

167
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE DNA, DURANTE
LAS PRIMERAS HORAS DE LA GERMINACION DE
ZEA MAYS L., POR BENZIL-ADENINA".

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

JORGE REYES JIMENEZ

JUNIO 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

INDICE

0.	A Manera de Prológo.....	I
I.	INTRODUCCION.....	2
I.1.	La Semilla.....	2
I.2.	Germinación.....	3
I.3.	Algunos Aspectos Bioquímicos de la Germinación.....	4
I.3.1.	Respiración.....	5
I.3.2.	Síntesis de Proteínas.....	6
I.3.3.	Síntesis de ARN.....	8
I.3.4.	Síntesis de DNA.....	9
I.3.5.	Cambios Morfológicos del Núcleo.....	10
I.3.6.	Acción de Fitorreguladores.....	12
I.3.7.	Citocininas.....	13
II.	ANTECEDENTES DE TRABAJO.....	17
III.	HIPOTESIS.....	18
IV.	OBJETIVOS.....	19
V.	MATERIAL.....	20
VI.	METODOS.....	24
VII.	RESULTADOS.....	28
VIII.	DISCUSION.....	41
IX.	CONCLUSIONES.....	48
X.	REFERENCIAS.....	49

Manera de Prologo

La naturaleza no es un simple paisaje, ni es una sustancia sensual. La naturaleza es un momento de la praxis humana y, a la vez, la totalidad de lo que existe (Schmidt, 1976), es medida o mediable por el hombre, transformada y "humanizada" por el esfuerzo del hombre, a través de la práctica histórico-social (Korck, 1975).

La concepción del mundo está íntimamente relacionada con la forma en que interaccionamos con la naturaleza. La historia de la humanidad ha sido, de alguna manera, una cambiante concepción que del universo tenemos. Tal concepción se aplica socialmente, ya sea, para beneficio de unos o perjuicio de otros.

Al Reino Vegetal le corresponde ser uno de los elementos de la naturaleza que ha sido transformador de la historia de la humanidad. Así, tenemos que el conocer la biología de las especies vegetales llevó al hombre a cambiar radicalmente su modo de vida. Con el conocimiento biológico se dio origen a la agricultura, y con esto al surgimiento de grandes sociedades, y como consecuencia la evolución cultural de la humanidad.

Para el caso de América, las civilizaciones tuvieron por base un intenso desarrollo agrícola que produjo efectos diversos e importantes: liberó al hombre de la incesante búsqueda de alimentos, permitió el crecimiento demográfico; hizo más estable la existencia del indígena y le permitió crear técnicas nuevas y organizar su conducta social de acuerdo con normas superiores; favoreció la aparición y perfeccionamiento de formas especializadas de trabajo y, finalmente, hizo posible la ejecución de grandes obras públicas, como sistemas de irrigación, templos y palacios, testimonio evidente de una cultura altamente desarrollada (Que-Canovas, 1976).

Por otro lado, el descubrimiento de América fue efecto de la

busqueda de ciertos vegetales (especies) necesarias para Europa. Entre los cuales se encontraba la pimienta, el jengibre, el clavo de olor, la nuez moscada y la canela, que eran tan codiciados como la sal para conservar la carne en invierno.

Por los años en que se llevaba a cabo la conquista de América, en Europa se forjaba "la conquista principal de la primera parte de la revolución científica, se removían obstáculos cardinales" que no habían hecho posible el avance del conocimiento. Se iniciaba una nueva concepción del mundo. "Esta proeza la cumplieron tres hombres: Copérnico, Kepler y Galileo. A partir de aquí se avanzó con rapidez, con velocidad creciente, hasta llegar a la edad atómica. Tratase del cambio revolucionario más importante de la historia del hombre, el cual determinó en el modo de existencia de éste una revolución más radical aún que la que habría significado la adquisición de un tercer ojo o alguna otra mutación biológica (Koeistler, 1981).

El descubrimiento de América permitió el aruge europeo. Durante poco menos de tres siglos, no hubo, para el comercio de Europa, producto agrícola más importante que el azúcar, al cual se le conocía como el "oro blanco". El azúcar del trópico latinoamericano impulsó con fuerza decisiva, directa e indirectamente, el desarrollo industrial de Holanda, Francia, Inglaterra y Estados Unidos (Galeano, 1978). Aunado a esto la ciencia y la técnica avanzaron en estos países. Debido al monocultivo de la caña de azúcar, la flora y fauna latinoamericana fueron sacrificadas. (Hay que tener presente que la riqueza de las sociedades de occidente, altamente industrializadas, se debe a una embriaguez de robo y saqueo como no conoce otra la historia; sus víctimas son, por un lado, los pueblos del tercer mundo y, por el otro, los hombres del futuro. Se trata de una riqueza que engendra una miseria inconcebible).

Entonces, desde aquellos años, América Latina ha dependido de la ciencia y técnica que se desarrolla en los países occidentales. Claro ejemplo de que en Latinoamérica (y en general los países del llamado tercer mundo) se han impulsado proyectos que son avalados

por los países del "primer mundo", se manifiesta en México cuando se implanta "La Revolución Verde", que pretendía "modernizar y desarrollar la agricultura de los países subdesarrollados". Si bien se logró en un lapso pequeño (y efímero) el incremento en la producción de trigo y maíz, los beneficios de tal revolución nunca llevaron a los países dependientes al desarrollo prometido, por el contrario, se estableció una nueva situación de dependencia y subordinación.

Además, debido al modelo de producción importado, se desdeña el trabajo que a través de miles de años de experiencia, en donde varias civilizaciones han seleccionado y domesticado una colección de plantas sobre las cuales la producción mundial de alimentos está basada. Por la "Revolución Verde" no solo el número de especies alimenticias decreció, sino, lo que es aún más alarmante, la diversidad genética disminuyó considerablemente (Wilkes, 1972). Todavía más, en la actualidad, la "ayuda" que los países capitalistas conceden al mundo pobre, finalmente, desemboca en una mayor dependencia alimenticia, ya que los créditos obtenidos son precisamente para comprar cereales y granos a tales países, en vez de destinarlos a la producción agrícola en México. Aún más, por cada hectárea dedicada a producir de 0.5 a una cabeza de ganado al año, la nación pierde alrededor de 250 especies de plantas y unas 200 de animales, que conforman un potencial forestal, alimentario, medicinal, industrial, doméstico y forrajero, perdido para siempre (Toledo, 1985).

Es así, que la ciencia está objetivamente confinada tras los límites de las sociedades avanzadas. América Latina no aplica en su propio beneficio los resultados de la investigación. En México a pesar de poseer una de las universidades más antiguas del continente, se carece totalmente de una tradición científica (Bastañeda, 1985). Como consecuencia se condena al país a padecer la tecnología de los poderosos. El mero trasplante de la tecnología de los países adelantados no solo implica la subordinación cultural y, en definitiva, también la subordinación económica, sino que, además, después de cuatro siglos y medio de experiencia en la multiplicación de los oasis de modernismo importado en medio de los desiertos de atraso y de la ignorancia,

Bien puede afirmarse que tampoco resuelve ninguno de los problemas del subdesarrollo.

Queda así entendida, entonces, a la naturaleza como una categoría social. La naturaleza física no interviene directamente en la historia universal, sino mediatamente, como un proceso de producción material que, desde su origen mismo, procede no solo entre el hombre y la naturaleza, sino entre el hombre y el hombre. Todo estudio que sobre la naturaleza se haga tiene repercusiones, ya sea en un tiempo largo o corto, es por ello que debe ser analizado para saber cómo se inserta en la sociedad.

I. INTRODUCCION

I.1 La Semilla

La formación de una semilla es esencial para la supervivencia y dispersión de la mayoría de las especies vegetales (y aún para muchas especies animales que dependen de estas estructuras para su alimentación).

El desarrollo de la semilla se inicia con la fertilización del óvulo, el cual formará el embrión; asimismo se origina una cubierta o testa para proteger a éste. Por otro lado, también, se forman reservas alimenticias, las cuales son la consecuencia de la expresión de sólo ciertos genes en esta fase de la embriogénesis (Dure, 1985) que servirán para poder sostener el desarrollo del organismo hasta que es autosuficiente.

Una vez formada la semilla se inicia una desecación progresiva de los tejidos. El contenido de humedad de la semilla completa cae desde 80-90% hasta un 10% en pocos días. A pesar de esta extrema deshidratación, un embrión puede permanecer vivo semanas, años o décadas. La desecación cambia profundamente la actividad de las células. La síntesis de macromoléculas, tales como DNA, RNA, y proteínas se detiene; el embrión entra en un estado de mínima actividad metabólica.

Para la mayoría de las semillas el secado es el evento terminal en el desarrollo, guiando ésto a un fase de quiescencia metabólica. Antes de este suceso el metabolismo de la semilla está dirigido hacia la terminación de los eventos del desarrollo, en particular, la biosíntesis y depósito de reservas nutritivas.

Parece ser que el secado juega una importante función en los fenómenos iniciales del desarrollo de la semilla. Una evidencia

que respaldaría lo anterior es que semillas inmaduras de algunas leguminosas y cereales (que han sido removidas de la planta madre y por lo tanto no han sufrido deshidratación) no germinan (Misra *et al.*, 1985).

El factor que se requiere para reanudar la actividad metabólica del organismo, y reiniciar su crecimiento y desarrollo es la adición de agua.

I.2 Germinación

Desde un punto de vista fisiológico se dice que la germinación principia por la toma de agua de la semilla (imbibición) y termina con el inicio de la elongación por el eje embrionario, usualmente la parte radicular -la cual atraviesa, en este momento, completamente la cubierta de la semilla- (Bewley and Black, 1986). Más, desde la perspectiva bioquímica, la germinación es la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular.

Para que la germinación se pueda llevar a cabo deben de existir ciertas condiciones ambientales: un apropiado suplemento de agua, temperatura, composición adecuada de gases y luz.

El agua es esencial para que ocurra la germinación. Cuando la semilla está en contacto con el agua se lleva a cabo lo que se conoce como imbibición.

La imbibición presenta tres fases. La fase I es una consecuencia de las fuerzas de hidratación de las paredes celulares de la semilla y es independiente de la actividad metabólica de ésta. La fase II es un periodo lento de absorción de agua y la semilla presenta un metabolismo activo, a diferencia de las semillas no viables. En la fase III la absorción de agua esta asociada con la germinación y desarrollo subsecuente de la semilla y presenta una actividad metabólica incrementada (Bewley y Black, 1978).

La hidratación de organelos secos, en las células de la semilla, (mitocondrias, ribosomas, núcleos, membranas) y de macromoléculas (enzimas, ARN_t, ARN_m, DNA, etc.) activa las funciones de estos elementos de una manera secuencial (Ching, 1972).

Si bien la toma de agua es una condición necesaria, no es suficiente. La germinación es un evento que requiere, además, del consumo de energía, la cual es proporcionada por los procesos de oxidación, en la que se involucra un intercambio gaseoso, salida de bióxido de carbono y entrada de oxígeno (Mocquot *et al.*, 1981).

I.3 ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION

La capacidad de las células de mantener un alto grado de orden está basada en la información genética que poseen, la cual es expresada, preservada, replicada y modificada por cuatro mecanismos celulares: i) síntesis de proteínas; ii) reparación del DNA; iii) replicación del DNA y iv) recombinación génica (Alberts *et al.*, 1983).

Además, para el caso de los vegetales, es posible que el control natural de la germinación involucre una interacción de fitorreguladores, tanto inhibidores como promotores de fenómenos metabólicos (Khan, 1967; Adicott, 1972). Por lo tanto los fitorreguladores pueden actuar en concierto para determinar respuestas fisiológicas tales como: tropismo, crecimiento de yemas laterales, división celular, etc. (Khan, 1971).

Las semillas contienen una gran variedad de enzimas, las cuales incluyen las relacionadas con los eventos metabólicos que condujeron a este organismo a su madurez. La mayoría de estas enzimas son resistentes a la desecación y se activan tan pronto como la imbibición se lleva a cabo (Simon, 1984).

Durante la germinación, la secuencia de eventos que parece ser común a embriones de un buen número de semillas de gramíneas puede

dividirse en: i) eventos tempranos, los cuales incluyen: hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de ARN y reparación de DNA; ii) eventos tardíos o secundarios: expansión celular, replicación del DNA y movilización de reservas (Osborne, 1983). Cada evento representa un estado potencial en el cual un sistema de control puede operar en la germinación (Deltour, 1985).

La anterior secuencia se ve alterada conforme la semilla envejece, de tal manera que pierde viabilidad, con lo que resulta, por ejemplo, un retraso del tiempo al cual ocurre la replicación del DNA. Por otro lado si una semilla bajo estas condiciones germina por lo general será anormal.

La actividad bioquímica y fisiológica de los ritmos biológicos en las plantas está asociada con varios aspectos genéticos, que intervienen en la regulación temporal de las funciones vitales. El ritmo y síntesis de macromoléculas son aspectos importantes en el desarrollo del embrión durante la germinación (Yadav, 1976).

I.3.1 Respiración

La respiración en las semillas deshidratadas es apenas detectable, más ésta se incrementa en el momento en que se inicia la imbibición. La dinámica de la respiración es trifásica.

Se incrementa rápidamente en las primeras horas de imbibición, enseguida se registra un nivel estacionario, cuya duración es variable, para luego, de nuevo incrementarse. La última fase está asociada principalmente con la división celular en los tejidos radicales (Simon, 1984).

La importancia de la respiración reside en que lleva a cabo la biosíntesis de ATP. La cantidad de ATP presente en los tejidos se incrementa en aproximadamente 10 veces durante las primeras horas de imbibición.

I.3.2 Síntesis de Proteínas

La síntesis de proteínas no ocurre en la semilla que se encuentra en estado latente, sino que se reinicia cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el ARN_m. Se ha observado que los polisomas se encuentran ausentes en las semillas y su estructuración ocurre durante la imbibición (Marcus and Feeley, 1964).

La formación del complejo de iniciación se lleva a cabo con la unión de la subunidad pequeña del ribosoma (40 S) con el metionil ARN_i, en el sitio de iniciación indicado en el ARN_m, y la posterior unión de la subunidad grande del ribosoma (60 S), quedando entonces estructurado el complejo de iniciación 80 S (Weeks and Marcus, 1971). Para que esto se lleve a cabo, se requiere de la intervención de factores proteicos solubles, denominados factores de iniciación, los cuales se encuentran en la semilla (Seal *et al.*, 1972).

Para que la elongación de la cadena pueda iniciarse se requiere la presencia de otros factores proteicos solubles, al menos para ir colocando los subsiguientes aminoacil-ARN_i en la posición correcta dentro del ARN_m, y otros para llevar a cabo la translocación del ribosoma sobre el ARN_m, los cuales se denominan factores de elongación y requieren GTP para que se activen (Twardowski and Legocki, 1973).

Es evidente que la síntesis de proteínas ocurre en la semilla poco después de la imbibición, lo cual sugiere que la mayoría de los componentes bioquímicos y estructurales necesarios para este evento deben de estar ya presentes en la semilla (Simon, 1984).

La síntesis de proteínas que se lleva a cabo a estos tiempos iniciales de la germinación puede ser debida a ARN_m almacenado

(Sánchez-Martínez *et al.*, 1986) o a una síntesis *de novo*. En este sentido, existen evidencias que muestran que la síntesis de proteínas *de novo* puede ocurrir en la ausencia de síntesis de ARN tanto en semillas de algodón (Dure and Waters, 1965) como en embriones de trigo (Chen *et al.*, 1968). La conclusión se basa en que hay una continua incorporación de aminoácidos marcados a proteínas en presencia de actinomicina D (un inhibidor de la síntesis de ARN). Además, Week y Marcus (1971), encontraron que una fracción celular (fracción mensajera, FM), obtenida a partir de embriones de semillas, podría estimular la síntesis de proteínas *in vitro*. Así que, durante los primeros minutos de imbibición, hay un aumento en la actividad de la FM en el embrión, la cual declina rápidamente hasta ausentarse en embriones embebidos por tres horas. A medida que la actividad de la FM decrece el número de polisomas aumenta. Esto evidencia la existencia de ARNm almacenado presente en el embrión en estado quiescente y que éste se une rápidamente a ribosomas durante la imbibición.

Resultados de este tipo apoyan el concepto de que durante la etapa temprana de la germinación, la síntesis de proteínas está dirigida únicamente por ARNm de vida media larga y que dicha molécula es sintetizada durante la embriogénesis y reactivada como molde sólo después de la imbibición.

Otros estudios muestran que algunos de los ARNm almacenados codifican para proteínas de reserva (Mori *et al.*, 1978). Esto podría significar que parte del ARNm almacenado es el restante que fue traducido durante la maduración de la semilla, pero no fue degradado cuando la semilla se secó. Desde luego que lo anterior no descarta la posibilidad de que dentro de estos ARNm almacenados puedan existir algunos específicos para la germinación.

La pregunta crucial, y que permanece sin respuesta, es si estos mensajeros de vida media larga, que están presentes en el embrión seco, juegan un papel controlador en la germinación y a qué tiempo los mensajeros sintetizados *de novo* son esenciales para el desarrollo.

Por otro lado se ha mostrado que después de 40 minutos de imbibición, la síntesis de proteínas en trigo, es dirigida por ARN sintetizado *de novo*, más que el ARN almacenado (Cheung *et al.*, 1979).

La síntesis de proteínas está presente 30 minutos después de iniciarse la imbibición en centeno. La síntesis de las primeras proteínas en el embrión en germinación se considera que es llevada a cabo por ARN_m ya presente en la semilla seca (Castroviejo *et al.*, 1979).

Parece ser que para que la germinación se lleve a cabo se requiere de la síntesis de proteínas, ya que si esta síntesis es inhibida no se efectúa la germinación (Sánchez, 1988).

I.3.3 Síntesis de ARN

La síntesis de ARN durante la germinación temprana requiere la presencia de una ARN polimerasa activa (Fabisz-Kijowska *et al.*, 1975) y de los cuatro nucleótidos trifosfatados (Slater *et al.*, 1978). La síntesis de ARN_m es detectada durante las primeras horas de imbibición, tanto en rábano como en trigo (Delseney *et al.*, 1977; Smith and Bray, 1982). En ejes embrionarios de maíz, Van de Walle y col. (1976), señalan que la mayoría de las moléculas de ARN sintetizadas en la radícula, durante la primera hora de imbibición, corresponden a ARN heterogéneo. Estudios posteriores (Dommes and Van de Walle, 1983) indicaron que el ARN heterogéneo nuclear (el cual es la especie de ARN más abundante durante las primeras horas de la germinación de maíz) es modificado para su posterior uso como ARN_m.

I.3.4. SINTESIS DE DNA

Si bien la síntesis de proteínas y de ARN se inician tan pronto como los tejidos se embeben, la síntesis de DNA, para la mayoría de las gramíneas, comienza posteriormente (Osborne *et al.*, 1984).

Parece ser que la síntesis de DNA que primero ocurre durante la germinación temprana, corresponde a una síntesis no-programada, la cual se postula que es de tipo reparativo. La síntesis de tipo replicativo se inicia horas después (Osborne *et al.*, 1984).

REPARACION DEL DNA. El DNA de las semillas puede sufrir alteraciones debido a una serie de factores físicos y/o químicos; ejemplo de esto son las desaminaciones y la formación de sitios apirimidicos que se manifiestan cuando semillas de *Zea mays* han sido almacenadas por largo tiempo (Dandoy *et al.*, 1987).

Aún más, los cultivos vegetales están expuestos a efectos de sustancias químicas provenientes de la atmósfera, del agua y del suelo (gases contaminantes, residuos de pesticidas, desechos industriales, etc.), algunas de las cuales son mutagénicas.

Velenisky y Gichner (1978), señalan que los embriones de las semillas poseen sistemas de reparación del DNA, los cuales actúan momentos después de que los organismos han sido rehidratados.

Osborne y col. (1984), indican que la síntesis temprana de DNA ocurre de manera normal en embriones de alta viabilidad (95 % de germinación) de semillas de centeno y, que dicha síntesis, no corresponde a una de tipo replicativo.

Además de lo anteriormente expuesto, Gudkov y Grozinsky (1976), reportan que en meristemos radicales de *Pisum sativum* L., sometidos a radiación γ , se induce la incorporación de timidina 3 [H] y este fenómeno no corresponde a una síntesis de tipo replicativo, ya que ésta ocurre horas después. Estos autores

concluyen que con la irradiación γ , la cual provoca rupturas en el DNA, se estimulan los mecanismos de reparación de la macromolécula, ya que además, inhibidores de la replicación no afectan la incorporación del radionucleótido.

Los mecanismos que operan en la reparación del DNA pueden ser, de manera general, de tres tipos, para todos los organismos: i) fotorreactivación; ii) reparación por escisión y iii) reparación post-replicativa (Veleminsky and Gichner, 1978; Hanawalt *et al.*, 1979). La reparación del DNA, al igual que la replicación, involucra la concertada activación de varios factores proteícos y enzimáticos: DNA polimerasas, proteínas que se asocian a las DNA polimerasas, DNA primasas, topoisomerasas, helicasas, proteínas que se unen al DNA, ribonucleasas, ligasas, etc. (Litvak and Castroviejo, 1987).

La reparación del DNA parece ser de vital importancia durante la germinación temprana, ya que si no se lleva a cabo este evento el embrión no germina, o si lo hace se incrementa la posibilidad de que ocurran aberraciones cromosómicas (Osborne *et al.*, 1984). En este mismo sentido Gutierrez (1987), en un reporte de reparación por escisión de uracilos en algunos vegetales (zanahoria, trigo y cebolla), señala que este mecanismo parece ser finamente regulado en los diferentes tipos celulares del organismo y depende del grado de proliferación y desarrollo celular.

I.3.5. CAMBIOS MORFOLOGICOS DEL NUCLEO

En las semillas secas, los mecanismos de síntesis de proteínas, transcripción, replicación y mitosis se encuentran inactivos. Estos eventos se reinician secuencialmente a pocas horas de iniciada la imbibición. La reactivación es acompañada por modificaciones en la expresión génica (Dowes and Van de Walle, 1983), la cual conlleva al crecimiento y diferenciación de las células embrionarias.

Deltour (1985), señala que en la mayoría de los vegetales, una vez que la maduración de la semilla se ha llevado a cabo, las células se detienen en la fase G_1 . En general, se postula, que el contenido 2C de DNA de los embriones ofrece un menor blanco a los factores que inducen mutaciones, que el contenido de 4C.

Con respecto a la cromatina, algunos reportes indican que se encuentra altamente condensada en el eje embrionario deshidratado. Durante los primeros momentos de la imbibición se observa una notable dispersión de la cromatina (Sargent and Osborne, 1980), la cual es interpretada como una desrepresión génica, que se manifiesta en una actividad enzimática y una síntesis *de novo* de ARNm (Jendrisak, 1980).

Por otro lado, en las semillas (en estado quiescente) de maíz se observan abundantes ribonucleoproteínas (RNPs) nucleoplásmicas, tanto granulares como fibrilares (Deltour *et al.*, 1979; Risueño and Moreno Díaz, 1979), las cuales se postula que son estructuras que contienen ARNm de vida-larga, y una de éstas, los granulos pericromátinianos, se cree que pueden representar el transportador del ARNm hacia el citoplasma (Vazquez-Nin and Bernhard, 1971).

Deltour (1985), señala que en la mayoría de los vegetales, una vez que la maduración de la semilla se ha llevado a cabo, las células se detienen en la fase G_1 . En general, se postula, que el contenido 2C de DNA de los embriones ofrece un menor blanco a los factores que inducen mutaciones, que el contenido de 4C.

Con respecto a la cromatina, algunos reportes indican que se encuentra altamente condensada en el eje embrionario deshidratado. Durante los primeros momentos de la imbibición se observa una notable dispersión de la cromatina (Sargent and Osborne, 1980), la cual es interpretada como una desrepresión génica, que se manifiesta en una actividad enzimática y una síntesis *de novo* de ARNm (Jendrisak, 1980).

Por otro lado, en las semillas (en estado quiescente) de maíz se observan abundantes ribonucleoproteínas (RNPs) nucleoplásmicas, tanto granulares como fibrilares (Deltour *et al.*, 1979; Risueño and Moreno Díaz, 1979), las cuales se postula que son estructuras que contienen ARNm de vida-larga, y una de éstas, los granulos pericromátinianos, se cree que pueden representar el transportador del ARNm hacia el citoplasma (Vazquez-Nin and Bernhard, 1971).

I.3.6. ACCION DE FITORREGULADORES

En plantas, las células son capaces de interactuar de diversas formas. Las interacciones más conocidas son las mediadas por mensajeros químicos: los fitorreguladores.

Se conocen cinco grupos básicos de fitorreguladores, clasificados de acuerdo a su naturaleza química y a sus efectos fisiológicos: las auxinas, el ácido abscísico, las citocininas, el etileno y las giberelinas. A continuación se mencionarán algunos eventos en los que participan cada uno de estos fitorreguladores durante la germinación (a excepción del etileno, que actúa solamente durante la maduración de frutos).

Auxinas. Promueven la elongación celular e intervienen en la diferenciación celular. Se sugiere que las auxinas pueden cambiar los niveles de algunos ARNm específicos (Theologis, 1986); asimismo, se reporta que inducen cambios en la fosforilación de proteínas en epicotilos de chícharo (Poovaiah et al., 1987).

Acido Abscísico (ABA). Este fitorregulador inhibe el crecimiento (Addicott, 1969); su modo de acción parece que es afectando el metabolismo de ácidos nucleicos (Van Overbeek et al., 1967; Villers, 1968; Walton et al., 1970, Steward and Smith, 1972; Barlow and Pilet, 1984).

Giberelinas. Durante la germinación el embrión sintetiza ácido giberélico (AG) el cual difunde hacia el endospermo hasta alcanzar la capa de aleurona, que responde sintetizando y secretando hacia el endospermo almidonoso diferentes hidrolasas, entre las cuales se encuentra la α -amilasa. Bernal (1984), señala que el AG induce la síntesis *de novo* de ARNm de la α -amilasa, y debido a esto se sintetiza dicha enzima, la cual es necesaria para los fenómenos que conllevan hacia la germinación de trigo (vegetal que ha sido tomado como modelo para este tipo de estudios).

Citocininas. Se dará una descripción amplia de su acción en el siguiente apartado.

I.3.6.1 CITOCININAS

La existencia de sustancias específicas que pueden controlar la división celular en plantas fue postulada desde mucho tiempo antes de que fueran conocidas. A tales sustancias se les dio el nombre de controladores químicos de la división celular de plantas por Wiesner (Citado por Horgan, 1984).

En 1956, después de 63 años de lo postulado por Weisner, se aisló un factor que induce la división celular (Miller *et al.*, 1956), al cual se le identificó como 6-(furfurilamino)purina y se le llamó cinetina.

En sentido genérico tenemos que las citocininas son definidas como: sustancias que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular (Horgan, 1984).

Las citocininas, similarmente a los otros cuatro fitorreguladores actúan en una multiplicidad de fenómenos biológicos.

I.3.7.1 EVENTOS FISIOLÓGICOS Y/O METABÓLICOS EN LOS QUE PARTICIPAN LAS CITOCININAS

Morfogénesis

A) Una de las respuestas más sobresalientes que se observan al agregar citocininas a cultivos de células vegetales, es que promueven la diferenciación; este fenómeno se presenta principalmente cuando las citocininas están en combinación con las auxinas (Skoog and Miller, 1957; Ferré and Torrey 1976, Bopp and Jacob, 1986). B) En plastidios, las citocininas aceleran la biogénesis del cloroplasto y promueven el incremento de la enzima ribulosa-1, 5-difosfato carboxilasa/oxigenasa (Longo *et al.*, 1979; Lerbs *et al.*, 1985).

Retraso de la senescencia

Las citocininas, aplicadas exógenamente, disminuyen la tasa de degradación de la clorofila y de proteínas, con un concomitante retraso en la senescencia. Se sugiere que una de las formas en que actúan las citocininas, es en la estabilización de los polisomas (Scrivastana, 1969; Berridge and Ralph, 1969).

Transporte dirigido por citocininas

Las citocininas tienen la capacidad de dirigir el movimiento de numerosas sustancias a diferentes áreas de la planta (Mothes, 1960).

Citocininas y luz

Las citocininas interactúan con la luz, y en algunos casos la sustituyen, durante el control de una gran cantidad de fenómenos biológicos: germinación (Miller, 1958), síntesis de pigmentos (Kohler and Conrad, 1966) y desarrollo de cloroplastos (Parthier, 1979).

Citocininas y Ácidos Nucléicos

Finalmente, el tratamiento con citocininas a hojas de frijol y a cotiledones de pepino induce un considerable incremento en el contenido de ARN total (Zwar, 1973; Naito *et al.*, 1978, 1979; Yokoyama *et al.*, 1981). Phillips y Torrey (1973), y Sympson (1977), señalan que existe un incremento en el contenido de DNA, (que coincide con la división celular), el cual es estimulado por cinetina. Otros autores también han encontrado un incremento en el contenido de ácidos nucleicos al aplicar exógenamente citocininas a tejidos vegetales (Khan and Heit, 1969; Grierson *et al.*, 1977; Tsuji *et al.*, 1979; Yokoyama *et al.*, 1980). Por otro lado se ha sugerido que las citocininas pueden prevenir el efecto inhibitorio de ABA (Khan, 1967; Sussex *et al.*, 1975) incrementando el contenido de ácidos nucleicos (Albanell *et al.*, 1985).

Asimismo, se reporta que existe una relación del fitorregulador con el ciclo celular (Parker *et al.*, 1978). Algunos datos que apoyan este último efecto han sido proporcionados por Nishinari y Syono (1986), estos autores encuentran que se manifiesta un drástico incremento de citocininas en los límites de la fase G₂/M, y otros más ligeros durante la fase S del ciclo celular.

I.3.7.2. POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE CITOCININAS

En forma general, el mecanismo de acción que debe operar en cualquier molécula que promueva una serie de eventos metabólicos, es que inicialmente tiene que unirse a una molécula receptora, de tal suerte que se una específicamente a ésta, y a partir de aquí desencadenar una actividad biológica.

Es de esperar entonces que el mecanismo que debe operar para que las citocininas promuevan los fenómenos metabólicos y/o fisiológicos que se han reportado es el de unirse a un receptor.

Uno de los primeros reportes que se aproxima a lo anterior fué el realizado por Berridge *et al.* (1970), quienes describieron un multisitio reversible no-saturable de las citocininas en los ribosomas aislados de hojas de *Brassica periniensis*.

Fox y Erion (1975) reportan que existe una alta especificidad y afinidad de enlace de la citocinina a una proteína, cuyo peso molecular es de 183 KDa y consiste de cuatro subunidades. Asimismo se reporta también un factor de alta afinidad asociado con la fracción mitocondrial de *Phaseolus vulgaris* (Keim *et al.*, 1981).

También se han aislado proteínas con una alta afinidad para citocininas, de hojas de tabaco y centeno, más su función no es muy clara, debido a que no se ha provado que dichas proteínas sean estrictamente receptores de citocininas, sino que también pueden ser: a) enzimas que se requieran para el metabolismo de dichos fitorreguladores; b) proteínas que estén involucradas en el transporte o c) proteínas que se conjugan con las citocininas.

Lerbs y col. (1985), señalan que la respuesta inicial en la célula debe consistir probablemente, de una señal transmisora o receptora, en una fase temprana de la expresión génica y su transcripción.

Por otro lado, la localización de citocininas en ciertas especies de ARNt y su localización específica en el extremo 3' del anticodón de iniciación sugiere que el modo de acción inicial de este fitorregulador puede ser via la incorporación al ARNt. Sin embargo la hipótesis anterior no puede ser del todo cierta, debido a que los cultivos vegetales incorporan las citocininas a su ARNt en muy baja proporción y, además, ésta no es muy específica (Horgan, 1984).

Kulaeva (1981), sugiere que las citocininas pueden modificar las propiedades de la ARN polimerasa, a través de la unión a un aceptor o cofactor (localizado en el citoplasma), de dos maneras: i) afectando a la enzima directamente o ii) a través de la modificación de la crómatina a la cual la se une la ARN polimerasa. Con base en esto, es entonces por lo que se dice, que el fitorregulador estimula la síntesis del ARN total.

Otra de las hipótesis involucra una regulación específica por las citocininas, de la síntesis de proteínas que se lleva a cabo en la transcripción y/o traducción. En este sentido se ha reportado que la cinetina puede regular la actividad génica uniéndose a la cromátina (Matthysee and Abrams, 1970).

II. ANTECEDENTES

Como ha sido señalado en la parte introductoria, las citocininas estimulan la síntesis de ácidos nucleicos de vegetales. En el laboratorio se ha probado el efecto que tiene benzil-adenina (BA, una citocinina sintética) sobre la síntesis del DNA que se lleva a cabo durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de *Zea mays* L. (var. Chalqueño).

Algunos resultados obtenidos hasta el momento muestran que se lleva a cabo un bajo, pero constante, nivel de síntesis de DNA durante las primeras horas de germinación de maíz (Vázquez Ramos y López, 1986). Esto pareciera ser un fenómeno común en las gramíneas, y de hecho existe evidencia de que la naturaleza de esta síntesis puede ser de tipo reparativo (Osborne *et al.*, 1984; Vázquez-Ramos and Osborne, 1986). Además esta síntesis temprana pudiera ser vital para la viabilidad de semillas y ocurre antes de que se inicie la síntesis replicativa (Osborne *et al.*, 1984).

Zarain y col. (1987), analizaron cualitativamente el tipo de síntesis de DNA que se lleva a cabo durante las primeras horas de germinación en maíz por cromatografía en BND-celulosa. En estos estudios encontraron que mientras que en embriones de semillas control no existe una síntesis predominante (no se puede diferenciar entre síntesis de tipo reparativo y replicativo), al agregar BA a dichos ejes se hacen ostensibles dos fenómenos: a) se incrementa la síntesis total de DNA y b) se detecta principalmente una síntesis de tipo reparativo. Estos mismos estudios se realizaron en ejes γ -irradiados, en los que existe una predominancia de síntesis de DNA de tipo reparativo; en presencia de BA los ejes γ -irradiados mostraron un comportamiento similar a los ejes no-irradiados, es decir: una mayor proporción de síntesis de tipo reparativo y un incremento total en síntesis de DNA.

El presente trabajo pretende aportar algunos elementos para el entendimiento del mecanismo de la estimulación de la síntesis de DNA por BA en ejes embrionarios de maíz, tanto γ -irradiados como no-irradiados.

III. HIPOTESIS

Dado que varios reportes en la literatura indican que las citocininas, al agregarlas exógenamente incrementan la síntesis de DNA, se postula que dicho incremento se debe a una estimulación de la síntesis de enzimas propias del metabolismo de DNA, tales como la DNA polimerasa.

IV. OBJETIVOS

I) Conocer si la estimulación de la síntesis de DNA por benzil-adenina (BA) ocurre en forma similar, tanto en ejes embrionarios no-irradiados (alta viabilidad) como en los γ -irradiados (baja viabilidad). Para ello los experimentos se hicieron con los dos tipos de ejes.

II) Determinar a qué tiempo de la germinación temprana, la síntesis de DNA de ejes embrionarios de maíz, son más sensibles a responder al efecto estimulador de BA.

III) Probar el efecto que tienen inhibidores (ya sea de la traducción o de la transcripción) en el estímulo de la síntesis de DNA promovido por BA.

IV) Medir si la actividad específica de la DNA polimerasa se ve afectada en el estímulo de la síntesis de DNA promovido por BA.

V. MATERIAL

Material Biológico

Las semillas de maíz (var. chalqueño) fueron proporcionadas por PRONASE (Productora Nacional de Semillas), Coyoacán, México, D.F. Los lotes de semillas tenían un porcentaje mínimo de germinación del 95%. Los ejes embrionarios, fueron obtenidos por disección manual, y si éstos no eran usados inmediatamente se mantenían en refrigeración a 4°C en un desecador.

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Benzil-Adenina, Cloranfenicol, α -amanitina, cicloheximida, timidina, albúmina de suero bovino (BSA), DNA de timo de ternera, dATP, dCTP, dGTP y ATP (Sigma Chemical Co.).

Timidina 3 [H], uridina 3 [H], metionina [35 S] y (metil- 3 [H])TTP (Amersham).

Tris-HCl, 2,2'fenilbis (5-fenoxazol) -POPOP-; y 2,5-difenoxazol -PPO- (Merck).

Soluciones Amortiguadoras y Reactivos Utilizados

Buffer de Imbibición (BI)

Tris-HCl, pH 7.6	50 mM
Cloruro de potasio	50 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
Sacarosa	2 %
Cloranfenicol	10 μ g/ml

A este buffer se le agrega, según el experimento a realizar:

Timidina ³ [H] (24.3 Ci/mmol)	20	μCi/ml
Uridina ³ [H] (30 Ci/mmol)	20	μCi/ml
L-[³⁵ S] metionina (1350 Ci/mmol)	20	μCi/ml
Benzil-adenina	100	μg/ml
α-amanitina	10	μg/ml
Cicloheximida	100	μg/ml
Cloranfenicol	100	μg/ml

Solución de homogeneización

Cloruro de sodio	0.15	M
EDTA	0.10	M
SDS	0.50	%

Solución de lavado

Citrato de sodio 1 % + 20 μg de timidina/ml	10	ml
Etanol 80 % + 20 μg de timidina/ml	10	ml

Solución Amortiguadora "A" para Homogeneizar

Tris-HCl, pH 7.6	50	mM
Cloruro de potasio	25	mM
2-mercaptoetanol	1	mM
Sacarosa	0.25	M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	0.10	mM
Cloruro de magnesio	1	mM

Líquido de Centelleo (LC)

2,2'-p-fenilen-bis(5-feniloxazol) (POPOP)	0.1	g
2,5-difeniloxazol (PPO)	5.0	g
Tolueno	1.0	l

Solución amortiguadora para activación del DNA

Tris-HCl, pH 7.5	50	μ M
Cloruro de magnesio	5	μ M
Albúmina de suero bovino (ASB)	0.5	mg/ml
DNA de timo de ternera	0.25	mg/ml

Mezcla de Reacción para el Ensayo de DNA polimerasa

Tris-HCl. pH 7.6	25	mM
Cloruro de potasio	16	mM
Cloruro de magnesio	6	mM
dATP	0.1	mM
dCTP	0.1	mM
dGTP	0.1	mM
Glicerol	4	%
2-mercaptoetanol	0.4	mM
DNA activado	1	μ g
ATP	1	mM
(metil- ³ H) TTP (57 Ci/mmol)	5	μ Ci/ml

Reactivos Requeridos para Determinar Proteínas Totales por el Método Modificado de Lowry (Peterson, 1977)

Reactivo A:

Se mezclan partes iguales de una solución de hidróxido de sodio 0.8 N, SDS al 10%, agua destilada y una solución de tartrato --carbonato-cobre (CTC).

Reactivo B:

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.0	vol.
Agua destilada	5.0	vol.

Soluciones Complementarias

Solución de CTC:

Carbonato de sodio	10	%
Sulfato de cobre pentahidratado	0.1	%
Tartrato de potasio	0.2	%
Desoxicolato de sodio (DOC)	0.15	%
TCA	72	%

Solución proteica para la construcción de la curva patrón.

Albúmina de suero bovino	1.0 mg/ml
--------------------------	-----------

Solución salina de citrato para disolver DNA (SSC).

Cloruro de sodio, pH 7.0	0.15	M
Citrato de sodio	0.015	M

VI METODOS

Irradiación de Ejes Embrionarios

Los ejes embrionarios que se colocaban en cajas petri de plástico, fueron expuestos a irradiación gamma proveniente de una fuente de cobalto de un irradiador Gamma Cell 200 (AECL), por un periodo de 120 minutos para alcanzar una dosis máxima de 1 000 Grays.

Imbibición de Ejes Embrionarios

En todos los experimentos se utilizaron muestras de 10 ejes embrionarios, excepto en los que se medía la actividad específica de la DNA polimerasa, en donde se utilizaban 50 ejes. Los ejes se incubaban sobre un disco de papel Whatman # 1 estéril, en pequeños frascos estériles con 100 μ l de BI. Las muestras se dejaban embeber por diferentes periodos en una incubadora con luz (Freas 818, Precision Scientific Company) a una temperatura de 25 ± 1 °C. Cuando las muestras se embebieron en presencia de algún inhibidor, éstas se sometieron a vacío durante aproximadamente 15 minutos para que dicha molécula penetrara al eje embrionario.

En los experimentos en que se midió la sensibilidad de respuesta de los ejes embrionarios a BA (síntesis de DNA), éstos fueron marcados con timidina 3 [H] en forma de pulsos por las últimas 3 horas del periodo de incubación de la siguiente manera: los ejes se colocaban en BI y 3 horas antes del término del periodo experimental (0-3, 0-6, 0-9, 0-12) se sacaron de los viales en que se encontraban y se les removía el exceso de BI con un papel Whatman, del No.1 estéril, enseguida eran colocados en un disco de papel del mismo tipo con 100 μ l de BI que contenían timidina 3 [H] (20 μ Ci/ml), dejándose embeber hasta el término del periodo experimental. Al concluir este tiempo los ejes embrionarios se lavarón, para remover el exceso de timidina 3 [H], con 10 ml de citrato de sodio 1 % + 20 μ g de timidina y, 10 ml de etanol (80%)+ 20 μ g de timidina, para enseguida homogeneizarlos.

En los experimentos en que se deseaba cuantificar el porcentaje de síntesis de ARN o de proteínas, los ejes embrionarios se marcaron con uridina ³[H] o metionina ³[H], respectivamente, desde el inicio del periodo de incubación hasta su término (0-6 horas), al concluir este periodo los ejes embrionarios se lavaron como en el caso anterior y se homogeneizaron.

En los siguientes experimentos (excepto en los que se medía la actividad específica de la DNA polimerasa) primero se preparaba el BI con timidina ³[H] y enseguida se agregaba, ya sea el inhibidor respectivo (cloranfenicol o α -amanitina) y/o BA en las concentraciones respectivas. Seguido de esto se dejó embeber los ejes embrionarios durante 6 horas. Para los experimentos en que se medía la actividad específica de la DNA polimerasa, se hacía todo lo anterior, a diferencia de que el BI no lleva ningún radionucleótido.

Preparación del Homogeneizado

Para cuantificar la incorporación total del radionucleótido al material insoluble en TCA, los ejes embrionarios se homogeneizaron a 4°C en un mortero con 1.2 ml de SL. Al homogeneizado se le agregó 1.0 ml de TCA 20% y se mantuvo en frío por un periodo mínimo de 60 minutos. Para medir la incorporación total de la marca (uptake) se tomó una alícuota de 100 μ l (del homogenado) y se puso sobre un disco de papel whatman GF/A (2.4 cm), el que fue secado en un horno a 60°C durante 60 minutos y se contaron en viales que contenían 5.0 ml de LC, en un contador de centelleo Packard Tri-Carb.

El precipitado con TCA fue filtrado al vacío a través de un disco de papel whatman GF/A, lavado con TCA 5% (10.0 ml) y enseguida con etanol al 96% (10.0 ml), el filtrado fue secado y contado de la misma manera que en el caso anterior. Al resultado obtenido se le toma como la incorporación de timidina ³[H] al DNA.

Preparación del Extracto Celular

(Para medir actividad específica de la DNA polimerasa)

Pasado el tiempo de imbibición, los ejes embrionarios se homogeneizarán con 2.5 ml de solución amortiguadora "A" en un mortero.

El homogeneizado se centrifuga a 5 000 x g durante 15 minutos, se toma el sobrenadante y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Estas dos centrifugaciones sirven para eliminar restos celulares y la mayoría de los lípidos presentes. El sobrenadante se centrifuga a 100 000 x g durante 2 horas, la pastilla se desecha y este nuevo sobrenadante se utiliza como fuente enzimática para realizar el ensayo de DNA polimerasa.

Preparación del DNA Activado (según Aposhian and Kornberg, 1962)

Se hacen reaccionar 0.25 mg de DNA de timo de ternera, previamente disuelto en 1 ml de solución amortiguadora de activación con 5×10^{-4} μ g de DNAasa I. Se incuba 15 minutos a 37°C y luego se calienta 5 minutos a 77°C; finalmente se pasa a un baño de hielo.

Determinación de la Actividad de DNA polimerasa

La actividad de DNA polimerasa se ensaya en un volumen final de 100 μ l que contiene la mezcla de reacción y 20 μ l del sobrenadante obtenido a 100 000 x g. La incubación se lleva a cabo a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detiene adicionando 100 μ l de una solución de DNA de esperma de salmón (2 mg/ml) disuelto en solución salina de citratos, y 2 ml de TCA al 10 % frío. Las muestras se colocan en hielo durante 30 minutos.

La radioactividad incorporada en material insoluble en TCA se obtiene filtrando por vacío a través de filtros de fibra de vidrio whatman GF/C. Luego, los filtros se lavan, primero con 5 ml de TCA al 5% frío y enseguida con 5 ml de etanol al 96%. Se secan perfectamente y se transfieren a viales que contienen 5 ml de LC.

Se determinan las cuentas por minuto (cpm) en el contador de centelleo.

Determinación de la Concentración de Proteínas. Método Modificado de Lowry (Peterson, 1977)

A partir de la solución stock de albúmina de suero bovino, se preparan soluciones patrón a diferentes concentraciones desde 0 hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen final de 1.0 ml con agua destilada. Las muestras problema (20 μl del sobrenadante obtenido a 100 000 x g) también se llevan a un volumen final de 1.0.

A todas las muestras, se les agrega 0.1 ml de DOC mezclando en un vortex y se dejan 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se les agrega 0.1 ml de TCA al 72 % frío y se colocan en hielo durante 15 minutos.

Las muestras se centrifugan 15 minutos a 3 000 rpm, el sobrenadante se desecha, a la pastilla se le agrega 1.0 ml de agua destilada y 1.0 ml de reactivo A, y se mezcla muy bien en un vortex, se dejan 10 minutos a temperatura ambiente. Después se les adiciona 0.5 ml del reactivo B, se agita y se deja 30 minutos a temperatura ambiente, período en el cual se desarrolla el color. Se lee la absorbancia a 750 nm.

La curva patrón de proteínas se construye graficando en las abscisas la concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$) y en las ordenadas la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteína de las muestras problema se determina interpolando la absorbancia en la curva patrón.

De esta manera la actividad específica de la DNA pol. se obtiene dividiendo las cuentas por minutos (cpm) obtenidas en el ensayo de esta enzima entre la cantidad de proteínas.

VII. RESULTADOS

Para la realización del presente estudio se trabajó con ejes embrionarios de *Zea mays* L. (var. Chalqueño), tanto sometidos a irradiación γ (1 000 G) como no-irradiados, los cuales se imbibían en presencia de la citocinina sintética benzil-adenina (BA). Los datos que se presentan son el promedio de al menos tres experimentos independientes.

La primera serie de experimentos, consistieron en saber a qué tiempo, durante las primeras 12 horas de la germinación, los ejes embrionarios son más sensibles a responder a BA (10^{-4} M), es decir tienen un mayor incremento en la síntesis de DNA, de tal manera que se pueda apreciar significativamente la síntesis estimulada por BA, para a partir de esto poder llevar a cabo los siguientes experimentos que nos permitan discernir a qué nivel se presenta el estímulo de la síntesis de DNA.

I. Estimulación de la Síntesis de DNA por BA a Diferentes Tiempos de la Germinación Temprana.

En la fig. 1a y 1b, podemos observar la síntesis de DNA que ocurre en ejes embrionarios no-irradiados y γ -irradiados, respectivamente, en presencia y sin BA, después de haber marcado los ejes con timidina 3 [H], durante las tres últimas horas del periodo experimental respectivo (0-3, 0-6, 0-9, 0-12). Se observa que la incorporación del radionucleótido es mayor en ejes γ -irradiados que en los no-irradiados durante las primeras 6 horas de imbibición. Dada la naturaleza del daño que la irradiación provoca al DNA, podría sugerirse que estos ejes se encuentran desarrollando un proceso de reparación del DNA más intenso que en los ejes no-irradiados; evidencia de lo anterior fue dada por Zarain *et al.* (1987). Después de este tiempo la cinética de síntesis de DNA en ejes γ -irradiados disminuye, mientras que en los ejes no-irradiados ésta se dispara notablemente. En ambas figuras se aprecia que la síntesis de DNA siempre se incrementa

cuando los ejes embrionarios se han embebido en presencia de BA 10^{-4} M). Si bien, aunque el pico de actividad se presenta a las 6 horas, el mayor porcentaje de incremento lo tenemos, para ejes embrionarios no-irradiados, a las 6 horas, mientras que para ejes γ -irradiados a las 9 horas (Fig. 1 y Tabla I).

Para la realización de los siguientes experimentos el tiempo de imbibición con el que trabajamos fue de 6 horas, ya que es en este momento en que se tiene un máximo de la síntesis de DNA, en ambos tipos de ejes, cuando agregamos el fitorregulador.

Con el fin de determinar la naturaleza de la estimulación de la síntesis de DNA por BA, el siguiente paso fue observar el efecto que un inhibidor de la síntesis de proteínas, como la cicloheximida, tenía sobre la síntesis de DNA en los ejes embrionarios.

CPM DE TIMIDINA $^3\text{[H]}$ X (10^3)

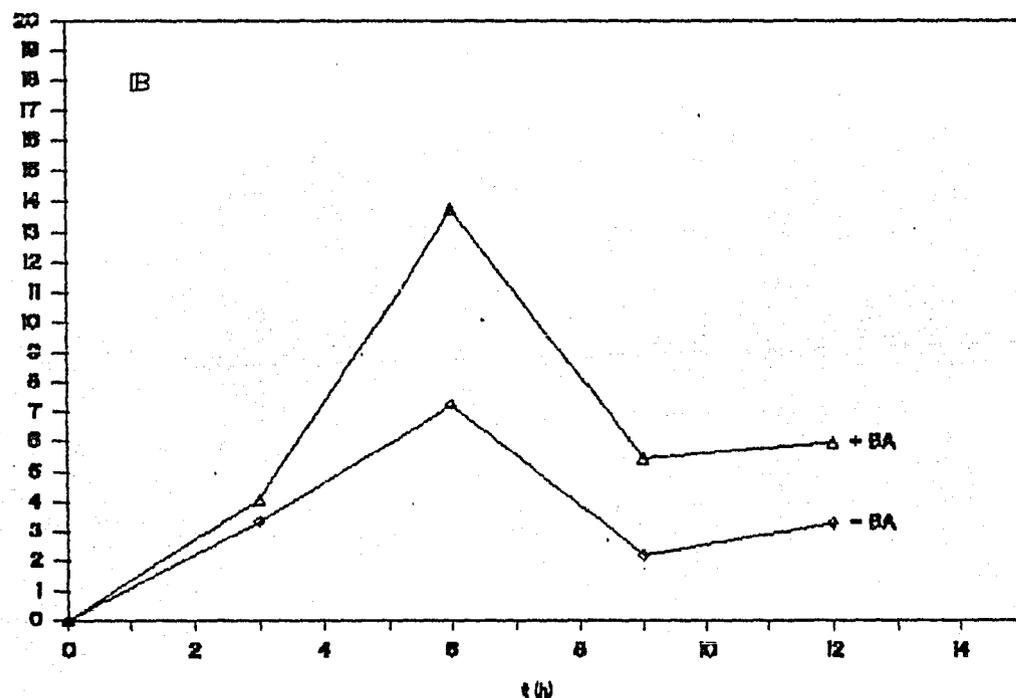
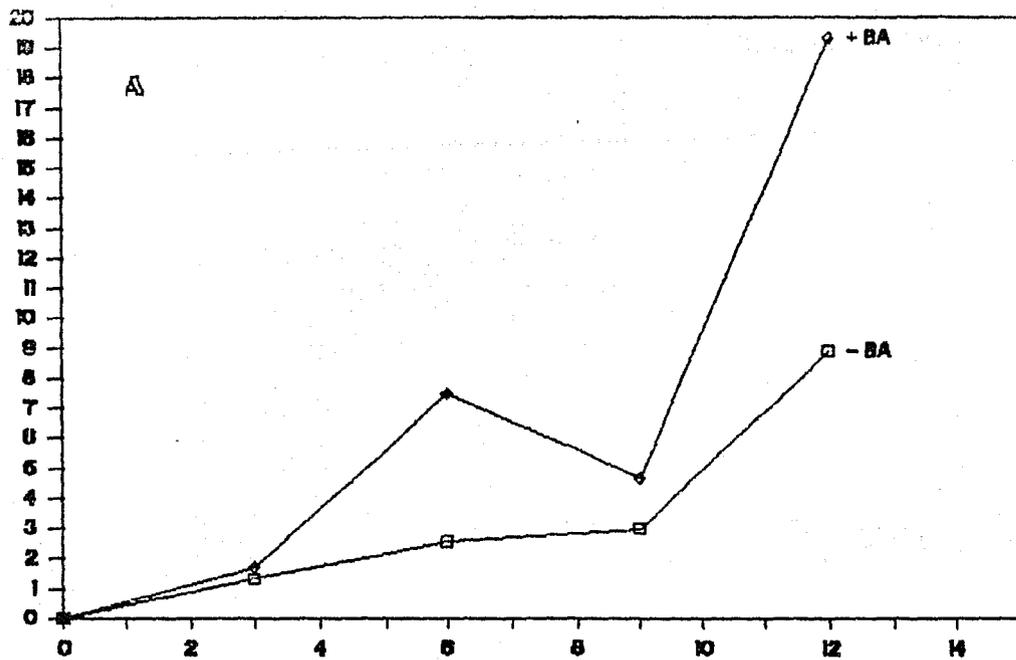


Fig. 1. Síntesis de DNA de ejes embrionarios de maíz embebidos en presencia (+ BA) y en ausencia (- BA) de benzil-adenina (10^{-4} M). Los ejes recibieron un pulso de timidina $^3\text{[H]}$ durante las 3 últimas 3 h del periodo experimental respectivo. A. Ejes no-irradiados. B. Ejes γ -irradiados.

Tabla I. Estimulación de la síntesis de DNA de ejes embrionarios de maíz por BA. Datos obtenidos a partir de las fig. 1.

Por ciento de incremento en la síntesis de DNA		
horas	Ejes no-irradiados	Ejes γ -irradiados
3	29	22
6	192	90
9	57	148
12	117	83

II. Efecto de Cicloheximida Sobre el Incremento en la Síntesis de DNA estimulada por BA.

En este conjunto de experimentos lo primero que se hizo fue probar que cicloheximida (CH) efectivamente inhibe la síntesis de proteínas durante las primeras 6 horas de imbibición, que es el tiempo experimental. El porcentaje de síntesis de proteínas en presencia de CH fue de 80 %, medida como la incorporación de metionina ³[H] a material insoluble en TCA, es decir, hubo una inhibición del 20 % (Fig. 2).

Las figuras 3a y 3b representan el efecto que tiene CH sobre la síntesis de DNA, en los ejes embrionarios no-irradiados y γ -irradiados, respectivamente, durante las primeras 6 horas de imbibición. En la fig. 3a se observa una síntesis de DNA del 110 % para los ejes no-irradiados tratados con BA, lo cual da un incremento del 10 %; este menor incremento comparado con el obtenido en la Fig. 1 puede deberse a que en estos experimentos se aplica vacío para que el inhibidor pueda entrar al eje embrionario. Este hecho probablemente provoca alguna alteración a las estructuras del organismo, de tal manera que se afectan algunos factores y se impide un mayor incremento en la síntesis de DNA. Cuando los ejes se embeben en presencia de BA + CH, la síntesis de DNA es del 45 % y cuando agregamos sólo CH es del 54%.

La misma tendencia se observa en ejes γ -irradiados (Fig. 2b). La síntesis de DNA es del 142 % cuando se embeben en presencia de BA, más cuando los ejes son tratados con BA + CH la síntesis es del 65% y 52 % cuando se embeben sólo en presencia de CH.

Los resultados anteriores sugieren que BA está de alguna manera modificando la maquinaria de traducción; no obstante, cabe la posibilidad de que el efecto que provoca el fitorregulador no se encuentre a este nivel de expresión, sino lo que estamos viendo sea consecuencia de que BA ha alterado algún evento previo al de la síntesis de proteínas, como puede ser la transcripción. Con la idea de probar lo anterior los siguientes experimentos consistieron en ver el efecto que tiene α -amanitina -un inhibidor de la RNA polimerasa II- sobre la síntesis de DNA estimulada por BA.

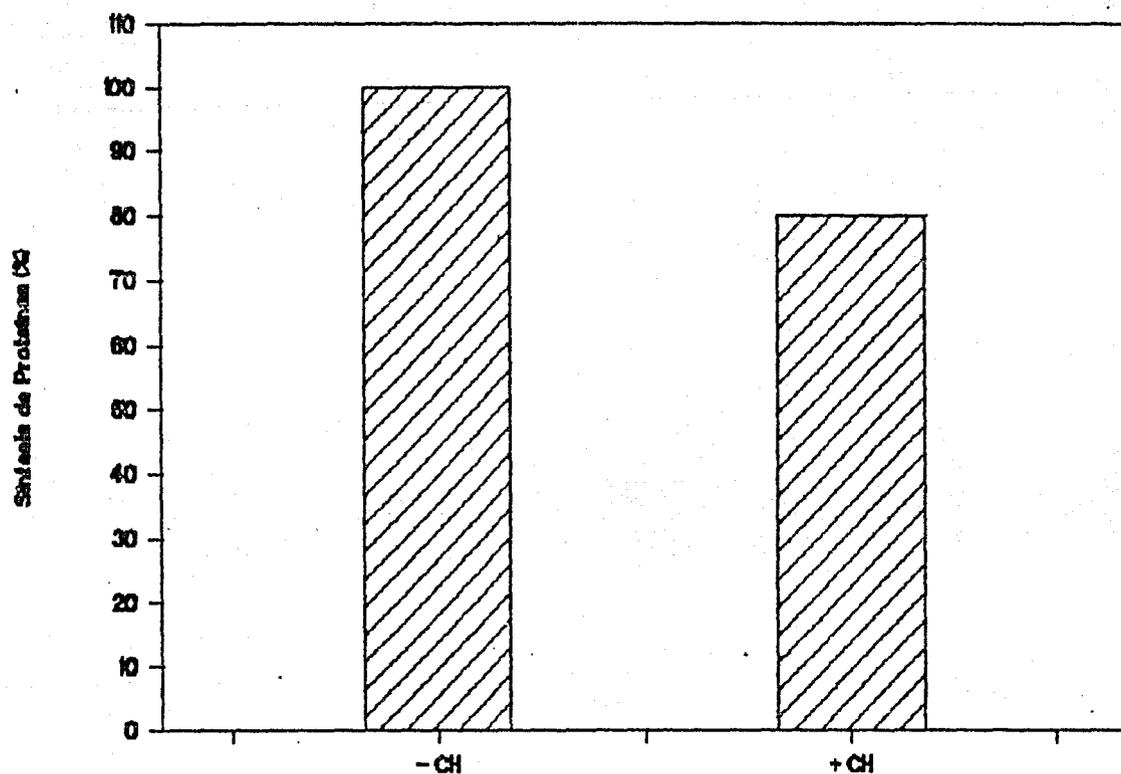


Fig. 2. Inhibición de la síntesis de proteínas por cicloheximida (CH; 100 $\mu\text{g/ml}$) a ejes embrionarios de maíz embebidos durante 6 h.

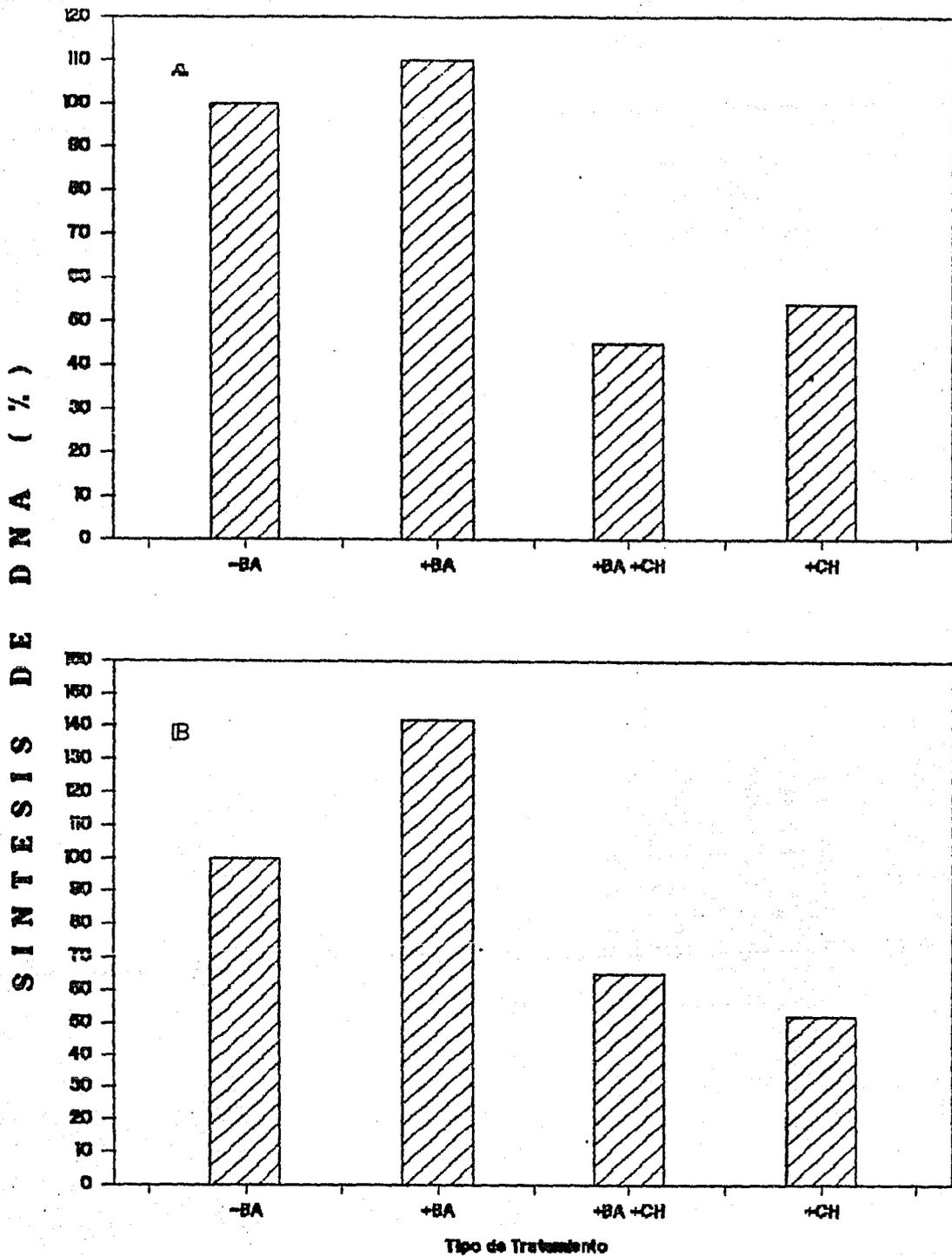


Fig. 3. Efecto de Cicloheximida sobre la síntesis de DNA de ejes embrionarios. Las muestras se embebieron durante 6 h con el respectivo tratamiento. A. Ejes embrionarios no-irradiados. B. Ejes embrionarios γ -irradiados.

III. Efecto de α -Amanitina Sobre el Incremento en la Síntesis de DNA Estimulada por BA.

En esta serie de experimentos lo primero que hicimos fue conocer que efectivamente al tiempo a que estamos trabajando se está llevando a cabo una síntesis de RNA susceptible de ser inhibida por α -amanitina (10 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados obtenidos nos señalan que al embeber los ejes embrionarios 6 horas en presencia de uridina $^3\text{[H]}$ (20 $\mu\text{Ci/ml}$) y α -amanitina (AA), la síntesis de RNA se inhibe en 15 % (Fig. 4).

La fig. 5 nos muestra el efecto que tiene α -amanitina (AA) sobre la síntesis de DNA, tanto de ejes no-irradiados como γ -irradiados. En la fig. 5a se observa que en presencia de BA la síntesis de DNA de ejes embrionarios no-irradiados es del 110 %, más al poner en la solución de imbibición BA + AA, el porcentaje de la síntesis de DNA con respecto al control es del 64 % y cuando agregamos sólo AA la síntesis de DNA es de 50 %.

Con respecto a los ejes γ -irradiados (Fig. 5b), se observa un comportamiento semejante al de ejes no-irradiados. La síntesis de DNA en presencia de BA es del 140 %; cuando se agrega BA + AA es del 68 % y cuando sólo está presente AA es del 65 %.

La estimulación de la transcripción pareciera ser el mecanismo por el cual BA estimula la síntesis temprana de DNA durante la imbibición de ejes embrionarios. El siguiente objetivo fue determinar si alguna enzima del metabolismo del DNA en particular era estimulada por BA. La actividad enzimática que se midió fue la de la enzima DNA polimerasa.

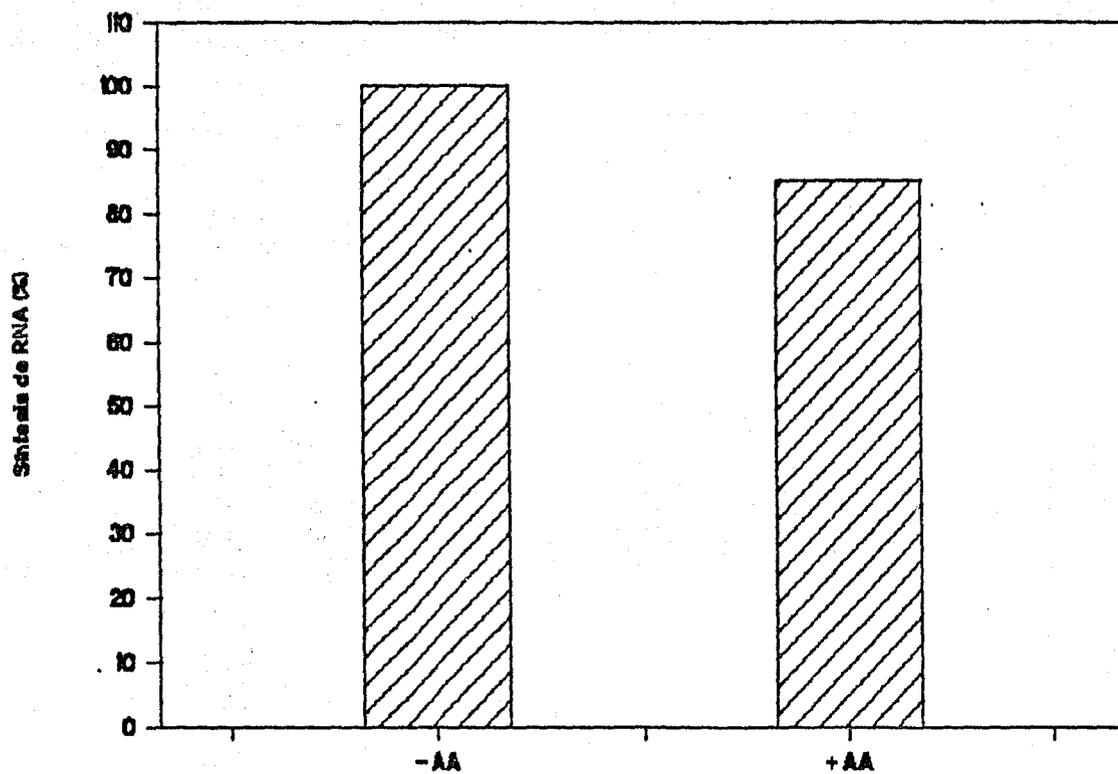


Fig. 4. Inhibición de la transcripción por α -amanitina (AA; 10 $\mu\text{g/ml}$) a ejes embrionarios embebidos por 6 h.

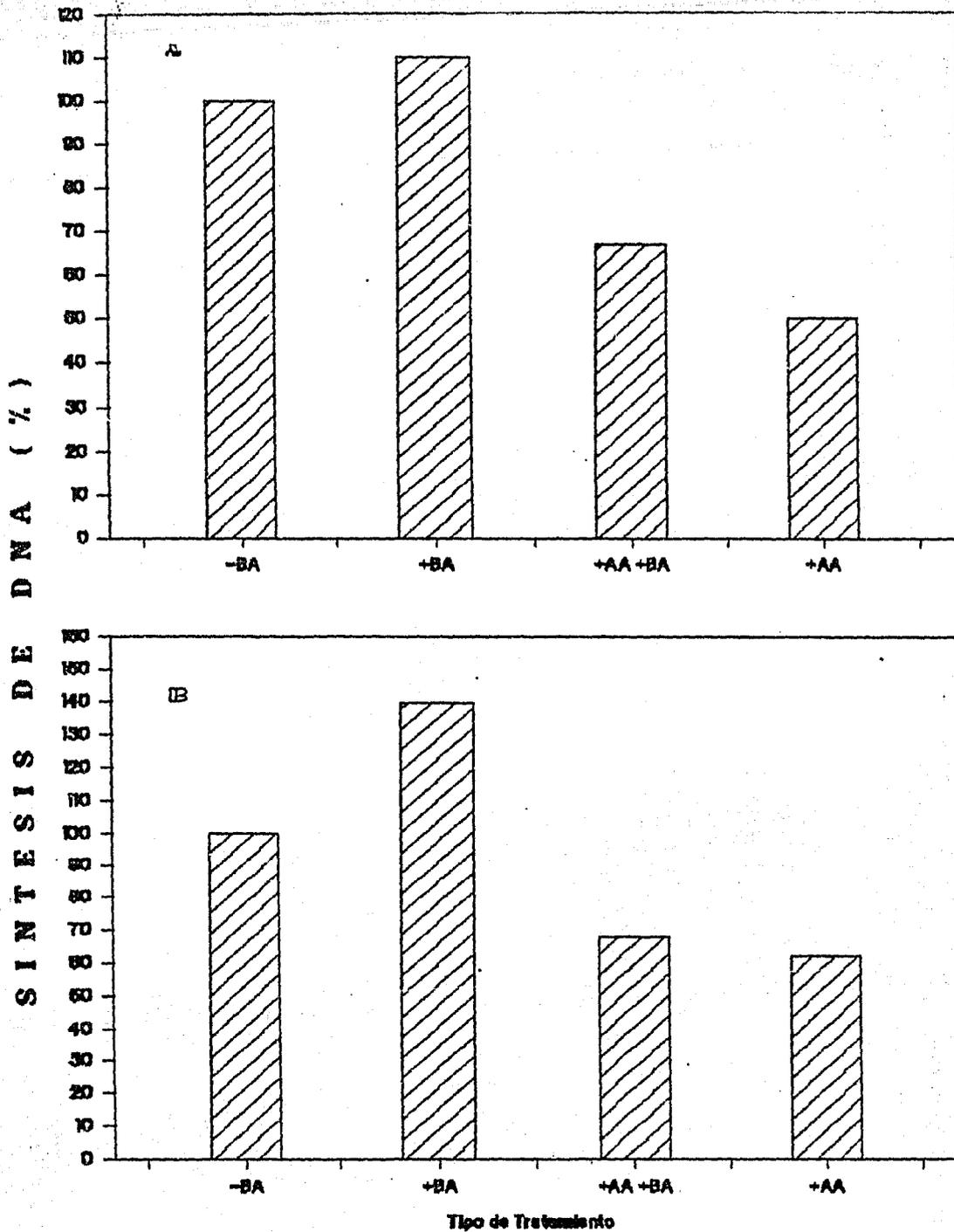


Fig. 5. Efecto de α -amanitina sobre la síntesis de DNA de ejes embrionarios embebidos durante 6 h con el respectivo tratamiento. A. Ejes no-irradiados. B. Ejes γ -irradiados.

IV. Actividad Específica de la DNA polimerasa

La actividad de la DNA polimerasa (DNA pol.) es medida como la relación que existe entre la radioactividad incorporada, en forma insoluble en TCA durante el ensayo y la cantidad de proteínas en la mezcla de reacción (ver métodos). En la fig. 6a se aprecia que existe un incremento del 23 % en la actividad específica de la DNA pol. cuando los ejes embrionarios no-irradiados se han embebido en presencia de BA durante 6 horas, mientras que para ejes embrionarios γ -irradiados, bajo las mismas condiciones, se aprecia un incremento del 14 % (Fig. 6b).

Ahora bien, el incremento observado en la actividad específica de la DNA pol. cuando se embeben los ejes embrionarios en presencia de BA puede deberse, de manera general, a tres factores: i) incremento en la transcripción del gene(s) que codifica(n) para la DNA polimerasa; ii) incremento en la traducción del ARN^m correspondiente a la DNA polimerasa y iii) un incremento en la actividad de la DNA polimerasa.

Para tratar de discernir entre las tres posibilidades descritas anteriormente, se embebieron los ejes embrionarios por 6 horas en presencia o ausencia de inhibidores de la transcripción (α -amanitina) o de la traducción (cicloheximida) y se midió la actividad de la DNA polimerasa en los extractos de estos ejes. La tabla II nos muestra los resultados de estos experimentos. Aquí se observa que en presencia de cualquiera de los inhibidores la actividad de la DNA pol. se mantiene por encima de la muestra control (- BA), no así la cantidad de proteínas que disminuye parcialmente en estas muestras.

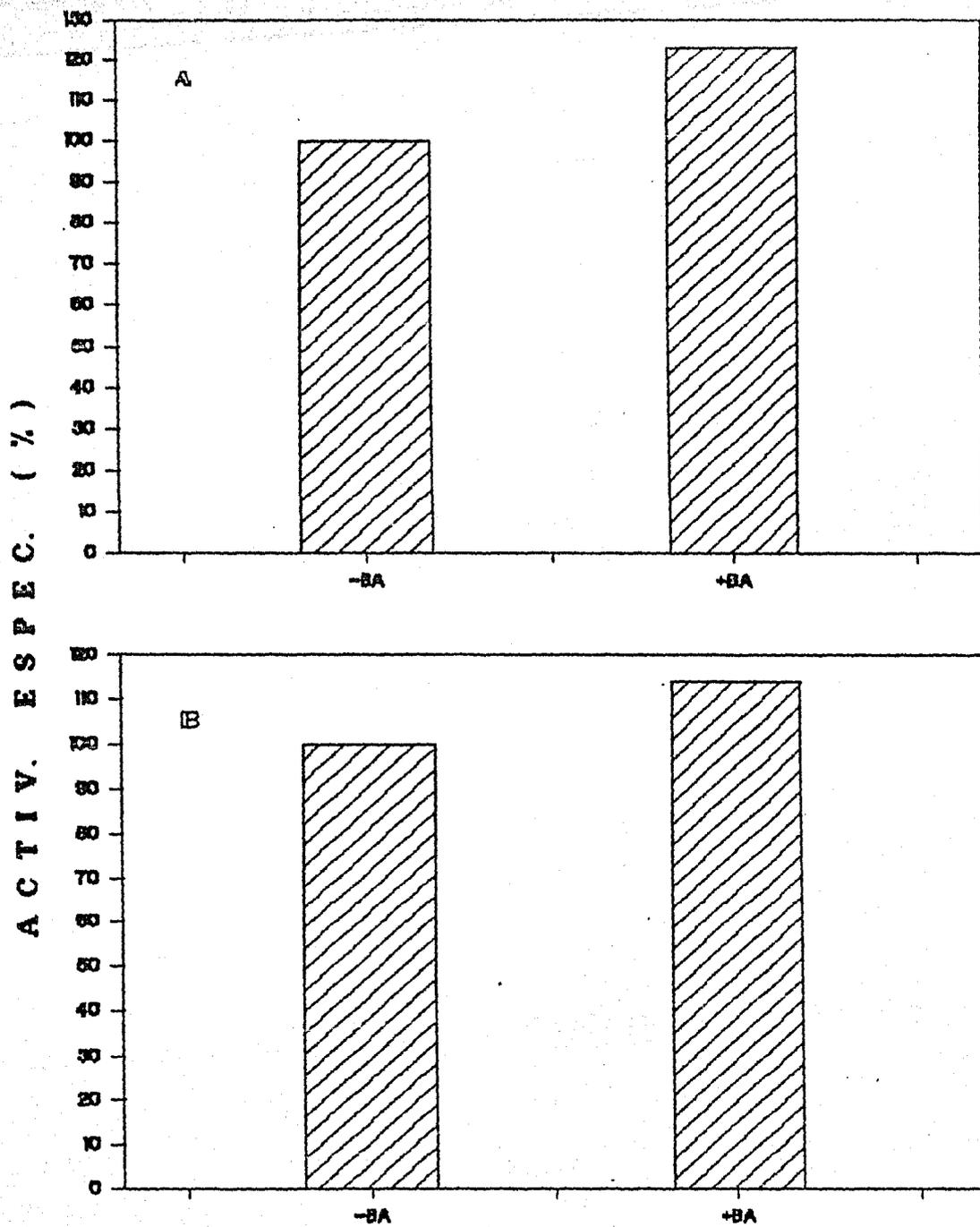


Fig. 6. Actividad específica de la DNA polimerasa de ejes embrionarios embebidos durante 6 h. A. Ejes no-irradiados. B. Ejes γ -irradiados.

Tabla II. Actividad Específica de la DNA pol. en presencia de BA e inhibidores (CH y AA).

Muestra	Activ. Espec. (%)	µg de prot. (%)
- BA	100	100
+ BA	119	98
+ BA + AA	111	87
+ BA + CH	146	74
+ CH	114	82
+ AA	113	92

VIII. D I S C U S I O N

A partir de que en 1956 se postula a las citocininas como promotoras de la división celular (Miller *et al.*, 1956), una serie de evidencias han probado que este fitorregulador está interviniendo en una diversidad de eventos metabólicos y/o fisiológicos.

En uno de los primeros trabajos realizados con citocininas se señaló que existía un incremento en el contenido de DNA al agregar este fitorregulador a tejido medular de *Nicotiana tabacum* (Das *et al.*, 1956). Investigaciones posteriores indicaron que se manifestaba un incremento tanto en el contenido de ARN como de DNA al añadir citocininas a diferentes tejidos vegetales (Mikulovitch and Kulaeva, 1977; Naito *et al.*, 1978; Tsuji, 1979; Yokoyama *et al.*, 1980; 1981).

Si bien es claro que se incrementa el contenido de DNA al agregar cualquier citocinina, no se sabe con precisión a qué puede corresponder este efecto. Yokoyama y col. (1980), proponen que el incremento en la cantidad de DNA puede deberse a: i) estimulación en la división celular; ii) endopoliploidia; iii) amplificación génica o iv) proliferación del DNA organelar.

Ahora bien, en nuestro grupo de trabajo Zarain y col. (1987), encontraron que BA estimula la síntesis total de DNA de ejes embrionarios de *Zea mays* a 3 y 15 horas después de la imbibición. Al analizar la síntesis de DNA por cromatografía en BND-celulosa obtuvieron patrones que muestran un incremento preferencial en la síntesis de tipo reparativo; es así que se concluye que en ejes embrionarios de maíz en germinación, BA estimula preferencialmente una síntesis de tipo reparativo. En concordancia con los datos anteriores Galli (1984), señaló que existe un incremento en la síntesis de DNA nuclear en cotiledones de sandía cuando se agrega BA, y que esta síntesis no corresponde a una de tipo replicativo.

Nuestros resultados señalan que existe una estimulación de síntesis de DNA a cualquier tiempo, durante las primeras 12 horas de germinación, en presencia de BA (10^{-4} M); ésto ocurre tanto en embriones no-irradiados como en γ -irradiados. No obstante la cinética de estimulación es diferente en ambas muestras.

Los datos de la Fig. 1 son compatibles con los que otros investigadores han reportado (Tabla III); es decir, las citocininas intervienen en varios eventos, ya sea moleculares y/o fisiológicos, y cualquiera de éstos tiene un tiempo específico al cual se ven afectados mayormente por el fitorregulador y, además, como señala Trewavas (1982), esta sensibilidad a responder es el factor limitante para que las células se vean afectadas o no por cualquier fitorregulador, no importando a que concentración se encuentre esta molécula.

A partir de los datos de la Tabla I, en donde se observa que los ejes embrionarios no-irradiados y γ -irradiados, presentan diferentes tiempos (6 y 9 horas, respectivamente) a los cuales responden con mayor intensidad a la estimulación por BA, pudiera sugerirse que se han alterado algunos mecanismos metabólicos en los ejes embrionarios irradiados y que por esto la estimulación de síntesis de DNA sea diferente con respecto a los ejes no-irradiados. Es importante señalar el hecho de que los ejes γ -irradiados no siguieron una conducta semejante a la de los no-irradiados después de las 12 horas de imbibición. Es evidente que el daño causado al DNA por la irradiación, aunque pudiera haber sido reparado, podría haber causado desfasamiento en la serie de eventos metabólicos comprendidos durante las primeras horas de la germinación. Es de notar que existe una notable recuperación de la viabilidad de los ejes γ -irradiados embebidos en presencia de BA (Zarain *et al.*, 1987).

Tabla III. Diferentes Respuestas Estimuladas por Citocininas.

Citocinina (Concentr.)	Efecto que provoca y tiempo en que este es máximo (despues del tratamiento con la citocinina)	Especie	Referencia
Cinetina (1 %)	Incremento en la cantidad de ARN (6 días)	Pinus ellioti	Varnel and Vasil, 1978
BA (0.01 mM)	Incremento en el porcentaje de núcleos marcados (1 día)	Melón	Galli, 1984
BA (30 microg/ml)	Incremento en la cantidad de DNA, RNA y proteínas. (24 h)	Phaseolus v.	Yokoyama et al., 1981

BA (30 microg/ml)	Incremento en el contenido de DNA, RNA, proteínas y clorofila. 8-14 días.	Phaseolus v.	Naito et al., 1978 Tsuji et al., 1979.
Cinetina (5 microM)	Incremento en el contenido de proteínas. (5 días).	Pisum sativum	Simpson and Torrey, 19
BA (0.1 mg/l)	Incremento en la act. espec. de la ARN pol. unida a cromátina. (9-12 días)	Centeno	Kulaeva, 1981.
Cinetina (0.5 mg/l)	Estimulación de la sínt. de ARN. (11 días).	Nicotiana T.	Matthysse and Abrams,
Cinetina (5 microM)	Incremento en el contenido de DNA. (66-68 h).	Pisum sativum	Simpson and Torrey, 19

Por otro lado, los resultados obtenidos al utilizar cicloheximida o α -amanitina (Fig. 3 y 5), muestran que la síntesis de DNA estimulada por BA es anulada, lo que sugiere que probablemente se está inhibiendo la síntesis de algunos factores que se requieren en este tiempo, que son necesarios para la síntesis de DNA y que probablemente alguno de éstos también se estimulen por el fitorregulador para que se incremente la síntesis de DNA. Matthysse y Abrams (1970) y Kulaeva (1981) sugieren que el nivel de acción de citocininas es en los sistemas de transcripción. Kulaeva (1981) postula que las citocininas se unen a receptores específicos que se localizan en el citoplasma, e inmediatamente se forma un complejo (citocinina + receptor) que entra al núcleo y afecta a la cromatina o la afinidad con la cual la ARN pol. se une a esta estructura; como consecuencia de lo anterior la síntesis de ARN y de proteínas se estimulan y, paralelo a este evento, se incrementan y/o aceleran los fenómenos biológicos.

Ahora, si el efecto de las citocininas se encuentra a nivel de la transcripción y este hecho provoca posiblemente que se estimule la síntesis de DNA (debido a que hay mayor cantidad de proteínas que participan en este evento), entonces, es de esperar que al tratar a los ejes embrionarios con CH + BA la estimulación en la síntesis de DNA que promueve el fitorregulador se vea eliminada, hecho que se corrobora tanto para ejes no-irradiados como para los γ -irradiados (Fig. 3). Kulaeva (1981) señala que la activación enzimática promovida por BA que obtiene está asociada con una síntesis de proteínas, ya que CH elimina este efecto; además observa que el estímulo en la síntesis de proteínas es uno de los primeros efectos que se logra observar cuando se agregan citocininas; dicho aspecto se puede deber a: i) una gran rapidez en la síntesis de ARNm; ii) una movilización de los moldes almacenados o iii) un incremento en la iniciación de la síntesis de proteínas, conllevando ésto a una utilización intensa de los moldes funcionales.

Las dos últimas posibilidades argumentan en favor de un efecto de las citocininas a nivel postranscripcional; en este sentido Tepfer y Fosket (1978) proponen que una parte del ARNm se encuentra en un

nivel bajo, el cual no puede ser traducido, pero cuando se encuentran citocininas en el medio éstas hacen que el ARNm pueda ser traducido.

Por otro lado, cuando se cuantifica la actividad específica de la DNA pol., que es una de las principales enzimas involucradas en la síntesis del DNA, se encuentra que dicha actividad se incrementa cuando se agrega BA, tanto para ejes no-irradiados como para los γ -irradiados (Fig. 6). Así la DNA pol. pareciera estar directamente involucrada en el incremento en la síntesis de DNA que se observa al añadir BA a los ejes embrionarios. No obstante, la actividad de esta enzima se mantiene alta, aún cuando provenga de ejes que fueron incubados en presencia de AA o CH (Tabla II), condición en la que decae la síntesis de DNA total (Fig. 3 y 5). Para explicar este comportamiento podrían darse varias opciones: a) que no sólo se estimula la DNA pol. sino que otras proteínas inherentes al metabolismo del DNA, o a su regulación, se ven estimuladas en su síntesis *de novo*; b) que la DNA pol. que se ha tomado como referencia no es la enzima, o la única enzima, que participa en la síntesis de DNA que es estimulada por BA; c) una combinación de las dos opciones anteriores. Un concepto que pareciera ser claro es que no existe síntesis *de novo* de la DNA pol. al menos durante las primeras 6 horas de la germinación. Por tanto, la estimulación de la actividad enzimática en presencia de BA pudiera deberse a estimulación de la enzima *per se*, directa o indirectamente, y no síntesis de nueva enzima. Pero también es probable que la BA estimule ciertos factores que se transcriben a las 6 horas y que son indispensables para la síntesis de DNA. Ya en la literatura se ha citado que BA estimula preferencialmente ciertas actividades. Por ejemplo, datos que señalan que BA afecta sólo a ciertos factores, en este caso a algunos RNAm, han sido proporcionados por Flores y Tobin (1986), quienes observan que durante la biogénesis del cloroplasto se incrementan los niveles de los RNAm que codifican tanto para la proteína que se une a la clorofila a/b como para la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-difosfato (RUBP) carboxilasa, cuando se agrega el fitorregulador; mientras que el mismo tratamiento no afecta al ARNm total. Estos investigadores sugieren que la citocinina

regula la expresión de estos dos mensajes a nivel post-transcripcional, lo cual probablemente sea afectando la estabilidad del ARNm.

Finalmente, podemos concluir diciendo que en la estimulación de la síntesis de DNA promovida por BA, es probable que no sólo se incremente la actividad específica de la DNA pol. sino que puede haber otras enzimas que participan en dicha síntesis, las cuales también ven favorecida su actividad en presencia del fitorregulador.

IX. CONCLUSIONES

I). Los ejes embrionarios no-irradiados (alta viabilidad) y los γ -irradiados (baja viabilidad) responden de manera similar en presencia de benzil-adenina (BA) en cuanto a la síntesis de DNA; no obstante, la cinética de dicha respuesta es diferente.

II). Existe un tiempo específico en que los ejes embrionarios son más sensibles a responder a la BA, aspecto que probablemente se deba al grado de desarrollo del organismo y a las condiciones fisiológicas en que éste se encuentre.

III). La inhibición de la transcripción o de la traducción durante la germinación de ejes embebidos en presencia de BA provoca la anulación del estímulo de la síntesis de DNA que el fitorregulador promueva. Esto sugiere que la estimulación de la síntesis de DNA por BA ocurre a nivel transcripcional/traduccional. No obstante no se puede descartar el efecto del fitorregulador sobre otros niveles de la expresión génica.

IV) En la estimulación de la síntesis de DNA por BA hay un incremento en la actividad específica de la DNA pol., pero aparentemente esta enzima no es la única responsable del incremento observado en la síntesis de DNA; es muy probable que también se afecten otras enzimas que participan en dicha síntesis.

X. REFERENCIAS

- Addicot, F. T. (1972). Biochemical aspects of the abscisic acid, in: D. J. Carr (ed), Plant growth substances. Springer Verlag pp. 272-80.
- Addicott, F.T. and Lyon. (1969). Physiology of ABA related substances. Ann. Rev. Plant Physiol. 20:139-64.
- Albanell, E., Plaixats, J. and Andrés, J. (1985). Interaction of ABA and 6-benzyl-amino purine on the metabolism of *Lemna minor*. Plant Cell Phys. 26:1557-64.
- Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith and Watson James D. (1983). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. pp. 435-55.
- Aposhian, H.V. and Kornberg, A. (1962). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 237:519-25.
- Barlow, P.W. and Pilet, P.E. (1984). The effect of abscisic acid on the cell growth, cell division and DNA synthesis in the maize root meristem. Physiol. Plant. 62:125-32.
- Bernal Lugo Irma. (1984). Acción de fitorreguladores en inducción de enzimas hidrolíticas en el endospermo y su control. En: Cuadernos de Posgrado 11. Bioquímica Vegetal. p. 87-102. Facultad de Química, UNAM.
- Berridge, M.V. and Ralph, R.H. (1969). Some effects of kinetin on floated Chinese cabbage leaf discs. Biochim. Biophys. Acta 182:266-69.
- Berridge, M.V., Ralph, R.H. and Letham, D.S. (1970). The binding of cytokinins to plant ribosomes. Biochim. J. 119:75-84.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1978). Physiology and biochemistry of seed in relation to germination. Vol. I. Development, germination and growth. Springer Verlag. pp. 132-71.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1986). Seed. Physiology of Development and Germination. Plenum Press. New York and London. pp. 135-172.
- Boop M. and Jacob, H. J. (1986). Cytokinin effect on branching and bud formation in *Funaria*. Planta 169:462-64.
- Castroviejo Michael, Thharand Daniéle, Mocqupt Bernard and Litvak Simon. (1979). Factor Affecting the onset of deoxyribonucleic acid synthesis during wheat embryo germination. Study of the changes in DNA polymerases A, B and C and the pool of DNA precursors. Biochem. J. 181:193-99.

Cué-Cánovas Agustín. (1976). Historia social y económica de México (1521-1854). Trillas. México. pp.40.

- Chen, D. Sarid, S. and Katchalski, E. (1968). Studien on the nature of messenger RNA in germination wheat embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60:902-9.

- Cheung, C.P., Wu, J. and Suhandolnik, A. (1979). Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during early hours of germination of wheat embryos. Nature 277:66-7.

- Ching, T. M. (1972). Metabolism of germinating seed, in: T. T. Kozlowski; (ed), Seed biology. V. I, Academic Press, New York, pp. 116-7.

- Dandoy Eric, Schyns Robert, Deltour Roger and Verly Walter G. (1987). Appearance and repair of apurinic'apyrimidic sites in DNA during early germination of *Zea mays*. Mut. Res. 181:57-60

- Das, N.K., Patau, K. and Skoog F. (1956). Physiol. Pl. 9:640-51. Citado por Zwar.

- Deltour Roger. (1985). Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. J. Cell Sci. 75:43-83.

- Deltour R., Gautier A. & Fakan J. (1979). Ultrastructural cytochemistry of the nucleus in *Zea mays* embryos during germination. J. Cell Sci. 40:43-62.

- Delseny M., Aspart L. & Guitton Y. (1977). Disappearance of stored polyadenylic acid and mRNA during early germination of radish (*Raphanus sativus* L.) embryo axes. Planta 135:125-8.

- Dommés, J. and Van de Walle, C. (1983). Newly synthesized mRNA is translated during the initial imbibition phase of germination maize embryo. Pl. Physiol. 73:484-7.

- Dure, L. III and Chlan, C.A. (1985) Cotton seed Storage proteins: products of three gene families. En: Molecular form and function of the plant genome. ed. by Lous van Vloten-Doting, Gert. S.P. Groot and Timothy C. Hall Plenum Press. New York and London. pp. 67-80.

- Dure, S. and Waters, L. (1965). Long-lived messenger RNA:evidence from cotton seed germination. Science 147:410-2.

- Fabisz-Kijowska, A., Dullin, P. and Walerych. (1975). Isolation and purification of RNA polymerases from rye embryos. Biochem. Biophys. Acta 390:105-16.

- Ferré Simpson Sandra and Torrey, John G. (1976). Hormonal control of deoxyribonucleic acid and protein symtheses in pea root cortical explants. Plant Physio. 59:4-9.

- Flores Susan and Tobin, Elaine M. (1986). BA modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast protein in *Lemma gibba*: apparent post-transcriptional regulation. Planta 168:340-9.

- Fox, J.E. and Erion J.L. (1975). A cytokinin binding protein from higher plant ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64:694-700.
- Galeano Eduardo. (1978). *Las venas Abiertas de América Latina*. Siglo XXI. México. pp. 17-88.
- Galli, M.G. (1984). Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and BA. *Planta* 160:193-99.
- Grierson D., Chambers S.E. and Penniket L.P. (1977). Nucleic acid and protein synthesis in discs cut from mature leaves of *Nicotiana t. L* and cultured on nutrient agar with and without kinetin. *Planta* 134:29-34.
- Gudkov, I.N. and Grozinsky, D.M. (1976). Induction by γ -radiation of DNA synthesis in Radicle cells of germinating seeds of *Pisum sativum* L. *Int. J. Radiat. Biol.* 29:455-62.
- Gutierrez Crisanto. (1987). Excision repair of uracil in higher plant cells: uracil-DNA glycosylase and sister-chromatid exchanges. *Mut. Res.* 181:111-26.
- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K. Ganesan, A.K. and Smith, C.A. (1979). DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48:783-836.
- Horgan H. (1984). Cytokinins. In: *Advanced plant physiology*. ed. by Wilkins Malcom B. The Pitman Press, Bath. Great Britain. pp. 53-75.
- Jendrisak J. (1980). The use of α -amanitin to inhibit *in vivo* RNA synthesis and germination in wheat embryos. *J. Biol. Chem.* 255:8529-33.
- Keim P., Erion J. and Fox J.E. (1981). Cytokinin: the current status of cytokinin binding moieties. In: *Metabolism and molecular activities of cytokinins*, eds J. Guern and C. Péaud-Lenoel. Springer, Berlin, pp. 179-90. Citado por Horgan.
- Khan, A.A. (1967). Antagonism between cytokinins and germination inhibitors. *Nature.* 216:166-7.
- Khan, A.A. (1971). Cytokinins: permissive role in seed germination. *Science* 171:853-9.
- Khan, A.A. and Heit, C.E. (1969). Selective effect of hormones on nucleic acid metabolism during germination of pear embryos. *Biochem. J.* 113:707-12.
- Koestler Arturo. (1981). *Los sonámbulos*. CONACYT. México. pp. 115.
- Kohler K.-H. and Conrad K. (1966). Ein quantitativer phytokinin-test. *Biol. Rdsch.* 4:36-7. Citado por Horgan.
- Korch K. (1975). *Karl Marx*. Ariel. Barcelona. pp. 166-7.

- Kulaeva, O.N. (1981). Cytokinin action on transcription and translation. In: Metabolism and molecular action of cytokinins. ed. by J. Guern and C. Péaud-Lenoël. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 219-27.
- Lerbs Silva, Lerbs W., Wollgiehn R. and Partnier B. (1985). Hormone (cytokinin) and light effects in rubisco gene expression. In: Molecular form and function of the plant genome. ed. by Lous van Vloten-Doting, Gert. S.P. Groot and Timothy C. Hall Plenum Press. New York and London. pp.267-75.
- Litvak Simon and Castroviejo Michael. (1987). DNA polymerases from plant cells. Mut. Res. 181:81-91.
- Longo, G. P., Pedrett, M., Rossi, G. and Longo, C. P. (1979). Effect of BA on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. Planta 145:209-17.
- Marcus, A. and Feeley, J. (1964). Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51:1075-9.
- Matthysee, A.G. and Abrams, M. (1970). A factor mediating interaction of kinins with the genetic material. Biochim. Biophys. Acta. 199:511-8.
- Mikulovitch, T.P. and Kulaeva O.N. (1977). Synthesis of DNA in isolated pumpkin cotyledons. Soviet Plant Physiol. 24:251-7. Citado por Galli.
- Miller, C.O. (1958). The relationship of the kinetin and right light promotion of lettuce germination. Plant Physiol. 33:115-7.
- Miller, C.O., Skoog., Okomura, F.S., Saltza, M.H. von and Strong, F.M. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc. 78:1345-50.
- Misra Santosh, Kermodé Allison and Bewley, J. Dereck. (1985). Maturation drying as the "switch" that terminates seed development and promotes germination. In: Molecular form and function of the plant genome. ed. by Lous van Vloten-Doting, Gert. S.P. Groot and Timothy C. Hall Plenum Press. New York and London. pp.267-75.
- Mocquot, B., Prat, Ch., Mouches, C. and Pradet, A. (1981). effect of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryos. Plant Physiol. 68:636-40.
- Mory, T., Wakabayashi, Y. and Tagaki S. (1978). Occurrence of mRNA for storage protein in dry soybean seeds. J. Biochem. 84:1103-11.
- Mothes, K. (1960). Über das Altern Blatter und die Moglichkert ihrer Wiederverjüngung. Naturwissenschaften 47:337-51. Citado en Horgan.

- Naito Kunihiko, Tsuji Hideo and Hatekeyama Isao. (1978). Effect of BA on DNA, RNA, protein and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to BA according to leaf age. *Phy. Plant.* 43:367-71.
- Naito K., H. Tsuji, I. Hatakeyama and K. Ueda. (1979). BA-induced increase in DNA content per cell, chloroplast size, and chloroplast number per cell in intact bean leaves. *J. Exp. Bot.* 30:1145-51.
- Nishinari, N. and Syono, K. (1986). Induction of cell division synchrony and variation of cytokinin contents through the cell cycle in tobacco cultured cell. *Plant Cell Physiol.* 27:147-53.
- Osborne, D.J., Dell'Aquila, A. and Elder, R.H. (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. *Folia Biologica, Proc. FEBS Symposium on DNA, Spec. Publ.*, pp. 155-64.
- Parker C.W., Lethman D.S., Gollnow B.I., Summons R.E., Duke C.C., and Macleod J.K. (1978). Regulators of cell division in plant tissues. *Planta* 142:239-51.
- Parthier, B. (1979). Phytohormones and chloroplast development. *Bioch. Physiol. Pflanzen* 174:174-214
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-56.
- Phillips R. and J.G. Torrey. (1973). DNA synthesis, cell division, and specific cytodifferentiation in cultured pea root cortical explants. *Dev. Biol.* 31:3336-47.
- Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N. and Mc Fadden, J.J. (1987). Calcium messenger system. Role of protein phosphorylation and inositol bisphospholipids. What's new in plant physiology. *Physiol. Plantarum* 69:569-73.
- Risueño, M.C. and Moreno Diaz de la Espina S. (1979). Ultrastructural and cytochemical study of the quiescent root meristematic cell nucleus. *J. Submicrosc. Cytol.* 11:85-98.
- Sánchez-Martínez Demetrio, Puigdomènech and Pagès Montserrat. (1986). Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination of maize. *Plant Physiol.* 82:543-9.
- Sargent, J.A. and Osborne, D.J. (1980). A comparative study of the fine structure of coleorhiza and root cells during the early hours of germination of rye embryos. *Protoplasma* 104:91-103.
- Schmidt A. (1976). El concepto de la naturaleza en Marx. Siglo XXI. Buenos Aires. pp.21.
- Scriverastana, B.I.S. (1968). Increase in chromatin associated nuclease activity of excised barley leaves during senescence and

Its suppression by kinetin. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 32:533-8.

- Seal, S.N., Bewley, J.D. and Marcus, A. (1972). Protein chain initiation in wheat embryos. *J. Biol. Chem.* 247:2592-7.
- Simpson, Sandra Ferré and Torrey, John G. (1977). Hormonal control of DNA and protein synthesis in pea root cortical explants. *Plant Physiol.* 54:4-9.
- Simon, E.W. (1984). Early events in germination. In: *Seed physiology. V. II. Germination and reserve mobilization.* ed. by David R. Murray. Academic Press. Australia. pp. 77-115.
- Skoog, F. and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Bio. Med.* 11:188-31. Citado en Wilkins, 1984.
- Slater, Robert J., Venis, Michel A. and Grierson Donald. (1978). Characterization of ribonucleic acid synthesis by nuclei isolated from *Zea mays*. *Planta* 144:89-93.
- Smith, C.A.D. and Bray, C.M. (1982). Intracellular levels of polyadenylated RNA and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Planta* 156:413-20.
- Steward, G.R. and Smith, H. (1972). Effect of ABA on nucleic acid synthesis and the induction of nitrate reductase in *Lemna polyrrhiza*. *J. Exp. Bot.* 23:875-85.
- Sussex Ian, Clutter Mary, and Walbot Virginia. (1975). BA reversal of abscisic inhibition of growth and RNA synthesis in germinating bean axes. *Plant Phys.* 56:575-8.
- Tepfer, D.A. and Fosket, D.E. (1978). Hormone mediated translational control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max*. *Devel. Biol.* 62:486-97.
- Theologis A. (1986). Rapid gene regulation by auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:407-38.
- Toledo Victor Manuel, Carabias Julia, Mapes Cristina y Toledo Carlos. (1985). *Ecología y autosuficiencia alimentaria. Siglo XXI. México.* pp. 11-56.
- Trewavas, A.J. (1982). Growth substance sensitivity: the limitin factor in plant development. *Physiol. Plant.* 55:60-72.
- Tsuji H., Naito K., Hatekeyama I. and Ueda K. (1979). BA-induced increase in DNA content per cell, chloroplast size, and chloroplast number per cell in intact bean leaves. *J. Exp. Bot.* 30:1145-51.
- Twardouski, T. and Legocki, A.B. (1973). Purification and some properties of elongation factor 2 from wheat germ. *Biochem. Biophys. Acta* 324:171-83.
- Van de Walle, C. Bernier, Deltour R. & Bronchart R. (1976). Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. *Plant Physiol.* 157:632-9.

- Van Overbeeck, J., Loeffler, J.E. and Mason, M.I.R. (1967). Dormin (Abscisin II), inhibitor of plant DNA synthesis. *Science* 156:1497-9.
- Varnell, R.J. and Vasil, I.K. (1978). Experimental studies of the shoot apical meristem of seed plants. II. Morphological and cytochemical effects of kinetin applied to the exposed meristem of *Pinus elliotti*. *Amer. J. Bot.* 65(1):47-9.
- Vazquez-Nin and W. Bernhard. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin- and balbiani ring granules. *J. Ultrastuct. Res.* 36:842-60.
- Vázquez Ramos, J.M. y López S. (1986). Inhibición *in vitro* de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y ara-ctp. *Rev. de la Soc. Química de México* 30(3):119-23.
- Vazquez-Ramos, J. and Osborne, D.J. (1986). Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye chromatography. *Mut. Res.* 166:39-47.
- Vělemínský, J. and Gichner, T. (1978). DNA repair in mutagen higher plants. *Mut. Res.* 55:71-84.
- Villers, T.A. (1968). An autoradiographic study of the effect of the plant hormone ABA on nucleic acid and protein metabolism. *Planta* 82:342-54.
- Walton, D.C. Soofi, G.S. and Sondheimer, E. (1970). The effect of abscisic acid on growth and nucleic acid synthesis in excised embryonic bean axes. *Plant Phys.* 45:37-40.
- Weeks, D. and Marcus, A. (1971). Preformed messenger of quiescent wheat embryos. *Biochem. Biophys. Acta* 232:671-84.
- Wilkes, H. Garrison and Wilkes Susan. (1972). The green Revolution. *Environment* 14(8):32-9.
- Yadav, S.P. (1976). Rhythmic increase in DNA content and incorporation of ³[H] thymidine in the developing wheat embryo during seed germination. *Planta* 129:87-89.
- Yokoyama Mineyuki, Naito Kunihiro and Suzuki Hiroshi. (1980). Effects of BA on chlorophyll, DNA, RNA, and protein content on attached young bean (*Phaseolus v. L.*) leaves. *Ann. Bot.* 45:649-53.
- Yokoyama Mineyuki, Naito Kunihiro and Suzuki Hiroshi. (1981). Benzyladenine-enhanced cell proliferation and -suppressed greening in attached young bean leaves. *Plant Cell Physiol.* 22:623-7.
- Zarain Herzber Martha, Bernal-Lugo Irma and Vázquez-Ramos Jorge M. (1987). Effect of BA on the DNA synthesis during early germination of Maize embryo axes. *Mut. Res.* 181:103-10.
- Zwar, J.A. (1973). Effects of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith. *J. Exp. Bot.* 24:701-10.