

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LA SINTESIS TEMPRANA DE PROTEINAS DURANTE
LA GERMINACION DEL EMBRION DE MAIZ.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

- 1985 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

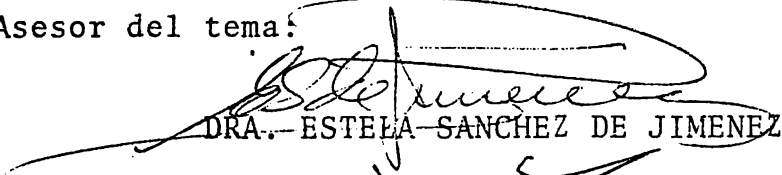
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

Presidente.	DRA. MARIA LUISA ORTEGA
1er. Vocal	DRA. IRMA BERNAL LUGO
Secretario	DR. VICTOR MANUEL LOYOLA
Suplente	DR. ALBERTO HAMABATA
Suplente	DR. BLAS LOTINA HENNSEN

El presente trabajo fue realizado en el:
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:



DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ

Sustentante:



RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

El presente trabajo fue apoyado económicamente
por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
bajo los convenios PAFNAL-790382 y PAFBNA-005382.

Este trabajo se llevó a cabo parcialmente bajo el Convenio de Colaboración Académica entre el Colegio de Posgraduados de Chapingo y la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las muestras de maíz utilizadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por la Dra. Evangelina Villegas, del Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y por el Dr. Joaquín Ortiz Cereceres, del Centro de Genética del Colegio de Posgraduados de Chapingo.

ANTECEDENTES

El grano de maíz está compuesto por tejidos y órganos muy especializados, lo cual está asociado a características físicas y químicas que resultan en diferencias notables de funciones en la constitución final de las partes del grano, el conocimiento de la estructura contribuye a ubicar el análisis sobre los eventos de la germinación.

El grano de maíz es el producto de una doble fertilización de núcleos haploides que tienen lugar en el saco embrionario que se encuentra enclavado en la superficie del raquis de la mazorca.

Antes de la fecundación, en el saco embrionario se forman ocho núcleos haploides y en las anteras cada grano de polen en desarrollo, produce dos núcleos haploides o microgametofitos masculinos que intervendrán en la doble fertilización del saco embrionario.

De los ocho núcleos solamente uno llamado ovocélula, se fusiona con un microgametofito, mientras que otros dos núcleos llamados polares lo hacen con el otro núcleo masculino.

Los otros núcleos se deterioran y mueren. La primera fusión dará lugar al embrión o germen y será de constitución

diploide, la segunda fusión de tres núcleos dará lugar al endospermo que será, por consiguiente de naturaleza triploide. El pericarpio que se desarrolla del crecimiento de las paredes del ovario también será diploide (Kiesselbach, 1949).

Cada grano de maíz es considerado botánicamente como un fruto o cariopsis por tener el pericarpio íntimamente unido al endospermo y al germen (Wolf et al., 1952).

El endospermo es una estructura que contribuye con el 80-85% del peso total del grano; su función metabólica es la de abastecer reservas alimenticias para el proceso de germinación del embrión y desarrollo inicial de la plántula. Está constituido por células de paredes delgadas que contienen granos de almidón y proteína.

Las diferentes texturas del endospermo conocidas comúnmente como dentado, cristalino, harinoso, palomero, dulce, etc. se determinan principalmente por variaciones en la organización y tipos de los gránulos de almidón.

El pericarpio contribuye aproximadamente con el 6% del peso total del grano y corresponde a la pared ovárica que después de desarrollada y transformada cubre totalmente el grano de maíz. Sus funciones biológicas principales son ais

lar y proteger los procesos citogenéticos que resultan en la formación del embrión y del endospermo y los procesos metabólicos que permiten posteriormente la germinación y desarrollo de la nueva planta (Wolf et al., 1952).

El embrión es un órgano que contribuye generalmente con el 10-15% del peso seco del grano, se encuentra ubicado en la base del grano y está formado por el escutelo y el eje embrionario.

El escutelo es un tejido que no crece ni se divide, sirve para transportar las reservas del endospermo hacia el eje embrionario.

El eje embrionario tiene como función biológica la de producir una nueva planta bajo condiciones ambientales apropiadas para el crecimiento y diferenciación de sus tejidos. Este eje embrionario está formado por el coleoptilo, la plúmula, la radícula y la coleorriza.

La semilla juega un papel muy importante en la biología de los vegetales superiores ya que provee la continuidad entre generaciones sucesivas, de ahí que requiere adaptarse al medio ambiente para tener éxito en la germinación, y el establecimiento del ciclo vital completo de la planta hasta la formación de nuevas semillas (Mayer, 1980).

Al ir aumentando el conocimiento acerca de la germinación de las semillas se pone de manifiesto cierto grado de uniformidad en los mecanismos generales que operan entre grandes variedades de semillas. Sin embargo, el comportamiento individual de las semillas de especies biológicas específicas muestra una gran variabilidad, la cual es necesaria para asegurar la dispersión de las semillas en la naturaleza.

La germinación de la semilla solo es una fase del ciclo de vida de una planta, el cual comprende desde el desarrollo de la célula huevo fertilizada hasta la formación de la panta madura. En la fase de la germinación, un embrión parcialmente diferenciado reinicia el curso de su desarrollo después de un período de quiescencia metabólica.

Aunque no es fácil definir la germinación, generalmente se considera que la germinación es el proceso que ocurre desde el inicio de la imbibición de la semilla hasta cuando una parte del embrión, generalmente la radícula, protruye a través de la cubierta o testa de la semilla (Bewley, 1978). La imbibición de la semilla es una condición necesaria para la germinación, sin embargo algunas veces no es suficiente por sí sola para lograrla.

Las semillas que germinan al colocarlas en un medio favorable se consideran semillas quiescentes. Aquéllas que requieren de algún factor adicional para poder germinar se les conoce como semillas latentes (Villiers, 1972).

Durante el período de imbibición se suceden tres eventos principales: primero, hay una toma rápida de agua (Hlynka y Robinson, 1954; Jirgenson, 1962; Hamabata, 1980). Segundo: se presenta una reactivación de las macromoléculas y los organelos preexistentes, los cuales han sido previamente formados durante la maduración de la semilla y almacenados o inactivados por el proceso de deshidratación cuando las semillas maduran (Marré, 1967). Tercero: la respiración propicia la formación de trifosfato de adenosina (ATP), el cual provee la energía para la síntesis de sustratos, coenzimas y proteínas (enzimas) los cuales son necesarios para iniciar las actividades anabólicas de los tejidos (Pradet, 1968). Las actividades anabólicas consisten de la síntesis de varios sustratos, ADN, ARNr, ARNm, ARNt, enzimas, proteínas estructurales y lípidos para la estructuración de los cromosomas, el nucleolo, los ribosomas, las mitocondrias, los cloroplastos, los dictiosomas, los microsomas, los peroxisomas, las membranas y los materiales para la pared celular necesarios para la extensión de las células presentes y la formación de las nuevas células en el eje embrionario.

Considerando que los gránulos de almidón, proteínas de reserva y grasas, son insolubles en agua, probablemente la imbibición sea heterogénea y el agua sea absorbida primeramente por los organelos metabólicamente funcionales como el citosol y membranas exteriores de los organelos de almacenamiento.

Aún cuando el contenido total de agua sea bajo para la semilla, la cantidad de agua tomada en sitios localizados en las células podrían proveer un medio adecuado para que la actividad metabólica proceda en esos sitios.

Se ha reportado la presencia de ARNm almacenados de larga vida en embriones de trigo (Weeks y Marcus, 1971) y arroz (Gordon y Payne, 1976), algodón (Dure, 1977), castor bean (Martin y Northcote, 1981) estos se forman durante la maduración de las semillas.

Se ha demostrado que estas especies de mensajeros se poliadenilan en una variedad de semillas y se han podido aislar por cromatografía de afinidad (Brooker, 1978), también se ha demostrado que estos ARNm tienen capacidad para dirigir la síntesis de proteínas en un sistema in vitro (Waters y Dure, 1966; D. Chen, 1966, Ihle y Dure, 1969, Lane y Tumaitis-Kennedy, 1981).

Existe, además en estos ejes embrionarios otro grupo de ARNm que son no poliadenilados (Payne, 1976). Las células pueden modular su actividad por medio de la síntesis de proteínas formando las enzimas requeridas, proteínas estructurales y reguladoras, aún cuando algunas veces las enzimas formadas en un estado de desarrollo pueden no ser funcionalmente activas hasta que las condiciones necesarias se presenten al mismo o diferente estadio de desarrollo.

Se ha sugerido (Dure, 1977; Gordon and Payne, 1976; Bewley, 1979) la existencia de un reloj biológico muy preciso que controla la síntesis de las macromoléculas en los embriones de las semillas al empezar el proceso de la imbibición.

Durante las primeras horas de la germinación, no se observa ningún cambio morfológico significativo en el embrión de la semilla, sin embargo este período es muy importante ya que en él, se producen los cambios metabólicos que permitirán la etapa siguiente, la de rápido crecimiento del embrión. Este período depende de la síntesis temprana de proteínas, ya que se ha demostrado (Jendrisak, 1980), que si se inhibe esta síntesis, no se puede desarrollar posteriormente el embrión. De ahí que este periodo de síntesis temprana debe estar regulado por mecanismos muy pre-

cisos que definan el tipo y la cantidad de cada proteína que deberá formarse como preparación a la subsecuente etapa de diferenciación y desarrollo del embrión.

Una de las partes involucradas en este reloj biológico está constituida por los ARNm almacenados, sin embargo aunque se ha especulado mucho, aún no se sabe con claridad, el papel de este tipo de ARNm en la germinación y desarrollo del embrión, ni la información genética que contienen.

Algunos autores (Payne, 1976), consideran que estos ARNm solo son residuos de ARNm que existieron durante la maduración de la semilla y que los importantes para la germinación son los nuevos ARNm (Cheung y Col., 1979) sin embargo se cuestiona esta interpretación debido a que el proceso de síntesis temprana de proteínas, es muy complejo ya que intervienen tanto sistemas de procesamiento pos-transcripcional (Delseny, 1981) como sistemas de regulación a nivel de traducción (Henson, 1979).

Otros autores (Brooker, Tomaszewski y Marcus, 1978; Martin, 1981) postulan que estos ARNm almacenados, son requeridos básicamente, para que al iniciarse la germinación, la actividad metabólica pueda ser reiniciada rápidamente.

Otro punto de vista considera que estos ARNm son moléculas que sirven para asegurar la sobrevivencia de la semilla durante la germinación en ambientes adversos.

Los estudios en embriones inmaduros de centeno llevados a cabo por Peumans y colaboradores (1979) demostraron la existencia de partículas ribonucleoproteicas conteniendo ARNm almacenados y que, durante la maduración estas partículas se acumulan en el eje embrionario, de tal forma que se enriquece con especies de ARNm cualitativamente idénticos, ya que traducidos in vitro, los ARNm de diferentes estadios de maduración dan un patrón igual. Si después de iniciado el proceso de germinación las condiciones ambientales cambian y no son adecuadas para que continúe el proceso, los polisomas ya formados se deshacen y con ello se pierde el grupo de ARNm que estos contenían, por lo que otro grupo de ARNm es requerido para reiniciar la formación de polisomas cuando las condiciones vuelven a ser favorables (Weeks 1971). De ahí la hipótesis de que existan partículas que tengan ARNm almacenado con información cualitativamente idéntica, explícitamente para asegurar la germinación y la sobrevivencia de la semilla en el campo.

Considerando la información que se tiene en la actualidad, aunque no hay un consenso general, se puede afirmar que la función de los ARNm almacenados o de larga vida, no se pue

de desligar de la germinación ya que aunque no se ha reportado (Jendrisak, 1980) que la germinación requiere de la síntesis de novo de ARNm, no se elimina la posibilidad de que esta síntesis de novo al inicio sea insuficiente para el proceso de la germinación y/o dependa de la síntesis previa de alguna proteína.

Se puede considerar que durante la germinación, se tienen dos estadios de desarrollo bien definidos: uno, el período inicial de elongación de la radícula en el que está involucrado el ARNm almacenado y otro que ya requiere de nuevos ARNm para el período de crecimiento. En el caso del maíz, solo se tienen datos muy preliminares (Van De Walle, 1976 ; Deltour, 1977) a este respecto. En relación a la síntesis de las otras especies de ARN, se ha demostrado (Robinson, 1975; Payne, 1977; Takaiwa, 1979) que al igual que el ARN mensajero, el ARN ribosomal y el ARN de transferencia, se sintetizan tan pronto como se inicia la imbibición.

Otro de los aspectos que no ha sido aclarado, es la similitud o diferencia de la información codificada por los ARNm almacenados y los sintetizados al inicio de la germinación.

Entre las proteínas que se sintetizan al inicio de la germinación se han identificado, en el caso del embrión de trigo (Lane y Tumaitis, 1981), proteínas ribosomales, en cambio, otras como las histonas, parecen ser sintetizadas en periodos más tardíos como ha sido reportado para maíz (Van De Walle, 1974). Sin embargo, se considera que al parecer lo que existe realmente en los tejidos embrionarios son programas de desarrollo específicos para la síntesis de ARN diferentes para cada especie o familia de plantas, (Van De Walle, 1983), lo cual significaría que los datos obtenidos para una especie no podrían ser extrapolables para otra.

Otro factor que podría estar involucrado en la regulación de la síntesis de proteínas es la poza de aminoácidos (Marsh, 1982), pero la información que existe con respecto a esto es aún muy limitada.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

Basado en estos antecedentes y con el fin de entender mejor los procesos que se inducen con la penetración del agua en las semillas y la regulación de los eventos bioquímicos primarios, se desarrolló el presente trabajo. En él se estudian los procesos relacionados con la síntesis de pro-

teínas y su regulación en el embrión de maíz, durante el período de germinación (24 h). Para ello se diseñó la siguiente hipótesis de trabajo:

La semilla de maíz al igual que otros cereales estudiados, contiene ARNm almacenados en los tejidos embrionarios. Estos ARNm deben estar programados para que se expresen durante la germinación de acuerdo a la función de cada tejido, si esto es así deberá existir un grupo de ARNm de larga vida que codifiquen un patrón proteico específico para los diferentes tejidos del embrión durante la germinación por lo que el patrón proteico que presente el eje embrionario (tejido que durante la germinación se va a dividir y a diferenciar) deberá ser diferente del que presente el escutelo (tejido diferenciado que no va a dividirse). La expresión de estos ARNm deberá estar sujeta a un sistema de regulación específico.

OBJETIVOS.

- 1.- Determinar si hay ARNm almacenados en el embrión de maíz (ARNm de larga vida).
- 2.- Medir la formación de polisomas, la síntesis de proteínas y la poza de aminoácidos durante el proceso de germinación.

- 3.- Analizar y comparar las proteínas sintetizadas en la germinación de dos tejidos embrionarios diferentes: eje embrionario y escutelo.
- 4.- Analizar el tipo de proteína sintetizada por los ARNm de larga vida.
- 5.- Conocer el momento en que se expresan los ARNm de novo y definir el patrón proteico para el que codifican.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Con el fin de lograr las metas propuestas se utilizarán entre otros los siguientes compuestos y técnicas:

- a) Para la medición de la síntesis de proteínas se emplearán precursores radiactivos: mezcla de aminoácidos ^{14}C , metionina ^{35}S , leucina ^{14}C y lisina ^{14}C .
- b) Con el fin de discernir entre las proteínas sintetizadas a partir de mensajes almacenados y las sintetizadas de mensajes de novo, así como el tiempo en que expresan estos últimos, se utilizará α -amanitina el cual es un inhibidor de la ARN polimerasa II.
- c) Por medio de electroforesis en geles de acrilamida en una y dos dimensiones y el análisis fluorográfico de los mismos, se analizarán las proteínas sintetizadas por ejes embrionarios y escutelo por separado, en los períodos estudiados de la germinación.

Como material de estudio se utilizará al embrión de maíz, debido a que presenta varias ventajas para ser usado como modelo biológico:

- 1.- Se cuenta con una amplia información genética del maíz.
- 2.- En el embrión del maíz se encuentran dos órganos bien definidos con funciones diferentes, el escutelo y el eje embrionario. Debido a su tamaño, estos órganos se pueden separar con cierta facilidad, circunstancia que no se presenta en otros cereales.

El escutelo es un tejido totalmente diferenciado que no se va a dividir durante la germinación, a través del cual se transportan los metabolitos hacia el eje embrionario. El eje embrionario por su parte, tiene una función diferente; sus tejidos se van a dividir y a diferenciar para dar lugar a una plántula.

Considerando lo anterior sería de esperarse que ambos tejidos sinteticen un determinado número de proteínas comunes, que serían las requeridas para mantener las funciones vitales de las células, pero además, otras específicas para sus funciones. El eje embrionario debería por tanto sintetizar las proteínas requeridas para llevar a cabo la germinación.

Los estudios se realizarán entre 0 y 6 horas y 18 y 24 horas de germinación, debido a que son dos períodos diferentes de desarrollo, uno temprano (0-6 horas), en el cual el embrión reinicia su actividad metabólica después de haber permanecido en estado quiescente, y el otro tardío (18-24 horas) en donde ya se inicia la protrusión de la radícula.

RESULTADOS.

Los resultados se agruparon en los siguientes tres trabajos:

- I.- Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination.
- II.- Aminoacid pools and protein synthesis in germinating maize embryos.
- III.- Protein Synthesis Patterns.
Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos.

Estos trabajos se encuentran ya publicados y se anexan los reimpresos correspondientes.

Los aspectos más sobresalientes de estos escritos se pueden resumir como sigue:

- I) El primero aporta información sobre el contenido de ARNm almacenado en el embrión quiescente, la formación de polisomas y la capacidad de síntesis de proteínas durante las primeras 24 horas de la germinación. También se estudió el tiempo en que se expresan los nuevos mensajes por medio de la utilización de α -amanitina.

- II) En el segundo trabajo se obtuvo información sobre la variación de los aminoácidos en el eje embrionario a las 0, 6 y 24 horas de germinación y su relación con el tipo de proteínas sintetizadas, utilizando aminoácidos específicos marcados radiactivamente.

- III) En el tercer trabajo, se estudiaron las proteínas sintetizadas tanto en el eje embrionario como en el escutelo del maíz durante un período temprano (0-6 h) y otro tardío (18-24 h) de germinación, en el caso del eje embrionario también se estudiaron en presencia de α -amanitina. Las proteínas fueron analizadas por electroforesis en dos dimensiones y fluorografía.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Artículo I.

Los datos indican que los embriones de maíz contienen ARNm almacenados en cantidades similares a las reportadas para otros cereales (Tabla 1). Sin embargo la velocidad de síntesis de proteínas no es comparable a la de otros cereales ya que es mucho más lenta (Fig. 1) lo cual sugiere que el ARNm no es un factor limitante para dicha síntesis.

Con respecto a los polisomas se encontró que en el estado seco no hay presencia de ellos y que durante la germinación se van formando (Fig. 2). Sin embargo el contenido neto de polisomas de maíz no parece incrementarse paralelamente al incremento de la velocidad de síntesis de proteínas observado durante la germinación (Fig. 1).

Con el uso de α -amanitina se pudo observar que en el periodo temprano (0-6 h) la síntesis de proteínas es codificada principalmente por los ARNm preformados a diferencia del periodo tardío de germinación (18-24 h) en que ya es significativa la cantidad de ARNm de novo que se está expresando.

Artículo II.

Los experimentos de marcaje de proteínas utilizando un aminoácido de tipo neutro (leucina ^{14}C) y otro de tipo básico (lisina ^{14}C) mostraron que ambos aminoácidos se incorporaron en mayor proporción entre 18 y 24 horas que entre 0 y 6 horas (Tabla 1); sin embargo se incorporó 4.5 veces más lisina que leucina, en el período tardío.

Estos resultados (Tabla 1) y el hecho de que al analizar las proteínas sintetizadas por electroforesis y fluorografía (Fig. 2), algunas bandas resultaran más acentuadas entre 18 y 24 horas cuando fue utilizada lisina ^{14}C , sugieren que en el período tardío de la germinación del maíz se están sintetizando proteínas del tipo básico.

Se ha reportado que en algunas semillas como Vicia faba, hay un incremento de la síntesis de histonas previo a la síntesis del ADN (Funkuel, 1978).

Considerando que en maíz la síntesis de ADN se presenta en una mayor velocidad entre 24 y 40 horas después de iniciada la germinación (J. Vázquez, comunicación personal) y el hecho de que entre los aminoácidos que más se incrementan durante la germinación están lisina y alanina (Fig. 1) los

cuales son constituyentes abundantes de las histonas vegetales (Spithir, 1982) nos sugiere que una parte de las proteínas básicas que se están sintetizando en el período tardío son histonas.

Artículo III.

La síntesis de proteínas se presenta desde las primeras 6 horas de germinación, sin embargo la velocidad de esta síntesis no es homogénea, ya que se acelera significativamente entre las 12 y 24 horas. En base a estos resultados, para el tercer trabajo se eligieron dos períodos del proceso, uno temprano (0-6 h) y el otro tardío en el cual el proceso de germinación está más avanzado.

El análisis de peso fresco de estos embriones muestra un incremento brusco en las primeras horas de germinación, posteriormente una etapa sin cambios y finalmente un mayor incremento en la etapa en donde protruye la raíz (Fig. 1). En este tercer trabajo se obtuvo una mejor separación de las proteínas con la electroforesis en dos dimensiones usando anfolitas con rangos de pH de 3.5 a 10 y de 5 a 8, por lo que se evidenció más claramente las diferencias en los patrones específicos de proteínas sintetizadas en los dos períodos estudiados (Fig. 2).

Estos resultados están de acuerdo a lo reportado para el trigo en donde se obtuvieron diferentes patrones de síntesis de proteínas a 1 hora y a 5 horas de imbibición tanto in vivo como in vitro (Lane, 1981), así mismo se ha reportado que en Castor bean (Martin, 1981) y en algodón (Dure, 1981) también se obtuvieron patrones diferentes entre un período temprano y otro tardío de germinación.

Con respecto al escutelo se encontró que el patrón de proteínas es muy similar al del eje en el período temprano (Fig 24 y Fig. 4A), lo cual sugiere que las proteínas comunes entre estos dos tejidos diferentes son las que mantienen las funciones básicas, (house keeping) (Dure, 1980).

En el segundo período ya se encontraron diferencias más importantes entre los dos tejidos, (Figs. 2B y 4B) lo cual concuerda con el hecho de que cada tejido tiene un papel muy diferente durante la germinación y por lo tanto cada tejido requerirá de diferentes proteínas para cumplir esas funciones.

Al utilizar α -amanitina ya sea entre 18 y 24 horas de imbibición y/o puesta desde el tiempo cero (inicio de la imbibición), se encontró que los patrones proteicos eran bastante similares con y sin α -amanitina (Fig. 3), lo cual sugiere que la mayoría de las proteínas codificadas por los

ARNm de novo formados en este período contienen información similar a la expresada por los ARNm almacenados. Por otro lado el patrón de proteínas sintetizadas entre 18 y 24 horas en presencia de α -amanitina es diferente del patrón obtenido para el período de 0-6 horas (Figs. 2 y 3), a pesar de que existe un 50% de inhibición total en la síntesis de proteínas (Tabla 1).

Estos datos sugieren que las proteínas que están presentes entre 18 y 24 horas con y sin α -amanitina pero que no están presentes entre 0 y 6 horas pertenecen a proteínas codificadas por ARN mensajeros de larga vida, presentes en el eje embrionario pero que se tradujeron hasta el período tardío. Esto podría interpretarse como la existencia de un mecanismo regulatorio selectivo presente en las células, el cual modularía la traducción de los mensajeros almacenados en la semilla seca. Este mecanismo podría referirse a procesamiento postranscripcional del ARNm almacenado ya que se ha reportado que durante la germinación del rábano hay un activo procesamiento postranscripcional (Delseny, 1981).

En erizo de mar se reportó que el ARNm almacenado en el oocito no es expresado mientras no se alcance cierto grado de desarrollo (Thomas, 1982) y se ha sugerido al igual que en trigo, la presencia de un mecanismo de control a base de proce-

samiento postranscripcional, (Lane, 1981).

También existe la posibilidad de que en el segundo período, exista una competencia entre los ARNm nuevos y los almacenados para ser traducidos, como se ha sugerido para el trigo (Brooker, 1977), una situación semejante a la que ocurre con las infecciones virales en donde el ARNm de las proteínas del virus se traducen prioritariamente a los de la célula parasitada, los cuales parecen desensamblarse de los ribosomas nativos, para dejar su lugar a los ARNm nuevos (Cohen, 1968). Si este fuera el caso, se esperaría que algunos ARNm nuevos contuvieran alguna señal en la zona de secuencias no codificante de la proteína, que le permitiera reconocer con mayor afinidad a los ribosomas.

Alternamente, se podría postular que esta mayor afinidad estuviera dada por cambios estructurales en los ribosomas, acaecidos durante la germinación, los cuales cambiarían su afinidad por ciertos ARNm prioritariamente a otros, logrando además una mayor eficiencia en la traducción.

CONCLUSIONES.

Con los resultados experimentales, podemos afirmar que la hipótesis presentada es verdadera en términos generales.

- 1) El embrión de maíz al igual que los embriones de otras semillas conservan durante el estado de quiescencia una cierta cantidad de ARN mensajeros, los cuales son traducidos en las primeras 24 horas de germinación.
- 2) La síntesis de proteínas del período temprano (0-6 horas) depende en su gran mayoría de los mensajeros almacenados, mientras que la del período tardío (18-24 horas), solamente depende parcialmente de ellos ya que los ARNm de novo ya son significativos. En el segundo período se vé incrementada significativamente la síntesis de proteínas y además presenta la protrusión de la radícula (23.5 horas).
- 3) Al estudiar el escutelo y el eje embrionario, órganos muy diferentes que constituyen al embrión, encontramos que en la primera etapa del desarrollo (0-6 horas), el patrón electroforético tanto del eje embrionario como del escutelo son muy semejantes entre sí, sin embargo al haber un mayor desarrollo (18-24 horas), los patrones electroforéticos se vuelven diferentes.

Ambos patrones conservan un grupo de proteínas comunes, las cuales pueden corresponder a las proteínas que mantienen

las funciones vitales de las células que los constituyen.

Otras proteínas que van apareciendo en los tejidos del eje embrionario corresponderían a las requeridas para la germinación.

- 4) La información genética codificada en los ARNm sintetizados de novo en el período tardío, es similar a las de los ARNm almacenados.
- 5) Entre las proteínas sintetizadas por el eje embrionario al final del período de germinación se encuentran proteínas de tipo básico, las cuales podrían corresponder a histonas o a proteínas ribosomales, sin embargo, esto requiere de mayores estudios para poder ser confirmado.
- 6) Existe un mecanismo específico de regulación que modula la expresión de los ARNm almacenados o de larga vida durante el proceso de germinación.

BIBLIOGRAPHIA

1. Ajtkhozhin, M.A., K.J. Doschanov and A.G. Akhanov. (1976). Informosomes as a stored form of mRNA in wheat embryos. FEBS Letters, 66: 124-126.
2. Bewley, J.D. and M. Black. (1978). Physiology and Biochemistry of seeds. Springer verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y. Vol. 1.
3. Bewley, J.D. (1979). Physiological aspects of desiccation tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 195-238.
4. Brooker, J.D., C.P. Cheung C.P. and A. Marcus. (1977). Protein synthesis and seed germination in: The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Elsevier North Holland Biomedical Press. 347-356.
5. Brooker, J.D., M. Tomaszewski and A. Marcus. (1978) Preformed messenger RNAs and early wheat embryo germination. Plant Physiol. 61: 145-149.
6. Caers, L.C., M.J. Peumans and A.R. Carlier. (1979). Preformed and newly synthesized messenger RNA in germinating wheat embryos. Planta. 144: 491-496.
7. Chen, D., Sarid, S. and Katchalsky, E. (1968). Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60 : 902-907.
8. Cheung C.P., J. Wu, and R.J. Suhadolnik (1979). Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryos. Nature 277: 66-67.
9. Cohen, S.S. (1968). Virus-Induced Enzymes, Columbia University Press. New York.

10. Delseny M., L. Aspar and R. Cooke (1981).
Studies on ribonucleic acids during radish seed germination: A search for potential regulatory mechanisms. *Israel J. Bot.* 29: 246-258.
11. Deltour, R. (1977).
Etude autoradiographique de la reprise des synthèses de protéines dans l'embryon de zea mays au début de la germination. *R.C. Acad. Sc. Paris* 284: 1643-1675.
12. Dure L.S. (1977) Stored messenger ribonucleic acid and seed germination. In: *The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and Germination*, Elsevier North Holland Biomedical Press. A.A. Khan Ed. 335-345.
13. Dure, S.L., M.A. Capdevilla and C.S. Greenway. (1980)
In: *Genome organization and expression in plants*. C.J. Leaver, ed. Plenum Publishing Corp. New York. pp. 127.
14. Dure III L.S., G.A. Galau, and C.S. Greenway. (1981)
Changing protein patterns during cotton cotyledon embryogenesis and germination as shown by in vivo and in vitro synthesis. *Ibid.* 293-306.
15. Funkuel, K., K. Yakura, and A. Tanifujo. (1978). Non-coordinated histone synthesis with DNA replication and close temporal association of ribosomal proteins and rRNA synthesis in germination *Vicia faba* embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 518: 390-400.
16. Gordon E.M. and P.I. Payne (1976). In vitro translation of the long lived messenger ribonucleic acid of dry seeds. *Planta* 130: 269-273.
17. Hamabata, A.; J.L. Martínez (1980). El papel del agua en la germinación de las semillas. *Mensaje Bioquímico* 3: 105-138.
18. Henson, D., A. Schmidt, S. Seal, and A. Marcus (1979).
Competitive mRNA translation in an in vitro system from wheat germ. *J. Biol. Chem.* 254: 8245-8249.

19. Hlynka, L., and Robinson, A.D. (1954). Moisture and its measurement. In "Storage of Cereal Grain and their Products" J.A. Anderson and A.W. Alcock, eds., pp. 1-12. Ass. Amer. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota.
20. Ihle, J.N. and Dure, L.S. (1969) Synthesis of protease in germinating cotton cotyledons, catalyzed by mRNA synthesized during embryogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36: 705-710.
21. Jendrisak, J. (1980). The use of α -amanitin to inhibit in vivo RNA synthesis and germination in wheat embryos. J. Biol. Chem. 255: 8529-8533.
22. Jirgensons, B. (1962), Natural Organic Macromolecule. Pergamon, Oxford.
23. Kiesselbach, T.A. (1949). The structure and reproduction of corn. Univ. of Nebraska, Coll. of Ag. Bull. Res. Num. 161.
24. Lane, B.G. and T.D. Tumaitis-Kennedy. (1981). Comparative study of levels of secondary processing in bulk mRNA from dry and germinating wheat embryos. Eur. J. Biochem. 114: 457-463.
25. Marré, E. (1967). Ribosome and enzyme changes during maturation and germination of the Castor bean seeds. Curr. Top. Develop. Biol. II, 76.
26. Marsh, L., K. Datta and A. Marcus. (1982). Germination of wheat embryos and the transport of aminoacids into a protein synthesis precursor pool. Plant Physiol. 79: 67-73.
27. Martin, C. and D.H. Northcote. (1981). Qualitative and Quantitative changes in mRNA of Castor beans during the initial stages of germination. Planta 151: 189-197.

28. Mayer A.M., J. Marbach. (1980). Biochemistry of the translation from resting to germinating state in seeds. In: Progress in Phytochemistry. L. Reinhold J.B. Harbrone and T. Swain eds. Pergamon Press Oxford.
29. Payne, P. (1976). The long-lived messenger RNA of flowering plant seeds. Biol. Rev. 51: 329-363.
30. Peumans, W.J., L.I. Caers and A.R. Carlier. (1979) Some aspects of the synthesis of long-lived messenger ribonucleoproteins in developing rye embryos. Planta 144: 458-490.
31. Pradet, A., Armuga Kannud, N., and Vermeersech, J. (1968). Plant tissue AMP, ADP, and ATP III. Energy metabolism during the first stages of germination of lettuce seeds. Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg. 14: 107.
32. Robinson, N.E. and J.A. Bryant (1975) On set of nucleic acid synthesis during germination of pisum sativum L. Planta 127: 63-68.
33. Spiker, S. Histone variants in plants. (1982). J. Biol. Chem. 257: 14250-14255.
34. Takaiwa, F. and S. Tanifuji. (1979). RNA synthesis in embryo axes of germinating pea seeds. Plant Cell Physiol. 20: 875-884.
35. Thomas, T.L., R.J. Britten and E.H. Davidson. (1982). An interspersed region of the sea urchin genome represented in both maternal poly A RNA and embryo nuclear RNA. Develop. Biol. 94: 230-239.
36. Van de Walle, C. and R. Deltour (1974). Presence of heterodisperse nuclear RNA in a plant Zea mays. Febs Letters 49: 87-91.

37. Van de Walle, C. and G. Bernier. (1976). Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. *Plant Physiol.* 157: 632-639.
38. Van de Walle, C., R. Deltour and G. Forgeur. (1983). Species of RNA synthesized during early germination in the radicle of the lentil embryo. *Physiol Plant.* 57: 181-188.
39. Villiers, T.A. (1972). Seed dormancy in *Seed Biology* T.T. Kozlowski, ed. Vol. 2, pp. 219-281. Academic Press. New York.
40. Waters, L.C and Dure, L.S. (1966). Ribonucleic acid synthesis in germinating cotton seed *J. Mol. Biol.* 19: 1-5.
41. Weeks, D.P. and A. Marcus . (1971). Preformed messenger of quiescent wheat embryos. *Biochem. Biophys. Acta* 232: 671-84.
42. Wolf, M.J., C.L. Buzan, M.M. Mac Masters and C. E. Rist. (1952). A structure of the mature corn Kernel I. Gross anatomy and structural relationship. *Cereal Chem.* 29: 321-333.
43. Wolf, M.J., C.L. Buzan, M.M. Mac Masters and C.E. Rist (1952). b Structure of the mature corn Kernel II. Microscopic structure of pericarp seed coat, and hilar layer of dent corn. *Cereal Chem.* 29: 334-348.

DISTINCTIVE CHARACTERISTICS OF PROTEIN SYNTHESIS IN MAIZE EMBRYOS
DURING THE EARLY STAGES OF GERMINATION.⁺

E. SANCHEZ DE JIMENEZ, R. AGUILAR, and S. LOPEZ

Biochemistry Department
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
México 20, D.F.

Received January 19, 1981

SUMMARY - Quiescent maize embryos were found to contain significant amounts of poly-A-rich pre-formed RNA. ¹⁴C-amino acid incorporation into trichloroacetic acid precipitable material was detected at slow rate at the beginning of imbibition and fastly increased near 18 to 24 h. Polysomal formation was measured during this period. Addition of α-amanitin to the incubation system at two 6h-pulse periods showed significant inhibition of the ¹⁴C-amino acid incorporation for the 18-24 h-period, but not for the 0-6 h-period.

INTRODUCTION

The existence of a precise biological clock controlling the synthesis of macromolecules in seed embryos following imbibition has been suggested (1-3). Embryos of wheat, rye, cotton and pea have been reported to contain a stock of pre-formed mRNA molecules (4-6), which seem to support the initial period of protein synthesis following imbibition (7-8). There is, however, no agreement about the role of these mRNA(s) in germination and further embryo development.

With regard to maize, there is only some preliminary data on this subject (9,10), but there is a lack of information about the early events related to resumption of protein synthesis on germinating embryos. Due to the importance of understanding phenomena such as vivipary in maize, the present work was undertaken in an effort to shed some light on the above subject.

⁺ Grant No. PCAFNAL-790382 from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México).

The maize embryos were provided by Dr. Evangelina Villegas from CIMMYT (International Center for the Improvement of Wheat and Maize).

MATERIALS AND METHODS

Two varieties of *Zea mays* L. (Crystalline yellow Bajio and Yellow Opaque 2) and *Triticum aestivum* var. Potam were used as sources of embryos. The seeds were dissected manually.

Batches of 100 to 250 mg of axes or 100 mg of scutella were vacuum infiltrated at 0°C for 20 min and further incubated in a shaking water bath at 25°C in a mixture of 0.3 ml or 1.0 ml containing: 10 to 20 μ Ci of ^{14}C -amino acid mixture (0.1 mCi/mM), 10 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris buffer pH 7.6, 10 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol and 2% sucrose. For some experiments, α -amanitin (10 $\mu\text{g/ml}$) was added to the system. The reaction was stopped by cooling at 0°C, and the tissues rinsed with cold water, and frozen until used.

Protein fractionation - Frozen samples of either maize axes or scutella or wheat embryos were ground in a mortar, and homogenized in polytron in 6.5 ml of 0.01 M MgCl_2 , 0.05 M KCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6 and 0.005 M B mercaptoethanol. The homogenate was centrifuged at 15 000 x g for 10 min and again at 105 000 x g for 3 h. The supernatant was precipitated with an equal volume of 10% trichloroacetic acid (TCA). The precipitate was dissolved in 0.1 M NaOH and proteins determined by Lowry's Method (11). Aliquots of 10 μl were mixed with 10 ml of Bray's solution and counted in a Packard Scintillation counter. The size of total amino acid pools were measured by the ninhydrin method in an aliquot of the TCA supernatant. 10 μl of the sample were used for radioactive determinations.

Ribosome analysis - The ribosomal pellet was obtained by Beachy et al. method (12), and was purified through 3.0 ml of a 1.0 M sucrose cushion and resuspended in 0.25 ml of 0.02 M KCl, 0.001 M Mg acetate, 0.04 M tris-acetate (pH 8.0). The samples were clarified at 10 000 x g for 15 min and analysed in a 12.5-50% sucrose gradient, in 0.04 M Tris buffer (pH 8.0), 0.02 M KCl, 0.01 M MgCl_2 performed in 17.0 ml tubes of SW 27 Spinco Rotor. The gradients were centrifuged at 26 000 rpm for 2.5 h, fractioned, and U.V. recorded.

TABLE 1

RNA CONTENT OF MAIZE SCUTELLA AND AXES AND WHEAT EMBRYOS

15 to 20 mg of total RNA from either wheat embryos or maize axes or 1 mg of scutellum RNA were fractionated in 5 ml oligo-dT chromatography column. The amount of RNA eluted at 0.1 M Tris buffer pH 7.6 was recorded as poly A(+) RNA. Each value represents the average of 3 or 4 repetitions.

BIOLOGICAL MATERIAL		RNA mg/10 g tissue	Poly A (-) RNA (%)	Poly A (+) RNA (%)
Maize	var. Opaque	16.59	98.73	1.23
Axes	var. Bajfo	18.33	98.90	1.10
Maize Scutellum		0.53	80.51	19.48
Wheat embryo		13.90	99.28	0.72

Polysomal RNA was extracted by the procedure of Marcus et al. (13) and fractionated by an oligo-dT cellulose column (14).

RESULTS AND DISCUSSION

Total RNA from maize scutella or axes was fractionated through and oligo-dT cellulose column (Table 1). Quiescent maize embryos were found to contain significant amounts of pre-formed mRNAs similarly as has been reported for embryos of other gramineae (2,3). It is interesting to notice that maize scutellum, a nondividing embryonic tissue, contains much smaller amounts of total and poly A⁺ RNA per gram of tissue (Table 1). This noticeable difference might be related to the specific role for the preformed mRNA in dividing tissues of the embryo during germination (1).

Maize embryos (axes or scutella) or wheat embryos were incubated separately for different times, with a mixture of ¹⁴C-amino acids as described in the methods. As shown in figure 1, the incorporation of amino acids into an acid insoluble fraction can be detected very soon after imbibition is initiated. Incorporation proceeds in maize axes at low

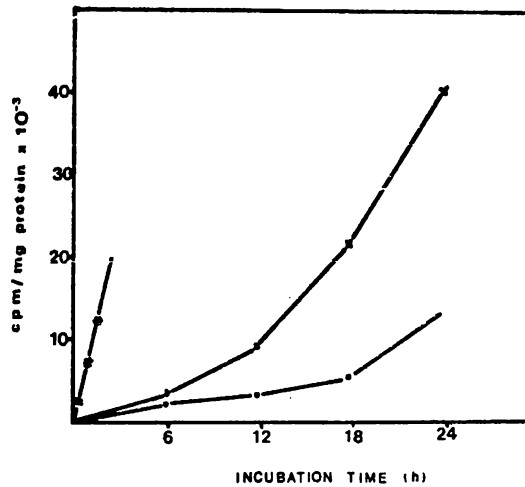


FIGURE 1

Total amino acid incorporation into TCA precipitable material.- Maize embryos axes (x--x) and scutella (0-0) were incubated separately in a mixture of ^{14}C -amino acids (10 to 20 μCi) at 25°C during 6, 12, 18 and 24 h. Wheat embryos (*-*) during 0.5, 1.0 and 1.5 h. These values have been corrected by the pool size of labeled amino acids in the cell homogenate.

rate up to approximately 12 h, and it increases while approaching 18-24 h. The initial rate of incorporation in wheat embryos is 8 times higher than in maize axes. (Data corrected by labeled amino acid pools).

Analysis by sucrose gradient centrifugation of the ribosomal fraction was carried out in samples of maize axes at 0, 6, 18 and 24 h of imbibition and at 0 and 6 h, in samples of wheat embryos as a control. Wheat and maize samples showed no polysomes at the dry stage (Figure 2). The characteristic polyribosomal profile was obtained for both after 6 h of imbibition. After 18 to 24 h of imbibition, the polysomal fraction of maize axes did not further increase significantly.

The effect of α -amanitin was analysed at two different 6 h ^{14}C -amino acid pulse periods: between 0-6 h and 18-24 h of imbibition. Total amino acid pools were also measured for both periods. The results indicate that, in the absence of α -amanitin, the amount of labeled amino acid incorporated into trichloroacetic precipitable material is significantly greater for the 18-24 h than for the 6 h period (24,000 vs. 12,600 cpm/mg of protein respectively) as expected from the results showed in

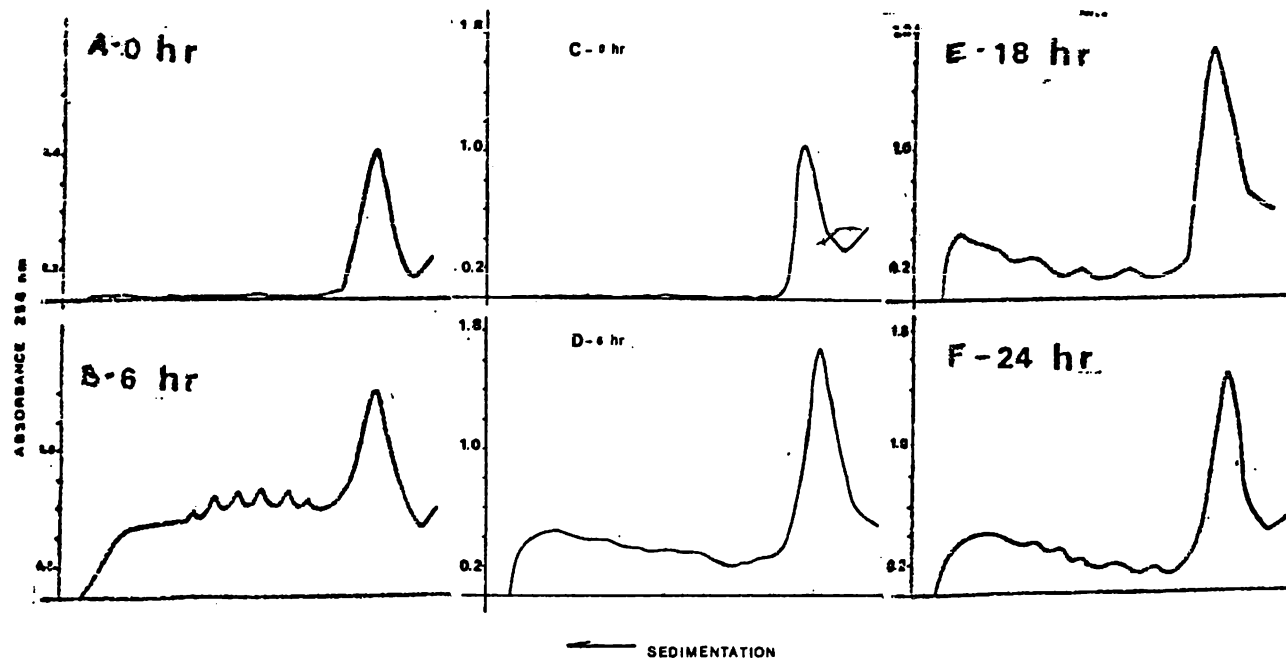


FIGURE 2

Sucrose gradient sedimentation of polyribosomes.- Approximately 6 A₂₆₀ units of polyribosomes extracted from either maize axes or wheat embryos (200 mg) were sedimented on 12.5 to 50% linear sucrose gradient, and monitored at 254 nm in a LKB 8300 Uvicord II with a Beckman recorder 10". Different times of incubation were applied to the samples as follows: A-Wheat 0 h, B-Wheat 6 h, C-maize 0 h, D-maize 6 h, E-maize 18 h, F-maize 24 h.

Figure 1. The α -amanitin inhibited significantly the amino acid incorporation during the 18-24 h period (47.5%) while it has a negligible effect during the 0-6 h period (5%). These experiments have been repeated 3 times with ^{14}C -amino acid mixture and 3 times with specific ^{14}C -amino acids (leucine or lysine) with very similar results. Therefore, it can be stated that the process of protein synthesis in maize, is mainly supported by the pre-formed mRNA during the early stages of germination. The translation of the newly synthesised mRNA seems, however, to be delayed. The effect of α -amanitin in maize axes is noticeable up to 18-24 h of imbibition, while in wheat embryos it is already significant after 5 h of imbibition (15).

The rate of protein synthesis, as well as the amount of polysomal fraction observed during the early stages of germination (figs 1 and 2)

are significantly lower in maize axes than the observed for wheat embryos, (monosome to polysome ratio: 0.62 and 0.88 respectively), regardless of the amounts of pre-formed mRNA present (Table 1), and much smaller than the capacity displayed by full active plant tissues (16). These findings suggest that the onset of protein synthesis in germinating maize embryos, is not limited by the amount of mRNA. This process should rather be controlled by other factor(s) which might determine the rate of translation (17) and even the type of messages to be translated, as seems to be the case for fertilized sea urchin eggs (18). The apparent increase in efficiency of translation observed in maize axes between the 0-6 and the 18-24 h-period, concomittant to the change from preferential translation of pre-formed to newly synthesised mRNA, seems to be in accordance with this hypothesis.

REFERENCES

1. Dure, S. L. (1977) In: The Physiology and Biochemistry Seed Dormancy and Germination. Elsevier North Holland Biomedical Press. pp. 335.
2. Gordon, E. M. and Payne, P. I. (1976) *Planta* **130**: 269.
3. Bewley, J. D. (1979) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30**: 195.
4. Weeks, P. D. and Marcus, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **232**: 671.
5. Ajtkhozhin, M. A., Doschanov, K. H. J. and Akhanov, A. U. (1976) *Febs Lett.* **66**: 124.
6. Caers, L. I., Reumans, W. J. and Carlier, A. R. (1979) *Planta* **144**: 491..
7. Spiegel, S., Obendorf, L. and Marcus, A. (1975) *Plant Physiol.* **56**: 502.
8. Tobías, A., López, S. and Sánchez de Jiménez, E. (1976) *J. Cell Biol.* **20**: 302.
9. Van de Walle C. and Bernier, G. (1976) *Plant Physiol.* **157**: 632.
10. Deltour, R. (1977) *R. C. Acad. Sc. Paris.* **284**: 1643.
11. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
12. Beachy, R. N., Thompson, J. F. and Madison, J. T. (1978) *Plant Physiol.* **61**: 139.
13. Brooker, J. D., Tomaszewski, M. and Marcus, A. (1978) *Plant Physiol.* **61**: 145.
14. Aviv, H. and Leder, P. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1412.
15. Thompson, E. and Lane, B. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 5965.
16. Ruzicska, P., Mettrie, R., Dorokhov, L., Premecz, G., Olah, T. and Farkas, G. L. (1979) *Planta* **145**: 199.
17. Dure, S. L., Capdevila, M. A. and Greenway, C. S. (1980) In: *Genome Organization and Expression in Plants* (C. J. Leaver, ed.) Plenum Publishing Corp. New York. pp. 127.
18. Woods, D. E. and Fitsche, W. (1978) *Cell Differentiation.* **7**: 103.

Amino acid pools and protein synthesis in germinating maize embryos

Julio Aguilar and Estela Sanchez de Jimenez

Instituto de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF

Received February 17, 1984/Revised version received August 1, 1984 - Communicated by O. L. Gamborg

ABSTRACT

Amino acid pools were analyzed in maize (*Zea mays* L.) axes germinated for 0, 6 and 18 h. Proteins synthesized at early (0-6 h) and late (18-24 h) stages were characterized by gel electrophoresis and fluorography after labeling with either ^{14}C -leucine or ^{14}C -lysine pulses. An increase of amino acid incorporation after 18-24 h was observed, as well as changes in protein patterns of the corresponding autoradiographs. Analysis of the endogenous amino acid pools showed major changes in contents of proline, alanine, isoleucine, valine, leucine and lysine. A selective increase in lysine incorporation into proteins during the late stage was detected.

INTRODUCTION

Cereal embryos re-establish metabolic activity following imbibition (Bewley and Black 1978). Protein synthesis is one of the major molecular events taking place in this period (Brooker et al. 1977). Several authors have shown that the proteins synthesized during germination are essential for further growth and plantlet development (Jendrisak 1980, Gatta et al. 1983). Among these, the ribosomal proteins have been identified as being synthesized early during wheat germination (Gatta and Tumaitis-Kennedy 1981), while histones seem to be produced later in maize embryos (Van de Walle and Deltour 1974). On the other hand, there is conflicting information regarding the similarity or differences between early and late proteins produced during germination (Brooker et al. 1978, Caers et al. 1979). These contradictory observations might be the result of the specific developmental programs for RNA synthesis that seem to characterize different kinds of seeds (Van de Walle et al. 1983). Therefore, data obtained in one species might not apply to another. Furthermore, differences in the endogenous amino acid pools might regulate the rate of protein synthesis during seed germination (Marsh et al. 1982).

Under the Academic Collaboration Program between the Universidad Nacional Autónoma de México and the Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

The aim of the present paper is to inquire about specific changes in protein synthesis taking place in maize embryos concomitant to the germination process and their relation to their free amino acid contents. Two stages of germination were chosen for this purpose: 0-6 h, when metabolic activity is beginning, and 18-24 h, before radicle protrusion is observed (23.5 h average) and cell division is initiated.

MATERIALS AND METHODS

A hybrid variety of maize (*Zea mays* L.) (H-30) donated by Dr. Joaquín Ortiz-Cereceres, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, was the source of the biological material. Embryonic axes without scutellum were excised from dry seeds and used in all the experiments.

Incubation system. Batches of 100 to 150 mg of axes were incubated at 25°C in an incubation medium (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ and 2% sucrose). A mixture made of 0.03 mM of each of the following amino acids was supplied to the incubation system, except for the experiments where the internal amino acid pools were determined: alanine, valine, proline, arginine, glycine, isoleucine, threonine, serine, tryptophan, cysteine, glutamate, aspartate, glutamine, asparagine, tyrosine, histidine, methionine, phenylalanine, and either leucine or lysine depending on the ^{14}C -amino acid supplied. 20 μCi of either ^{14}C -leucine (314 mCi/mmol) or ^{14}C -lysine (285 mCi/mmol) (New England) were applied for a 6 h period at either 0 or 18 h of incubation. After the incubation period, the tissues were washed, frozen and homogenized in buffer (50 mM Tris pH 7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoethanol) with a mortar and pestle and centrifuged at 15,000 g for 30 min. The supernatant was again centrifuged at 190,000 g for 80 min.

Proteins were precipitated from the supernatant with trichloroacetic acid (final concentration of 5%), centrifuged and resuspended in water, neutralized with 0.5 M KOH and this process was repeated twice. Proteins were assayed by the Lowry method (Lowry et al. 1951) using bovine serum albumin (Sigma) as the standard. Radioactivity was determined in 100 μl of protein samples with 10 ml of

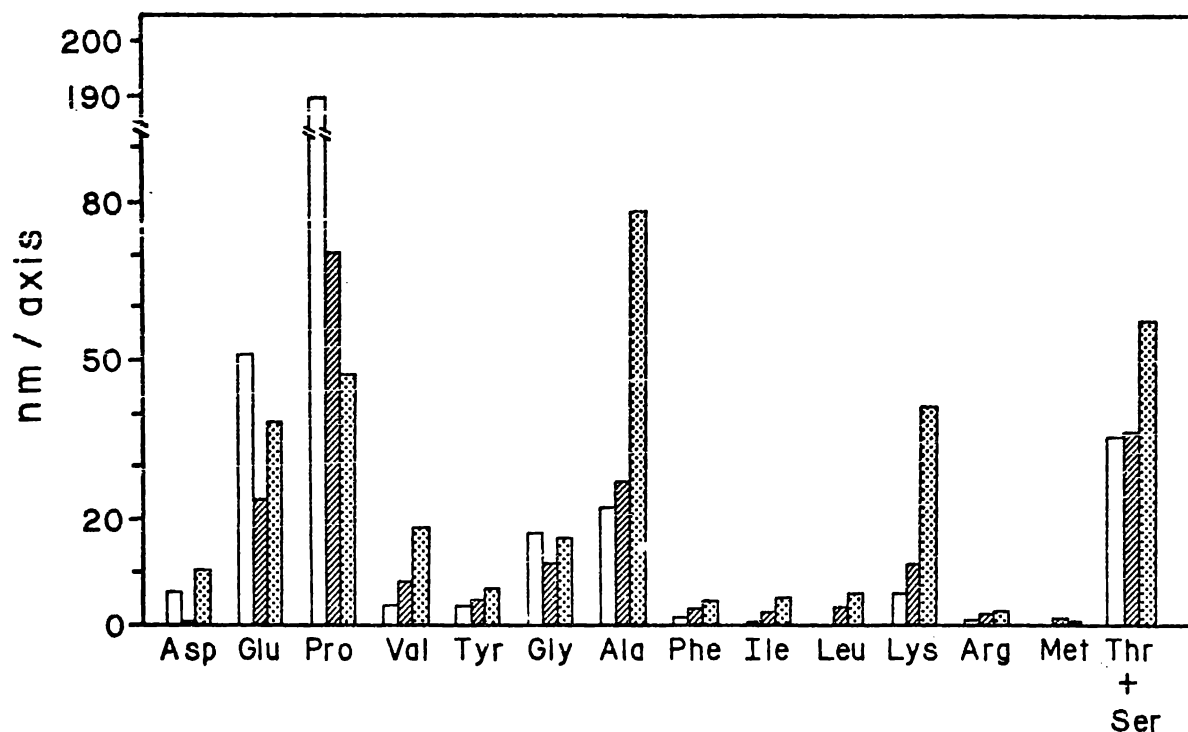


Figure 1. Composition of the free amino acid pool at three stages of development. Batches of 100 axes were incubated at 25°C in buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.6, for 0 (□), 6 (▨) and 24 (▩) h. Samples were processed as explained in Material and Methods. Amino acid pools were measured in a Beckman Autoanalyzer.

scintillation mixture (Bray 1964) in a packard scintillation counter.

Gel electrophoresis of radioactive proteins.

Radioactive ^{14}C -amino acid proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), using a stacking gel of 5% and a resolving gel of 7-15% gradient of polyacrylamide (Laemmli 1970).

Fluorographs were prepared by exposing Kodak X-0 mat S-5 film to the dried gel at -70°C (Bonner and Laskey 1974), 20×10^3 counts/min were applied per channel.

Amino acid analysis. Proteins from the post-ribosomal supernatant were precipitated with sulfosalicylic acid (35 mg/ml) and centrifuged at 3,500 rpm for 15 min. Amino acid analysis was carried out on the supernatant using a Beckman model 120 B amino acid analyzer, on physiological mode following Pickering and Soto (1978).

RESULTS AND DISCUSSION

The pool of amino acids from embryonic axes at 0, 6 and 24 h of germination were analyzed (Fig. 1). For most of the amino acids, there is a slight increase in the amino acid content from zero to 24 h of germination; leucine, valine, isoleucine, alanine and lysine, however, increase from 3.5 to 9.7 times. On the other hand, three of the amino acids decrease during this period: aspartic acid, glutamic acid and proline; the later decreases to about a third of its original value. Leakage of amino acids was tested in the system. After 24 h of incubation, proline is the main amino acid present in the surrounding medium. Its concentration, however, does not represent more than 20% of the original amount found in the dry embryonic axis. Methionine is not detected in the dry axis, but detectable amounts occur at 6 and 24 h. This amino acid however, might be underestimated

due to loss during the extraction procedure. Proline, on the other hand, is much more abundant in the dry embryo than any other amino acid. In order to detect major changes in the types of proteins being synthesized during this period, leucine and lysine were chosen for the pulse labelling experiments. Both of them increase significantly in concentration from zero to 24 h of germination, and lysine is characteristic of basic proteins like H_1 , H_2A and H_3B plant histones (Spithir 1982), whose synthesis might be expected during this period.

Pulse labelled experiments with either ^{14}C -leucine or ^{14}C -lysine were carried out for 6 h and the proteins from 0-6 h and 18-24 h were TCA precipitated and counted. The amount of amino acid incorporated per milligram of protein was determined after correction for amino acid pool size. Results indicated a larger incorporation of both amino acids in the proteins synthesized from 18-24 h than from 0-6 h.

Table 1. Amount of ^{14}C -amino acid incorporated in proteins. Embryonic axes (150 mg) were pulse-labelled (20 μCi) at 0-6 or 18-24 h with ^{14}C -leucine or ^{14}C -lysine.

Amino Acid	Pulse time (h)		Relative Increment
	0-6	18-24	
	nmoles of amino acid/mg protein		18-24 / 0-6
^{14}C -leucine	2.44	45.80	18.80
^{14}C -lysine	6.51	202.47	31.10
Ratio			
Lysine/Leucine	2.66	4.41	1.65

The increments are not similar, however, since the lysine/leucine ratios significantly increase in the 18-24 h period. (Table 1).

The labelled proteins were also analyzed by gel electrophoresis and fluorography.

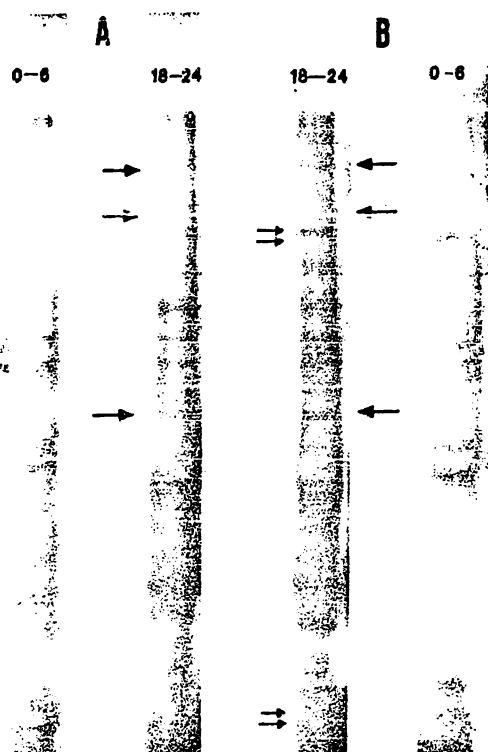


Figure 2. Fluorographs of the SDS-polyacrylamide gel profiles of the proteins synthesized between 0-6 or 18-24 h. Embryonic axes were labelled with either ^{14}C -leucine (A) or Lysine (B). Proteins were separated by PAGE-SDS and detected by fluorography.

Major changes can be observed in the corresponding fluorographs (Figure 2). Several bands are clearly apparent in the 18-24 h period (arrows, Figure 2), which are not seen in the 0-6 h patterns. Some of them are more pronounced in the 18-24 h ^{14}C -lysine pattern (double arrows, Figure 2). These data indicate quantitative as well as qualitative changes in the proteins being synthesized during both periods. It is known that proteins synthesized in the early stages of germination are mainly coded for by preformed mRNAs (Brooker et al. 1977), while at later periods new mRNAs are translated in the cells (Lane and Tumaitis-Kennedy 1981). In maize, the same pattern seems to occur, since the early period (0-6 h) is not sensitive to α -amanitin, while the later one (18-24 h) shows a significant inhibitory effect with this antibiotic (Sánchez de Jiménez et al. 1981). Among these later synthesized proteins, histones might be a significant fraction, since the embryonic cells are ready

to divide. Embryonic axes of *Vicia faba* have shown a burst in histone production at about 24 h of germination, previous to the period of DNA synthesis, and again at cell division (Funkuel et al. 1978). In maize, the main DNA synthesis seems to reach major rates between 24 and 40 h after imbibition is initiated (unpublished results); therefore, an increase in lysine rich proteins in the 18-24 h period seems to be in accordance with this scheme. Furthermore the large increase in lysine and alanine pools at this time (Figure 1) is in accordance with the cell requirements for histone production, as indicated by the abundance of these two amino acids in some of the plant histones (Spithir 1982).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Mark Engleman, Colegio de Postgraduados de Chapingo, México, for critical reading of the manuscript and to Mrs. Maricela Villarreal for her assistance in typing it.

REFERENCES

- Bewley JD, Black M (1978) In: Physiology and biochemistry of seeds, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Bray GA (1960) Anal Biochem. 1: 29-235
- Bonner WM, Laskey RA (1974) Eur J. Biochem. 46: 83-88
- Brooker JD, Cheung CP, Marcus A (1977) In: Khan AA (ed) The physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination. Elsevier North-Holland Biomedical Press pp 347-356
- Brooker JD, Tomaszewski M, Marcus A (1978) Plant Physiol 61: 145-149
- Caers LC, Peumans WJ, Carlier AR (1979) Planta 144: 491-496
- Datta K, Marsch L, Marcus A (1983) Plant Physiol 72: 394-397
- Funkuel K, Yakura K, Tanifuji S (1978) Biochim Biophys Acta 518: 390-400
- Jendrisak J (1980) J Biol Chem 255: 8529-8533
- Laemmli UK (1970) Nature 227: 680-685
- Lane BG, Tumaitis-Kennedy TD (1981) Eur J Biochem 114: 457-463
- Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) J Biol Chem 193: 265-275
- Marsh L, Datta K, Marcus A (1982) Plant Physiol 70: 67-73
- Pickering MV, Soto DU (1978) Application notes No 13, Durrum Instrument Corp, Sunnyvale, California USA
- Sánchez de Jiménez E, Aguilar R, López S (1981) Biochem Biophys Res Comm 99: 445-450
- Spithir S (1982) J Biol Chem 257: 14250-14255
- Van de Walle C, Deltour R (1974) FEBS Letters 49: 87-91
- Van de Walle C, Deltour R, Forgeur G (1983) Physiol Plant 57: 181-188

† Communication

Protein Synthesis Patterns¹

VANCE OF OLD AND NEW MESSENGER RNA IN GERMINATING MAIZE EMBRYOS

Received for publication October 5, 1983 and in revised form February 28, 1984

ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ AND RAUL AGUILAR

Departamento de Bioquímica Vegetal, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., Mexico

ABSTRACT

Proteins synthesized during the first hours of seed imbibition were analyzed in the embryonic axes and scutellum of maize embryos separately. Increase in protein synthesis was followed in the embryonic axes through the germination pulse labeling experiments with ¹⁴C-amino acids were carried out at two stages of development: 0 to 6 and 18 to 24 hours in the presence or absence of α -amanitin. The proteins were analyzed by two-dimensional electrophoresis and fluorography. Results showed a major group of proteins common to both tissues, axes and scutellum (housekeeping proteins), besides the specific proteins synthesized by each tissue. In the axes, the changes in proteins observed between the periods 0 to 6 and 18 to 24 hours of development seem to be due both to newly synthesized mRNA as well as to delayed translation of stored mRNA

attempt to analyze the type of protein synthesized and their origin during the early stages of maize germination. Proteins synthesized at two stages of germination in two different tissues of the maize embryo are compared in the presence or absence of α -amanitin which interferes with the synthesis of mRNA (9).

MATERIALS AND METHODS

Biological Materials. Seeds of maize (*Zea mays* L.), hybrid H-30 provided by Dr. Joaquín Ortiz Cereceres from the Colegio de Postgraduados de Chapingo, México, were used in this work. Embryonic axes and scutellum were manually cut off from the seeds. Each experiment was carried out with 100 to 150 mg of tissue.

Incubation System. Tissue samples were imbibed between two filter papers in 0.2 ml of incubation medium (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2% sucrose, 0.5 mM of an equimolar mixture of the 20 amino acids and 10 μ g/ml chloramphenicol (8), in sterile 25-ml Erlenmeyer flasks at 25°C. A mixture of ¹⁴C-labeled amino acids (20-30 μ Ci New England Nuclear) was added to the samples per pulse. In some experiments, the tissues were pretreated with α -amanitin (10 μ g/ml) (20 min under vacuum). Controls were also vacuum treated without α -amanitin.

After the incubation period, the tissues were washed with 50 ml of buffer containing: 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, and 5 mM β -mercaptoethanol, at 0°C. Samples were homogenized in 1.5 ml of the same buffer in a mortar and pestle, precooled at 0°C. In some experiments, 0.1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) were added to the homogenizing buffer. The homogenate was centrifuged at 15,000g for 30 min. The supernatant was again centrifuged at 190,000g for 80 min. Soluble proteins from the supernatant were precipitated with 10% TCA, allowed to stand at 0°C for 3 h, and centrifuged at 3,000 rpm for further analysis.

Electrophoretic Procedure. The precipitated proteins were suspended in water, neutralized with 4 M KOH, and an equal volume of ampholite-buffer mixture (LKB) either pH 3.5 to 10 or 5 to 8 was added. Electrophoresis in two dimensions was carried out following O'Farrell's procedure (15), except that in the second dimension 0.2% SDS was added to the polyacrylamide gels. The stacking gel was 5% and gel gradient from 7 to 15% was used as the running gel. A Bio-Rad model 220 apparatus was used and 30,000 to 40,000 cpm were applied to each isoelectric focusing gel.

Slab gel electrophoresis in one dimension was carried out following the method of Laemmli (10), except that the running separator gel was a 7 to 15% acrylamide gradient in 50 mM Tris-HCl buffer 0.2% SDS, pH 8.8. The proteins were run at a constant current at 1.5 mamps per channel. An electrophoresis calibration kit from Pharmacia (range 14,000-94,000 D) was

existence of stored mRNA in embryos of different quiescent seeds has been described (2, 16, 18). Many reports have been concerned with finding out the role of the stored mRNA of the seed embryos (for review, see 14). Some authors have stated that these mRNA are required basically for rapid initiation of metabolic activity in the seeds during germination while others support the idea that they have been specifically synthesized during the maturation period and stored as ribonucleoprotein particles to insure germination under unfavorable conditions (17), while still others suggest that stored mRNA is used for new RNA transcription, which in turn supports the germination process (9).

Well-defined developmental steps are recognized during germination: it has been demonstrated that the early elongation period of the radicle is supported by translation of the stored mRNA, while the further sustained growth period seems to be supported by newly formed mRNA (4, 7, 9). The specific mRNA required by each process must be clarified since there is complete agreement in regard to the similarity or discrepancy in protein formation encoded by the stored and newly synthesized mRNA (2, 3). Furthermore, this picture is more complicated when considering the possibility of processing of preformed transcripts from the stored mRNA population: this process could be responsible for changes in the protein pattern observed at different stages of embryo development (11). The present paper is an

¹Supported by CONACYT (National Council for Science and Technology Improvement, México), Grant No. PCAFBNA-005382. Under the Interuniversity Collaboration Program: Universidad Nacional Autónoma de México-Colegio de Postgraduados, Chapingo.

ography. The method of Bonner and Laskey (1) was used, and the dried gels were exposed to a Kodak X-0 mat at -70°C for 1 to 3 weeks.

Protein Determination. After 10% TCA precipitation, samples were neutralized with 4 M KOH and proteins were measured by the method of Lowry *et al.* (12). BSA (Sigma) was used as standard.

RESULTS

Two main periods of development were studied for protein synthesis: the 0- to 6-h period of imbibition, when the embryos initiate metabolic activity after a long period of quiescence, and the 18- to 24-h period, when the axes initiate radicle protrusion (Fig. 1). The protein synthesized by the maize axes in those periods was pulse-labeled with ^{14}C -amino acid mixture, and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis, using a 3.5 to 10 pH range. Quantitative and qualitative changes are apparent in those proteins in the correspondent fluorographing prints.

These patterns, which are highly reproducible, show that proteins synthesized at the later period do not appear on the earlier one (dashed squares), although some, present in the earlier period are not in the 18- to 24-h one (dashed circle). In some experiments were carried out in the presence of α -amanitin. Experimental conditions were selected in which uracil incorporation into polysomal poly A⁺ RNA was dramatically reduced (90%, unpublished data). Under these conditions, a significant inhibitory effect was noticed on the amount of ^{14}C -amino acid incorporated into proteins of the 0- to 6-h period, but not any inhibition was obtained for the 18- to 24-h period (Fig. 1).

These data indicate that, for the first period studied, the proteins being synthesized belong to stored mRNA, while for the second one a significant fraction of the synthesized proteins are translated from the new mRNA. The proteins formed during the 18- to 24-h period in the presence of α -amanitin were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis; in these experiments a 5 to 8 pH range was used in order to achieve a better resolution, since most of the proteins appeared located in the region of the 3.5 to 10 pH gels. The fluorography pattern in the presence of α -amanitin was compared with the one obtained for this

period in the absence of the antibiotic (Fig. 3). A striking result was obtained since, as it can be seen in this figure, the 18- to 24-h patterns with and without α -amanitin are very similar. Most of the proteins formed in the absence of α -amanitin are also seen in its presence, indicating that they are formed from stored mRNA species. Some spots, however, are absent (arrow) or dramatically depleted (dashed squares) in the α -amanitin pattern, suggesting they belong to the newly synthesized mRNA.

It is also interesting to note that, in the two-dimensional fluorography of the α -amanitin pattern (Fig. 3B), some spots are more noticeable than in the gel without α -amanitin and even some new spots are visible (dashed oval) (Fig. 3). This experiment was repeated using [^{35}S]methionine instead of ^{14}C -amino acid mixture, and the proteins were analyzed by one-dimensional gel electrophoresis. A new band can also be observed in the fluorography of proteins made in the presence of α -amanitin.

In order to find out which set of proteins are related to the 'house keeping' functions of the cells and which are actually involved in the sustained growth process of germination, ^{14}C -amino acid pulse-labeled experiments were carried in scutellum. This embryony tissue is not expected to divide nor to develop into the new plantlet but rather to function as metabolic sustainer and transporter of metabolites for the embryonic axes. The capacity of scutellum to synthesize proteins during these periods is much lower than the one observed in the axes (from 3 to 5 times lower), (18). However, fluorographic analysis of the scutellum proteins synthesized during the 0- to 6-h and 18- to 24-h period can be clearly observed (Fig. 4). As expected, a large background of proteins common to axes and scutellum are seen on these fluorographic prints (Figs. 2 and 4). The 0- to 6-h patterns are, however, more similar among themselves than each one with their correspondent 18- to 24-h pattern. A common group of proteins for the two 18- to 24-h patterns can also be recognized in the fluorographies. However, these two patterns differ more between themselves than the corresponding 0- to 6-h patterns, suggesting a more specialized stage of differentiation for both tissues in the second period.

DISCUSSION

Early work in rye showed that the proteins synthesized from the stored and newly synthesized mRNAs, when translated *in*

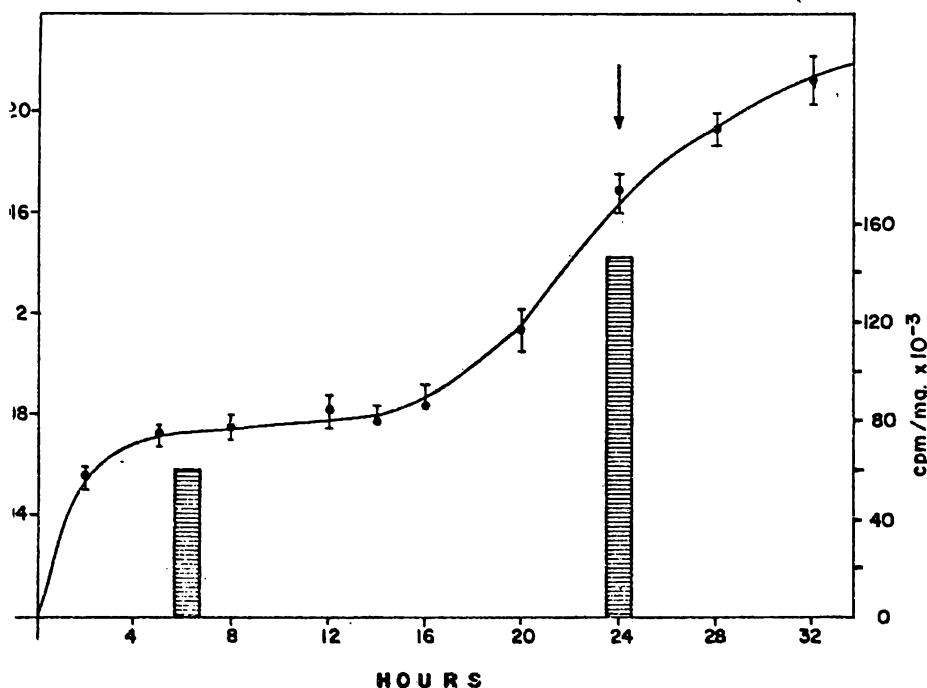
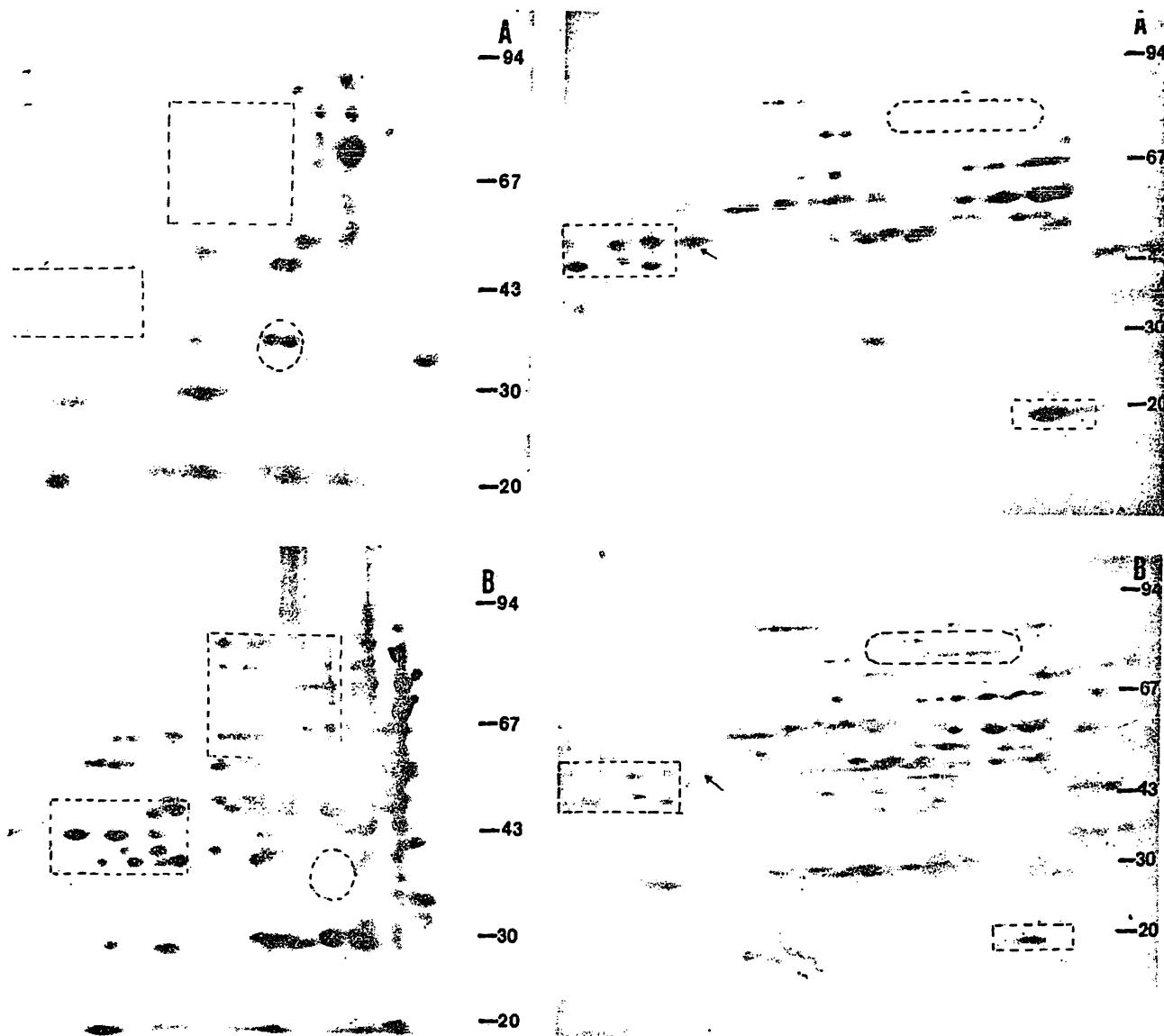


FIG. 1. Fresh weight increase of maize axes during germination. Each experimental value of the fresh weight represents average of at least three batches of 20 embryonic axes each. Vertical lines represent SD. Bars stand for ^{14}C -amino acid incorporation into TCA-precipitable material in a 6-h pulse-labeled experiment, after correction for total amino acid pool size. Arrow indicates average time for radicle protrusion.



Fluorographies of two-dimensional gel electrophoretic analysis of proteins. A 6-h pulse-labeled ¹⁴C-amino acids mixture (20 μCi) at 0 h (A) or 18 h (B) to batches of embryony axes. Proteins treated as indicated in "Materials and Methods," and separated by electrophoresis in a 3.5 to 10 pH range, using 30,000 to 40,000 cpm of electric focusing gel. Numbers indicate the mol wt × 10⁻³ of polypeptides.

FIG. 3. Effect of α-amanitin in the proteins synthesized by embryony axes during the 18- to 24-h period. Two separated groups of embryony axes (100 mg each) were 6-h pulse-labeled with 20 μCi of ¹⁴C-amino acids at 18 h. One of them was previously treated with α-amanitin (10 μg/ml at 0 time) (B). Proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis in a 5 to 8 pH range and detected by fluorography. Numbers indicate the mol wt × 10⁻³ of reference polypeptides.

Amino Acid incorporated (6 h)	Amino Acid Incorporation into Proteins		Inhibition %
	Control	+α-Amanitin	
	<i>cpm/mg</i>		
1-6 ^a	7,115	6,818	4
1-24 ^b	36,650	21,255	42
1-24 ^a	212,683	87,687	58

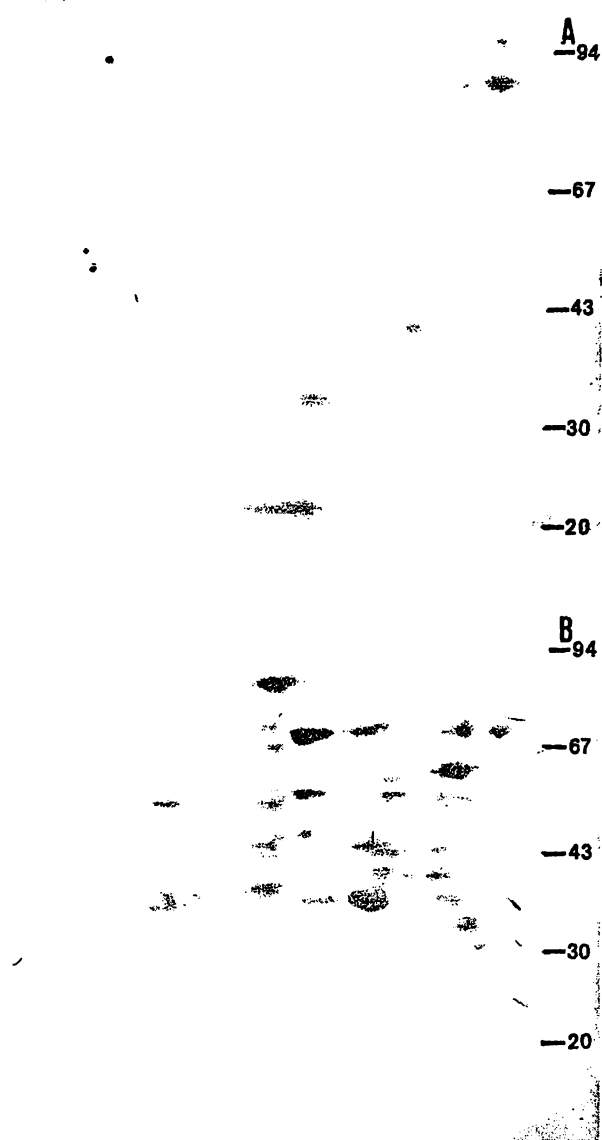
^a α-amanitin added at 0 h.
^b α-amanitin added at 18 h.

very similar patterns (17). Furthermore, hybridization experiments with cDNA from early and late mRNAs of wheat (2) showed no differences. Later, however, differences were found for proteins synthesized in early and late germination in wheat embryos (11), in castor bean (13), and in cotton (6). Our results also showed differences in the

pattern of proteins synthesized during the early and late germination periods of maize axes as seen by the ¹⁴C two-dimensional gels (Fig. 2). These differences are not due to artefacts or degradation during the sample processing since the same patterns are obtained in the presence of phenylmethylsulfonyl fluoride.

Although, both scutellum and axes constitute the seed embryo, each one has a different role during germination. The synthesized proteins in axes and scutellum, however, seem to be similar on the early stage of germination (0- to 6-h period) when both tissues are just reinitiating metabolic activity (Figs. 2A and 4A), suggesting that there is a common group of proteins at that time, regarded as the house keeping proteins (6), which should be present in the cells to fulfill the requirements for their basic metabolic functions. These proteins seem to be codified mainly by the stored mRNA (Table I).

A significant group of the proteins synthesized in the later period (18-24 h), when newly synthesized mRNA is being expressed, is not altered by the addition of α-amanitin to the embryos (Fig. 3), suggesting that they are translated from pre-



4. Fluorographs of proteins synthesized by scutellum. Batches of scutellum were 6-h pulse-labeled with 20 μ Ci-amino acid at either 0 h (A) or 18 h (B). Proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis in a 3.5 to 10 pH range and detected by autoradiography. Number indicate the mol wt $\times 10^{-3}$ of reference polypep-

RNA transcripts of the stored mRNA population. However, since many of these proteins are not present in the 0- to 6-h period, the data might be interpreted as indicative of a selective mechanism present in the cells which modulates the translation of stored transcripts; that is to say, some of the stored RNA transcripts, though already present in the quiescent axes, are not translated until late in germination, probably due to posttranslational processing requirements. Evidence for active tran-

scriptional processing during germination has been reported for radish (5) as an important step in this period. A similar developmentally regulated mechanism has been suggested to occur during sea urchin embryo development, in which maternal stored poly A⁺ RNA transcripts in oocytes are not expressed until later embryonic stages (19). Composition among mRNA for *in vivo* translation in this period has also been suggested to occur in wheat embryos (2) and it could also happen between the stored and newly available (processed or synthesized) mRNA. Regarding the proteins which are more noticeable in the presence of α -amanitin (Fig. 3), a plausible explanation could be the assumption that the synthesis of mRNA for some proteases could be inhibited by the antibiotic, resulting in higher stability of some proteins which otherwise will be more rapidly degraded within the cell.

LITERATURE CITED

1. BONNER WM, RA LASKEY 1974 A film detection method for tritium-labeled protein and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biol* 46: 83-88
2. BROOKER JD, M TOMASZEWSKI, A MARCUS 1978 Preformed messenger RNAs and early wheat embryo germination. *Plant Physiol* 61: 145-149
3. CAERS LI, WJ PEUMANS, AR CARLIER 1979 Preformed and newly synthesized messenger RNA in germinating wheat embryos. *Planta* 144: 491-496
4. DATTA K, L MARSCH, A MARCUS 1983 Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol* 72: 394-397
5. DELSENY M, L ASPART, R COOKE 1981 Studies on ribonucleic acids during radish seed germination: A search for potential regulatory mechanism. *Israel J Bot* 29: 246-258
6. DURE L III, G GALAU 1981 Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. *Plant Physiol* 68: 187-194
7. GALLI MG, M LEVI, E SPARVOLI 1981 Lack of correlation between overall protein synthesis and the onset of cell elongation in germinating embryos of *Haplopappus gracilis*. *Physiol Plant* 51: 321-325
8. HERNÁNDEZ-TOBIÁS A 1979 Regulación de la expresión genética durante las primeras horas de la germinación de trigo. Tesis de Maestría (Bioquímica). Facultad de Química UNAM México, pp 113
9. JENDRISAK J 1980 The use of α -amanitin to inhibit *in vivo* RNA synthesis and germination in wheat embryos. *J Biol Chem* 255: 8529-8533
10. LAEMMLI UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685
11. LANE BG, TD TUMAITIS-KENNEDY 1981 Comparative study of levels of secondary processing in bulk mRNA from dry and germinating wheat embryos. *Eur J Biochem* 114: 457-463
12. LOWRY OH, N ROSEBROUGH, A FARR, RJ RANDALL 1951 Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
13. MARTIN C, DH NORTHCOTE 1981 Qualitative and quantitative changes in mRNA of castor beans during the initial stages of germination. *Planta* 151: 189-197
14. MAYER AM, J MARBACH 1980 Biochemistry of the transition from resting to germinating state in seeds. *In* L Reinhold, JB Harbone, T Swain, eds. *Progress in Phytochemistry*. Pergamon Press, Oxford
15. O'FARREL PH 1975 High resolution two dimensional electrophoresis of protein. *J Biol Chem* 250: 4007-4021
16. PAYNE P 1976 The long-lived messenger RNA of flowering plant seeds. *Biol Rev* 51: 329-363
17. PEUMANS WJ, LI CAERS, AR CARLIER 1979 Some aspects of the synthesis of long-lived messenger ribonucleoproteins in developing rye embryos. *Planta* 144: 485-490
18. SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ E, R AGUILAR, S LÓPEZ 1981 Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 445-450
19. THOMAS TL, RJ BRITTEN, EH DAVIDSON 1982 An interspersed region of the sea urchin genome represented in both maternal poly A RNA and embryo nuclear RNA. *Develop Biol* 94: 230-239