UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Modificaciones al Método de Marmur para la Extracción de ADN en Algunas Plantas Superiores

ESTE LIBRO NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MA. EUGENIA HERES PULIDO

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la 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 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.

A mis padres y hermanas

A mis amistades

Manifiesto mi sincero agradecimiento, por la valiosa dirección y desinteresada colaboración que me brindaron las Bióls. Matilde Breña - Valle, Aurora Chimal H. y Ma. Teresa Cruz de Palacios.

Agradezco al Dr. A. L. de Garay, Director del Programa de Genética y Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Nuclear, -- así como al personal del mismo, por las facilidades y atenciones que me otorgaron para el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco al personal del Laboratorio de Bioquímica de la División del Doctorado de la Facultad de Química, el habernos - facilitado el equipo y la dirección técnica indispensable para las pruebas de desnaturalización.

La presente tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genética Vegetal del Programa de Genética y Radiobiología de la C.N.E.N. gracias a una beca otorgada por las Autoridades de dicha Institución.

INTRODUCCION

Los ácidos nucleicos son compuestos orgánicos que se localizan en todos los seres vivos. Están formados por azúcar, bases nitrogenadas y radicales fosfóricos que al integrarse constituyen unidades monoméricas de ribonucleósidos para el ácido ribonucleico o unidades de desoxirribonucleósidos para el ácido desoxirribonucleico, siempre unidas por enlaces fosfodiéster. Estas unidades se arreglan en cadenas helicoidales sencillas en el ácido ribonucleico (ARN) o en cadenas dobles como el ácido desoxirribonucleico (ADN), alrededor de un mismo eje, con las bases nitrogenadas orientadas hacia el interior unidas por puentes de hidrógeno y con los fosfatos al exterior (Fig. 1).

El progreso en las técnicas citológicas y genéticas, ha demostrado que en el núcleo de la célula, los cromosomas están constituídos por ADN y proteínas estructurales. En investigaciones posteriores, se ha comprobado la presencia de éste, en organoides citoplasmáticos como en los cloroplastos (4, 32, 66) y en las mitocondrias (63). En cualquier organismo la cantidad y composición de ADN es constante, un ejemplo de ello es lo que se ha observado en variedades e híbridos de trigo donde existe una definida relación entre el-

d Desoxirribosa

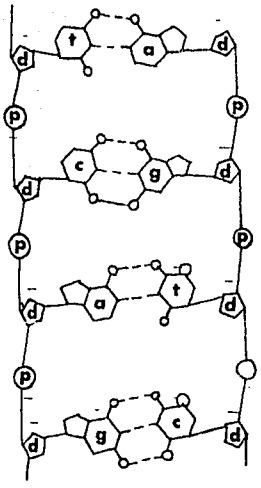
p Fósforo

t Timina

a Adenina

c Citosina

g Guanina



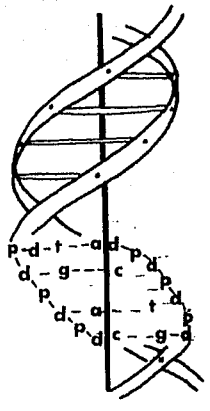


Fig. 1.- Modelo de la estructura del ADN (Watson y Crick, 1957), (48,65).

contenido de ADN de las plántulas y la cantidad de cromosomas, ya que a mayor contenido cromosómico se observa mayor cantidad de ADN (1).

Las células germinales contienen ADN de idéntica composición a la de las células somáticas pero exactamente la mitad del total. Se ha demostrado que el ADN constituye las unidades hereditarias o genes, los cuales están determinados por la ordenación de los desoxirribonucleótidos en la molécula (13). Para explicar como reside el mensaje genético en el ADN, Gamow sugirió que la presencia de cuatro bases, dos púricas: adenina y timina, y dos pirimídicas: guanina y citosina, cifraba veinte aminoácidos, lo cual implicaba una combinación de tres bases, llamada tríada o triplete, para cada aminoácido.

Las posibles combinaciones serían del orden de 4^3, donde las variaciones serían 4^n, siendo "n" el número de nucleótidos en cada triplete y 4 las diferentes bases (48). Nirenberg, Ochoa y Crick demostraron, a partir de 1961, el mecanismo de los tripletes utilizando diferentes ARN mensajeros sintéticos.

El gene se ha definido (65) como una pequeña región cromosómica que lleva la información para la síntesis de un producto y consiste en unidades potencialmente mutables, que pueden variar y en-

trecruzarse entre sí. Tales unidades se transfieren a los descendientes y se conservan en las células somáticas del organismo mediante un proceso en el cual el ADN sirve de molde, para formar nuevas bandas complementarias, en lo que se conoce como "mecanismo semiconservador" (41).

El ADN induce en la célula la síntesis de las proteínas, que constituyen el material estructural y enzimático de los organismos. Este proceso ha sido descrito por Jacob y Monod en 1961 e incluye dos fases: transcripción y traducción. El ARN mensajero (ARNm) lleva el mensaje del ADN a los ribosomas, donde se realiza la síntesis proteica. Ahí se efectúa la traducción por medio de diferentes ácidos ribonucleicos de transferencia que llevan un aminoácido, específico para cada uno de ellos, el cual se une a la cadena polipeptídica en crecimiento.

Se debe señalar que en la célula, los diferentes ARN mencionados, se sintetizan al efectuarse el ordenamiento de los ribonucleótidos, según un molde dado por cierta zona de la molécula de ADN (9 , 70).

Los cambios fisiológicos de los tejidos en crecimiento, el efecto del medio ambiente sobre el metabolismo, el mejoramiento de las variedades, los efectos de las radiaciones ionizantes y de los com--

puestos químicos sobre los vegetales superiores de importancia económica o alimenticia, ha determinado el incremento en los estudios sobre el metabolismo y caracterización de los ácidos nucleicos que contienen.

En las plantas el crecimiento consiste en un aumento irreversible de tamaño, que se debe a la formación de nuevas células y al -- alargamiento de las mismas. Las diferencias que presentan en todas las etapas de su desarrollo se han observado claramente en las células de la punta de la raíz.

La raíz es un órgano que se desarrolla fácilmente, está constituído por una cofia que va desde la punta y que se extiende ligeramente hacia atrás, rodeando a las células iniciales del meristemo apical e inmediatas a esta zona se localizan tres regiones, que de afuera - hacia adentro son: la epidermis, la corteza y el cilindro vascular dividido en xilema y floema.

Las células del meristemo apical son pequeñas, cúbicas o isodiamétricas, contienen mucho protoplasma y se dividen rápidamente. Conforme se alejan de la punta las divisiones son menos frecuentes y su longitud aumenta hasta que cesa el alargamiento celular, lo --- cual no implica el término del desarrollo y de su diferenciación. -- En este proceso la composición de la pared cambia ya que las célu-

las jóvenes presentan mayor contenido de sustancias pécticas y hemicelulosa, mientras que las menos jóvenes tienen cantidades relativamente grandes de polisacáridos no celulósicos y celulosa. De tal manera que el aumento celular se produce por absorción de agua que distiende una cápsula celular plástica, cuyo espesor se equilibra con nuevos depósitos de materiales en la misma.

Por lo general, en los primeros dos milímetros de la raíz, se ha observado una correlación entre la síntesis del ADN y la mitosis, pero cuando ésta cesa, la síntesis del ADN continúa y la cantidad de éste, aumenta por núcleo hasta 8 veces el valor haploide (68). Sin embargo, existen variaciones, ya que en los tejidos epidérmicos la síntesis de ADN se interrumpe con la mitosis, mientras que en las células vasculares la cantidad de ADN aumenta aún cuando ya se ha terminado la mitosis, en una etapa muy temprana del desarrollo.

Se ha comprobado que en los períodos de crecimiento y diferenciación existe un incremento significativo de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, en el maíz la máxima cantidad de ADN y ARN, se localiza en la zona de elongación del meristemo, zona que presenta dos fases: una inicial de síntesis de ADN y constituyentes citoplasmáticos y otra de extensa vacuolación y acumulación de agua, señalándose que los niveles de ácidos nucleicos caen con el crecimiento celular (14,

64). Por otro lado, en la semilla de trigo, se ha visto que las células meristemáticas, además de presentar un incremento en los ácidos nucleicos durante la germinación, tienen actividad enzimática escasa y bajo contenido total de ribonucleasas, en relación con las células más maduras (27). Y en las células de las hojas de algodón, se ha determinado una relación inversa entre el contenido de ácidos nucleicos y su edad puesto que las jóvenes tienen la mayor cantidad mientras que las células más viejas y las de las hojas que han caído, contienen un mínimo de ácidos nucleicos (25).

Existen y se han observado variaciones en el contenido de ácidos nucleicos en plantas, relacionados con el medio ambiente(36) y su influencia sobre el crecimiento y desarrollo de las mismas.(57). Por ejemplo, Sergieva (55) en 1968 realizó estudios histoquímicos que muestran que el contenido de ácidos nucleicos se relaciona con el período anual de las plantas; en el letargo invernal el ARN aumenta intensivamente hasta un máximo y durante el período vegetativo decae, lo cual se explica por la cantidad de ARN, proteínas e inhibidores del crecimiento que se acumulan y proporcionan el material necesario para provocar el inicio del período vegetativo (68).

Al iniciarse la floración, la planta ha alcanzado cierto grado de crecimiento vegetativo que puede estar condicionado a factores

que la ocasionen. Los factores externos que más influyen en la regulación de la reproducción son la duración del día y la temperatura -- además de ciertas hormonas vegetales cuya presencia puede acelerar o inhibir el desarrollo. (3)

En plantas que florecen siete días después de un día corto se - ha comprobado el incremento del porcentaje de ADN hasta que las yemas aparecen y una disminución en el contenido, cuando la planta se coloca en condiciones de luz constante. Es así que se ha relacionado la longitud del fotoperíodo con la dinámica de acumulación del -- ADN(56), puesto que la estimulación por parte de la luz para la inducción de la floración, provoca la formación del estímulo floral que se desplaza de las hojas hasta las yemas cuyo meristemo apical se - ensancha y produce los esbozos foliares (3, 56)

Otros estudios se refieren específicamente al efecto de hormonas modificadoras y estimulantes del crecimiento en las plantas. -- El crecimiento implica incremento de volumen y no necesariamente - una división celular. La auxina es una hormona vegetal cuyo principio activo es el ácido indolacético que causa división celular en al-- gunos tejidos y provoca el alargamiento celular por activación del -- ARNm, el cual induce la síntesis de enzimas específicas que actúan sobre la pared celular, además incrementa el contenido de asparagi

na y proteínas y disminuye el contenido de aminoácidos libres. Este sistema se puede resumir en el siguiente diagrama:

AUXINAS

ADN → ARNm → ARNt → síntesis de enzimas que actúan sobre la pared celular

↓ presión osmótica

alargamiento celular

La inhibición de este sistema por medio de inhibidores específicos o por la ausencia de esta hormona, ocasiona una disminución de los ácidos nucleicos que intervienen en el proceso de alargamiento -- descrito o en la división celular (68), lo cual se ha observado por -- ejemplo en la vaina del frijol (16)

La producción de complejos químicos que se utilizan para inducir alteraciones en el metabolismo de las plantas, ha despertado interés en cuanto a su efecto sobre los ácidos nucleicos de las mismas. Immoliev (25) observó que los defoliantes como el ácido 2-4-diclorofenoxiacético inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y sugiere que éstos representan un papel muy importante en el control natural y artificial de la caída de las hojas(47)La caída de las hojas y de los fru-

tos está determinada por la presencia de una capa de abcisión en la base del pecíolo o del pedúnculo del fruto, cuyas células presentan las cápsulas muy débiles. Se ha demostrado que la adición de auxina evita o retarda la formación de esta capa de abcisión al conferirle a la cápsula celular, más plasticidad e incrementar la formación de proteínas. Por el lado contrario, la auxina en concentraciones elevadas es tóxica para algunos vegetales de hojas anchas, que la absorben rápidamente afectando las zonas de crecimiento y determinando que actualmente se utilice como herbicida (3). De esta manera, la presencia de auxina aumenta o mantiene constante la síntesis de los ácidos nucleicos, mientras que las concentraciones elevadas inhiben notablemente el crecimiento y desarrollo de la planta y por lo tanto, la síntesis de ácidos nucleicos.

En forma diferente, la adición de ácidos giberélicos produce un aumento en el contenido de ácidos nucleicos, como se ha demostrado en las hojas del tabaco (16) y que se debe a un incremento de la división celular por inhibición, de los efectos inhibidores de la luz sobre los procesos de elongación y germinación. Su acción se atribuye a una activación de ciertos genes que producen los cambios morfológicos descritos (69) y es independiente de la de las auxinas.

Se pueden mencionar, los estudios de Drury (15), que en 1969

obtiene la inhibición del crecimiento de plántulas de calabaza y cebolla, por adición de sulfato de estreptomicina que induce errores en la traducción y síntesis de proteínas al dañar el ARN y que además causa defectos en la formación de la membrana celular (19, 20).

Por último, existen en los vegetales problemas filogenéticos difíciles de dilucidar por medio de una clasificación que tome en cuenta únicamente caracteres morfológicos ya que estos son muy variables debido a la influencia del medio ambiente(21)Hasta 1967 se reportaban pocos estudios en plantas superiores de diferentes grupos, en los que se caracterizen física y químicamente los ácidos nucleicos respectivos (9). Este tipo de investigaciones contribuyen a determinar en este nivel, las pequeñas o grandes diferencias si es que existen, para sumarlas al conjunto de características morfológicas, fisiológicas, físicas, etc., que se reunen en los diversos grupos taxonómicos. Uno de los trabajos realizados es el de Cherry (9) quien en 1967, localiza en las plántulas de maíz una cantidad considerablemente superior en el porcentaje total de ARN, de un tipo de ácido ribonucleico de vida larga y casi ausente en las dicotiledóneas. El autor asume que pueden existir dos tipos de ARNm, uno de vida corta para la síntesis de proteínas "clave", otro de vida larga para la síntesis de proteínas esenciales y presente en un alto porcentaje en el

grupo de las monocotiledóneas, especialmente en la familia Graminae. Señala además que todos los tipos de ácidos nucleicos encontrados en bacterias y microrganismos en general, se localizan también en las plantas superiores, siendo la principal diferencia el grado de síntesis de los mismos y su longevidad relativa en la célula.

Por otro lado, Sueoka (62) en 1961 realiza un estudio extensivo, para determinar la variación en el porcentaje de G+C (guanina + citosina) en el ADN de organismos superiores e inferiores de la escala animal y vegetal reportando porcentajes de 40% y 42% para dos especies de un mismo género, respectivamente el género Salix caprea y Salix acubifolia (sauce), 44% para Crylus avelana, 48% para Alnus barbata (aile) y Triticum vulgare (trigo), 36% para Allium cepa (cebolla), y 40% para Papaver somniferum (amapola), Cucurbita pepo (calabaza), Phaseolus vulgaris (frijol), Arachis hypogaea (cacahuate) y Pinus sibirica (pino) en plantas superiores.

La fluctuación del contenido de G+C en el ADN de organismos superiores resultó ser inferior a la que presenta el ADN de las bacterias, cuyos valores van del 25 al 75%. Esto sugirió la posibilidad de una reclasificación taxonómica de ellas, de acuerdo con el contenido de G+C, que probablemente sea una característica evolutivamente estable no plenamente demostrada ya que los valores obtenidos en in

vertebrados, vertebrados y plantas superiores tienen escasa variación entre sí.

El estudio de la heterogeneidad en la distribución de bases dentro de un organismo ha mostrado que en las bacterias ésta es muy limitada y que generalmente todos los organismos tienen una sola distribución de G+C en los gradientes de CsCl, indicando que la distribución intramolecular de los pares G-C y A-T es uniforme, aunque algunas ocaciones ciertas pequeñas fracciones se distribuyen diferente y no por azar, lo cual da cierta variación dentro de las moléculas(62)

Lo anterior se corrobora con los estudios hechos con diferentes muestras de ADN de diversos orígenes, que una vez fraccionadas, con la técnica de ADN-agar muestran una reasociación que se ha relacionado con las secuencias de nucleótidos dentro de la molécula. El grado de reasociación se mide por espectrofotometría y da un valor "Cot" (mol. x seg/litro) en el cual una fracción con cierto grado de repetición puede obtener la mitad de su reasociación, interviniendo en el cálculo la talla del genoma y la cantidad de la fracción rápidamente repetitiva.

Las condiciones de reasociación dan un "Cot" entre 1-100 donde se reasocian apreciablemente los organismos superiores e incluyen estudios en invertebrados, vertebrados y las siguientes plantas superio

res: arroz, tabaco, frijol, haba, cebada, chícharo, trigo y cebolla.

Los resultados obtenidos muestran que virtualmente el ADN repetitivo se localiza en organismos superiores, organizado por familias de secuencias de nucleótidos cuya semejanza o diferencia podría ser una medida de la relación filogenética en las especies superiores (4, 40).

Al desnaturalizar la molécula de ADN, por calor o algún otro medio físico o químico, se rompen los puentes de hidrógeno que unen las bandas que la integran. Esto provoca un incremento en la absorbancia máxima de luz ultravioleta que se presenta a 260 mμ y el fenómeno puede ser reversible o no, de acuerdo con el agente desnaturalizante y las condiciones de renaturalización. Por ejemplo, se ha observado que la desnaturalización térmica es reversible cuando la muestra de ADN se enfría lenta o rápidamente después del proceso, obteniéndose una mejor renaturalización en el primer caso. Las moléculas desnaturalizadas pierden la estructura secundaria y terciaria al romperse los puentes de hidrógeno, de Van der Waals, fuerzas de London, etc., pero pueden establecer nuevos puentes de H entre sus bases (30, 35). Esta reversibilidad permite utilizar las moléculas desnaturalizadas de ADN de diversos orígenes y aún varios tipos de ARN, para que en condiciones favorables se hibridi-

zen, relacionándose este mecanismo con la complementaridad de las bandas.

De esta manera se asume que la variación en el contenido de G+C en las muestras de ADN de diversas especies o grupos; la heterogeneidad en la distribución de ciertas fracciones del ADN en un gradiente de CsC1; los patrones de reasociación entre muestras de ADN desnaturalizadas o entre éstas y varios tipos de ARN, caracterizan de una manera u otra a los ácidos nucleicos de las especies estudiadas. (37, 59, 67, 4).

Todas las investigaciones anteriores se han llevado al cabo mediante el uso de técnicas físicas o químicas como la cromatografía, la espectrofotometría, la centrifugación diferencial y la electroforesis. Además se han empleado otras técnicas que han permitido: la observación de la ultraestructura mediante el microscopio electrónico, la obtención de subcomponentes celulares por centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, la utilización de radioisótopos en los precursores químicos para la localización de compuestos y para el establecimiento de las funciones e interrelaciones celulares (48).

Como paso previo, en numerosas investigaciones se requieren muestras de ácidos nucleicos de alto peso molecular, con la mayor actividad biológica posible (38); unidades monoméricas resultados de

la hidrólisis de los polímeros (26, 34); cadenas de polinucleótidos sintéticos, etc.

Los ácidos nucleicos son macromoléculas fuertemente ácidas y con carga negativa muy fuerte a pH fisiológico, que en las células se unen a proteínas básicas o a cationes alcalinos.

Existen tres tipos de proteínas asociadas con el ADN de los cromosomas: las protaminas que son moléculas pequeñas ricas en arginina, localizadas selectivamente; las histonas que son moléculas mayores con una gran variedad de aminoácidos y están presentes en todos los tejidos; por último las proteínas residuales o acídicas que debido a su insolubilidad se separan usualmente, como un complejo con el ADN (30).

Los puentes de unión del ADN con las proteínas varían según el tejido y para romperlos se utilizan concentraciones salinas adecuadas, inhibidores de nucleasas que no depolimericen, ni ocasionen agregación de las cadenas de polinucleótidos, bajas temperaturas y como complemento se añaden detergentes que remueven las proteínas.

Las histonas se pueden aislar como un complejo estable de fibras amarillas, unidas al ADN por medio de uniones electrostáticas que probablemente son puentes salinos. Estas proteínas pueden removerse con ácidos o con altas concentraciones salinas.

Las proteínas acídicas en unión con el ADN, pueden ser separadas después de la extracción de las histonas con ácido diluído o directamente por extracción con fenol y ciertas sales. Se pueden obtener mejores resultados con un anión que combine propiedades quelantes y lipofílicas, como el 4-aminosalicilato, el naftaleno-2-sulfonato, el tetracetato de etilendiamina (EDTA) o utilizando combinaciones de sales. Este último compuesto, alcanza su mayor efectividad cuando se añade sodio-dodecil-sulfato (SDS) a la mezcla salina extrayéndose las proteínas con una mezcla de fenol más cresol u 8-hidroxiquinolina (30).

Se han desarrollado diversas técnicas para la desproteinización de los ácidos nucleicos, de las cuales se mencionarán las más comunes:

1.- Método de cloroformo: octanol (58). Para obtener una desproteinización completa, después del uso del detergente aniónico, se utiliza un volumen igual de mezcla de Sevag (cloroformo:octanol) o de cloroformo:alcohol isoamílico (38), se agita vigorosamente y se centrifuga para separar las fases. Una alternativa es disociar el complejo en NaCl 1 M o en $NaClO_4$ 1 M (34), precipitando los ácidos nucleicos fraccionadamente con la adición de etanol a la fase acuosa. Las proteínas se extraen alternativamente por -

precipitación con la solución de Sevag.

2.- Método de sodio-dodecil-sulfato (SDS), sodio-lauril-sulfato o "dupanol" (8, 29, 38). Este reactivo es un detergente aniónico, que lisa a las células, disocia las nucleoproteínas, inhibe las nucleasas y desnaturaliza proteínas en concentraciones del 0.3 al 2.05% (61) y 4% (8, 24). Se usa en presencia de fenol o utilizando la desproteinización térmica (38).

3.- Método de la solución acuosa de fenol (29). Este método incluye el tratamiento de homogenados en un volumen de SDS, igual al de una solución acuosa de fenol, seguido por centrifugación para separar el sistema bifásico. La distribución inicial de las proteínas y lípidos en la fase fenólica y los ácidos nucleicos en la fase acuosa, es muy precisa debido al coeficiente de partición que es altamente favorable. Las nucleoproteínas no separadas se encuentran en un nivel intermedio, entre las dos fases del sistema. (12)

En ningún método en general, se obtienen desde el principio el ARN y el ADN por separado, puesto que ambos son mezclados y extraídos simultáneamente. Al elegir el tipo de ácido nucleico que se desea extraer, en general se escoge uno u otro, y la facilidad de su separación depende de la cantidad de ácidos nucleicos y del método utilizado (29)(60)

Por otra parte, en las extracciones de ácidos nucleicos, casi siempre hay contaminación con polisacáridos, lo cual puede evitarse separando previamente los núcleos (10, 61), utilizando métodos enzimáticos o iones de amonio alifáticos que precipitan el ADN selectivamente en los últimos pasos de la purificación (38, 61).

Existen numerosos trabajos sobre métodos de extracción de ácidos nucleicos en plantas, los cuales se resumen en la Tabla 1. Algunos autores utilizan los métodos de: Schmidt y Thanhauser (53), el de Ogur y Rosen (46) o el de Schneider (54) basados en la extracción con álcalis o ácidos diluídos. Otros autores mencionan el método de Marmur (10, 24, 63, 71) con ciertas modificaciones, para el tejido o especie que se utiliza.

Basándose en el método de Marmur (38) y en los trabajos de Yolles (71), Cherry (8), Kirby (29), Sato (52) y Steele (61) se ensayaron técnicas para simplificar la extracción del ADN en algunas especies vegetales del grupo de las Angiospermae, de importancia económica o alimenticia.

Autor	Año	Investigación	Material	Método	Modificaciones	Resultados
Kulaeva.O. (31)	1965	Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos.	Cebada y tabaco.	Compara tres métodos.	Purificaciones adicionales.	Schmidt & Thanhauser buena separación de ADN-ARN pero valores bajos. Ogur & Rosen tardado, mala separación ADN-ARN.
Li.P. (34)	1967	"	Especie leñosa *Cornus* sp.	Digestión alcalina del ARN y caliente ácida para el ADN.	Sin puficaciones adicionales.	Solvento salino buena extracción cuantitativa.
Millikan.D. (42)	1963	Relación entre exposición alcalina y obtención de ARN.	Manzano	Hidrólisis con sosa.	Cambios en el tiempo de exposición al álcali.	Menos de 7 hs. no hidrolizan al ARN completamente.
Millikan.D. (43)	1965	Extracción y propiedades de ácidos nucleicos.	Frijol de soya.	"	Acidificación y precipitación con etanol para remover el ADN.	ARN hidrolizado. 60-70% del ADN hidrolizado y eluído con el ARN.
Ingle.J. (26)	1963	"	Variedad de plantas.	Etanol acuoso y ácido perclórico diluído.	Purificaciones con sales, solventes e intercambio iónico.	No establece método general. Obtiene el 20-30% de los nucleótidos.
Fialova.S. (17)	1968	"	Trigo.	Hidrólisis en ácido perclórico.	Varía la temperatura y concentraciones del ácido perclórico.	Método de Kern: 75% del total con 90% de ARN. Ogur & R. Spirin y Heitefuss no dan separación ADN-ARN. Interfieren compuestos.
Cherry.J. (7)	1962	"	Cacahuate, olivo y maíz.	Métodos de Smillie y de Krothov.	Extrae y homogeniza en metanol.	Los tejidos requieren técnicas especializadas.
Chun.E.H. (11)	1963	ADN en cloroplastos.	Espinaca y betabel.	Homogenados en gradiente de densidad.		La fracción nuclear con el mayor componente y la cloroplástica con dos componentes menores.
Hotta Y. (24)	1965	ADN nuclear y citoplasmático.	Trigo.	"		El ADN citoplasmático con mayor densidad que el nuclear.
Cherry.J. (9)	1967	Comparación de los ácidos nucleicos.	Maíz y chícharo.	Sistema bifásico de Kirby.		ARNx en monocotiledóneas, especialmente en gramíneas, muy escaso en dicotiledóneas.
Ralph.R. (50)	1964	ARN nativo.	Col y células de cultivo de tabaco.	Sistema bifásico de Kirby.	Diferente solubilidad en las sales de cetil-trimetil-amonio.	El método remueve contaminantes.
Cherry.J. (8)	1966	Factores en la ex-	Cacahuate.	"	Temperatura, el	Dos muestras:

		dos nucleicos.				ácidos nucleicos. b) 4-5% del total (ARNr, ARNm y ADN).
Lazar.G.(33)	1969	Fraccionación de - de los ácidos nu-- cleicos.	Cebada y tabaco.	"	Dietilpirocarbonato como inhibidor de nucleasas.	En cebada el uso del DEP, de mayor rendimiento. En tabaco, hay pérdida de ARNr.
Wilkinson.B.(69)	1970	Extracción y caracterización de ácidos nucleicos.	Algodón.	"	Mezcla fenol-cresol. Sal hidrofílica para el ARN y sal lipofílica y quelante para el ADN.	Extrae ARNr, ARNs y ADN en buena cantidad y grado de pureza.
Ruppel.R.(51)	1964	Acidos nucleicos en cloroplastos.	Poro y "Perrito.	" más Método de Behrens.	Mezcla fenol-SDS e hidrólisis en ácido fórmico.	Fase fenólica: 60% de nucleótidos. Fase acuosa: ARN. No localiza ADN en cloro-- plastos de hojas adultas.
Pollard- Clifford.	(49) 1964	ADN en cloroplastos.	Espinaca	Extracción acuosa.	Purifica.	Encuentra ADN en los cloroplastos, con valores típicos.
Wells.R.(66)	1967	"	Espinaca, lechuga, frijol soya y chícharo.	Extracción acuosa con soluciones isotónicas. Extracción no acuosa.	Antes de la extracción, remueve la cromatina con deoxirribonucleasa.	En preparados no --- acuosos el ADN se -- contamina con la fracción nuclear.
Heber.U.(22)	1963	ARN en cloroplastos.	Arroz, tabaco, frijol y espinaca.	Extracción no acuosa.		Contaminación citoplasmática, presencia de alcohol y ribonucleasas.

Tabla 1.- Resumen de las investigaciones realizadas por diversos autores para la extracción, cuantificación y caracterización de los ácidos nucleicos en plantas.

MATERIAL

a) Semillas

Se utilizan cuatro géneros de la Clase Angiospermae:

Genero y especie	Procedencia
Agave celsii (maguey)	Jardín Botánico UNAM
Agave potatorum (maguey)	Jardín Botánico UNAM
Pisum sativum (chícharo)	Programa de Genética CNEN
Vicia faba (haba)	Programa de Genética CNEN
Zea mays (maíz)	Programa de Genética CNEN

b) Reactivos

Bicloruro de mercurio al 0.10%

Monohidrato de 3-0-clorofenil-5-metil-4-isoaxil penicilina sódica al 0.25%

Celulasa 4000 U al 2% (p/v) (estéril)

Pectinasa al 2% (p/v) (estéril)

Pectinasa al 4% (p/v) (estéril)

EDTA (Titriplex III) 0.10 M NaC1 0.15 M, pH 8

NaOH 0.5 N

Sodio-dodecil-sulfato al 25% (p/v)

Perclorato de sodio, purificado 7 M

Mezcla de Sevag: cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v)

Citrato salino estandard (SSC) pH 7.0±0.2:cloruro de sodio 0.15 M citrato de trisodio 0.015 M

Cloruro de sodio 6 M

Solución saturada de perclorato de sodio impuro (comercial)

Ribonucleasa: se hace una solución 0.2% en cloruro de sodio 0.15 M pH 5.0, la solución se calienta a 80°C por 10 mins., para evitar la contaminación con desoxirribonucleasa.

Acetato de EDTA pH 7.0 : acetato de sodio 3 M EDTA 0.001 M

Solución acuosa de fenol: Fenol p.a. 500 gm, 8-Hidroxiquinolina 5 gm, agua destilada 55 ml, pH 7.0

Alcohol etílico absoluto

Alcohol iso-amílico

Alcohol iso-propanol

METODOS

Las semillas se desinfectan de la siguiente forma:

1.- Se lavan primero con agua corriente y después en agua destilada.

2.- Se desinfectan con la solución de bicloruro de mercurio durante 15 mins.

3.- Se lavan con agua destilada.

4.- Se dejan con agua destilada durante 24 hs.

Para conseguir un 100% de desinfección se efectúa el siguiente - tratamiento:

1.- Se lavan las semillas con agua destilada.

2.- Se lavan con agua destilada estéril.

3.- Se desinfectan con la solución de bicloruro de mercurio durante - 15 mins.

4.- Se lavan con agua destilada estéril.

5.- Se desinfectan con la solución de penicilina sódica durante 15 --- mins.

6.- Se dejan en agua destilada estéril durante 24 hs. en un recipiente cerrado.

b) Siembra y colecta.

Las leguminosas (chícharo, haba) se siembran en charolas de - peltre, entre dos capas de algodón húmedo comprimido. Para mejorar los resultados se esterilizan, el algodón y el agua. La graminea (maíz) se siembra de igual forma.

El proceso para desinfectar las semillas de Agave sp (maguey) es el mismo que en las leguminosas, pero para la siembra se utilizan otros métodos:

1.- Se siembran en charolas de peltre, entre dos capas de papel filtro húmedo.

2.- Se siembran en cajas de Petri con una capa inferior de algodón y papel manila húmedo, estériles.

El período de germinación en leguminosas fue de dos días a --- temperatura ambiente y de un día a 25°C.

El período de germinación en la gramínea Zea mays (maíz) fue de 4-6 días a temperatura ambiente y de 36 hs. a 25°C.

El período de germinación en ambos géneros del maguey, fue de 10 días a temperatura ambiente y de tres días a 25°C.

En la colecta de los cuatro tipos de semillas, se utilizó la raíz, la plántula y en una ocasión los tallos jóvenes, sin embargo el material de preferencia es la raíz en desarrollo, por su alto índice mitótico y el incremento en la síntesis de proteínas (68, 3, 5).

En Agave sp. se colectan plántulas de 1-8 días (evitando las partes verdes) y frutos maduros de 4-6 meses, cuyas semillas proporcionan mejores resultados.

En Pisum sativum se colectan plántulas de 1-6 días, con meristemos y raíces jóvenes de paredes muy delgadas.

En Vicia faba se colectan plántulas de 2-10 días.

En Zea mays se colectan plántulas de 1-6 días.

Todo el material se coloca después, en la solución salina de -- EDTA y para conservarlo se congela a -15°C, durante un lapso de -- 1-15 días, sin diferencia aparente en el rendimiento.

c) Homogeneización

Se efectúan dos métodos: enzimático y mecánico.

En el enzimático se utilizan, cualquiera de las dos formas siguientes:

1.- Se lava el material con agua destilada estéril y se coloca en 100 ml de alguna de las soluciones enzimáticas de celulasa o pectinasa, -- manteniéndose en condiciones estériles durante tres días a temperatura ambiente o un día a 37°C.

2.- El material se muele mecánicamente y se coloca en una solución enzimática, durante una hora en baño María a 37°C, con agitación suave.

El material se recupera por centrifugación o filtración.

Se añaden de 25 a 50 ml de solución salina de EDTA.

Se presiona a través de una malla de nylon de 0.25 mm de diámetro.

Se muele en el mortero y en ocasiones se pasa a través de cuatro capas de organdí.

El homogeneizado se pasa a un matraz de tapón esmerilado.

En el método mecánico se elige una de las formas siguientes:

1.- Después de la colecta, el material se congela en hielo seco.

Se muele en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Según la cantidad de tejido en gm/húmedo se añade EDTA en - relación 2:1

Se presiona a través de una malla de nylon.

Se pasa a un matraz de tapón esmerilado.

2.- Se muele el tejido en una licuadora con 25 ml de EDTA (relación 2:1), durante 75 y 15 segs a velocidad alta y baja respectivamente. Para evitar la espuma se añaden unas gotas de alcohol isoamílico.

Se pasa a un matraz de tapón esmerilado.

Cuando los resultados en la homogeneización no son satisfactorios, los homogeneizados se filtran a través de 2 o 4 capas de organdí de algodón.

d) Método de extracción de los ácidos nucleicos.

Sobre una base fundamental que es el método de Marmur, el - cual utiliza reactivos y métodos recomendados por algunos autores - (3, 8, 24, 63, 71) se ensayaron modificaciones tendientes a adaptarlo en homogeneizados totales de plantas superiores (6).

1.- De 2 a 3 gms de células húmedas se lavan una vez con 50 ml de EDTA salino. Por la acumulación de agua y tendencia a la vacuolación en las células vegetales, se aumentó el peso en proporciones -- que lo multiplican por 10 a 50, en los 25 a 50 ml de EDTA salino.

2.- La lisis se efectúa por adición de 2 ml de SDS (sodio dodecil -- sulfato al 25%) y se coloca la mezcla en baño María a 60°C por 10 - mins., después se enfría con agua de la llave a la temperatura am-- biente. Como resultado de la concentración celular el volumen se -- multiplicó de 10 a 150 veces.

3.- Se añade perclórato de sodio hasta alcanzar una concentración de 1 M. En ocasiones se sustituyó el perclorato de sodio purificado, -- por una solución de perclorato de sodio impuro o una solución concentrada de cloruro de sodio 6 M. En la primera y en la segunda sustitución se quería comprobar la efectividad de ambas soluciones, --- puesto que los reactivos son más fáciles de obtener.

4.- Se agita la mezcla con un volumen igual de cloroformo:alcohol -- isoamílico por 30 mins. En algunas ocasiones se disminuyó el volu-- men de la mezcla y los resultados eran aparentemente iguales.

5.- La emulsión resultante se centrifuga durante 5 mins a 8000 xg -- separándose en tres capas: una inferior de cloroformo, una media de proteínas y una acuosa superior. Se extrae la capa acuosa superior

que contiene los ácidos nucleicos, los cuales se precipitan añadiendo dos volúmenes de etanol aproximadamente.

6.- Los ácidos nucleicos se colectan utilizando una varilla de vidrio a la cual se adhieren.

7.- El exceso de alcohol se elimina, haciendo presión de los filamentos sobre el vidrio.

8.- Se transfieren a 10 ml de SSC diluído (0.1x SSC). Cuando se han disuelto por completo, se ajusta la solución a una concentración de 1x SSC añadiendo solución concentrada de 10x SSC.

9.- Nuevamente se vuelve a agitar con un volumen igual de mezcla de Sevag por 15 mins. y se centrifuga repitiendo los pasos del No. 5 al 8 hasta que se hayan eliminado todas las proteínas, comprobándolo al eliminar la fase intermedia después de centrifugar la emulsión.

10.- El sobrenadante obtenido después de la serie de desproteinizaciones se precipita con etanol y se diluye en SSC (cerca de 0.5 a 0.75 del volumen del sobrenadante).

11.- Se añade ribonucleasa a una concentración final de 50 μgm/ml y la mezcla se incuba por 30 mins. a 37°C. Se elimina la enzima con mezcla de Sevag, hasta que en la última desproteinización haya poca o ninguna proteína en la fase intermedia.

12.- El sobrenadante se precipita con etanol y los ácidos nucleicos - se disuelven en 9 ml 0.1x SSC.

13.- Se añade 1 ml de acetato de sodio-EDTA y cuando la solución - está completamente mezclada, se añaden 0.54 volúmenes de alcohol - isopropílico (35).

14.- El ADN precipita selectivamente en forma de filamentos en el - fondo del vaso.

15.- Si el ADN es suficiente, se redisuelve y precipita nuevamente.- El precipitado final se lava y el acetato se elimina, incrementando - progresivamente en un 70-95% el volumen, con alcohol etílico absoluto.

16.- Se obtiene nuevamente el precipitado, se disuelve perfectamente en 0.5x SSC y se lleva la solución a una concentración de 1x SSC - por adición de 10x SSC.

En el método descrito se utilizó opcionalmente una solución de fenol acuoso + 8-hidroxiquinolina ya que Yolles (71) y Kirby (30) lo - utilizan para una desproteinización completa.

Es así que en la secuencia anterior se puede sustituír el paso - No. 4 por los pasos 4a y 4b siguientes:

4a.- Se añade un volumen igual al del homogeneizado, de una solu-- ción acuosa de fenol. Se agita durante 24 hs a temperatura ambien-

te con un mínimo de dos cambios a fenol fresco.

4b.- Se centrifuga a 8000 xg, se elimina la fase fenólica y se añade un volumen igual de mezcla de Sevag.

Como una comprobación de la obtención de nucleoproteínas hidrolizadas, mediante el uso de soluciones alcalinas diluídas se efectuó la siguiente extracción (44):

1.- El material fresco se coloca en una solución al 0.5 N de NaOH incubándose por 1 h a 37°C.

2.- La solución se acidifica con ácido acético glacial.

3.- Las nucleoproteínas se precipitan por adición de dos volúmenes de alcohol etílico absoluto.

Todos los experimentos realizados se resumen en las Tablas (del No. 2 al No. 9).

Determinación de ADN por absorción de luz ultravioleta (u.v.):

Se calculó el contenido de las soluciones y su pureza por absorción de luz u.v.

a) Cocientes de extinción de las soluciones:

Se toman las lecturas de Densidad Optica (D.O.) en las longitudes de onda 260/280 mμ de las soluciones a un pH 7.

b) Espectros de absorción:

Se toman las lecturas de D.O. en un rango de longitudes de onda que va de 220 a 310 mμ en soluciones a pH 7, se grafica D.O. contra longitud de onda y se obtiene el espectro de absorción de la solución.

c) Determinación del punto de "desnaturalización térmica":

Una muestra de ADN con D.O. de 0.50 a 0.80 mμ en una solución 1x SSC (38) o 0.1x SSC (10) se somete a un proceso de desnaturalización térmica, por incremento de la temperatura hasta 95°C en un portacubetas termoestabilizable adaptado a un espectrofotómetro. Los cambios en la D.O. se leen a la longitud de onda de absorción máxima o sea a 260 mμ y mediante la siguiente ecuación se calcula el porcentaje de hipercromicidad (35):

$$\% \text{ Hpcm} = \left[\frac{\text{D.O.}_{\text{t.v.}}}{\text{D.O.}_{\text{t.i.}}} - 1 \right] 100$$

donde

$\text{D.O.}_{\text{t.v.}}$ = D.O. registrada a partir de la temperatura en que se incrementa dicha D.O. en intervalos de 2 a 3°C.

$\text{D.O.}_{\text{t.i.}}$ = D.O. registrada a temperatura ambiente

Una vez que se han obtenido los porcentajes de hipercromía para

cada una de las temperaturas empleadas, éstos se grafican y en el - trazo se localiza la media del porcentaje de hipercromía que corresponde a la temperatura en la que la mitad de la cadena de ácido desoxirribonucleico se ha desnaturalizado. (30)

RESULTADOS

En los cuatro géneros descritos se ensayaron técnicas de lisis enzimática y mecánica, para la obtención de homogeneizados y se sometieron a la técnica para extracción de ácidos nucleicos, con las modificaciones que ya se han mencionado. En las dos especies de leguminosas (chícharo y haba) y la gramínea (maíz) se obtuvieron muestras de ADN puro, en la agavácea (maguey) solo se obtuvieron nucleoproteínas fragmentadas.

Lisis enzimática: Empleando celulasa al 2% durante tres días, se obtuvieron muestras de ADN puro en haba, chícharo y maíz (Tabla 2).

Al utilizar otros porcentajes de la misma enzima o de pectinasa, una mezcla de ambas o variaciones en la duración del tratamiento enzimático, los resultados fueron muy inferiores (Tabla 3-7).

Lisis mecánica: Este tipo de lisis produjo la obtención de fragmentos de nucleoproteínas en la especie Agave potatorum del maguey, sin la intervención de una maceración enzimática. Al utilizar el mortero y la malla en la lisis, se obtuvo una homogeneización parcial del tejido determinada por la presencia de numerosos fragmentos y fibras del tejido. Por otra parte la homogeneización en -

licuadora junto con la anterior, dió los resultados mencionados en la Tabla 9.

En haba, chícharo y maíz, la lisis con el mortero y la malla - mostró ser efectiva cuando se utilizó después de la lisis enzimática, sin ésta los resultados fueron negativos. (Tabla 8).

En los homogeneizados que se filtraron a través de las capas - de organdí de algodón, se eliminaron las fibras vegetales satisfactoriamente.

Plántulas: la variación en la edad de las mismas, no dió diferencias notables en los resultados. Hay que señalar que las características del tejido de la agavácea parecen disminuir la efectividad del método y que las semillas de frutos inmaduros de Agave proporcionaron mejores condiciones para la obtención de resultados.

Al utilizar $NaClO_4$ 7 M como agente desproteinizante, después - de una lisis enzimática con celulasa al 2% y la lisis mecánica descrita, se obtuvieron muestras de ADN puro, pero al sustituírlo con --- NaCl o una solución saturada de $NaClO_4$ impuro sólo se obtuvieron - escasas nucleoproteínas (Tabla 2).

Una lisis enzimática con pectinasa al 2% en las condiciones --- mencionadas y con $NaClO_4$ 7 M o con la solución saturada del $NaClO_4$ impuro como agente desproteinizante produjo escasas nucleoproteínas

Planta (especie)	Chícharo	Chícharo	Haba	Maíz	Chícharo	Haba	
Edad de plántulas	2-5 días	2-5 días	2-6 días	4-6 días	2 días	1-10 días	
Parte utilizada	Raíces	Raíces	Raíces y tallos	Raíces	Raíces	Raíces	
Congelación en EDTA	si	si	si	si	si	si	
Descongelación	temp.amb.	temp.amb.	temp.amb.	temp.amb.	2 hs. 37°C	temp.amb.	
Lisis enzimática	Celulasa 2% 3 días	Celulasa 2% 3 días	Celulasa 2% 3 días	Celulasa 2% 3 días	Celulasa 2% 3 días	Celulasa 2% 3 días	
Lisis mecánica	Mortero Malla	Mortero Malla	Mortero Malla	Mortero Malla	Mortero Malla	Mortero Malla	
EDTA	25 ml.	25 ml.	25 ml.	25 ml.	25 ml.	25 ml.	
SDS	15 ml.	10 ml.	20 ml.	15 ml.	20 ml.	20 ml.	
$NaClO_4$ o NaCl	20 ml.	27 ml.	50 ml.	20 ml.	50 ml.	50 ml. NaCl 6M	50 ml. sol.sat.
Mezcla de Sevag	30 ml.	30 ml.	30 ml.	30 ml.	30 ml.	30 ml.	30 ml.
Obtención nucleoproteínas	**	****	****	****	****	---	---
ADN puro	---	****	****	****	---	---	---

Tabla 2. Experimentos en chícharo (P. sativum) y haba (V. faba) con celulasa al 2%.

**** Nucleoproteínas suficientes para una purificación y obtención de ADN

*** Escasas nucleoproteínas, insuficientes para purificación y obtención de ADN

** Escasas nucleoproteínas y depolimerizadas.

Planta (especie)	Maguey	
Edad de plántulas	Frutos inmaduros 4-6 meses	
Parte utilizada	Semillas	
Congelación en EDTA	no	
Descongelación	no	
Lisis enzimática	Celulasa 2% 3 días	Celulasa 2% 3 días
Lisis mecánica	Mortero malla	Mortero malla
EDTA	25 ml.	25 ml.
SDS	30 ml.	10 ml. al 80%
$NaClO_4$ o NaCl	70 ml. NaCl 6M	15 ml.
Mezcla de Sevag	30 ml.	70 ml.
Obtención nucleoproteínas	---	**

Tabla 3.- Experimentos en maguey (A. potatorum y A. celsii) con celulasa al 2% y $NaClO_4$ o NaCl como agente desproteinizante.
** Escasas nucleoproteínas y depolimerizadas.
--- No se obtuvieron nucleoproteínas

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

Planta (especie)	Chícharo	Haba	Chícharo	Haba
Edad de plántulas	2 días	1-6 días	2-6 días	1-6 días
Parte utilizada	Raíces	Raíces	Raíces	Raíces
Congelación en EDTA	si	si	si	si
Descongelación	temp.amb. 1 h. 50°C	temp.amb. 35' a 50°C	temp.amb.	37°C
Lisis enzimática	Pectinasa 2% 3 días	Pectinasa 2% 3 días	Pectinasa 4% 3 días	Pectinasa 4% 3 días
Lisis mecánica	Mortero malla	Mortero malla	Mortero malla	Mortero malla
EDTA	25 ml.	25 ml.	20 ml.	25 ml.
SDS	20 ml.	15 ml.	4 ml.	10 ml.
$NaClO_4$ o NaCl	50 ml. sol. sat.	12 ml.	7 ml.	65 ml. sol. sat.
Mezcla de Sevag	30 ml.	30 ml.	50 ml.	30 ml.
Obtención nucleoproteínas	***	***	---	---
ADN puro	---	---	---	---

Tabla 4.- Experimentos en chícharo (P. sativum) y haba (V. faba) con pectinasa al 2% y al 4%.
*** Escasas nucleoproteínas, insuficientes para su purificación y obtención de ADN.
--- No se obtuvieron nucleoproteínas.

Planta (especie)	Chícharo	Haba
Edad de plántulas	2-5 días	1-3 días
Parte utilizada	Raíces	Meristemos
Congelación en EDTA	si	Hielo seco
Descongelación	temp. amb.	temp. amb.
Lisis enzimática	Celulasa 2% Pectinasa 4% 1 día	Celulasa 2% 30' Pectinasa 4% 30'
Lisis mecánica	Mortero malla	Mortero *H
EDTA	50 ml.	25 ml.
SDS	4 ml.	20 ml.
$NaClO_4$	14 ml.	50 ml.
Mezcla de Sevag	60 ml.	30 ml.
Obtención nucleoproteínas	---	---
ADN puro	---	---

Tabla 5.- Experimentos en chícharo (P. sativum) y haba (V. faba) con celulasa al 2% y pectinasa al 4%.
--- No se obtuvieron nucleoproteínas.
*H En este caso el material se homogeneizó y después se degradó enzimáticamente.

Planta (especie)		Maguey	
Edad de plántulas		Frutos inmaduros 4 - 6 meses	
Parte utilizada		Semillas	
Congelación en EDTA		si	
Descongelación	temp. amb.	temp. amb.	1 h. 54°C
Lisis enzimática	Pectinasa 2% 4 días	Pectinasa 4% 3 días	Pectinasa 4% 3 días
Lisis mecánica	Mortero malla	Mortero malla, organdí	Licuadora malla
EDTA	25 ml.	25 ml.	25 ml.
SDS	20 ml.	20 ml.	100 ml.
$NaClO_4$ o NaCl	66 ml.	20 ml.	150 ml. NaCl 6 M
Mezcla de Sevag	46 ml.	30 ml.	100 ml.
Obtención nucleoproteínas	---	---	---
ADN puro	---	---	---

Tabla 6.- Experimentos en maguey (A. potatorum y A. celsii) con pectinasa al 2% y al 4% y $NaClO_4$ o NaCl como agente desproteinizante.
--- No se obtuvieron nucleoproteínas.

Planta (especie)	Chícharo	Chícharo
Edad de plántulas	2 días	2 días
Parte utilizada	meristemos	meristemos
Congelación en EDTA	si	si
Descongelación	temp. amb.	temp. amb.
Lisis enzimática	Pectinasa 10% 1 día	Pectinasa 10% 1 día
Lisis mecánica	Mortero malla	Mortero malla
EDTA	50 ml.	50 ml.
SDS	2 ml.	2 ml.
NaCl	10.5 ml. NaCl .5M	7 ml. NaCl 2M
Mezcla de Sevag	65 ml.	60 ml.
Obtención nucleoproteínas	---	---
ADN puro	---	---

Tabla 7.- Experimentos en chícharo con pectinasa al 10% y NaCl como agente desproteinizante.
--- No se obtuvieron nucleoproteínas.

Planta (especie)	Haba	Chícharo
Edad de plántulas	8 días	2-6 días
Parte utilizada	Raíces	Raíces
Congelación en EDTA	no	no
Descongelación	no	no
Lisis enzimática	no	no
Lisis mecánica	Licuadora Mortero Malla	Mortero malla
EDTA	25 ml.	100 ml.
SDS	10 ml.	44 ml.
$NaClO_4$ o NaCl	15 ml.	14 ml.
Mezcla de Sevag	50 ml.	60 ml.
Nucleoproteínas	---	---
ADN puro	---	---

Tabla 8.- Experimentos en chícharo (*P. sativum*) y haba (*V. faba*) sin lisis enzimática.
--- No se obtuvieron nucleoproteínas.

Planta (especie)	Maguey			
Edad de plántulas	Frutos inmaduros 4-6 meses			
Parte utilizada	Semillas			
Congelación en EDTA	si		si	no
Descongelación	temp. amb.	30 min. 60°C	1 h. 54°C	no
Lisis enzimática	no	no	no	no
Lisis mecánica	Licuadora mall, organdí	Licuadora malla, organdí	Licuadora malla	Licuadora malla, organdí
EDTA	25 ml.	25 ml.	50 ml.	50 ml.
SDS	30 ml.	30 ml.	20 ml.	30 ml.
$NaClO_4$ o NaCl	20 ml. F	15 ml.	75 ml.	15 ml. F
Mezcla de Sevag	100 ml.	100 ml.	60 ml. NaCl 6 M	100 ml.
Obtención nucleoproteínas	**	***	---	---
ADN puro	---	---	---	---

Tabla 9.- Experimentos en maguey (A. potatorum y A. celsii) sin lisis enzimática y $NaClO_4$ o NaCl como agente desproteinizante.

*** Escasas nucleoproteínas insuficientes para su purificación y obtención de ADN.

** Escasas nucleoproteínas y depolimerizadas.

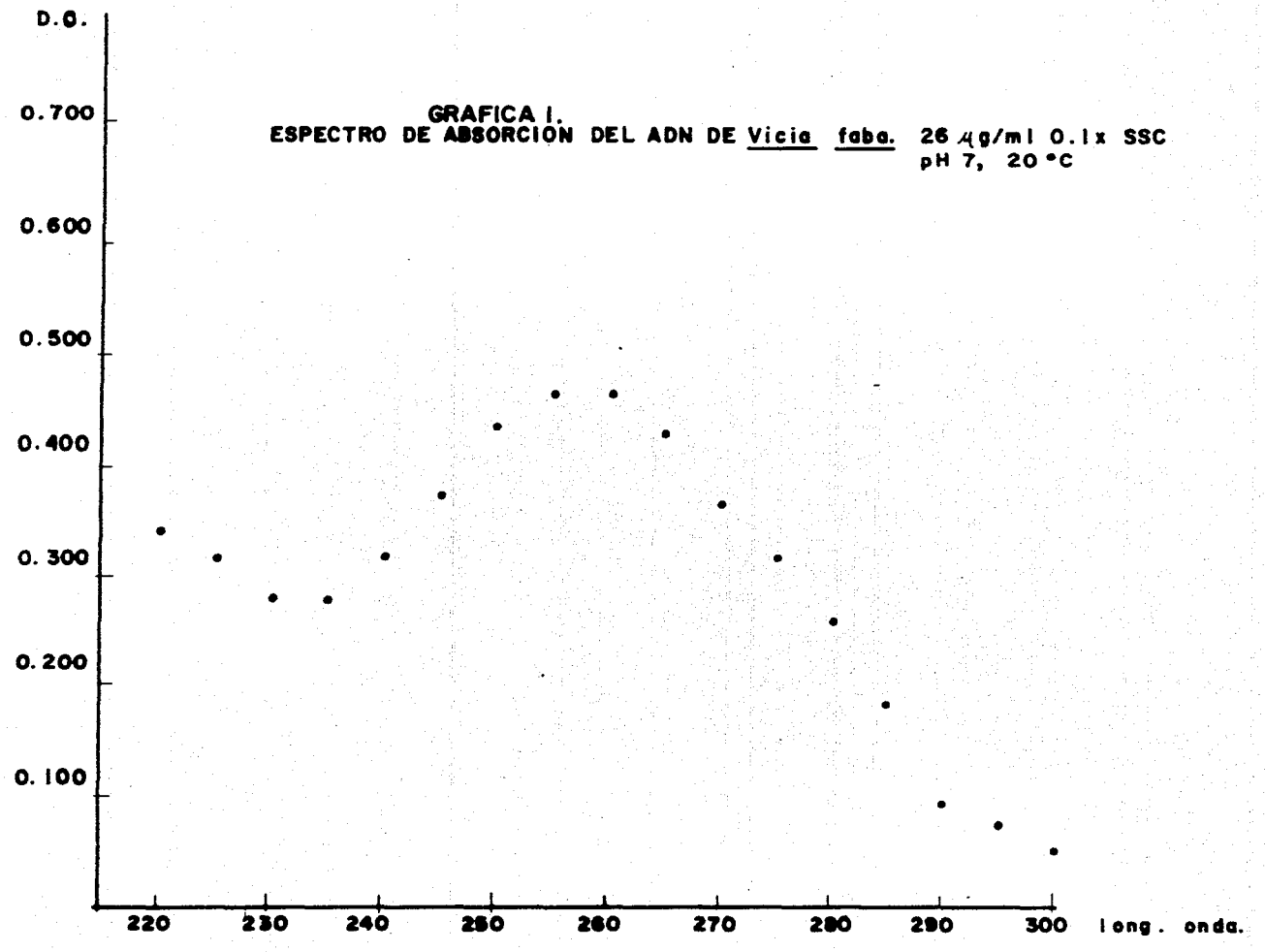
--- No se obtuvieron nucleoproteínas.

F Se utilizó fenol para desproteinizar.

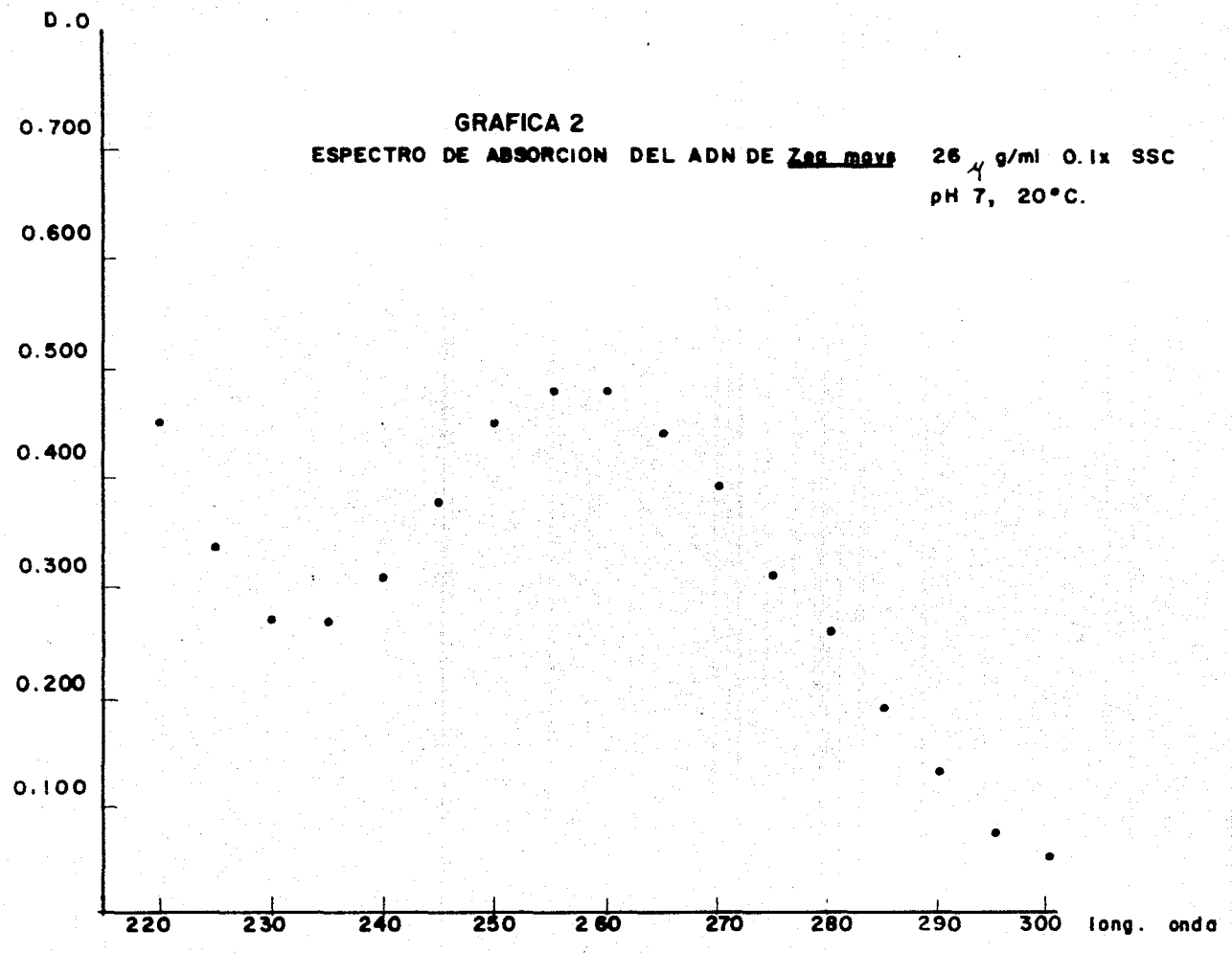
Tabla 10

Origen de la muestra	E_{260}/E_{280}	% M de A-T [18]
P. sativum	1.77	34.4
V. faba	1.72	33.9
Z. mays	1.84	36.2
A. potatorum	----	----
E. coli [18]	1.405	28.0
Timo de ternera [18]	1.33	25.0

La proporción de absorbancias a 260 y 280m μ E_{260}/E_{280} se ha determinado como una característica constante que depende de la proporción molar de los nucleótidos en el ácido nucleico. Desde que se estableció (5) que las diferentes muestras de ADN de diferentes orígenes contienen la misma proporción molar de adenina—timina por un lado y por el otro guanina—citosina, es suficiente en principio, determinar la proporción A-T/G-C para saber la composición de la molécula, para seguir la fraccionación o para checar la pureza de una muestra de ADN.

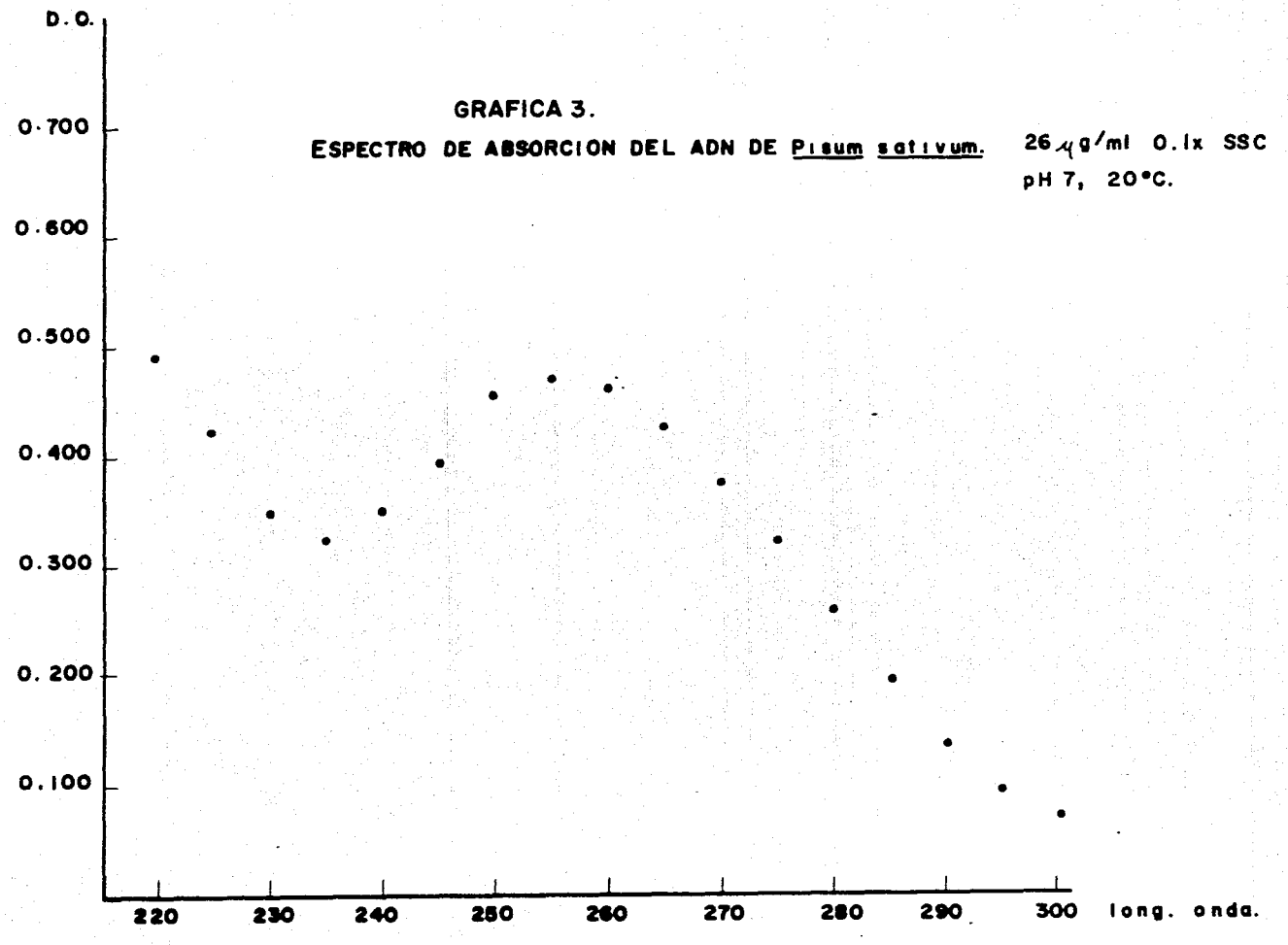


GRAFICA I.
ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ADN DE *Vicia faba.* 26 μg/ml 0.1x SSC pH 7, 20 °C



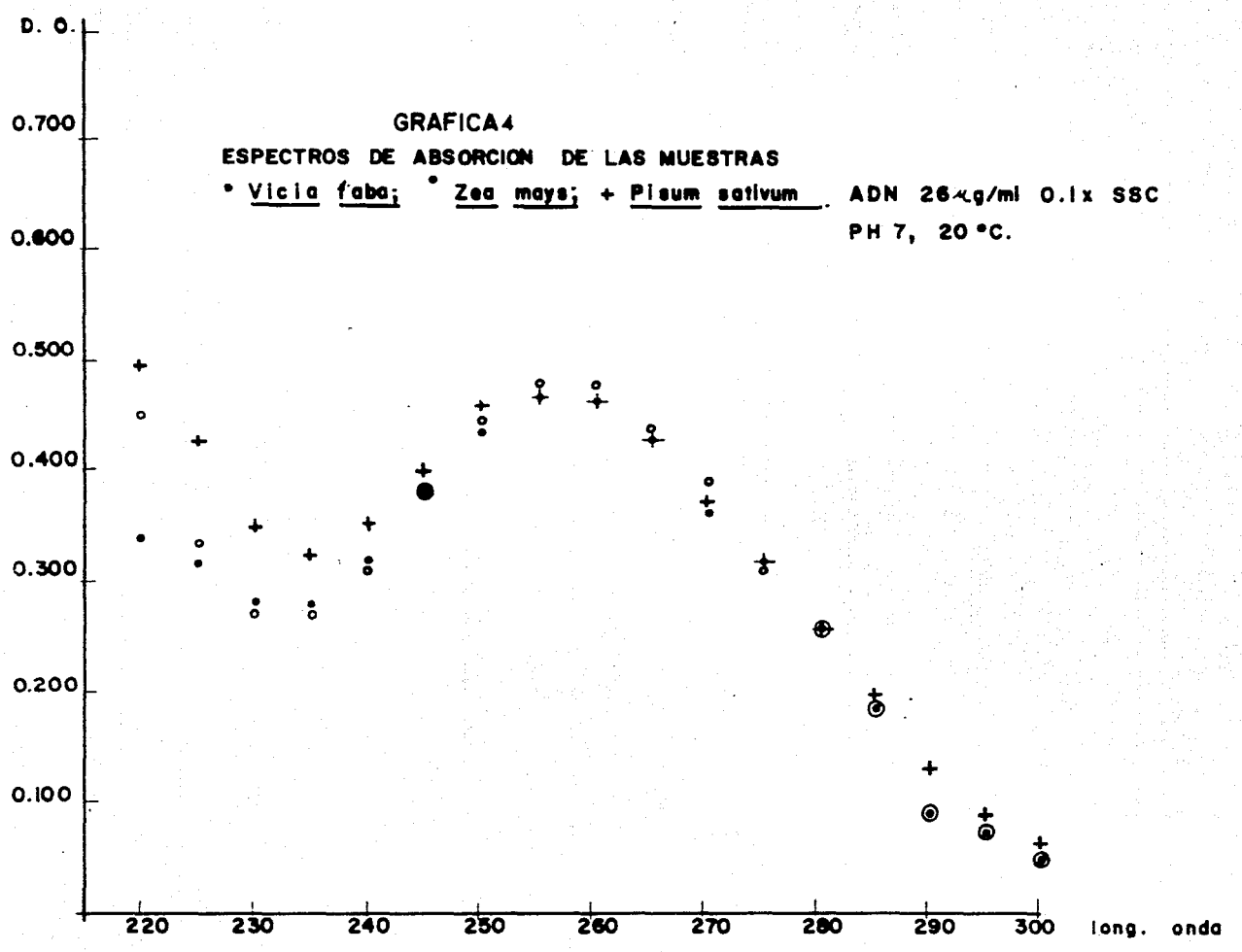
GRAFICA 2

ESPECTRO DE ABSORCION DEL ADN DE *Zea mays* 26 μg/ml 0.1x SSC pH 7, 20°C.



GRAFICA 3.

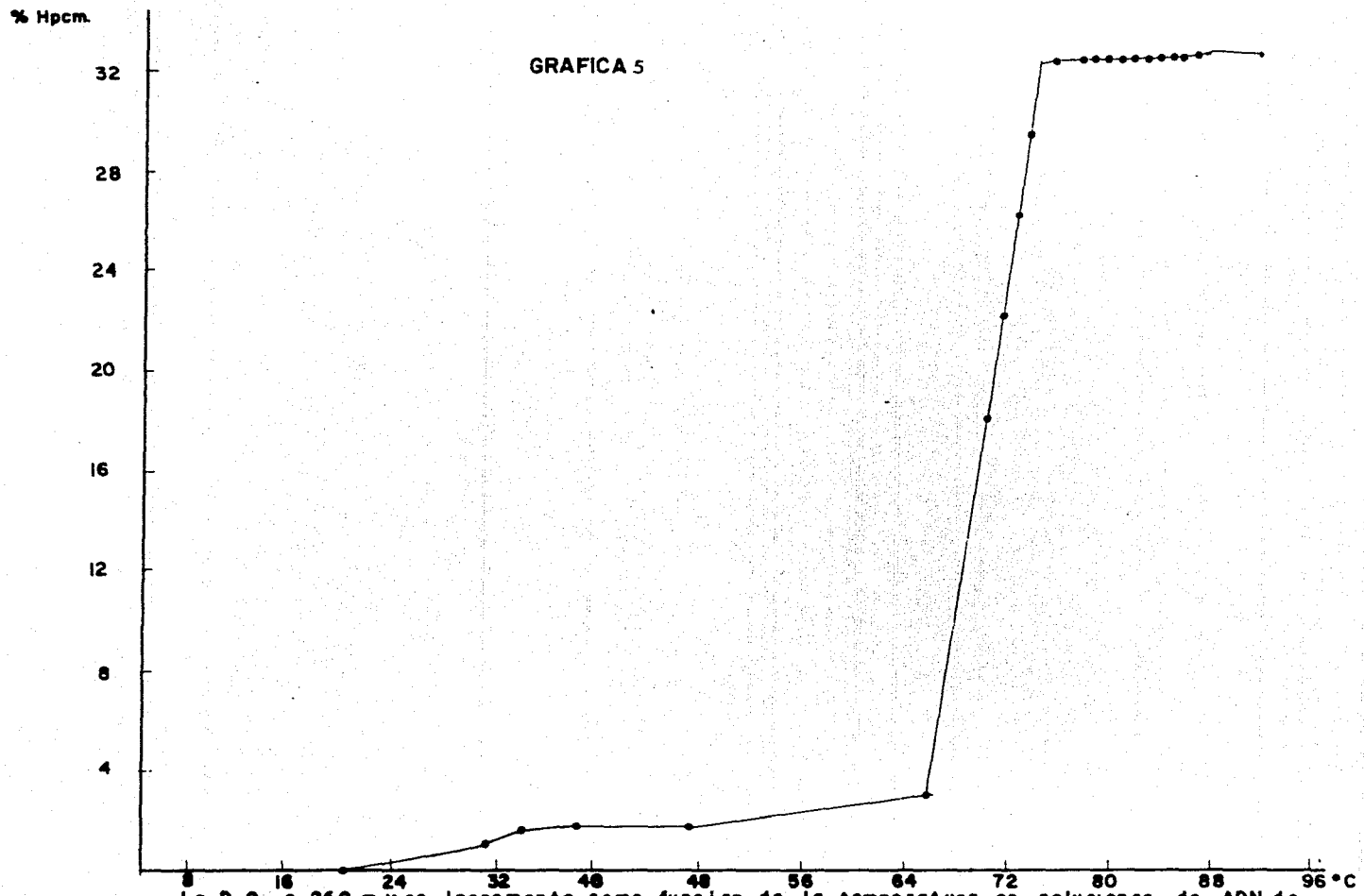
ESPECTRO DE ABSORCION DEL ADN DE *Pisum sativum*. 26 μg/ml 0.1x SSC pH 7, 20°C.



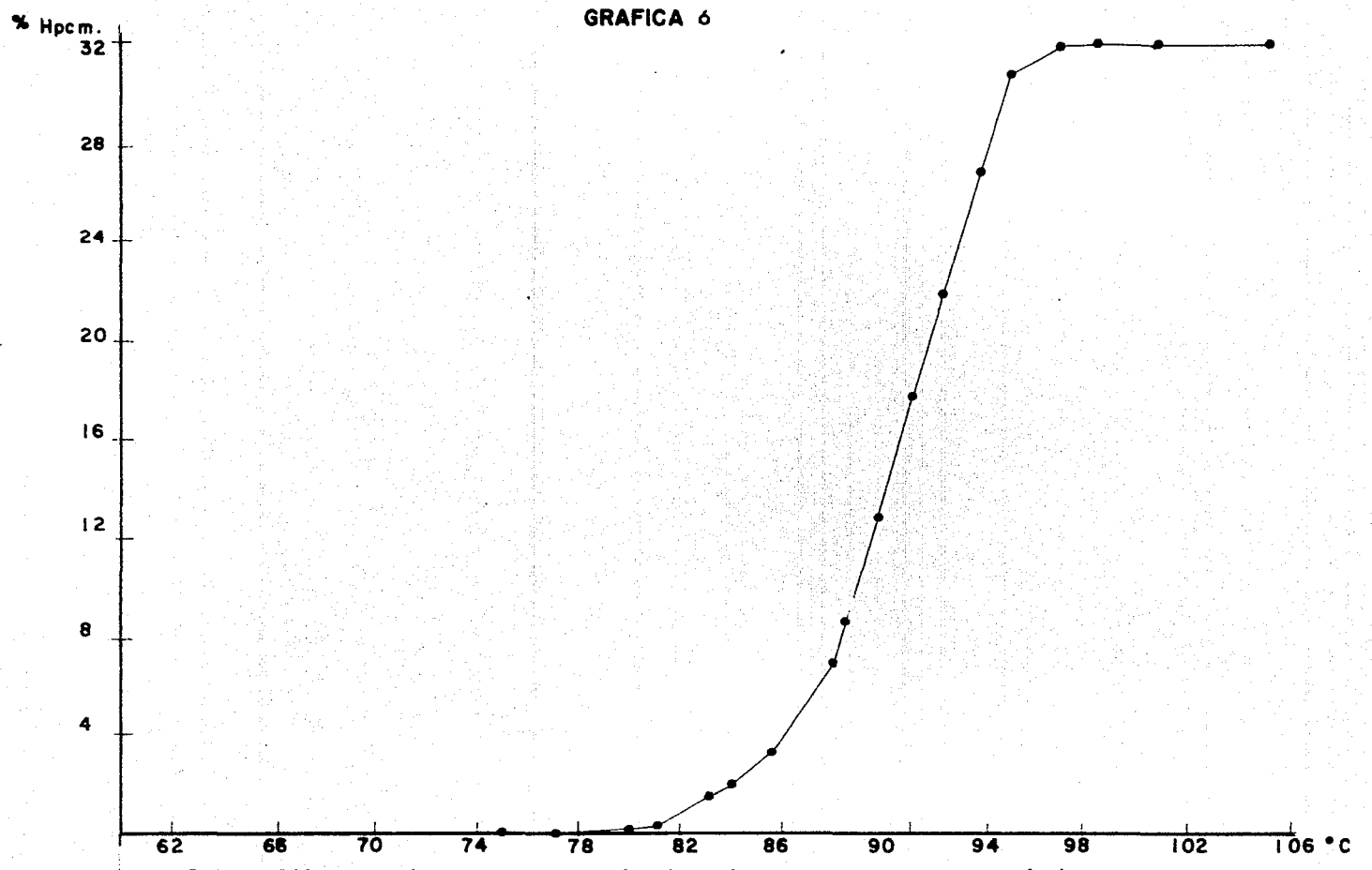
GRAFICA 4

ESPECTROS DE ABSORCION DE LAS MUESTRAS

• *Vicia faba*; ° *Zea mays*; + *Pisum sativum*. ADN 26 µg/ml 0.1x SSC PH 7, 20 °C.



La D.O. a 260 mμ se incrementa como funcion de la temperatura en soluciones de ADN de *Vicia faba*. El TM se estime en 69.5 °C, en 0.1x SSC pH 7.



La D.O. a 260 mμ se incrementa como funcion de la temperatura en soluciones de ADN de *Vicia faba*. El TM se estimo en 90°C ± 1.C, en 1X SSC PH 7.

(Tabla 4).

En el maguey la lisis enzimática con celulasa al 2% y la lisis - mecánica en unión con el $NaClO_4$ 7 M dió escasas nucleoproteínas y - fragmentadas cuando se utilizó SDS al 80% (Tabla 3). Por otro lado, después de una lisis mecánica efectiva en el maguey y utilizando ---- $NaClO_4$ 7 M se llegaron a obtener escasas nucleoproteínas pero esta - vez sin fragmentar, en cambio usando NaCl no se obtuvieron nucleo-- proteínas (Tabla 9).

Mediciones espectrofotométricas en las muestras de ADN.

1.- Se determinaron los espectros ultravioleta en .1x SSC a $\pm$ 20°C, pH 7 y a intervalos de 5 mμ . Gráficas 1, 2 y 3.

2.- Se obtuvieron las relaciones de absorbancia, mostradas en la Tabla 10.

3.- Se desnaturalizó térmicamente la muestra de ADN de Vicia faba en las siguientes condiciones:

Una muestra de concentración 23.4 μg de ADN/ml en 0.1x SSC, se sometió a un aumento de temperatura de 20°C a 92°C en un espectrofotómetro Zeiss con un portacubetas termoestabilizante.

La muestra de ADN en solución 0.1x SSC presentó un punto de - desnaturalización térmica de 69.5 °C, Gráfica 5.

La misma muestra de ADN se llevó a una concentración de --- 1x SSC por adición de 10x SSC, se desnaturalizó en la misma for-- ma y se obtuvo un punto de desnaturalización térmica de 90 °C ± 1 - °C, Gráfica 6.

Debe señalarse también, que contrariamente a lo esperado (29) no se encontraron problemas de contaminación con pigmentos. En - las plantas los pigmentos antociánicos son solubles en el agua y los carotenoides solo lo son, en solventes orgánicos. Su presencia in- terfiere en las mediciones de D.O. a 260mμ y se asume que la au-- sencia de pigmentos fue posible, debido a que el cloroformo y el -- etanol los eliminaron satisfactoriamente (26, 34, 61).

DISCUSION

Debido a que los métodos para extracción y cuantificación de los ácidos nucleicos fueron originalmente desarrollados para tejidos animales, no es sorprendente que se tropiece con dificultades en su adaptación a los tejidos vegetales.

Los métodos para la extracción de los ácidos nucleicos se relacionan directamente con el tejido (7, 29) y la utilidad de un método de extracción depende enormemente de la facilidad con la cual los ácicos nucleicos pueden ser purificados después de su extracción. Por la abundancia de materiales que interfieren en las determinaciones en los extractos, no se ha obtenido ningún método general, para la extracción de ADN de doble banda o ARN polimerizado, o para el cálculo directo del total de nucleótidos de los ácidos nucleicos en vegetales (26, 34). En las plantas superiores los puentes intercelulares, el proceso de vacuolación y acumulación de agua (3), las paredes celulares de celulosa y la presencia de sustancias que interfieren como contaminantes, impiden la libre separación celular, la obtención de nucleoproteínas y la purificación de los polímeros y de monómeros (7, 17, 50).

Las extracciones preliminares son necesarias para detener las

actividades enzimáticas cuando se utilizan tejidos frescos y para eliminar sustancias como coenzimas, mononucleótidos solubles, fosfatos inorgánicos y carbohidratos (23, 26). Estos hechos han ocasionado que los tejidos se pretraten enzimática, mecánica o químicamente.

La digestión enzimática de los tejidos ha sido estudiada ampliamente, pero la cuantificación del grado de degradación de los mismos es difícil, aún cuando se han ido desarrollando métodos que la determinan, por ejemplo, midiendo la proporción de clorofila en la suspensión celular (52).

Sato (52) realiza un estudio sobre la maceración enzimática de tejidos vegetales, encontrando que el EDTA la facilita y que la concentración óptima para efectuar la separación celular con pectinasa al 0.2%, pH 6.2 es de 0.001 M.

Cherry (8) por otra parte, ha reportado que el ADN extraído con el método de Marmur presenta una gran cantidad de proteínas que no pueden ser removidas del extracto hasta que no se utiliza papaína.

Chayen (6) en un estudio sobre la distribución del ácido desoxirribonucleico en homogeneizados de raíces de plantas superiores, señala que se obtienen resultados fundamentalmente iguales cuando se

ha efectuado la maceración por fuerzas mecánicas o por el uso de - pectinasa.

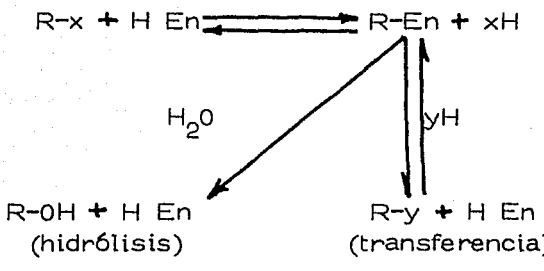
Debido a que los principales puentes de unión entre las células vegetales son sales de calcio de ácido péctico o pectónico (52) y sus cápsulas de secresión están constituídas por moléculas de celulosa, se decidió utilizar: pectinasa y celulasa como modificación inicial al método de Marmur, para romper los puentes e hidrolizar la celulasa y la pectina.

Las enzimas se adsorben en la superficie del sustrato y el grado de digestión es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida. - Como en toda actividad enzimática, el pH afecta la actividad catalí - tica habiéndose determinado un pH de 5.2-5.4 para la celulasa (45) y de 5.5 para la pectinasa en presencia de EDTA (52). No obstante - existen variaciones en el pH óptimo de acuerdo con la procedencia - de la enzima y el tejido o especie vegetal que se utilice. El cloruro de sodio estimula la separación, dependiendo de la forma y con-- centración de los iones en los puentes celulares de las diferentes -- plantas.

Basándose en lo anterior, se utilizaron las enzimas menciona-- das, en presencia de EDTA-salino y a un pH 5-6. Los mejores resultados se obtuvieron en tejidos frescos sometidos al proceso, durante

tres días a temperatura ambiente y a una concentración de enzima de 2% (Tablas 2y 4).

Zaitlin y Cortrin (72) obtuvieron una separación celular con pectinasa al 0.2%, pH 5 en 1h 30 mins y Sato (52) en pectinasa al 0.4%, pH 5 en 3 hs. Se supone que los resultados obtenidos en el presente trabajo se deben a varias razones, siendo la principal la siguiente: Sato (52) señala que la reacción catalítica es muy lenta si los espacios intercelulares no se llenan con agua destilada. Un mecanismo donador de agua facilita la difusión de la mezcla enzimática en el sustrato celular y actúa como aceptor final del proceso introduciendo un grupo hidroxilo en el sustrato:



(45)

Se piensa entonces, que el retardo en la actividad enzimática se debe a la falta de agua destilada en los espacios intercelulares, ya que en pruebas preliminares con diferentes porcentajes en las soluciones enzimáticas, a diferentes condiciones de temperatura y con agitación lenta los resultados fueron negativos.

La acción de la celulasa, al hidrolizar las moléculas de celulosa fue más efectiva para los fines que se perseguían, ya que al romper las cápsulas de secreción primarias, se deben haber liberado los componentes celulares.

Es muy probable que exista un detrimento en el rendimiento --- ADN/gm de tejido, puesto que este se mantuvo a un pH 5-6 durante - tres días. Sin embargo, los resultados en las muestras (Gráficas - 1-6, Tablas 1 y 2) nos indican que la calidad es aceptable, sugiriéndose que el método de digestión enzimática debe acelerarse introduciendo agua al tejido, para obtener los mayores rendimientos en cantidad y calidad de acuerdo con el tejido, la edad de la planta y el grupo al que pertenece (52).

Los resultados muestran que la actividad enzimática es positiva en determinadas concentraciones y condiciones (Tabla 2), atribuyéndose el bajo rendimiento en el maguey (Tabla 3), a la presencia de sustancias contaminantes como los alcaloides, la gran cantidad de celulosa y de oxalato de Ca en sus tejidos. Al utilizar solamente lisis mecánica, hay un rendimiento casi negativo a no ser por la escasa obtención de fragmentos de nucleoproteínas, que indican la necesidad de otros tratamientos en los tejidos (Tablas 8 y 9).

Como un complemento a la lisis enzimática se utilizó con resul

tados satisfactorios, la homogeneización en mortero, la eliminación de fibras usando mallas y en ocasiones capas de organdí. En las pruebas previas, se vió que el tejido de las plántulas de maguey resistía el tratamiento enzimático o mecánico, por lo cual se utilizaron tejidos embrionarios que se sometieron al método con los resultados ya mencionados (Tablas 3 y 9).

Para la cuantificación de los ácidos nucleicos en plantas, se han utilizado métodos que los extraen con soluciones frías o calientes de ácido diluído (46, 54) o soluciones calientes de álcali diluído (53). Los autores que han utilizado estos métodos (34, 26, 23, 42, 31) cuantifican el contenido de ácidos nucleicos en las plantas, por determinación de los nucleótidos solubles en los extractos, mediante el empleo de espectrofotometría con luz u.v., pero estos métodos no sirven para obtener un ADN de doble banda o ARN, polimerizados y con actividad biológica.

Se ha demostrado que las diferentes técnicas de extracción que emplean cambios en el pH o la adición de SDS más un agente desproteinizante como el NaCl , el $NaClO_4$ o el fenol, son las más adecuadas para obtener los ácidos nucleicos en su estado nativo y con actividad biológica (8, 24, 26, 34). El método de Marmur reune las características mencionadas, que lo hacen susceptible de ser adapta-

do a otros organismos aparte de los microrganismos a los que originalmente iba destinado (38).

Tal método implica en sus fases iniciales un tratamiento enzimático de las células, que en este caso se ha sustituído por celulasa y pectinasa. Además los reactivos que utiliza: SDS, $NaClO_4$, cloroformo, etanol e isopropanol son ampliamente recomendados en la literatura con opción de incluir en el método la solución acuosa de fenol (71).

Al ensayar la hidrólisis alcalina (44) se obtuvieron filamentos depolimerizados de acuerdo con la acción de la solución sobre los puentes de unión de las nucleoproteínas (35).

En las muestras de ADN se determinaron las relaciones de absorbancia, los espectos de absorción (Gráfica 4) y en el ADN de *V. faba* se determinó el punto de desnaturalización térmica. Este última prueba no se pudo efectuar en las otras dos muestras por dificultades técnicas, sin embargo los datos que se obtuvieron en las sucesivas desnaturalizaciones indicaron un porcentaje máximo de hipercromía de 32.2% y un "Tm" de 69.5 °C para la muestra en .1x SSC mientras que en la muestra diluída en 1x SSC se obtuvo un "Tm" de 90 °C ± 1°C con un porcentaje de hipercromía de 32.4% lo cual concuerda perfectamente con lo reportado por otros autores

(10, 38) e indica la presencia de un ADN de doble banda, interviniendo, en la diferencia de "Tm" el rango iónico de la solución. (Gráficas 5 y 6).

Además un buen indicio de la ausencia de ARN contaminante es, que en la determinación del "Tm" en 0.1x SSC el aumento en la --- D.O. se localiza en la región de los 25°-50°C (30).

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el método es efectivo, en homogeneizados totales de tejidos que han sido sometidos previamente a tratamientos enzimáticos que rompen las cápsulas de secreción y en menor grado a tratamientos que destruyen los puentes intercelulares --- (Tablas 1 y 3).

De acuerdo con los autores (3, 30, 29) los tejidos requieren diferentes modificaciones en los métodos para extracción de los ácidos nucleicos, hecho que sobresale al comparar los resultados en los géneros estudiados: en haba (V.faba), en chícharo (P.sativum) y en -- maíz (Z.mays) se obtuvieron muestras de ADN con el mismo método (Tabla 1). En el maguey (Agave spp.) el método fue aplicable en -- mucho menor grado (Tabla 2) y ciertas modificaciones en la lisis mecánica más la eliminación de la degradación enzimática, dieron resultados parciales (Tabla 9) que indican la necesidad de cambios específicos en el método, para ese tejido.

En las muestras de ADN las relaciones de absorbancia (Tabla 10) en espectrofotometría con luz ultravioleta dan una idea del grado de contaminación de la muestra (18, 23, 26, 63), en este caso parece que el grado de contaminación es escaso. Además los espectros de absorción, en las mismas condiciones de espectrofotometría

presentan una curva característica y el pico de absorción se localiza en los 255-260 mμ (5).

El punto de desnaturalización térmica de la muestra de ADN - de V.faba fue de 69.5 °C en .1x SSC con un porcentaje de hipercromía de 32.2 % que concuerda con lo reportado por Chipcase (10) en las mismas condiciones de rango iónico, o sea 37% para ADN de origen vegetal, específicamente en P.sativum. A mayor rango iónico de la solución, es decir en SSC aumenta el punto de desnaturalización a 90°C ± 1 °C con un porcentaje de hipercromía de 32.4%. Si se toma en cuenta que el ADN nativo o de doble banda presenta un - 40% para el promedio de máxima hipercromicidad, el incremento en la Densidad Optica como resultado de la desnaturalización térmica, - indica que la mayor parte del ADN es nativo y que el incremento en el punto de desnaturalización en la muestra de ADN diluída en SSC es resultado del aumento en el rango iónico de la solución que le - confiere mayor estabilidad a la molécula (38).

El uso del $NaClO_4$ como agente desproteinizante mostró ser -- más efectivo que el NaCl o la solución saturada del $NaClO_4$ impuro (Tablas 1-9). El uso de la solución acuosa de fenol (29, 71) requiere en este caso, más investigación puesto que las condiciones experimentales no permitieron obtener conclusiones definitivas.

LITERATURA CONSULTADA

1.- ALIEV,R.T., 1967. Nucleic acid content in various types and --- hybrids of wheat. Dokl. Akad. Nauk. Azerb. SSSR. 23(12): 65-69 In: Biological Abastracts 1969.

2.- ALI-ZAD,M.A., 1968. Changes in nucleic acid content in leaves - of polyploid mulberry varieties. Dokl. Akad. Nauk. Azerb. SSSR. 178(3): 725-727. In: Biological Abs-- tracts 1968.

3.- BONNER,J., and A.W.GALSTON, 1965. Principios de Fisiología Vegetal. Ed. Aguilar.

4.- BRITTEN,R.J., and D.E.KOHNE, 1968. Repeated sequence in --- DNA. Science 161 (3841): 529-540.

5.- CHARGAFF,E., 1955. In: The Nucleic Acids, ed. by E. Chargaff and J.M.Davidson, 1 New York Academic Press.

6.- CHAYEN,J., E.DENBY, 1960. The distribution of deoxyribonucleic acid in homogenates of plant roots. Exp. Cell. Res. 20: 182-197.

7.- CHERRY,J.H., 1962. Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. Plant Physiol. 37: 670-678.

LITERATURA CONSULTADA

1.- ALIEV,R.T., 1967. Nucleic acid content in various types and --- hybrids of wheat. Dokl. Akad. Nauk. Azerb. SSSR. 23(12): 65-69 In: Biological Abastracts 1969.

2.- ALI-ZAD,M.A., 1968. Changes in nucleic acid content in leaves - of polyploid mulberry varieties. Dokl. Akad. Nauk. Azerb. SSSR. 178(3): 725-727. In: Biological Abs-- tracts 1968.

3.- BONNER,J., and A.W.GALSTON, 1965. Principios de Fisiología Vegetal. Ed. Aguilar.

4.- BRITTEN,R.J., and D.E.KOHNE, 1968. Repeated sequence in --- DNA. Science 161 (3841): 529-540.

5.- CHARGAFF,E., 1955. In: The Nucleic Acids, ed. by E. Chargaff and J.M.Davidson, 1 New York Academic Press.

6.- CHAYEN,J., E.DENBY, 1960. The distribution of deoxyribonucleic acid in homogenates of plant roots. Exp. Cell. Res. 20: 182-197.

7.- CHERRY,J.H., 1962. Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. Plant Physiol. 37: 670-678.

8.- CHERRY,J.H. and H.CHROBOCZEC, 1966. Factors affecting nucleic acid extractability in plants. Phytochem. 5: - 411-422.

9.- CHERRY,J.H. and K.J.LESSMAN, 1967. Comparison of nucleic acids in maize shoots and pea epicotyls. Amer. -- Jour. Bot. 54(2): 181-188.

10.- CHIPCHASE,I., H.MARGARET., M.L.BIRNSTIKL, 1963. On the nature of nucleolar RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. - 50: 1101-1107.

11.- CHUN,C.H.L., 1963. The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. Jour. -- Mol. Biol. 7(2): 130-141.

12.- CLICK,R.E., D.P.HACKETT, 1966. The isolation of ribonucleic acid from plant, bacterial or animal cells. Biochim. Biophys. Acta. 129: 74-84.

13.- CRICK, F.H.C., L.BARNETT, S.BRENNER and R.J. WATTS-TOBIN, 1963. General nature of the genetic code for proteins. Nature 192: 1227.

14.- CUTTER,E.G., 1970. Trichoblasts in Hydrocharis. II nucleic -- acids proteins and a consideration of cell growth in relation to endopolyploidy. Amer. Jour. Bot. 57(2) 202-211.

15.- DRURY,R.E., 1969. The inhibition of seedling growth by streptomycin sulfate. Physiol. Plant. 22(4): 751-758.

16.- DOBROWOLSKI,J. and D.SIAZKO, 1966. The influence of gibberellin on the contents of nucleic acid in tobacco ----- Zeszity. Nauk. Uniw. Mikolata.Kopernika Toruniu. Biol. 8: 209-216 In: Biological Abstracts 1967.

17.- FIALOVA,S., 1968. Contribution to the estimation of nucleic ---- acids in wheat roots. Biol. Plant. (Praha) 10(6): 409-423 In: Biological Abstracts 1969.

18.- FREDERICQ,E., A.OTH and F.FONTAINE, 1961. The ultraviolet spectrum of deoxyribonucleic acids and their constituents. Jour. Mol. Biol. 3: 11-17.

19.- GORINI,L., 1966. Antibiotics and the Genetic Code. In: Molecular Basis of Life. Readings from Scientific American.-- Freeman and Co.

20.- GOTH, A., 1971. Farmacología Médica. Ed. Interamericana, S.A.

21.- GUSEV,S.A., 1970. Effect of harvest time and storage temperature on the nucleic acid content in potato tubers --- tissues. Priklad. Biokhim. Microbiol. 6(2): 138-141 In: Biological Abstracts 1970.

22.- HEBER,U., 1963. Ribonucleic acids in the chloroplasts of the leaf ceil. Planta. Arch. Wiss. Bot. 59(6): 600-616 In: Biological Abstracts 1965.

23.- HOLDGATE,D.P. and T.W.GOODWIN, 1965. Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. Phytochem. 4: 831-843.

24.- HOTTA,Y., A.BASSEL and H.STERN, 1965. Nuclear DNA and cytoplasmic DNA from tissues of higher plants. Jour. Cell. Biol. 27: 451-457.

25.- IMMOLIEV,A.S., 1967. Effect of defoliants on the nucleic acid content of cotton leaves. Uzb. Biol. Zh. 11(1): 21-26 In: Biological Abastracts 1969.

26.- INGLE,J.H., 1963. The extraction and estimation of nucleotids and nucleic acids from plant material. Phytochem 2: 353-370.

27.- INGLE,J.H., 1965. Metabolism changes associated with the germination of corn. Plant Physiol 40(1): 48-53 In: Biological Abstracts 1965.

28.- IWAMURA,I., 1966. In: Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology. ed. by Davidson.J. and W.E. Cohn 5: 133.

29.- KIRBY,K.S., 1964. In: Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology. ed. by New York: Academic Press - 3: 1.

30.- KIRBY, K.S., 1967. Deoxyribonucleic Acids and Cancer In: ----- Methods in Cancer Research, Vol. III Acad. Press. N.Y.

31.- KULAEVA,O.N. and E.A.POPOVA, 1965. Quantitative determination of nucleic acids in leaves. Inst. Plant. Physiol. Acad. Sci. USSR. Moscow. Fiziol. Rast. 12(3): - 558-564. In: Biological Abastracts 1967.

32.- KUNG, S.D., 1968. Isolation of chloroplaste free from nuclear -- DNA contamination. Biochim. Biophys. Acta 169(1): 265.

33.- LAZAR,G., 1969. Fractionation of nucleic acids isolated by the - phenol and DEP methods from leaf tissues at different stages of development. Phytochem. 8(12): —— 2353-2365.

34.- LI,P.H., and C.H.WEISER, 1967. Evaluation of extraction and - assay methods for nucleic acids from red-osier -- dogwood and RNA, DNA and protein changes during cold acclimation. Proc. Amer. Soc. Hor. Sci. 91: 716-727.

35.- MAHLER, H.R., and E.H.CORDES, 1966. Biological Chemistry. Harper Int, Japan.

36.- MAMEDOVA, L.L., 1967. Changes in the nucleic acids in the --- leaves of the olive (Olea europea) during its annual cyclc. Izv. Akad. Nauk. Azerb. Ssr. Ser. Biol. - Nauk. 2: 11-14 In: Biological Abstracts 1969.

37.- MARMUR,J., and D.LANE, 1960. Strand separation and specific - recombination in deoxyribonucleic acids: biological studies. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46: 453.

38.- MARMUR,J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonu-- cleic acid from microorganisms. Jour. Mol. Biol. 3: 208-218.

39.- MARMUR,J., R.ROWRD., and C.L.SCHILDKRAUT, 1963. In: Progress in Nucleic Acid Research. ed. by New York: Academic Press 1: 289.

40.- McCARTHY,B.J., and B.HOYER, 1964. Identity of DNA and diver sity of messenger RNA molecules in normal mouse tissues. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52: 914.

41.- MESELSON,M. and F.STAHL, 1958. The replication of DNA in - Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. --- 44: 671.

42.- MILLIKAN,D.F., 1963. Relation between the length of exposure to alkali and yield of RNA from apple plant-leaf ----- tissue. Nature 200(4905): 470-471.

43.- MILLIKAN, D.F., 1965. Isolation and properties of nucleic acids from soybean leaf tissue Phytochemistry 4(6): 981-983.

44.- NECHAEVA,E.P., 1966. Technique for determination of nucleic acids in young green plants barley and cobbage --- lettuce. Inst. Plant. Physiol. Acad. Sci. USSR. - Moscow.Fiziol. Rast. 13(5): 919-922 In: Biological Abstracts 1967.

45.- NELLANDS.J.B, and P.STUMPF., 1958. Outlines of enzyme - chemistry. ed. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A.

46.- OGUR,M., and G.ROSEN, 1950. The nucleic acid of plant ----- tissues. I.The extraction and estimation of deoxy-pentose nucleic acid and pentose nucleic acid. --- Arch. Biochem. 25: 262-276.

47.- OKHOTNIK,S.G., 1969. Nucleic acid content in the leaves of -- cotton varieties differing in defoliation. Uzb. Biol. Zh. 13(2): 19-21 In: Biological Abstracts 1969.

48.- ONDARZA,R.N., 1968. Biología Moderna. ed. Siglo XXI, México.

49.- POLLARD-CLIFFORD., 1964. The DNA content of purified spi-- nach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 105 (1): 114-119.

50.- RALPH,R.K., and A.R.BELLAMY., 1964. Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids. Biochim. ---- Biophys. Acta. 87: 9-16.

51.- RUPPEL,R.G., 1964. Nucleic acids in chloroplast of Allium --- porrum and Antirrhinun majus. Biochim. Biophys. Acta. 80(1): 63-72.

52.- SATO,S., 1968. Enzymatic maceration of plant tissue. Physiol. Plant. 21: 1067-1075.

53.- SCHMIDT,G., and S.J.THANNHAUSER., 1945. A method for determination of deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. Jour - Biol. Chem. 161: 83-89.

54.- SCHNEIDER,W.C., 1945. Phosphorus compounds in animal ----- tissues. I.Extraction and estimation of deoxyribonucleic acid and of pentose nucleic acid. Jour. Biol. Chem. 161: 293-303.

55.- SERGIEVA,K.A., 1968. The phosphorus metabolism of woody -- plants in relation to their winter hardiness. Tr. Inst.Ekol.Rast.Zhivotn.Ural.Fil.Aked.Nauk.Sssr. 62: 30-36 In: Biological Abstracts 1969.

56.- SELITZKAYA,J.V., 1968. Accumulation of nucleic acids in leaves of oleaginous Perilla in relation to photoperiodic reaction of the plants. Byul. Nauch-Tekh. Inform.Agron. Fiz. 12: 46-50 In: Biological Abstracts 1969.

57.- SERRANO,M., 1967. Nucleic acid content and viability of wheat seeds. Rev. Espan. Fisiol. 23(4): 227-235 In: Biological Abstracts 1969.

58.- SEVAG,M.G., D.B.LACKMAN,J.SMOLENS, 1930. The isolation of the components of streptoccal nucleoproteins in serologically active form. Jour. Biol. Chem. 124: 425.

59.- SPIEGELMAN,S., 1964. Hybrid nucleic acids. Sci. Amer. 210 (5): 48.

60.- STANSLY,P.G., and P.G. SEESE., 1965. Concerning the differential isolation of nucleic acids by phenol. Biochim. Biophys. Acta. 95: 671-674.

61.- STEELE,W.J. and H.BUSCH, 1967. RNA: isolation and fractionation. In: Methods of Cancer Research. III: 65. ed. by Acad. Press. N.Y.

62.- SUEOKA,N., 1961. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: a compilation of old and new data. Jour. Mol. Biol. 3: 31-40.

56.- SELITZKAYA,J.V., 1968. Accumulation of nucleic acids in leaves of oleaginous Perilla in relation to photoperiodic reaction of the plants. Byul. Nauch-Tekh. Inform.Agron. Fiz. 12: 46-50 In: Biological Abstracts 1969.

57.- SERRANO,M., 1967. Nucleic acid content and viability of wheat seeds. Rev. Espan. Fisiol. 23(4): 227-235 In: Biological Abstracts 1969.

58.- SEVAG,M.G., D.B.LACKMAN,J.SMOLENS, 1930. The isolation of the components of streptoccal nucleoproteins in serologically active form. Jour. Biol. Chem. 124: 425.

59.- SPIEGELMAN,S., 1964. Hybrid nucleic acids. Sci. Amer. 210 (5): 48.

60.- STANSLY,P.G., and P.G. SEESE., 1965. Concerning the differential isolation of nucleic acids by phenol. Biochim. Biophys. Acta. 95: 671-674.

61.- STEELE,W.J. and H.BUSCH, 1967. RNA: isolation and fractionation. In: Methods of Cancer Research. III: 65. ed. by Acad. Press. N.Y.

62.- SUEOKA,N., 1961. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: a compilation of old and new data. Jour. Mol. Biol. 3: 31-40.

63.- SUYAMA,Y., and W.D.BONNER Jr., 1966. DNA from plant mitochondria. Plant. Physiol. 41: 383-388.

64.- SYTNIK,K.M., 1968. Nucleic acids in growth zones of maizes -- stalks. Dopov. Akad. Nauk. Ukr. Rsr. 30(8): 760-762 In: Biological Abstracts 1969.

65.- WATSON,J.D., 1965. Molecular Biology of the Gene. ed. W.A. - Benjamín, Inc. New York. p. 257.

66.- WELLS,R. and M.L.BIRNSTIEL, 1967. Buoyant density CsCl in DNA from Vicia faba chloroplasts. Biochem. Jour. 105: 53.

67.- WHITFIELD,R.R., and D.SPENCER., 1968. Buoyant density in - DNA from tobacco and spinach chlroplasts. Bio--- chim. Biophys. Acta. 157: 333.

68.- WILKINS, M. 1970. The Physiology of Plant Growth and Development. Mc Graw-Hill.

69.- WILKINSON,B.R., 1970. Keratin Biosynthesis II Extraction and characterization of nucleic acids from wool roots. Aust. J. Biol. Sci. 23(1): 139-148 In: Biological - Abastracts 1970.

71.- YOLLES,R.S., and G.FREEMAN, 1967. Studies on the depro-- teinization of DNA. Biochim. Biophys. Acta. 138 (3): 506.

72.- ZAITLIN,M. and D.COLTRIN, 1964. Use of pectic enzymes of the nature of incercellular cement of tobacco leaf cells. Plant. Physiol. 39: 91-95.

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.