). Conjugation of [<sup>125</sup>I] ubiquitin to cellular proteins in permeabilized mammalian cells: comparison of mitotic and interphase cells. *EMBO J.*, **5**: 863-86.

Radloff, R., Bauer, W. and Vinograd, J. (1967). A dye-buoyant-density methods for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**: 1514.

Renz, M., Nehls, P. and Hozier, J. (1977). Involvement of histone H<sub>1</sub> in the organization of the chromosome fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 1879-83.

Reeves, R. (1984). Transcriptionally active chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, **792**: 343-93.

Reeves, R. and Nissen, M.S. (1990). The A-T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. *J. Biol. Chem.*, **265**: 8573-82.

Reeves, R., Langan, T.A. and Nissen, M.S. (1991). Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc 2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 1671-75.

Reyes, J., Jiménez-García, L.F., Gonzalez, M.A. and Vazquez-Ramos, J.M. (1991). Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research*, **1**: 113-17.

Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, **311**: 532-37.

Roberts, B.S., Emmons, W.S. and Childs, G. (1989). Nucleotide sequences of *Caenorhabditis elegans* core histone gene. Genes for different histone classes share common flanking sequences elements. *J. Mol. Biol.*, **206**: 567-77.

Robbins, E. and Borun, T.W. (1967). The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**: 409-16.

Roche et al., 1985. *Nucleic Acid Res.*, **13**: 2843. Citado en Stein et al., 1989.

Rodrigues, J., Brandt, W. and VonHolt, C. (1985). The aminoacid sequence of wheat histone H<sub>4</sub>A (1). A core histone with a C-terminal extension. *Eur. J. Biochem.*, **150**: 499-05.

Rodrigues, J., Brandt, W. and VonHolt, C. (1988). The primary structure of the histone H<sub>4</sub>A(2) type from wheat germ. A core histone type with both N-terminal and C-terminal extensions. *Eur. J. Biochem.*, **173**: 555-60.

Romanoff, A.L. (1967). *Biochemistry of the avian embryo*. John Wiley and Sons, New York. Citado por Sugarman et al., 1983.

Ross, J., Peltz, W.S., Kobs, G. and Brewers, G. (1986). Histone mRNA degradation *in vivo*: the first detectable step occurs at or near the 3' terminus. *Mol. Cel. Biol.*, **6**: 4362-71.

Ross, J. and Kobs, G. (1986). H<sub>4</sub> histone messenger RNA decay in cell-free extracts initiates at or near the 3' terminus and proceeds 3' to 5'. *J. Mol. Biol.*, **188**: 579-93.

Roth, J.R. (1970). Genetic techniques in studies of bacterial metabolism. *Methods in Enzymology*, **17A**: 7.

Ruderman, J.V. and Pardue, M.L. (1977). Cell-free translation analysis of messenger RNA in echinoderm and amphibian early development. *Dev. Biol.*, **60**: 48-68.

Ruderman, J.V. and Pardue, M.L. (1978). A portion of all major classes of histone messenger RNA in amphibian oocytes is polyadenylated. *J. Biol. Chem.*, **253**: 2018-25.

Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J., Littau, J.C. and Allfrey, V.G. (1974). Changes in histone acetyl content and in nuclear non-histone protein composition of avian erythroid cells at different stage of maturation. *J. Biol. Chem.*, **249**: 7358-68.

Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J. and Allfrey, V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecule. *Science*, **190**: 117-28.

Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J. and Allfrey, V.G. (1976). Selectives synthesis and modification of nuclear proteins during maturation of avian erythroid cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**: 273-290.

Ruiz-Carrillo, A., Affolter, M. and Renaud, J. (1983). Genomic organization of the genes coding for six main histone of the chicken complete sequence of the H<sub>4</sub> gene. *J. Mol. Biol.*, **170**: 843-59.

Sachs, M.M. and Ho. T.H.D. (1986). Alteration of gen expression during enviromental stress in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **37**: 363-76.

Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. and Lopez, S. (1981). Distintive characteristic of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **99**: 445-50.

Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (1984). Protein synthesis patterns. *Plant Physiol.*, **75**: 231-34.

Sánchez-Mártinez, D., Puigdomenech, P. and Pages, M. (1986). Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. *Plant Physiol.*, **82**: 543.

Sautiere, D., Wouters-Tyrov, D., Laine, B. and Biserte, G. (1975). Structure of histone H<sub>4</sub>A (histone ALK, I1b1 or F2a2) *Ciba Found Symp.*, **28**: 77-88.

Schaffner, W., Gross, K., Telford, J. and Birnstiel, M. (1976). Molecular analysis of the histone gene cluster of *Psammecinus miliaris*. II. The arrangement of the five histone-coding and spacer sequences. *Cell*, **8**: 471-78.

Schaffner, W., Kunz, G., Daetwyler, H., Telford, J., Smith, H.O. and Birnstiel, M.L. (1978). Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA analyzed by sequencing. *Cell*, **14**: 655-71.

- Schleif, R.F. and Wensink, P.C. (1981). Practical methods in molecular biology. Springer-Verlag, New York.
- Schumperli, D. (1986). Cell cycle regulation of histone gene expression. *Cell*, **45**: 471-72.
- Sedat, J. and Manuelidis, L. (1977). A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**: 331-50.
- Seiler, A.T. and Birnstiel, M.L. (1981). Structure and expression in L-cells of a cloned H<sub>1</sub> histone gene of the mouse. *J. Mol. Biol.*, **151**: 607-25.
- Secretaria de Educación Publica (1990). Maiz. Manuales para la educación agropecuaria. Ed. Trillas pag.50.
- Sergeant, A., Bohman, D., Zentgraf, H., Weiher, H. and Keller, W. (1984). A transcription enhancer acts *in vitro* over distances of hundreds of base-pairs on both circular and linear templates but not on chromatin-reconstituted DNA. *J. Mol. Biol.*, **180**: 577-600.
- Sevall, J.S., Jagodzinski, L.L., Tsai, S.S., Castro, C.E. and Lee, D. (1978). Nonhistone proteins and gene organization. In: Busch, H. (ed) The cell nucleus. vol.IV Acad. Press, London New York pp 319-343.
- Seyedin, S.M. and Kistler, W.S. (1979). H<sub>1</sub> histone subfractions of mammalian testes. 2. organ-specific in mice and rabbits. *Biochemistry*, **18**: 1376-79.
- Sharma, A., Bos, T.j., Pekkala-Flagan, A., Vogt, P.K. and Lee, A.S. (1989). Interaction of cellular factors related to the jun oncoprotein with the promoter of a replication-dependent hamster histone H<sub>2</sub>.2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 491-95.
- Shibata, K., Inagaki, M. and Ajiro, K. (1990). Mitosis-specific histone H<sub>1</sub> phosphorylation *in vitro* in nucleosome structure. *Eur. J. Biochem.*, **192**: 87-93.
- Sierra, F., Lichtler, A., Marashi, F., Rickles, R. R., Dyke, V.T., Clark, S., Wells, J., Heintz, N., Zernik, M. and Roeder, G.R. (1981). The structure of the histone genes: clustered but no tandemly repeated. *Cell*, **24**: 661-68.
- Sierra, F., Lichtler, A., Marashi, F., Rickles, R., Dyke, V. T., Clark, S., Wells, J., Stein, G. and Stein, J. (1982). Organization of human histone genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 1795-99.



Sittman, D., Chiu, I., Pan, C., Cohn, R., Kede, L.H. and Marzluff, W. (1981). Isolation of two clusters of mouse histone genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 1265-69.

Sittman, D.B., Graves, R.S. and Marzluff, W.F. (1983). Histone mRNA concentrations are regulated at the level of transcription and mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 1849-53.

Sive, H.L., Heintz, N. and Roeder, R.G. (1986). Multiple sequence elements are required for maximal *in vitro* transcription of a human histone H<sub>2</sub>A gene. *Mol. Cell. Biol.*, **6**: 3329.

Smith, D.L., Chen, C.C., Bruegger, B.B., Holtz, S.L., Halpern, R.M. and Smith, R.A. (1974). Characterization of histone kinase forming acid-labile histone phosphate in Walker 256 carcinoma cell nuclei. *Biochemistry*, **13**: 3780-85.

Smith, H.O. and Birnstiel, M.L. (1976). A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acid Res.*, **3**: 2387-98.

Smith, M.M. and Murray, K. (1983). Yeast H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> histone messenger RNAs are transcribed from two-non-allelic gene sets. *J. Mol. Biol.*, **169**: 641-61.

Smith, M.M. and Andresson, S.O. (1983). DNA sequences of yeast H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> histone genes from two-non-allelic gene sets encode identical H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> proteins. *J. Mol. Biol.* **169**: 663-90.

Smith, S.S., Gilroy, T.E. and Ferrari, F.A. (1983). The influence of agarose-DNA affinity on the electrophoretic separation of DNA fragments in agarose gels. *Anal. Biochem.*, **128**: 153.

Sonnenbichler, J. (1979). Advances in chromatin research. *Naturwissenschaften*, **66**: 244-50.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503.

Spiegel, S. and Marcus, A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature*, **256**: 228-30.

Spiegel, S., Obendorf, R.L. and Marcus, A. (1975). Transcription of ribosomal and messenger RNAs in early wheat embryo germination. *Plant Physiol.*, **56**: 502-07.

Spiker, S. and Isenberg, I. (1977). Cross-complexing pattern of plant histone. *Biochemistry*, **16**: 1819-26.

Spiker, S. and Isenberg, I. (1978). Evolutionary conservation of histone-histone binding sites: Evidence from inter kingdom complex formation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 157-66.

Spiker, S. (1982). Histone variants in plant. Evidence for primary structure variants differing in molecular weight. J. Biol. Chem., 257: 14250-55.

Spiker, S. (1984). Chromatin structure and gene regulation in higher plant. In: Molecular Genetic of Plants, ed. J. Scandalios, 22: 145-208 Orlando, Academic.

Spiker, S. (1985). Plant chromatin structure. Ann. Rev. Plant Physiol., 36: 235-53.

Spiker, S., Hopkins, R., Fischer, R. and Quatrano, R. (1987). Synthesis of nucleosomal histone variants during wheat grain development. Biochim. Biophys. Acta, 910: 157-62.

Stauber, C. and Schumperli, D. (1988). 3' processing of pre-mRNA plays a major role in proliferation-dependent regulation of histone gene expression. Nucleic Acid Res., 16: 9399-9414.

Stein, G., Stein, J. and Kleinsmith, L.J., Eds. (1978). Chromatin and chromosomal protein research. Meth. Cell Biol. vol.16 Acad. Press London New York.

Stein, G.S., Stein, J.L. and Marzluff, W.F., Eds. (1984). Histones genes. Structure, organization and regulation. John Wiley and Sons, New York. Citado por Collard et al., 1991.

Stein, G., Lian, J., Stein, J., Briggs, R., Shalhoub, V., Wright, K., Pauli, V. and VanWijnen, A. (1989). Altered binding of human histone gene transcription factors during the shut-down of proliferation and onset of differentiation in HeLa 60 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 1865-69.

Sterner, R., Vidali, G. and Allfrey, V.G. (1979). Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. J. Biol. Chem., 254: 11577-83.

Sterner, R., Vidali, G. and Allfrey, V.G. (1981). Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. (Identification of sites of acetylation in high mobility group proteins 14 and 17). J. Biol. Chem., 256: 8892-95.

Sterner, R., Boffa, L.C., Chen, T.A. and Allfrey, V.G. (1987). Cell cycle dependent changes in conformation composition of nucleosome containing human histone gene sequences. Nucleic Acid Res., 15: 4375-91.

Stillman, B. (1986). Chromatin assembly during SV-40 replication in vitro. *Cell*, **45**: 555-65.

Stout, T.J. and Phillips, L.R. (1973). Two independently inherited electrophoretic variant of the lysine-rich histones of maize (*Zea mays*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**: 3043-47.

Suda, M. and Iwai, K. (1979). Identification of suberimate cross-linking sites of four histone sequences in H<sub>1</sub>-depleted chromatin. Histone arrangement in nucleosome core. *J. Biochem.*, **86**: 1659-70.

Sugarman, J.B., Dodgson, B.J. and Engel, D.J. (1983). Genomic organization, DNA sequence and expression of chicken of chicken embryonic histone genes. *J. Biol. Chem.*, **258**: 9005-16.

Sun, J.M., Wiaderkiewicz, R. and Ruiz-Carrillo, A. (1989). Histone H<sub>1</sub> in the control of DNA synthesis and cell proliferation. *Science*, **245**: 68-71.

Sun, J., Ali, Z., Lurz, R. and Ruiz-Carrillo, A. (1990). Replacement of histone H<sub>1</sub> by H<sub>2</sub> in vivo does not change the nucleosome repeat length of chromatin but increases its stability. *EMBO J.*, **9**: 1651.

Sung, M.T., Dixon, G.H. and Smithies, O. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**: 1358-64. Citado en Bostock y Summer, 1978.

Sung, M.T. (1977a). Phosphorylation and dephosphorylation of histone V (H5): controlled condensation of avian erythrocyte. *Biochemistry*, **16**: 286-90.

Sung, M.T., Harford, J., Bundman, M. and Vidalakas, G. (1977). Metabolism of histones in avian erythroid cells. *Biochemistry*, **16**: 279-85.

Sung, M.T. and Freedlender, E.F. (1978). Sites of in vivo phosphorylation of histone H<sub>2</sub>. *Biochemistry*, **17**: 1884-92.

Sures, I., Levy, S. and Kedes, L.H. (1980). Leader sequences of *S. purpuratus* histone mRNA start at a unique heptanucleotide common to all five histone genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 1265-69.

Tabata, T., Fukasawa, M. and Iwabuchi, M. (1984). Nucleotide sequence and genomic organization of a wheat histone H<sub>1</sub> gene. *Mol. Gen. Genet.*, **196**: 397-400.

Tabata, T. and Iwabuchi, M. (1984). Molecular cloning and nucleotide sequence of variant wheat histone H<sub>1</sub> gene. *Gene*, **31**: 285-89.

Tabata, T., Sasaki, K. and Iwabuchi, M. (1983). The structural organization and DNA sequence of a wheat histone H<sub>1</sub> gene. *Nucl. Acids Res.*, **11**: 5865-75.

- Tabata, T. and Iwabuchi, M. (1986). Characteristic sequence in the 3' flanking region of wheat histone genes. *Plant Cell Physiol.*, 27: 929-33.
- Taylor, J.H. (1979). *Chromosome structure*. Acad. Press, London, New York.
- Taylor, B. and Powel, A. (1982) Isolation of plant DNA and RNA. *Focus*, 4: (3) 4-6.
- Thomas, J.O. and Thompson, R.J. (1977). Variation in chromatin structure in two cell types from the same tissue. A short DNA repeat leght in cerebral cortex. *Cell*, 10: 633-40.
- Thoma, F. and Koller, T. (1977). Influence of histone H<sub>1</sub> on chromatin structure. *Cell*, 12: 101-107.
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979). Involvement H<sub>1</sub> in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent super structures of chromatin. *J. Cell Biol.*, 83: 403-27.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 5201.
- Thomas, F. and Koller, T. (1981). Unravalled nucleosomes, nucleosome beads and higher order structure of chromatin: Influence of non-histone components and histone H<sub>1</sub>. *J. Mol. Biol.*, 149: 709-29.
- Thomas, G. and Padayatty, D.J. (1983). Organization and bidirectional transcription of H<sub>1</sub>A, H<sub>1</sub>B and H<sub>1</sub> histone gene in rice embryos. *Nature*, 306: 82-84.
- Thorne, A.W., Sautiere, P., Briand, G. and Crane-Robinson, C. (1987). The structure of ubiquitinated histone H<sub>1</sub>B. *EMBO J.* 6: 1005-10.
- Tobin, C. and Seligy, R. (1975). Citado en Isenberg, 1979.
- Todd, R.D. and Garrard, W.T. (1977). Two dimensional electrophoretic analysis of polynucleosomes. *J. Biol. Chem.*, 252: 4729-38.
- Toole, E.H., Hendricks, S.B., Borthwick, H.A. and Toole, J.k. (1956). Physiology of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 7. 299-324.
- Trewavas, A. (1976). Post-translational modification of protein by phosphorylation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 27:349-74.
- Tsao, Y.P., Wu, H.Y. and Liu, L.F. (1989). Transcription-driven supercoliling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*, 56: 111-18.
- Tuan, D.Y.H. and Bonner, J. (1969). Optical absorbance and optical rotatory dispersion studies on calf thymus nucleohistone. *J. Mol. Biol.*, 45: 59-76.

Turner, P.C. and Woodland, H.R. (1983). Histone gene number and organization in *Xenopus*: *Xenopus borealis* has a homogeneous major cluster. *Nucl. Acids Res.*, 11: 971-86.

Turner, M.B., Franchi, L. and Wallace, H. (1990). Islands of acetylated histone H<sub>1</sub> in polytene chromosome and their relationship to chromatin packaging and transcriptional activity. *J. Cell. Science*, 96: 335-46.

Urban, M.K., Francklin, S.G. and Zweidler, A. (1979). Isolation and characterization of the histone variants in chicken erythrocytes. *Biochemistry*, 18: 3952-60.

Van de Walle, C. and Deltour, R. (1974). Presence of heterodisperse nuclear RNA in a plant: *Zea mays*. *Febbs letters*, 49: 87-91.

Vanfleteren, J.R., VanBun, S.M. and Beevmen, J.J. (1987). The primary structure of histone H<sub>4</sub>A from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry J.*, 243: 297-300.

VanWijnen, J.A., Wright, K.L., Ramsey-Ewing, A., Kennedy, M.B., Carter, R., Cosenza, S.C., Soprano, K.J., Lian, J.B. and Stein, G.S. (1989). Human H<sub>1</sub> histone gene transcription requires the proliferation-specific nuclear factor H1NF-D. *J. Biol. Chem.*, 264: 15034-42.

VanWijnen, J.A., Choi, K.T., Owen, A.T., Whight, L.K., Lian, B.J., Jaenisch, R., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1991). Involvement of the cell cycle-regulated nuclear factor H1NF-D in cell growth control of a human H<sub>1</sub> histone gene during hepatic development in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 2573-77.

VanWijnen, A.J., Massung, R.F., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1988). Human H<sub>1</sub> histone gene promoter CCAAT box binding protein H1NF-B is a mosaic factor. *Biochemistry*, 27: 6534.

Vasserot, A.P., Schaufele, F.J. and Birnstiel, M.L. (1989). Conserved terminal hairpin sequences of histone mRNA precursors are not involved in duplex formation with the U7 RNA but act as a target site for a distinct processing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 4345-49.

Vazquez-Ramos, J.M. and Osborne, D.J. (1986). Analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mut. Res.*, 166: 39-48.

Vazquez-Ramos, J.M. and Lopez, S. (1986). Inhibición *in vitro* de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y Ara-CTP. *Rev. Soc. Quím. Mex.*, 30(3): 119-23.

Vazquez-Ramos, J.M., Lopez, S., Vazquez, E. and Murillo, E. (1988). DNA integrity and DNA polymerase activity in deteriorated maize embryo axes. *J. Plant Physiol.*, 133: 600-04.

Veda, K., Omachi, A., Kawaichi, M. and Hayaishi, O. (1975). Natural occurrence of poly(ADP-ribosyl) histone in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72: 205-09.

Vegis, A. (1964). Dormancy in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 15: 185-24.

Wahl, G.M., Stern, M. and Stark, G.R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 3683.

Wallis, J.W., Hereford, L. and Grunstein, M. (1980). Histone H<sub>3</sub> genes of yeast encode two different proteins. *Cell*, 22: 299-305.

Wang, T.Y. and Kostraba, N.C. (1978). Protein involved in positive and negative control of chromatin function. In: Busch, H. (ed). *The cell nucleus*. vol. IV Acad. Press, London-New York pp 289-317.

Wang, S.W., Robins, A.J., D'Andrea, R. and Wells, J.R.E. (1985). Inverted duplication of histone genes in chicken and deposition of regulatory sequences. *Nucl. Acids Res.*, 13: 1360-87.

Waterborg, J.H. and Matthews, H.R. (1983). Acetylation sites in histone H<sub>1</sub> from *Physarum polycephalum*. *Febs Lett.*, 162: 416-19.

Waterborg, H.J., Harrington, E.R. and Winicov, I. (1989). Differential histone acetylation in *Medicago sativa* due to growth in NaCl. *Plant Physiol.*, 90: 237-45.

Weeks, D. P. and Marcus, A. (1971). Preformed messenger of quiescent wheat embryos. *Biochem. Biophys Acta*, 232: 671-684.

Weinberg, E.S., Overton, G.C., Shutt, R.H. and Reeder, R.H. (1975). Histone gene arrangement in the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72: 4815-19.

Weintraub, H. and Groudine, M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, 93: 848-58.

Weisbord, S. and Weintraub, H. (1979). Isolation of a subclass of nuclear protein responsible for conferring a DNAase I-sensitive structure on globin chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 630-34.

Weisbrod, S., Groudine, M. and Weintraub, H. (1980). Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes. *Cell*, 9: 289-301.

- Weintraub, H. (1985). Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. *Cell*, 42: 705.
- Wells, D. and Kedes, L. (1985). Structure of a human histone cDNA: evidence that basally expressed histone genes have intervening sequences and encode polyadenylated mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 2834-38.
- Well, J.R.E. (1986). Compilation analysis of histone and histone genes. *Supplement. Nucl. Acids Res.*, 14: 119.
- Wells, D., Hoffman, D. and Kedes, L. (1987). Unusual structure, evolutionary conservation of non-coding sequences and numerous pseudogenes characterize the human H<sub>4</sub> histone multigene family. *Nucl. Acids Res.*, 15: 2871-89.
- West, M.H.P. and Bonner, W. M. (1980a) Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*, 19: 3238-45.
- West, M.H.P. and Bonner, W.M. (1980b). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucl. Acids Res.*, 8: 4671-80.
- Whihelm, M.L. and Wilhelm, X.F. (1984). A transposon-like DNA fragment interrupts a *Physarum polycephalum* histone H<sub>4</sub> gene. *Febs Letter*, 168: 249-54.
- Whihelm. M.L., Toublan, B., Jalouzot, R. and Whihelm, X.F. (1984). Histone H<sub>4</sub> gene is transcribed in S phase but also in G2 phase in *Physarum polycephalum*. *EMBO J.*, 3: 2659-62.
- Wilkins, B.M. (1984). *Advanced Plant Physiology*. Ed. Pitman Pub. Ltn. Great Britain.
- Wilson, S.B. and Bonner, W.D.Jr. (1971). *Plant physiol.*, 48: 340-44. Citado en Bewley y Black, 1986.
- Wilson, M.C. and Melli, M. (1977). Determination of the number of histone genes in human DNA. *J. Mol. Biol.*, 110: 511-35.
- Wolffe, A.P. (1989). Dominant and specific repression of *Xenopus* oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H<sub>4</sub>. *EMBO J.*, 8: 527.
- Wong, T.K. and Marushige, K. (1976). Modification of histone binding in calf thymus chromatin and the chromatin-protamine complex by acetic anhydride. *Biochemistry*, 15: 2041-46.
- Wong, N.C.W., Poirier, G.C. and Dixon, G.H. (1977). Adenosine dephosphoribosylation of certain basic chromosomal protein in isolated trout testis nuclei. *J. Biochem.*, 77: 11-21.
- Woodcock, C.L.F. (1973). Ultrastructure of inactive chromatin. *J. Cell Biol.*, 59: 368.

- Worcell, A. and Benyajati, C. (1977). Higher order coiling of DNA in chromatin. *Cell*, 12: 83-100.
- Wu, M., Holmes, D.S., Davidson, N., Cohn, R.H. and Kedes, H.L. (1976). The relative positions of sea urchin histone genes on the chimeric plasmids pSp2 and pSp17 as studied by electron microscopy. *Cell*, 9: 163-69.
- Wu, S.R. and Bonner, W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cell of chinese hamster. *Cell*, 27: 321-30.
- Wu, S.R., Nishika, D and Bonner, W.M. (1982). Differential conservation of variants of histone H<sub>4</sub> in mammifer and sea urchin. *J. Cel Biol.*, 93: 426-31.
- Wu, R.S., Tsai, S. and Bonner, W.M. (1982a). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G<sub>0</sub> from G<sub>1</sub> cells. *Cell*, 31: 367-74.
- Wu, R.S., Tsai, S. and Bonner, W.M. (1983). Changes in histone H<sub>4</sub> composition and synthesis pattern during limphocyte activation. *Biochemistry*, 22: 3868-73.
- Wu, S.R. and Bonner, W.M. (1984). Pattern of histone-variant synthesis and implications for gene regulation. *Eukaryotic gene expression*. A. Kumer Editor, Plenum, Press.
- Wu, R.S., Panusz, H.T., Hatch, C.L. and Bonner, W.M. (1986). Histones and their modifications. *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, 20: 201-63.
- Xu, H., Johnson, L. and Grunstein, M. (1990). Coding and noncoding sequences at the 3' end of yeast histone H<sub>2</sub>B mRNA confer cell cycle regulation. *Mol. Cel. Biol.*, 10: 2687-94.
- Zambetti, G., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1987). Targeting of a chimeric human histone fusion mRNA to membrane-bound polysome in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 2683-87.
- Zambetti, G., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1990). *J. Cell Physiol.*, 144: 175-87.
- Zarain, M., Bernal-Lugo, I. and Vazquez-Ramos, J.M. (1987). Effect of benzyl-adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryos axes. *Mutat. Res.*, 181: 103-10.
- Zernik, M., Heintz, N., Boime, I. and Roeder, R.G. (1980). *Xenopus laevis* histone genes: variant H<sub>4</sub> genes are present in different clusters. *Cell*, 22: 807-15.
- Zhang, D.E. and Nelson, D.A. (1986). Histone acetylation in chicken erythrocytes. *Biochem. J.*, 240: 857-62.



Zhang, D.E. and Nelson, D.A. (1988). Histone acetylation in chicken erythrocytes. Rates of acetylation and evidence that histones in both active and potentially active chromatin are rapidly modified. *Biochem. J.*, **250**: 233-40.

Zhong, R., Roeder, R.G. and Heintz, N. (1983). The primary structure and expression of four cloned human histone genes. *Nucl. Acids Res.* **11**: 409-25.

Zlatanova, V.S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimshirova, K.V. and Stanchev, B.S. (1987). DNA repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Mol. Biol.*, **10**: 134-44.

Zlatanova, J. and Ivanov, P. (1988). DNA and histone synthesis are uncoupled during germination of maize embryos. *Plan Sci.*, **58**: 71-76.

Zlatanova, J. (1990). Histone H<sub>1</sub> and the regulation of transcription of eukaryotic genes. *TIBS*, **15**: 273-76.

Zubay, G. and Watson, M.R. (1959). *J. Biophys Biochem.*, **12**: 34. Citado en Brachet and Mirsky, 1961.