

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

4
201

"ACTIVIDAD DE LA DNA LIGASA EN
SEMILLAS DETERIORADAS DE MAIZ"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

PRESENTA: EDGAR TARCISIO VAZQUEZ RAMOS.

MEXICO, D.F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO

1. INTRODUCCION

1.1. La semilla y su estructura

1.2. Germinación, viabilidad y vigor

1.3. Daños genéticos relacionados con la pérdida de la viabilidad

1.4. Efecto del deterioro de las semillas en la síntesis de ATP y en la respiración

1.5. DNA ligasa

1.6. Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre viabilidad e integridad de los sistemas de síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz

2. HIPOTESIS

3. OBJETIVOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Soluciones amortiguadoras y reactivos utilizados

4.2. Métodos

4.2.1. Introducción del plásmido por transformación bacteriana

4.2.2. Extracción del DNA plasmídico

4.2.3. Ensayo de corte del DNA con enzimas de restricción

4.2.4. Ensayo de fosfatasa alcalina

4.2.5. Maracaje de extremos 5'PO₄ con ³²P

4.2.6. Deterioro de semillas

4.2.7. Imbibición de los ejes embrionarios

4.2.8. Extracción de la ligasa proveniente de ejes embrionarios de semillas de maíz

4.2.9. Ensayo de actividad de la DNA ligasa

4.2.10. Revelado de las placas de rayos X

4.2.11. Determinación de proteínas totales

4.2.12. Preparación de dietilaminoetil-celulosa

5. RESULTADOS

5.1. Actividad de la DNA ligasa

5.2. Actividad de la DNA ligasa en semillas deterioradas de maíz

5.3. Purificación parcial de la DNA ligasa

6. DISCUSION

7. CONCLUSIONES

8. REFERENCIAS

RESUMEN

Durante el almacenamiento inadecuado y el envejecimiento de las semillas la viabilidad de estas disminuye, además de que el DNA nuclear sufre rupturas. Uno de los primeros eventos que debe ocurrir en las semillas al empezar la germinación debe ser un proceso que repare el daño sufrido por el DNA. En este proceso participarían varias enzimas y una de las más importantes sería la DNA ligasa. Esta enzima cataliza la unión de desoxirribonucleótidos contiguos mediante un enlace fosfodiéster del extremo 3'-OH con el extremo 5'-PO₄ de una de las cadenas de un DNA de doble cadena.

La pregunta que surgió en base a los antecedentes antes mencionados fue si una de las causas de la disminución de la viabilidad de las semillas es que la DNA ligasa sea particularmente lábil al envejecimiento.

Para poder estudiar la actividad de la DNA ligasa, se montó la metodología y se determinaron algunos parámetros óptimos de reacción como tiempo, temperatura y concentración del cofactor (ATP).

Los resultados muestran que durante el envejecimiento de las semillas la actividad de la enzima disminuye y que ésta se recupera conforme pasa el tiempo de germinación (0-9 h). Igualmente se sugiere que existen dos formas de la enzima.

SUMMARY

During senescence and inadequate storage of seeds their viability is diminished. Since under these conditions nuclear DNA seems to be altered, one event that most probably occurs at the onset of germination is the process of DNA repair. Central to this process is DNA ligase which catalyzes the synthesis of phosphodiester bonds between adjacent 3'-hydroxyl to 5'-phosphoryl termini of deoxynucleotides hydrogen-bonded to a complementary strand.

We therefore decided to explore whether a particular labile DNA ligase is related to the loss of viability in seeds.

DNA ligase activity was studied using adapted methodology from reports previously published; some parameters such as time, optimal temperature and cofactor concentration were determined.

The results show that during senescence the DNA ligase activity decreases and that this activity is recovered some hours (9 h) after the onset of germination. Our findings also suggest the possible existence of two forms of the enzyme.

1. INTRODUCCION

1.1 La semilla y su estructura.

La semilla es un ensamblaje de células vivientes. Cada semilla contiene la potencialidad de generar un nuevo individuo de su especie. Está adaptada para sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones no favorables para el crecimiento de la planta, conservando entonces la posibilidad de permanecer viva por largos períodos (Thiman, 1980).

La semilla es una estructura en reposo; por lo general está sumamente deshidratada, adaptándose a la deshidratación por algunas señales aún desconocidas, pero es claro que en cuanto el nivel de contenido de humedad empieza a disminuir, la división celular del embrión se detiene y hay una atenuación progresiva de la síntesis de DNA y proteínas. Existen también algunos cambios estructurales tales como el número de crestas en las mitocondrias, una concentración notable del retículo endoplásmico, desaparición de vacuolas y una condensación de la cromatina nuclear. Como resultado de estos cambios en la organización citoplásmica y nuclear, el embrión de una semilla puede permanecer viable y con la capacidad de germinación por largos períodos (Thiman, 1980).

La semilla se desarrolla a partir de un óvulo fertilizado. Las semillas de las angiospermas por lo general están formadas de un embrión que es el resultado de la fertilización de una célula huevo en el saco embrionario y una célula masculina del tubo del polen; del endospermo, el cual proviene de la fusión de 2 núcleos

polares en el saco embrionario con otro núcleo del tubo del polen; y del perispermo desarrollado en la nucela y la testa o capa de la semilla, formada de uno o ambos integumentos alrededor del óvulo (fig. 1) (Bewley and Black, 1978a; Bewley and Black, 1986; Cutter, 1975; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

El embrión está compuesto del eje embrionario y uno o más cotiledones. El eje comprende la raíz embrionaria (radícula), el hipocotilo al cual están unidos los cotiledones y un tallo con las primeras hojas (plúmula). El cotiledón sencillo de estos embriones se convierte en el escutelo (Bewley and Black, 1978a; Cutter, 1975; Esau, 1972; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

La forma y el tamaño del embrión es variable en relación a las otras estructuras dentro de la semilla. Esto depende de la forma del ovario, las condiciones bajo las cuales la planta progenitora creció durante la formación de la semilla y obviamente, de la especie. En monocotiledoneas y dicotiledoneas con un endospermo bien desarrollado en la semilla madura, el embrión ocupa menos espacio que en una semilla no endospermica (Bewley and Black, 1978a; Bewley and Black, 1986; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

La envoltura o testa de la semilla se origina de la planta progenitora y normalmente se desarrolla de los integumentos del óvulo. La testa es de considerable importancia para la semilla ya que en ocasiones es la única barrera entre el embrión y el medio externo. La testa es generalmente una capa dura; en algunos casos está presente una testa interna delgada formada por el integumento interno. La naturaleza protectora de la testa se debe a la presencia de una cutícula externa y una interna, en ocasiones

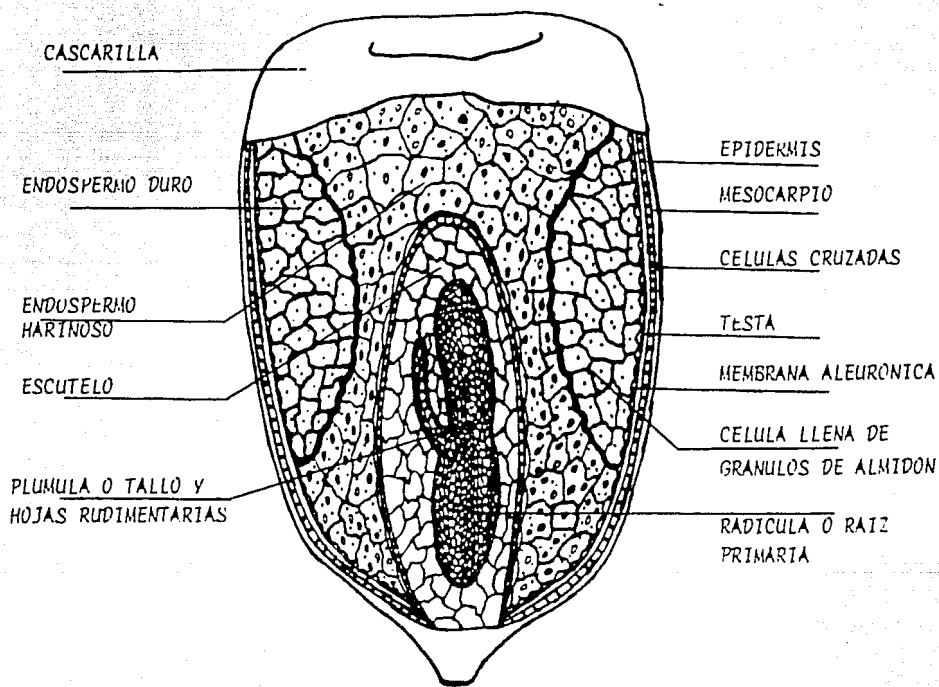


Fig. 1. Diagrama de sección longitudinal de una semilla de maíz.

impregnada de ceras o grasas y una o más capas de una pared celular gruesa. Estas características confieren a la testa un grado de impermeabilidad al agua y/o gases, incluyendo al oxígeno, así que ésto puede consecuentemente ejercer una influencia regulatoria sobre el metabolismo y el crecimiento de los tejidos y organos internos de la semilla. En algunos casos, la testa puede ser mucilaginososa y debido a esto tener una importante función en la retención del agua y dispersión de la semilla (Bewley and Black, 1978a; Bewley and Black, 1986).

El endospermo se deriva, como el embrión, del material genético tanto materno como paterno. Sus núcleos primarios proceden de la triple fusión de dos núcleos polares con uno de los núcleos espermáticos. Frecuentemente el tejido endospermico es triploide, pero su ploidia puede ser muy alta y difiere en varias regiones del endospermo. Esta poliploidia procede de procesos secundarios después de la división del núcleo primario (Thiman, 1980).

La semilla normal contiene material de nutrición el cual utiliza durante el proceso de germinación. Este material está frecuentemente presente en el endospermo, como es el caso del maíz y del trigo. El endospermo puede contener una variedad de materiales almacenados como almidón, hemicelulosas, aceites y/o proteínas, aunque una semilla puede o no tener endospermo y éste no es siempre la principal localización del material de reserva. En muchas plantas el endospermo esta muy reducido. En estos casos el material de reserva esta presente en toda la semilla, como es el caso del frijol. En algunas plantas el material de reserva esta contenido en el perispermo. El perispermo se origina de la nucela

y no del saco embrionario como en el caso del endospermo (Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

Durante el desarrollo de la semilla el endospermo rodea al embrión y puede persistir como un tejido relativamente grande hasta que la semilla esta casi por crecer. Pero cuando el embrión acelera su crecimiento, el endospermo puede ser absorbido o convertido en una capa fina y el embrión ocupará virtualmente toda la semilla (Bewley and Black, 1978a).

Dentro del grupo de las angiospermas, se encuentra la familia de las gramíneas. El maíz pertenece a la familia de las gramíneas y como miembro de este grupo botánico posee sistema de raíces fibrosas, hojas alternadas, dos hileras de vainas paralelas en las hojas, hojas separadas de la vaina, tallos cilíndricos con nódulos sólidos y flores más o menos espigadas (Matz, 1969).

El maíz tiene como nombre botánico *Zea mays* Linnaeus; es una planta monoica; un arbusto robusto erecto y anual, nativa de America. Es el único cereal sistemáticamente cultivado por los Indios Americanos. El nombre "maíz" proviene del nombre que le daban los haitianos al cereal, quienes le denominaban mahiz (Cutter, 1975; Matz, 1969).

El maíz es la segunda planta alimenticia más importante del mundo, desde el punto de vista de producción. Con el descubrimiento de dos mutantes de maíz con alto contenido de lisina, el maíz juega un papel aún más importante en la nutrición humana y animal (Jugenheimer, 1976; Matz, 1969).

1.2. Germinación, viabilidad y vigor.

Podemos considerar a la germinación de las semillas de las plantas superiores como un número consecutivo de eventos que se suceden en una semilla inmóvil, con bajo contenido de agua y que se manifiesta como una elevación en su actividad metabólica general para iniciar la formación de una planta a partir de un embrión, esto es, pasar del estado de vida latente a la vida activa para producir una planta semejante a aquella de la cual provino (Bewley and Black, 1978b; Bewley and Black, 1986; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

Para que las semillas puedan germinar, es necesario que reúnan ciertas condiciones propias de la semilla o intrínsecas y que además ocurran otras dependientes del medio en que se hallan o condiciones extrínsecas. Entre las primeras podemos destacar que las semillas estén sanas, bien formadas y que hayan alcanzado una madurez fisiológica. Entre las condiciones extrínsecas, las más importantes son el agua, la temperatura, el aire o composición gaseosa de la atmósfera, así como la luz en algunos casos (Bewley and Black, 1978a; Bewley and Black, 1986; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

La germinación comienza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y termina con el inicio de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Esto implica numerosos eventos como hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular (Bewley and Black, 1978a; Bewley and Black, 1986; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

El agua es indispensable para romper los tegumentos, facilitar la salida del embrión y también para las reacciones

químicas de estos procesos (Bewley and Black, 1978b).

El aire es necesario para la respiración de la semilla, tal como lo es para las plantas, pues en atmósfera carente de oxígeno no germinan (Bewley and Black, 1978b).

La temperatura es específica para cada especie y cada una tiene una temperatura mínima por debajo de la cual no germina, una máxima por arriba de la cual tampoco puede germinar y por supuesto una temperatura óptima de crecimiento (Bewley and Black, 1978b).

Las semillas son bastante resistentes a condiciones extremas, por decirlo así, ya que están en estado de desecación. Como resultado de esto, pueden retener su habilidad para germinar (viabilidad), por períodos considerables. El lapso durante el cual las semillas pueden permanecer viables es extremadamente variable y depende de las condiciones de almacenamiento y del tipo de semilla. En general, la viabilidad es retenida mejor bajo condiciones en las cuales la actividad metabólica de las semillas está bastante reducida, por ejemplo, bajas temperaturas y altas concentraciones de dióxido de carbono. El período por el cual las semillas permanecen viables está determinado genéticamente y por factores ambientales. Al parecer, las condiciones de sequedad son esenciales para el almacenamiento y retención de la viabilidad, aunque algunas semillas permanecen viables cuando se conservan sumergidas en agua. (Bewley and Black, 1978b; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975; Thiman, 1980).

La viabilidad es retenida por largos períodos, especialmente en semillas que tienen una cubierta dura, como en las leguminosas, donde su viabilidad es retenida por varias décadas (Bewley and Black, 1984; Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

No sólo el agobio por almacenamiento es lo que hace que la semilla pierda su viabilidad. Una variedad de factores a los cuales estuvo sometida la planta progenitora durante la formación y maduración de la semilla pueden también afectar la viabilidad de la semilla. Tales factores incluyen: disponibilidad de agua, temperatura, nutrición mineral, luz, etc; aunque estos factores ambientales son de importancia secundaria, comparados con los del control genético de viabilidad de la semilla (Mayer and Poljakof-Mayber, 1975).

En términos generales el vigor se define como la habilidad que tiene una semilla de crecer correcta y rápidamente. Una definición más amplia es la habilidad de una semilla para producir una planta bien formada capaz de incrementarse en tamaño y volumen mientras todavía dependa de sus propias reservas. El vigor de la planta o semilla es usualmente caracterizado por el peso de la planta después de un período de crecimiento en un ambiente dado; en la cantidad de reservas que están presentes, la rapidez con la cual éstas son movilizadas y la eficiencia de su metabolismo (Roberts, 1972).

1.3 Daños genéticos relacionados con la pérdida de la viabilidad.

Se sabe que los factores que influyen principalmente en la longevidad de una semilla en almacenamiento son temperatura y humedad. Estudios realizados por un gran número de investigadores en una amplia variedad de semillas y granos, han mostrado que casi cualquier combinación de tiempo, temperatura y humedad lleva a la

pérdida de la viabilidad durante el almacenaje y también a una gran cantidad de daños genéticos en los sobrevivientes (Bewley and Black, 1978b).

Las semillas pueden acumular daño cromosomal durante años y cuando la frecuencia de células afectadas excede un valor crítico, el embrión no puede germinar y se clasifica como muerto. Sin embargo, no debemos olvidar que las lesiones citoplásmicas son probablemente acumuladas al mismo tiempo que las otras y ésto, independientemente o en conjunción con las lesiones nucleares, puede constituir los cambios letales (Bewley and Black, 1978b).

La mayoría de las células con cromosomas aberrantes de semillas supervivientes no persisten más allá de una simple división celular, ya que las células hijas contienen grandes desbalances genéticos y desaparecen desde el estado de células apicales antes de que la raíz crezca. Un daño genético menor, por mutaciones en genes recesivos puede persistir y puede ser enmascarado por los alelos dominantes, teniendo un efecto mínimo en el metabolismo celular. Sin embargo, algunos genes recesivos pueden ser letales en células haploides (Bewley and Black, 1978b).

Abdalla y Roberts (1968), han sugerido que el número de aberraciones cromosómicas observadas en la primera división celular durante la germinación, puede ser tomado como una medida del daño acumulado durante el período de almacenamiento. Se ha observado un alto número de aberraciones cromosomales en plantas provenientes de semillas viejas.

Peto (1933), trabajó con semillas de maíz y parece haber sido el primero en observar que ocurrían frecuentes aberraciones cromosomales visibles en células de raíces de semillas viejas.

Pero no sólo el envejecimiento de las semillas puede ocasionar rupturas y aberraciones cromosomales. Por ejemplo, el almacenamiento a temperatura alta puede ser también la causa de rompimiento cromosomal. Una serie de trabajos por Navashin y Shkvarnikov (Navashin 1933, Shkvarnikov 1936 y 1939), en trigo, muestran que tratamientos de semillas frescas con temperatura de 50-60°C por 20 días tienen un efecto comparable en cuanto a la producción de aberraciones cromosomales con aquellas semillas almacenadas por 6-7 años a temperatura ambiente. En contraste, Smith (1943-1946) reportó que la exposición de semillas de cereales a temperatura de 50-70°C por 5-15 días o a 80°C por 45-80 min no presentan o tienen pocos efectos sobre la frecuencia de aberraciones cromosomales.

Cheah y Osborne (1978), reportaron que cuando una semilla pierde viabilidad, el peso molecular del DNA disminuye y esto ocurre debido a los rompimientos que sufre el DNA principalmente nuclear. La pérdida de viabilidad es muy rápida a altas temperaturas y humedades y es poco probable que esto se pueda explicar por mecanismos casuales; sin embargo, la acción de nucleasas (endonucleasas) pareciera ser el mecanismo más común para que el peso molecular del DNA disminuya.

García Rendon, M. (1985), reportó que tratamientos con temperatura y/o humedad altas producen deterioro en semillas de maíz Chalqueño, lo que se refleja en una disminución de la viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas y que parece haber una relación directa con la baja en la integridad del DNA. Otro hallazgo importante es el hecho de que en semillas tratadas 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con 100% de humedad relativa, se

presenta una caída considerable en la incorporación de $^3\text{[H]}$ timidina al material insoluble en ácido tricloroacético (síntesis de DNA) desde las primeras horas de germinación, por lo que sugiere que ambos tratamientos han afectado el aparato de síntesis de DNA y que al parecer no hay reparación del daño durante las primeras 15 horas de germinación.

Meléndez López S.G. (1987), demostró que el DNA de las semillas de maíz (var. Chalqueño) tanto de semillas control como de semillas que fueron tratadas con temperatura y/o humedad, se encuentra fragmentado al iniciar la germinación y que el peso molecular del DNA se recupera conforme avanza la germinación (0-15 h), por tal motivo se puede sugerir que sucede un proceso de tipo reparativo durante este tiempo de germinación.

Vázquez Ramos et al. (1988) mencionan que debido a los tratamientos con temperatura y/o humedad a que fueron sometidas las semillas de maíz la actividad de la DNA polimerasa disminuye, pero que conforme avanza el tiempo de germinación (0-15 h) la actividad de la enzima se recupera debido a una síntesis *de novo*. Además, el efecto de los tratamientos sobre la actividad de la DNA polimerasa no parece ser un efecto general sobre todas las enzimas presentes en la semilla seca ya que al medir otras enzimas no relacionadas con el metabolismo del DNA se encuentra que algunas como la catalasa y la alcohol deshidrogenasa no sufren alteración alguna, mientras que la actividad de otras como la malato deshidrogenasa disminuye considerablemente.

Villiers (1974), reportó que también las semillas de lechuga que son almacenadas en condiciones de sequedad al parecer permiten la acumulación de daños nucleares, en un grado más o menos rápido

dependiendo de las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, siendo ésta una semilla latente, condiciones de almacenamiento con imbibición de agua permitían a la semilla mantenerse con una alta capacidad de germinación y un alto grado de estabilidad genética.

Un daño cromosomal intenso puede perjudicar la actividad de molde del DNA y así reducir la síntesis de RNA y finalmente la síntesis de proteínas. Los efectos en la transcripción y la traducción perturbarán la germinación ya que ella depende de estos procesos. Es por ello que puede afirmarse que el DNA juega un papel importante en la pérdida de la viabilidad (Bewley and Black, 1978b).

Además, Cheah y Osborne (1978) mencionan que las semillas con un bajo porcentaje de viabilidad tienen una disminución en la habilidad para sintetizar RNA y proteínas; mencionan también que existe una falla en el acoplamiento respiratorio, una pérdida de la actividad de enzimas (deshidrogenasas, transferasas GTP dependientes), fallas en los ribosomas y pérdida del RNA rico en poli A de vida larga.

También, Muro Rico, M. (1986) reportó que al someter las semillas de maíz a tratamientos de temperatura y/o humedad, se provoca deterioro que se manifiesta en la incapacidad de sintetizar RNA y proteínas en las primeras 15 horas de germinación.

La pérdida progresiva de la integridad del RNA ribosomal en semillas secas ha sido demostrada durante el proceso de envejecimiento. Los rRNA's 18 S y 25 S sufren una gran degradación por la acción de las ribonucleasas que son extremadamente resistentes al deterioro, ya que a pesar de que la semilla esté

muerta, o sea, no viable, dichas enzimas todavía pueden ser aisladas y permanecer activas (Thiman, 1980).

Todos estos son eventos asociados con germinación lenta y pérdida de viabilidad y vigor.

1.4. Efecto del deterioro de las semillas en la síntesis de ATP y en la respiración.

La actividad mitocondrial en semillas viables aumenta con el tiempo después de empezada la imbibición y ocurre un acoplamiento más eficiente en la síntesis de ATP y mayor consumo de oxígeno (Thiman, 1980).

En embriones de centeno, arroz y maíz no viables, se observa una apariencia anormal en la ultraestructura de la mitocondria, además de observarse de un tamaño mayor. A los dos o tres días ocurre una lisis completa. Las semillas de maíz que no pueden germinar consumen poco oxígeno; recientemente se ha querido correlacionar la disminución en la actividad de enzimas respiratorias con un intercambio gaseoso reducido (Thiman, 1980).

La membrana externa de muchas mitocondrias está deformada formando vesículas y está dissociada de la membrana interna que también se encuentra desorganizada. La membrana plasmática se encuentra frecuentemente separada de la pared celular y además la semipermeabilidad y la integridad molecular se encuentran dissociadas. La membrana nuclear también presenta rupturas e irregularidades (Thiman, 1980).

No se conoce hasta que punto la disminución de la actividad de enzimas respiratorias contribuye al deterioro del proceso

respiratorio; pero recientemente se ha observado que la síntesis de algunas enzimas e isoenzimas respiratorias se lleva a cabo en embriones viables pero no en los no viables (Thiman, 1980).

La pérdida de viabilidad de semillas en estado seco es un evento progresivo expresado en la germinación por fallas en el vigor de los embriones y un bajo establecimiento de las plantas. En términos bioquímicos ésta pérdida del vigor aparece como un decremento en la actividad mitocondrial (Abu Shakra y Ching, 1967), baja actividad de enzimas respiratorias (Lakṣṇ, 1949) y una baja producción de ATP (Ching, 1973). Pero la mayor lesión es la falla progresiva del sistema de síntesis de proteínas.

1.5. DNA ligasa.

Debido a que el almacenamiento inadecuado y el envejecimiento de las semillas causa que el DNA sufra rupturas, uno de los procesos que debe ocurrir al iniciar la germinación debe ser la reparación del daño sufrido. Una de las enzimas más importantes en este proceso es la DNA ligasa.

La DNA ligasa es la enzima que cataliza la unión de nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster del extremo 3'-OH con el extremo 5'-PO₄ de una de las cadenas de un DNA de doble cadena. Esta función la realiza con la concomitante ruptura de NAD a AMP y NMN o de ATP a AMP y PPI, dependiendo de la fuente de donde provenga (fig. 2) (Kornberg, 1974).

Esta enzima es muy importante en el metabolismo del DNA ya que participa en recombinación genética, replicación y reparación (Kornberg, 1974).

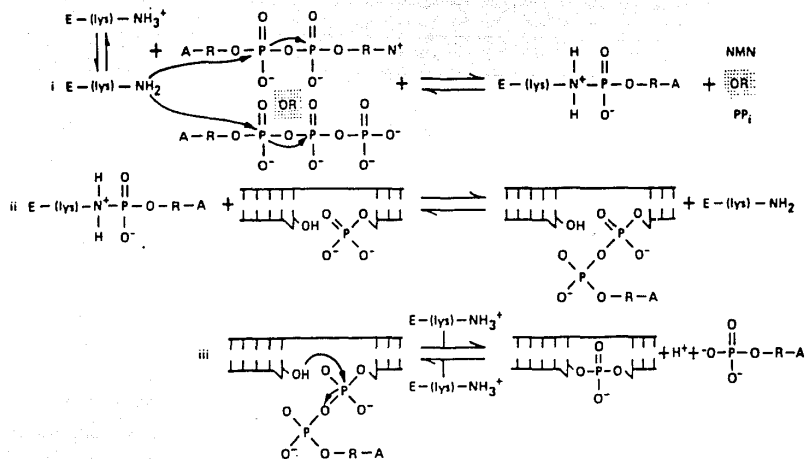


Fig. 2. Mecanismo de reacción de la DNA ligasa.

i) Formación del complejo Enzima-AMP por la ruptura de ATP o NAD⁺ por el ataque nucleofílico del ε-amino del residuo de lisina de la enzima al fosforo α en relación a la Adenina.

ii) Unión del AMP del complejo al extremo 5'-PO₄ del DNA para formar una unión pirofosfato.

iii) Ataque nucleofílico del OH del extremo 3' del DNA al fosforo 5', formación del enlace fosfodiéster y liberación de AMP.

Tomado de Lehman, 1974.

Martín Gellert (1967) al parecer, fue el primero en reportar de manera concluyente la actividad de una enzima en extractos de E. coli que es capaz de formar círculos covalentemente cerrados de DNA del fago λ . Para ello, se basó en el grado de sedimentación del DNA en gradientes alcalinos de sacarosa y microscopía electrónica. Esta actividad requería de iones magnesio.

En 1967, Olivera y Lehman reportaron que mediante un proceso de ruptura y re-unión se llevaba a cabo la recombinación genética. Este era un proceso muy similar al que ocurría durante la reparación en oscuridad del DNA irradiado con luz U.V.

Todos éstos procesos eran llevados a cabo por una enzima que provenía de extractos de E. coli y que realizaba la función bajo condiciones específicas, por ejemplo, que los nucleótidos a ser unidos pertenecieran a una doble cadena de DNA y que estuvieran en la misma cadena. Esta enzima requería de cationes divalentes (Mg^{2+} o Ca^{2+}) y un cofactor que era termoestable. La actividad la midieron utilizando poli dA/oligo dT.

En ese mismo año, Olivera y Lehman (1967), reportaron que el cofactor de la enzima era NAD y que éste se rompía en AMP y NMN. También observaron que se necesitaba un extremo 3'-OH para que se llevara a cabo la reacción ya que si éste era cambiado por un extremo 3'-PO₄ (aunque el extremo 5' fuera OH), la reacción disminuía grandemente (aprox. 80%). Además, estos mismos autores reportaron en 1968 otra actividad de la enzima que era la formación de círculos de DNA de cadena sencilla de copolímeros de dAdT.

Weiss et al. (1968), publicaron un reporte sobre la actividad de la enzima en extractos de E. coli que había sido infectada por

el fago T4. Esta enzima utiliza ATP en vez de NAD como cofactor, el cual también es escindido en AMP y PPI. Este estudio lo realizaron utilizando DNA del fago T7, el cual fue tratado con DNasa pancreática para producir rompimientos en cadena sencilla y así obtener los grupos 3'-OH y 5'-PO₄ terminales. Después trataron con fosfatasa alcalina para sustituir los grupos PO₄ de los extremos 5' por fosfatos marcados radiactivamente adicionando polinucleótido cinasa y ATP [γ -³²P] y observaron la marca unida a doble cadena. Además nuevamente agregaron fosfatasa alcalina para asegurarse que el DNA estuviera covalentemente ligado y no hubiera liberación de ³²P. Los resultados que obtuvieron fueron similares a los de Olivera y Lehman.

En ese mismo año Weiss et al. publicaron algunas propiedades de la DNA ligasa, como el recambio entre ATP y PPI y la formación de un complejo enzima-AMP intermediario de la reacción de unión de los extremos del DNA.

En 1974 Lehman publicó un artículo resumiendo algunas de las características de la enzima de E. coli y la del fago T4. El peso molecular para la enzima de E. coli está entre 74-77000 D y la del fago T4 entre 63-68000 D. Ambas utilizan diferente cofactor siendo NAD el de la ligasa de E. coli y ATP el de la del fago T4. La DNA ligasa del fago T4 puede catalizar la unión de oligodesoxirribonucleótidos u oligorribonucleótidos en un híbrido duplex RNA-DNA, lo que la enzima de E. coli no puede hacer.

El primer indicio de la actividad de la DNA ligasa en células eucarióticas fue reportado por Lindahl y Edelman en 1968 en células de médula ósea y de bazo de conejo. La actividad era muy similar a la actividad de la enzima de E. coli infectado por el

fago T4. Ambas enzimas son dependientes de ATP.

Howell y Stern en 1971 también reportaron la actividad de la enzima en eucariontes. El sistema de estudio que utilizaron fue microsporocitos de azucena en desarrollo.

Más tarde se observó que aparentemente existían dos tipos de DNA ligasas que podían ser separadas mediante procedimientos serológicos. En este reporte, Söderhall y Lindahl (1975), mencionan que existen dos actividades. Por una parte, una mayor correspondiente a una DNA ligasa que esta presente en extractos de timo de ternera, que requiere ATP y que tiene un peso molecular de 175-220000 D. Esta enzima denominada DNA ligasa I actúa de manera muy similar a la de E. coli infectada por el fago T4. Además de esta actividad, en los extractos se encontraron con una segunda que también requiere ATP, pero tiene propiedades diferentes de fraccionamiento y es más lábil a la temperatura que la ligasa I. Los anticuerpos contra la DNA ligasa I no inhiben la actividad de la otra enzima.

En 1982 Teraoka y Tsukada, mencionan que la DNA ligasa I se encuentra en el citoplasma y que la DNA ligasa II se encuentra en el núcleo y es de menor peso molecular, además de que la actividad de la DNA ligasa I es mayor cuando la célula está en crecimiento, mientras que la de la DNA ligasa II parece permanecer constante.

Arrand et al. (1986), mencionan que el peso molecular de la DNA ligasa I está entre 180-200000 D y la DNA ligasa II de 80000 D. La DNA ligasa I solo une oligodesoxirribonucleótidos mientras que la DNA ligasa II puede unir oligodesoxirribonucleótidos alineados a polirribonucleótidos complementarios. La ligasa I puede unir extremos rasurados cosa que la ligasa II no puede

hacer.

Elder et al. (1987), reportaron la actividad de la DNA ligasa proveniente de embriones de centeno, mencionando la relación entre la actividad de la enzima y la reparación del DNA alterado tanto por envejecimiento como por daño con rayos γ , haciendo notar que la actividad de la enzima disminuye a causa del deterioro y que no se recupera con el tiempo de imbibición (0-6 h), además de que los rayos γ no estimulan la actividad de ésta a pesar de que causan mayor daño al DNA.

Daniel y Bryant (1988), estudiando semillas de chícharo encontraron dos actividades de DNA ligasa, una unida a cromatina y otra soluble. La actividad de la enzima unida a cromatina aumenta conforme pasa el tiempo de imbibición (8-48 h) y después decae (48-72 h), en tanto que la enzima soluble aumenta durante todo el tiempo en que se hizo el experimento (8-72 h). Ambas formas son inhibidas por dTTP (y no por otro dNTP), siendo más sensible la forma soluble.

Los genes de las DNA ligasas de Schizosaccharomyces pombe y el de Saccharomyces cerevisiae han sido clonados, secuenciados y comparados, observándose que existe una gran homología entre ellos, sobre todo en el lugar que se sugiere constituye al sitio activo y que posee a la lisina donde se une el ATP (Barker et al., 1987).

1.6. Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre viabilidad e integridad de los sistemas de síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz.

En el laboratorio estamos interesados en el metabolismo del DNA y su relación con el deterioro de las semillas de maíz.

Se han encontrado algunos factores que son alterados debido al deterioro de las semillas como son : disminución de la viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas (García, 1985), pérdida de la integridad del DNA, caída de la síntesis de DNA (García, 1985), RNA y proteínas (Muro, 1986), disminución de la actividad de la DNA polimerasa durante las primeras horas de la germinación y su posterior recuperación debido a una síntesis de novo (Vázquez, 1986; Vázquez et al, 1988), (aunque no todos los tratamientos que provocan disminución de la viabilidad disminuyen la actividad de la DNA polimerasa ya que los rayos γ afectan la viabilidad pero no la actividad de la DNA polimerasa). También se ha observado que el DNA se encuentra fragmentado al iniciarse la germinación y que conforme avanza el tiempo de germinación (0-15 h) la integridad del DNA se recupera sugiriendo la presencia de un proceso de tipo reparativo (Meléndez, 1987).

La pregunta que surgió a partir de éstos antecedentes fue si una de las causas de la caída de la viabilidad de las semillas de maíz era debida a que la DNA ligasa fuera particularmente lábil a los tratamientos de temperatura y/o humedad. Esto, aunado a la caída en la capacidad de síntesis de RNA y proteínas y junto con la caída de la actividad de la DNA polimerasa, explicaría por qué a pesar de que al parecer el DNA recupera su integridad las semillas siguen siendo poco viables.

2. HIPOTESIS

Una de las causas de la disminución de la viabilidad de las semillas es debida a la alteración de la actividad de la DNA ligasa, la cual es particularmente lábil a tratamientos de temperatura y/o humedad.

3. OBJETIVOS

Montar la metodología para medir la actividad de la DNA ligasa.

Comparar la actividad de la enzima proveniente tanto de semillas sin tratar como de semillas tratadas.

Realizar una purificación parcial de la enzima.

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1. MATERIALES:

Material Biológico:

Las semillas de maíz utilizadas en este trabajo fueron variedad Chalqueño, las cuales fueron proporcionadas por PRONASE (Productora Nacional de Semillas) al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.

Reactivos:

Soluciones amortiguadoras y reactivos utilizados.

4.1.1. Medio de cultivo Luria:

Triptona	10g/l
Extracto de levadura	5g/l
NaCl	5g/l
Timidina	50mg/l
Agar (para medio sólido)	12g/l
Ampicilina (para medio selectivo)	20mg/l

4.1.2 Solución amortiguadora STE:

Tris-HCl	pH=7.5	10mM
NaCl		10mM
EDTA		1mM

4.1.3. Solución amortiguadora TE:

Tris-HCl	pH=7.5	10mM
EDTA		1mM

4.1.4. Soluciones amortiguadoras para digestión por endonucleasas de restricción:

Concentración media de sales (10X):

Tris-HCl	pH=7.5	500mM
NaCl		600mM
MgCl ₂		70mM

Concentración alta de sales (10X):

Tris-HCl	pH=7.5	60mM
NaCl		1500mM
MgCl ₂		60mM

4.1.4. Solución amortiguadora para carga del gel (10X):

Sacarosa	37%
EDTA	50mM
SDS	0.01%
Azúl de bromofenol	0.1%

4.1.5. Solución amortiguadora TBE para electroforesis:

Tris base	89mM
Ácido bórico	89mM
EDTA	2mM

4.1.6. Solución amortiguadora para fosfatasa alcalina (10X):

Tris-HCl	pH=9.0	500mM
MgCl ₂		10mM
ZnCl ₂		1mM
Espermidina		10mM

4.1.7. Solución amortiguadora para polinucleótido cinasa (10X):

Tris-HCl	pH=7.6	500mM
MgCl ₂		100mM
DTT		50mM
Espermidina		1mM
EDTA		1mM

4.1.8. Extracción de plásmido por lisis alcalina:

Solución I:

Tris-HCl	pH=8.0	25mM
Glucosa		50mM
EDTA		10mM

Solución II:

NaOH		0.2N
SDS		1%

4.1.9. Solución amortiguadora para imbibición de embriones:

Tris-HCl	pH=7.6	50mM
KCl		50mM
MgCl ₂		10mM
Sacarosa		2%

Cloranfenicol**50µg/ml****4.1.10. Solución amortiguadora para homogenación de embriones:**

Tris-HCl	pH=7.8	50mM
KCl		500mM
Sacarosa		250mM
Bisulfito de sodio		10mM
DTT		2mM
EDTA		1mM
PMSF		1mM

4.1.11. Solución amortiguadora para medir la actividad de la DNA ligasa:

Tris-HCl	pH=7.8	20mM
MgCl ₂		5mM
BSA		2mg/ml
ATP		5mM
KCl		20mM

4.1.12. Líquido de centelleo:**(1,4-bis(2-(5-feniloxazolil))**

benceno (Mz PDPDP)	0.1g
2,5-Difeniloxazol (PPO)	5.0g
Tolueno	1.0 lt

4.1.13. Reactivo "A" para la determinación de proteínas:

Desoxicolato de sodio (DOC)	0.15%
-----------------------------	-------

Acido tricloroacético (TCA)	72%
Solución de Cobre-Tartrato- Carbonato (CTC):	
Na ₂ CO ₃	10%
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1%
Tartrato de sodio y potasio	0.2%

(estable por dos semanas a temperatura ambiente)

4.1.14. Reactivo "B" para la determinación de proteínas:

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1 volumen
Agua desionizada	5 volúmenes

4.1.15. Soluciones amortiguadoras de cloruro de sodio:

Todas las soluciones de cloruro de sodio utilizadas para la purificación de la enzima por cromatografía en columna contenían los mismos reactivos; lo único que varió fue la concentración de cloruro de sodio.

Tris-HCl	pH=7.5	50mM
EDTA		1mM
Glicerol		10%
β-mercaptoetanol		1mM
PMSF		0.15mM
Solución amortiguadora "A":		
Cloruro de sodio		10mM
Solución amortiguadora "B":		
Cloruro de sodio		400mM

Solución amortiguadora "C":

Cloruro de sodio

600mM

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Introducción del plásmido por transformación bacteriana. (Maniatis et al., 1982).

1. Crecer la bacteria en medio de Luria líquido durante toda la noche a 37°C.
2. Pasar 1/50 del volumen inicial a un matraz erlenmeyer de 50 ml con 20ml de medio de Luria líquido e incubar a 37°C durante 2-3 hr con agitación vigorosa.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se transfiere a tubos de centrifuga (estériles) y se centrifuga a 3000 rpm en una centrifuga clínica, 10 min a 4°C.
4. Se decantan y se resuspenden en 1/2 del vol. total con CaCl₂ 50mM (frio), reposan 5 min en frio. Centrifugar 10 min. a 3000 rpm en una centrifuga clínica a 4°C.
5. Se decantan y se resuspenden en 1/15 del volumen total con CaCl₂ (frio). Se dejan reposar 1 h en frio.
6. Pasar 0.2 ml a un tubo eppendorf que contiene 1 µl de DNA en 100µl de Tris 10mM pH 7.5 y mezclar. Reposar por 25 min en hielo.
7. Dar un choque térmico a 37°C por 2 min. Reposar 10 min a temperatura ambiente.
8. Transferir a un tubo que contiene 3 ml de medio de Luria líquido e incubarlo a 37°C por 1 h.
9. Centrifugar a 3000 rpm, 10 min a temperatura ambiente. Resuspender en el líquido remanente y sembrar en cajas con medio de cultivo sólido (en este caso se observa el desarrollo de las bacterias en medios que contienen antibiótico ya que el plásmido transferido contiene la resistencia al antibiótico).

4.2.2. Extracción del DNA plasmídico. (Maniatis et al., 1982)

1. Crecer las bacterias en 500 ml de medio líquido de Luria en un matraz de 2 litros con aereación vigorosa por 24 h.
2. Recolectar las células por centrifugación a 3000 xg, 10 min a 0°C, en botellas de centrifugación.
3. Lavar las células con 10-20 ml de STE frio. Transferir las células a tubos de centrifuga y centrifugar a 5000 rpm, 10 min

a 0°C.

4. Resuspender cada pastilla en 6 ml de sacarosa al 25% en Tris 50mM pH 8.

5. Adicionar 2 ml de lisozima (10 mg/ml). Mezclar suavemente en hielo por 5 min.

6. Adicionar 2 ml de EDTA 500mM pH 8.5 frío. Mezclar suavemente en hielo por 5 min.

7. Adicionar 10 ml de una solución fría de Tritón (0.1 ml de Tritón X-100, 12.5 ml de EDTA 500mM, 5ml de Tris 1M y 80 ml de H₂O). Mezclar suavemente y dejar reposar en hielo por 10 min.

8. Centrifugar 60 min, 15 000 rpm a 0°C.

9. Recuperar el sobrenadante y extraer con 4 ml de fenol saturado con STE. Centrifugar 10 min, 12 000 xg a 0°C para separar fases.

10. Remover la fase acuosa y adicionar 1/20 del volumen total de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar y colocar a -70°C por 30 min.

11. Centrifugar 60 min, 10 000 rpm a -10°C. Resuspender la pastilla en 14.4 ml de STE.

12. Adicionar 15g de CsCl sólido y 0.6 ml de bromuro de etidio 10 mg/ml. Transferir a tubos de ultracentrifugación.

13. Centrifugar a 130 000xg, 15°C por 36-48 hrs.

14. Visualizar las bandas con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga. Abrir la parte superior del tubo y coleccionar la banda inferior que es la del plásmido con una jeringa con aguja del #18.

15. Remover el bromuro de etidio por extracción con isopropanol y STE saturado con NaCl, 2 ó 3 extracciones.

16. Diluir con 5 volúmenes de agua estéril, adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar y colocar a -70°C por 30 min.

17. Centrifugar 60 min, 12 000 xg a -10°C.

18. Decantar el sobrenadante. Secar los tubos. Resuspender la pastilla en 0.4 ml de STE y transferir a tubos eppendorf.

19. Adicionar 1 ml de etanol absoluto frío, mezclar y colocar a -70°C por 30 min.

20. Centrifugar por 10 min a 4°C en una microfuga. Decantar. Secar los tubos en vacío. Resuspender el plásmido puro en 0.4 ml de STE.

*También se hizo la extracción del plásmido por lisis alcalina reportada por Maniatis et al. (29).

4.2.3. Ensayo de corte del DNA con enzimas de restricción (Maniatis et al, 1982).

1. Mezclar:

50-80 pmoles de DNA plasmídico
5 μ l de buffer de concentración media de sales
2 unidades de EcoRI
H₂O cbp 50 μ l

2. Incubar a 37°C por 1-2 hr.

3. Extraer el DNA con 50 μ l de fenol saturado con STE.

4. Centrifugar 3 min a 4°C en una microfuga, tomar la fase acuosa y repetir los pasos 3 y 4.

5. Adicionar 1/20 del volumen total de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Colocar a -70°C por 30 min.

6. Centrifugar 10 min a 4°C en una microfuga. Decantar y lavar con 0.5 ml de etanol al 70% en STE. Centrifugar. Decantar.

7. Secar el DNA en un desecador al vacío. Resuspender en 10 μ l de STE.

4.2.4. Ensayo de fosfatasa alcalina (desfosforilación del DNA) (Maniatis et al, 1982).

1. Mezclar:

50 pmoles de DNA digerido con alguna enzima de restricción
5 μ l de buffer de fosfatasa alcalina
1 unidad de fosfatasa alcalina
H₂O cbp 50 μ l

2. Incubar a 37°C por 30 min.

3. Adicionar otra alícuota de fosfatasa alcalina y continuar la incubación por 30 min.

4. Adicionar 40 μ l de H₂O, 10 μ l de STE 10X y 5 μ l de SDS 10%. Calentar a 68°C por 15 min.

5. Extraer 2 veces con fenol saturado con STE.

6. Pasar la fase acuosa a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada con buffer TE por centrifugación a 3000rpm en una centrífuga clínica 4 min.

7. Precipitar el DNA adicionando 1/20 del volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Colocar a -70°C por 30 min. Centrifugar 10 min a 4°C en una microfuga, decantar y resuspender en 10 μ l de TE.

4.2.5. Marcaje de extremos 5'-fosfatos con ^{32}P (Maniatis et al, 1982).

1. Mezclar:

50 pmoles de DNA desfosforilado
10 unidades de polinucleótido cinasa de T4
50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (act. esp. 3000 Ci/mmol, NEN Research Products)
5 μl de buffer de polinucleótido cinasa
H₂O cbp 50 μl

2. Incubar a 37°C por 30 min.

3. Adicionar 2 μl de EDTA 0.5 M. Extraer dos veces con fenol saturado con STE.

4. Precipitar el DNA adicionando 1/20 del volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Colocar a -70°C por 30 min, centrifugar, decantar y resuspender el DNA marcado en 100 μl de TE.

5. Separar el DNA marcado del no marcado por cromatografía en una pequeña columna de Sephadex G-50 por centrifugación a 3000 rpm en una centrífuga clínica por 4 min.

4.2.6. Deterioro de las semillas.

Las semillas se colocaron en cajas de Petri y se incubaron bajo las siguientes condiciones: 40°C con 100% de humedad relativa durante 6 días (tratamiento húmedo) ó 60°C durante 2 días (tratamiento seco). Después de transcurrido el tiempo de los tratamientos, se procedió a extraer los ejes embrionarios de las semillas.

4.2.7. Imbibición de los ejes embrionarios.

Lotes de 0.4g de ejes embrionarios fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaOCl, 0.5%) por 30 seg y después lavados perfectamente con agua desionizada y estéril. Estos ejes se colocaron entre discos de papel filtro estériles en tubos de cultivo o en frascos estériles (ésto se realizó bajo condiciones de esterilidad). Después se agregó solución amortiguadora de imbibición (400 μl). Los tubos se taparon una vez que se agregó la solución amortiguadora, para evitar evaporación y se incubaron durante 0, 3, 6 y 9 horas a 27°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los ejes

embrionarios se sacaron de los tubos y se homogenaron. En caso de que no fueran a ser procesados de inmediato, los ejes se colocaron en tubos de ensaye y se guardaron a -70°C .

4.2.8. Extracción de la ligasa proveniente de ejes embrionarios de semillas de maíz (Elder et al, 1987).

1. Homogenar los ejes en un mortero preenfriado con buffer de homogenación.
2. Homogenar 3 veces en un politrón por 30 seg. a máxima velocidad.
3. Centrifugar a 12 000xg por 15 min a 4°C .
4. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 170 000xg por 1 hr a 4°C .
5. El sobrenadante es la fuente de enzima.

4.2.9. Ensayo de actividad de la DNA ligasa.

1. Mezclar:

0.1 μCi de DNA marcado radiactivamente
Buffer de ligasa
80-100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína del extracto enzimático
HzD cbp 40 μl .

2. Incubar a 37°C por 10 min.
3. Separar en 2 alícuotas de 20 μl cada una. A una se le adiciona 1 unidad de fosfatasa alcalina y se calienta por 20 min a 80°C .
4. Se enfría inmediatamente en hielo.
5. Adicionar 100 μl de DNA de alto peso molecular y 250 μl de ácido tricloroacético (TCA) AL 20%.
6. Dejar reposar 1 hr en hielo.
7. Filtrar en membranas de fibra de vidrio (GF/A Whatman), lavar con 5 ml de TCA al 5% frío y con 15 ml de etanol frío.
8. Secar las membranas, colocarlas en frascos con líquido de centelleo y contar en un contador de centelleo.
9. La actividad estará dada por la relación entre las cuentas resistentes a fosfatasa alcalina y las cuentas sin tratar con fosfatasa alcalina menos el blanco. La actividad específica se da en % de marca resistente a fosfatasa alcalina entre la cantidad de proteínas.
10. En caso de que se quisiera producir una imagen autorradiográfica, el protocolo será el siguiente: seguir el

protocolo hasta el punto 4 y después se le adiciona 2 μ l de buffer de carga.

11. Se colocan las muestras en los pocillos de un gel de agarosa.
12. Se corre la electroforesis a 20-30mA durante 6-7 horas.
13. Se lava el gel para quitar exceso de marca inespecifica.
14. Se seca el gel entre hojas de papel filtro por toda la noche.
15. El gel deshidratado se coloca sobre una placa de vidrio envuelta en "Ega Pack" y se cubre con otra capa de "Ega Pack".
16. Se coloca una placa de rayos X encima del gel, se cubre con otra placa de vidrio y se deja envuelto con hojas de papel aluminio para guardarlo de la luz durante el tiempo deseado (todo esto se realiza en un cuarto oscuro).

4.2.10. Revelado de las placas de rayos X.

1. En un cuarto oscuro, se saca la placa de rayos X y se deposita en una charola que contiene solución reveladora para placas de rayos X de manera que quede bien cubierta la placa durante 5 minutos.
2. Transcurrido el tiempo, se saca de la charola y se enjuaga bien con agua durante unos 30 segundos.
3. Después se deposita durante 5 min en otra charola que contiene solución fijadora, con agitación suave cada minuto.
4. Por último se enjuaga bien con agua y se deja secando al aire.

4.2.11. Determinación de proteínas totales por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977).

1. Primero se hizo una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB), de 20-200 μ g de proteína.
2. De los extractos de maíz, se tomaron alícuotas de 10, 20 y 40 μ l, a las cuales se les añadió agua desionizada para completar un volumen de 1 ml.
3. A cada una de las muestras se le añadió desoxicolato de sodio (0.15%, 0.1ml) y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.
4. Se les agregó ácido tricloroacético (72%, 0.1ml) preenfriado.
5. Se dejaron reposar durante 15 min en hielo.
6. Se centrifugaron a 3000 rpm en una centrífuga clínica por 15 min. El sobrenadante se desechó y los tubos se dejaron boca abajo sobre un papel absorbente durante 5 min para que la pastilla se

seca.

7. Después se les agregó agua desionizada (1ml) y reactivo "A" (1ml) se mezclaron y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente.

8. Transcurrido el tiempo, se les agregó reactivo "B" (0.5ml), se mezcló y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente.

9. Por último se leyeron a 750nm en un espectrofotómetro (Pye Unicam) y se interpolaron los valores en la curva patrón para saber la concentración de proteínas en el extracto.

4.2.12. Preparación de Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa, Sigma).

1. Se colocan 5g de DEAE-celulosa en 75ml de HCl 0.5 N agitando suavemente durante 45 min a intervalos de 15 min. Se lava con agua destilada hasta llegar a un pH de 4.0.

2. La resina se resuspende en 75ml de KOH 0.5 N, agitando suavemente durante 45 min, cada 15 min, a temperatura ambiente. Se lava con agua destilada hasta llegar a un pH de 8.0.

3. La resina se resuspende en 80ml de KCl 0.05 N y se lleva a pH de 7.2 con HCl 0.05 N. Se agita suavemente por 1h a intervalos de 15 min a temperatura ambiente. Se retitula a pH de 7.2 y se agita suavemente por 2 hrs cada 30 min.

4. Se retitula a pH 7.2, se decanta eliminando los finos y materia particulada y se resuspende en solución amortiguadora "A".

5. RESULTADOS

5.1. Actividad de la DNA ligasa.

La DNA ligasa es la enzima que une 2 extremos adyacentes en un DNA de doble cadena (Kornberg, 1974).

Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en procariones (Gellert, 1967; Lehman, 1974, Lindahl and Edelman, 1968; Lindahl, 1971; Modrich and Lehman, 1970; Olivera and Lehman, 1967a; Olivera and Lehman, 1967b; Olivera et al, 1968; Weiss et al, 1968a y Weiss et al, 1968b) y en eucariotes (mamíferos) (Arrand et al, 1986; Barker et al, 1987; Creissen and Shall, 1982; Mezzina et al, 1987; Montecucco et al, 1988; Prignet et al, 1987; Rabin and Chase, 1987; Söderhall and Lindahl, 1975 y Teraoka and Tsukada, 1985); en vegetales existen muy pocos reportes. (Daniel and Bryant, 1988; Elder et al, 1987 y Howell and Stern, 1971)

Nuestro grupo de trabajo esta interesado en el metabolismo del DNA en maíz y su relación con el deterioro de las semillas.

Por tal motivo el estudio de esta enzima es muy importante ya que participa en recombinación genética, replicación y reparación.

Como se dijo anteriormente el estudio de esta enzima en procariones y en mamíferos ha sido muy extenso, por lo que decidimos utilizar algunas de las metodologías empleadas para ver si podíamos determinar la actividad de la enzima de maíz.

Primero se obtuvo un extracto enzimático de ejes embrionarios homogenándolos en un mortero y después centrifugándolo 2 veces a 3000xg, 15 min y por último a 100,000xg, 2h. Este extracto se pasó después por una columna de fosfocelulosa con el propósito de eliminar el exceso de proteínas y las fracciones de lavado de

60mM, del gradiente de 60-400mM y del lavado de 600mM de fosfatos, fueron probadas para determinar la actividad. Para ello se utilizó la metodología reportada por Maniatis et al (1982).

Los resultados muestran que al parecer había actividad en las primeras fracciones del gradiente, ya que en los geles (fig. 3) se mostraba un corrimiento similar a multímeros de plásmidos cerrados. Para asegurar que las bandas realmente eran debidas a actividad de la enzima y no a un corrimiento diferencial por existir proteínas asociadas al DNA, se hizo una extracción de proteínas con fenol. El problema que surgió fue que la muestra desproteïnizada perdía la marca radiactiva o que la muestra la perdíamos en la desproteïnización (fig. 4). Después de varios experimentos sin éxito, se pensó que quizá la concentración de sales del gradiente de elución inhibía la actividad de la ligasa, por lo que se decidió dializar las fracciones y probar la actividad de una ligasa comercial mezclada con una fracción de alta concentración salina para saber si se inhibía su actividad.

El resultado mostró que al parecer no había actividad en las fracciones y que a la ligasa comercial no le afectaba mayormente la alta concentración de sales (fig. 5).

Con estos resultados se pensó que quizá la proteína no se egaba a la columna, por tal motivo decidimos cambiar la columna a DEAE-celulosa, una resina reportada para el aislamiento de enzimas relacionadas con el DNA (De Recondo et al 1973). La resina se eluyó con NaCl a distintas concentraciones, 60, 120, 180, 240 y 300 mM, las fracciones se dializaron y se probaron para determinar la actividad.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fig. 3. Actividad de la DNA ligasa a través de una columna de fosfocelulosa. Autorradiografía de un gel de agarosa al 1%. La electroforésis se corrió a 40mA por 3 hr. La actividad se determinó por el método descrito por Maniatis et al, (1981). Carriles 2,3,6,9,10 y 11 fracciones de elución de fosfocelulosa de menor a mayor concentración de sales; carril 7, control no ligado; carril 8, control ligado.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

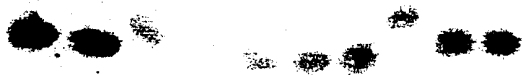


Fig. 4. Actividad de la DNA ligasa a través de una columna de fosfocelulosa y tratada con fenol. Autorradiografía de un gel de agarosa al 1%. La lectrforésis se corrió a 40mA por 3 hr. La actividad se determinó por el método descrito por Maniatis et al, (1981). Carriles 1 al 6 y 9-10, fracciones de elución de fosfocelulosa de menor a mayor concentración de sales; carril 7, control no ligado; carril 8, control ligado; carril 11 muestra tratada con fenol.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

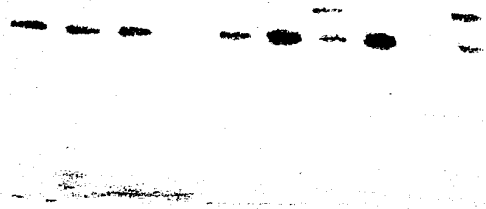


Fig. 5. Actividad de la DNA ligasa después de dielizar. Au
torradiografía de un gel de agarosa al 1%. La electro
forésis se corrió a 40mA por 3 hr. La actividad se de
terminó por el método descrito por Maniatis et al, -
(1981). Carriles 2,3,4,5,6 y 9, fracciones de elución
de fosfocelulosa de menor a mayor concentración de sa
les; carril 7, control no ligado; carril 8, control -
ligado; carril 11, fracción de 400 mM de fosfatos -
con ligasa de T-4.

Los resultados obtenidos muestran nuevamente que no hay actividad (fig. 6), por lo que se pensó que probablemente la cantidad de material biológico utilizado (ejes embrionarios) era muy poca. Se aumentó la cantidad de ejes embrionarios (de 0.05 a 0.3g), se ensayaron algunas fracciones bajo el mismo protocolo. El resultado fue poco alentador pues no se detectó actividad, por lo que decidimos cambiar el protocolo por otro reportado para medir actividad de la DNA ligasa en extracto de hígado de rata (Söderhall y Lindahl, 1975).

Para comprobar que ésta metodología funciona, primero se midió la actividad de la DNA ligasa en extractos de hígado de rata. Se extrajeron los hígados y se siguió el protocolo reportado. Los resultados fueron alentadores pues se pudo detectar la actividad de la enzima (fig. 7). Se realizó el mismo protocolo pero ahora con ejes embrionarios de maíz, se aumentó la cantidad de ejes embrionarios y se imbibieron por 24 h para así aumentar la cantidad de proteínas e indirectamente la cantidad de la DNA ligasa. Los resultados se muestran en la figura 8, donde se observa que probablemente había actividad, pero ahora se tenía el problema de que el control sin ligasa también mostraba una banda a la altura de la banda de ligado, por lo que ahora no había un punto de comparación. Se decidió entonces agregar fosfatasa alcalina para quitar marca inespecífica después del ensayo de la actividad de la DNA ligasa.

Después de varios experimentos sin éxito, se decidió cambiar la metodología por otra que reportaba la actividad de la DNA ligasa en centeno (Elder et al, 1987), un sistema relacionado al

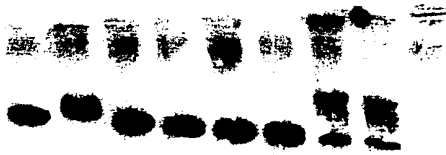


Fig. 6. Actividad de la DNA ligasa a través de una columna de DEAE-celulosa. Autorradiografía de un gel de agarosa al 1%. La electrificación se corrió a 40mA por 3 hr. La actividad se determinó por el método descrito por Maniatis et al, (1981). Carriles 3 al 7 fracciones de elución de 60, 120, 180, 240 y 300 mM de NaCl respectivamente; carril 8, control no ligado; carril 9, control ligado; carril 10, fracción de 300 mM de NaCl con ligasa de T-4.

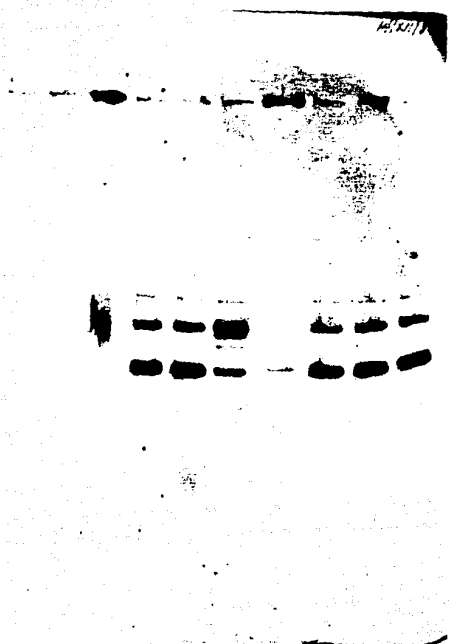


Fig. 7. Actividad de la DNA ligasa de extractos de hígado - de rata. Autorradiografía de un gel de agarosa al 0.8%. La electroforesis se corrió a 30mA por 4 hr. La actividad se determinó por el método de Söderhall y Lindahl, (1975). Carril 1, extracto crudo; carril 3, fracción - de la precipitación con sulfato de amonio al 60%; ca - rriles 4 y 5, fracciones de elución de fosfocelulosa; carril 6, control ligado; carril 7, control no ligado; carriles 8 al 10, fracciones de elución de hidroxilapa - tita.

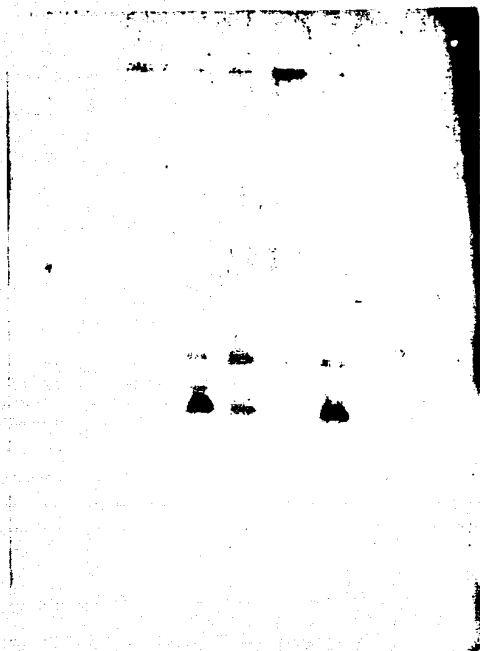


Fig. 8. Actividad de la DNA ligasa de extractos de maíz por el método de Söderhall y Lindahl, (1975). Autorradiografía de un gel de agarosa al 0.8%. La electroforesis se corrió a 30mA por 4 hr. La actividad de la enzima se determinó por el método de Söderhall y Lindahl, --- (1975). Carril 4, fracción de la precipitación con sulfato de amonio al 40%; carril 5, fracción de la precipitación con sulfato de amonio al 60%; carril 6, control no ligado; carril 7, control ligado; carril 9, -- fracción de elución de fosfocelulosa.

que estábamos estudiando.

Se realizó la metodología desde la extracción hasta la medición de la enzima y se encontró actividad, medida como cpm resistentes a fosfatasa alcalina, es decir, la diferencia entre las cpm tratadas con fosfatasa alcalina entre las cpm sin tratar con fosfatasa alcalina menos el blanco de reactivos era la actividad de la enzima en el extracto (fig. 9).

Se decidió determinar algunos parámetros óptimos de actividad de nuestra enzima.

Tiempo de reacción:

Se realizó una cinética a diferentes tiempos que fueron 5, 10, 20, 30 y 60 minutos a 37°C. El resultado que se obtuvo fue que 10 minutos era el tiempo óptimo de reacción ya que se observó el máximo de actividad. Después de este tiempo se tenían problemas por actividad de nucleasas por lo que al parecer se perdía la marca radiactiva. (fig. 10).

Temperatura de reacción:

Se realizó el ensayo a dos temperaturas que fueron 30 y 37°C. 37°C presentó un tiempo óptimo de reacción que fué 10 minutos (fig.10), en tanto que 30°C parecería llegar a un máximo a los 10 min y después permanecer constante (fig. 11).

Concentración de ATP:

Se probaron varias concentraciones de ATP 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 15 mM (cofactor de la enzima) para saber cual concentración era la óptima para la actividad de nuestra enzima. El resultado se observa en la figura 12. La concentración óptima fue de 5mM ya que se obtenía la mejor diferencia entre ensayo tratado con fosfatasa

ACTIVIDAD DE LA DNA LIGASA

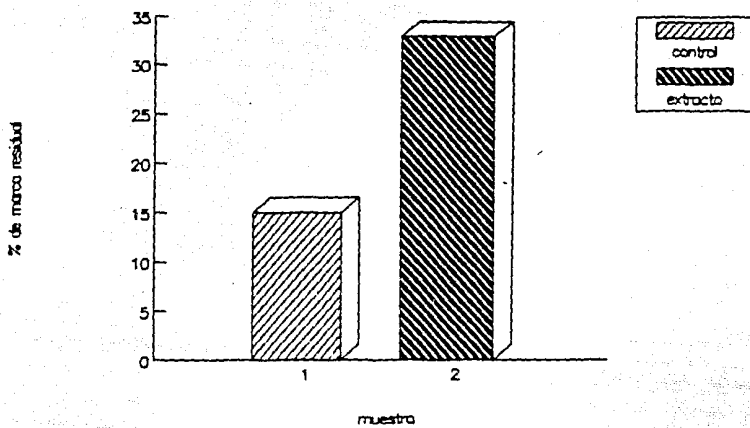


Fig. 9. Actividad de la DNA ligasa en extracto crudo de embriones de maíz. La actividad de la enzima se determinó por el método de Elder et al, (1987).

Actividad de la DNA ligasa a 37°C

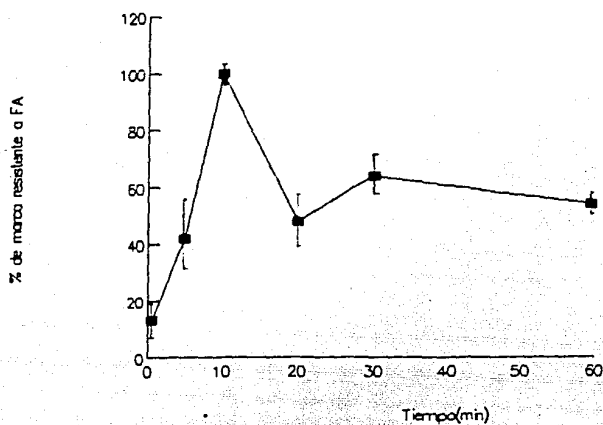


Fig. 10. Actividad de la DNA ligasa, curso de reacción a 37°C contra tiempo. La actividad se determinó por el método de Elder-et al, (1987). n=3

Actividad de DNA ligasa a 30°C

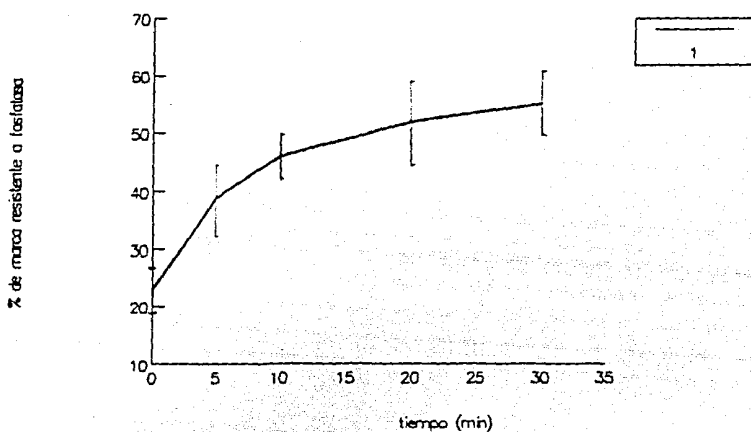


Fig. 11. Curso de reacción a 30°C contra tiempo.

La actividad se determinó por el método de

Elder et al, (1987). n=3

Actividad de la DNA ligasa a diferentes concentraciones de ATP

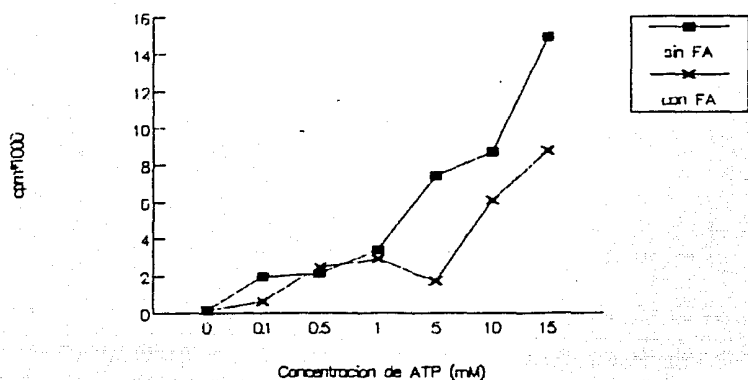


Fig. 12. Curso de reacción contra concentración de ATP (cofactor), medido a 37°C por 10 min. La actividad se determinó por el método de Elder et al, (1987). n=3

alcalina y el ensayo sin tratar con esta enzima, además de que al parecer concentraciones mayores de ATP inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina (Colowick and Kaplan, 1955).

Concentración de extracto enzimático:

Para comprobar que realmente se estaba midiendo la actividad de la DNA ligasa, se midió actividad contra concentración de extracto. El resultado mostró en una forma lineal que a mayor cantidad de extracto mayor actividad, con lo que se reafirma que lo que se estaba midiendo era realmente una actividad enzimática y que se estaba en saturación de sustrato (fig.13).

Para comprobar nuevamente la actividad de la enzima, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se puso en contacto con una placa de rayos X con el objeto de producir una imagen autorradiográfica. El resultado se observa en la figura 14, notándose la banda de ligado en los carriles donde se encuentra la actividad de la enzima en el extracto de los ejes embrionarios.

5.2. Actividad de la DNA ligasa en semillas deterioradas de maíz.

En este estudio se sometió a las semillas de maíz a dos tipos de tratamientos, que pretenden imitar las condiciones de almacenamiento inadecuadas del grano que provocan deterioro de las semillas y envejecimiento acelerado.

De los ejes embrionarios de las semillas se investigó la actividad de la DNA ligasa como un marcador bioquímico para observar si a este nivel había algún daño.

Este estudio se realizó debido a que anteriormente (García,

Actividad de DNA ligasa

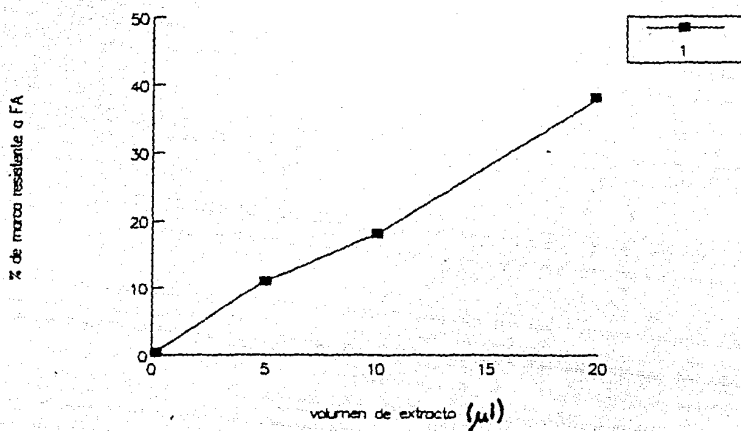


Fig. 13. Curso de reacción contra volumen de extracto, medido a 37°C por 10 min. La actividad se determinó por el método de Elder et al, (1987).

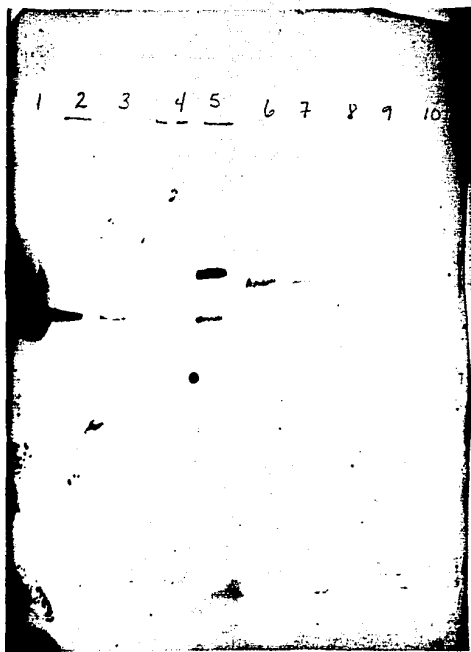


Fig. 14. Actividad de la DNA ligasa de maíz extraída según el método de Elder et al, (1987). Autorradiografía de un gel de agarosa al 0.8%. La electroforésis se corrió a 20mA por 6 hr. La actividad se determinó como se indica en la metodología. Carril 2, control no ligado sin tratar con fosfatasa alcalina; carril 3, control no ligado tratado con fosfatasa alcalina, carril 5, control ligado tratado con fosfatasa alcalina; carril 6, extracto de maíz sin tratar con fosfatasa alcalina, carril 7, extracto de maíz tratado con fosfatasa alcalina.

1985), se había demostrado que en los embriones de las semillas tratadas por 6 días a 40°C con 100% Humedad Relativa (H.R.) y 2 días a 60°C se afectaba la síntesis de DNA y la integridad del mismo. Además, la actividad de la DNA polimerasa disminuía por efecto de los tratamientos (Vázquez, 1986; Vázquez et al, 1988).

La pregunta fue si una disminución en la actividad de la DNA ligasa, aunado a la disminución de la actividad de la DNA polimerasa, pudiera ser una de las causas de la disminución de la viabilidad de las semillas.

Se observó que cuando se trataban las semillas a 60°C por 2 días, la actividad relativa de la DNA ligasa era de 69% con respecto al control, en tanto que la actividad proveniente de semillas tratadas a 40°C por 6 días con 100% de H.R. no mostraba alteración alguna. Estos experimentos se hicieron con ejes embrionarios secos (fig.15).

A las 3 horas de imbibición de los ejes, la actividad relativa de la enzima proveniente del tratamiento a 60°C por 2 días fue 62% y la actividad de la enzima proveniente del tratamiento de 40°C por 6 días/100% H.R. fue 50%, ambas con respecto a la actividad mostrada por el control (fig. 16).

En cuanto a los ejes embrionarios que fueron imbibidos por 6 horas, se pudo observar que los ejes embrionarios de las semillas tratadas por 60°C por 2 días, la actividad de la enzima fue 66% mientras que la actividad de la enzima de los ejes embrionarios de las semillas tratadas por 40°C, 6 días, 100% H.R., fue de 80%, ambas con respecto al control (fig.17).

Por último, como se observa en la figura 18, en los ejes

Actividad de la DNA ligasa en ejes secos de maiz

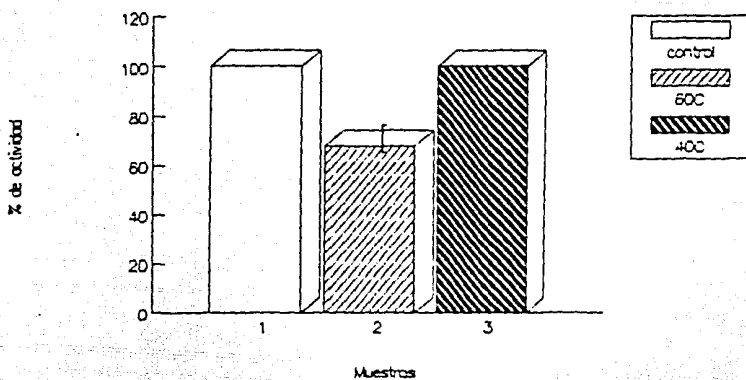


Fig. 15. Comparación de la actividad de la DNA ligasa de semillas control (1) con deterioradas (2 y 3). La actividad se determinó - como se menciona en los métodos. n=4

Actividad de la DNA ligasa en ejes de maiz imbibidos 3h

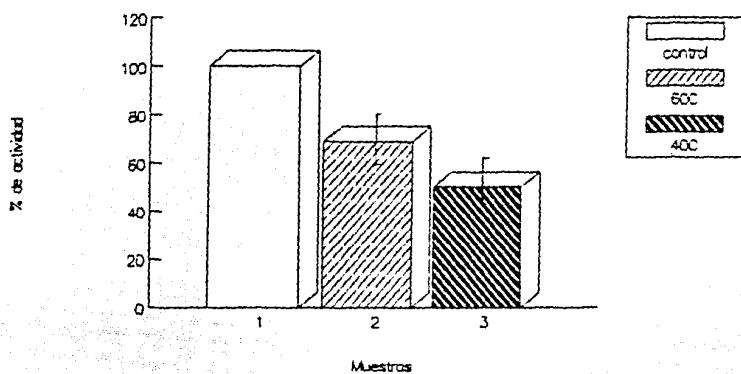


Fig. 16. Comparación de la actividad de la DNA ligasa de semillas control (1) con deterig radas (2 y 3). La actividad se determinó - como se menciona en los métodos. n=4

Actividad de la DNA ligasa en ejes de maiz imbibidos 6h

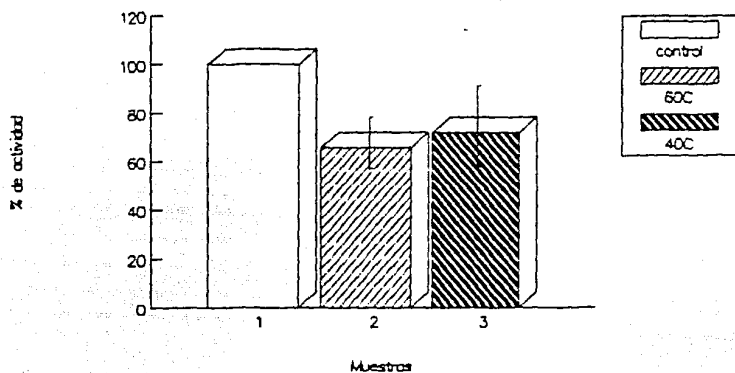


Fig. 17. Comparación de la actividad de la DNA ligasa de semillas control (1) con deterioradas (2 y 3). La actividad se determinó - como se menciona en los métodos. n=4

Actividad de la DNA ligasa en ejes de maiz imbibidos 9h

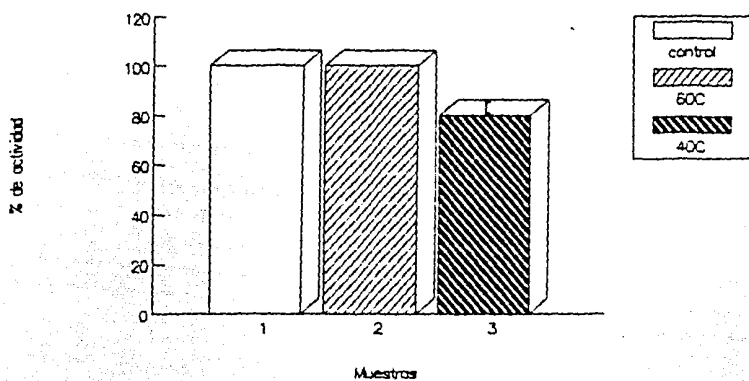


Fig. 18. Comparación de la actividad de la DNA ligasa de semillas control (1) con deterioradas (2 y 3). La actividad se determinó como se menciona en los métodos.

n=4

embrionarios imbibidos por 9 horas, la actividad de la enzima de los ejes embrionarios de las semillas tratadas por 2 días a 60°C se ha recuperado en su totalidad, en tanto que la actividad de la enzima de los ejes embrionarios de las semillas tratadas a 40°C por 6 días/100% H.R., mostró un 80% de actividad con respecto al control.

Un resumen del comportamiento de la enzima a través del tiempo de imbibición, se puede apreciar en la figura 19.

5.3. Purificación parcial de la DNA ligasa.

Para poder estudiar mejor la actividad de la DNA ligasa, realizamos un paso de purificación a través de una columna de DEAE-celulosa.

A una columna de DEAE-celulosa de 7.5x1.1cm, equilibrada con solución amortiguadora con NaCl 10mM, se le adicionó un extracto protéico proveniente de la homogenación de los ejes embrionarios, se lavó la columna con 3 volúmenes de solución amortiguadora con NaCl 10mM para quitar el exceso de proteínas que no se hubieran pegado, se pasó un gradiente 10-400mM (5 volúmenes) y por último se lavó con 3 volúmenes de solución amortiguadora con NaCl 600mM.

Se midieron las fracciones a 280/260nm para detectar cantidad de proteínas y algunas fracciones se les midió la actividad de la DNA ligasa.

Los resultados muestran que al parecer hay 2 picos de actividad, uno que sale en las primeras fracciones del gradiente (60mM-140 mM) y otro pico que sale en las últimas fracciones del gradiente (310mM-350mM) (fig. 20).

Actividad de la DNA ligasa en semillas deterioradas de maiz

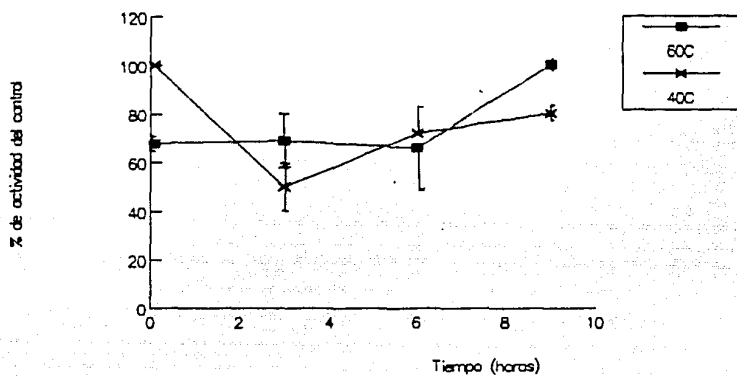


Fig. 19. Actividad de la DNA ligasa a través del tiempo de incubación en semillas control y deterioradas.

Purificación parcial de la DNA ligasa por DEAE-celulosa

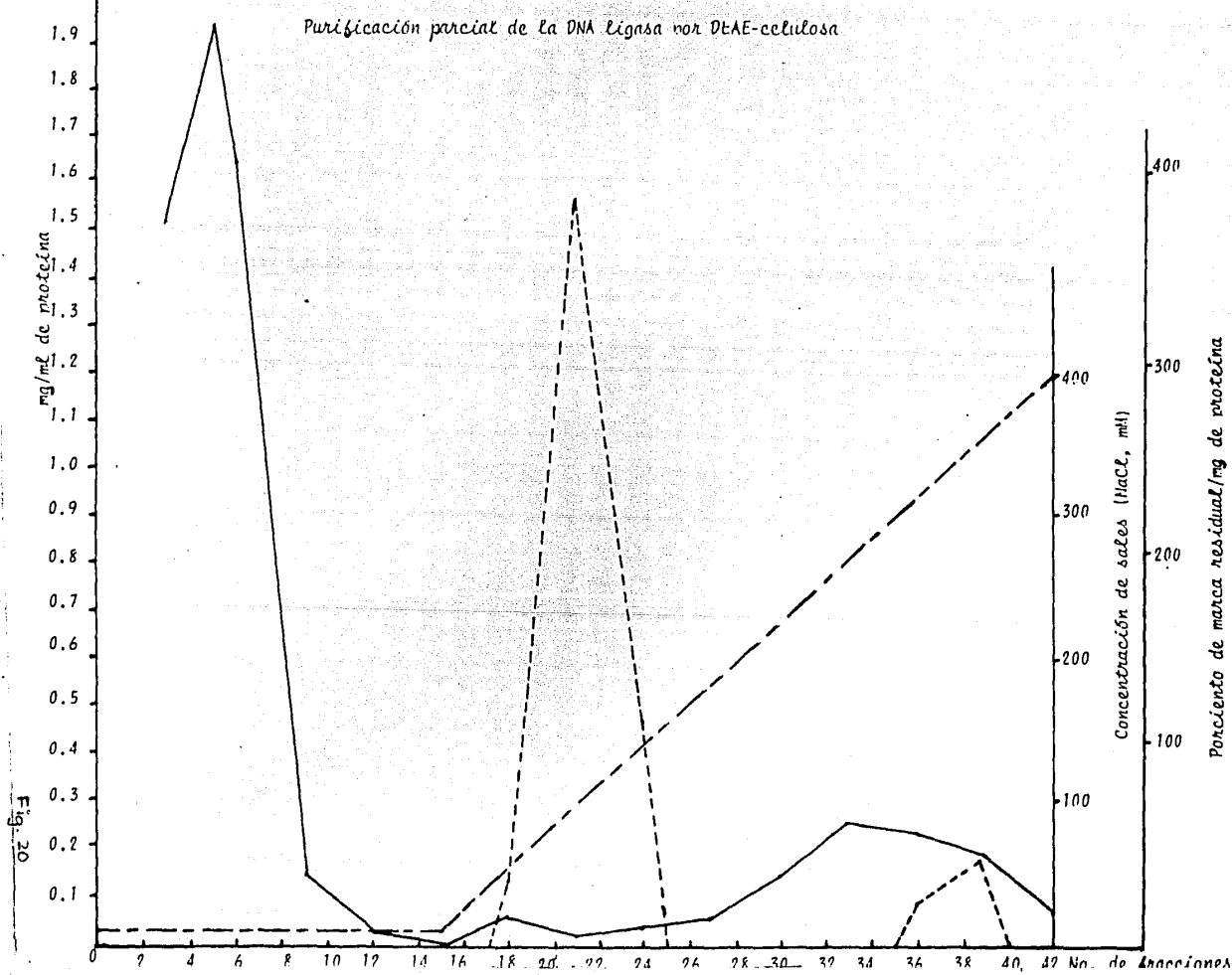


Fig. 20

Algunas de estas fracciones se les comprobó su actividad mediante una electroforesis en gel de agarosa y produciéndose una imagen autorradiográfica en una placa de rayos X, distinguiéndose claramente las bandas de ligado en las fracciones (fig. 21).

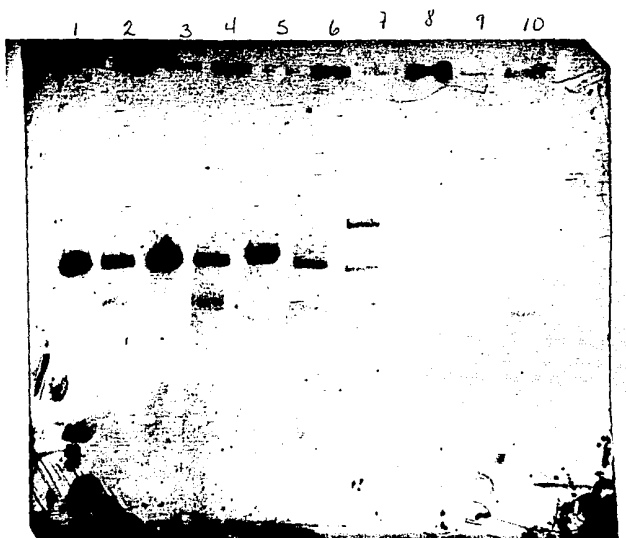


Fig. 21. Actividad de la DNA ligasa a través de una columna de DEAE-celulosa. Autorradiografía de un gel de agarosa al 0.8%. La electroforésis se corrió a 20mA por 6hr. La actividad se determinó como se indica en la metodología. Carriles 1,3,5, fracciones de la columna de DEAE-celulosa tratadas con fosfatasa alcalina; carriles 2,4,6, fracciones de la columna de DEAE-celulosa sin tratar con fosfatasa alcalina; carril 7, control ligado tratado con fosfatasa alcalina; carril 8, control ligado sin tratar con fosfatasa alcalina; carriles 9 y 10, control no ligado con y sin fosfatasa alcalina respectivamente.

6. DISCUSION

El deterioro de semillas provoca la disminución en la capacidad de síntesis del DNA durante la germinación temprana de maíz (García, 1985) y también una disminución en la actividad de la DNA polimerasa de ejes embrionarios deteriorados de maíz (Vázquez, 1986; Vázquez et al, 1988); esto podría explicar el hecho de que la síntesis de DNA decreciera durante la germinación de los ejes deteriorados (García, 1985). Esta evidencia, aunada a la observación de que el DNA de semillas deterioradas se encuentra fragmentado, es decir, ha perdido su integridad, podrían explicar la baja viabilidad de las semillas (Meléndez, 1987). No obstante, la actividad de la DNA polimerasa se recupera conforme pasa el tiempo de germinación (0-15 h). Dicha recuperación se debe a una síntesis *de novo* de la enzima (Vázquez et al, 1988). Además, la integridad del DNA también se recupera según avanza la germinación (0-15 h) (Meléndez, 1987). Por lo anterior se esperaría que la viabilidad de las semillas se incrementara, pero no sucede así. La recuperación de la integridad del DNA muy probablemente se debe a una síntesis reparativa de DNA, pero quizá el DNA que ha sido resintetizado mantiene aún "nicks" o cortes en su estructura y por tal motivo no puede realizar sus funciones de replicación y molde adecuadamente siendo ésta una de las causas de la pérdida de la viabilidad de las semillas.

La enzima responsable de cerrar (ligar) covalentemente al DNA es la DNA ligasa.

Nosotros estudiamos la actividad de esta enzima bajo los mismos tratamientos de pérdida de viabilidad (temperatura y/o

humedad) reportados anteriormente (García, 1985) para tratar de observar si existía alguna relación entre la pérdida de la viabilidad y la actividad de la DNA ligasa.

Desde que Gellert (1967) reportó por primera vez una actividad que formaba "círculos cerrados covalentemente" en el DNA del fago λ a partir de DNA lineal y que Olivera y Lehman (1967) la denominaran "enzima unidora de polinucleótidos", se han utilizado varias metodologías para estudiar a la DNA ligasa.

La forma de determinar la actividad enzimática fue mediante geles de agarosa y la posterior producción de una imagen autorradiográfica; ésta es una metodología reciente y ha sido ampliamente reportada para el estudio de ligasa tanto de bacterias como de mamíferos (Arrand et al, 1986; Elder et al, 1987; Mezzina et al, 1987; Montecucco et al, 1988; Rabin and Chase, 1987; Roberts et al, 1973), detectandose la actividad con claridad. Sin embargo, la mayoría de los investigadores han usado polímeros sintéticos en el ensayo (polidA/oligodT) y nunca han usado plásmidos, ya que con éstos se han encontrado dificultades experimentales (Rhod Elder y A. Sarasin, comunicación personal). No obstante, también se han reportado algunas dificultades en la medición de la enzima usando polímeros sintéticos (Elder et al, 1987). Este ensayo, aunque muy demostrativo, no fue útil para nuestro sistema quizá debido a que la sensibilidad de éste no es suficiente para la cantidad de enzima presente en los extractos de maíz (preparados a partir de hasta 1 gramo de ejes embrionarios).

Otro problema que pudo haber afectado nuestro ensayo sería la baja eficiencia en la extracción de la enzima, lo que necesariamente se reflejaría en la cantidad de la enzima presente.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En sistemas animales, estas mismas metodologías de extracción de la enzima son adecuadas porque sus células son más fáciles de romper que las de vegetales, al presentar éstas últimas pared celular rígida.

Por otra parte, se han reportado otros problemas para la determinación de la actividad de la DNA ligasa. Daniel et al, (1988), por ejemplo, mencionan que encontraron actividad solo hasta las 8 horas de germinación de los embriones de chícharo y que antes es prácticamente imposible observarla.

Otra forma de medir la actividad de la DNA ligasa es precipitando el DNA con ácido tricloroacético y contando la marca precipitada. Este ensayo también ha sido muy utilizado desde los experimentos pioneros (Daniel and Bryant, 1988; Howell and Stern 1971; Olivera and Lehman, 1967a; Olivera et al, 1968; Teraoka and Tsukada, 1985 y Weiss et al, 1968b) y aparentemente es más sensible y cuantitativo. Se ha utilizado principalmente con polímeros sintéticos. Debido a las dificultades observadas con otros ensayos, usamos este tipo de metodología con plásmidos como sustrato, obteniendo los resultados ya indicados. Al parecer éste sería uno de los primeros reportes, al menos en sistemas vegetales, donde se utiliza plásmidos como sustrato obteniendo buenos resultados.

Al utilizar la metodología usada por Elder et al, (1987), la actividad medida se determinó como cuentas por minuto precipitables con ácido tricloroacético, de las cuales la marca resistente a fosfatasa alcalina refleja la actividad de la DNA ligasa. La forma como se midió la actividad fue tomando en cuenta la relación entre las cpm resistentes a fosfatasa alcalina y las

cpm sin tratar con esta enzima. De esto resulta un porcentaje de cpm que es restado del blanco y que es dividido entre la cantidad de proteínas totales; por lo tanto, la actividad se expresa como el porciento de cpm resistentes a fosfatasa alcalina entre la cantidad de proteínas.

Una vez que se logró medir la actividad enzimática, se determinaron algunos parámetros óptimos de reacción tales como tiempo, temperatura, concentración del cofactor, etc. Se encontró un tiempo óptimo de 10 minutos. Después de este tiempo se perdía la marca radiactiva. Esto puede ser explicado por la posible presencia de nucleasas en el extracto.

La temperatura óptima de reacción fue de 37°C , ya que a esta temperatura se encontró mayor actividad (reflejada como cpm) que a 30°C . En ambas temperaturas el punto máximo de actividad fue de 10 minutos.

La concentración óptima de ATP fue de 5mM, ya que a esta concentración se encontró una mejor diferencia entre las cpm de muestras tratadas con fosfatasa alcalina y de aquellas sin tratar con fosfatasa alcalina. Las concentraciones más pequeñas mostraban pocas cpm y una menor diferencia y las más altas mostraban mayor número de cuentas pero también menor diferencia. Esto se puede explicar por el hecho de que el ATP en altas concentraciones inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina por tener grupos fosfatos y por lo tanto pudiera competir con los extremos $5' \text{ } ^{32}\text{P}$ del DNA.

Se realizó un curso de reacción de la DNA ligasa a diferentes concentraciones de la enzima a 37°C por 10 min. Lo que se encontró fue una relación lineal, por lo que se puede decir que lo que se

midió es realmente una actividad enzimática y también que se estaba en saturación de sustrato en el ensayo.

Conociendo los parámetros óptimos de reacción, se procedió a tratar de observar si la actividad de la DNA ligasa tenía o no alguna relación con la pérdida de la viabilidad de las semillas de maíz.

Se determinó la actividad de esta enzima encontrándose que la actividad proveniente de ejes embrionarios de semillas deterioradas presentó un decremento durante las primeras horas de la germinación (0-6 h). Interesantemente, de manera análoga a la DNA polimerasa (Vázquez, 1986; Vázquez et al, 1988), la actividad de la DNA ligasa proveniente del tratamiento con calor seco (60°C por 2 días) se recuperó totalmente para las 9 h de germinación; la enzima proveniente del tratamiento con calor húmedo (40°C por 6 días con 100% de humedad relativa) se recuperó en un 80 % a ese mismo tiempo.

El tratamiento con calor húmedo parece ser más severo para la semilla que el tratamiento con calor seco. Al parecer el hecho de combinar temperatura y humedad provoca mayor daño en las semillas. Un estudio más a fondo nos daría la información de si la recuperación de la actividad se debe a una síntesis de novo de la enzima, a una recuperación de la enzima per se o a la activación de otro factor que a su vez active a la DNA ligasa como podría ser la ADP-ribosilasa, enzima que se ha reportado que estimula la actividad de la DNA ligasa (Creissen and Shall, 1982).

La purificación parcial de la enzima pasando los extractos por una columna de DEAE-celulosa al parecer mostró 2 picos de actividad, uno de baja fuerza iónica y el otro eluido a fuerza

iónica mayor teniendo ambos picos actividades similares en cuanto a la concentración de ATP. Un estudio más detallado nos daría la información de si son 2 enzimas o actividades diferentes, como en el caso de chícharo (Daniel and Bryant, 1988) donde se encuentra una enzima unida a cromatina y otra soluble o bien, que se trate de un producto de degradación de la enzima.

Si el DNA está dañado por estos tratamientos y uno de los primeros eventos que deben suceder en la germinación es la reparación del DNA, entonces el hecho de que la DNA polimerasa y la DNA ligasa presenten una caída en su actividad podría provocar que la capacidad reparativa de las semillas se vea, por lo tanto, disminuída y todos los procesos que llevan a la germinación también se verán retrasados lo cual se reflejará en la viabilidad de las semillas.

Funciones del DNA tales como replicación y molde estarán alteradas por el hecho de que el DNA no ha sido reparado eficientemente en el tiempo adecuado y por lo tanto también estarán alterados los procesos de supervivencia de las semillas.

Consecuentemente, debido a la importancia de la DNA ligasa sugerimos que al igual que la DNA polimerasa (Vázquez, 1986), esta enzima podría ser tomada como otro marcador bioquímico en semillas resistentes al almacenamiento.

7. CONCLUSIONES

1. Se montó la metodología para poder estudiar la DNA ligasa en el sistema de maíz.

2. Se determinaron algunos parámetros óptimos de actividad de la DNA ligasa, como fueron temperatura, tiempo y concentración de ATP.

3. Se demostró que la actividad de la DNA ligasa es lábil ante los tratamientos con temperatura y/o humedad a que fueron sometidas las semillas.

4. La actividad de la DNA ligasa presentó recuperación después de algún tiempo de germinación (0-9 h) de los ejes embrionarios.

5. Al purificar parcialmente la DNA ligasa se encontró la posibilidad de que existieran 2 formas de la enzima.

REFERENCIAS

1. Abdalla, F.H. and Roberts, E.A. (1968) *Ann. Bot. (N.S.)* 32: 119-136.
2. Abu-Shakra, S.S. and Ching, T.M. (1967) *Crop. Scien.* 73: 115-118.
3. Arrand, E.J., Willis, A.E., Goldsmith, I. and Lindahl, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 20: 9079-9082.
4. Barker, D.G., White, J.H.M. and Johnston, L.H. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162: 659-667.
5. Bewley, J.D. and Black, M. (1978)a *Physiology and Biochemistry of seed in relation to germination. Vol. 1 (Development, Germination and Growth)*. Springer-Verlag. pp. 1-3 y 7-13.
6. Bewley, J.D. and Black, M. (1978)b *Physiology and Biochemistry of seed in relation to germination. Vol. 2 (Viability, Dormancy and Environmental control)*. Springer-Verlag. pp. 39-41.-41.
7. Bewley, J.D. and Black, M. (1986) *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. New York, USA. pp. 89-171.
8. Bray, C.M. and Dasgupta, J. (1976) *Planta*, 132: 103-108.
9. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978) *Nature, (London)* 272: 593-599.
10. Ching, T.M. (1973) *Sed. Sci. Technol.* 1: 73-88.
11. Ching, T.M. (1973) *Plant Physiol.* 51: 400-402.
12. Creissen, D. and Shall, S. (1982) *Nature* 296 (5854): 271-272.

13. Cutter, G.E. (1975) Plant Anatomy: Experiment and Interpretation Edward Arnold, Part 2, London. pp. 286-287.
14. Daniel, P.P. and Bryant, J.A. (1988) J. Exp. Bot. 39 (201): 481-486.
15. DeRecondo, A.M., Lepesant, J.A., Fichot, O., Grasset, L., Rossignol, J.M. and Cazillis, M. (1973) J. Biol. Chem. 248 (1): 131-137.
16. Elder, R.H., Dell'Aquila, A., Mezzina, M., Sarasin, A. and Osborne, D.J. (1987) Mut. Res. 181: 61-71.
17. Esau, K. (1972) Anatomia Vegetal. Ed. Omega, Barcelona, España. pp. 64B.
18. García, R.M. (1985) Tesis de Licenciatura.
19. Gellert, M. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 57: 357-378.
20. Germ, H. (1960) Proc. Int. Seed. test Ass. 25: 215-218.
21. Howell, S.H. and Stern, H. (1971) J. Mol. Biol. 55: 357-378.
22. Jugenheimer, R.W. (1976) Corn: improvement, set production and uses. John Wiley and sons, Inc. pp. 25.
23. Kornberg, A. (1974) DNA Replication. W.H. Freeman and Co., Sn. Francisco.
24. Lakon, G. (1949) Plant Physiol. 24: 389-394.
25. Lehman I.R. (1974) Science, 186: 790-797.
26. Lindahl, T. and Edelman, G.E. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 61: 680-687.
27. Lindahl, T. (1971) Methods in Enzymology 21: 333
28. Matz, A.S. (1969) Cereal Science, The Abi publishing Co. Inc. London, England. pp. 49-51.

29. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
30. Mayer, A.M. and Poljakof-Mayber, A. (1975) The Germination of seeds. 2nd. Ed. Pergamon Press. pp. 21-26.
31. Meléndez López, S.G. (1987) Tesis de Licenciatura.
32. Mezzina, M., Rossignol, J.M., Izzo, M., Bertazzoni, U. and Sarasin, A. (1987) Eur. J. Biochem. 162: 325-332.
33. Modrich, P. and Lehman, I.R. (1970) J. Biol. Chem. 245 (14): 3626-3631.
34. Montecucco, A., Pedrali-Noy, G., Spadari, S. and Ciarrocchi, G. (1988) Biochim. Biophys. Acta. 951: 330-334.
35. Muro, R.M. (1986) Tesis de Licenciatura.
36. Navashin, M.S. (1933) Planta 20: 233-243.
37. Navashin, M.S. (1933) Nature, Lond. 131: 436.
38. Olivera, B.M. and Lehman, I.R. (1967)a Proc Natl. Acad. Sci. USA. 57: 1426-1433.433.
39. Olivera, B.M. and Lehman, I.R. (1967)b Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 1700-1704.704.
40. Olivera, B.M., Scheffler, I.E., and Lehman, I.R. (1968) J. Mol. Biol. 36: 275-285.
41. Peterson, G.L. (1977) Anal. Biochem. 83: 346-356.
42. Peto, F.H. (1933) Can. J. Res. Lond. 9: 261-164.
43. Prignet, C., Maniey, D., Lefresne, J., Epel, D. Signoret, J. and David, J.C. (1987) Development Biology 124: 281-286.
44. Rabin, B.A. and Chase, J.W. (1987) J. Biol. Chem. 262 (29): 14105-14111.

45. Roberts, B.E., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973) *Bochem. J.* 131: 275-286.
46. Roberts, B.E. and Osborne, D.J. (1973) *Biochem. J.* 135: 405-410.
47. Roberts, E.H. (1972) *Viability of seeds*. Chapman and Hall, London. pp. 209-213 y 253-306.
48. Sen, J. and Osborne, D.J. (1977) *Biochem. J.* 166: 33-38.
49. Shvarnikov, P. (1936) *Planta* 25: 471-480.
50. Shvarnikov, P. (1939) *Bull. Acad. Sci., URSS, Ser. Biol.* 1009-1054.
51. Söderhall, S. and Lindahl, T. (1975) *J. Biol. Chem.* 250 (21): 8438-8444.
52. Teraoka, H. and Tsukada, K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260 (5): 2937-2940.
53. Thiman, K.V. (1980) *Senescence in Plants*, CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
54. Vázquez Ramos, E.T. (1986) *Tesis de Licenciatura*.
55. Vázquez-Ramos, J.M, López, S., Vázquez, E. and Murillo, E. (1988) *J. Plant Physiol.* 133: 600-604.
56. Villiers, T.A. (1974) *Plant Physiol.* 53: 875-878.
57. Villiers, T.A. and Edgecumbe, D. (1978) *Seed. Sci. Technol.* 3: 761-774.
58. Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. and Richardson, C.C. (1968)a *J. Biol. Chem.* 243 (17): 4543-4555.
59. Weiss, B., Thompson, A. and Richardson, C.C. (1968)b *J. Biol. Chem.* 243 (17): 4556-4563.

60. Colowick, S.P. and Kaplan, H.O. (1955) Methods in Enzymology, vol. II, pag. 538.