



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PATRONES DE PESO MOLECULAR DEL DNA,
MEDIANTE GRADIENTES DE SACAROSA Y GELES DE
AGAROSA DE SEMILLAS DETERIORADAS DE MAIZ



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SAMUEL GUILLERMO MELENDEZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1987.



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

	PAGINA
.- Introducción.	1
I.- Generalidades.	2
1.1.- Estructura de la semilla.	2
1.2.- Germinación.	4
1.3.- Bioquímica de la germinación.	5
A) Síntesis de proteínas.	5
B) Síntesis de RNA.	7
C) Síntesis de DNA y división celular.	12
1.4.- Factores que pueden afectar la viabilidad y el vigor de las semillas.	15
1.5.- Características de las semillas con bajos porcentajes de viabilidad.	18
1.6.- Integridad del DNA en semillas secas y su relación con la baja viabilidad.	18
1.7.- Evidencia de la reparación del DNA en semillas de plantas superiores.	21
1.8.- Antecedentes inmediatos del presente trabajo.	23
1.9.- Hipótesis de trabajo.	27
1.10.- Objetivos.	27
II.- Materiales y métodos	
A) Material biológico.	29
B) Soluciones y sustancias empleadas.	29
C) Métodos.	31
1.- Tratamientos de calor y humedad.	31
2.- Obtención de los ejes embrionarios.	32
3.- Técnica de imbibición de ejes embrionarios.	32
4.- Técnica de homogenización de ejes embrio-	32

narios para la obtención de núcleos.	33
5.- Técnica del gradiente alcalino de sacarosa.	34
6.- Extracción del DNA.	38
7.- Electroforesis del DNA en geles de agarosa.	39

RESULTADOS

1.- Montaje de la técnica del gradiente alcalino de sacarosa.	40
2.- Afinación de la técnica de Difenilamina.	43
3.- Montaje de la técnica de electroforesis en geles de agarosa.	43
4.- Patrones de peso molecular del DNA mediante gradientes alcalinos de sacarosa.	46
.- Geles de agarosa	56

DISCUSION.-	64
CONCLUSIONES.-	68
BIBLIOGRAFIA.-	69

I N T R O D U C C I O N

Tanto los procariotes como los eucariotes poseen sistemas efectivos de reparación del DNA que mantienen la integridad del genoma frente a las agresiones de la radiación ultravioleta, la radiación cósmica y otras radiaciones de alta energía, así como de los efectos de agentes mutagénicos químicos. (Hanawalt y cols, 1979).

La reparación de lesiones inducidas en el DNA de células vegetales ha sido demostrada para un buen número de tejidos incluyendo los embriones de las semillas (Soyfer, 1979; Osborne, 1982). La inducción de rupturas en las cadenas del DNA por γ -irradiación o tratamiento químico de embriones de cebada y su reparación subsecuente durante la imbibición, ha sido demostrada mediante el análisis del DNA en gradiente de densidad de sacarosa. (Veleminsky y Gichner, 1978). Sabemos ahora, que aún en estado seco, los embriones de alta viabilidad poseen algunos cortes de cadena sencilla en su DNA. (Cheah y Osborne, 1978). Igualmente, hemos demostrado en nuestro laboratorio, que el almacenamiento prolongado en condiciones adversas de temperatura y humedad producen fragmentación del DNA de semillas de maíz de alta viabilidad. (García Rendón, 1985).

El presente trabajo pretende aportar evidencias que apoyen la existencia de un proceso de reparación de la molécula de DNA, durante las primeras horas de la germinación (0-6 h), en semillas de maíz deterioradas artificialmente con calor y/o humedad.

I.- GENERALIDADES

El maíz pertenece a la familia de las plantas llamadas gramíneas y como miembro de este 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 (32).

El maíz tiene como nombre botánico Zea mays Linnaneus, es una planta monoica y nativa de América, donde su importancia biológica y alimenticia es notable desde hace siglos (40).

El maíz como planta alimenticia, ocupa el 2do. lugar a nivel mundial desde el punto de vista de producción. Con el reciente descubrimiento de dos mutantes de maíz de alto contenido de lisina, el maíz juega aún un papel más importante en la nutrición humana y animal (40).

1.1.- Estructura de la semilla.

Las semillas en general presentan tres estructuras básicas: el embrión, la testa o cubierta de la semilla y el endospermo. El embrión se deriva de la fusión de los núcleos de los gametos masculino y femenino.

La cubierta o testa se origina de la planta madre y se desarrolla en los integumentos del óvulo. El endospermo procede, al igual que el embrión, del material genético materno y paterno; su núcleo primario proviene de la triple unión de dos núcleos polares con uno de los núcleos masculinos.

La semilla de maíz madura está compuesta por tres partes principales: la testa o cubierta de la semilla, el endospermo amiláceo y el embrión, que llegará ser una nueva planta.

Cada una de las tres partes del grano cumple una función definida. La testa, también llamada pericarpio, protege a la semilla, tanto antes como después de la siembra, limitando o impidiendo la entrada de organismos patógenos que pudieran invadir al grano. Si el pericarpio resulta dañado tal vez la germinación se tome más lenta pues los hongos y bacterias pueden invadir a la semilla en germinación y utilizar las reservas alimenticias antes del afianzamiento de la plántula.

El endospermo es la principal reserva energética del grano y está compuesta por un 90% de almidón y 7% de proteínas con pequeñas cantidades de aceites, minerales y otros componentes químicos. Su función principal consiste en proporcionar nutrimentos a la planta hasta que sus raíces estén bien afianzadas y sus hojas elaboran carbohidratos en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos del crecimiento. En el endospermo la proteína se encuentra formando una red córnea en la que están incluidos los gránulos de almidón (36).

El embrión del grano está formado por el eje embrionario y el escutelo que constituye una reserva importante de nutrientes para la plántula en crecimiento. El eje embrionario está compuesto del hipocotilo al que se halla unido el escutelo, la radícula y la plúmula o epicotilo (parte foliar)

esbozo embrionario de cinco o seis hojas. El escutelo contiene un alto porcentaje de aceite(35-40%) y sustancias activas e importantes en las etapas iniciales de la germinación.

En forma muy general, 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	(32).

1.2.- Germinación.-

Es el conjunto de etapas sucesivas que llevan a que la semilla cambie su estado de reposo ó latente, al metabólicamente activo despertándose con ello una serie de eventos moleculares que llevan finalmente a la formación de una plántula a partir del embrión. Aunque el concepto de germinación no es fácil de definir, generalmente se dice que ha ocurrido una vez que una parte del embrión, normalmente la radícula atraviesa completamente la cubierta de la semilla. Este acontecimiento es precedido por una serie de eventos que son acompañados por ó terminan en un incremento irreversible en el volumen del eje embrionario. Desde un punto de vista bioquímico la germinación podría definirse como la se

ria de eventos moleculares que anteceden la primera división celular.

1.3.- Bioquímica de la germinación.

Según Osborne (1983) la secuencia de eventos que parece ser común a embriones, de un buen número de semillas de gramíneas, durante la germinación, puede dividirse en:

- a) Eventos tempranos: hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación del DNA.
- b) Eventos tardíos o secundarios: expansión celular, replicación del DNA y movilización de reservas.

A) Síntesis de Proteínas.

La síntesis de proteínas no ocurre en la semilla seca; comienza cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con RNAm.

El grueso de la literatura sobre síntesis de proteínas durante la germinación e imbibición ha sido revisada por -- Bray(1979), Mayer y Marbach(1981), Bewley y Black(1978) y -- Bewley(1982).

La capacidad de los tejidos imbibidos para sintetizar proteínas se mide proporcionando a éstos, aminoácidos marcados radiactivamente y determinando posteriormente que proporción de éstos se ha incorporado a las proteínas.

Para asegurarnos el acceso rápido del sustrato radiactivo a los tejidos vivos usualmente se trabaja con tejidos aislados como embriones de cereales, los ejes embrionarios

de semillas de leguminosas, etc.,. Estos tejidos aislados toman agua mucho más rápidamente que las semillas completas y quedan imbibidas totalmente. La incorporación de leucina a proteínas de embriones de avena procede a grados cada vez mayores, durante el período de dos horas durante el cual se completa su imbibición en agua. Esto se debe probablemente al número creciente de células que se hidratan conforme la imbibición progresa y al incremento de la actividad sintética de células individuales (41). La síntesis de proteínas también comienza en la primera hora de imbibición en embriones de trigo (Marcus y cols, 1966), cebada (Stoddart y Thomas, 1973), y centeno (Secale cereale) (Sen y cols, 1975) y en ejes embrionarios de frijol de Lima (Klein y cols, 1971).

La síntesis de proteínas se inicia tan rápidamente después de la imbibición, que, muy probablemente la mayoría de los componentes bioquímicos y estructurales necesarios deben estar presentes en la semilla seca.

Se pueden preparar sistemas libres de células capaces de sintetizar proteínas a partir de embriones secos de trigo y ejes embrionarios de chícharo (Peumans y cols, 1980). El sistema de germen de trigo tiene una gama completa de componentes solubles incluyendo RNA de transferencia (tRNA) y aminoacil-tRNA sintetasas (Weill y Parthier, 1982) junto con los factores requeridos para la iniciación y elongación de la cadena (Marcus, 1982).

Los ribosomas preparados de embriones secos son incapaces de sintetizar proteínas. Sin embargo, la actividad de estas preparaciones ribosomales aumenta rápidamente con la imbibición incrementándose en forma paralela la proporción

de polisomas presentes (Marcus y cols, 1966; Weeks y Marcus, 1971).

En embriones completos de cereales el índice de síntesis de proteínas continúa en aumento aún cuando la imbibición ya haya cesado. Un factor que podría ser el responsable de este aumento en embriones de avena es la creciente proporción de polisomas presentes (Bewley, 1982).

En embriones de trigo, por otro lado, no parece presentarse un incremento marcado en el contenido de polisomas durante el período lag que se extiende desde los 40 min a las 5 horas a partir del inicio de la imbibición (Spiegel y Marcus, 1975).

La creciente eficiencia de la síntesis de proteínas durante la fase lag puede ser atribuida en parte a niveles más elevados de ATP y GTP (Brocker y cols, 1977) y quizá también a un recambio incrementado de RNA.

B) Síntesis de RNA.-

Se ha demostrado que embriones secos de trigo contienen una diversa variedad de RNAs mensajeros almacenados; habiéndose confirmado también esto para otras especies como: centeno, algodón, chícharo, rábano, ricino, etc.. Se especula que probablemente existen dos clases de RNA en los embriones o ejes embrionarios secos: 1) RNA residuales -éstos son RNA producidos durante el desarrollo de la semilla y que no fueron destruidos durante la maduración tardía y la desecación. No son esenciales para la germinación y pueden ser degradados inmediatamente después de iniciada -

la imbibición. 2) RNAm almacenados o conservados -éstos -- son sintetizados durante el desarrollo, de tal forma que estén disponibles inmediatamente después de la hidratación y pueden ser rápidamente traducidos a proteínas que son parte integral de la germinación (4).

La evidencia de la existencia de RNAm almacenado en -- las semillas viene de experimentos en los cuales éstas se -- imbiben bajo condiciones que bloquean la formación de nuevo RNAm; si aún así la síntesis de proteínas continúa será por que se está utilizando RNAm preformado. Spiegel y Marcus -- (1975) trataron embriones de trigo con concentraciones de -- ~~α~~-amanitina y cordicepina(3'-desoxiadenosina) suficiente-- mente altas para inhibir la síntesis de RNAm en más de un 80%. Los embriones se colocaron en las soluciones inhibitorias preliminarmente durante 30 min a 0°C, para permitir -- que el inhibidor penetrara en los tejidos. Durante los pró-- ximos 40 min a 25°C se observó que la formación de polisom-- as fue tan rápida como en los controles, indicando que el RNAm preformado fue en gran medida el responsable de la sín-- tesis de proteínas en este período.

Como existe un cambio en el espectro de proteínas sinte-- tizadas durante el proceso de germinación: algunas "proteí-- nas del desarrollo de la semilla" que ya no se forman y nue-- vas "proteínas de la germinación" que aparecen por primera -- vez, podríamos esperar un cambio en la población de las mo-- léculas de RNAm durante este proceso. La cordicepina se ha -- utilizado para determinar la vida media de la molécula de -- RNAm durante la fase lag (Caers y cols, 1979). Cuando los -- embriones se imbiben durante dos horas en una solución que --

contiene adenosina marcada y después son transferidos a una solución con adenosina no marcada con cordicepina, el rRNA - marcado poliadenilado formado durante el pulso desaparece - con una vida media de aproximadamente dos horas; algo similar se ha encontrado en ejes embrionarios de semillas de rábano (Delseny y cols, 1977).

Aún a pesar de esta rápida degradación del rRNA existente, la síntesis de nuevas moléculas de mensajero puede - ser detectada en la primera hora de imbibición (Payne, 1977; Bray, 1979).

Tanto en rábano como en trigo se presenta una caída -- del nivel global del rRNA durante la primera y segunda ho-- ras de imbibición, seguido por un aumento a los niveles ori-- ginales durante el siguiente par de horas (Delseny y cols, 1977; Smith and Bray, 1982).

La conclusión que se puede extraer de estos experimen-- tos es que los embriones y los ejes embrionarios pueden sin-- tetizar proteínas codificadas por el rRNA almacenado duran-- te la imbibición temprana (los primeros 40 min para embri-- ones de trigo), pero después las moléculas sintetizadas de -- novo deben jugar un papel cada vez más importante. Estas mo-- léculas deben ser responsables, al menos en parte, del más -- alto índice de síntesis de proteínas observado durante la -- fase lag. El hecho de que la α -amanitina y la cordicepina -- aplicadas durante la fase lag impidan la síntesis de prote-- ínas así como la de rRNA apoyan este punto de vista (Caers y cols, 1979; Cheung y cols, 1979).

Con respecto al maíz la literatura es limitada; un es-- tudio acerca de la síntesis de proteínas durante la germina

ción se realizó en 1981 por Sánchez de Jiménez y cols. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la síntesis de proteínas de maíz está respaldada por RNAm preformado durante los estadios tempranos de la germinación. Se concluye que la traducción del RNAm sintetizado de novo está retardada con respecto a los estudios realizados en trigo, puesto que el efecto de α -amanitina en ejes embrionarios de maíz no es notable hasta las 18-24 horas de imbibición, mientras que en embriones de trigo se detecta después de 5 horas de imbibición.

Van de Walle y cols (1976) realizaron un estudio de la síntesis de RNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Ellos utilizaron métodos bioquímicos y autorradiográficos y reportaron que la mayoría de las moléculas de RNA sintetizadas en la radícula durante la primera hora correspondieron a RNA heterogéneo. Las autorradiografías les sugieren que una fracción del RNA heterogéneo nuclear recién sintetizado después de iniciada la imbibición se procesa rápidamente y transloca al citoplasma y posiblemente se incorpora a los polisomas.

Fue hasta 1983 cuando Domes y Van de Walle aclararon y confirmaron la suposición anterior al determinar el tiempo aproximado en el que el RNA recién sintetizado aparecía en el aparato traductor de los ejes embrionarios de maíz en germinación. Dos horas después de iniciada la imbibición en presencia de uridina radiactiva, se pudo encontrar moléculas de RNA marcadas en los polisomas; se determinó en una electroforesis en gel que su tamaño correspondía a 16S y cerca del 60% de éstas estaban poliadeniladas. Se demostró

también que las moléculas de RNA polisomal poliadenilado corresponden a RNAm ya que son capaces de servir como molde en un sistema de traducción libre de células dependiente de RNAm. Por lo tanto concluyeron que se trataba de RNA sintetizado de "novo"; los resultados indican también que el RNA heterogéneo nuclear, que es la especie de RNA más abundante durante las primeras horas de la germinación del maíz, es procesado rápidamente a RNAm funcional, translocado al citoplasma y traducido. Este proceso ocurre inmediatamente después de iniciada la imbibición y antes de que se termine el período inicial de absorción de agua por los ejes embrionarios de maíz; dicho proceso de absorción de agua dura de 3 a 4 horas.

La iniciación y continuación de la síntesis de RNA dependen de la existencia de una poza de precursores de ribonucleósidos trifosfato. ATP, GTP, CTP y UTP, que están presentes en muy pequeñas cantidades en el embrión seco de trigo; los cuatro nucleótidos aumentan rápidamente durante las etapas tempranas de la germinación. Sin embargo, el aumento de UTP y CTP es más lento, aunque aumenta sustancialmente entre las 3 y 5.5 horas después de iniciada la imbibición. Por ello el índice de síntesis de RNA a estos tiempos podría estar controlado tan solo por los niveles de ribonucleósidos trifosfato pirimidínicos. Pero, a decir verdad, la naturaleza de los mecanismos de control cualitativos y cuantitativos que gobiernan la síntesis de RNA en semillas en germinación es desconocido. Muchos niveles de control son posibles, por ejemplo: exposición del molde por las horas, la actividad de la RNA polimerasa, la disponibilidad

del sustrato, el procesamiento del RNA(particularmente del RNAm y RNAr) pero por el momento no existe evidencia que -- sustancie la operación de alguno de ellos durante la germinación.

C) Síntesis de DNA y División celular.-

La división celular cesa en una etapa relativamente - temprana del desarrollo de las semillas de chícharo y frij--jol. El embrión crece entonces, por expansión celular única mente, aunque la síntesis de DNA puede continuar para que - las células del cotiledón logren la poliploidia con niveles de DNA de 8-64C (Muntz, 1982).

La síntesis de proteínas y RNA se reinician tan rápido como los tejidos empiezan a ser imbibidos, pero la síntesis de DNA comienza después. En ejes embrionarios de trigo la - síntesis de la enzima DNA polimerasa es evidentemente un --prerrequisito para la síntesis de DNA(Mory y cols, 1975). En embriones de trigo,centeno la incorporación de timidina tritiada, comienza 5 horas después de iniciada la imbibición, pero en algodón y frijol comienza aún después.

La expansión de la radícula en la semilla, ocurre inicialmente por elongación celular, y su salida subsecuente a través de la cubierta de la semilla podrá o no estar acompa--ñada por la división celular(4).

Durante la mitosis en las radículas de semillas de cebolla (Allium cepa) en germinación los núcleos crecen de un diámetro de aproximadamente 7µm hasta más del doble.

La síntesis de DNA comienza antes de la división celu--

lar mitótica, ocurriendo la primera cuando la longitud de la raíz ha alcanzado 1.4 mm (y los núcleos 15 μ m de diámetro), pero la segunda no es evidente hasta que las raíces han alcanzado una longitud mínima de 2.8 mm. Entre la síntesis de DNA y la mitosis existe un interludio de aproximadamente 9 horas. Se han hecho observaciones similares en otras semillas aunque el inicio de la síntesis de DNA en diferentes tejidos de una semilla en germinación puede ser muy variable, por ejemplo en ejes embrionarios de Zea mays la síntesis de DNA es detectada, primero en la punta de la raíz, la coleorriza y el nodo escutelar, después en la raíz y finalmente en el mesocotilo, ápice del tallo y en las hojas (4).

Se sabe poco acerca de la regulación de la síntesis de DNA y la razón por la cual se retarda hasta las instancias terminales de la germinación y/o etapas tempranas del crecimiento.

Se ha considerado la posibilidad de que la disponibilidad de los precursores de los desoxirribonucleósidos trifosfato juegan un papel importante (porque no se encuentran en la semilla seca), o la disponibilidad de las enzimas que los procesan hasta DNA o ambos.

La timidina debe ser convertida primero a su trifosfato (TTP) antes de su incorporación como desoxirribonucleótido (dTTP) a la molécula de DNA.

Dos enzimas deben hacerse presentes para que la timidina sea utilizada: 1) la timidina cinasa para la fosforilación de la timidina y 2) la DNA polimerasa para la inser---

ción de los desoxirribonucleótidos al molde de DNA. La actividad de la timidina cinasa es muy baja en embriones secos de trigo, pero considerablemente elevada a las 36 horas de iniciada la germinación (el mecanismo cinético de su aumento de actividad a través del tiempo se desconoce) (4).

La enzima esta formada por dos componentes (P y T), y ambos son requeridos para su actividad. En embriones de maiz el componente T (pero no el P) está ausente durante las primeras 36 horas de imbibición, y a partir de aquí aumenta su actividad (4). Es posible, entonces, que la timidina cinasa (y quizá también las cinasas para otros desoxirribonucleótidos) limita la síntesis de DNA durante las etapas que suceden a la imbibición restringiendo la utilización de la poza de precursores. Pero también los niveles de DNA polimerasa pueden ser un factor de control, ya que la actividad de esta enzima es generalmente baja en las semillas secas y aumenta poco antes de que la germinación llegue a término (4). En otras semillas (por ejemplo chícharo), dicha enzima no parece ser un factor limitante, durante el período anterior al inicio de la síntesis de DNA. Una tercera enzima, la ribonucleósido reductasa (que convierte ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos), aumenta su actividad en semillas de Vicia faba coincidentemente con una síntesis incrementada de DNA; en embriones de trigo, sin embargo, esto no sucede (4). Actualmente, entonces, no puede invocarse a una enzima o a un evento en particular como el responsable del control o limitación de la síntesis del DNA (Podrá variar de especie a especie, o, simplemente, no existe un solo punto de control sino varios) (4).

Para una síntesis exitosa de DNA se requieren un gran número de factores y enzimas por ejemplo, protefnas desenrolladoras, girasas, RNA polimerasas, DNasa y primasas, etc, y los estudios sobre ellos están aún por iniciarse en semillas(4).

En los tejidos de reserva en los cuales no se presenta la división celular los niveles de DNA pueden ó no cambiar después de la imbibición. En algunos por ejemplo: Chfcharo silvestre(Pisum arvense), los niveles de DNA permanecen --- constantes durante y después de la germinación del eje y --- luego declinan conforme se inicia la senescencia. En otros, por ejemplo cotiledones de cacahuete, los niveles de DNA se duplican entre los siete y diez días después de la imbibición y después declinan durante los días siguientes. Parte del incremento puede deberse a la síntesis de DNA plastídico o mitocondrial, aunque este corresponde tan solo al 1-2% del DNA total. Así, puede afirmarse que la mayor parte de la síntesis de DNA es muy probablemente de origen nuclear y podría deberse a una amplificación de genes para enzimas --- involucradas en la degradación de reservas; debe decirse, --- sin embargo que no existe evidencia alguna que apoye esta --- posibilidad (4).

1.4.- Factores que pueden afectar la viabilidad y el vigor de las semillas. (Longevidad de las semillas).

Una semilla que no germina cuando se le proporcionan a agua y ambiente adecuados para su reactivación, ha perdido --- viabilidad. La pérdida de viabilidad de semillas en estado_

seco es un hecho que se refleja en la germinación a través de un vigor y un porcentaje de germinación disminuidos. Durante el período en que la semilla permanece seca, se llevan a cabo cambios lentos en las células vivas, que dan como resultado una pérdida de vigor y viabilidad del embrión, que se dice que son efectos del envejecimiento de la semilla.

Los factores que influyen sobre la longevidad de las semillas en el almacenamiento son: la temperatura, la humedad y la presión de oxígeno. En general a menor temperatura y humedad es mayor el período de viabilidad de la semilla y para muchas especies a mayor presión de oxígeno es menor el período de viabilidad(2).

Relación entre la pérdida de viabilidad y el ambiente de almacenamiento:

1.- Por 1% de disminución en el contenido de humedad de la semilla, la vida(en almacenamiento) de la semilla se duplica,(según Roberts es por cada 2% de decremento de humedad) (2).

2.- Por cada 5.6% de decremento de la temperatura de almacenamiento de la semilla, la vida en almacenamiento se duplica.

3.- La suma aritmética de la temperatura($^{\circ}$ F) y el porcentaje de humedad relativa de almacenamiento no debe exceder de 100 y la temperatura no debe exceder la mitad de la suma.(2).

Las semillas son bastante resistentes a condiciones ex

ternas extremas, siempre y cuando estén en estado de desecc
ción y como resultado de éste, conservan íntegra su capaci-
dad de germinar.

El tiempo que la semilla se conserve viable depende de su información genética y de las condiciones de almacena-
miento. En general la viabilidad se conserva mejor bajo con
diciones en que la actividad metabólica de las semillas es-
té más reducida: baja temperatura y elevada concentración -
de CO₂.

Los factores ambientales tienen un efecto decisivo en la
duración de la vida de la semilla; esto determinarán si
la semilla se conserva viable durante el período fijado ge-
néticamente o bien pierde viabilidad en un tiempo más corto

Los tratamientos a los que está sometida la semilla du-
rante la cosecha y postcosecha afectan y dan lugar a la pér-
dida de viabilidad. Los daños mecánicos durante la cosecha -
pueden reducir considerablemente la viabilidad de algunas -
semillas que son más susceptibles, otras como el arroz y --
trigo son más resistentes. Las semillas esféricas y peque--
ñas tienden a estar más protegidas al daño durante la cose-
cha que aquéllas semillas alargadas o de forma irregular.
Durante el almacenamiento, las zonas dañadas o perforadas -
de las semillas sirven como centro de infecciones y provo--
can un envejecimiento acelerado. Esto también promueve el -
debilitamiento y muerte temprana de los tejidos vecinos nor-
males. Temperaturas elevadas durante el secado o bien un se-
cado muy rápido o excesivo puede reducir la viabilidad (34)
(68).

1.5.- Características de las semillas con bajos porcentajes de viabilidad.

Las semillas con bajos porcentajes de viabilidad muestran fallas en el acoplamiento respiratorio, pérdida de la actividad de algunas enzimas tales como las deshidrogenasas (Iakou, 1949) y las transferasas dependientes de GTP (Roberts y Osborne, 1973; Dell' Aquilla y cols, 1976; Bray y Chow, 1976a), desensamblaje de ribosomas (Bray y Chow, 1976b; Roberts y cols, 1973) y pérdida de RNA poliadenilado, además se ha demostrado que a nivel transcripcional la síntesis de todas las clases de RNA está deteriorada y el procesamiento de precursores de RNA ribosomal a RNA ribosomal maduros se demora (cebada: Van Onckelen y cols, 1974; centeno: Sen y Osborne, 1977; ejes embrionarios de Chfcharo: Bray y Dasgupta, 1976).

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

1.6.- Integridad del DNA en semillas secas y su relación con la baja viabilidad.

Cuando una lesión producida al DNA de semillas se convierte en una mutación, esta es reflejada por una serie de variaciones morfológicas en las plantas originadas por estas semillas. Estas alteraciones han sido detectadas con frecuencia en plantas de semillas que han sido almacenadas

en estado seco por tiempo prolongado, en relación con aquellas originadas por semillas recién cosechadas, como lo reportó De Vries desde 1901.

Cheah y Osborne(1978) encontraron que tanto el envejecimiento natural como la irradiación de semillas con rayos gamma, produce un incremento en la fragmentación del DNA. Ellos analizaron por autorradiografía-después de cuantificar la incorporación de $^3\text{H-dCTP}$ a cortes en el DNA de los núcleos de embriones de centeno en presencia de $3'$ -OH-desoxinucleotidil transferasa de timo de ternera, el alto número de fragmentos de cadena sencilla detectables en el DNA nuclear en preparaciones fijas de secciones de embriones de semillas de un largo período de almacenamiento, cuya capacidad de germinación corresponde a 0%.

También realizaron preparaciones de embriones frescos, con un 95% de germinación y de embriones con una capacidad de germinación del 95%, después de haber sido irradiadas (Radiaciones gamma - 50KR) en estado seco.

Las diferencias en la integridad del DNA se pueden demostrar también por técnicas electroforéticas. Los resultados obtenidos mostraron que el DNA de los embriones con una capacidad de germinación del 95% fue predominantemente de elevado peso molecular, con solo unos cuantos fragmentos de bajo peso molecular, mientras que una gran proporción de éstos últimos fueron detectados en el DNA de semillas no viables.

Una observación de gran interés es el hecho de que existe un incremento en la degradación del DNA, cuando los embriones no viables son imbibidos en agua durante 18 horas

antes del aislamiento de los núcleos.

Un análisis en el densitómetro de Faulgen de preparaciones de embriones , muestra que la cantidad total de DNA por núcleo no varía durante las horas de imbibición; entonces la fragmentación progresiva del DNA con el tiempo, es atribuible a una continua actividad de endodesoxirribonucleasas asociadas a la cromatina.

En semillas, durante la maduración del embrión la fragmentación del DNA nuclear y la activación de las DNAsas ocurre in vivo. Esta disminución de la integridad del DNA puede ser la fuente de las aberraciones y el daño observado en la transcripción, cuando las semillas de baja viabilidad -- germinan (Cheah y Osborne, 1978). Investigaciones en semillas de chícharo, haba y cebada, tratadas con humedad y temperatura en diferentes rangos, han mostrado pérdida de la viabilidad de las semillas en diferentes grados y acumulación de aberraciones cromosómicas durante las primeras divisiones de los meristemas de las raíces, siendo durante la anafase más fácil observar el daño causado a los cromosomas.

De Vries (1901) fue el primero en relacionar los bajos porcentajes de germinación de las semillas de baja viabilidad de Oenothera lamarckiana con el gran número de alteraciones fenotípicas de las plantas y con los cambios en el DNA.

1.7.- Evidencia de la reparación del DNA en semillas de Plantas superiores.

Se han encontrado evidencias de que, tanto en semillas viejas como en aquéllas que han sido cosechadas recientemente se lleva a cabo un proceso reparativo del DNA durante la germinación temprana, previo a la replicación de esta macromolécula, el cual se refleja como un aumento en la incorporación de timidina tritiada dentro del DNA sintetizado en una fase no replicativa. Esto sucede en semillas de diferentes especies. Estos resultados son aún más claros cuando las semillas han sido irradiadas o tratadas con agentes químicos mutagénicos (Soyfer y Ciemenis, 1974; Yamaguchi y Naito, 1975).

Mory (1972) sugiere que existe una fase de activación de los procesos bioquímicos relacionados con la síntesis de DNA y que estos procesos incluyen: eliminación de los posibles inhibidores; síntesis y/o activación de enzimas participantes, tanto en la replicación del DNA como en el proceso de reparación, que proporcione un molde activo y eficiente.

Tano y Yamaguchi (1977) señalan en su estudio del DNA de núcleos aislados de embriones irradiados que, éste sufre un cambio que va desde predominancia de DNA de bajo peso molecular en general, a un peso molecular mayor durante el período prerreplicativo del DNA, indicando que debe ocurrir un proceso de reparación de las rupturas sufridas en el DNA antes del estado replicativo.

Resultados similares han sido obtenidos por Villiers y Edgecumbe (1975) en semillas secas de lechuga que fueron i--

radiadas y después sometidas a imbibición, sin que éstas llegaran a germinar.

Osborne y colaboradores (1984) en su estudio sobre semillas de centeno, indican que la síntesis temprana de DNA no replicativa, ocurre de manera normal tanto en embriones frescos con un 95% de germinación como en embriones de semillas envejecidas con un 52% de germinación, siendo inicialmente esta síntesis significativamente alta.

Veleminsky y Gichner (1978) señalan que los embriones de semillas poseen un sistema reparativo activo del DNA. Cuando el DNA de semillas secas ha sido dañado por agentes físicos o químicos, los sistemas de reparación actúan sólo cuando los embriones han sido rehidratados.

En tejidos hidratados de plantas superiores y activos metabólicamente, los mecanismos de reparación parecen estar en continua operación, por ejemplo: en protoplastos de zanahoria expuestos a radiación gamma, la reparación de fragmentos de cadena sencilla en el DNA analizados por gradiente alcalino de sacarosa, muestran que el 50% del daño causado en una de las cadenas del DNA, es reparado en solo 5 min y la reparación total de la molécula de DNA se alcanza después de una hora (Howland y cols, 1975).

Qué el mecanismo de reparación no es totalmente efectivo en semillas viejas se hace evidente dado el alto nivel de aberraciones cromosómicas observadas en plantas de maíz durante la germinación y del gran número de anomalías presentes en las plantas originadas de estas semillas. Una vez que las mutaciones pasan a línea germinal, se convier-

ten en mutaciones heredables.

Por otra parte, los rompimientos pueden ocurrir en sitios próximos en una de las cadenas del DNA de semillas viejas, el daño entonces puede ser considerado de manera diferente al daño que provoca el rompimiento de las dos cadenas. Esto, asociado a la actividad de ligasa afectada, aumenta la probabilidad de que ocurra una mutación; mientras que el daño a cadena sencilla puede repararse con mayor fidelidad y menor riesgo a la ocurrencia de errores. Cortes cercanos producidos en cadenas opuestas, pueden conducir a lesiones letales o a la posibilidad de que la reparación ocurra erróneamente (Osborne, 1982).

Puede entonces concluirse, que al no detectarse proceso sintético en semillas secas, cualquier daño o lesión al DNA que se acumula durante el estado seco requerirá de una reactivación de procesos reparativos durante la imbibición, antes de poder iniciar el proceso de replicación.

La efectividad y fidelidad del proceso reparativo dependerá entonces de que tan funcionales se encuentran las enzimas reparativas y de la integridad general de la molécula de DNA.

1.8.- Antecedentes inmediatos del presente trabajo.

Miranda Ham, Ma. de Lourdes (1984) en su tesis de licenciatura reportó que durante la pérdida de viabilidad de ejes embrionarios de maíz (var. Chalqueño) se presenta fragmentación del DNA.

Existe semejanza en cuanto a la falta de integridad --

del material genético entre los ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad y los ejes embrionarios dañados con luz ultravioleta. Se demostró también que hay un incremento en la síntesis temprana de DNA en ejes embrionarios dañados con luz ultravioleta. Estas observaciones sugieren que antes de iniciarse la replicación del DNA, debe presentarse un proceso reparativo de éste durante las primeras horas de la imbibición lo cual permite que la germinación pueda llegar a su término.

García Rendón, M. (1985) reportó, en su tesis de licenciatura, que al tratar con temperaturas y/o humedad altas - semillas de maíz chalqueño se produce deterioro en ellas, - lo que se refleja en una disminución de la viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas y parece estar relacionado con la integridad del DNA. Otro hallazgo importante relacionado con la integridad del DNA, es el hecho de que en semillas tratadas 2 días a 60°C y 6 días a 40°C con humedad saturante se presenta una caída considerable en la incorporación de material radiactivo (³H-timidina) desde las primeras horas de la germinación, estos datos sugieren que ha sido afectado sensiblemente el aparato de síntesis del DNA durante los tratamientos dados a las semillas, y el proceso de reparación del daño a esta macromolécula también se ve afectado durante las primeras horas (15 horas) de la germinación.

Muro Rico, Marcela (1986), reportó en su tesis de licenciatura que al someter semillas de maíz a tratamientos drásticos de temperatura y/o humedad, se provoca deterioro en éstas el cual se manifiesta en la incapacidad de sintetizar

zar RNA y protefnas en las primeras 15 horas de la germinación.

Vázquez Ramos, E.T. (1986), en su tesis de licenciatura demostró que la DNA polimerasa de ejes embrionarios de semillas de maíz (var. Chalqueño) es lábil ante los tratamientos de temperatura y/o humedad a que fueron sometidas estas semillas. Sin embargo, no pudo correlacionar esta caída de la actividad de la DNA polimerasa con la viabilidad de las semillas, ya que dicha actividad se recuperaba gradualmente conforme avanza el tiempo de imbibición (15 horas o más). Además, existen otros tratamientos (como los rayos gamma) que bajan la viabilidad pero no afectan la actividad de la enzima.

Osborne y colaboradores (1980-81) han encontrado que a mayores dosis de irradiación aplicada a los embriones secos de centeno, los índices de incorporación de ^3H -metil-timidina al DNA durante las primeras horas de imbibición son también mayores (esto es, durante el período previo a la sin tesis replicativa).

A resultados similares llegaron Vázquez Ramos, J.M. y Osborne, D.J. (1986). Ellos encontraron que los ejes embrionarios de centeno irradiados e imbibidos durante 50 minutos mostraron un patrón de síntesis de DNA al que ellos llamaron de tipo "reparativo", después de analizar el DNA sintetizado y marcado mediante cromatografía en BND-celulosa. Igualmente encontraron que ejes embrionarios de centeno de alta viabilidad y no irradiados presentaron un patrón de síntesis al que llamaron de tipo "replicativo", el cual se presentó después de las 8 horas de imbibición, y, por úl-

timo observaron que ejes embrionarios de centeno no irradiados de baja viabilidad, durante las primeras dos horas de imbibición, presentaron un patrón de síntesis diferente (no encasillable) a los patrones de síntesis netamente "reparativo" ó "replicativo".

En estudios realizados con ejes embrionarios de maiz, Zarafn Herzberg y cols. encontraron que ejes embrionarios γ -irradiados, imbibidos por tres horas, mostraban un patrón de síntesis de DNA de tipo "reparativo" (después de realizar el análisis del DNA marcado isotópicamente por cromatografía en BND-celulosa); el patrón de síntesis presentado por ejes embrionarios de semillas de alta viabilidad (control), durante las primeras horas de la germinación (0-6 h) mostró patrones de síntesis que no pudieron clasificarse como de tipo "tipo reparativo" ó de "tipo replicativo". Asimismo, los patrones de síntesis de DNA presentados por ejes embrionarios de semillas de alta viabilidad (control) imbibidos durante 9-15 horas, correspondieron a aquéllos de tipo "replicativo".

Los ejes embrionarios de maiz γ -irradiados imbibidos por 15 h, muestran una caída dramática en la incorporación de desoxiadenosina tritiada (lo cual indica que el daño ocasionado es irreversible).

Un dato sorprendente, es que la adición de citocininas al medio de imbibición de ejes irradiados y no irradiados (control) estimula notablemente la síntesis de tipo "reparativo"; de hecho, en ejes embrionarios control la citocinina define totalmente el tipo de síntesis que se está llevando a cabo en el período temprano (0-6 h), como una síntesis de

tipo "reparativo".

En base a los antecedentes descritos y, pensando que la reparación del DNA, debe ser un proceso fisiológico que se presenta en forma habitual durante las etapas tempranas de la germinación de semillas de alta viabilidad y de aquellas semillas de baja viabilidad o deterioradas; nos abocamos a intentar detectar este proceso en núcleos de ejes embrionarios de semillas de maíz deterioradas artificialmente mediante trataminetos de calor y/o humedad, en los cuales sabemos que el DNA se encuentra dañado.

1.9.- HIPOTESIS DE TRABAJO.-

"Conforme a la evidencia presentada anteriormente, --- que indica la presencia de un DNA de bajo peso molecular en semillas deterioradas, postulamos: que será posible detectar procesos de reparación de la molécula de DNA en ejes -- embrionarios de semillas deterioradas con calor y/o humedad sometidos a imbibición durante períodos cortos (0-15 h). Es tos procesos de reparación serán detectados como un incremento en el peso molecular del DNA procedente de las semillas, según avanza el tiempo de incubación."

1.10.- OBJETIVOS.-

1.).- Determinar qué sucede con el peso molecular del DNA de ejes embrionarios de maíz (de semillas deterioradas -- mediante calor y/o humedad), después de ser sometidos a diferentes períodos de imbibición (0h, 3h, 6h, y 15h), anali-

zando éste mediante las técnicas de : gradiente alcalino - de sacarosa y la electroforesis en gel de agarosa.

2).- Correlacionar los resultados obtenidos con un posible proceso de reparación del DNA que se lleva a efecto, - como lo sugieren otros resultados experimentales.

II

MATERIALES Y METODOS

A) Material biológico.

Se utilizaron las semillas de maíz variedad "Chalqueño", las cuales fueron proporcionadas por "PRONASE" (Productora Nacional de Semillas de la SARH), el lote empleado poseía una viabilidad de aproximadamente 95%.

B) Soluciones y sustancias empleadas.

1.- Solución Amortiguadora para la homogenización de los ejes embrionarios de maíz (Buffer "C", según Osborne y cols).

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

2.- Solución Amortiguadora alcalina para gradiente de DNA.

NaOH	0.3 M
NaCl	0.7 M
EDTA	10.0 mM
pH =	13 ó superior.

3.- Solución amortiguadora neutra para gradiente de --

RNA.

NaCl	0.1 M
Tris pH= 7.5	10.0 mM
EDTA	10.0 mM

4.- Solución amortiguadora para lisar los núcleos.

NaCl	0.4 M
EDTA	10.0 mM
NaOH	0.15 M
Sarkosyl	1%
pH =	13 ó superior.

5.- Solución amortiguadora para la imbibición de los e
jes embrionarios.

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

(Esta solución debe ser estéril).

6.- Soluciones de sacarosa.

Para DNA:

6.1.- Sacarosa al 80% disuelta en solución amortiguado
ra para gradiente(2) ó en agua desionizada.

6.2.- Sacarosa al 20% disuelta en solución amortiguado
ra para gradiente (2), más Sarkosyl al 0.1%.

6.3.- Sacarosa al 5% disuelta en solución amortiguado-
ra alcalina para gradiente (2), más Sarkosyl al 0.1%.

6.4.- Sacarosa al 1% disuelta en solución amortiguadora neutra para gradiente (pH= 7.5), más Sarkosyl al 0.1%.

Para RNA:

6.5.- Sacarosa al 20% en solución amortiguadora neutra para gradiente: pH= 7.5, más Sarkosyl al 0.1%.

6.6.- Sacarosa al 5% disuelta en solución amortiguadora neutra para gradiente, pH= 7.5, más Sarkosyl al 0.1%.

7.- Acido tricloroacético al 15% (TCA 15%).

8.- Albúmina sérica bovina (BSA), 0.1 mg/ml.

9.- Acido perclórico al 15% (PCA al 15%).

C) Métodos.-

1.- Tratamientos con calor y humedad.

50 a 60 semillas de maíz se colocaron en cajas Petri - de tamaño estándar, y se sometieron a los siguientes tratamientos:

a) Dos días a 60°C (calor seco) en una estufa con temperatura regulada.

b) Seis días a 40°C en una atmósfera saturada de humedad(100% de humedad relativa), igualmente en una estufa de temperatura regulada. La atmósfera saturante se logró en una charola de plástico herméticamente cerrada con una pequeña cantidad de agua adicionada de azida de Sodio que es un inhibidor del crecimiento de hongos.

2.- Obtención de los ejes embrionarios.

Los ejes embrionarios fueron extraídos manualmente. Sólo se utilizaron ejes íntegros en aquellos experimentos que requirieron de imbibición; para experimentos de 0 horas de imbibición (ejes no imbibidos) se utilizaron ejes íntegros y ejes rotos.

Se utilizaron 45 ejes embrionarios en promedio para cada gradiente y extracción de DNA para electroforesis.

La extracción de los ejes embrionarios, se realizó habitualmente un día antes o el mismo día del experimento; - los ejes embrionarios extraídos con mayor antelación se mantuvieron en un desecador a 4°C.

3.- Técnica de imbibición de ejes embrionarios.

45 ejes embrionarios íntegros (de cada uno de los tratamientos mencionados en 1) se colocaron entre dos discos - de papel filtro Whatman (#1 ó #2) dentro de un vial de vidrio con tapón de rosca; los ejes deben quedar perfectamente inmovilizados entre ambos discos de papel por lo que con unas pinzas se presiona suavemente el círculo superior de - papel filtro contra los ejes embrionarios; a continuación - se añadieron 400 µl de solución amortiguadora para imbibición (B. # 5), a ejes que se incubaron 3 horas y 600 µl a ejes cuyo tiempo de imbibición fue de 6 horas. La incubación se llevó a efecto en un baño maría con temperatura regulada a 26-27°C (en oscuridad). No fueron necesarias condiciones estrictas de esterilidad, sólo la solución amortiguadora de imbibición, los viales y los filtros debieron permanecer estériles.

Al finalizar el tiempo de incubación, los ejes embrionarios se procesaron de inmediato en todos los experimentos de gradiente alcalino de sacarosa y aquéllos usados para el análisis por electroforesis, fueron congelados a -70°C , hasta su uso.

Los tiempos de incubación para todos los experimentos fueron: 0, 3 y 6 horas. Se efectuó un experimento de 15 horas de incubación, pero fué para hacer un análisis de DNA por electroforesis en gel de agarosa.

4.- Técnica de homogenización de ejes embrionarios para la obtención de núcleos.

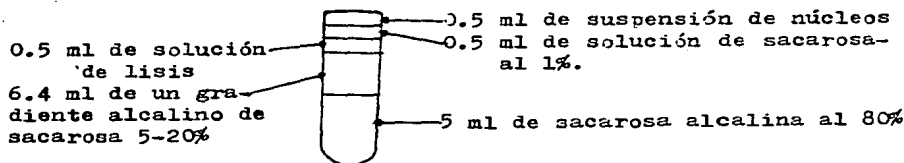
Los ejes embrionarios incubados y no incubados (de cada uno de los tratamientos de calor y/o humedad), se sometieron al siguiente proceso de homogenización (Técnica de Cheah y Osborne, 1978).

En un mortero preenfriado a 2°C , y con ayuda de un mango (también preenfriado) se maceró suavemente la totalidad de ejes embrionarios con 2 ml de solución amortiguadora de homogenización (Buffer "C"= sección B #1), el homogenizado se filtró a través de 3 capas de papel miracloth (con ayuda de vacío y a 4°C), los residuos del mortero se lavaron tres veces con 2 ml de solución amortiguadora de homogenización (sección B # 1), filtrándose cada lavado y finalmente, sobre el papel miracloth se lavó el residuo con otros 2 ml de la misma solución (sección B # 1); al filtrado se le añadió Tritón X-100 hasta una concentración final de 0.05% (a partir de un stock al 10%). Se sedimentaron los núcleos a $625 \times g$ por 6 minutos (2000 rpm en una centrifuga refrigera-

da MSE). El sedimento (que contiene los núcleos) se resuspendió en 0.2 ml de solución amortiguadora para homogenización (sección B, #1) para la extracción y análisis del DNA por electroforesis en geles de agarosa, y en 0.5 ml de la misma solución cuando fue empleada para gradiente alcalino de sacarosa.

5.- Técnica del gradiente alcalino de sacarosa.

Después de modificar varias ocasiones la técnica del gradiente alcalino de sacarosa, para adecuarlo a los propósitos de este proyecto, se llegó a establecer el gradiente que se describe a continuación:



Este tipo de gradiente presentó varias ventajas; los núcleos se lisaron "in situ" (modificación reportada por Yamada y cols, 1985), lo cual elimina las manipulaciones que conlleva efectuar la lisis de éstos en un tubo de ensayo y la transferencia del DNA liberado sobre el tope del gradiente (se pueden producir rupturas o cortes en el DNA al azar, variando así su EM). Otra ventaja consistió en que nos permitió obtener un número reducido de fracciones, lo cual, hizo menos tardada la determinación colorimétrica --

del DNA. Por último, la reducción que se efectuó del volumen del gradiente permitió, que de acuerdo a las condiciones preestablecidas de centrifugación, los picos de mayor absorción a 595 nm y 700 nm, no quedaran localizados en fracciones muy cercanas al tope del gradiente.

Para hacer cada gradiente, en un tubo de polialómero de 13 ml de capacidad, se agregaron en estricto orden y con sumo cuidado las siguientes soluciones:

- a) 5 ml de una solución alcalina de sacarosa al 80% (que sirve de colchón) (sección B, # 6.1)
- b) Sobre este colchón se hace un gradiente alcalino de sacarosa 5-20% de 6.4 ml de volumen. (sección B, # 6.2 y 6.3).
- c) Sobre el gradiente se estratifica 0.5 ml de solución de lisis (sección B, # 4).
- d) Sobre la solución anterior se estratifican 0.5 ml de solución de sacarosa neutra al 1%. (Sección B, # 6.4).
- e) Sobre esta solución se estratifican 0.5 ml de la suspensión de núcleos (resuspendidos en B, # 1).

En cada sesión de experimentos se realizaron 4 gradientes; uno para núcleos de ejes embrionarios de semillas control y otros dos para aquéllos (núcleos) provenientes de semillas tratadas con calor seco (2 días a 60°C) y con calor húmedo (6 días a 40°C, 100% de humedad relativa), el cuarto gradiente, fue un gradiente neutro de sacarosa para analizar RNA ribosomal total de Tripanosoma cruzi, este gradiente fue nuestro control de centrifugación. Durante la elaboración del presente gradiente se hicieron las siguientes modificaciones:

La sacarosa al 80% estaba disuelta en agua desionizada.

El volumen de muestra empleado fue mucho más pequeño (60 μ l) por ello se utilizó un volumen mayor de sacarosa al 1%, para igualar los volúmenes totales con los otros gradientes.

La centrifugación de los gradientes se realizó en una centrifugadora digital IEC empleando el rotor 628 de columna, durante 12.5 horas, a 10,000 rpm (17,000 X g) y 10°C. Inmediatamente después de finalizada la centrifugación los gradientes se fraccionaron, desde el fondo, con ayuda de una bomba peristáltica (Marca Buchler), a una velocidad de 5 l/2; el gradiente pasó por la celda de un espectrofotómetro de U.V. (Uvicord II, IKB instruments), cuyo detector estaba conectado a un graficador; este instrumento estaba dotado además, con un filtro de 260 nm (máximo de absorción en ácidos nucleicos); la lectura obtenida mediante el graficador proporcionaba un perfil de absorción del gradiente que sirvió para corroborar algunos datos posteriormente. En el caso del gradiente de RNA, la gráfica obtenida mostraba claramente los "picos" de las diferentes especies de RNA ribosomal presentes en la muestra, trabajo adicional sobre la gráfica nos permitió obtener el número de las fracciones en que se localizó cada pico de cada especie de RNA. Si se trabajaba correctamente, los picos obtenidos eran completamente reproducibles de experimento a experimento, por ello, este gradiente sirvió como control de centrifugación.

Se colectaron manualmente 15 fracciones de 30 gotas cada una (\pm 0.5 ml), separando los primeros 5 ml en una probeta graduada, los cuales correspondían al colchón de sacarosa al 80%.

En cada fracción se llevó a efecto la determinación de DNA por el método de Giles y Myers (1965) el cual se detalla a continuación:

- Preenfriar los tubos en hielo.
- Añadir a cada fracción 50 μ l de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración de 0.1 mg/ml.
- Añadir a cada fracción 1 ml de TCA al 15%, agitar cada tubo con un agitador mecánico y dejar que continúe la precipitación en frío durante 15 minutos más.
- Centrifugar cada a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga MSE refrigerada.
- Decantar el sobrenadante.
- Secar los tubos durante 15 minutos.
- Añadir a cada tubo 1 ml de TCA al 15%, agitar para reprecipitar cada fracción; agitar cada tubo con un agitador mecánico. Dejar enfriar durante 15 minutos.
- Centrifugar, otra vez, a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga MSE.
- Decantar el sobrenadante.
- Secar los tubos 20 minutos en una estufa a 60°C.
- A cada uno de los tubos; ya secos, y a temperatura ambiente, añadir 1 ml de PCA (ácido perclórico) al 15%, agitar, tapar y calentar durante 30 minutos en un baño María a \pm 80°C.
- Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
- Agregar a cada tubo 1 ml de difenilamina al 4% disuelta en ácido acético glacial; agitar mecánicamente hasta homogenización.
- Agregar a cada tubo 50 μ l de acetaldehído a una con-

centración de 1.6 mg/ml (en agua desionizada).

- Incubar los tubos toda la noche, (bien tapados) a 30°C en un baño María.

- Leer cada tubo contra un blanco de reactivos (HClO₄, difenilamina en ácido acético y acetaldehído, manipulado de igual forma que los problemas) a 595 nm y a 700 nm; calcular la diferencia de absorción entre ambas longitudes de onda respectivamente y graficar dicha diferencia contra el número de fracción.

6.- Extracción del DNA.

De acuerdo a lo mencionado en el punto C, #3, a los núcleos resuspendidos (de cada uno de los tratamientos) en -- 0.2 ml de solución amortiguadora de homogenización, se les añadió 0.8 ml de solución amortiguadora para lisis, se agitó suavemente, y se colocó el tubo en la obscuridad durante 1-2 horas, al final de dicho tiempo, se le añadió 5.0 ml de solución amortiguadora de citratos (pH= 7.6, sección B, #13), y se desproteinizó la muestra una vez con una mezcla de --- cloroformo-alcohol isoamílico(24:1 v/v). Las proteínas quedan en la fase orgánica, por lo que la fase acuosa se separó y se le añadió 50 µl de proteinasa K (1 mg/ml) incubando se durante 1.5 a 2 horas a 40°C.

Finalmente se dializó la muestra contra un litro de solución de diálisis(sección B, #13), pH= 7.6, durante toda la noche a 4°C.

7.- Electroforesis del DNA en geles de agarosa.-

Se prepararon geles de agarosa al 1% disolviendo ésta en solución amortiguadora de electroforesis, (sección B, #12), pH= 7.8, ya disuelta y a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ se vertió en la cámara adecuada para ello, una vez solidificado el gel se procedió a cargar cada pocito con 30 μl de cada una de las muestras de DNA (de los diferentes tiempos de incubación y tratamientos; siempre se hizo un gel por cada tiempo de incubación con los diferentes tratamientos); ya colocadas las muestras se procedió a cubrir y a sumergir el gel en solución amortiguadora para electroforesis.

Se corrió la electroforesis aplicando un amperaje constante de 60 mA durante 7 horas (condiciones estandarizadas).

Al finalizar el tiempo de corrida se sacó el gel de la cámara y se tiñó en una cámara para tinción, con una solución diluida de bromuro de etidio (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15-20 minutos, al finalizar este tiempo, se observaron las bandas de DNA con ayuda de un transiluminador de luz U.V. Se procedió después a eliminar el exceso de bromuro de etidio del gel con abundante agua desionizada para lograr el tono de tinción más adecuado. Finalmente se fotografió el gel con película blanco y negro, auxiliándose con un filtro rojo para lograr un mayor contraste y resolución en las fotografías.

RESULTADOS

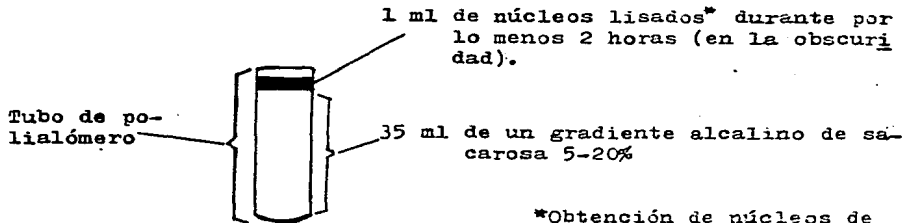
En el presente estudio se sometió a semillas de maíz (variedad Chalqueño) a tratamientos deteriorantes de calor y/o humedad (60°C 2 días: calor seco; 40°C 6 días, 100% de humedad: calor húmedo; (y semillas no tratadas: semillas con trol).

Los ejes embrionarios de estas semillas fueron sometidos a un procedimiento de homogenización para separar los núcleos y a continuación, se extrajo de éstos el DNA (por 2 métodos diferentes) y por medio de dos metodologías se analizaron en forma cualitativa las variaciones en su peso molecular.

Los métodos empleados para analizar el peso molecular del DNA fueron: los gradientes alcalinos de sacarosa y la lectroforesis en geles de agarosa.

1).- Montaje de la técnica del gradiente alcalino de sacarosa.

Se inició la experimentación realizando la siguiente técnica del gradiente alcalino de sacarosa:



*Obtención de núcleos de acuerdo a materiales y métodos.

Condiciones de centrifugación:

En un rotor Beckman SW 27, a 11,000 rpm durante 14.5 h a 10°C en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-75.

Este procedimiento presentó las siguientes desventajas:

1).- Se necesitaban alrededor de 150 ejes embrionarios por cada gradiente, cantidad muy grande si se toma en consideración que el tiempo necesario para extraer cada eje embrionario es de varios minutos, y además los ejes embrionarios de semillas tratadas por 2 días a 60°C eran muy frágiles y se rompían con frecuencia. Esto no permitía avanzar con rapidez, ya que, en cada sesión de experimentación se debía llevar a cabo la centrifugación de tres gradientes (lo cual da un total de 450 ejes embrionarios).

2).- De cada gradiente resulta una cantidad considerable de fracciones, en cada una de las cuales debe llevarse a efecto la determinación colorimétrica del DNA.

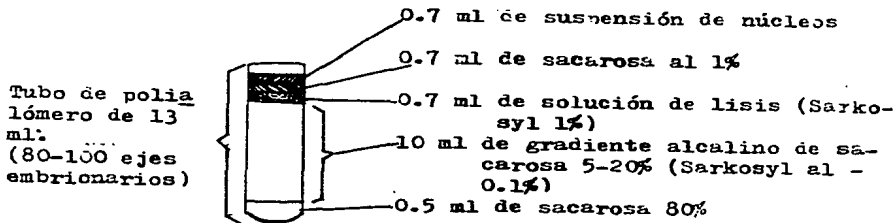
3).- La lisis externa de los núcleos, sometía al DNA extraído a manipulaciones mecánicas que podrían variar sensiblemente su peso molecular.

Para tratar de superar estas desventajas, realizamos las siguientes modificaciones a la técnica del gradiente al calino de sacarosa:

- Reducción del gradiente de 35 a 10 ml.
- Lisis de los núcleos dentro del Gradiente.
- Variación de las condiciones de centrifugación.

(Se redujo asimismo el número de ejes embrionarios requeridos para cada gradiente).

El gradiente resultante fue el siguiente:



Condiciones: 11,000 rpm, 12.5 horas y 10°C, en un rotor SW 40 de Beckman.

La lisis de los núcleos en el gradiente fue la respuesta a los problemas de manipulación que plantaba lisarlos -- fuera de éste, ya que la integridad de la molécula de DNA -- podría ser modificada sin control y, sería difícil tener la certeza de la representatividad ó validez de los resultados obtenidos (Yamada y cols, 1985).

El número de ejes embrionarios requeridos, hacía todavía muy tardado el desarrollo de los experimentos, por lo -- que se procedió a disminuir el volumen del gradiente de --- 10 ml a 6.4 ml (el número de ejes embrionarios requeridos -- para cada gradiente, disminuyó a 40-50), usando el mismo ti -- po de tubos (de polialúmina) el volumen fue sustituido por -- un colchón de sacarosa alcalina al 80%.

El diseño final del gradiente, el cual fue empleado -- para obtener todos los resultados que se describen en este -- trabajo, se presenta en el apartado correspondiente en "ma-

teriales y métodos".

Perforar el tubo en el fondo para fraccionar los grano no resultó viable, por lo que se optó por colectarlos con la ayuda de una bomba peristáltica. El procedimiento se detalla en "materiales y métodos".

2).- Afinación de la técnica de difenilamina.

La sacarosa remanente en cada tubo después de la precipitación con TCA 15% se caramelizaba al someter las fracciones a la hidrólisis con PCA al 15%. Este fenómeno producía un color amarillo-café que interfería en forma total con la lectura adecuada y confiable a 595 nm. Por tal motivo el procedimiento fue modificado como se muestra en "materiales y métodos".

3).- Montaje de la técnica de electroforesis en geles de agarosa(para analizar DNA de maíz).

Como se trataba de analizar DNA, se pretendió inicialmente realizar la electroforesis en condiciones alcalinas - (pH= 13). Dichas condiciones desnaturalizan totalmente la molécula de DNA y estandarizan su movilidad electroforética, lo cual permite resolver bien las bandas de DNA en los geles, ya que las principales rupturas que sufre éste "in vivo" se producen en cadena sencilla. (Molecular Cloning, --- Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Se extrajo el DNA en forma gruesa, macerando 10 ejes embrionarios de semillas tratadas en diferentes condiciones de calor y/o humedad (2 días a 60°C; 6 días a 40°C, 100% de

humedad relativa) y semillas control (imbibidas por diferentes tiempos: 0 h, 3 h y 6 h) con 1.2 ml de solución de homogenización (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 M y SDS al 0.5%, a 4°C); a continuación la suspensión se incubó por lo menos 2 horas con proteinasa K (50 µl de concentración 1 mg/ml), al finalizar el tiempo de incubación los restos de membranas se sedimentaron en una microcentrifuga (10,000 rpm, 3 min); volúmenes del sobrenadante (20 µl) se mezclaron con 10 µl de solución de carga (NaOH 50 mM, EDTA 1 mM, Ficoll: tipo -- 400 al 2.5%, Azul de Bromofenol al 0.025%).

Los geles se prepararon con agarosa en concentración del 1%, disolviéndose ésta, para evitar su hidrólisis, en una solución neutra: NaCl 50 mM, EDTA 1 mM.

La solución amortiguadora de electroforesis (NaOH 30mM, EDTA 30 mM), debe cubrir perfectamente el gel (técnica de geles sumergidos), a continuación se colocaron las muestras en los carriles correspondientes y se corrió el gel a 30 -- volts (Voltaje constante), durante 3 horas.

Se presentaron dos problemas:

.- La solución y el gel presentaban una elevada resistencia al paso de la corriente, lo cual disparaba el amperaje suministrado por la fuente de poder, se producía calentamiento y finalmente la deformación del gel. (Aunque se contaba con un sistema de enfriamiento).

.- Debido a que los voltajes aplicados no eran muy --- grandes, el DNA no corrió lo suficiente (no se adentró casi en el gel), para darnos una idea de su integridad en cada muestra.

Para atacar el problema, se decidió bajar el voltaje -

(para no disparar el amperaje) primero, y después, correr los geles a amperaje constante (50 mA), además se duplicó el tiempo de corrida. Se logró que las moléculas de DNA se adentraran un poco más en el gel, pero la deformación del mismo siguió presentándose frecuentemente. Considerando que estas condiciones alcalinas seguirían afectando nuestro trabajo, decidimos cambiar todas las soluciones por otras con pH menos alcalino; como las siguientes:

--. Solución de electroforesis (Buffer TBE) : EDTA 1 mM, Tris 20 mM, ajustar el pH con ácido bórico hasta 8.5.

--. Solución de disolución de agarosa; EDTA 1 mM, Tris 20 mM, ajustar el pH hasta 7.5 con ácido bórico.

--. Solución amortiguadora de llenado: Tris 10 mM, NaCl 15 mM, azul de bromofenol 0.025%, Ficoll (tipo 400) al 2.5%, pH= 7.5.

Estas soluciones modificaron ligeramente las condiciones de corrida, se pudo aumentar el voltaje hasta 25 volts (8-9 mA), y el gel sufrió deformaciones esporádicamente. Por otro lado, en esta ocasión se incluyó un tratamiento previo con RNasa durante la extracción del DNA; al realizar esto el DNA se observó muy degradado, impidiendo que se pudieran apreciar diferencias entre los DNAs extraídos de ejes embrionarios imbibidos por diferentes tiempos.

Es muy probable que el tratamiento con RNasa y posteriormente con proteinasa K no fué efectivo para eliminar completamente la actividad de nucleasas, por lo que el DNA sufrió una digestión parcial por estas enzimas, ello explica el barrido observado en los geles. Esta situación impidió obtener resultados objetivos y concluyentes. Para solu

cionar este problema se decidió extraer el DNA y desproteí-
nizarlo de inmediato, químicamente primero y después median-
te digestión enzimática con proteinasa K, asimismo se deci-
dió cambiar de amortiguador y trabajar a un pH cercano al -
neutro; estas condiciones modificaron en forma radical los_
resultados, eliminándose por completo la deformación del --
gel; estos procedimientos se describen con detalle en mate-
riales y métodos.

4.- Patrones de peso molecular del DNA obtenidos ne--- dante gradientes alcalinos de sacarosa.

En la figura # 1 podemos observar el patrón obtenido -
al analizar por gradiente alcalino de sacarosa el DNA de e-
jes embrionarios no imbibidos (0 h de imbibición) de semi-
llas sometidas previamente a tratamientos de calor y/o hume-
dad(y su control).

Puede observarse que el pico de máxima absorción para_
DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C (calor seco) se en-
cuentra en la fracción # 13, muy cercano al tope del gra---
diente, lo cual indica que dicho DNA presenta una aprecia--
ble cantidad de cortes, y es superior a la que presentan
el DNA de semillas control(pico de máxima absorción en la -
fracción # 12) y el de semillas tratadas 6 días a 40°C(pico
de máxima absorción en la fracción # 10); aquí al parecer -
se presenta una incoherencia, ya que el DNA control presen-
ta una mayor cantidad de cortes que el DNA de semillas tra-
tadas 6 días a 40°C; estos resultados se discutirán poste-
riormente cuando se muestren los resultados de los geles.

Cabe mencionar, qué todos los resultados aquí presen--

tados son representativos de tres experimentos.

En la figura # 2 podemos observar el patrón obtenido al analizar por gradiente alcalino de sacarosa el DNA de ejes embrionarios imbibidos durante 3 horas a 27°C de semillas sometidas previamente a tratamientos de calor y/o humedad (2 días a 60°C, 6 días a 40°C y su respectivo control).-- Puede observarse que los picos de máxima absorción se han desplazado hacia la izquierda, en la gráfica, lo cual indica que se han empezado a sellar los cortes en el DNA, los cuales se presentaban en mayor cantidad en el DNA de semillas no imbibidas. Estos hechos podrían indicar que ha habido un aumento en el peso molecular del DNA de ejes embrionarios imbibidos durante 3 horas, de tal forma que el pico de máxima absorción para el DNA control está en la fracción # 10, para el DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C, el pico se extiende de la fracción # 9 a la # 12 ó sea, aparece antes que aquél presentado por el DNA de ejes embrionarios no imbibidos (y tratados 2 días a 60°C). El pico de máxima absorción para el DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C:100% de H.R. se presenta en la fracción # 9 una menos que en la gráfica de la figura # 1 (correspondiente a DNA de ejes embrionarios no imbibidos y tratados de la misma forma).

En la figura # 3 podemos observar el patrón obtenido al analizar por gradiente alcalino de sacarosa el DNA de ejes embrionarios de semillas imbibidas durante 6 h a 27°C, sometidas previamente a tratamientos de calor y/o humedad (2 d 60°C, 6 d 40°C 100% de H.R.), y su respectivo control. De nuevo los picos de máxima absorción se han desplazado hacia la izquierda de la gráfica lo cual sugiere que existe -

un mecanismo activo en el sistema, que permite que los cortes en el DNA sean sellados, lo cual se manifiesta finalmente con un aumento en el peso molecular de esta macromolécula, conforme transcurre el tiempo de imbibición.

El pico de máxima absorción del DNA control (6 h de imbibición) y el DNA de semillas tratadas por 2 días a 60°C se encontró en la misma fracción (fracción # 9); el máximo de absorción del DNA de semillas tratadas por 6 días a 40°C se encontró en la fracción # 8, más hacia el centro del gradiente (respecto a los anteriores), este resultado es congruente con aquellos obtenidos en los dos tiempos de imbibición anteriores con semillas sometidas al mismo tratamiento.

El RNA total de Tripanosoma cruzi, analizado por gradiente neutro de sacarosa, banded repetitiva y sistemáticamente en las fracciones 14(5S) y en la 10(25S). Se indica su localización en las gráficas de los gradientes, con una flecha en la fracción correspondiente.

La figura # 4 muestra el desplazamiento gradual que sufre el pico de máxima absorción conforme aumenta el tiempo de imbibición de las semillas sometidas al mismo tratamiento. El desplazamiento se produce en el sentido de derecha a izquierda de la gráfica. Se trata en este caso de DNA de semillas control. Dicho desplazamiento sugiere que el DNA está aumentando de peso molecular.

En la figura # 5, volvemos a observar el desplazamiento gradual que sufre el pico de máxima absorción hacia la izquierda de la gráfica, esto demuestra que probablemente un proceso activo de reparación del DNA en semillas trata--

das 6 días a 40°C: 100% de H.R. ha propiciado el aumento en el peso molecular de la macromolécula (inicialmente dañada), conforme avanza el proceso de germinación.

En la figura # 6 se muestra el desplazamiento que sufren los patrones de peso molecular del DNA, de semillas -- por 2 días a 60°C, conforme transcurre el tiempo de imbibición. El pico de máxima absorción, que para DNA de ejes embrionarios no imbibidos (0 h de imbibición) se presenta en la fracción # 13, a las 6 horas de imbibición dicho pico dicho pico se ha desplazado hasta la fracción # 9 lo cual implica un aumento considerable del peso molecular; es muy probable que un proceso de reparación de esta macromolécula se ha desencadenado con la imbibición de los ejes embrionarios.

Patrones de Peso Molecular
de DNA de Ejes embrionarios
no imbibidos (0 h)

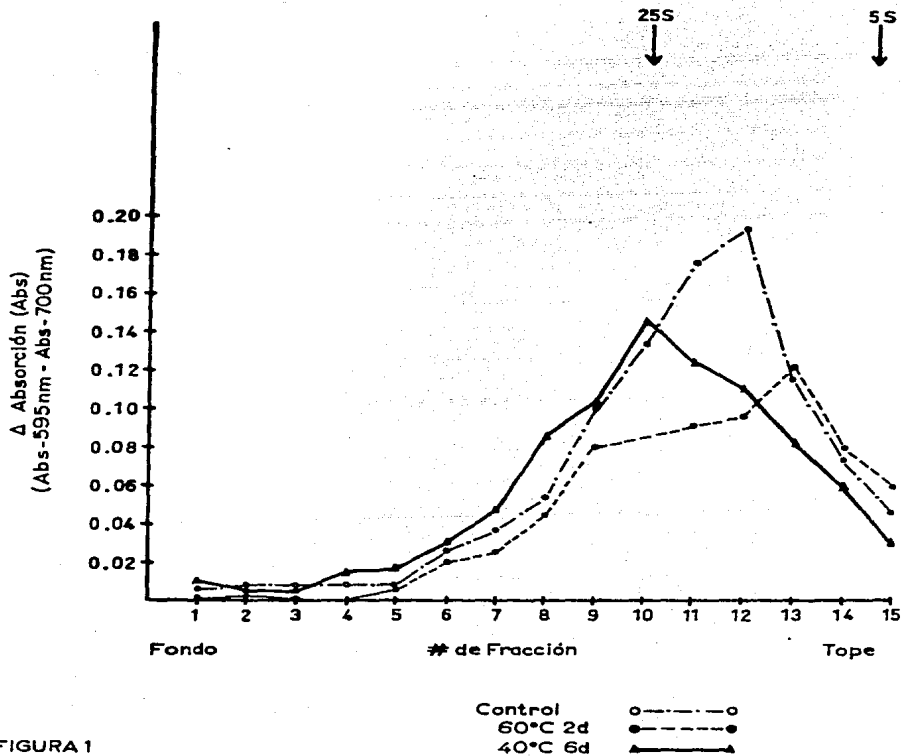


FIGURA 1

Patrones de Peso molecular
del DNA de Ejes embrionarios de maíz
imbibidos por 3 h a 27° C

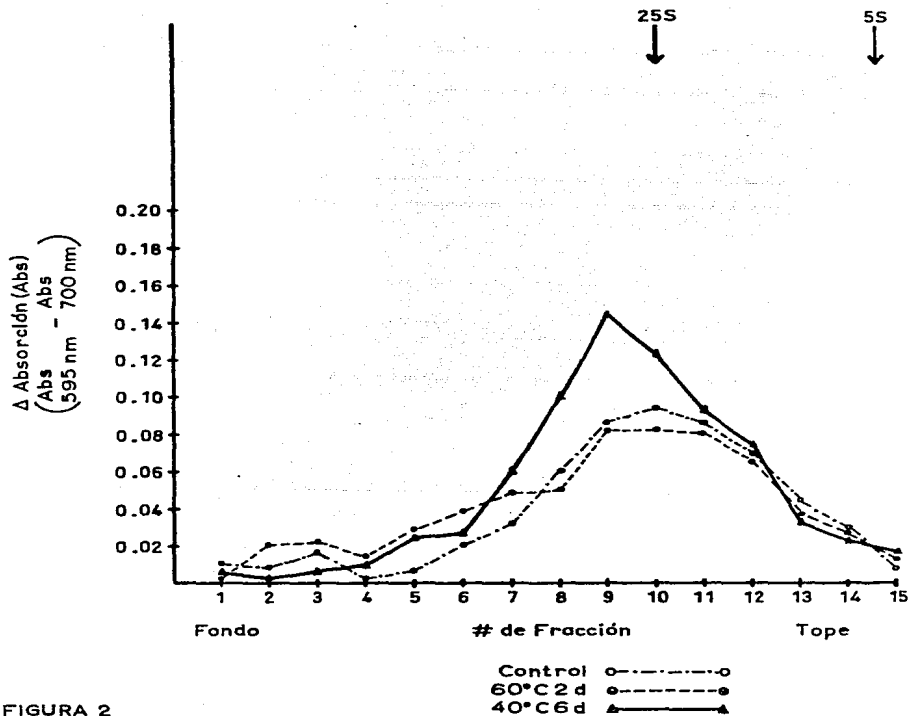


FIGURA 2

Patrones de Peso molecular
de DNA de Ejes embrionarios de maíz
imbibidos por 6 h a 27° C

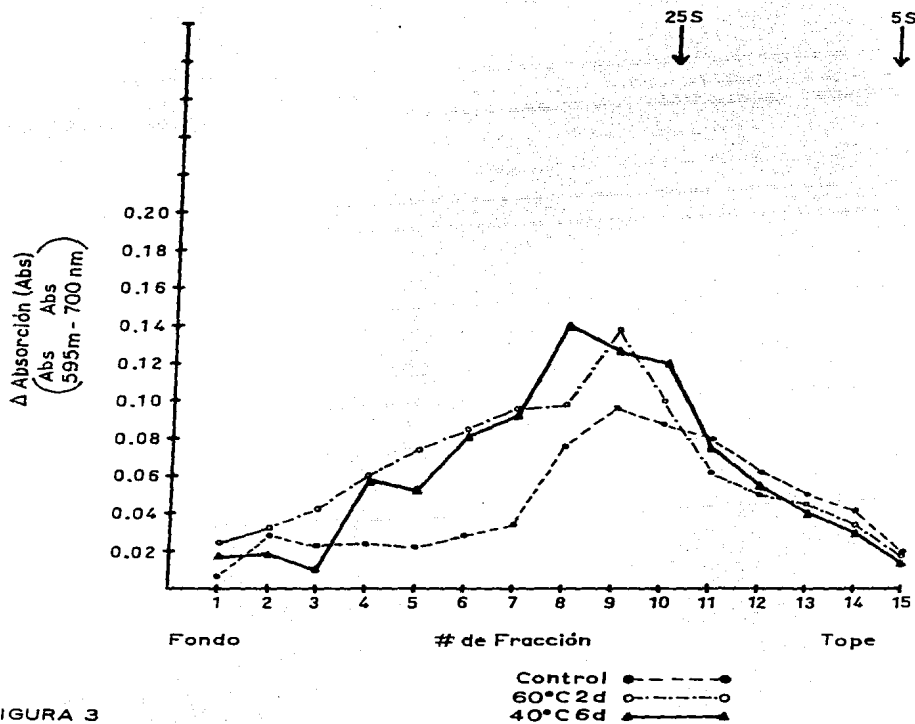


FIGURA 3

Patrones de Peso molecular
de DNA de Ejes embrionarios de maíz extraídos
de semillas control (0 h, 3 h y 6 h de imbibición)

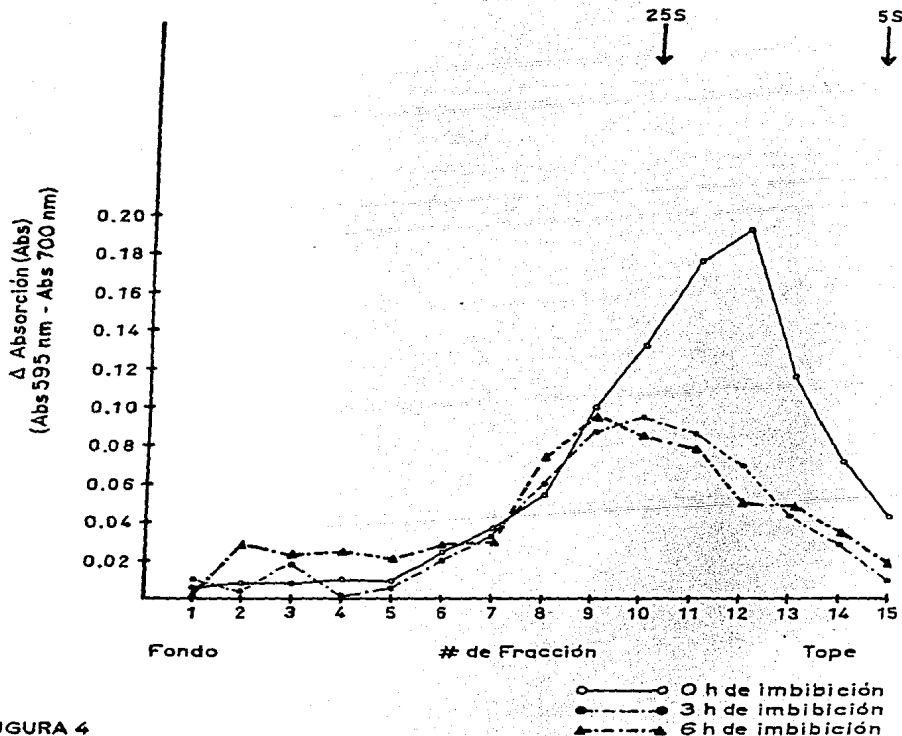


FIGURA 4

Patrones de Peso molecular
de DNA de Ejes embrionarios de maíz
tratados 6 d a 40°C (0 h, 3 h y 6 h de Imbibición)

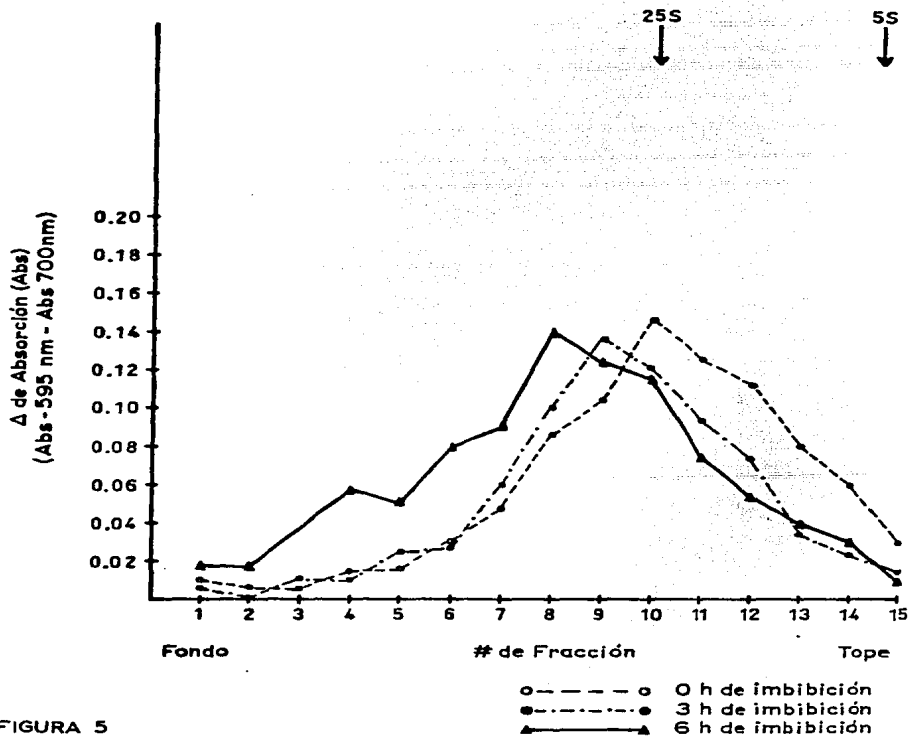


FIGURA 5

Patrones de Peso molecular
de DNA de Ejes embrionarios de maíz
tratados 2 d a 60°C (0 h, 3 h y 6 h de imbibición)

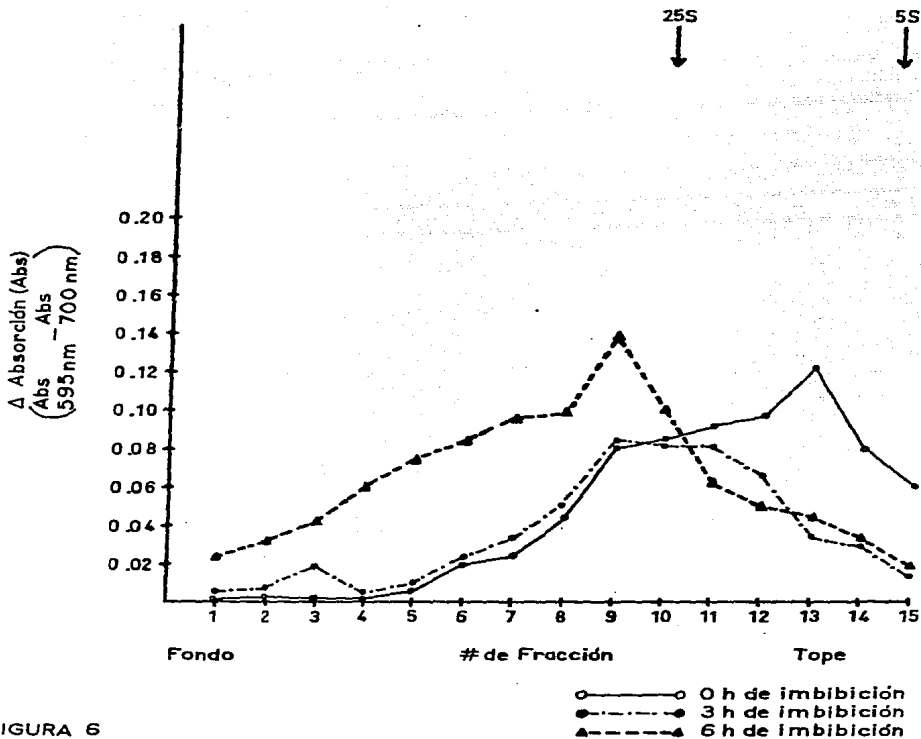


FIGURA 6

Geles de Agarosa.-

La figura # 7 corresponde a una fotografía de un gel de agarosa en el cual se analizó el DNA extraído de ejes embrionarios no imbibidos correspondientes a los tres tratamientos : carriles 1 y 2: DNA extraído de semillas control; carriles 4 y 5: DNA extraído de semillas tratadas 2 días a 60°C; carriles 7 y 8: DNA extraído de semillas tratadas 6 a 40°C (100% H.R.).

Se puede observar claramente que el DNA de semillas control presenta una banda de alto peso molecular que apenas entró al gel y otra banda de alto peso molecular ya un poco más adentrada en el gel, proseguida por un barrido que corresponde a DNA de menor peso molecular, producto de las rupturas que ha sufrido éste.

El DNA correspondiente a semillas tratadas 2 días a 60°C, se observa como un barrido difuso, producto de las innumerables rupturas que debe tener el DNA original(no es observable alguna banda definida). Por tanto, en este caso predomina el DNA de bajo peso molecular. Se verá posteriormente que estos resultados concuerdan con aquéllos obtenidos mediante el gradiente alcalino de sacarosa.

El DNA correspondiente a semillas tratadas 6 días a 40°C(100% H.R.), se observa como una banda de alto peso molecular(muy similar a la obtenida con semillas control), la cual va seguida por un barrido correspondiente a DNA de bajo P.M., producto de la degradación de DNA de más alto peso molecular; este barrido es ligeramente más difuso que aquel presentado por el DNA de semillas control, pero mucho menos que aquel presentado por el DNA de semillas tratadas 2 días

a 60°C. Los resultados obtenidos para el DNA control y el DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C, no concuerdan con los resultados obtenidos mediante gradientes alcalinos de sacarosa; estas discrepancias serán discutidas posteriormente para todos los tiempos de incubación (imbibición).

En la figura # 8 se muestra una fotografía de un gel de agarosa donde se analizó el DNA extraído de semillas control (carriles 1 y 2), de semillas tratadas 2 días a 60°C (carriles 4 y 5) y de semillas tratadas 6 días a 40°C (100 de H.R.) (carriles 7 y 8), cuyos ejes embrionarios fueron imbibidos durante 3 horas.

El DNA control muestra ahora un barrido ligeramente -- menos difuso y una banda de alto peso molecular más nítida que aquellas que se observan en la figura # 7.

El DNA correspondiente a semillas tratadas 2 días a -- 60°C muestra ahora una banda nítida y definida de alto peso molecular (que no apareció en el DNA de cero horas de imbibición), acompañada de un barrido mucho menos difuso que el observado en la figura # 7 (para el DNA correspondiente). -- Al parecer, se ha presentado, un proceso que ha permitido -- la reparación del DNA (el aumento de su peso molecular), como consecuencia de los procesos bioquímicos que desencadena la imbibición.

El DNA de semillas tratadas durante 6 días a 40°C (100% de H.R.) muestra ahora dos bandas de alto peso molecular; -- una, que empieza adentrarse en el gel y otra dentro del -- gel, sigue a estas bandas un barrido (DNA de bajo peso molecular), que en este caso se observa más difuso con respecto al DNA de semillas control y al DNA de semillas tratadas 2_

días a 60°C (de ejes embrionarios imbibidos por 3 horas), - pero dicho barrido es ya menos difuso con respecto al observado en el DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C de -- 0 h de imbibición (figura # 7).

En la figura # 9 se muestra la fotografía de un gel - de agarosa donde se analizó DNA de semillas tratadas y control, cuyos ejes embrionarios se imbibieron durante 6 horas. Los carriles 1 y 2 muestran DNA de semillas control; puede observarse que el barrido a disminuido sensiblemente y la - banda de alto peso molecular es mucho más nítida que la que se presenta en el DNA (control) de 0 y 3 h de imbibición (figura 7 y 8). Los carriles 5 y 6 muestran DNA de semillas - tratadas 2 días a 60°C también aquí el barrido disminuyó - sensiblemente; la banda de alto peso molecular aumentó en - nitidez.

Los carriles 8 y 9 muestran DNA de semillas tratadas - 6 días a 40°C (100% de H.R.). Aquí las dos bandas de alto pe - so molecular aumentaron también en nitidez, asimismo el ba - rrido disminuyó con respecto a tres horas de imbibición (fi - gura # 8); y fue similar a los barridos presentados por -- los otros dos DNAs de 6 horas de imbibición (control y 2 --- días 60°C).

La figura # 10 muestra la fotografía de un gel de aga - rosa donde se analizó DNA de ejes embrionarios de semillas - tratadas y control, imbibidos durante 15 horas. Los carri - les 3 y 4 muestran DNA de semillas control, aquí el barrido es virtualmente inexistente y se observa sólo una banda de - alto peso molecular muy nítida; sucede exactamente lo mismo para los carriles 6 y 7 que contienen DNA de semillas tra-

tadas por 2 días a 60°C, y también para los carriles 9 y 10 con el DNA de semillas tratadas por 6 días a 40°C (100% H.R.). Para estos tiempos de imbibición (15 h) casi todo el DNA observado es de alto peso molecular.



Figura # 7.- Análisis del DNA extraído de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 0 horas.- Carriles 2 y 3 DNA de semillas control.- Carriles 5 y 6 DNA de semillas tratadas a 60°C 2 días.- Carriles 8 y 9 DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C: 100% de humedad relativa(H. R.).

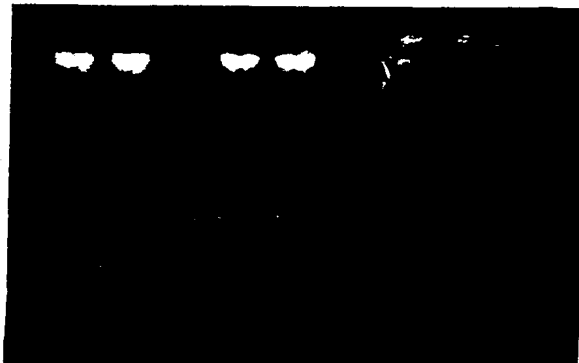


Figura # 8.- Análisis del DNA extraído de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 3 horas.- Carriles 2 y 3 DNA de semillas control.- Carriles 5 y 6 DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C.- Carriles 8 y 9 DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C: 100% de humedad relativa(H. R.).

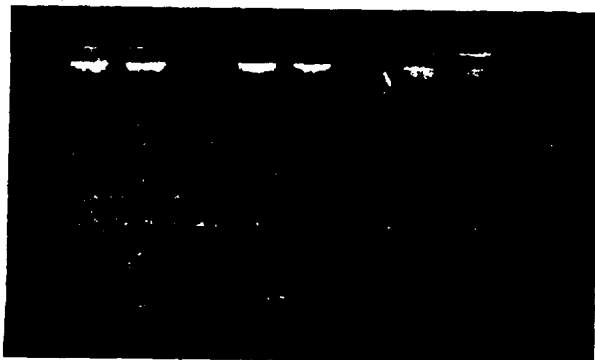


Figura # 9.- Análisis del DNA extraído de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 6 horas.- Carriles 1 y 2 de semillas control.- Carriles 4 y 5 DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C.- Carriles 7 y 8 DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C: 100% de humedad relativa.(H.R.).



Figura # 10.- Análisis del DNA extraído de ejes embriona---
rios de maíz imbibidos durante 15 horas.- Carriles 2 y 3 ---
DNA de semillas control.- Carriles 5 y 6 DNA de semillas ---
tratadas 2 días a 60°C.- Carriles 8 y 9 DNA de semillas ---
tratadas 6 días a 40°C: 100% de humedad relativa(H.R.).

DISCUSION

Trabajos anteriores han aportado evidencias de la existencia de procesos reparativos del DNA, durante las primeras horas de la germinación: en ejes embrionarios de semillas γ -irradiadas y de baja viabilidad de centeno (Cheah y Osborne, 1978; Osborne y cols, 1980; Osborne, 1982; Osborne, 1983; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986), en semillas de Yaccaria pyramidata (Hecker y cols, 1982), en ejes embrionarios de maíz γ -irradiados (Zarafn-Herzberg y cols, 1986), en semillas tratadas con agentes mutagénicos (Soyfer y Ciemenis, 1974; Yamaguchi y cols, 1975), en semillas de lechuga (Villiers y Edgcombe, 1975), en ejes embrionarios de chfcharo (Gudkov y Grodzinsky, 1976). Los criterios para detectar dichos procesos reparativos han sido variados: incorporación de un desoxirribonucleótido radiactivo durante las primeras horas de germinación (García Rendón, 1985; Cheah y Osborne, 1978; Osborne, 1982 y 1983); análisis del DNA mediante gradientes alcalinos de sacarosa (de semillas secas y de semillas en germinación) (Cheah y Osborne, 1978; Osborne y cols, 1980/81; Osborne, 1982 y 1983); y mediante la definición de patrones de síntesis de DNA marcado radiactivamente (durante su síntesis en la germinación temprana) a través de columnas de BND-celulosa (Osborne y cols, 1980/81; Osborne, 1982 y 1983; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; y Zarafn-Herzberg y cols, 1986).

Los resultados obtenidos al analizar el DNA extraído de ejes embrionarios de semillas no imbibidas (0 h), control y tratadas con calor y/o humedad (2 d 60°C y 6 d 40°C,

100% de H.R.), están de acuerdo con datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (García Rendón, 1985).

El DNA de semillas deterioradas presentó una mayor cantidad de cortes que el DNA control; con la única diferencia de que el DNA extraído de ejes embrionarios de semillas tratadas 6 días a 40°C y 100% de H.R., presentó en esta ocasión menor cantidad de cortes, que el DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C (éste se observó totalmente degradado, como un barrido difuso en los geles de agarosa; y en los gradientes alcalinos de sacarosa mostró un patrón de peso molecular en que predominaba DNA de bajo peso molecular). Cabe señalar, que en esta ocasión los cortes que presentó el DNA extraído de semillas tratadas 6 días a 40°C, 100% de H.R., fueron de hecho ligeramente mayores que aquéllos que presentó el control. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que el DNA de semillas tratadas 6 días a 40°C, 100% de H.R. (0 h de imbibición), poseía una mayor cantidad de cortes al ser analizado por electroforesis en gel de agarosa (Se observó un barrido difuso), con respecto al DNA de semillas tratadas 2 días a 60°C.

Nuestros resultados no coinciden con los datos expuestos anteriormente; al parecer el lote de semillas de maíz empleado por nosotros para este trabajo no resultó tan afectado por el tratamiento de calor y humedad, lo cual se debe probablemente, a la variabilidad genética existente entre lote y lote de semillas.

El DNA extraído de ejes embrionarios de semillas tratadas durante 6 días a 40°C, 100% de H.R. (imbibidos por 0, 3 y 6 h) mostró una mayor fragmentación cuando fue analizado

por electroforesis en geles de agarosa, que cuando se analizó por gradiente alcalino de sacarosa. Especulando podríamos atribuir las diferencias al uso de diferentes metodologías (en cada técnica) para lisar los núcleos y extraer el DNA. Finalmente podríamos pensar que los resultados observados son un artefacto de la metodología empleada, sin embargo, no estamos en condiciones de explicar estos resultados.

Pudo observarse, que el DNA extraído de ejes embrionarios de semillas tratadas y control que fueron imbibidos durante 3 horas, mostró un aumento en su peso molecular, con respecto al DNA de ejes embrionarios no imbibidos tanto mediante gradiente alcalino de sacarosa como por electroforesis en gel de agarosa.

El aumento en el peso molecular del DNA, observado en ejes embrionarios (de semillas tratadas y control) imbibidos durante 6 horas, fue aún más evidente que el observado a las tres horas de imbibición. Estos datos sugieren que la imbibición ha disparado un proceso de reparación cuya finalidad fisiológica y bioquímica es lograr restituir la integridad del DNA para que sea molde adecuado cuando la transcripción y replicación den inició (ambos son eventos previos a la división celular).

El gel de agarosa, en que se analizó DNA extraído de ejes embrionarios de semillas tratadas y control imbibidas durante 15 horas (Fig. # 10), muestra resultados que avalan con mayor peso el hecho de que se lleve a efecto un proceso reparativo del DNA durante las primeras horas de la germinación; a este tiempo de imbibición el DNA de las semillas -- tratadas y control se observa como una banda nítida de ele-

vado peso molecular; además, el barrido presente en muestras de DNA de tiempos de imbibición menores, a las 15 horas virtualmente ha desaparecido.

Los resultados obtenidos indican que es muy factible -- que un proceso de reparación del DNA se presenta como un -- proceso fisiológico normal tanto en semillas normales (control de alta viabilidad), como en semillas deterioradas por tratamientos de calor y/o humedad.

Hasta lo que podemos afirmar, el proceso observado de -- reparación, se encarga de aumentar el peso molecular de la -- molécula de DNA (inicialmente fragmentada), para constituir-la en un molde adecuado para la replicación y la transcrip-ción. Lo que nuestros resultados no nos pueden decir es por que, teniendo ya nuestro molde íntegro (DNA , 15 h de imbibición, fig. # 10) las semillas tratadas con calor y/o hume-- dad pierden del 30-50% de la viabilidad, aún cuando hemos -- demostrado en este trabajo que la integridad (EM) de su DNA es recuperada. ¿ Ha sido reparado correctamente el DNA? ¿Ha sido adecuadamente ligado durante el proceso de reparación? ¿Los eventos que preceden a la división celular han ocurri-- do en el tiempo adecuado? ¿Qué tanto contribuyen a la pérdi-- da de viabilidad el daño a los sistemas de síntesis de pro-- teínas y de RNA? Estas son preguntas aún sin respuesta y -- que rebasan grandemente los alcances de este trabajo. Traba-- jamos arduamente en nuestro laboratorio buscando respuesta -- a estas interrogantes.

C O N C L U S I O N E S

1).- El DNA de las semillas de maiz tratadas y control se encuentra fragmentado al dar inicio la germinación.

2).- A las 15 horas de germinación los pesos moleculares del DNA de semillas control y el de semillas deterioradas parecen ser iguales.

3).- Ya que el DNA recupera su peso molecular tanto en semillas control como en semillas deterioradas, debe desencadenarse un proceso reparativo.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bewley, J.D. and Black, M.(1978). Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Volume 1, Development, Germination and Growth. Springer--Verlag, Berlin: pp. 1-3, 7-13, 107, 115-117, 153-171.
- 2.- Bewley, J.D. and Black, M. (1978). Physiology and Biochemistry of Seeds in relation to germination. Volume 2. Viability, Dormancy and Environmental control. Springer-Verlag, Berlin, pp. 17-21, 27-39.
- 3.- Bewley, J.D. In " Nucleic Acids and Proteins in Plants I. Structure, Biochemistry and Physiology of proteins". (D. Boulter and B. Parthier, eds). Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 14 A, pp. 559-591. Springer-Verlag, Berlin -- (1982).
- 4.- Bewley, J.D. and Black, M. "Seeds Physiology of Development and Germination". Plenum Press. New York-London(1986), pp. 89-171.
- 5.- Blowers, L.E.: Stormonth, D.A. and Bray, C.M.(1980). Nucleic acids and Protein synthesis and loss of vigour in germinating Wheat embryos. Planta, 150: 19-25.
- 6.- Bray, C.M., and Chow, T.Y.(1976)(a). Lesions in postribosomal supernatant associated with loss of viability in pea - (Pisum sativum) seeds. Biochim. Biophys. Acta. 442: 1-13.
- 7.- Bray, C.M., and Chow, T.Y.(1976)(b). Lesions in the ribosomes of non-viable pea (Pisum sativum) embryonic axes tissue. Biochim. Biophys. Acta. 442 : 14-23.
- 8.- Bray, C.M. and Dasgupta, J.(1976). Ribonucleic acid -- synthesis and lost of viability in pea seed. Planta. 132: -- 103-108.
- 9.- Bray, C.M. (1979). In " Recent advances in Biochemistry of cereals (D.L. Laidman and R.G. Wyn Jones eds). pp. 147---173. Academic Press, London.
- 10.- Brooker, J.D., Cheung, C.P. and Marcus, A.(1977). In -- "Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination." (A.A. Khan, ed), pp. 347-356; North Holland Publishing Co., - Amsterdam.

- 11.- Caers, L.I.; Peumans, W.J., y Carlier, A.R. (1979). --
Preformed and newly synthesized messenger RNA in germina---
ting wheat embryos. *Planta*. 144: 491-496.
- 12.- Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1977). Analysis of nu-
cleosomal deoxyribonucleic acid in higher plants. *Biochem J*.
163: 141-144.
- 13.- Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978). DNA lesions oc-
cur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature*. 272: 593-599.
- 14.- Cheung, C.P.; Wu, J. and Suhaldonik, R.J. (1979). De--
pendence of protein synthesis on RNA synthesis during the e-
arly hours of germination of wheat embryos. *Nature*. 277 : -
66-67.
- 15.- Cook, P. and Brazell, I.A. (1976). Detection and repair of
single-stranded breaks in nuclear DNA. *Nature*. 263: 679-
682.
- 16.- Datta, K.; Marsh, L. and Marcus, A. Early growth of --
wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. (1983).
Plant Physiol. 72: 394-397.
- 17.- Dell'Aquila, A.; Zocchi, G.; Lanzane, G.A., and De -
Leo, P. (1976). Different forms of EFI and viability in whe-
at embryos. *Phytochemistry*. 15: 1607-1610.
- 18.- Delseney, M.; Aspart, L. and Guitton, Y. (1977). *Planta*.
135 : 125-128. Citada en la referencia # 41.
- 19.- De Vries, H. (1901). *Die Mutationstheorie*. Band 1 und
2. Leipzig: von Veit and Comp.
- 20.- Doetch, P.W.; Helland, D.E. and Haseltine, W.A. (1986).
Mechanism of action of mammalian DNA repair endonuclease. -
Biochemistry. 25: 2212-2220.
- 21.- Dommès, J. and Van de Walle, C. (1983). Newly synthesi-
zed mRNA is translated during the initial imbibition phase -
of germinating wheat embryos. *Plant Physiol*. 73: 484-487.
- 22.- Fong, F.; Smith, J.M. and Koehler, D.E. (1983). Early-
events in Maize development. *Plant Physiol*. 73: 899-901.
- 23.- García Rendón, M.- Relación entre viabilidad de germi-
nación y síntesis de DNA en embriones de maíz. (1985). Tesis
de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 24.- Giles, R.W. and Myers, A. (1965). An improved diphenyla-
mine method for the stimation of DNA. *Nature(London)*, 206: -
93.
- 25.- Gudkov, I.N. and Grodzinsky, D.M. (1976). Induction by
gamma irradiation of DNA synthesis in radicle cells of ger-
minating seeds of *Pisum sativum*. *L. Int. J. Radiat. Biol.* --
29 : 455-462.

- 26.- Hecker, W. ; Kohler, K.H. ; Wachlin, G. and Bernhardt, D. (1982). Relation between DNA synthesis and germination of *Vaccaria pyramidata* seeds. Phytochemistry. 21: 1491-1494.
- 27.- Howland, G.P. (1975). Dark repair of ultraviolet induced pyrimidine dimers in the DNA of wild carrot protoplasts. Nature. 254 : 160-161.
- 28.- Howland, G.P. ; Hart, R.N. ; and Yette, M.L. (1975). Repair of DNA strand breaks after gamma-irradiation of protoplasts isolated from cultured wild carrot cells. Mutat. Res. 27 : 81-87.
- 29.- Klein, S. ; Barenholz, H. and Budnik, A. (1971). Plant and Cell Physiol. 12: 41-60. Citada en la referencia # 41.
- 30.- Lakon, L.A. (1969). Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from nuclei of sea Urchin embryos. J. Biol. Chem. 244: 1672-1681.
- 31.- Marcus, A. ; Feeley, J. and Volcani, T. (1966). Plant - Physiol. 41 : 1167-1172. Citada en la referencia # 41.
- 32.- Matz, A.S. (1969). Cereal Science. The Abi publishing Co. Inc. London, England. pp. 49-51.
- 33.- Marcus, A. (1982). In "Nucleic acids and Proteins in Plants I. Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins. (D. Boulter ; B. Parthier, eds). Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 14A. pp 113-135. Springer-Verlag. Berlin. Citada en la referencia # 41.
- 34.- Mayer, A.M. and Marbach, I. (1981). Progr. Phytochem. 7: 95-136. Citada en la referencia # 41.
- 35.- Mayer, A.M. and Poljakoff, A. (1975). The germination of Seeds. 2nd Edition. Pergamon Press, pp. 21-26.
- 36.- Miranda Ham, María de Lourdes.- Estudio sobre la síntesis de ADN en la germinación de Maíz (1984). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 37.- Mory, Y.Y. ; Chen, D. and Sarid, S. (1975). Plant Physiol. 25: 437-442.
- 38.- Mory, Y.Y. ; Chen, D. and Sarid, S. (1972). Onset of deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat embryos. Plant Physiol. 49: 20-23.
- 39.- Müntz, K. (1982). In " Nucleic acids and Proteins in - Plants I. Structure, Biochemistry and Physiology. New Series, Vol. 14A. pp. 505-558. Springer Verlag, Berlin. Citada en la referencia # 41.
- 40.- Muro Rico, M. (1986). Efecto del deterioro de semillas sobre los sistemas de síntesis de proteínas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

- 41.- Murray, D.R. (editor). Seed Physiology. Volume II. Academic Press, Australia (1984). 1st Edition.- pp. 77-115.
- 42.- Osborne, D.J.; Sharon, R.; Ben Ashai, R.- (1980/81). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (Secale cereale). Israel Journal of Botany. 29; 259-272.
- 43.- Osborne, Daphne J. (1982). DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. In "embryonic development, Part B. Cellular aspects. pp. 577-592. (Allan R. - Liss, Inc. 150 fifth avenue. New York, NY 10011.).
- 44.- Osborne, D.J. (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. Canadian Journal of Botany. 61: 3568-3577.
- 45.- Osborne, D.J.; Dell'Aquila, A. and Elder, R.H. (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early germination in seeds. Folia Biologica (Praha), special publication.
- 46.- Osborne, D.J.; Dell'Aquila, A. and Elder, R.H. (1984). Ageing and repair processes in the embryo of seeds: Loss of DNA integrity as a critical event. Folia biologica (Praha), special publication of the FEBS Symposium
- 47.- Payne, P.I. (1977). Synthesis of Poly A-Rich RNA in embryos of Rye during imbibition and early germination. Phytochem. 16: 431-434.
- 48.- Peumans, W.J.; Carlier, A.R. and Delaey, B.M. (1980). Plant Physiol. 66: 584-587.
- 49.- Peumans, W.J. and Carlier, A.R. (1981).- Loss of protein synthesis activity in ageing wheat grains: lesions in the initiation process and mRNA degradation. Biochem. Physiol Pflanz. 176: 384-395.
- 50.- Roberts, S.E. and Osborne, D.J. (1973).- Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The lability of transferase enzymes during senescence. Biochem J. 135 :- 405-410.
- 51.- Roberts, B.E.; Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973). - Protein synthesis and the viability of rye grains. Loss of activity of protein synthesizing enzymes in vitro associated with a loss of viability. Biochem J. 131: 275-286.
- 52.- Sánchez de Jiménez, E; Aguilar, R. and López, S. (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. Biochemical and Biophysical Research Communications. 99: 445-450.
- 53.- Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (short communication). Protein synthesis patterns (relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos). (1984). Plant Physiol. 75: 231-234.

- 54.- Sen, S. and Osborne, D.J. (1975). Early ribonucleic acid synthesis during the germination of Rye (Secale cereale) embryos and the relationship to early protein synthesis. -- Biochem J. 148: 381-387.
- 55.- Sen, S. and Osborne, D.J. (1977).-- Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of Rye (Secale cereale) embryos. Biochem J. 166: 33-38.
- 56.- Smith, C.A.D. and Bray, C.M. (1982). Planta. 156: 413-420.
- 57.- Soyfer, V.N. and Ciemenis, K.G.R. (1974). Dark repair in higher plants. Pro. Acad. Sci. URSS. 215 : 1261-1264.
- 58.- Spiegel, S. and Marcus, A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. Nature. 256: 228-230.
- 59.- Stoddart, J.L. and Thomas, H. (1973) Planta. 112: 309-321. Citada en la referencia # 41.
- 60.- Tano, S. and Yamaguchi, H. (1977). Repair of radiation induced single strand breaks in DNA of Barley embryos. Mutat Res. 421: 71-78.
- 61.- Van Onckelen, A.; Verbeek, R. and Khan, A.A. (1974). - Relationship of ribonucleic acid metabolism in embryo and aleurone to α -amilase synthesis in barley. Plant Physiol. 53: 562-568.
- 62.- Van de Walle, C. and Bernier, G. (1976). Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. Plant Physiol. 157: 632-639.
- 63.- Vázquez Ramos, Edgar T.- Actividad de la DNA polimerasa en semillas deterioradas de maíz. (1986). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 64.- Vázquez-Ramos, J.M. and Osborne, D.J. (1986).-- Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose Chromatography. Mutation Res. --- 166: 39-47.
- 65.- Veleminsky, J. and Gichner, T. (1978). DNA repair in - mutagen injured higher plants. Mutation Res. 55: 71-84.
- 66.- Villiers, TA. (1974). Seed aging. Chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. Plant Physiol. 53: 875-878.
- 67.- Villiers, T.A. and Edgecumbe, D. (1975). On the cause of seed deterioration in dry storage. Seed Sci Technol. 3: 761-774.
- 68.- Walbot, V. (1972). Rate of RNA synthesis and t-RNA labeling during early development of Phaseolus. Planta. 108:--

161-171.

69.- Weeks, D.P. and Marcus, A. (1971). Preformed messenger RNA of quiescent wheat embryos. *Biochim. Biophys. Acta.* 232: 671-684.

70.- Weill, J.H. and Parthier, B. (1982). In "Nucleic acids and Proteins in Plants II. Structure, Biochemistry and Physiology of Nucleic acids". (B. Parthier and D. Boulter, --- eds). *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol 14B*, pp. 65-112. Springer-Verlag (Berlin).

71.- Yamada, K.; Hanaoka, F. and Yamada, M. (1985).- Effects of Aphidicolin and/or 2',3'-Dideoxythymidine on DNA repair induced in HeLa cells by four types of DNA damaging agents. *J. Biol Chem.* 260: 10,412-10,417.

72.- Yamaguchi, H.; Tatara, A. and Naito, T. (1975). Unscheduled DNA synthesis induced in barley seeds by gamma rays-- and 4-nitroquinoline-1-oxide. *Japan J Genet.* 50: 307-318.

73.- Zarafin-Herzberg, M.; Bernal-Iugo, I. and Vázquez-Ramos, J.M.- Effect of Benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutation Res(en pres sa)*.