

2 Ej. No. 77

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO SOBRE LA SINTESIS DE ADN EN LA GERMINACION DE EMBRIONES DE SEMILLAS DE MAIZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

MARIA DE LOURDES MIRANDA HAM

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I. INTRODUCCION.

1.1	Estructura de la semilla de maíz.	1
1.2	Germinación, viabilidad y vigor.	3
1.3	Características de las semillas con bajos porcentajes de viabilidad.	4
1.4	Pérdida de viabilidad y cambios en el ADN.	5
1.4.1	Aberraciones cromosómicas.	6
1.4.2	Daño al ADN.	8
1.5	ADN polimerasas eucariotes. Características y funciones.	12
1.6	ADN polimerasas de plantas.	19
1.7	Inhibidores de las ADN polimerasas eucariotes.	22
1.7.1	Afidicolina.	22
1.7.2	1- β -D-arabinofuranosilcitosina 5'tri-fosfato.	23
1.7.3	Novobiocina.	25

II. OBJETIVO. 26

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1	Materiales.	
3.1.1	Material biológico.	27
3.1.2	Soluciones amortiguadoras y reactivos utilizados.	27
3.2	Métodos.	
3.2.1	Curva de síntesis de ADN.	30
3.2.2	Obtención de extractos proteicos de ejes embrionarios.	32

3.2.3	Determinación de proteínas en los extractos.	33
3.2.4	Obtención del ADN activado.	34
3.2.5	Determinación de la síntesis de ADN <u>in vitro</u> con extractos proteicos.	35
3.2.6	Determinación de patrones de fragmentación del ADN.	36
3.2.7	Ensayo de difenilamina para determinación de ADN.	37
3.2.8	Extracción de ADN marcado de ejes embrionarios.	37
3.2.9	Ensayo de nucleasas en extractos proteicos.	38
IV.	RESULTADOS.	
4.1	Determinación de viabilidad de las semillas utilizadas.	41
4.2	Determinación de curvas de síntesis de ADN.	42
4.3	Determinación de la actividad enzimática (ADN polimerasas) dentro de las primeras 24 horas de germinación.	46
4.4	Determinación de patrones de fragmentación de ADN.	57
4.5	Ensayo de actividad de nucleasas.	59
V.	DISCUSION.	64
VI.	CONCLUSIONES.	69
VII.	BIBLIOGRAFIA.	71

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ara-CTP	1- β -D-arabinofuranosilcitosina 5'-trifosfato
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
ASB	Albúmina de suero bovino
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BND-celulosa	Benzoilnaftoil celulosa
CDP	Citidina 5'-difosfato
cpm	Cuentas por minuto
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCDP	2'-desoxicitidina 5'-difosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil celulosa
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
nov	Novobiocina
PPi	Pirofosfato inorgánico
Tris	(Tris-[hidroximetil]-amino metano)

I. INTRODUCCION.

Los cereales pertenecen a una familia de plantas (Fam. Gramineae), siendo una de sus características más importantes el reproducirse a través de semillas. Las semillas, -- plantas en potencia, presentan estructuras funcionales que las hacen competentes para desarrollar su papel como unidades que transportan el material genético de una generación a otra y están provistas de reservas alimenticias que pueden sostener a una planta joven hasta que se convierte en un -- organismo autosuficiente, autotrófico.

1.1 Estructura de la semilla de maíz.

Las semillas se desarrollan a partir de óvulos fertilizados y presentan tres estructuras básicas: el embrión, la testa o cubierta de la semilla y el endospermo. El embrión se deriva de la fusión de los núcleos de los gametos femenino y masculino. La cubierta o testa se origina de la planta madre y se desarrolla de los integumentos del óvulo. El endospermo procede, al igual que el embrión, del material genético materno y paterno; su núcleo primario proviene de la triple unión de dos núcleos polares con uno de los núcleos masculinos.

Además de las estructuras ya mencionadas, se puede encontrar el perispermo, derivado de la nucela, que en algunas semillas no es más que un estadio incipiente del desarrollo pero en ciertos casos (por ejemplo: Yucca, Coffea) -

este tejido se convierte en la fuente de reservas alimenticias de la semilla.

El grano de maíz maduro está compuesto por tres partes principales: la testa o cubierta de la semilla, el endospermo amiláceo y el embrión, que llegará a ser una nueva planta. Cada una de las tres partes del grano cumple una función definida. La testa, también llamada pericarpio, protege a la semilla, tanto antes como después de la siembra, limitando o impidiendo la entrada de organismos patógenos que podrían invadir el grano. Si el pericarpio resulta dañado, tal vez la germinación se torne más lenta, pues los hongos y las bacterias pueden invadir a la semilla en germinación y utilizar las reservas alimenticias antes del afianzamiento de la plántula.

El endospermo es la principal reserva energética del grano y está compuesto por un 90% de almidón y 7% de proteína con pequeñas cantidades de aceites, minerales y otros componentes químicos. Su función principal consiste en proporcionar nutrimentos a la plántula hasta que sus raíces estén bien afianzadas y sus hojas elaboren carbohidratos en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos de la vida y el crecimiento. En el endospermo, las proteínas se encuentran formando una red córnea en la que están incluidos los gránulos de almidón.

El embrión del grano está formado por el eje embriona-

rio y el escutelo, que constituye una reserva importante de nutrientes para la plántula en crecimiento. El eje embrionario está compuesto del hipocotilo, al que se halla unido el escutelo, la radícula y la plúmula o epicotilo (parte foliar), esbozo embrionario de cinco o seis hojas. El escutelo contiene un alto porcentaje de aceite (35-40%) y sustancias activas e importantes en las etapas iniciales de la germinación.

1.2 Germinación, viabilidad y vigor.

El proceso de germinación lleva eventualmente al desarrollo del embrión hasta una plántula. La germinación de una semilla se puede definir como la sucesión de diferentes etapas que hace que esta semilla inactiva, con un contenido bajo de agua, presente un incremento en sus actividades metabólicas para que se inicie la formación de una plántula a partir del embrión. El momento preciso en que la germinación termina y el crecimiento empieza es muy difícil de diferenciar. Esto se hace más complicado de distinguir pues se dice que una semilla ha germinado cuando una parte del embrión ha perforado la cubierta que la protege; esto es, en realidad, consecuencia del crecimiento.

Para que una semilla pueda germinar, debe ser colocada donde las condiciones del medio ambiente favorezcan este proceso. Entre las condiciones necesarias para la germinación están el suministro adecuado de agua, la temperatura y la

composición gaseosa de la atmósfera apropiadas; así como luz para determinadas semillas. Los requerimientos mencionados - varían para cada especie y variedad y están determinados por las condiciones que prevalecieron durante la formación de la semilla y por factores hereditarios.

Las semillas son resistentes a condiciones externas extremas, si se hallan en estado de desecación. Por esto, las semillas pueden mantener su capacidad de germinar o viabilidad - si se les da agua y el medio ambiente adecuado para -- su reactivación -, durante largos períodos. El período durante el cual una semilla puede permanecer viable es extremadamente variable y depende de las condiciones de almacenamiento y del tipo de semilla que se trate. Generalmente, la viabilidad permanece más o menos constante bajo condiciones en las que la actividad metabólica de las semillas se halla muy reducida; pero aún en estas condiciones, se presentan pérdidas en su viabilidad y vigor. El vigor de una semilla se puede describir como la condición en que se encuentra a la semilla en el máximo de sus capacidades potenciales para germinar satisfactoriamente en un rango amplio de condiciones ambientales, utilizando sus reservas alimenticias adecuadamente para formar una plántula que crezca normalmente.

1.3 Características de las semillas con bajos porcentajes de viabilidad.

Las semillas con bajos porcentajes de viabilidad mues-

tran fallas en el acoplamiento respiratorio, pérdida en la actividad de algunas enzimas tales como las deshidrogenasas (Lakon, 1949) y las transferasas dependientes de GTP (Roberts y Osborne, 1973; Dell'Aquila et al, 1976; Bray y Chow, 1976a), desensamblaje de ribosomas (Bray y Chow, 1976b; Roberts et al, 1973) y pérdida de ARN poli A⁺. Además se ha demostrado que a nivel transcripcional, la síntesis de todas las clases de ARN está deteriorada y el procesamiento de precursores de ARNr a ARNr maduros se demora (cebada: Van Onckelen et al, 1974; centeno: Sen y Osborne, 1977; ejes embrionarios de chícharo: Bray y Dasgupta, 1976).

La pérdida de viabilidad se haya también asociada con un descenso drástico en la actividad de síntesis de proteínas, que puede atribuirse a degradación de ARNm y reducción de la actividad del factor de elongación EF-1 (eukaryotic elongation factor 1) (Peumans y Carlier, 1981).

1.4 Pérdida de viabilidad y cambios en el ADN.

El material genético de una semilla al envejecer en forma natural o inducida, muestra cambios que son pasados por alto por los sistemas de reparación por lo que se hacen permanentes. Estos cambios pueden ser de dos tipos: a nivel molecular, es decir mutaciones génicas o puntuales o bien cambios microscópicos que afecten el número y/o arreglo de los lugares (loci) de los genes; estos últimos también son llamados aberraciones cromosómicas.

El daño al ADN puede reflejarse no sólo en forma de mutaciones sino también en cambios en su integridad y propiedades físicas o químicas. Es por esto que una aberración cromosómica implica daño al ADN pero el daño a esta macromolécula no es necesariamente una aberración cromosómica.

1.4.1 Aberraciones cromosómicas.

El daño a los cromosomas ocurre y se acumula en las semillas durante el almacenamiento. Esta evidencia se deriva de tres tipos de observaciones: 1) examen de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, en especial en las primeras mitosis de los meristemas de las raíces de semillas A_1^* en germinación, 2) examen de la frecuencia de aborción de polen producido por plantas A_1 y 3) el examen de las variaciones fenotípicas en plantas A_2 y A_3 .

En 1901, De Vries fue el primero en indicar que un cambio en el ADN podría ser la causa de bajos porcentajes de germinación y de la gran proporción de plantas morfológicamente anormales generadas de semillas de Oenothera lamarckiana que fueron almacenadas largo tiempo, es decir, semillas de baja viabilidad.

* Se ha designado a las semillas que han recibido un tratamiento de envejecimiento y a las plantas que se generan de ellas, generación A_1 ; las generaciones subsecuentes se designan A_2 , A_3 .

Navashin en 1933 observó que se producen aberraciones cromosómicas muy frecuentes en las raíces producidas de semillas envejecidas. Otros investigadores han encontrado un comportamiento similar al aumentar la edad de las semillas en varias especies: Allium cepa (Nichols, 1941; Sax y Sax, 1964), Triticum durum, T. aestivum, Secale cereale y Pisum sativum (Gunthardt et al, 1953).

Se han realizado investigaciones con chícharos, habas y cebada en que se trataba a las semillas con varias combinaciones de temperatura y humedad que producían diferentes proporciones de pérdida de viabilidad y se observaba la acumulación de daño a los cromosomas por exámenes citológicos durante las primeras divisiones de los meristemas de las raíces, siendo observado el daño más fácilmente durante la anafase.

Roberts y Abdalla (1968) encontraron que hay aumento en el daño cromosómico al aumentar el período de tratamiento y que si el tratamiento llevaba a la rápida pérdida de viabilidad, había también una rápida acumulación de aberraciones.

En plantas, las aberraciones cromosómicas disminuyen en cantidad en ciclos celulares progresivos en los meristemas de las raíces de cebolla que están germinando (Nichols, 1941).

Las semillas en estado latente mantenidas imbibidas -

(las cuales tienen un alto porcentaje de humedad) muestran una incidencia baja de aberraciones cromosómicas, comparadas con aquellas que han sido almacenadas secas, lo que sugiere que se lleva a cabo un proceso reparativo en embriones imbibidos (Villiers, 1974).

1.4.2 Daño al ADN.

Berjack y Villiers en 1972 informaron que embriones envejecidos de maíz fueron capaces de germinar después de un tiempo y sugirieron que los embriones con estructuras macromoleculares dañadas podían recuperar sus funciones metabólicas durante las primeras horas de germinación.

Osborne y colaboradores (1980/81) observaron que durante el almacenamiento de embriones de centeno, los niveles totales de ARN, ADN y proteínas permanecían constantes. Sin embargo, la integridad de las macromoléculas mencionadas podía no mantenerse durante el período de envejecimiento. Por ejemplo, se observó que la cantidad total de ADN permanece constante tanto por procedimientos de extracción química -- como por estimación del contenido de ADN en núcleos teñidos por Feulgen en preparaciones fijas. No obstante, la baja recuperación de ADN de alto peso molecular usando la técnica de Marmur (1961) indicaba que la ruptura de las moléculas de ADN a fragmentos de bajo peso molecular ocurre sin pérdida total de ADN.

Con el fin de demostrar la existencia de fragmentos de

ADN de bajo peso molecular en embriones de centeno no viables, Cheah y Osborne (1978) centrifugaron ADN, aislado por la técnica de Marmur, en gradientes neutros de sacarosa. El ADN de doble cadena de los embriones no viables se presentaba como una población homogénea de bajo peso molecular, en comparación con el ADN extraído en condiciones semejantes de embriones viables.

Esto sugería que la pérdida de integridad del material genético se llevaba a cabo durante la disminución de la viabilidad pero no excluía la posibilidad de ruptura del ADN durante la manipulación. Esta dificultad podía ser superada aislando células completas y lisándolas sobre un gradiente alcalino de sacarosa. El ADN así liberado presentaría una mínima cantidad de cortes. En las plantas, la lisis directa de las células no es posible, debido a la presencia de la pared celular; por lo que primero se aislaron los núcleos y se lisaron en el gradiente. Los perfiles encontrados (Figura 1) muestran que los embriones de baja viabilidad poseen una proporción mayor de fragmentos de bajo peso molecular que los embriones viables.

En esta evidencia y en experimentos que demuestran la marcada incidencia de cortes de cadena sencilla in situ en embriones no viables, se basan para afirmar que durante la pérdida de viabilidad en el estado seco ocurren cortes in vivo en el ADN nuclear. Esta pérdida de integridad se debe

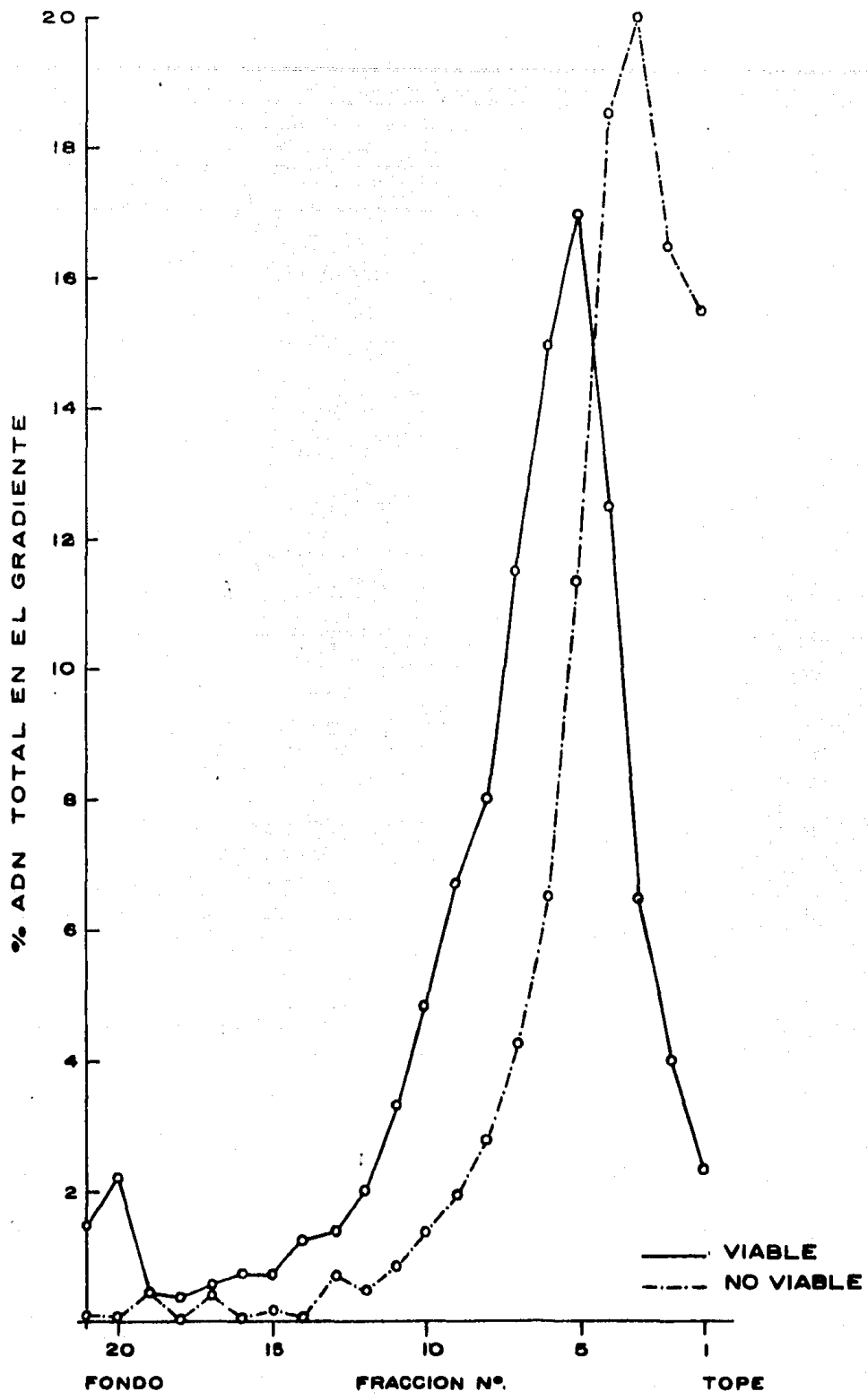


FIGURA 1 FRACCIONAMIENTO DE ADN DE NUCLEOS AISLADOS DE EMBRIONES DE CENTENO.- (CHEAH Y OSBORNE, 1978)

a la acción lenta pero progresiva de endodesoxirribonucleasas, más que a exonucleasas, que pudieran estar localizadas en el núcleo, como se ha encontrado en núcleos de levadura y en células de mamíferos.

La reparación parece ser improbable durante el almacenamiento de las semillas secas y la acumulación de cortes en el ADN podría llegar a un nivel tal que no pudiera ser reparado durante la germinación.

Se sugiere la existencia de una fase larga de activación de procesos bioquímicos que estén asociados con la síntesis de ADN antes de la primera división celular en los embriones de trigo de baja viabilidad. Estos procesos incluyen la eliminación de inhibidores, síntesis y/o activación de algunas enzimas involucradas directamente con la polimerización del ADN y la disponibilidad de un molde activo (Mo^{ry} et al, 1972).

En estudios hechos con semillas secas expuestas a dosis bajas de irradiación (Villiers y Edgecumbe, 1975; Tano y Yamaguchi, 1977) se encontró que éstas, a semejanza de las de baja viabilidad, pueden sobrevivir y llegar a formar plantas normales, siendo la germinación lenta en ambos casos. Este retardo de la primera fase de germinación puede atribuirse a pérdida de integridad y de actividad del molde de ADN.

Osborne y colaboradores (1980/81) han encontrado que a mayores dosis de irradiación dada a los embriones secos de

centeno eran mayores sus proporciones de incorporación de [³H-metil]timidina al ADN durante las primeras horas de imbibición (durante el período previo a la síntesis replicativa del ADN) (Figura 2). Después se fraccionó el ADN marcado por cromatografía en BND-celulosa, hallándose que durante el período pre-replicativo 0-2 h de imbibición, la mayor parte de la radiactividad eluye como ADN de doble cadena o ADN "reparado"; en comparación con el período 5-7 h donde la radiactividad se presenta como ADN de cadena sencilla o ADN "replicativo".

De lo anterior, Osborne et al concluyen que el proceso de tipo reparativo que se presenta durante las primeras horas de imbibición ocurre como un evento normal en los embriones de centeno.

1.5 ADN polimerasas eucariotes. Características y funciones.

Es evidente de lo anterior que la maquinaria de síntesis y reparación del ADN tiene una función fundamental en el mantenimiento de la viabilidad de las semillas; es por ello que algunos investigadores se han avocado a su estudio, en especial el de las polimerasas en células vegetales con actividades semejantes a las ADN polimerasas α y β en vertebrados, cuyas funciones las hacen candidatos probables, en células vegetales, para mantener la integridad del ADN y por tanto, la viabilidad de las semillas.

Las ADN polimerasas dependientes de ADN catalizan la -

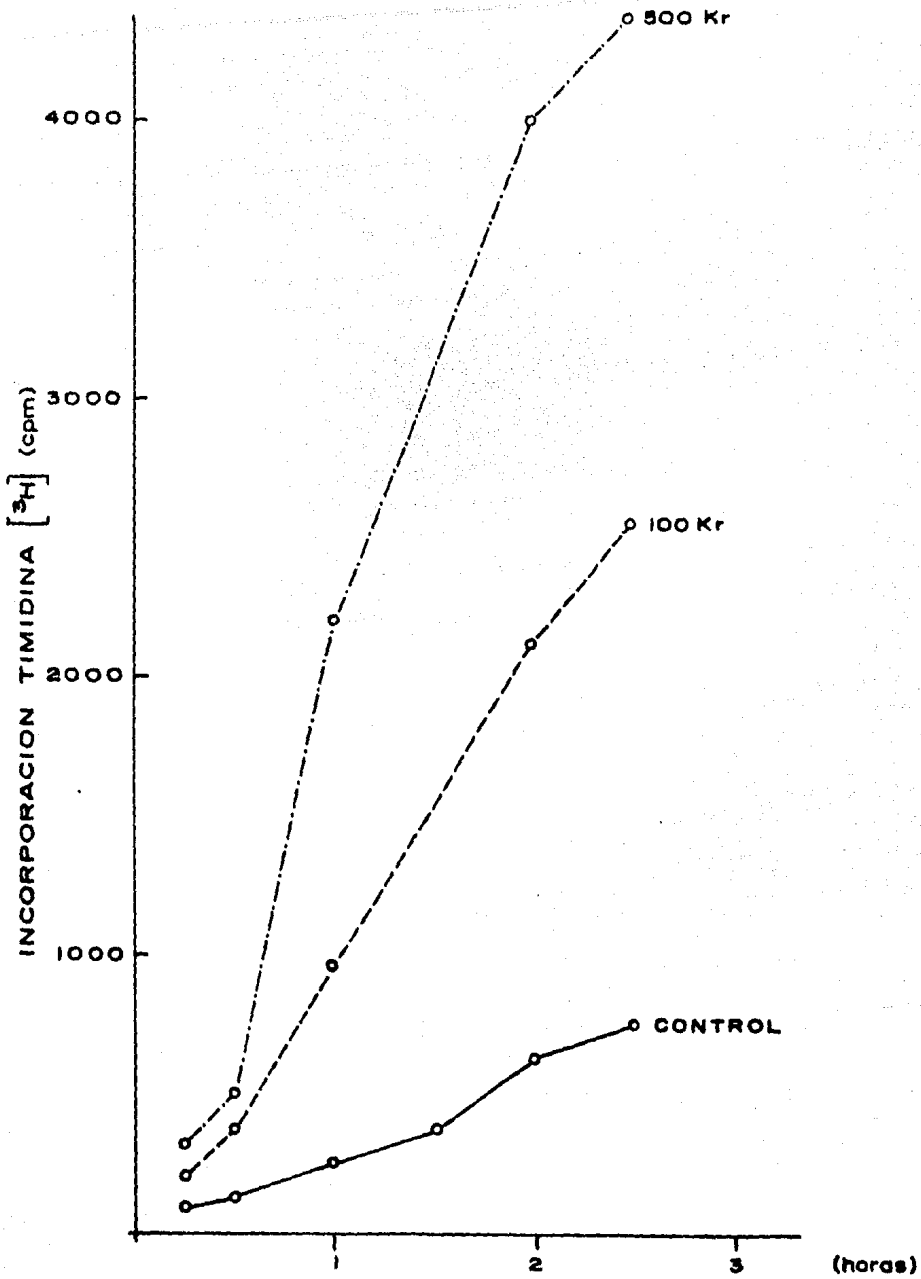
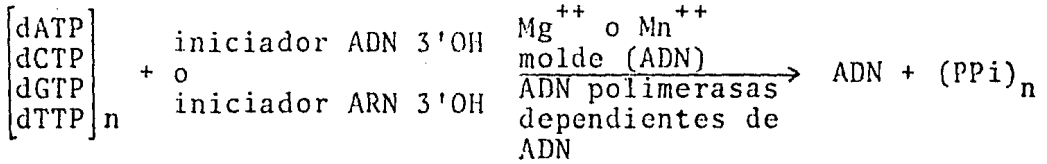


FIGURA 2 INCORPORACION DE TIMIDINA $[^3\text{H}]$ AL ADN DE EMBRIONES NO IRRADIADOS Y δ -IRRADIADOS.
(OSBORNE ET AL, 1980/81)

síntesis de ADN a partir de los desoxirribonucleótidos. Se requieren: un iniciador, que puede ser ADN o ARN, que contenga un extremo 3' hidroxilo libre, un molde (ADN) y cationes divalentes.



El ADN es replicado de forma semiconservativa en cada cadena que sirve como molde para que una nueva cadena de ADN sea sintetizada en forma complementaria y antiparalela en la dirección 5' → 3'. Los desoxirribonucleótidos se unen covalentemente por uniones fosfodiéster 3' → 5', por lo que se libera pirofosfato inorgánico en el proceso.

Las ADN polimerasas representan sólo un componente de la compleja maquinaria involucrada en la replicación del ADN. En procariotes ha sido posible identificar los diferentes elementos que llevan a cabo este proceso, mientras que en eucariotes, la identificación de proteínas accesorias, cofactores y estructuras replicativas del ADN en el complejo replicativo está aún en sus primeras fases; aunque es indudable que el aparato de replicación del ADN en eucariotes contiene ADN ligasa, endonucleasas, exonucleasas, ARN polimerasas y proteínas estructurales en la cromatina.

Las células de animales vertebrados, en especial de mamíferos, contienen tres distintas ADN polimerasas dependientes de ADN en diferentes proporciones relativas en estas cé

lulas, que han sido designadas con letras griegas (α , β y γ).

La ADN polimerasa α fue la primera de las ADN polimerasas de mamíferos en ser parcialmente purificada y estudiada (Bollum, 1960). Parece ser ubicua en células en crecimiento y ha sido hallada en células de timo de ternera (Yoneda y Bollum, 1965), humanas (Sedwick et al, 1975) y hámster (Craig y Keir, 1975), en erizos de mar (Loeb, 1969) y levadura (Wintersberger y Wintersberger, 1970), entre otros. Se han reportado pesos moleculares desde 70,000 hasta un millón con valores de sedimentación entre 5-12 S para varias especies.

Se creía que se encontraba libre en el citoplasma pues al extraerla por procedimientos acuosos, la mayor parte de su actividad se detectaba en este sitio pero al utilizar técnicas no acuosas con disolventes orgánicos, se encontraba que del 85 al 90% de su actividad se detectaba en el núcleo. Es probable que su localización intracelular in vivo esté en el núcleo aunque pudiera encontrarse en cantidades discretas en el citoplasma.

Una propiedad característica de esta enzima es su sensibilidad a sustancias que bloquean los grupos sulfhidrilo, tales como p-hidroximercuribenzoato y N-etilmaleimida. La enzima es inhibida también por concentraciones de sales superiores a 25 mM y depende de un catión divalente como Mg^{++}

o Mn^{++} . Ni la enzima de timo de ternera ni la humana poseen actividades nucleolíticas asociadas; posee punto isoeléctrico ácido.

La polimerasa α fue relacionada primero con la replicación por Chang y Bollum (1973) que mostraron que existía un incremento marcado en el nivel de esta enzima cuando se estimulaban células para su replicación. Esto se ve apoyado por las pruebas hechas con 2',3'-didesoxitimidina 5'trifosfato (ddTTP) y afidicolina en células en fase S, que es cuando se replica el ADN. El ddTTP es capaz de inhibir las actividades de ADN polimerasas β y δ , por tanto no anula el proceso; mientras que la afidicolina que es un inhibidor específico de la ADN polimerasa α , detiene completamente la replicación.

La ADN polimerasa α se encuentra en las células en dos, tres o más formas heterogéneas, que han sido identificadas en células de múridos, HeLa y de timo de ternera. -- Estas formas difieren en sus propiedades de unión a DEAE-celulosa y fosfocelulosa, su utilización de moldes, su inhibición por N-etilmaleimida, afidicolina y 1- β -D-arabino furanosilcitosina 5'trifosfato (ara-CTP) y su sensibilidad a temperatura. Se sugiere que estas isoenzimas o tipos de ADN polimerasa α tengan actividades especializadas en la replicación y la reparación del daño causado por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, N-nitrosometil urea e irradiación con luz ultravioleta (Weissbach, 1979; Miller y Chinnault, 1982).

La ADN polimerasa β se encuentra en menor cantidad -- (generalmente menos del 10% de la actividad total de ADN polimerasas en tejidos o células en período proliferativo). Es una enzima de bajo peso molecular ($<5 \times 10^4$) con un coeficiente de sedimentación entre 3-4 S. La polimerasa β no requiere de grupos sulfhidrilo y no es inhibida por concentraciones bajas de p-cloromercuribenzoato, que inhibirían completamente a la polimerasa α . Posee una gran resistencia a agentes químicos como ácido fosfonoacético, urea 5 M, alcohol 20-25% o acetona y es estable en solución a pH 4.5 hasta 10.5. Tiene punto isoeléctrico básico y es estimulada por concentraciones altas de sales, pero su actividad disminuye en presencia de fosfatos. La enzima purificada está libre de actividad nucleolítica y no lleva a cabo intercambio de pirofosfato.

Esta enzima utiliza moldes de polidesoxirribonucleótidos como poli(dA) o poli(dC) de manera más eficiente que -- los polirribonucleótidos correspondientes, poli(A) o poli(C). Se considera que se encuentra solamente en el núcleo o asociada a la cromatina.

Se ha asignado a la ADN polimerasa β la función de reparación del ADN pues sus niveles parecen no ser afectados por las variaciones en el crecimiento celular y por permanecer constante durante el ciclo de vida de las células de mamíferos. Bertazzoni y colaboradores (1976) sugirieron que esta enzima lleva a cabo síntesis de tipo reparativo en lin

focitos humanos que han sido irradiados con luz ultravioleta; así como Hübscher et al (1979) han demostrado una actividad similar de esta enzima en núcleos neuronales tratados con luz ultravioleta.

La polimerasa β puede catalizar la reparación de cortes inducidos por bleomicina y neocarzinostatina (Coetzee et al, 1978; Miller y Chinault, 1982).

La ADN polimerasa γ presenta naturaleza heterogénea - cuando se aísla y presenta alto peso molecular ($>1 \times 10^5$) y coeficientes de sedimentación entre 4-11 S. La enzima aislada de tejidos humanos y de embriones de trigo muestra preferencia por ribohomopolímeros sintéticos, en lugar de ADN -- sintético o natural. Al igual que la polimerasa α , la polimerasa γ es inhibida por N-etilmaleimida y posee punto - isoeléctrico ácido.

Esta polimerasa representa entre 1-2% del total de ADN polimerasas en células de vertebrados y generalmente se encuentra en las fracciones citoplásmicas.

La polimerasa γ es la enzima encargada de la replicación del ADN mitocondrial en células animales (Hübscher et al, 1979) y está involucrada en la replicación del ADN del adenovirus por síntesis por remoción de cadena (rolling circle).

1.6 ADN polimerasas de plantas.

Hay poca información disponible acerca de las ADN polimerasas en plantas; sin embargo, se ha extraído actividad de ADN polimerasa de algunas plantas (McLennan y Keir, 1977; Srivastava y Grace, 1974) y se han realizado caracterizaciones de las enzimas en algunos casos: Triticum aestivum (Castroviejo et al, 1975; Mory et al, 1975; Tarragó-Litvak et al, 1975), Catharantus roseus (Gardner y Kado, 1976) y Pisum sativum L. (Stevens y Bryant, 1978).

Las células vegetales parecen contener dos ADN polimerasas de alto peso molecular con algunas de las propiedades enzimáticas de las ADN polimerasas α y γ de vertebrados, pero generalmente no se ha detectado una enzima análoga a la ADN polimerasa β (Chang, 1976; Gardner y Kado, 1976). Algunos autores sugieren la existencia de una actividad de ADN polimerasa en plantas que comparte algunas de las propiedades de la polimerasa β , en Nicotiana tabacum (Srivastava y Grace, 1974) y en Pisum sativum L. (Stevens y Bryant, 1978).

La ADN polimerasa parecida a la α es la más abundante en células vegetales cultivadas, mientras que la parecida a la polimerasa γ está presente en cloroplastos (Amileni et al, 1979).

Poco se sabe de las ADN polimerasas de los diferentes organelos que actúan en la replicación de los genomas de mi

tocondria y cloroplasto; sin embargo, se asume que estas enzimas son distintas de las que intervienen en la replicación y reparación del ADN nuclear.

Algunas de las características de las ADN polimerasas aisladas de T. aestivum y de Catharantus roseus se muestran en la tabla I.

La ADN polimerasa A de trigo utiliza eficientemente un ribohomopolímero como molde; mientras que la ADN polimerasa B lo utiliza deficientemente. La de tipo A comparte algunas de las características de la polimerasa γ de vertebrados pero el nivel de enzima es mucho mayor (30-40% del total); por su parte, la B posee algunas de las propiedades de la polimerasa α .

La polimerasa de Catharantus roseus posee algunas de las características similares a la de tipo B y a la polimerasa α .

Las plantas parecen contener múltiples ADN polimerasas solubles y unidas a cromatina. Generalmente, estas enzimas están relacionadas con las polimerasas α o γ .

En trigo, las ADN polimerasas están casi exclusivamente localizadas en el citoplasma, pero al inicio de la germinación son transportadas al núcleo donde se activan para la replicación del ADN (Castroviejo et al, 1975).

TABLA I
PROPIEDADES DE ALGUNAS ADN POLIMERASAS*

	MAMIFEROS			<u>T. aestivum</u>		<u>Catharantus roseus</u>
	α	β	γ	A	B	
P.M.	140000-175000	27000-45000	60000-110000	150000	110000	105000
SUBUNIDADES	1-2	1-2	1	ND	ND	2
PUNTO ISOELÉCTRICO	6	9	6	ND	ND	6.8
pH ÓPTIMO	7-7.5	8-9	8-9	8	7	7.5
FUERZA IÓNICA ÓPTIMA	25 mM NaCl	100-200 mM KCl	100-300 mM KCl	0-200 mM KCl	25 mM KCl	50-200 mM KCl
INHIBICIÓN POR N-ETILMALEIMIDA	+	-	+	+	+	+
ACTIVIDAD EXONUCLEOLÍTICA	-	-	-	ND	ND	+

ND - NO DETERMINADO

* Guilfoyle, 1981.

1.7 Inhibidores de las ADN polimerasas eucariotes.

Los inhibidores de las diferentes ADN polimerasas han sido útiles para asignarles funciones a estas enzimas dentro del proceso de síntesis de ADN; por consiguiente, resulta importante conocer su modo de actuar y sus efectos en las células sobre las que ejercen su acción.

1.7.1 Afidicolina.

La afidicolina es un diterpeno tetraol tetracíclico -- producido por el hongo Cephalosporium aphidicola (Brundret et al, 1972) que inhibe la replicación del ADN nuclear y viral en células animales (Pedrali-Noy y Spadari, 1979; Huber mann, 1981; Ikegami et al, 1978). La droga interfiere específicamente con la ADN polimerasa α de células animales -- (Hübscher et al, 1979; Weissbach, 1977) o con la polimerasa inducida por virus; sin afectar la síntesis de ADN en los organelos, ni la síntesis reparativa (Coetzee et al, 1978; Geuskens et al, 1981; Giulotto y Mondello, 1981; Hardt et al, 1981).

La afidicolina inhibe la actividad de la ADN polimerasa parecida a la α purificada de células de arroz (Amileni et al, 1979; Sala et al, 1980), pero no actúa sobre la parecida a la ADN polimerasa γ (Geuskens et al, 1981; Sala et al, 1981).

La inhibición es competitiva con respecto a dCTP y no competitiva con dGTP, dATP y dTTP, por lo que la droga reco

noce una porción específica del sitio activo de la enzima - que es único en estas proteínas. El sitio de unión probablemente esté cerca o tal vez, esté traslapado con el sitio de unión para dCTP pues se observa que hay interacción competitiva entre afidicolina y dCTP.

En algunos reportes, se ha sugerido que no existe inhibición por afidicolina de la síntesis reparativa del daño - inferido por luz ultravioleta (Giulotto y Mondello, 1981; - Hardt et al, 1981; Sala et al, 1982). Sin embargo, hay otros estudios que reportan que la afidicolina inhibe la síntesis reparativa del daño inducido por agentes alquilantes como - N-nitrosometil urea e irradiación por luz ultravioleta (Hanaoka et al, 1979; Berger et al, 1979; Miller y Chinault, - 1982) y que se acumulan cortes en el ADN relacionados con - la reparación por excisión (Snyder y Regan, 1981; Collins et al, 1982). Los resultados conflictivos reportados en células de mamíferos pueden deberse parcialmente a la variedad de sistemas (células íntegras, células permeabilizadas, preparaciones nucleares) y a los tipos celulares usados (normales, transformadas, humanas, de roedores) o pueden indicar que la polimerasa α está involucrada de diferente manera - en los procesos relacionados con el ADN en diferentes tipos celulares.

1.7.2 1- β -D-arabinofuranosilcitosina 5'-trifosfato (ara-CTP).

Se han propuesto tres hipótesis acerca del modo de acción de ara-CTP: 1) Esta droga impide la conversión de CDP

a dCDP, inhibiendo la actividad de la ribonucleótido reductasa (Moore y Cohen, 1967), 2) Ara-CTP se incorpora al ADN provocando la terminación de la elongación de la cadena -- (Mompalmer, 1972) y 3) Ara-CTP inhibe la síntesis del ADN - al unirse al sitio activo de la ADN polimerasa α ; la inhibición es competitiva con dCTP (Furth y Cohen, 1968; Schrecker et al, 1974).

Como ara-CTP es citotóxico específicamente durante la fase S del ciclo celular durante el cual se lleva a cabo la replicación, la inhibición de la polimerasa α por esta droga se ha tomado como indicador de su función replicativa -- (Frindland, 1977).

Se ha observado que ara-CTP interrumpe la reparación - por excisión del ADN en células de mamíferos; los cortes hechos por la endonucleasa de reparación se acumulan en presencia de esta droga pues se bloquea la síntesis reparativa por inhibición de la polimerasa α y la ligadura de fragmentos (Collins et al, 1977; Hiss y Preston, 1977; Collins et al, 1982).

Waters y colaboradores (1981) sugirieron que el modo de acción de ara-CTP en el bloqueo de la síntesis semiconservativa y en la de tipo reparativo sea similar al de afidicolina, bloqueando la actividad de la ADN polimerasa α en células irradiadas con rayos X y fibroblastos de pacientes con xeroderma pigmentosum.

1.7.3 Novobiocina.

La novobiocina tiene un efecto significativo sobre la síntesis replicativa y reparativa del ADN. Originalmente, se observó que la novobiocina tenía un efecto específico sobre topoisomerasas de tipo II. Actualmente, se ha visto que la novobiocina tiene un efecto inhibitorio directo sobre la ADN polimerasa α , deteniendo inmediata y completamente la síntesis del ADN (Burke et al, 1979; Nishio y Uyeki, 1982).

La inhibición de la incorporación debida a reparación por novobiocina es una consecuencia de su habilidad para impedir la incisión enzimática en los sitios en que el ADN está dañado (Collins y Johnson, 1979; Collins et al, 1982).

Nishio y Uyeki (1982) sugieren la existencia de una girasa o topoisomerasa de tipo II en células de ratones basados en sus observaciones: 1) la síntesis de ADN no fue sensible solamente a novobiocina sino también a ácido nalidíxico, 2) ATP antagoniza el efecto de novobiocina pero no el de ácido nalidíxico (en procariotes, la novobiocina se une a la subunidad B de la girasa compitiendo con el ATP) y 3) el efecto inhibitorio de la novobiocina excede el de afidicolina y de N-etilmaleimida, por lo que el efecto de novobiocina no puede ser explicado en base a su interacción con la ADN polimerasa α solamente.

II. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fue detectar si existe o no un incremento en la síntesis temprana de ADN en ejes embrionarios de semillas de maíz de baja viabilidad, como una posible indicación del daño que ha sufrido el ADN durante la pérdida de viabilidad de las semillas, así como tratar de determinar el tipo de síntesis, ya sea replicativa o reparativa, que se llevó a cabo durante las primeras horas de germinación.

Para desarrollar este objetivo, se planteó la siguiente secuencia de trabajo:

1. Detectar si existe o no un incremento en la síntesis temprana de ADN en los ejes embrionarios de semillas de maíz de baja viabilidad.

2. Establecer el tipo de síntesis que se ha llevado a cabo durante las primeras horas de germinación, usando inhibidores de la replicación del ADN como afidicolina, 1- β -D-arabinofuranosilcitosina 5'trifosfato (ara-CTP) y novobiocina.

3. Empleando gradientes alcalinos de sacarosa, determinar los patrones de fragmentación del ADN de los ejes embrionarios de alta y baja viabilidad para observar el grado de integridad del material genético.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Materiales.

3.1.1 Material biológico.

Las muestras de maíz denominado Chalqueño procedían de las cosechas de 1980 y 1982. El maíz fue adquirido en PRONASE (Productora Nacional de Semillas, SARH).

Las semillas se mantuvieron en frascos de vidrio cerrados.

3.1.2 Soluciones amortiguadoras y reactivos utilizados.

3.1.2.1 Solución amortiguadora de imbibición.

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
KCl		50 mM
MgCl ₂		10 mM
Sacarosa		2%
Cloranfenicol		50 µg/ml

3.1.2.2 Líquido de centelleo.

(1,4-bis[2-(5 Feniloxazolil)])- benceno (M ₂ POPOP)	0.1 g
2,5 Difeniloxazol (PPO)	5.0 g
Tolueno	1 l

3.1.2.3 Solución amortiguadora A para obtención de extractos proteicos.

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
KCl		25 mM
MgCl ₂		1 mM

2-Mercaptoetanol	1 mM
Sacarosa	0.25 M
Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF)	5 mM

3.1.2.4 Solución amortiguadora de diálisis I para extractos proteicos.

Tris-HCl pH 7.6	50 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
Glicerol	9.25%
2-Mercaptoetanol	1 mM

3.1.2.5 Reactivo A para la determinación de proteínas en los extractos.

Se mezclan partes iguales de Agua, NaOH 0.8 N, Dodecil sulfato de sodio 10% y solución base de Cobre-Tartrato-Carbonato (CTC).

Solución CTC.

Na ₂ CO ₃	10%
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1%
Tartrato de sodio y potasio	0.2%

3.1.2.6 Reactivo B para la determinación de proteínas en los extractos.

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1 volumen
Agua	5 volúmenes

3.1.2.7 Solución amortiguadora para la activación de ADN.

Albúmina de suero bovino	0.5 mg
MgCl ₂	0.47 mg
Tris-HCl pH 7.5	6.05 mg
Volumen final: 1 ml	

3.1.2.8 Solución amortiguadora B para síntesis de ADN in vitro con extractos proteicos.

Tris-HCl pH 7.6	25 mM
MgCl ₂	4.4 mM
KCl	16 mM
dATP, dCTP y dGTP	0.1 mM
ATP	1 mM
Glicerol	4%
2-Mercaptoetanol	0.4 mM
ADN activado de timo de ternera	50 µg/250 µl

3.1.2.9 Solución amortiguadora C.

Tris-HCl pH 7.4	15 mM
KCl	10 mM
NaCl	15 mM
Sacarosa	0.3 M
2-Mercaptoetanol	15 mM
Espermina	0.15 mM
Espermidina	0.5 mM

3.1.2.10 Capa de Lisis (pH ~ 13)

NaCl	0.4 M
EDTA	10 mM
NaOH	0.15 M

3.1.2.11 Solución amortiguadora de los gradientes de sacarosa (pH ~13).

NaCl	0.7 M
EDTA	10 mM
NaOH	0.3 M

3.1.2.12 Solución amortiguadora de diálisis II para ADN marcado.

Tris-acetato pH 7.8	40 mM
Acetato de sodio	20 mM
EDTA	5 mM

3.1.2.13 Solución amortiguadora D para ensayo de nucleasas.

Tris-HCl pH 7.0	25 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	10 mM
Glicerol	4%
2-Mercaptoetanol	0.5 mM

3.2 Métodos.

3.2.1 Curva de síntesis de ADN.

3.2.1.1 Imbibición de ejes embrionarios.

Lotes de 10 ejes embrionarios de maíz fueron pesados y desinfectados con NaClO (0.5%) por treinta segundos y a continuación, lavados extensivamente con agua desionizada estéril.

Las muestras de 10 ejes embrionarios se colocaron entre dos discos de papel filtro estériles en tubos de cultivo o frascos estériles. Se humedecieron con solución amortiguadora de imbibición (3.1.2.1), a la que se agregó el precursor radiactivo, timidina [^3H] (5 $\mu\text{Ci/ml}$). Las muestras se incubaron por diferentes períodos a 27°C.

Al concluir el tiempo de incubación, los ejes embrionarios se lavaron con citrato de sodio (1%, 10 ml), que contenía 20 $\mu\text{g/ml}$ de timidina no radiactiva y después, con etanol (80%, 10 ml), que también contenía 20 $\mu\text{g/ml}$ de timidina no radiactiva. Se secó el exceso de líquido presionándolos ligeramente en papel filtro e inmediatamente se pesaron.

Cuando los ejes embrionarios no se procesaban en ese momento, se guardaban en tubos de ensayo (16 x 150 mm) a -70°C.

3.2.1.2 Procesamiento.

Se añadió etanol (80%, 1.5 ml), que contenía 20 $\mu\text{g/ml}$ de timidina no radiactiva a cada una de las muestras; homogenizándolas en Polytron durante treinta segundos al máximo de revoluciones. La homogenización debe hacerse en frío y debe cuidarse que no queden pedazos enteros de ejes. Se centrifugaron a 3000 rpm durante diez minutos.

El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió con NaOH (1 M, 0.5 ml), caléntandose en baño María a 90°C durante tres minutos. Se dejó enfriar lentamente y se

añadió ácido tricloroacético (10%, 2 ml), permaneciendo luego en hielo quince minutos.

Se filtró por Millipore en filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio; lavándolos, primero con ácido tricloroacético (5%, 5 ml) y en seguida con etanol (96%, 5 ml).

Los filtros se secaron en horno a 60°C por una hora. Una vez que estuvieron secos, se transfirieron a frascos que contenían líquido de centelleo (3.1.2.2, 5 ml) y se determinaron las cuentas por minuto en un contador de centelleo Packard, Tri-Carb.

En el caso de ejes embrionarios irradiados con luz ultravioleta de onda corta (254 nm), los ejes se imbibieron durante una hora siguiendo la técnica ya descrita. Al finalizar el tiempo de incubación, se secó el exceso de humedad con papel filtro y se irradiaron durante diez minutos, colocándose la lámpara (Mineralight Lamp; Short wave UV 254 nm, model UVS-11) a diez centímetros de altura (Dosis: 552 J/m²). Luego se volvieron a incubar los ejes embrionarios hasta completar los períodos establecidos (técnica descrita en 3.2.1.1).

En ambos casos, se muestra el resultado del mejor experimento que muestra la tendencia de varios experimentos similares.

3.2.2 Obtención de extractos proteicos de ejes embrionarios.

Los ejes embrionarios recibieron el tratamiento reque-

rido según los objetivos del experimento (imbibición a diferentes tiempos o irradiación e imbibición).

A veinte ejes embrionarios se les añadió solución amortiguadora A (3.1.2.3, 3 ml) y se les homogenizó perfectamente en mortero, previamente enfriado por cinco minutos a -70°C .

El homogenado se centrifugó dos veces a $10,000 \times g$ durante quince minutos y el sobrenadante se centrifugó a $100,000 \times g$ ($39,000 \text{ rpm}$, rotor 40) por dos horas.

El sobrenadante se dializó toda la noche contra solución amortiguadora de diálisis I (ver 3.1.2.4). El dializado se centrifugó a $10,000 \times g$ durante veinte minutos y el sobrenadante se usó como fuente de enzima.

3.2.3 Determinación de proteínas en los extractos.

Se siguió la técnica de Lowry modificada (Peterson, 1977).

Se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovino (ASB). Para ello, se preparó una solución de ASB, 1 mg/ml , empleando como disolvente agua desionizada.

Se tomaron alícuotas de la solución de ASB (1 mg/ml) y se completó el volumen a 1 ml con agua desionizada, para obtener un rango de concentración de 10 a $100 \mu\text{g}$ de proteínas. En el caso de los extractos, se tomaron volúmenes de 10 , 20 y $30 \mu\text{l}$, a los cuales se les añadió agua desionizada para que su volumen final fuera 1 ml .

A cada una de las muestras se le añadió desoxicolato de sodio (0.15%, 0.1 ml) y se incubó a temperatura ambiente diez minutos. Se enfrió durante cinco minutos y se precipitó con ácido tricloroacético frío (72%, 0.1 ml). Se dejó reposar durante veinte minutos en frío, centrifugándose en seguida, a 3000 rpm durante quince minutos.

El sobrenadante se desechó y al precipitado se le añadió agua (1 ml) y reactivo A (3.1.2.5, 1 ml), incubándose diez minutos a temperatura ambiente.

Al término de este período, se añadió reactivo B (3.1.2.6, 0.5 ml) y se incubó treinta minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorción a 750 nm.

La curva patrón se obtuvo graficando el logaritmo de la concentración de μg de ASB contra el logaritmo de la absorción a 750 nm.

Para calcular la concentración de proteína en los extractos, el valor del logaritmo de la absorción se interpoló en la curva patrón, leyendo así el logaritmo de concentración de los problemas. Al encontrar el antilogaritmo de esta última cifra, se determinó la concentración de proteína de los extractos.

3.2.4 Obtención del ADN activado.

Se hizo reaccionar ADN de timo de ternera (0.25 mg en solución salina de citratos: NaCl, 0.15 M; citrato de sodio, 0.015 M; pH 7.0) con ADNasa (5×10^{-4} μg) en 1 ml de solu--

ción amortiguadora de activación (3.1.2.7). Se incubó a 37°C durante quince minutos, se calentó a 77°C durante cinco minutos y se enfrió súbitamente en un baño de hielo.

3.2.5 Determinación de la síntesis de ADN in vitro con extractos proteicos (Dell'Aquila et al, 1980).

La mezcla de reacción, cuyo volumen total fue 250 μ l, contenía solución amortiguadora B (3.1.2.8), proteína de los extractos (100-150 μ g) y TTP [3 H] (2 μ Ci).

La mezcla de reacción podía o no contener inhibidores (ara-CTP, nov o afidicolina). Cada uno de ellos se encontraba en una concentración de 200 μ g/ml.

Se incubó a 37°C y se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 10, 20 y 30 minutos. A éstas se les añadió ADN de espermatozoos de salmón (1.25 mg/ml, 250 μ l) y luego, ácido tricloroacético (10%, 1 ml). Permanecieron en hielo quince minutos y se filtraron por Millipore en filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio; los filtros se lavaron con ácido tricloroacético (5%, 5 ml) y después con etanol (96%, 5 ml). Se secaron en horno a 60°C durante una hora y una vez secos, se transfirieron al líquido de centelleo. Se determinaron las cuentas por minuto en el contador de centelleo.

Se muestran los resultados de los mejores experimentos de cada uno de los casos, que muestran la tendencia de varios experimentos realizados en condiciones similares.

3.2.6 Determinación de los patrones de fragmentación del ADN (Cheah y Osborne, 1978).

Este procedimiento se llevó a cabo con ejes embrionarios de semillas de alta y baja viabilidad, imbibiéndo^s como se describió en 3.2.1.1, pero suprimiendo el material radiactivo de la solución amortiguadora.

Se homogenizaron 400 mg de ejes embrionarios en mortero, previamente enfriado por cinco minutos a -70°C con solución amortiguadora C (3.1.2.9, 3 ml). El homogenado se diluyó a 10 ml con solución amortiguadora C, se filtró a través de tres capas de Miracloth y el residuo se lavó dos veces con solución amortiguadora C (5 ml cada vez). Se añadió Tritón X-100 hasta 0.05% para liberar los núcleos, agitando suavemente y éstos se bajaron centrifugando a $625 \times g$ durante seis minutos.

La preparación nuclear se resuspendió en solución amortiguadora C (0.2 ml) y se transfirió con pipeta a una capa de lisis (3.1.2.10, 0.8 ml). Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante al menos dos horas.

El lisado se colocó cuidadosamente sobre un gradiente alcalino de sacarosa 5-20% en solución amortiguadora (3.1.2.11). El gradiente se centrifugó en un rotor Beckman SW 27 a 11,000 rpm durante catorce y media horas a 11°C . Se colectaron fracciones de 1.2 ml aproximadamente y se realizó el ensayo de difenilamina para la determinación de

ADN.

3.2.7 Ensayo de difenilamina para la determinación de ADN - (Giles y Myers, 1965).

A dos mililitros de solución problema de ADN en 10% de ácido perclórico, se añadió difenilamina (4% en ácido acético glacial, 2 ml) y acetaldehído (1.6 mg/ml en ácido acético glacial, 0.1 ml). Se incubó a 27°C durante toda la noche y se leyó la diferencia de absorciones (595 nm - 700 nm) -- comparando con un testigo de reactivos.

3.2.8 Extracción de ADN marcado de ejes embrionarios,

700 mg de ejes embrionarios de semillas de alta viabilidad se imbibieron durante 24 horas según la técnica descrita en 3.2.1.1, aumentando la marca radiactiva, timidina [³H], a 20 µCi/ml.

Se siguió el mismo procedimiento que en 3.2.6, hasta la lisis de la preparación nuclear.

Transcurrido el período de lisis, se observó la formación de una masa gelatinosa, que fue resuspendida en la capa de lisis antes de aumentar el volumen a 7 ml con solución salina de citratos pH 7.6.

Para llevar a cabo la desproteínezación, se añadió un volumen igual de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitando periódicamente en hielo durante diez minutos. Se centrifugó en frío durante diez minutos a 3000 rpm para separar las fases. Con la fase acuosa obtenida de la

primera desproteínización, se repitió la operación anterior y a la fase acuosa resultante, se le volvió a dar el mismo tratamiento.

La última fase acuosa se dializó toda la noche contra solución amortiguadora de diálisis II (3.1.2.12, 1.5 l).

A la mañana siguiente, se precipitó el ADN marcado con un volumen igual de ácido perclórico (20%), se dejó reposar quince minutos en hielo y se centrifugó en frío durante -- quince minutos a 5000 rpm. El precipitado se resuspendió -- lentamente en solución salina de citratos pH 7.6 (2 ml). Se colocó una alícuota de 10 μ l sobre un filtro Whatman GF/C - de fibra de vidrio, secándose en horno (60°C) durante una - hora y se transfirió a líquido de centelleo. Se determina-- ron las cuentas por minuto en el contador de centelleo. Se encontró que por alícuota de 10 μ l había \pm 300 cpm.

3.2.9 Ensayo de nucleasas en extractos proteicos.

La mezcla de reacción contenía, en un volumen de ---- 150 μ l, solución amortiguadora D, ADN marcado con timidina- [³H] (1500 cpm) y proteína de los extractos (100-150 μ g).

Se incubó a 37°C durante treinta minutos y la reacción se detuvo añadiendo, primero albúmina (2 mg/ml, 100 μ l) y - luego ácido perclórico frío (20%, 500 μ l). Permaneció en -- hielo quince minutos y se centrifugó a 3000 rpm diez minu-- tos. Se tomo una alícuota del sobrenadante (100 μ l), deposi-- tándola sobre un filtro Whatman GF/C de fibra de vidrio, la

vándose el residuo con etanol (96%, 5 ml).

Las membranas se secaron en horno (60°C) durante una ho
ra y se transfirieron a líquido de centelleo. Se determina--
ron las cuentas por minuto en el contador de centelleo.

Se muestra el mejor resultado obtenido de varios experimen
mentos similares.

IV. RESULTADOS.

Una semilla ha perdido viabilidad cuando al dársele -- agua y el medio ambiente apropiado para su reactivación, no germina. La viabilidad se define como el porcentaje de semillas que germinan al proporcionarles condiciones adecuadas.

De Vries en 1901, encontró los primeros indicios que - le llevaron a sugerir que un cambio en el ADN pudiera estar relacionado con la pérdida de viabilidad de las semillas. - Al correr de los años, se han hecho más experimentos para - dar credibilidad a la idea de que se llevan a cabo lesiones en la estructura cromosómica durante el envejecimiento de - las semillas (Sax y Sax, 1964; Roberts y Abdalla, 1968; -- Cheah y Osborne, 1978).

Berjack y Villiers en 1972 encontraron que embriones - envejecidos de maíz fueron capaces de germinar después de - un tiempo y sugirieron que los embriones con estructuras ma cromoleculares dañadas podían recuperar sus funciones meta- bólicas durante las primeras horas de germinación.

En embriones de centeno, Osborne y colaboradores --- (1980/81) han demostrado que la acumulación de cortes en el ADN como parte del proceso de envejecimiento se lleva a ca- bo cuando éstos pierden viabilidad, así como que la presen- cia de un proceso de síntesis temprana de ADN se debe a que la reparación de dichos cortes es un evento normal durante las primeras horas de la germinación.

4.1 Determinación de viabilidad de las semillas utilizadas.

Para los experimentos realizados, se contó con dos tipos de semillas: una procedentes de maíz "Chalqueño" cosecha 1982 y otras de maíz "Chalqueño" cosecha 1980.

Se probó el porcentaje de viabilidad de ambos tipos -- colocando semillas entre algodones humedecidos con agua dentro de frascos pequeños. La superficie de las semillas fue desinfectada con hipoclorito de sodio (0.5%) durante dos minutos, seguido de lavado con agua destilada estéril.

Las semillas de maíz "Chalqueño" cosecha 1980 estaban cubiertas con un colorante (Rodamina), por lo que se determinó el porcentaje de viabilidad de lotes de semillas lavadas con etanol (96%) y sin lavar, antes de ser desinfectadas.

Los frascos se incubaron durante cinco días a 27°C y -- transcurrido este período, se determinó el porcentaje de semillas que habían germinado.

Los resultados mostraron que el maíz "Chalqueño" cosecha 1982 poseía de 90 a 100% de viabilidad (alta viabilidad), mientras que el de la cosecha 1980 era más bajo (68-70%, baja viabilidad). Se encontró el mismo porcentaje de viabilidad en las semillas de la cosecha 1980 que fueron lavadas con etanol y en las que no lo fueron.

Estos porcentajes fueron posteriormente verificados al germinar las semillas sobre un soporte inerte (agrolita) en

charolas (comunicación verbal, Caro, G.).

4.2 Determinación de curvas de síntesis de ADN.

Se determinaron las curvas de síntesis de ADN durante la imbibición de los ejes embrionarios de semillas de alta y baja viabilidad y de ejes embrionarios irradiados con luz ultravioleta por diferentes períodos.

En la figura 1, se observa la cinética de síntesis que mostraron los ejes embrionarios de semillas de alta viabilidad. La síntesis, durante las primeras horas de imbibición, fue lenta, en comparación con la síntesis en el período entre las horas 10 y 20. El ascenso lento durante las primeras horas se puede observar con más detalle en la figura 2.

Se presentó una meseta, donde no se detecta síntesis de ADN; la presencia de esta meseta no fue constante en todos los experimentos realizados con este tipo de ejes embrionarios. La pendiente de la curva durante las siguientes 20 horas fue muy pronunciada. En el período comprendido entre las horas 55 y 75, se observó la pérdida de material genético marcado. Se trató de dilucidar la causa de la caída en la cantidad de ADN marcado, más no se obtuvieron resultados que ayudaran a determinar la naturaleza de ésta.

Se pudo notar que después del período anterior, en que se presentó la pérdida, volvió a incrementarse la síntesis para enseguida caer hasta quedar en el mismo nivel que al inicio de este segundo incremento. Podría sugerirse que --

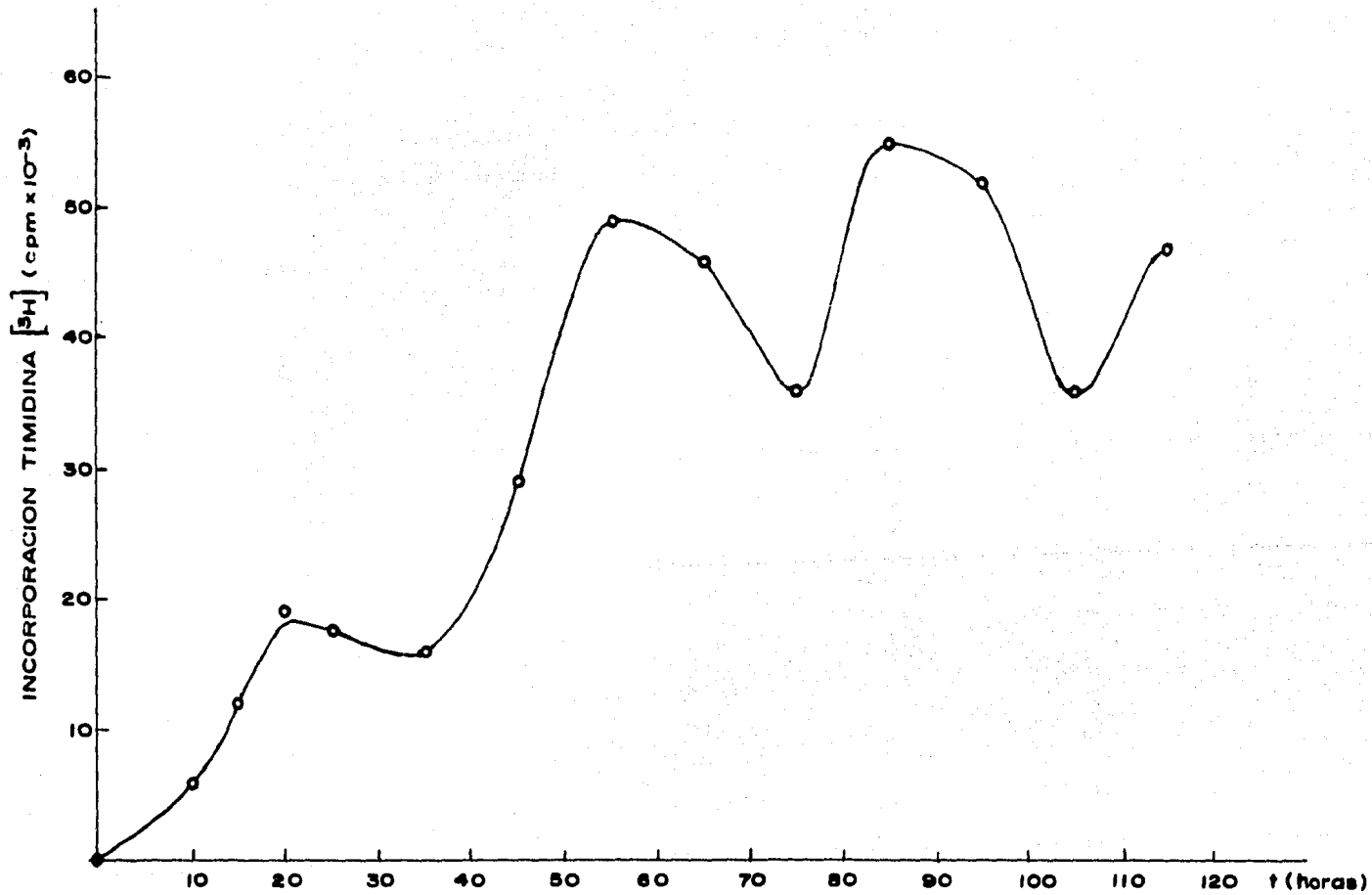


FIGURA 1 CURVA DE SINTESIS DE ADN DE EJES EMBRIONARIOS DE ALTA VIABILIDAD.

estos picos, donde hay aumento en la síntesis de ADN, estén relacionados con el ciclo celular, más no se realizaron experimentos para poder confirmarlo.

Se determinó la curva de síntesis de ADN de los ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad (cuya figura no se muestra). Se encontró que durante las primeras diez horas de imbibición se incrementó en 64% con respecto a la curva de los ejes embrionarios de semillas de alta viabilidad. Este hecho indicaba la existencia de un incremento en la síntesis temprana de ADN en los ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad.

El incremento en la síntesis temprana de ADN en los ejes embrionarios de baja viabilidad podría sugerir que se estuviera llevando a cabo la reparación del ADN que pudiera estar dañado, por lo que con objeto de promover un proceso de tipo reparativo en la síntesis de ADN durante la imbibición de ejes embrionarios de maíz, se procedió a irradiar ejes embrionarios procedentes de semillas de alta viabilidad con luz ultravioleta de onda corta (254 nm).

En este caso, se hizo necesario realizar un estudio preliminar acerca de las mejores condiciones para llevar a cabo este tratamiento. Se probaron los siguientes parámetros: a) distancia entre la fuente de irradiación y los ejes embrionarios secos y b) el tiempo de exposición a la luz ultravioleta de los ejes embrionarios secos.

Como se estaba induciendo daño al ADN, se esperaba que durante las primeras horas de imbibición se efectuara la reparación de dicho daño, lo que implicaría un aumento considerable en la síntesis de ADN durante este período.

Se determinaron las curvas de síntesis de ADN de los ejes embrionarios que habían sido irradiados, de acuerdo a los parámetros mencionados. Se encontró que las curvas de síntesis de los ejes embrionarios irradiados estaban por de bajo de la curva de los ejes embrionarios de semillas de al ta viabilidad, es decir, había disminuído la síntesis; por ejemplo, para los ejes embrionarios expuestos 240 segundos a la luz ultravioleta a 13 centímetros, disminuyó hasta el 42% y para los irradiados a 27 centímetros de distancia durante el mismo tiempo, hasta el 61.5%. Se podrían presentar dos explicaciones a este fenómeno: a) aparentemente el sistema de reparación no había sido inducido o b) se dañó el sistema de reparación del ADN, pues las enzimas que lo componen se encuentran entre los componentes proteicos más lábiles (Lakon, 1949; Roberts y Osborne, 1973).

Debido a los resultados anteriores, se decidió imbibir los ejes embrionarios durante una hora antes de que fueran irradiados. El agua que ha sido tomada por el eje embrionario produce radicales libres por efecto de la irradiación y estos radicales interaccionan con las macromoléculas, produ ciéndose entonces el daño.

El mejor procedimiento para la inducción del daño en el ADN de los ejes embrionarios fue irradiarlos, después de la hora de imbibición, diez minutos a diez centímetros de distancia; ésto implicaría un tratamiento de 552 J/m^2 de luz ultravioleta.

En la figura 2, se advierte el notable incremento de la síntesis de ADN durante las primeras seis horas de imbibición en los ejes embrionarios irradiados; mientras que en el control, la síntesis fue mínima. Se pudo observar que, después del marcado aumento en la síntesis de ADN en los ejes embrionarios irradiados, había una pequeña caída, seguida de síntesis que aumentó lentamente; en comparación con el control, cuya síntesis se incrementó considerablemente a partir de las seis horas de imbibición.

4.3 Determinación de la actividad enzimática (ADN polimerasas) dentro de las primeras 24 horas de germinación.

El siguiente objetivo fue detectar la presencia de actividad de ADN polimerasas, a través de estudios comparativos de la síntesis de ADN en ejes embrionarios con y sin inhibidores de las ADN polimerasas.

Al determinar la curva de síntesis de ADN de los ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad, se encontró que durante las primeras diez horas la pendiente de la curva era más pronunciada que la de los ejes embrionarios de alta viabilidad. Este incremento en la síntesis temprana se

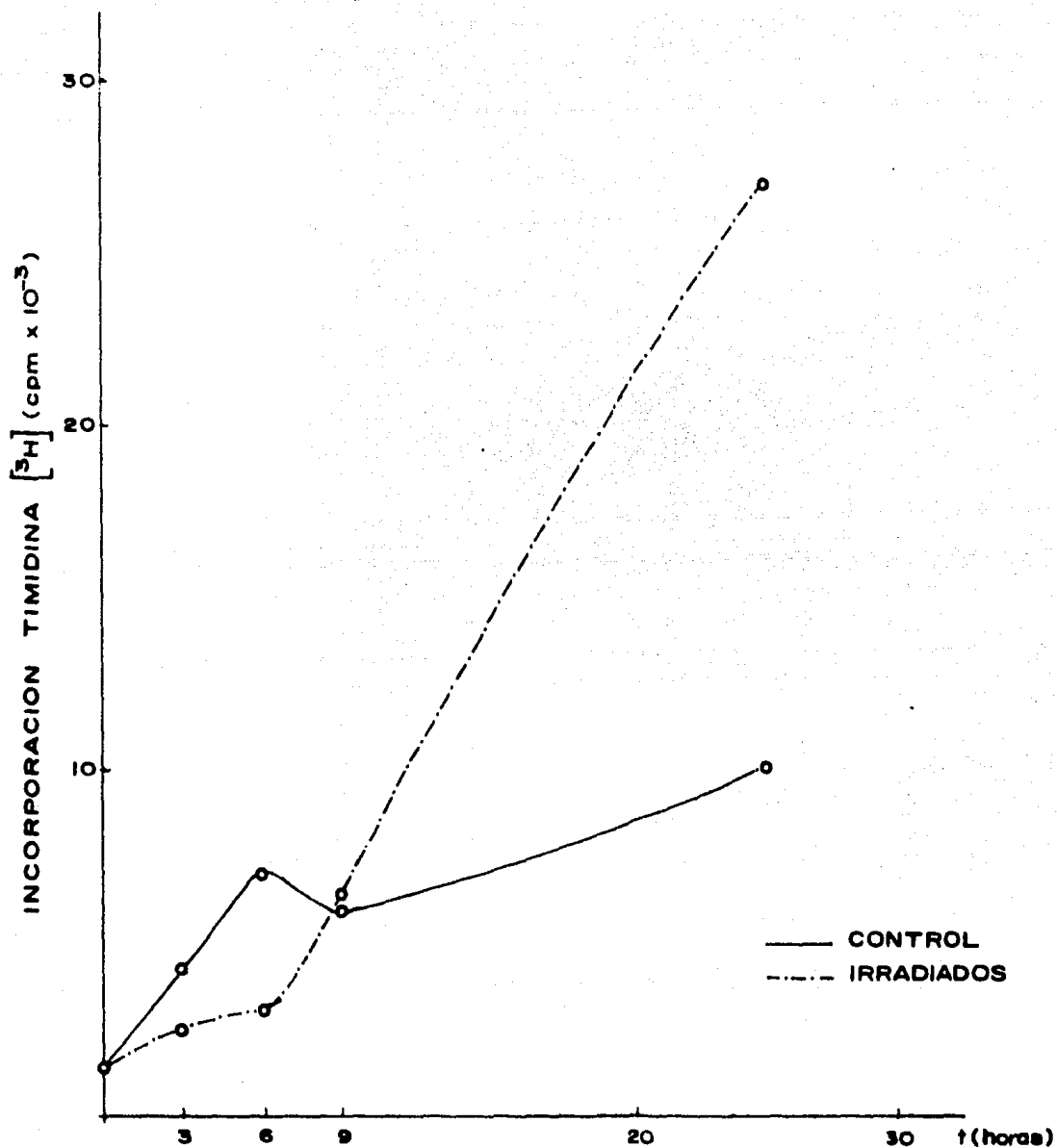


FIGURA 2

CURVA DE SINTESIS DE ADN DE EJES
EMBRIONARIOS IRRADIADOS CON LUZ ULTRAVIOLETA

podía deber a uno de los dos siguientes procesos: reparación o replicación. Para poder diferenciarlos, se determinó la actividad de ADN polimerasas durante las primeras 24 horas de germinación y se usaron inhibidores de la ADN polimerasa que interviene activamente en la replicación del ADN: la ADN polimerasa α .

Entre los inhibidores usados, se encuentran: a) afidicolina, que inhibe la acción de la polimerasa α , tanto en células animales (Hübscher et al, 1979; Weissbach, 1977) -- como en células vegetales (Amileni et al, 1979; Sala et al, 1980); b) novobiocina (nov), cuyo papel no se ha definido en sistemas vegetales pero que actúa como inhibidor de topoisomerasas en bacterias (Gellert et al, 1976; Kornberg, -- 1980); c) arabinosil-CTP (ara-CTP) que inhibe la síntesis del ADN al unirse al sitio activo de la ADN polimerasa α (Furth y Cohen, 1968; Schrecker et al, 1974) y d) butilanelinouracilo, que actúa de manera similar a 6-(p-hidroxifenilhidrazino)-uracilo (HPUra), que se une a la ADN polimerasa replicativa y también al ADN, con formación de un complejo terciario en bacterias (Kornberg, 1980).

Se trató de observar el efecto de los inhibidores sobre la síntesis de ADN en ejes embrionarios. Sin embargo, al poner el eje embrionario en contacto directo con cualquiera de los inhibidores mencionados, no se observó actividad de éstos. Esto podía deberse a que el inhibidor no actuaba como tal en el sistema o porque no fue capaz de atra-

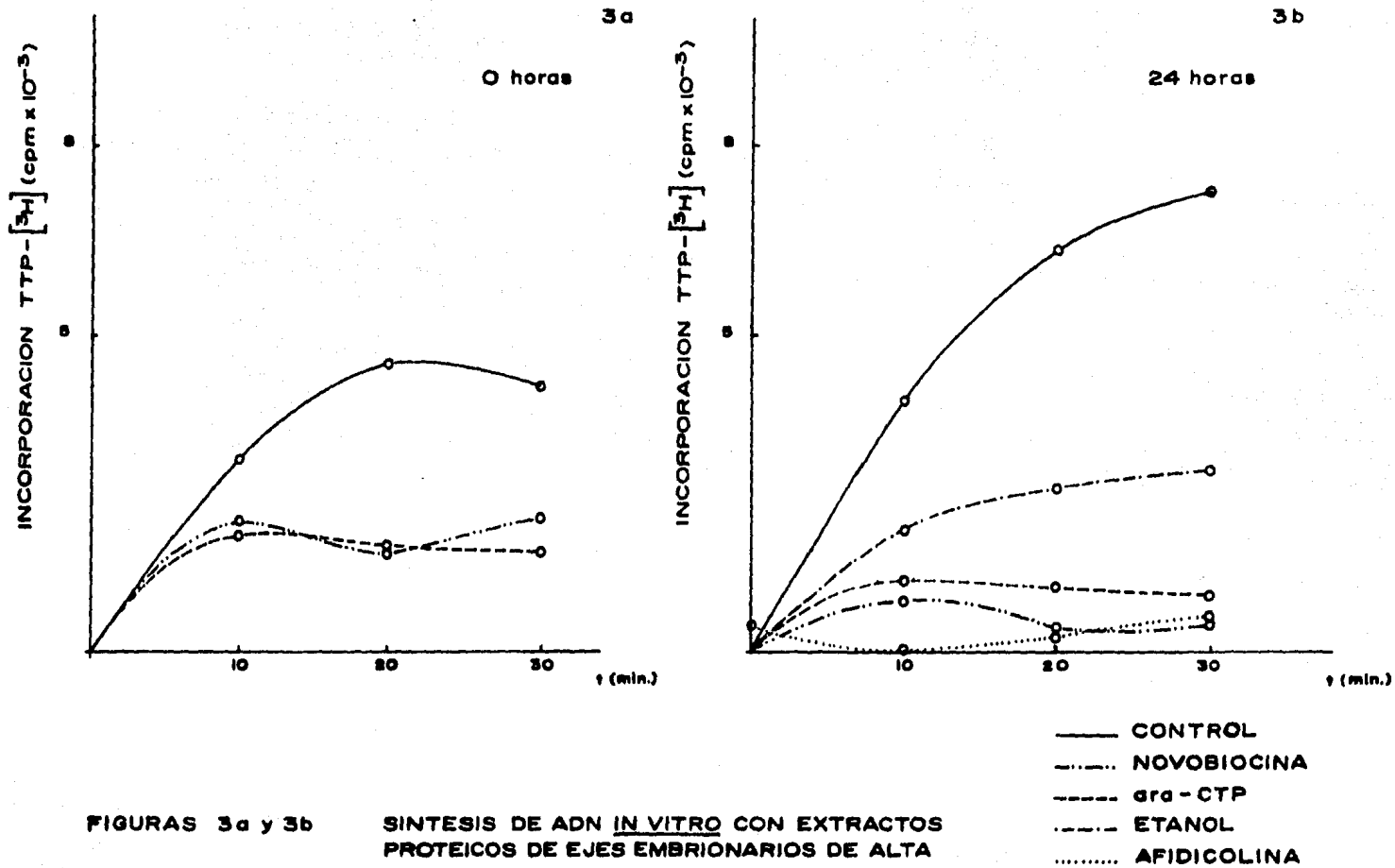
vesar las diferentes capas embrionarias. En vista de lo anterior, se optó por ensayos de síntesis de ADN in vitro con núcleos activos de los tres tipos de ejes embrionarios: alta y baja viabilidad e irradiados y en un sistema con extractos proteicos de los tres tipos de ejes ya mencionados y en presencia de un molde de ADN.

4.3.1 Extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz de alta viabilidad.

Se obtuvieron extractos proteicos de ejes embrionarios sin imbibir (t_0) y de ejes embrionarios imbibidos durante 24 horas (t_{24}).

El extracto t_0 presentó de 60 a 70% de inhibición de la actividad de ADN polimerasas por ambos compuestos, nov y ara-CTP desde los primeros 20 minutos (Tabla I). La curva de síntesis del extracto sin inhibidores mostró cinética de aumento hasta los 30 minutos (Figura 3a).

En el extracto t_{24} , la inhibición con nov fue ligeramente mayor que cuando se usó ara-CTP; con ambos inhibidores, se observó que la síntesis de ADN se encontraba notablemente disminuída (entre 80 y 95%, Tabla I). Se probó también la capacidad inhibitoria de la afidicolina en el sistema de medición y no obstante que el disolvente inhibe, se puede observar que afidicolina per se inhibe fuertemente la síntesis de ADN. La incorporación de TTP [^3H] al usar afidicolina fue $\sim 4\%$, en contraste con $\sim 45\%$ cuando se usó eta--



FIGURAS 3a y 3b

SINTESIS DE ADN *IN VITRO* CON EXTRACTOS
 PROTEICOS DE EJES EMBRIONARIOS DE ALTA
 VIABILIDAD.

TABLA I

% de TTP [³H] incorporado durante
la síntesis de ADN in vitro con
extractos proteicos (20 minutos).

		Sin inhibidores	+ Nov	+ Ara-CTP
Alta viabilidad	0 h	100	31.75	38.72
	24 h	100	4.12	17.72
Baja viabilidad	0 h	100 (67.43)*	58.17**	15.86**
	24 h	100 (48.61)*	53.79**	2.1 **
Irradiados	3 h	100	109.85**	2.3 **
	24 h	100 (30.73)*	69.68**	26.51**

* % de TTP [³H] incorporado con respecto a extractos de ejes embrionarios de alta viabilidad.

** % calculado con respecto a su control (sin inhibidores).

no1 (Figura 3b).

Resumiendo, la inhibición por ara-CTP y nov fue mayor a t_{24} que a t_0 .

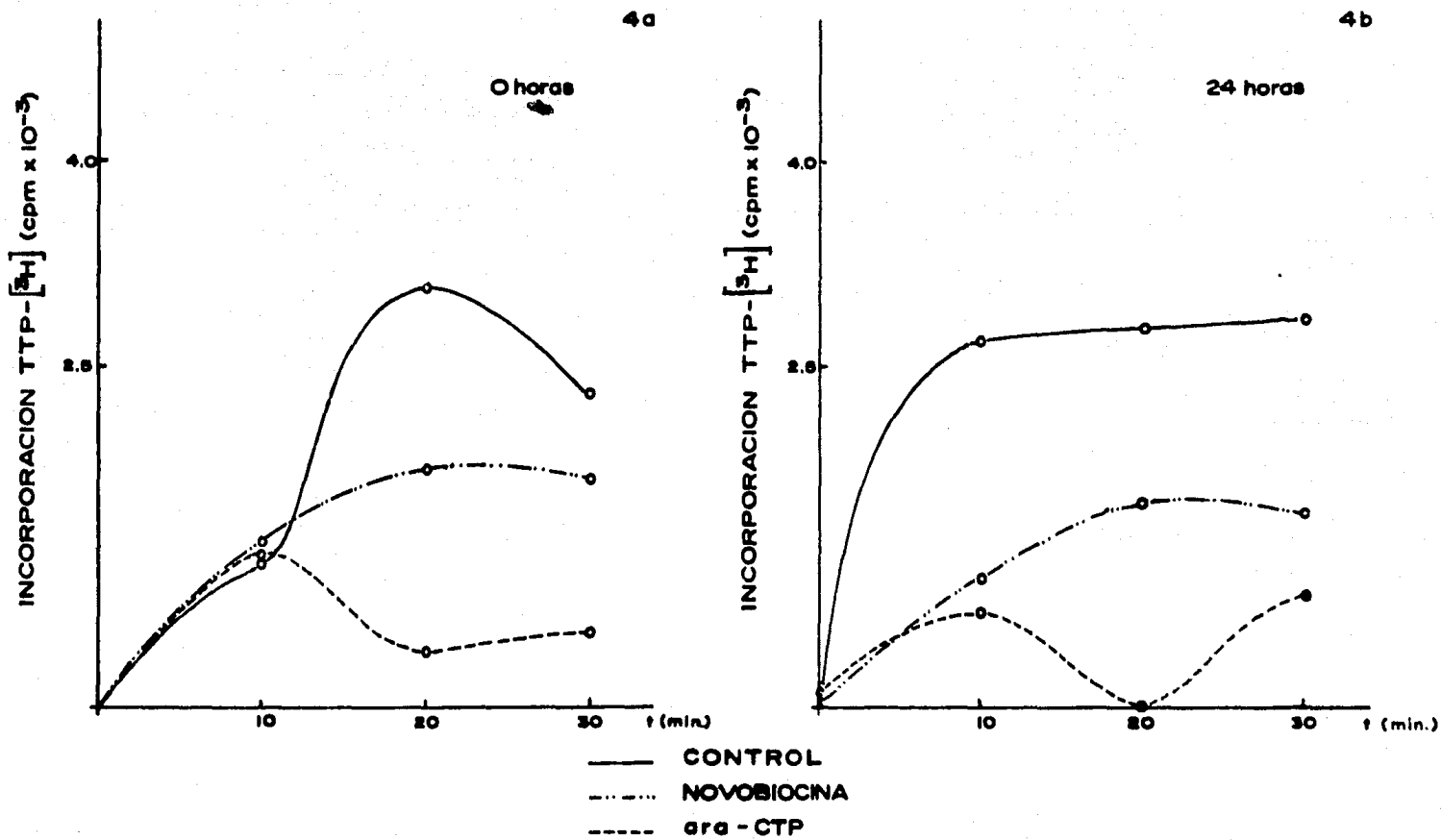
4.3.2 Extractos proteicos de ejes embrionarios de semillas de baja vaibilidad.

Se obtuvieron extractos t_0 y t_{24} de ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad. Tanto a t_0 como a t_{24} , las curvas de síntesis de ADN de los extractos sin inhibidores alcanzaron un máximo de cpm de alrededor de 2.5×10^3 , las cuales fueron menores que las que se presentaron a tiempos similares en los extractos de ejes embrionarios de alta viabilidad ($5-7.5 \times 10^3$ cpm) (Figuras 4a y 4b, en comparación con las figuras 3a y 3b).

La inhibición por ara-CTP en los extractos t_0 y t_{24} -- fue mayor que la que se presentó por nov, en forma más marcada que en los extractos de ejes embrionarios de alta viabilidad.

Cuando se obtuvo un extracto t_{15} , éste también presentó un patrón similar al de los dos extractos anteriores: -- ara-CTP inhibió en mayor grado que nov.

Los rangos de inhibición de los extractos de ejes embrionarios de alta y baja viabilidad se pueden comparar en la Tabla I.



FIGURAS 4a y 4b

SINTESIS DE ADN IN VITRO CON EXTRACTOS PROTEICOS DE EJES EMBRIONARIOS DE BAJA VIABILIDAD.

4.3.3 Extractos proteicos de ejes embrionarios irradiados - con luz ultravioleta.

El objetivo de realizar este ensayo con extractos de ejes embrionarios irradiados fue el observar la actividad enzimática de ADN polimerasas al usar los inhibidores nov y ara-CTP en un sistema que se supone estaba llevando a cabo la reparación del ADN dañado y poder compararla con las actividades obtenidas en los extractos de ejes embrionarios de baja viabilidad.

Los ejes embrionarios se imbibieron durante una hora, se irradiaron diez minutos colando la lámpara a diez centímetros de altura y se dejaron incubando hasta completar 3 y 24 horas de imbibición. Después se obtuvieron los extractos t_3 y t_{24} , respectivamente.

En el extracto t_3 , la inhibición por nov fue menor que la que se presentó por ara-CTP (Figura 5a). El extracto t_{24} presentó una tendencia similar al de t_3 ; es decir, nov inhibió en menor grado la síntesis de ADN que ara-CTP (Tabla I); lo que viene a repetir el comportamiento de los extractos de semillas de baja viabilidad.

A t_{24} no se presentó la inhibición tan marcada por nov que mostró el extracto t_{24} de ejes embrionarios de alta viabilidad (Tabla I); sin embargo, la inhibición por ara-CTP llegó a un nivel semejante a la encontrada en el extracto del mismo tiempo de ejes de alta viabilidad (Figura 5b).

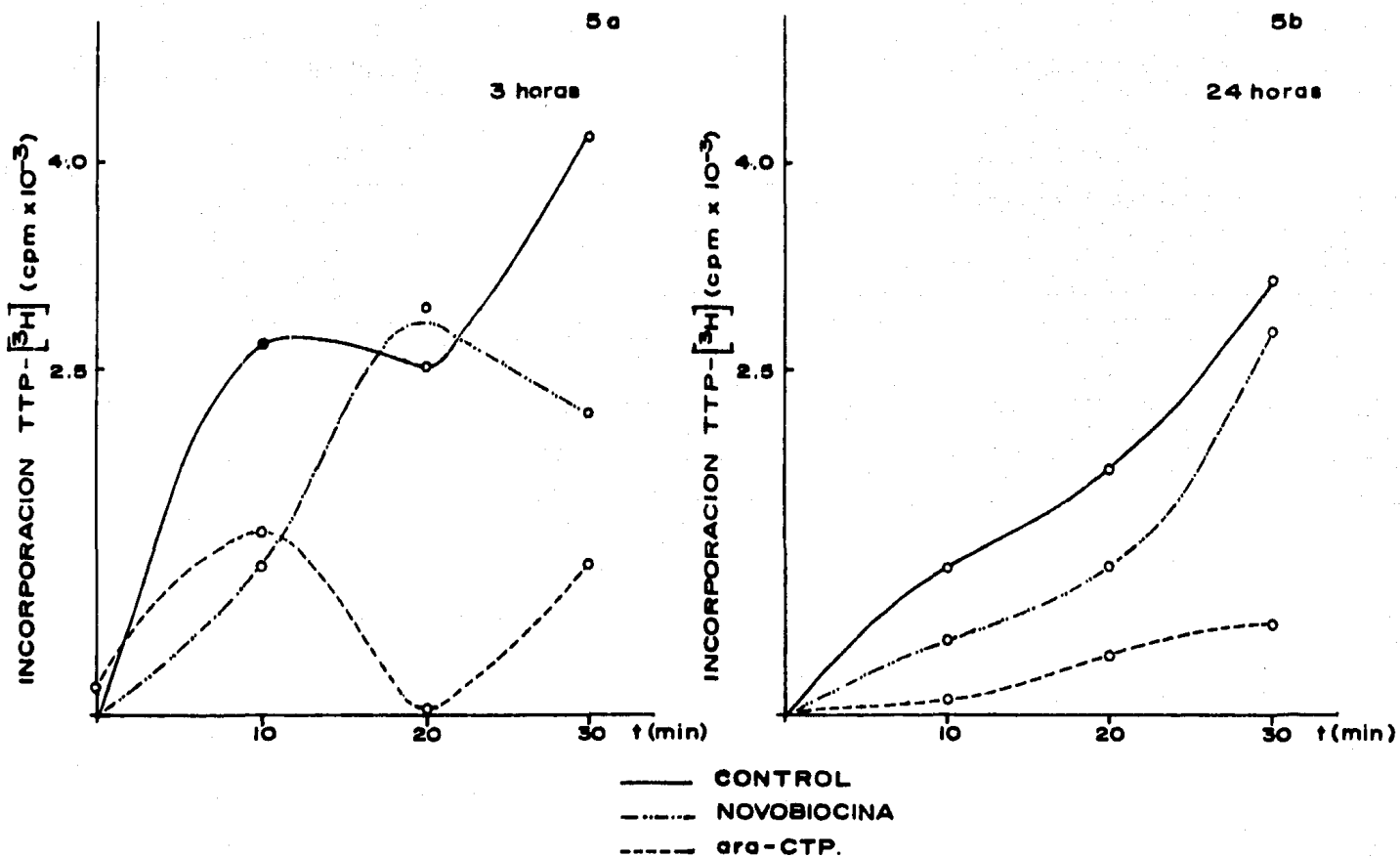


FIGURA 5a y 5b.

SINTESIS DE ADN IN VITRO CON EXTRACTOS PROTEICOS DE EJES EMBRIONARIOS IRRADIADOS.

Con afidicolina y butilanilinouracilo no se pudo distinguir entre el efecto del inhibidor per se y la del disolvente en el que se encontraban (etanol y dimetil sulfóxido, respectivamente). Sólo en una ocasión, se pudo diferenciar la acción de afidicolina y por ésto, se dejaron de usar.

4.3.4 Núcleos aislados de los tres tipos de ejes embrionarios.

En estudios simultáneos al presente trabajo en el Departamento de Bioquímica Vegetal, DEPg, Facultad de Química, realizados por Vázquez, J. y López, S., se probó la actividad de los dos inhibidores, nov y ara-CTP, en un sistema con núcleos activos aislados de los tres tipos de ejes embrionarios.

El fin de incluir los resultados de estos experimentos fue tener más evidencias experimentales para comparar con los resultados obtenidos con los extractos proteicos de ejes embrionarios de baja viabilidad y de ejes irradiados.

Para obtener los núcleos, se homogenizaron los ejes embrionarios y los núcleos se purificaron en gradientes de percoll y sacarosa. Se extrajo la zona donde bandearon los núcleos, lavándose exhaustivamente para eliminar los restos de percoll. La preparación nuclear se resuspendió en solución amortiguadora y de esta suspensión se tomaron alícuotas para los ensayos.

Los ensayos de síntesis de ADN fueron similares a los

realizados con extractos proteicos. En un volumen determinado de mezcla de reacción, donde se incluyó el nucleótido --- marcado, TTP [^3H], se depositó una alícuota de la suspensión de núcleos, incubándose el tiempo necesario. Luego en alícuotas tomadas a intervalos regulares de este sistema, se determinó la incorporación del marcador al material ácido insoluble (otras condiciones experimentales se describen en 3.2.5).

La curva de síntesis de ADN en ausencia de los inhibidores en núcleos de ejes embrionarios de alta viabilidad fue muy semejante tanto para los núcleos aislados de ejes embrionarios sin imbibir (t_0) como para los imbibidos durante 24 horas (t_{24}). En los núcleos de t_0 , la acción de nov y ara---CTP fue casi nula; mientras que a t_{24} , ambos inhibieron completamente la síntesis.

Por el contrario, en los núcleos de ejes embrionarios de baja viabilidad y en los que fueron aislados de ejes irradiados con luz ultravioleta, la inhibición por ara-CTP fue mayor que la presentada por nov; ésto concordó con lo observado anteriormente para extractos proteicos de ejes embrionarios de baja viabilidad e irradiados.

4.4 Determinación de patrones de fragmentación de ADN.

Se mencionó ya que en embriones de centeno que iban perdiendo viabilidad en el estado seco, se observaban cortes en el ADN que se manifestaban como fragmentos de bajo peso molecular. Aún cuando en los embriones de centeno había mayor --

cantidad de fragmentos de bajo peso molecular, se pudo advertir la existencia de una pequeña cantidad de material de alto peso molecular (Cheah y Osborne, 1978).

Esto condujo al análisis del tamaño del ADN sintetizado que se estaba obteniendo en los ensayos. El fin que se persiguió al analizar los patrones de tamaño del ADN fue demostrar que el ADN de bajo peso molecular en los ejes embrionarios de baja viabilidad se encontraba en mayor proporción que el de peso molecular alto, siendo ésto evidencia que podría sugerir la falta de integridad del ADN en estos ejes.

Para obtener los patrones de fragmentación fue necesario primero extraer los núcleos de los ejes embrionarios, para luego lisarlos y así obtener el ADN. La suspensión de ADN resultante se puso sobre un gradiente alcalino de sacarosa 5-20%.

La concentración de ADN se determinó por el ensayo de difenilamina.

En el caso de ejes embrionarios imbibidos durante 3 horas, se pudieron observar dos picos bien definidos: el que se encontró alrededor de la fracción 20 que corresponde a maíz de alta viabilidad y el que estaba entre las fracciones 22 y 23 que corresponde a maíz de baja viabilidad. Esto demostró que los ejes embrionarios de baja viabilidad poseían mayor proporción de material genético de bajo peso mo

lecular que los de alta viabilidad. Se podría sugerir que también se encuentra una pequeña cantidad de material de mayor peso molecular en ambos casos, que se pudiera discernir del hombro que se presentó en las fracciones 19-20 para los de baja viabilidad y del pico entre las fracciones 16 y 18 para los de alta viabilidad (Figura 6a).

Al obtener los patrones de ambos tipos de ejes embrionarios de t_{24} , los picos se superpusieron, localizándose en las fracciones 22-23; esto pareció indicar que el patrón de fragmentación en ambos casos fuera similar. Se podría señalar que existe una población homogénea de fragmentos de ADN de bajo peso molecular; así como una pequeña cantidad de -- ADN de alto peso molecular, que se presenta en ambos casos como un hombro entre las fracciones 18 y 20 (Figura 6b).

4.5 Ensayo de actividad de nucleasas.

La finalidad de este ensayo fue demostrar que los patrones de fragmentación encontrados para los ejes embrionarios de alta y baja viabilidad no fueron artefactos producidos por la actividad de enzimas que hidrolicen el ADN extraído al lisar los núcleos.

Debido a lo anterior, en la mezcla de reacción se añadió ADN marcado con timidina [^3H] extraído de ejes embrionarios de alta viabilidad y diferentes tipos de extractos proteicos: de ejes embrionarios de alta y baja viabilidad incubados durante 3 y 24 horas. En el caso del control, a la --

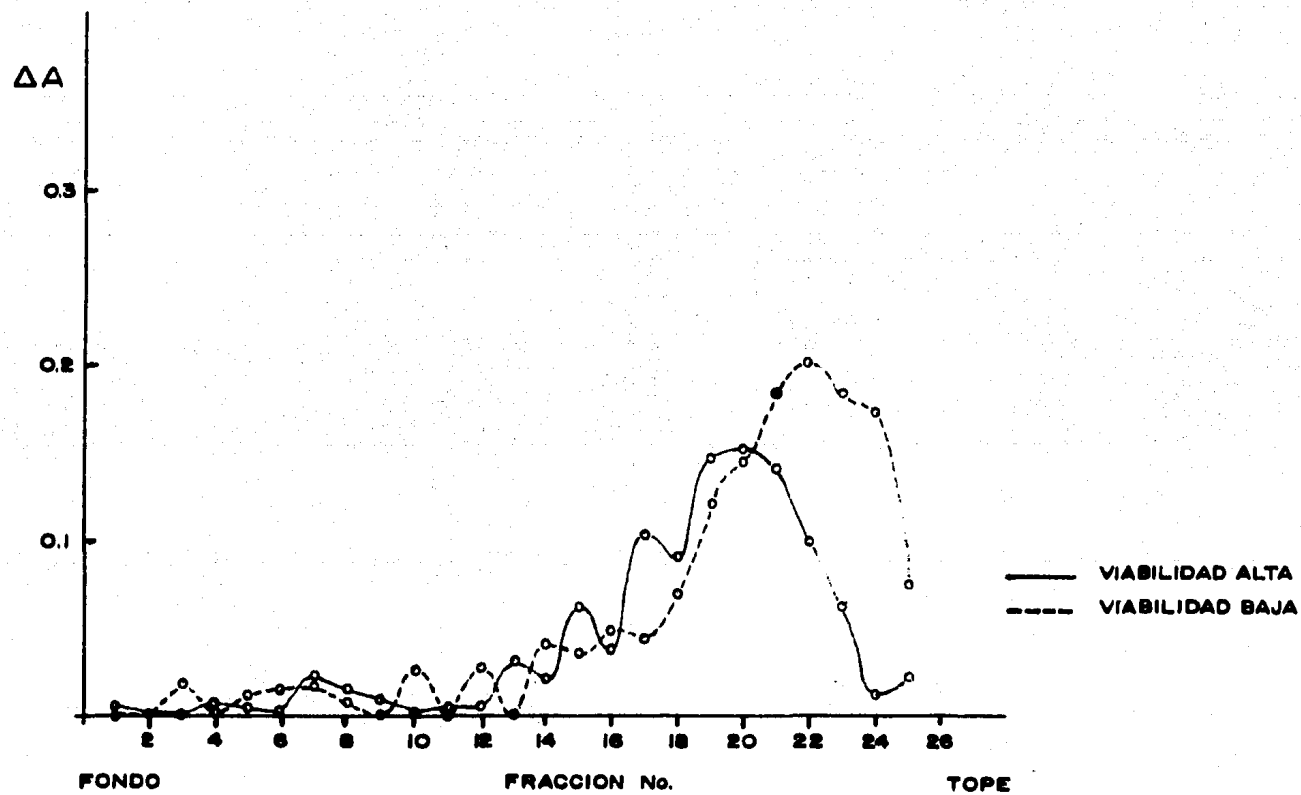


FIGURA 6a

PATRON DE FRAGMENTACION DE ADN DE EJES EMBRIONARIOS
IMBIBIDOS DURANTE 3 HORAS

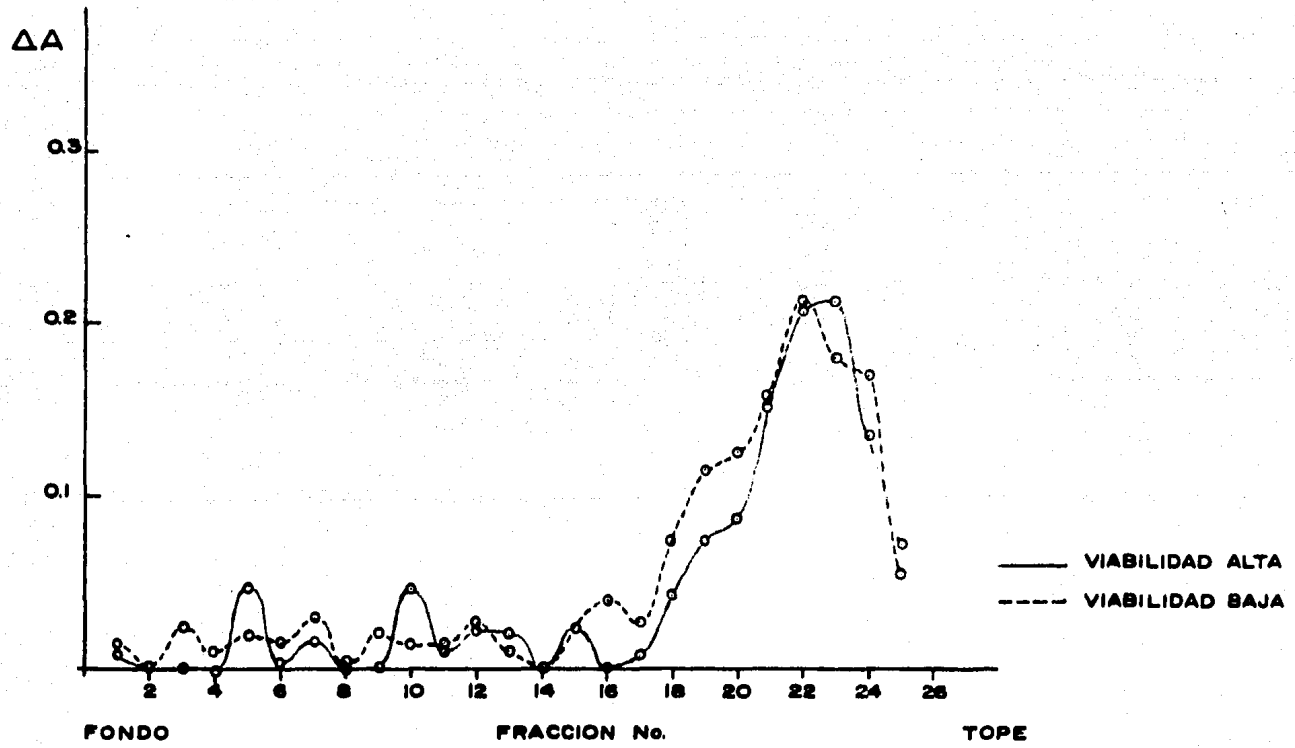


FIGURA 6b

PATRON DE FRAGMENTACION DE ADN DE EJES EMBRIONARIOS
IMBIBIDOS DURANTE 24 HORAS.

mezcla de reacción se añadió el ADN marcado y se completó - al volumen establecido con solución amortiguadora D. La mezcla de reacción, en todos los casos, contenía 1500 cpm.

Las muestras se incubaron durante 30 minutos y se cuantificó la cantidad de material radiactivo liberado a la --- fracción soluble en HClO_4 frío.

En la tabla II, se muestran los resultados obtenidos - al realizar este ensayo. Se pudo advertir que la cantidad - de material radiactivo liberado en el control fue muy baja. Las magnitudes encontradas para los extractos proteicos de t_3 y t_{24} de los dos tipos de ejes embrionarios oscilaron entre 1.32 y 1.54%; lo cual demostró que no había actividad - hidrolítica de ADN en los extractos pues no se observó diferencia significativa entre éstos y el control.

TABLA II

LIBERACION DE MATERIAL RADIOACTIVO A LA
FRACCION SOLUBLE

TIPO DE EXTRACTO	% cpm LIBERADAS
ALTA VIABILIDAD, 3 h.	1.32
ALTA VIABILIDAD, 24 h.	1.54
BAJA VIABILIDAD, 3 h.	1.52
BAJA VIABILIDAD, 24 h.	1.38
CONTROL	1.32

V. DISCUSION.

Los resultados del presente estudio aportan datos para sugerir que los ejes embrionarios de semillas de maíz de baja viabilidad presentan fragmentación de su ADN y que la falta de integridad de esta macromolécula debe repararse durante las primeras horas de germinación.

La curva de síntesis de ADN de los ejes embrionarios de alta viabilidad fue similar a las encontradas para embriones de trigo de alta viabilidad (Dell'Aquila et al, 1980; Buchowicz et al, 1978; Chen y Osborne, 1970). En estas curvas, se presenta poca síntesis durante las primeras doce horas, que luego incrementa su proporción (26, 12 y 7 veces) en el período comprendido entre las horas 16 y 30. Después de este tiempo, la síntesis desciende drásticamente y no se sabe si vuelve a incrementarse como se muestra en el caso de los ejes embrionarios de maíz.

Ninguno de los investigadores mencionados muestra en su trabajo, la curva de síntesis de embriones de trigo de baja viabilidad; pero sí mencionan que hay incremento en la síntesis de ADN durante las primeras horas de germinación.

La curva de síntesis de ejes embrionarios irradiados con luz ultravioleta mostró un incremento marcado durante las primeras seis horas de germinación, en comparación con el control y después, en el período entre las horas 10 y 25, la síntesis aumenta de manera lenta; probablemente debido a

un desacoplamiento en el metabolismo general de la germinación, originado por el daño causado al ADN y que debe ser reparado durante las primeras horas de germinación.

El hecho anterior concuerda con las investigaciones de Osborne y colaboradores (1980/81) en las que encuentran que los embriones de centeno al ser irradiados presentan incremento en la síntesis temprana de ADN. El análisis cromatográfico del ADN sintetizado durante las primeras horas, tanto en embriones de centeno irradiados como en los de baja viabilidad, demuestra que el incremento en la síntesis temprana de ADN se debe a un proceso de tipo reparativo.

Tanto el incremento en la síntesis temprana de ADN en los ejes embrionarios de maíz de baja viabilidad y en los que han sido irradiados con luz ultravioleta, como la semejanza en los patrones de inhibición de los extractos proteicos y núcleos activos de estos ejes embrionarios podrían sugerir que existe en los ejes embrionarios de baja viabilidad la posibilidad de que se llevara a cabo un proceso de reparación del ADN como uno de los primeros eventos en la germinación.

El proceso de síntesis en los extractos proteicos y en los núcleos, que se presenta tanto en los ejes embrionarios de baja viabilidad como en los irradiados, fue más sensible a la acción de ara-CTP que a la de nov, tanto a t_0 como a

t_{24} .

La inhibición tan marcada por ara-CTP y en menor grado por nov en los dos sistemas de síntesis podría indicar la presencia de actividad de ADN polimerasa α que estuviera involucrada en un proceso reparativo durante las primeras horas de germinación de estas dos clases de ejes embrionarios. No se tiene evidencia de que ara-CTP inhiba también a la ADN polimerasa β , que pudiera también estar presente e involucrada en el proceso reparativo.

Por otra parte, los núcleos t_0 de los ejes embrionarios de alta viabilidad no presentaron inhibición por ara-CTP y nov, mientras que los extractos proteicos mostraron de 60 a 70% de inhibición de la síntesis de ADN. En el sistema de síntesis de los núcleos, también se debería haber presentado inhibición por la presencia de actividad de ADN polimerasas; su ausencia se podría explicar en base a diferencias en la permeabilidad de su membrana.

En los extractos proteicos y los núcleos t_{24} de ejes embrionarios de alta viabilidad hubo gran inhibición por nov y ara-CTP. Puesto que ambos compuestos inhiben la actividad de la ADN polimerasa α , se podría asumir que a este tiempo se esté llevando a cabo un proceso de tipo replicativo.

Es importante hacer notar que se observó que las curvas de síntesis de ADN de los extractos proteicos sin inhibidores de ejes embrionarios de baja viabilidad y de los

ejes irradiados eran menores que las obtenidas para los extractos proteicos de ejes embrionarios de alta viabilidad.

Se ha observado que el ADN de los embriones de centeno se fragmenta, al haber disminución en sus porcentajes de -- viabilidad. Este hecho se pudo comprobar en los ejes embrio narios de maíz mediante los patrones de fragmentación.

Los patrones de fragmentación de ADN de los ejes em--- brionarios de baja viabilidad a t_3 , mostraron una gran cantidad de porciones de ADN de bajo peso molecular, en comparación con los ejes embrionarios de alta viabilidad, que -- mostraron una porción elevada de material de alto peso mole cular. A t_{24} , ambos tipos de ejes embrionarios presentaron el mismo tipo de patrón, lo que indicó que en ambos había - fragmentos de peso molecular semejante. En el caso de los - ejes embrionarios de alta viabilidad, el patrón de fragmen tación a t_{24} corroboraría la información que se obtuvo con los extractos proteicos y los núcleos, en los que la acción de ara-CTP, nov y afidicolina sobre la actividad de ADN po limerasas sugiere que se está llevando a cabo un proceso de tipo replicativo.

La falta de integridad del ADN de los ejes embrionarios de baja viabilidad y la semejanza que existe en el patrón - de inhibición de estos ejes con aquellos en los que se ha - inducido la reparación del daño al ADN, puede sugerir que, durante las primeras horas de germinación, el ADN de los --

ejes embrionarios de baja viabilidad sea reparado y que después de este período, continuen el proceso normal de la germinación.

Si el daño al ADN es muy grave (por ejemplo, pérdida total de viabilidad), podría suceder que esta macromolécula no pudiera ya ser reparada en absoluto y por tanto, los ejes embrionarios no germinaran y murieran.

VI. CONCLUSIONES.

1. Se demostró que existe un incremento en la síntesis temprana de ADN en ejes embrionarios de baja viabilidad y en ejes irradiados con luz ultravioleta.
2. Se sugiere que en los ejes embrionarios irradiados hay un desacoplamiento en el metabolismo general de la germinación, debido al daño causado al ADN.
3. El efecto diferencial de los inhibidores de la ADN polimerasa α , como ara-CTP, nov y afidicolina, en los extractos proteicos y en los núcleos de ejes embrionarios de alta viabilidad, sugiere que a t_{24} se está llevando a cabo la replicación del ADN y también sugiere la posibilidad de la presencia de una topoisomerasa de tipo II durante el proceso replicativo.
4. Se encontró que los sistemas enzimáticos (actividad de ADN polimerasas) son similares en los extractos proteicos y en los núcleos de ejes embrionarios de baja viabilidad y de irradiados. Se sugiere que la síntesis de ADN observada mediante estos sistemas podría ser de tipo reparativo, en la que pudiera intervenir la ADN polimerasa α . No se descarta la posibilidad de que la ADN polimerasa β intervenga en dicho proceso.
5. Se demostró que durante la pérdida de viabilidad de los ejes embrionarios de maíz, se presenta fragmentación del ADN.
6. La semejanza que existe entre los ejes embrionarios de

baja viabilidad y aquellos en que se ha inducido daño al ADN, en cuanto a la falta de integridad de su material genético y a la similitud de su patrón de inhibición, sugiere que un proceso de tipo reparativo del ADN debería ser un evento que se debería llevar a cabo durante las primeras horas y que permitiría a la semilla continuar el proceso normal de germinación.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Aldrich, S.R. y Leng, E.R. (1974) Producción Moderna del Maíz, 1a. edición, Ed. Hemisferio Sur. pp. 1-3.
2. Amileni, A., Sala, F., Cella, R. and Spadari, S. (1979) The major DNA polymerase in cultured plant cells: Partial purification and correlation with cell multiplication. Planta 146, 521-526.
3. Aposhian, H.V. and Kornberg, A. (1962) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. IX. The polymerase formed after T2 bacteriophage infection of Escherichia coli: a new enzyme. J. Biol. Chem. 237, 519-525.
4. Berger, N.A., Kurohara, K.K., Petzold, S.J. and Sikorski, G.W. (1979) Aphidicolin inhibits eukaryotic DNA replication and repair: Implications of DNA polymerase α in both processes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 50-58.
5. Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedrali-Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A. and Spadari, S. (1976) Variations of DNA polymerases- α and - β during prolonged stimulation of human lymphocytes. P.N.A.S. 73, 785-789.
6. Bewley, J.D. and Black, M. (1978) Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, Springer-Verlag. pp. 1,2,7-13.
7. Bollum, F.J. (1960) Calf thymus polymerase. J. Biol. Chem. 235, 2399-2403.
8. Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J. (1978) Characterization of the early synthesized DNA in germinating Triticum aestivum embryos. Phytochemistry 17, 1481-1484.
9. Burke, J.F., Duff, P.M. and Pearson, C.K. (1979) Effect of drugs on deoxyribonucleic acid synthesis in isolated mammalian cell nuclei: Comparison with partially purified deoxyribonucleic acid polymerases. Biochem. J. 178, 621-626.
10. Bray, C.M. and Chow, T.Y. (1976a) Lesions in post-ribosomal supernatant associated with loss of viability in pea (Pisum sativum) seeds. Biochim. Biophys. Acta 442, 1-13.
11. Bray, C.M. and Chow, T.Y. (1976b) Lesions in the ribosomes of non-viable pea (Pisum sativum) embryonic axes tissue. Biochim. Biophys. Acta 442, 14-23.

12. Bray, C.M. and Dasgupta, J. (1976) Ribonucleic acid - synthesis and loss of viability in pea seed. *Planta* 132, 103-108.
13. Brundret, K.M., Dalziel, W., Hesp, B., Jarvis, J.A.J. - and Neidle, S. (1972) X-ray crystallographic determination of the structure of the antibiotic aphidicolin: a tetracyclic diterpenoid containing a new ring system. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1027-1028.
14. Castroviejo, M., Tarragó-Litvak, L. and Litvak, S. -- (1975) Partial purification and characterization of two cytoplasmic DNA polymerases from ungerminated wheat. *Nucleic Acids Res.* 2, 2077-2090.
15. Chang, L.M.S. (1976) Phylogeny of DNA polymerase β . *Science* 191, 1183-1185.
16. Chang, L.M.S. and Bollum, F.J. (1973) A comparison of associated enzyme activities in various deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.* 248, 3398-3404.
17. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978) DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature* 272, 593-599.
18. Chen, D. and Osborne, D.J. (1970) Ribosomal genes and DNA replication in germinating wheat embryos. *Nature* - 225, 336-340.
19. Coetzee, M.L., Chou, R. and Ove, P. (1978) Selective - response of DNA polymerase β to bleomycin-induced breaks in DNA. *Cancer Res.* 38, 3621-3627.
20. Collins, A.R. and Johnson, R.T. (1979) Novobiocin: An inhibitor of the repair of UV-induced but not X-ray-induced damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 7, 1311-1320.
21. Collins, A.R., Schlor, S.L. and Johnson, R.T. (1977) - The inhibition of repair in UV-irradiated human cells. *Mutation Res.* 42, 413-432.
22. Collins, A.R., Squires, S. and Johnson, R.T. (1982) -- Inhibitors of repair DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 10, 1203-1213.
23. Craig, R.K. and Keir, H.M. (1975) Deoxyribonucleic -- acids polymerases of BHK-21/C 13 cells: Partial purification and characterization of the enzymes. *Biochem. J.* 145, 215-224.

24. Dell'Aquila, A., Lioi, L. and Scarascia, I. (1980) Deoxyribonucleic acid synthesis and deoxyribonucleic acid-polymerase activity during early germination of wheat embryos at high and low viability. *Biologia Plantarum* (PRAHA) 22, 287-293.
25. Dell'Aquila, A., Zocchi, G., Lanzane, G.A. and De Leo, P. (1976) Different forms of EF1 and viability in wheat embryos. *Phytochemistry* 15, 1607-1610.
26. De Vries, H. (1901) *Die mutationstheorie*, Vol. 1, Veit and Co.
27. Furth, J.J. and Cohen, S.S. (1968) Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9- β -D-arabinofuranosyladenine. *Cancer Res.* 28, 2061-2067.
28. Frindland, S. (1977) Effect of cytosine arabinoside on replicon initiation in human lymphoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 72-78.
29. Gardner, J.M. and Kado, C.I. (1976) High molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from crown gall tumor cells of periwinkle (*Vinca rosea*). *Biochemistry* 15, 688-697.
30. Gellert, M., O'Dea, M.H., Itoh, T. and Tomizawa, J.I. (1976) Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *P.N.A.S.* 73, 4474-4478.
31. Geuskens, M., Hardt, N., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1981) An autoradiographic demonstration of nuclear DNA replication by DNA polymerase α and of mitochondrial DNA synthesis by DNA polymerase γ . *Nucleic Acids Res.* 9, 1599-1613.
32. Giles, K.A. and Myers, A. (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206, 9.
33. Guilfoyle, T.Y. (1981) DNA and RNA polymerases in: *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf and E.E. Conn (ed.), Vol. 6: Proteins and Nucleic Acids, Academic Press. pp. 208-220.
34. Giulotto, E. and Mondello, C. (1981) Aphidicolin does not inhibit the repair synthesis of mitotic chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1287-1294.
35. Gunthardt, H., Smith, L., Haferkamp, M.E. and Nilan, R.A. (1953) Studies on aged seeds. II. Relation of age of seeds to cytogenic effects. *Agron. J.* 45, 438-441.

36. Hanaoka, F., Kato, H., Ikegami, S., Ohashi, M. and Yamada, M. (1979) Aphidicolin does inhibit repair replication in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 575-580.
37. Hardt, N., Pedrali-Noy, G., Focher, F. and Spadari, S. (1981) Aphidicolin does not inhibit DNA repair synthesis in ultraviolet-irradiated HeLa cells. *Biochem. J.* 199, 453-455.
38. Heydecker, W. (1972) *Vigour in: Viability of Seeds*, - E.H. Roberts (ed.), Syracuse University Press. pp. 209-252.
39. Hiss, E.A. and Preston, R.J. (1977) The effect of cytosine arabinoside on the frequency of single strand breaks in the DNA of mammalian cells following irradiation or chemical treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 478, 1-8.
40. Hubermann, J.A. (1981) New views of the biochemistry of eukaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase α . *Cell* 23, 647-648.
41. Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1979) - Functional roles of DNA polymerases β and γ . *P.N.A.S.* 76, 2316-2320.
42. Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. and Mano, Y. (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature* 275, 458-460.
43. Kornberg, A. (1980) *DNA Replication*, W.H. Freeman and Co. pp. 182, 425, 437.
44. Lakon, G. (1949) The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiol.* 24, 389-394.
45. Loeb, L.A. (1969) Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from nuclei of sea urchin embryos. *J. Biol. Chem.* 244, 1672-1681.
46. Marmur, J.J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
47. Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1975) *The Germination of Seeds*, 2nd. edition, Pergamon Press. pp. 1-8, 21-26.

48. McLennan, A.G. and Keir, H.M. (1975) The deoxyribonucleic acid polymerases of non-vertebrate eukaryotes. - *Biochem. Soc. Symp.* 42, 55-73.
49. Miller, M.R. and Chinault, D.N. (1982) The roles of - DNA polymerases α , β and γ in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. *J. Biol. Chem.* 257, 10204-10209.
50. Momparler, R.L. (1972) Kinetic and template studies - with 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate and mammalian deoxyribonucleic acid polymerase. *Mol. Pharmacol.* 8, 362-370.
51. Moore, E.C. and Cohen, S.S. (1967) Effects of arabinonucleotides on ribonucleotide reduction by an enzyme - system from rat tumor. *J. Biol. Chem.* 242, 2116-2118.
52. Mory, Y.Y., Chen, D. and Sarid, S. (1972) Onset of - deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat - embryos. *Plant Physiol.* 49, 20-23.
53. Mory, Y.Y., Chen, D. and Sarid, S. (1975) De novo bio synthesis of deoxyribonucleic acid polymerases during - wheat embryo germination. *Plant Physiol.* 55, 437-442.
54. Navashin, M.S. (1933) Ageing of seeds is a cause of - chromosome mutations. *Planta* 20, 233-243.
55. Nichols, C. (1941) Spontaneous chromosome aberration in Allium. *Genetics* 26, 89-100.
56. Nishio, A. and Uyeki, E.M. (1982) Inhibition of DNA - synthesis in permeabilized L cells by novobiocin. --- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 1448-1455.
57. Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai, R. (1980/81) - Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (Secale cereale). *Israel J. of Botany* 29, 259-272.
58. Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1979) Effect of aphidicolin on viral and human DNA polymerases. *Biochem. - Biophys. Res. Commun.* 88, 1194-1202.
59. Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
60. Peumans, W.J. and Carlier, A.R. (1981) Loss of protein synthesis activity in ageing wheat grains: Lesions in the initiation process and mRNA degradation. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 176, 384-395.

61. Roberts, B.E. and Osborne, D.J. (1973) Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The lability of transferase enzymes during senescence. Biochem. J. 135, 405-410.
62. Roberts, B.E., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973) - Protein synthesis and the viability of rye grains. Loss of activity of protein-synthesizing systems in vitro associated with a loss of viability. Biochem. J. 131, 275-286.
63. Roberts, E.H. (1972) Cytological, Genetical and Metabolic Changes Associated with Loss of Viability in: Viability of Seeds, E.H. Roberts (ed.), Syracuse University Press. pp. 253-265.
64. Roberts, E.H. and Abdalla, F.H. (1968) The influence of temperature, moisture and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans and peas. Ann. Bot. 32, 97-117.
65. Sáez, F.A. y Cardoso, H. (1978) Citogenética básica y biología de los cromosomas, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la O.E.A. pp. 73-77.
66. Sala, F., Galli, M.G., Levi, M., Burrioni, D., Parisi, B., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1981) Functional roles of the plant α -like and γ -like DNA polymerases. FEBS Lett. 124, 112-118.
67. Sala, F., Magnien, E., Galli, M.G., Dalschaert, X., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1982) DNA repair synthesis in plant protoplasts is aphidicolin-resistant. FEBS Lett. 138, 213-217.
68. Sala, F., Parisi, B., Burrioni, D., Amileni, A.R., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1980) Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the α -like DNA polymerase of plant cells. FEBS Lett. 117, 93-98.
69. Sax, K. and Sax, H.J. (1964) The effect of chronological and physiological ageing of onion seeds on the frequency of spontaneous X-ray induced chromo-aberrations. Radiat. Bot. 4, 37-41.
70. Schrecker, A.W., Graham-Smith, R. and Gallo, R.C. (1974) Comparative inhibition of purified DNA polymerase from murine leukemia virus and human lymphocytes by 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate. Cancer Res. 34, 286-292.

71. Sedwick, W.D., Wang, T.S.F. and Korn, D.J. (1975) "Cytoplasmic" deoxyribonucleic acid polymerase. Structure and properties of the highly purified enzyme from human KB cells. *J. Biol. Chem.* 250, 7045-7056.
72. Sen, S. and Osborne, D.J. (1977) Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (*Secale cereale*) embryos. *Biochem. J.* 166, 33-38.
73. Snyder, R. and Regan, J.D. (1981) Aphidicolin inhibits repair of DNA in UV-irradiated human fibroblasts. --- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1088-1094.
74. Srivastava, B.I.S. and Grace, J.T. (1974) A 7S DNA polymerase in the cytoplasmic fraction of higher plants. *Life Sci.* 14, 1947-1954.
75. Stevens, C. and Bryant, J.A. (1978) Partial purification and characterization of the soluble DNA polymerase (polymerase- α) from seedlings of *Pisum sativum* L. --- *Planta* 138, 127-132.
76. Tano, S. and Yamaguchi, H. (1977) Repair of radiation-induced single-strand breaks in DNA of barley embryos. *Mutat. Res.* 42, 71-78.
77. Tarragó-Litvak, L., Castroviejo, M. and Litvak, S. --- (1975) Studies on a DNA polymerase γ -like enzyme from wheat embryos. *FEBS Lett.* 59, 120-130.
78. Van Onckelen, A., Verbeek, R. and Khan, A.A. (1974) - Relationship of ribonucleic acid metabolism in embryo - and aleurone to α -amilase synthesis in barley *Plant Physiol.* 53, 562-568.
79. Villiers, T.A. (1974) Seed ageing: Chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiol.* 53, 875-878.
80. Villiers, T.A. and Edgecumbe, D. (1975) On the cause of seed deterioration in dry storage. *Seed Sci. Technol.* 3, 761-774.
81. Waters, R., Crocombe, K. and Mirzayans, R. (1981) The inhibition of DNA repair by aphidicolin or cytosine arabinoside in X-irradiated normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Mutation Res.* 94, 229-234.
82. Weissbach, A. (1977) Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 25-47.

83. Weissbach, A. (1979) The functional roles of mammalian DNA polymerases. Arch. Biochem. Biophys. 198, -- 386-396.
84. Wintersberger, U. and Wintersberger, E. (1970) Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. I. Partial purification and properties of two DNA polymerases from mitochondrial-free cell extracts. Eur. J. Biochem. 13, 20-27.
85. Yoneda, M. and Bollum, F.J. (1965) Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. I. Large scale purification of terminal and replicative deoxynucleotidyl transferases. J. Biol. Chem. 240, 3385-3391.