

2ej
131



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

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

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
EDGAR TARCISIO VAZQUEZ RAMOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

México, D. F.

1988



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.

I N D I C E

- 1.- INTRODUCCION
 - 1.1 Estructura de una semilla de Angiosperma
 - 1.2 Germinación, viabilidad y vigor
 - 1.3 Daños Genéticos relacionados con la pérdida de viabilidad
 - 1.4 Efecto del deterioro de las semillas en la síntesis de ATP y en la respiración
 - 1.5 Antecedentes inmediatos sobre el estudio de la relación entre viabilidad 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 Material biológico
 - 4.1.2 Soluciones Amortiguadoras y reactivos utilizados
 - 4.2 Métodos
 - 4.2.1 Tratamientos de las semillas
 - 4.2.2 Imbibición de los ejes embrionarios
 - 4.2.3 Obtención del homogenado y del extracto protéico
 - 4.2.4 Obtención del DNA activado
 - 4.2.5 Determinación de la síntesis de DNA in vitro con los extractos protéicos
 - 4.2.6 Determinación de proteínas totales en los extractos protéicos
 - 4.2.7 Determinación de la actividad de otras enzimas no relacionadas con el DNA

5.- RESULTADOS

- 5.1. Actividad de DNA polimerasa en extractos celulares de semillas no tratadas y tratadas.
- 5.2. Uso de NEM para verificación del tipo de enzima
- 5.3. Medición de otras enzimas no relacionadas con el DNA

6.- DISCUSION

7.- CONCLUSIONES

8.- BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

1.1. Estructura de una semilla de Angiosperma.

Las semillas de las angiospermas son esencialmente simples en estructura y se desarrollan de un óvulo fertilizado. Este consiste de un embrión que está rodeado por una envoltura. El embrión es usualmente derivado de la fusión de los núcleos de gametos masculinos y femeninos, es decir, es el resultado de la fertilización de la célula huevo en el saco embrionario por uno de los núcleos masculinos del tubo de polen (16).

Este embrión consiste del eje embrionario que contiene uno o más cotiledones. El eje embrionario está compuesto del hipocotilo al cual los cotiledones están unidos, la radícula y la plúmula. Raramente, un mesocotilo está presente, que es el sector de eje existente entre el escutelo y el coleóptilo. (Ver fig. 1). Estas partes son generalmente fáciles de distinguir en un embrión dicotiledón, pero difíciles de identificar en muchas especies monocotiledoneas, especialmente en las gramíneas. El cotiledón sencillo de éstos embriones se convierte en el escutelo (3, 9, 10, 16).

El tamaño de los embriones y su posición dentro de la semilla varía considerablemente. 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. Otros factores, los cuales determinan la forma y el tamaño de la semilla son el tamaño del embrión, la cantidad de endospermo presente y otros tejidos que participan en la estructura de la semilla (3,16).

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 generalmente una capa dura, en algunos casos una testa interna delgada está presente y está formada por el integumento interno. Su importancia fisiológica procede de la presencia de una cutícula externa e interna, a veces grasosa o cerosa y una o más capas de células delgadas protectoras. Estas características confieren sobre la testa un grado de impermeabilidad al agua y/o a gases,

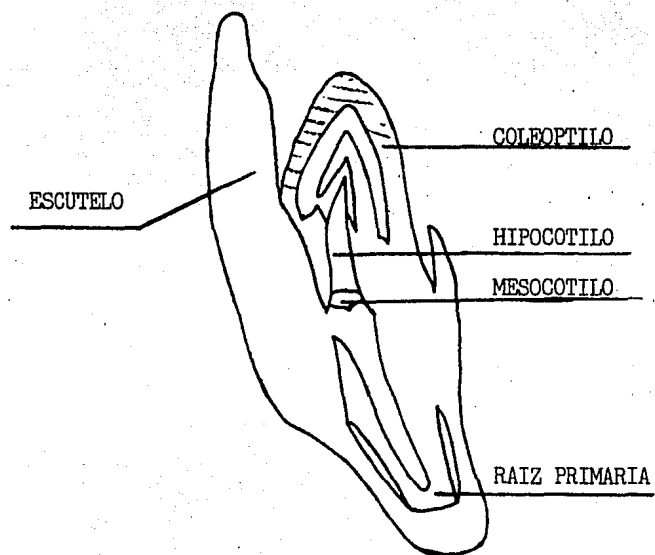


Fig. 1.- Diagrama de sección longitudinal de una semilla de trigo.
(*Triticum aestivum*)

incluyendo al oxígeno, así que éste puede consecuentemente ejercer una influencia regulatoria sobre el metabolismo y el crecimiento de los tejidos y órganos internos de la semilla. En algunos casos, la testa puede ser mucilaginosa y debido a esto tener una importante función en la retención del agua y dispersión de la semilla. (3).

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 (14).

Las semillas están descritas como endospermicas o no endospermicas dependiendo de la presencia o ausencia de un endospermo bien formado (3).

La semilla normal contiene material de nutrición el cual utiliza durante el proceso de germinación. Este material de nutrición está frecuentemente presente en el endospermo, como en el maíz y en el trigo. El endospermo puede contener una variedad de materiales almacenados como almidón, aceites y proteínas o hemicelulosas, 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 está grandemente reducido. En estos casos el material de reserva está presente en toda la semilla, como es el caso del frijol. En algunas plantas el material de reserva está contenido en el perispermo. El perispermo se origina de la nucela y no del saco embrionario como en el caso del endospermo (16).

Durante el desarrollo de la semilla el endospermo rodea al embrión y puede persistir como un tejido relativamente grande hasta que la semilla está 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 (3).

Las semillas se forman en el ovario y su desarrollo es dentro de los frutos. Los frutos que se originan primeramente del ovario son conocidos como frutos "verdaderos", mientras que los frutos en los que participan otras estructuras o varios ovarios y también su estructura relativa, son a veces denominados "falsos" (16)

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 éste grupo botánico posee sistemas 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 (15).

El maíz tiene como nombre botánico Zea mays Linnaeus ésta es una planta monoica y nativa de América donde su importancia biológica es notable hace siglos (18).

El registro histórico del maíz esta limitado a los años siguientes del descubrimiento de América. Aparentemente la primera referencia de la planta en documentos históricos data en Noviembre 5 de 1492. En aquél día dos Españoles, en una expedición de Colón al interior de Cuba, regresaron con un reporte de que "una clase de grano que aquellos llamaban maíz, tenía buen sabor, horneada, secada y hecha en harina" (13).

El maíz es la segunda planta alimenticia más importante del mundo, desde el punto de vista de producción. Con el reciente 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 (18).

La semilla de maíz contiene:

Humedad (%)	16.7
Almidón (%)	71.5
Proteínas (%)	9.91
Grasas (%)	4.78
Fibra (cruda) (%)	2.66
Azúcares totales (%)	2.58
Cenizas (óxidos) (%)	1.42
Carotenoides totales (mg/Kg)	30.0

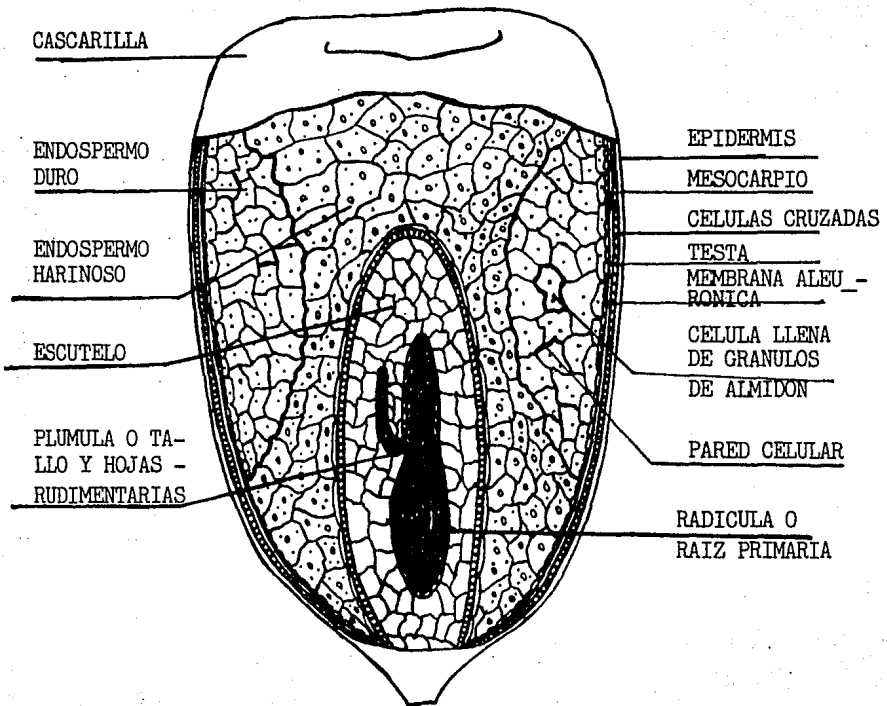


FIG. 2. Diagrama de sección longitudinal de una semilla de maíz.

La semilla de maíz está formada al igual que todas las Angiospermas — de las partes antes mencionadas. Su estructura es la que se observa en la — figura dos (15).

1.2. Germinación, viabilidad y vigor.

El término germinación es usado para referirse a un largo número de — procesos, incluyendo la germinación de las semillas y de esporas bacteria— nas, fúngicas y de helechos. Aunque todos éstos son procesos de germinación, daremos el uso del término germinación al de las semillas de las plantas supe riores (16).

La germinación de las semillas de las plantas superiores podemos obser— varlo como un número consecutivo de eventos que se suceden en una semilla in— móvil, con un 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 (16).

Para que puedan germinar las semillas, 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 gaseo sa de la atmósfera, así como la luz para algunas semillas (11).

El agua es indispensable para romper los tegumentos, facilitar la sali— da del embrión y también para las reacciones químicas de estos procesos.

El aire es necesario para la respiración de las semillas, como lo es pa— ra las plantas, pues en la atmósfera carente de oxígeno no germinan.

La temperatura, es específica para cada especie y cada especie 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. Por ejemplo, el maíz tiene una temperatura mínima de 9°C, una máxima de 43°C y la temperatura óptima de crecimiento es de 33°C (11).

El proceso de germinación comienza con un aumento de volumen a consecuencia del agua absorbida. El momento exacto en el cual la germinación ha terminado y comienza el crecimiento es muy difícil de determinar. Esto se hace particularmente difícil porque se identifica a la germinación por la protusión de una parte del embrión de la capa de la semilla, la cual es una consecuencia del crecimiento (16).

El proceso de germinación lleva eventualmente al embrión al desarrollo de una planta.

Las semillas son bastante resistentes a condiciones extremas, por decirlo así, ya que están en estado de desecación. Como un resultado de esto, pueden retener su habilidad para germinar, o viabilidad, por períodos considerables. La duración de tiempo 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 grandemente 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 (16).

La viabilidad es retenida por largos períodos de tiempo, especialmente en semillas que tienen una cobertura dura, como en las leguminosas, donde su viabilidad es retenida por varias décadas (16).

No sólo el estrés por almacenamiento es lo que hace que la semilla pierda su viabilidad. Una variedad de factores los cuales estuvo sometida la plan

ta 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 (16).

El vigor se define como la capacidad de una semilla para producir una planta bien formada y capacidad 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 (24).

1.3. Daños genéticos relacionados con la pérdida de viabilidad.

Estudios elaborados en una variedad de semillas y granos han mostrado que algunas combinaciones de tiempo, temperatura y contenido de humedad pueden ocasionar una pérdida de viabilidad en las semillas durante el almacenamiento y que esto lleva consigo una cantidad predecible de daños genéticos en dichas semillas (4).

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 esto, también independientemente o en conjunción con las lesiones nucleares, pueden constituir los cambios fatales (4).

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 (4).

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. Así se ha encontrado con alto número de aberraciones cromosomales en plantas provenientes de semillas viejas (6, 28).

Peto (1933), quien trabajó con semillas de maíz parece haber sido el -- primero en observar que ocurrían frecuentes aberraciones cromosomales visi- bles en raíces provenientes de semillas viejas.

Pero no sólo el envejecimiento de las semillas pueden ocasionar rupturas y aberraciones cromosomales. Por ejemplo, el almacenamiento a una alta temperatura también puede ser la causa de rompimientos cromosomales. 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 las exposiciones de semillas de cereales a temperaturas 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 viabili- dad, el peso molecular del DNA se ve disminuido y esto ocurre debido a los -- rompimientos que sufre el DNA principalmente el nuclear. La pérdida de viabi- lidad es muy rápida a altas temperaturas y humedades, es poco probable que es- to se pueda explicar por mecanismos casuales, sin embargo, la acción de nucle- asas (endonucleasas) pareciera ser el mecanismo más común para que el peso mo- lecular del DNA disminuya.

Villiers (1974), reportó que también las semillas de lechuga que son al- macenadas en condiciones de sequedad al parecer permiten la acumulación de da- ños nucleares, en un grado más o menos rápido dependiendo de las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, siendo ésta una semilla latente, en condicio- nes de almacenamiento con imbibición de agua, permitía a la semilla mantener-

se con una alta capacidad de germinación y un alto grado de estabilidad genética.

Un daño cromosomal intenso puede perjudicar a la actividad de templado 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 que depende de estos procesos. Así es como el DNA juega un papel importante en la pérdida de la viabilidad (4).

Por lo anterior un evento temprano después de la imbibición de semillas almacenadas podría ser la reparación del daño sufrido a las macromoléculas principalmente el DNA (4).

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; muestran también 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; todos éstos son eventos asociados con germinación lenta y pérdida de 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.

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

Además, las semillas de maíz no viables contienen niveles disminuidos de - citocromo oxidasa, deshidrogenasa alcohólica y deshidrogenasa málica. No se conoce hasta que punto la disminución de actividad de enzimas respiratorias con- tribuyen al deterioro del proceso respiratorio; pero se ha observado reciente- mente que la síntesis de algunas enzimas e isoenzimas respiratorias se llevan a cabo en embriones viales, pero no en los no viables. Por lo tanto, la incapaci- dad de producción y activación de enzimas respiratorias se asocia con la pérdi- da de viabilidad (18).

La pérdida de viabilidad en semillas en estado seco es un evento progresi- vo expresado en la germinación por fallas en el vigor de los embriones y un ba- jo establecimiento de las plantas. En términos bioquímicos ésta pérdida de vi- gor aparece como un decremento en la actividad mitocondrial (Abu Shakra y Ching, 1967), baja actividad de enzimas respiratorias (Lakon 1949) y una baja produc- ción de ATP (Ching 1973). Pero, la mayor lesión es la progresiva falla del sis- tema de síntesis de proteínas (25).

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

Miranda Ham, L. (1984), reporta que durante la pérdida de viabilidad de -- los ejes embrionarios de maíz (variedad Chalqueño), se presenta fragmentación - del DNA. Se demostró también que hay un incremento en la síntesis temprana de - DNA en ejes embrionarios de baja viabilidad y en los dañados por luz U.V., por lo que se sugiere que antes de iniciarse la replicación del DNA en estos ejes, - existe un proceso de tipo reparativo del DNA durante las primeras horas de imbi- bición lo cual permite que la germinación pueda llevarse a cabo.

García Rendón, M. (1985), reportó que tratamientos con temperatura y/o hu- medad altas producen deterioro en las semillas de maíz Chalqueño, que se refle- ja en una disminución de la viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas y que parece haber una relación con la baja en la integridad del DNA. Otro ha-

llazgo importante es el hecho de que en semillas tratadas dos días a 60°C y - 6 días a 40°C/100% de humedad, se presenta una caída considerable en la incorporación de (³H) Timidina al material ácido tricloro acético (síntesis de DNA) desde las primeras horas de germinación, por lo que sugieren que ha sido afectado el aparato de síntesis de DNA con los dos tratamientos y que no hay reparación del daño durante las primeras 15 horas de germinación.

Muro Rico, M. (1986), reportó que al someter las semillas de maíz a tratamientos con 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.

En la variedad de maíz Chalqueño, el grado del daño causado es mayor cuando el tratamiento aplicado es el de 6 días 40°C con 100% de humedad.

La pregunta que surgió a partir de éstos antecedentes fue si la causa de la caída en la capacidad de síntesis de DNA de los ejes embrionarios tratados con temperatura y/o humedad podrían ser debido a la actividad de las DNA polimerasas que, fueran particularmente lábiles a los tratamientos antes mencionados. Esto y la caída observada en la capacidad de síntesis de RNA y proteínas, explicarían por que los ejes embrionarios de semillas tratadas son incapaces de sintetizar DNA durante las primeras horas de la germinación.

2. Hipótesis

Ya que la síntesis de DNA se encontró reducida, en los ejes embrionarios de semillas deterioradas por los tratamientos de temperatura y/o humedad, podemos suponer que una de las causas de esta disminución en la capacidad sintética se debe a una menor actividad de la DNA polimerasa, que es particularmente lábil a dichos tratamientos.

3.- Objetivos.

Detectar como varia la actividad enzimática debido a los tratamientos a que son sometidas las semillas.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Materiales

4.1.1. Material Biológico:

Las semillas de maíz utilizadas en este trabajo son del tipo llamado Chalqueño, las cuales fueron proporcionadas por PRONASE (Productora Nacional de Semillas) al departamento de Bioquímica Vegetal de la DEPg de la Facultad de Química.

4.1.2. Soluciones amortiguadoras y reactivos utilizados

4.1.2.1. Solución amortiguadora de imbibición.

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

4.1.2.2. Solución Amortiguadora "A" para homogeneización.

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)		0.1 mM

4.1.2.3. Solución amortiguadora para la activación del DNA.

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

4.1.2.4. Solución Amortiguadora para medir síntesis de DNA in vitro

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

4.1.2.5. Líquido de centelleo.

(1,4-bis(2-(5-Feniloxazolil)) benceno (M ₂ POPOP))	0.1g
2,5-Difeniloxazol (PPO)	5.0g
Tolueno	1.0L

4.1.2.6. Reactivo "A" para la determinación de proteínas.

Desoxicolato de Sodio (DOC)	0.15%
Acido tricloroacético (TCA)	72.0%
Solución de Cobre-Tartrato- Carbonato (CTC):	
Na ₂ CO ₃	10.0%
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1%
Tartrato de Sodio y Potasio	0.2%

-estable por 2 semanas a temperatura ambiente-

4.1.2.7. Reactivo "B" para la determinación de proteínas.

Reactivo de Folin-Ciocalteus	1 Volumen
Agua desionizada	5 Volúmenes

4.1.2.8. Soluciones para la determinación de la alcohol deshidrogenasa.

Etanol	1.0M
Solución amortiguadora de Glicina *pH 7.5	0.5M
NADH	10mg/2ml

4.1.2.9. Soluciones para la determinación de málico deshidrogenasa

Solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.5	0.1M
Acido oxalacético	16mM
NAD ⁺ en NaHCO ₃	20mM

4.1.2.10 Soluciones para la determinación de la catalasa.

KMnO ₄	0.01M
Agua oxigenada (H ₂ O ₂)	0.06% sol.final
H ₂ SO ₄	2.0%

4.2. Métodos.

4.2.1. Tratamiento de las semillas.

Se colocaron las semillas en cajas de petri y éstas después se incubaron en las siguientes condiciones: 40°C con 100% de humedad durante 6 días o 60°C (calor seco) por 2 días. Después de éstos tratamientos, se procedió a extraer los embriones de las semillas.

4.2.2. Imbibición de los ejes embrionarios.

Lotes de 30 embriones fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaOCl, 0.5%) por 30 segundos y después lavados perfectamente con agua desionizada y estéril. Estos embriones se colocaron entre discos de papel filtro estériles en tubos de cultivo o en frascos estériles (ésto se realizó en condiciones de esterilidad). Se agregó después solución amortiguadora de imbibición (4.1.2.1.) (300µl). Una vez que se agregó la solución amortiguadora, se taparon los tubos para evitar evaporación y se incubaron durante 0,3,6 y 15 horas a 27°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los ejes embrionarios se sacaron de los tubos y se homogeneizaron. En caso de que no fueran a ser procesados de inmediato, los ejes se colocaron en tubos de ensayo y se guardaron a -70°C.

4.2.3. Obtención del homogenado y del extracto protéico.

Los ejes embrionarios se colocaron en un mortero limpio y seco, previamente enfriado y conservado en hielo, se agregó solución amortiguadora de homogeneización (4.1.2.2.) (2ml) y se homogeneizó durante aproximadamente 1 minuto en frío.

El homogenado se pasó a tubos "Corex" de 15 ml previamente enfriados y el mortero se enjuagó con 0.5ml de solución amortiguadora y se vertió al tubo. Después se procedió a centrifugar.

Primeramente se hicieron 2 centrifugaciones a 2000xg en una ultracentrífuga J2-21 Beckman, con un rotor JA-20 previamente enfriado, durante 15 minutos cada vez. Después de las 2 centrifugaciones, el sobrenadante de las centrifugaciones se trasvasó con pipeta pasteur, evitando acarrear tanto lípidos como pastilla, a tubos de policarbonato de 5ml previamente enfriados y éstos se centrifugaron en un rotor 494 IEC preenfriado, en una ultracentrífuga IEC a - - - 100,000xg durante dos horas.

Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, el sobrenadante se pasó a tubos de 13x100 con una pipeta pasteur evitando tomar tanto lípidos como pastilla. Los tubos se conservaron en frío todo el tiempo y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

4,2,4, Obtención del DNA activado.

Se disolvió 1mg de DNA de timo de ternera con 4ml de solución amortiguadora de activación (4.1.2.3.); una vez bien disuelto, se le agregaron 4 μ l de DNA asa (0.05mg/ml). Se incubó a 37°C por un período de 15 minutos, después se calentó a 77°C por 5 minutos y exactamente a los 5 minutos se sacó del baño y se enfrió súbitamente en hielo.

4.2.5. Determinación de la síntesis de DNA in vitro con los extractos proteicos.

La mezcla de reacción, cuyo volumen total fué de 250 μ l contenía solución amortiguadora para medir síntesis de DNA (4.1.2.4.), extracto protéico (70-120 μ g) y TTP ($3H$) (2 μ Ci)

Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, después se le agregó DNA de esperma de salmón (1.25mg/ml, 250 μ l) y luego ácido tricloroacético (10%, 1ml) previamente enfriado. Los tubos se colocaron en hielo durante 30 minutos. Una vez pasados los 30 minutos, se filtró mediante un sistema de filtro Millipore con filtros Whatman GF/C; los tubos se enjuagaron dos veces con TCA (10%) 1ml, cada vez y dos veces con etanol (96%) 1ml cada vez. Los filtros se secaron en

el horno a 100°C durante 30 minutos y una vez secos, se transfirieron a viales que contenían líquido de centelleo (4.1.2.5) (5ml). Se determinaron las cuentas por minuto en un contador de centelleo líquido Packard-Tri-Carb.

4.2.6. Determinación de proteínas totales en los extractos protéicos.

Se realizó la determinación de proteínas totales por el método de Lowry - modificado (Peterson, 1977).

Se hizo primeramente una curva patrón con albúmina sérica bovina (ASB). - Para ello se preparó una solución stock de 1mg/ml de ASB, empleando agua desionizada como disolvente.

Se tomaron alícuotas de la solución stock de ASB y se completó el volumen con agua desionizada a 1ml, para obtener un intervalo de concentraciones de -- 20-200µg de proteínas. En el caso de los extractos, se tomaron volúmenes de 10, 20 y 40µl, a los cuales se les añadió agua desionizada para que el volumen final fuera de 1ml.

A cada una de las muestras se le añadió desoxicolato de sodio (0.15%, 0.1 ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se le agregó ácido tricloroacético (72%, 0.1ml) preenfriado, se dejó reposar durante 15 minutos en hielo, una vez transcurridos los 15 minutos se centrifugaron los tubos - a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y los tubos se dejaron boca abajo sobre un papel absorbente durante 5 minutos aproximadamente para que la pastilla estuviera más o menos seca. Después se le agregó agua desionizada (1ml) y reactivo "A" (1ml) se mezclaron y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se les agregó reactivo "B" (0.5ml), se mezcló y se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. A los 30 minutos se tomó la lectura en un espectrofotómetro (Pye Unicam) a 750 nm.

La curva patrón se obtuvo graficando la absorción a 750 nm contra la concentración de proteínas en µg de ASB. Para calcular los valores de los extractos protéicos, el valor de la absorción se interpoló en la gráfica patrón y así se determinó la concentración de éstos.

4.2.7. Determinación de la actividad de otras enzimas no relacionadas con el DNA.

4.2.7.1. Alcohol Deshidrogenasa

Se midió la actividad de la alcohol deshidrogenasa por medio de un método espectrofotométrico, basado en la oxidación del NADH a NAD⁺ y observando el -- cambio de absorción en el espectrofotómetro a 340 nm.

Primeramente se agregó a una celda de cuarzo de 1ml, solución amortiguada de glicina (350ul) después se le agregó etanol (50ul), ambos mantenidos a - 37°C, se mezcló bien y se le agregó entonces el extracto protéico de los ejes embrionarios de las semillas tanto del control como de los dos tratamientos -- (50ul), se mezclaron bien y en seguida se agregó el NADH (50ul), se metió la - celda en el aparato y se observó el cambio de la absorción por medio de un gra ficador adaptado al espectrofotómetro.

Por último se calculó la actividad específica de la enzima por medio de - la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta E \times V}{t \times E_{340} \times v \times d} = X \text{ mol/min/ml}$$

de donde: ΔE = cambio de absorción

V= volumen de la celda

t= tiempo de corrido de la carta

E_{340} = absorción específica del NADH a 340nm

v= volumen de alícuota

d= paso de luz por la celda

a la concentración obtenida con la fórmula anterior se la divide entre la cantidad de proteínas del extracto, determinada por el método de Lowry modificado, mencionado anteriormente.

4.2.7.2. Malato Deshidrogenasa.

El método seguido para medir la actividad de esta enzima fué el mismo que para la alcohol deshidrogenasa.

En una celda de cuarzo de 1ml, se agregó solución amortiguadora de fosfatos (0.93ml), después se agregó ácido oxalacético (10µl) recientemente preparado, se mezcló bien y se le agregó extracto protéico de los ejes embrionarios de las semillas tanto control como de los dos tratamientos (50µl) se mezcló y por último se agregó NAD⁺ (10µl), se mezcló y la celda se introdujo en el aparato para observar el cambio de la absorción por medio de un graficador adaptado al espectrofotómetro.

La actividad específica de la enzima se midió por medio de la siguiente fórmula.

$$\frac{\Delta E \times V}{t \times E_{340} \times v \times d} = X \text{ mol/min/ml}$$

y a la concentración obtenida se le divide entre la cantidad de proteínas totales del extracto, determinada por el método de Lowry modificado.

4.2.7.3. Catalasa.

Esta enzima se midió por medio de la titulación del agua oxigenada remanente después de la reacción con permanganato de potasio.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. En primer lugar se agregaron 5ml de la solución de agua oxigenada a un matraz erlenmeyer de 250ml e inmediatamente después se agregaron 0.5ml del extracto protéico; se dejó la reacción por 5 minutos con agitación ocasional; inmediatamente después la reacción se detuvo con 5ml de ácido sulfúrico. El remanente se tituló con permanganato de potasio 0.01M; el resultado se comparó con un blanco de tiempo cero.

La actividad por minuto se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{(2.5 \text{ ml} - \text{vol. de KMnO}_4 \text{ problema}) 8.5 \mu\text{moles}}{2.5 \text{ ml} \times 5}$$

de donde:

8.5 μ moles es la concentración de H₂O₂ al tiempo
cero de la reacción

2.5 ml es el volumen de KMnO₄ que titulan las
8.5 μ moles de H₂O₂

5 son los minutos de la reacción.

Para obtener la actividad específica a este resultado se divide entre los
mg de proteína en 0.5ml del extracto.

5. R e s u l t a d o s.

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 éstas semillas se investigó la actividad de la DNA polimerasa como un marcador bioquímico para observar si a este nivel - había un daño.

Este estudio se realizó debido a que anteriormente (11), se había demostrado que en los embriones de semillas tratadas a 60°C por 2 días y a 40°C por 6 días/100% de humedad se afectaba la síntesis de DNA y la integridad del mismo.

La pregunta era si ésta disminución en la capacidad para sintetizar DNA se debía a que la DNA polimerasa también resultaba dañada, independientemente de que otros factores, relacionados o no, fueran igualmente afectados.

5.1 Actividad de la DNA polimerasa en extractos celulares de semillas no tratadas y tratadas.

El objetivo, era detectar cómo variaba la actividad enzimática en las - semillas sometidas a varios tratamientos.

Se pudo observar que cuando se trataban las semillas a 60°C por 2 días - y a 40°C por 6 días/100% humedad, la actividad de la DNA polimerasa era de -- 43% aproximadamente en ambos casos con respecto a la actividad mostrada por - el control. Estos experimentos se hicieron con ejes embrionarios sin imbibir. (Ver fig. 3)

En cuanto a los ejes embrionarios que fueron imbibidos durante 3 horas, - se pudo observar que en tanto en los embriones de las semillas tratadas a 60°C por 2 días, la actividad enzimática fué 40%, la actividad de la enzima de los ejes de las semillas tratadas por 6 días a 40°C/100% humedad fue 70% ambas con respecto a la actividad mostrada por el control (Ver fig. 4).

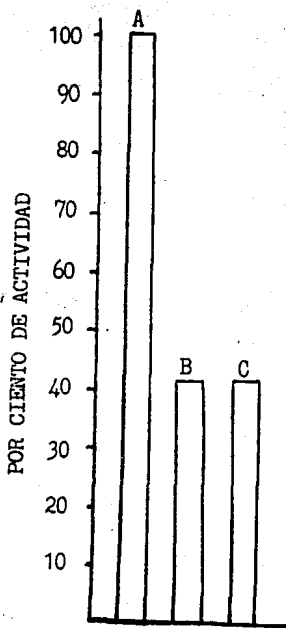


FIG. 3

Ejes embrionarios sin imbibir, A es el control, B es dos días a 60° y C - es 6 días a 40°/100% humedad.

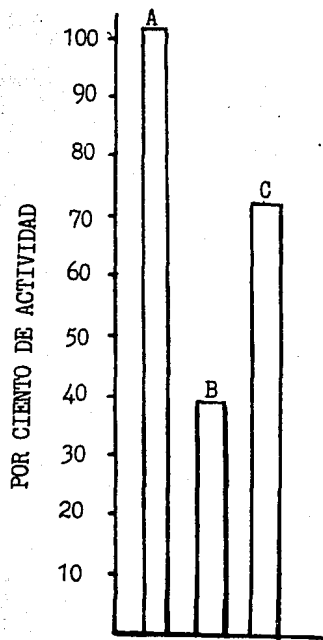


FIG. 4

Ejes embrionarios con 3 horas de imbibición, A es el control, B - es dos días a 60° y C es 6 días a 40°/100% humedad.

Por lo que respecta los embriones con 6 horas de imbibición, en las semillas tratadas a 60°C por 2 días la actividad fue 50% con respecto al control.- La actividad de la enzima en los embriones de las semillas tratadas a 40°C por 6 días/100% humedad se mantuvo similar a la actividad mostrada por la enzima - de los embriones imbibidos por 3 horas (70%). (Ver fig. 5)

Por último en los embriones de 15 horas de imbibición, como se observa en la figura 6, la actividad de la enzima de los embriones de las semillas tratadas a 60°C por 2 días se ha recuperado en su totalidad en tanto que la actividad de la enzima de los embriones de las semillas tratadas por 6 días a 40°C/-100% humedad mostraron un 80% de actividad con respecto al control.

Un resumen del comportamiento de la enzima con los tratamientos dados se puede observar en la figura 7.

Ya que se observó que la actividad de la DNA polimerasa se veía afectada por los tratamientos antes mencionados y que éstos tratamientos también afectaban la viabilidad, se quiso observar la actividad de la DNA polimerasa bajo -- otro tratamiento que también causa una baja en la viabilidad, como es la irradiación con rayos γ .

Los resultados obtenidos fueron que la actividad enzimática, tanto de los ejes controles como de los ejes irradiados mostró un comportamiento similar, -- es decir, la irradiación no afectó la actividad de la enzima. Este experimento se hizo sólo en ejes embrionarios sin imbibir y la dosis de radiación fué de -- 100K rads . (Ver fig. 8)

5.2 Uso de NEM para verificación del tipo de enzima.

Se utilizó N-etil maleimida (NEM) para tratar de averiguar si la actividad enzimática mostrada se debía a una DNA polimerasa de tipo α ya que la -- NEM es un potente inhibidor de esta enzima. La NEM se disolvió en Dimetilsul--fóxido (DMSO) por lo que los controles de éstos experimentos llevaban DMSO en cantidad igual a la NEM.

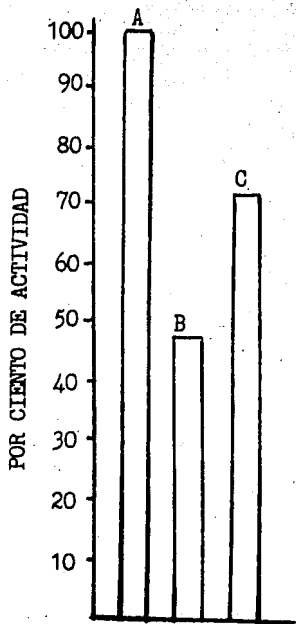


FIG. 5

Ejes embrionarios con 6 horas de imbibición, A es el control, B es 2 días a 60°C y C es 6 días a 40°C/100% humedad.

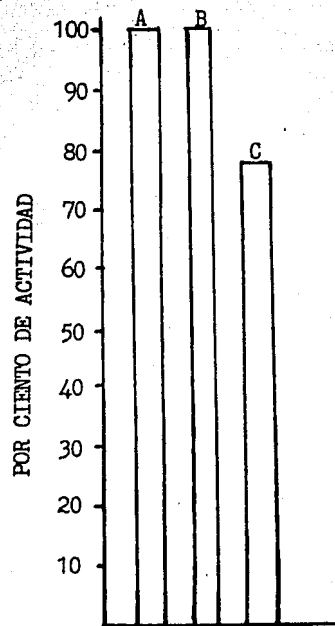


FIG. 6

Ejes embrionarios con 15 horas de imbibición, A es el control, B es 2 días a 60°C y C es 6 días a 40°C/100% humedad.

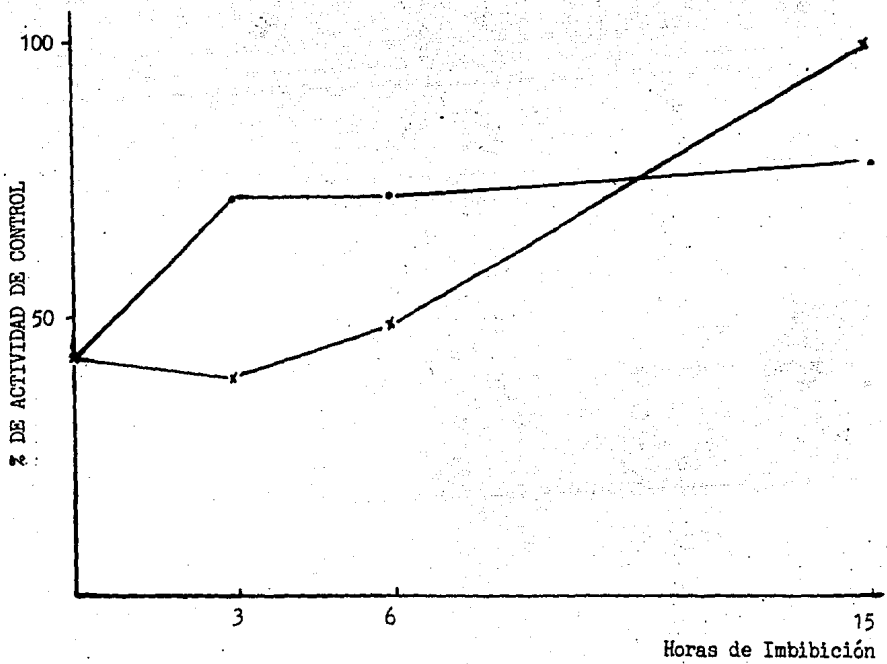


FIG. 7. Actividad de la DNA polimerasa.

Ejes embrionarios de semillas tratadas 2 días 60°C (X)

Ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días 40°C/100% humedad (•)

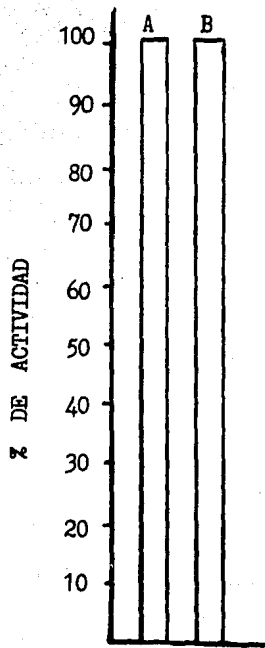


FIG. 8

Fig. 8. Ejes embrionarios sin imbibir

A= ejes embrionarios control

B= ejes embrionarios irradiados con rayos δ .

Estos experimentos se realizaron con ejes embrionarios de semillas que -
tuvieron los dos tratamientos antes mencionados e imbibidos por 3 y 15 horas.

Los resultados obtenidos con los ejes embrionarios de semillas tratadas
o no e imbibidos por 3 horas fueron los siguientes:

- a) Semillas control (no tratadas). Los extractos de ejes de semillas no tratadas e incubadas en presencia de NEM tuvieron sólo un 30% de la actividad mostrada por el control con sólo DMSO. (Ver fig. 9)
- b) Semillas tratadas por 6 días a 40°C/100% humedad. La presencia de NEM redujo la actividad de la enzima en los extractos de éstos -- ejes en un 30% comparada con su control con sólo DMSO. (Ver fig.9)
- c) Semillas tratadas por 2 días a 60°C. La actividad enzimática en - los extractos de los ejes de éstas semillas en presencia de NEM - fué de 40% comparada con su control con sólo DMSO. (Ver fig. 9)

Los resultados obtenidos con los ejes embrionarios de semillas tratadas -
o no e imbibidos por 15 horas fueron los siguientes :

- a) Semillas control (no tratadas). Los extractos de ejes de semillas no tratadas e incubadas en presencia de NEM tuvieron sólo un 30% de la actividad mostrada por el control con sólo DMSO. (Ver fig.10)
- b) Semillas tratadas por 6 días a 40°C/100% humedad. La presencia de NEM redujo la actividad de la enzima de los extractos de éstos - ejes en un 70% comparada con su control con sólo DMSO. (Ver fig.10)
- c) Semillas tratadas por 2 días a 60°C. La actividad enzimática de - los extractos de los ejes de éstas semillas en presencia de NEM - fué de 20% con respecto a su control con sólo DMSO. (Ver fig. 10)

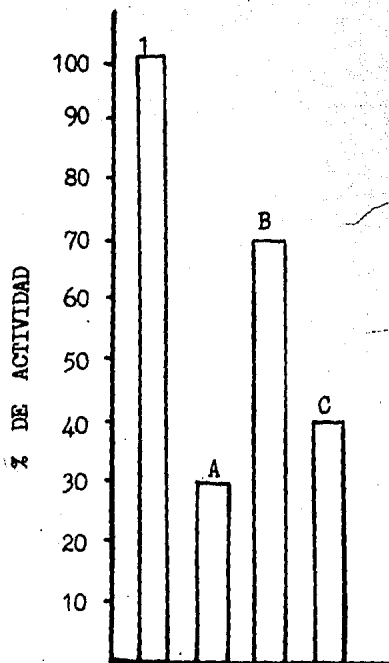


FIG. 9

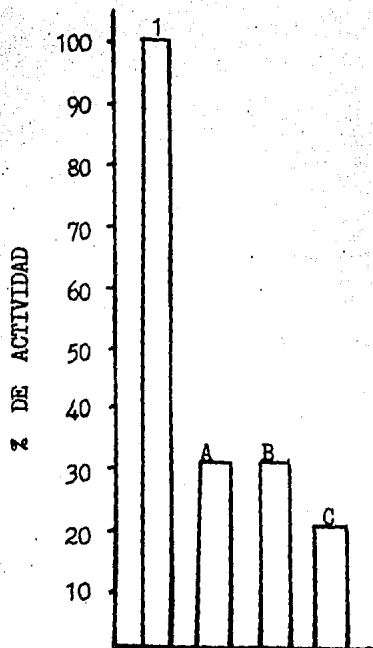


FIG. 10

Fig. 9. ejes embrionarios con 3 horas de imbibición; 1. control, 40°C 60°C con DMSO; A es control con NEM; B es 40°C con NEM y C 60°C con NEM.

Fig.10. ejes embrionarios con 15 horas de imbibición; 1. control, 40°C, 60°C con DMSO; A es control con NEM; B 40°C con NEM y C 60°C con NEM.

Se comparó la actividad enzimática de los controles con sólo DMSO tanto de los extractos de los ejes de las semillas como de las no tratadas. La actividad mostrada a las 3 horas de imbibición por extractos de ejes de semillas deterioradas (ambos tratamientos), fué de 70% con respecto a las no tratadas.

Por lo que respecta a las 15 horas de imbibición, los extractos de los ejes de las semillas tratadas por 6 días a 40°C/100% humedad tuvieron una actividad de 50% con respecto a los no tratados y los del tratamiento de 60°C por 2 días tuvieron 100% de la actividad mostrada por los no tratados. (Ver fig. 11).

5.3. Medición de otras enzimas no relacionadas con el DNA.

Debido a que la DNA polimerasa se vió afectada por los tratamientos a los que fueron sometidas las semillas, se quiso observar si otras enzimas no relacionadas con los mecanismos de síntesis del DNA se veían afectadas también con los tratamientos mencionados.

Las enzimas estudiadas fueron 3: la alcohol deshidrogenasa (ADH), la malato deshidrogenasa (MDH) y la catalasa. Las enzimas se estudiaron en ejes embrionarios de semillas que recibieron ambos tratamientos y del control, todos ellos sin imbibir.

5.3.1. Alcohol Deshidrogenasa (ADH) (EC 1.1.1.1.)

Esta es una enzima que pertenece a la vía Glucolítica anaerobia y es una de las enzimas finales de esta vía. Se encuentra en el citoplasma y su función es convertir el acetaldehído a etanol de manera reversible.

El comportamiento de esta enzima fué similar tanto en los extractos de los ejes de las semillas no tratadas, como en los extractos de los ejes de las semillas tratadas tanto de 40°C/100% humedad a 6 días, como en las de 60°C por 2 días. El valor que se obtuvo para su actividad fué aproximadamente de 20 μ mol/min/mg de proteína.

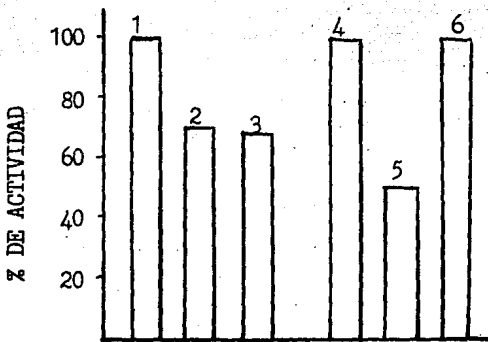


FIG. 11

Fig. 11. ejes embrionarios con 3 horas de imbibición :
1.- Control; 2.- 40°C y 3.- 60°C, todos con DMSO.
ejes embrionarios con 15 horas de imbibición:
4.- Control; 5.- 40°C y 6.- 60°C, todos con DMSO.

5.3.2. Malato Deshidrogenasa (MDH) (EC 1.1.1.37.)

Esta es una de las enzimas del ciclo de Krebs; su función es convertir - el ácido málico en ácido oxalacético de manera reversible. Esta enzima se encuentra tanto en citoplasma como en las mitocondrias.

El comportamiento de esta enzima varió un poco dependiendo del tratamiento.

- a) Semillas control (no tratadas). El comportamiento de la enzima de extractos de embriones de semillas no tratadas tuvo un valor de $13 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Ver cuadro 1).
- b) Semillas tratadas por 60°C por 2 días. El comportamiento de la enzima de extractos de embriones de semillas tratadas tuvo un valor de actividad específica de $5.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Ver cuadro 1).
- c) Semillas tratadas por 40°C 6 días/100% humedad. El comportamiento de la enzima de embriones de semillas tratadas tuvo un valor de actividad específica de $3.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (ver cuadro 1).

5.3.3. Catalasa (EC 1.11.1.6.).

Esta enzima rompe al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para evitar oxidaciones no deseadas ya que el H_2O_2 es un oxidante fuerte, rompe el H_2O_2 en H_2O y $1/2\text{O}_2$. Esta enzima se encuentra en un 40% en los peroxisomas aunque hay también en otros organelos.

El comportamiento de esta enzima fué similar tanto en los extractos de embriones que provenían de semillas control (no tratadas) como en los extractos de embriones de las semillas tratadas, tanto a 60°C por 2 días como a 40°C por 6 días/100% humedad. El valor que se obtuvo fué aproximadamente de $30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Ver cuadro 1).

T R A T A M I E N T O	E N Z I M A S		
	ADH μ Moles NADH/min/mg prot.	MDH μ Moles NAD ⁺ /min/mg prot.	CATALASA μ Moles H ₂ O ₂ /min/mg prot.
CONTROL	20.4	13	30.1
40°C	22.7	5.2	30.1
60°C	19.7	3.3	26.2

Cada valor es el promedio de 4 determinaciones, los valores fueron reproducibles.

6. DISCUSION

Se había reportado ya una correlación entre la baja viabilidad de semillas tratadas con alta temperatura y/o humedad y la menor capacidad de los ejes embrionarios de éstas semillas para sintetizar DNA (11). Se pensaba que una posible causa de esta reducida síntesis de DNA se debía al daño sobre la DNA polimerasa durante los tratamientos. Nosotros determinamos que en efecto la actividad de ésta enzima se reducía un 43% en extractos de ejes embrionarios sin imbibir de las semillas tratadas con respecto a las no tratadas. Interesantemente esta actividad fue recuperándose conforme aumentó el tiempo de imbibición de los ejes (0-15h) hasta llegar a un 80% en el caso de las semillas tratadas por 6 días a 40°C/100% humedad y a un 100% en el caso de las semillas tratadas por 2 días a 60°C. Esto está indicando que la baja capacidad de síntesis de DNA en las semillas deterioradas bien puede deberse a la caída en la actividad de la polimerasa. Si el DNA de las semillas deterioradas se encuentra roto (28) y uno de los primeros eventos de la germinación debiera ser la reparación del DNA (6), podríamos pensar que estas semillas que poseen una baja actividad de DNA polimerasa serán deficientes en su capacidad reparativa y por tanto el proceso germinativo podría retrasarse en mayor o menor grado.

Se usó NEM para verificar el tipo de DNA polimerasa presente en los extractos protéicos utilizados y se encontró que al menos en los del control se trata mayoritariamente de una DNA polimerasa de tipo α ya que la NEM inhibe en más de un 70% la actividad. El porcentaje de inhibición por NEM de la actividad en los extractos de semillas tratadas es variable. Interesantemente, los extractos de semillas tratadas por 6 días a 40°C/100% humedad tienen 70% de actividad a las 3 horas, pero NEM reduce esta actividad a sólo 30% a las 15 horas. Por otro lado, la actividad de polimerasa en estos ejes se recupera de 43% en los no imbibidos a 80% en los imbibidos por 15 horas (figs. 3 y 6). La actividad en los extractos de semillas tratadas a 60°C por 2 días es inhibida por NEM 60% a las 3 horas y 80% a las 15 horas. Igualmente, la actividad de polimerasa se recupera de 43% en los ejes no imbibidos hasta 100% de

los imbibidos por 15 horas (figs. 3 y 6). Estos datos sugieren, sobre todo -- para los ejes de semillas tratadas 6 días a 40°C/100% humedad, que existe -- otra actividad de polimerasa no inhibida por NEM presente en los extractos, -- que lleva a cabo la actividad sintética residual y que no resulta dañada por los tratamientos. La DNA polimerasa tipo α debe ser preferencialmente sintetizada cuando la semilla se recupera, ya que después de 15 horas, la inhibición por NEM de la actividad sintética es mucho mayor que a 3 horas.

La reducción en la actividad de polimerasa no es simplemente una consecuencia de la reducción de la viabilidad, ya que el tratamiento de las semillas con rayos γ que provoca una disminución de la viabilidad de éstas, no parece afectar la actividad de polimerasa. Es posible pues, que los tratamientos con humedad y/o temperatura que provocan un envejecimiento acelerado sean los causantes de la disminución de la actividad de la DNA polimerasa.

El efecto de los tratamientos sobre la actividad de la DNA polimerasa -- no parece ser un efecto general sobre todas las enzimas presentes en las semillas secas ya que al medir otras enzimas no relacionadas con el metabolismo -- del DNA se encuentra que algunas como son la catalasa y la ADH no sufren alteración alguna, mientras que la actividad de otras como la MDH se ve importantemente disminuída (50% aproximadamente).

Ya que la DNA polimerasa es de suma importancia para los procesos celulares y en particular vemos que en las semillas de maíz esta enzima es lábil al envejecimiento (28), podríamos sugerir que un marcador bioquímico a buscar en semillas más resistentes al almacenamiento, ya sea en condiciones óptimas o -- de deterioro, será una DNA polimerasa resistente. La presencia de este tipo -- de polimerasa en semillas indicaría la posibilidad de prolongar el tiempo de almacenamiento de las semillas conservando su viabilidad.

7. CONCLUSIONES

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

- 2.- La actividad de la DNA polimerasa presentó recuperación después de algún tiempo de imbibición (15 horas) de los ejes embrionarios.

- 3.- No se puede establecer una relación entre la actividad de la DNA polimerasa y la viabilidad de las semillas, ya que existen tratamientos (como los rayos γ) que bajan la viabilidad pero que no afectan la actividad de la enzima.

- 4.- Al analizar la actividad de enzimas no relacionadas con los mecanismos de síntesis del DNA, se observó - que con los tratamientos dados el daño no es general, ya que algunas enzimas se vieron alteradas y otras - no.

8.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abdalla, F.H. And Roberts, E.A. (1968) Ann. Bot. (N.S.) 32-119-136. Effects of Temperature moisture, and oxygen on the induction of chromosome damage in seeds of barley, broad beans, and peas during storage.
- 2.- Abu-Shakra, S.S. & Ching, T.M. (1967) Crop. Scie. 73: 115-118.
- 3.- Bewley, J.D. & Black, M. (1978) Physiology and Biochemistry of Seed in relation to germination. Vol. 1 (Development, Germination and Growth). Springer-Verlag. - pp. 1-3 y 7-13.
- 4.- Bewley, J.D. & Black, M. (1978) Physiology and Biochemistry of Seed in relation to germination. Vol. 2 (Viability, Dormancy and Environmental control). Springer - Verlag. pp. 39-41.
- 5.- Bray, C.M. & Dasgupta, J. (1976) Planta 132: 103-108. Ribonucleic acid-synthesis and loss of viability in pea seed.
- 6.- Cheah, K.S.E. & Osborne, D.J. (1978) DNA lesions - - occur with loss of viability in embryos of ageing rye-seeds. Nature (Lond) 272: 593-599.
- 7.- Ching, T.M. (1973) Sed Sci. Technol. 1: 73-88.
- 8.- Ching, T.M. (1973) Plant Physiol. 51: 400-402.

- 9.- Cutter, G.E. (1975) Plant Anatomy: Experiment and Interpretation. Edward Arnold, Part 2, London. pp. 286-287.
- 10.- Esau, K. (1972) Anatomia Vegetal. Ed. Omega, Barcelona - España. p. 648.
- 11.- García, R.M. (1985) Relación entre viabilidad de germinación y síntesis de DNA en embriones de maíz. Tesis de licenciatura.
- 12.- Germ, H. (1960) Methodology of the vigour test for wheat rye and barley in rollet filter paper. Proc. int. Seed. test Ass. 25: 215-218.
- 13.- Jugenheimer, R.W. (1976) Corn: improvement, set production and uses. John Willey and sons, Inc. p. 25.
- 14.- Lakon, G. (1949) Plant Physiol 24: 389-394. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds.
- 15.- Matz, A.S. (1969) Cereal Science. The Abi publishing Co. Inc. London, England. pp. 49-51.
- 16.- Mayer, A.M. & Poljakof-Mayber, A. (1975) The Germination of seeds. 2nd. edition Pergamon Press. pp. 21-26.
- 17.- Miranda, H.M.L. (1984) Estudio sobre la síntesis de DNA en la germinación de embriones de semillas de maíz. Tesis de Licenciatura.
- 18.- Muro, R.M. (1986) Efecto del deterioro de semillas sobre los sistemas de síntesis de proteínas en maíz. Tesis de Licenciatura.

- 19.- Navashin, M.S. (1933) Ageing of seeds is a cause of -- chromosome mutations. *Planta* 20: 233-243.
- 20.- Navashin, M.S. (1933) Origin of espontaneous mutations *Nature*, Lond. 131: 436.
- 21.- Peto, F.H. (1933) The effect of ageing and heat on the chromosomal mutation rate in maize and barley. *Can. J. Res.* 9: 261-264.
- 22.- Roberts, B.E. Payne, P.I. & Osborne, D.J. (1973) *Biochem J.* 131: 275-286. Protein synthesis and the viability of rye grains. Loss of activity of protein-synthesizing systems in vitro associated with a loss of viability.
- 23.- Roberts, B.E. & Osborne, D.J. (1973) *Biochem. J.* 135: 405-410. Protein synthesis and loss of viability in -- rye embryos. The lability of transferase enzymes during senescense.
- 24.- Roberts, e.h. (1972) Viability of seeds. Chapman and Holl, London. pp. 209-213 y 253-306.
- 25.- Sen, S. & Osborne, D.J. (1977) Decline in Ribonucleic Acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of ombition of Rye. (*Secale cereale* L) embryos. *Biochem. J.* 166: 33-38.
- 26.- Shkvarnikov, P. (1936) *Planta* 25: 471-480. Einfluss Hoher Temperatur ant die Mutationsrate bei Weizen.
- 27.- Shkvarnikov, P. (1939) *Bull. Acad. Sci. URSS Ser. Biol.* 1009- - 1054. Mutation in seeds and its significance in seed production and plant breeding .

- 28.- Vázquez, R.J., García, M. & López, S. Effect of High temperature and High Humidity on Viability, DNA Integrity and (³ H) Thymidine Incorporation in Zea mays, L. (Sometime a Canadian Journal of Botany)
- 29.- Villiers, T.A. (1974) Seed aging: Chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. Plant Physiol. 52: 875-878.
- 30.- Villiers, T.A. & Edgecumbe, D. (1975) Seed Sci. Technol 3: 761-774. On the Cause of seed deterioration in dry storage.