



00362
6
Zei

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
Division de Estudios de Posgrado

PAPEL DE LOS FITORREGULADORES
EN LA INDUCCION DE LA REPARACION
DE DNA EN LA SEMILLA DE MAIZ.

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Quimicas (Bioquimica).

P R E S E N T A

Martha Zarain Herzberg

México, D.F.

1987.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS.

| | |
|---------|--|
| ABA | ácido abscísico |
| ara-CTP | arabinosil citidina 5 -trifosfato |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BA | benzil adenina |
| BSA | albúmina de suero bovino |
| EDTA | ácido etilen diamino tetra-acético |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| NADH | nicotinamida adenina dinucleótido (reducido) |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido) |
| PCA | ácido perclórico |
| RNA | ácido ribonucléico |
| mRNA | ácido ribonucléico mensajero |
| rRNA | ácido ribonucléico ribosomal |
| tRNA | ácido ribonucléico de transferencia |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| TCA | ácido tricloroacético |
| U.V. | ultravioleta |

I N D I C E

R E S U M E N

- 1.- INTRODUCCION
- 2.- ANTECEDENTES
 - 2.1 GERMINACION
 - 2.2 REPLICACION DEL DNA
 - 2.3 REPARACION DEL DNA
 - 2.4 DAÑO AL DNA EN PLANTAS
 - 2.5 INFLUENCIA DE FITOREGULADORES DURANTE LA GERMINACION
 - 2.6 CROMATOGRAFIA EN BND-CELULOSA
 - 2.7 ANTECEDENTES INMEDIATOS
- 3.- HIPOTESIS
- 4.- OBJETIVO
- 5.- MATERIALES Y METODOS
 - 5.1 MATERIALES
 - 5.1.1 QUIMICOS
 - 5.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO
 - 5.2 METODOS
 - 5.2.1 RADIACION DE EJES EMBRIONARIOS
 - 5.2.2 IMBIBICION DE EJES EMBRIONARIOS
 - 5.2.3 PREPARACION DEL HOMOGENADO
 - 5.2.4 PREPARACION DE MUESTRAS PARA LA CROMOTOGRAFIA
 - 5.3 CROMOTOGRAFIA EN BND-CELULOSA
 - 5.4 PREPARACION DE FITORREGULADORES
 - 5.5 IMBIBICION DE EJES EMBRIONARIOS EN CAJAS DE PETRI
 - 5.6 OPTIMIZACION DE METODOLOGIA
 - 5.6.1 PATRONES DE ELUSION DEL DNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ
- 6.- RESULTADOS
 - 6.1 PATRONES DE SINTESIS DE DNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ NO-RADIADOS E RADIADOS, INCUBADOS DE - - 0-1, 0-3 y 0-15 H.

- 6.2 EFECTO DE ABA Y BA EN LA GERMINACION DE EJES -
EMBRIONARIOS DE MAIZ.
- 6.3 EFECTO DE ABA Y BA SOBRE LA SINTESIS DE DNA EN -
ENES EMBRIONARIOS DE MAIZ.
- 6.4 EFECTO DE BA SOBRE LOS PATRONES DE SINTESIS DE -
DNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ RADIADOS Y NO--
RADIADOS INCUBADOS POR 0-3 H.
- 7.- DISCUSION
- 8.- CONCLUSIONES
- 9.- BIBLIOGRAFIA
- 10.- ARTICULO ANEXO: EFFECT OF BENZIL ADENINE ON THE
DNA SYNTHESIS DURING EARLY GERMINATION OF MAIZE
EMBRYO AXES.

SUMMARY

During early maize embryo axes (0-15h), the method that we use (BND-celulose Chromatography) has been provided a series of ra tio in counts incorporated, in conclusion as interpreted --- about a pattern of main synthesis.

A pattern of repair synthesis in gamma irradiated maize embryo axes has been obtained during the early germination (pre-repli cat ive period, 0-3h). However it has not been possible to distin gu ish the pattern of non-irradiated axes imbibed for the some period of time while this DNA synthesis observed does not respond to ABA (abscisic acid), as is discussed.

The pattern of elution of embryo axes imbibed for 0-15h really has been obtained a pattern of replicative synthesis whether the replicative synthesis appears to start 12-15 hours after imbibition.

We observed that BA (benzil-adenine) induced germination in irradi ated or not irradiated embryo axes imbibed for 48h. This effect is more drastic in gamma irradiated axes.

When BA is added to irradiated and not irradiated embryo axes, during pre-repli cat ive period (0-3h), the result was an increase in the counts incorporated, enhancing the repair type pattern in irradiated axes but most was the change in the pattern of elution the DNA labelled of not irradiated embryo axes and now it is the repair type synthesis.

This pattern occurs irrespective of whether the pulse label is given 10, 20 or 30 min before the end of the incubation period. The role of BA on early germination and repair synthesis is -- discussed.

R E S U M E N

Durante las primeras horas de germinación (0-15h) en ejes embrionarios de maíz, la metodología utilizada (cromatografía en BND-celulosa) nos proporcionó una serie de relaciones de marca incorporada, que se interpretan finalmente como un patrón de síntesis preferencial.

Se encontró un patrón de síntesis reparativa en ejes embrionarios radiados durante las primeras horas de germinación (0-3h, periodo pre-replicativo), sin embargo no pudo definirse claramente el patrón obtenido de ejes embrionarios - no radiados durante los mismos periodos (0-1, 0-3 h), siendo que se observa que esta síntesis de DNA es insensible a ABA, como se discute.

En los patrones de elusión de ejes embrionarios incubados de 0-15 h efectivamente se encontró un patrón de síntesis replicativa, ya que la síntesis replicativa parece comenzar alrededor de las 12 a 15 h.

Se observó que BA estimuló la germinación de ejes embrionarios radiados y no radiados incubados por 48 h, siendo más notable este efecto en ejes embrionarios radiados.

Cuando BA es añadido a ejes embrionarios radiados y no radiados durante periodos pre-replicativos (0-3h), el resultado fué un incremento de la marca incorporada, favoreciéndose el patrón de tipo reparativo en ejes embrionarios radiados y provocando un cambio en el patrón de elusión de DNA marcado de ejes embrionarios no radiados que ahora se presenta como tipo reparativo. Este patrón se mantiene independientemente de pulso dado, ya sea por 10, 20 o 30 minutos, antes del término del periodo de incubación. También se discute el papel de BA en las primeras horas de germinación y en la síntesis reparativa.

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

Uno de los problemas fundamentales que enfrenta la humanidad es el problema alimentario. Los altos ritmos de crecimiento poblacional y la injusta distribución de la riqueza, se han combinado para producir como efecto la desnutrición y el hambre de decenas de millones de personas en el planeta.

Tan solo la encuesta mundial aplicada por la FAO sobre alimentación en 1985 registra para América Latina, un total de 56 millones de personas desnutridas.

Para muchas culturas los granos constituyen el alimento básico. La producción, almacenamiento, transportación, distribución y consumo de los mismos es una tarea indispensable en la solución del problema alimentario mundial.

Nuestro país ha quedado rezagado en la creación de una infraestructura del almacenamiento de granos, se presenta el problema de pérdida de viabilidad y/o vigor de semillas almacenadas que serán utilizadas para la siembra, redundando este problema económicamente al producir una baja en la productividad de las cosechas.

La baja viabilidad de semillas de cereales puede ser ocasionada por varios factores, por ejemplo, una posible causa podría ser el daño en el material genético (cortes en el DNA) provocado por un almacenamiento inadecuado (Cheany y Osborne, 1978) y como posible consecuencia se observa un retardo en la síntesis de DNA.

Ya que el daño en el material genético tendría que ser corregido por una síntesis reparativa de DNA, este trabajo se dedicó al análisis de los diferentes tipos de síntesis de DNA que se inducen cuando una semilla sufre daño en su material genético y su posible modificación por medio de fitorreguladores.

2.1 GERMINACION

Las semillas de las angiospermas se desarrollan de un óvulo fertilizado y consisten de un embrión diferenciado en un vástago y una raíz, rodeado por un endospermo o material de reserva y finalmente la testa que rodea a estas dos estructuras.

La germinación y desarrollo de las semillas de una -- planta superior, pueden verse como un número de etapas consecutivas que provocan que una semilla latente, con bajo contenido de agua, muestre un aumento de su actividad metabólica e inicie la formación de una plántu- la a partir de un embrión.

Para que una semilla germine debe ser puesta en condiciones ambientales adecuadas, como son: cantidad de - agua, temperatura apropiada y composición de gases en la atmósfera. Nuestra definición particular de germinación la delimita desde el inicio de la imbibición - hasta el momento de la primera división celular.

La absorción de agua por una semilla presenta 3 fases. La fase I es una consecuencia de las fuerzas de hidratación de las paredes celulares de la semilla y es independiente de la actividad metabólica de la semilla. La fase II es un periodo lag de absorción de agua y - la semilla latente presenta un metabolismo activo a - diferencia de las semillas no viables. En la fase III la absorción de agua está asociada con la germinación y desarrollo subsecuente de la semilla y presenta una actividad metabólica incrementada (Bewley y Black, - 1978).

Durante su formación la semilla sufre de una extrema-deshidratación, sin embargo todas las células del embrión permanecen vivas por un tiempo largo (Osborne, 1983), si las semillas se mantienen en condiciones adecuadas. El factor mas importante para que se inicie la actividad metabólica y se reinicie el crecimiento y desarrollo del embrión es la entrada de agua. La hidratación de organelos secos en las células de la semilla (mitocondrias, ribosomas, nucleos, membranas) y de macromoléculas (enzimas, rRNA, mRNA, DNA, etc.) activa las funciones de estos organelos y macromoléculas secuencialmente (Ching, 1972).

Muchos de los estudios bioquímicos sobre la germinación se han efectuado en embriones aislados de trigo, centeno, frijol, etc. (Walton et al, 1970; Castroviejo, 1979; Sen y Osborne, 1977; Mory et al, 1972), y con este sistema de estudio se ha encontrado que algunos de los principales eventos que se disparan después de la hidratación son la producción de ATP, síntesis de proteínas, síntesis de RNA, reparación de DNA y - horas después, se lleva a cabo la replicación del DNA, seguida por la división celular (Osborne, 1980/81; - Osborne, 1983; Datta et al, 1983; Osborne et al, - 1984; Vázquez y Osborne, 1986).

Otras actividades celulares fundamentales también juegan un papel importante, para preparar a la semilla a germinar y desarrollarse.

Son importantes tres rutas metabólicas, llamadas glicólisis, ruta de las pentosas y ciclo de krebs, para la producción de intermediarios en el metabolismo, - energía en forma de ATP y poder reductor como NADH y NADPH (Bewley y Black, 1978).

La síntesis de ATP ha sido estudiada en algunas semillas durante la germinación, pero pocos estudios se han hecho en relación con el cambio de estructura o actividad de las mitocondrias. Como la concentración intracelular de ATP aumenta en los primeros 15 minutos, es de esperarse que las enzimas para la síntesis de ATP, deban de estar presentes. También es posible que las mitocondrias se preserven en las semillas a través de su deshidratación o periodos de almacenamiento, ya que se observa una rápida toma de oxígeno al inicio de la imbibición (Mayer y Poljakoff, 1975).

La maquinaria de síntesis de proteínas provee un equipo básico para que las células puedan sintetizar las enzimas requeridas, tanto estructurales como reguladoras, desde el inicio de la germinación. La síntesis de proteínas se detecta pocos minutos después de iniciada la imbibición en embriones de trigo (Marcus et al, 1966). Los polisomas considerados el complejo activo para la síntesis de proteínas, están ausentes en los tejidos de la semilla seca y su formación se inicia rápidamente durante la imbibición, junto con la presencia de los componentes citoplásmicos esenciales para la síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1978).

Ahora bien, los patrones de síntesis de proteínas y RNA obtenidos de los embriones hidratados han mostrado que los embriones tienen la capacidad de sintetizar todos los tipos de RNA (mRNAs, rRNAs, tRNAs). Parece ser que la síntesis de novo de mRNA no es esencial para la síntesis de proteínas, sin embargo existe la síntesis de mRNA durante etapas muy tempranas de imbibición (Sen y Osborne, 1977). Aún no se determina que tan importantes son los mRNAs preformados presentes en la semilla antes de la síntesis de novo del mRNA, cuál

es su papel en la germinación y en que momento son esenciales los sintetizados de nov. Estudios efectuados por Sánchez. et al (1981), sugieren que la síntesis -- temprana de proteínas en maíz está dirigida por un mRNA preformado.

El proceso de la germinación lleva eventualmente al desarrollo de una plántula a partir de un embrión. Una pregunta que surge, en relación al proceso de la germinación y desarrollo de una semilla, es que evento ocurre primero cuando el embrión rompe la envoltura de la semilla, si es la división o elongación celular, en el caso de maíz y cebada la elongación celular precede a la mitosis o división celular, por varias horas durante la germinación (Toole, 1924; Caldecott y Smith, -- 1952).

Dentro de esta serie de eventos que se disparan después de la hidratación se encontró que la replicación del DNA, junto con la primera división celular, son eventos que ocurren en semillas en germinación algunas horas después, en comparación con otras actividades (Osborne et al, 1984; Chen y Osborne, 1970; Vázquez y Osborne, 1986).

2.2 REPLICACION DEL DNA

Durante cada ciclo celular, las células crecen por una duplicación de todos sus elementos estructurales y capacidades funcionales. Dos grandes procesos han sido identificados durante cada ciclo celular; la replicación del DNA y la división celular. El último evento se refiere ya a un periodo post-germinación, durante el desarrollo de una plántula, de acuerdo a nuestra definición particular de germinación.

Estas dos etapas permiten dividir al ciclo celular en 4 periodos sucesivos: G_1 , S, G_2 y M. En el periodo G_1 se asume la existencia de una serie de eventos que conducen a la replicación del DNA. El periodo G_2 refleja una secuencia de etapas ya iniciadas para el término de la síntesis del DNA y que lleva a la división nuclear y citocinesis, que se inician en la fase M (Prescott, -1976).

2.3 REPARACION DE DNA

Para que el material genético se mantenga fiel a su --molde requiere que el sistema de copiado (replicación del DNA) sea muy eficiente. Es necesario también que existan un mecanismo que repare posibles lesiones accidentales que pueda sufrir el DNA.

Las moléculas en los genes sufren cambios debidos a -fluctuaciones termales, como lo había señalado desde -1946 Erwin Shroedinger. Ahora conocemos que alrededor de 10^4 depurinaciones ocurren diariamente en el DNA de células humanas debido a rupturas termales de sus uniones N-glicosil con la desoxirribosa (Lindahl y Nyberg, 1972).

De la misma manera existen desaminaciones espontáneas. También las bases del DNA estan sujetas a los efectos de la luz U.V., proveniente del sol, que induce uniones covalentes en dos timidinas adyacentes en el DNA, formándose dímeros de timina.

Estos son algunos ejemplos de los cambios que ocurren espontáneamente en el DNA, la explicación de que estas lesiones sean eliminadas con eficiencia es debido a la

existencia de mecanismos de reparación del DNA. En eucariontes al menos existen 3 sistemas de reparación de bases dañadas en el DNA; fotorreactivación, reparación por escisión y la reparación post-replicación.

La fotoreactivación es específica para daños inducidos por luz U.V. Este mecanismo existe tanto en plantas como animales (Cook, 1970), previniendo la letalidad inducida por la luz U.V. (Brunk y Hanawalt, 1967) y reduciendo el número de mutaciones y aberraciones cromosómicas producidas como resultado de la luz (Griggs y Bender, 1973).

El mecanismo de reparación por escisión es un sistema universal de reparación del DNA, tanto en su distribución filogenética, como en el tipo de lesiones que puede reparar. Este sistema puede operar cuando las células han sufrido daño en su material genético por diferentes tipos de radiación o agentes químicos. El sistema requiere de al menos 5 etapas para reparar el daño: 1) reconocimiento del daño, 2) incisión, donde una endonucleasa específica que reconoce bases dañadas induce un corte cercano al daño, 3) escisión de las bases dañadas, 4) reparación i.e. inserción de bases no dañadas en la región donde se produjo la escisión, 5) ligamiento de las nuevas bases insertadas.

La reparación post-replicación, a diferencia de la reparación por escisión, implica la corrección de cualquier daño en el DNA después que la replicación se ha completado.

Hasta hace algunos años se pensaba que el mecanismo de reparación por escisión, no se presentaba en plantas (Wolff y Cleaver, 1973; Painter, 1974). Posterior

mente se encontró que este mecanismo en plantas es si milar al conocido en bacterias y células de mamíferos (Soyfer, 1979; Veleminsky y Gichner, 1978), y opera durante la reparación del daño producido por algunos de los agentes mencionados en los párrafos anteriores (Soyfer, 1983).

2.4 DAÑO AL DNA EN PLANTAS (Tratamientos químicos, radiación ionizante, almacenamiento).

Como ya se mencionó, las células de una semilla pueden permanecer vivas en estado latente, hasta que la semilla se encuentre en condiciones adecuadas para germinar, pero si el tiempo de almacenamiento de las semillas es muy prolongado estas germinan lentamente y baja su porcentaje de germinación, diciendo entonces que estas han perdido vigor y viabilidad (Roberts, 1972).

El primero en reconocer plántulas con variantes morfológicas, provenientes de semillas que han sido almacenadas por periodos prolongados fue De Vries (1901, -- 1903). Navahim (1933) y otros reportes, relacionan la duración del almacenamiento de semillas, con el número de aberraciones cromosómicas; Nichols (1941) encontró que en etapas sucesivas del desarrollo de las raíces de Allium cepa, después de la hidratación, disminuyó el porcentaje de aberraciones cromosómicas encontradas en las puntas de raíces provenientes de semillas en estado seco.

En trabajos mas recientes, Osborne (1980/81) encontró que conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, también la velocidad de síntesis temprana de proteínas disminuye, siendo ésta una forma de manifestarse la pérdida de vigor en las semillas durante las primeras-

horas de germinación (Roberts y Osborne, 1973), asimismo la síntesis de RNA se retarda y se observa un retraso en el inicio de la síntesis replicativa del DNA, que se inicia normalmente en embriones de centeno 3-4 h después de la imbibición (Cheah y Osborne, 1978). Posiblemente, uno de los factores que intervienen en el retraso de la síntesis replicativa, sea la pérdida de la integridad del material genético nuclear, contribuyendo éste a favorecer una germinación lenta.

Las diferencias en integridad del DNA, pueden ser vistas fácilmente por un fraccionamiento electroforético del DNA aislado de núcleos, tanto de embriones de centeno con alta viabilidad, como de semillas no viables; las primeras poseen una DNA de alto peso molecular y las segundas poseen material de bajo peso molecular - (Osborne, 1982).

El-Metainy et al (1971) trabajaron con núcleos aislados de semillas de cebada que habían sido radiadas -- con rayos gamma mostrando estos perfiles en el DNA de peso molecular bajo, en comparación con el de semillas no radiadas, encontrando una relación lineal entre el número de cortes en el DNA de cadena sencilla y los cambios en peso molecular. Pero cuando embriones radiados se imbibieron por un tiempo determinado y después se efectuó un fraccionamiento del DNA, éste recuperó su peso molecular como el obtenido para las semillas control (no radiadas) (Tano y Yamaguchi, 1977).

Otros trabajos sobre integridad del DNA se han efectuado en semillas al producir un daño por radiación ionizante o tratamientos químicos. Estos daños en el material genético se han detectado por una alta incorporación de timidina (^3H) en el DNA, en su forma no repli-

cativa (Soyfer y Ciemenis, 1974; Yamaguchi et al, 1975).

La radiación ionizante produce rupturas en las uniones de las bases con la desoxirribosa; también modifica -- las bases formando compuestos derivados, induciendo la formación de sitios apirimidínicos y apurínicos; causa la apertura y fragmentación de anillos de residuos pirimidínicos e induce cortes en cadena sencilla y doble de DNA (Strauss, 1977; Lindahl, 1982). Los agentes alquilantes forman una variedad de aductos en el DNA (fosfotriesteres, alquilaciones en la guanina, inter e intra cruzamientos (G-C, etc.) (Strauss, 1977).

Además del daño que se puede inducir en el material genético de una semilla por agentes químicos o radiación, existe otro factor importante, como ya se mencionó, el cual favorece cambios degradativos o daño al DNA, como lo es el almacenamiento prolongado de las semillas (Osborne, 1980), que produce rupturas en el DNA de embriones de centeno en estado seco (Chesh y Osborne, 1978). También se ha encontrado que durante las primeras horas de imbibición de estos embriones ocurre una síntesis de DNA no programada, previa al inicio de la síntesis-semi-conservativa del DNA, y que puede atribuirse a una reparación del DNA (Osborne, 1980/1981).

La capacidad de reparación del DNA se probó en embriones de semillas de centeno, durante las primeras horas de germinación. Los embriones se aislaron de semillas cosechadas inmediatamente, teniendo un 96% de germinación y de aquellas que habían sido almacenadas y presentaban una germinación baja del 52%. (Osborne, 1980/81).

Se mostró por estudios de incorporación de marca radiac

tiva en el DNA de estos embriones (alta y baja viabilidad) y su posterior fraccionamiento sobre columnas de BND-celulosa, que la síntesis de DNA que se manifiesta en las primeras horas de germinación representa una síntesis reparativa; incrementándose ésta si las semillas se radían (Osborne, 1982). Por estudios autoradiográficos se demostró que la incorporación que se efectuó en estos embriones gama radiados se restringe al núcleo (Osborne, 1984). Asimismo el análisis del DNA sintetizado durante la germinación temprana de embriones de centeno usando la cromatografía en BND-celulosa, mostró la existencia de 3 tipos preferenciales de síntesis de DNA: un tipo reparativo en ejes radiados incubados en tiempos pre-replicativos, una síntesis replicativa y un tercer tipo de síntesis en embriones no irradiados incubados por tiempos pre-replicativos la cual no pudo definirse (Vázquez y Osborne, 1986).

Con estas evidencias y otras (Berjak y Villiers, 1972; Villiers, 1974) se ha sugerido que el principal evento que se inicia tempranamente en muchos tipos de semillas, son mecanismos de reparación de lesiones en el DNA, que surgen durante el almacenamiento.

2.5 INFLUENCIA DE LOS FITORREGULADORES DURANTE LA GERMINACION.

Se sabe que la germinación de una semilla puede verse influenciada por la aplicación exógena de fitorreguladores (auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno), y es posible que el control natural de la germinación involucre una interacción de fitorreguladores, tanto-promotores como inhibidores (Khan, 1967; Addicott, -- 1972). Por lo tanto los fitorreguladores pueden actuar en concierto para determinar respuestas fisiológicas-

tales como: tropismo, floración, crecimiento de yemas laterales, alargamiento de tallos, división celular, etc. (Khan, 1971).

Como ejemplo de un fitorregulador que inhibe el crecimiento tenemos al ABA que fué identificado en 1968 por Wareing, el cual aplicado a tejidos de plantas da como resultado un número de respuestas que incluyen la abscisión de hojas, inhibición de crecimiento y una variedad de eventos que indican senescencia (Addicott y Lyon, 1969).

Su modo de acción aún no ha sido entendido, sin embargo hay varios reportes que indican que el ABA afecta el metabolismo de ácidos nucleicos. Van Overbeck et al (1967) fueron los primeros en reportar que ABA en Lemna inhibe el crecimiento y la síntesis de ácidos nucleicos, en particular la síntesis de DNA. Villiers (1968) mostró que ABA también inhibe la incorporación de uridina y timidina tritiada en ácidos nucleicos en ejes embrionarios de Fraxinus. Wareing et al (1968) sugirieron que el principal efecto del ABA fue el de inhibir la síntesis de RNA y Walton et al (1970) postularon un posible efecto a nivel de traducción. Steward y Smith (1972) observaron que ABA actúa principalmente sobre el proceso de división celular en Lemna, provocando la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, al igual que se encontró en otros sistemas como el del frijol, trigo y maíz (Khan, 1971; Davey y Brown, 1982; Barlow y Pilet, 1984). Asimismo ABA inhibió la síntesis replicativa del DNA en centeno (D.J. Osborne, comunicación personal), sin efecto sobre la síntesis temprana del DNA que se observó en centeno (Vázquez y Osborne, 1986).

Por otro lado, el primer papel que se le atribuyó a otro fitorregulador como es la citocinina, fue el de

promover la división celular (Patau et al, 1957; Zwar, 1973), además de su efecto fisiológico observado de influir en procesos tales como diferenciación o senescencia, cuando se les aplica exogenamente a plantas, tejidos u órganos.

Estas respuestas han conducido a especular sobre estos procesos y su control por niveles endógenos de citocininas (Horgan, 1984; Osborne, 1962).

También se les ha identificado como promotores de la germinación (Van Standen, 1983), cuando se aplican exogenamente a ejes embrionarios de Phaseolus vulgaris se obtienen aumentos hasta de un 25% en su crecimiento -- (Sussex et al, 1975).

Las citocininas también tienen una variedad de efectos sobre el desarrollo de cloroplastos (Harvey et al, 1974; Longo et al, 1979).

Como ya se dijo, la germinación y crecimiento de plántulas puede estar influenciada por más de un fitorregulador y las evidencias sugieren que cada proceso es controlado por un juego de factores hormonales (Adicott, 1972). Se ha sugerido que las citocininas pueden prevenir el efecto inhibitor del ABA (Khan, 1967; Khan y Heit, 1969) incrementando el contenido de ácidos nucleicos (Van Overbeck et al, 1967; Albanell et al, 1985).

Asimismo, benzil-adenina una citocinina sintética, activó la síntesis de DNA en yemas laterales de tabaco y en semillas latentes de Vaccaria pyramidata (Schaeffer y Sharpe, 1969; Kohler et al, 1982). En cotiledones de sandía crecidos en agua y benzil-adenina, esta última -

promovió crecimiento e incrementó una síntesis temprana de DNA nuclear, diferente de la síntesis replicativa - (Galli, 1984).

Es de especial interés que este fitorregulador incrementa la síntesis de DNA, dada la importancia que ésta tiene en el proceso de la germinación y desarrollo de la semilla.

En otros estudios sobre la cuantificación de los niveles endógenos de fitorreguladores durante el ciclo celular, se mostró que existe un drástico incremento de citocininas en los límites de la fase G₂/M y otros mas ligeros durante la fase S del ciclo celular, sugiriendo ésta - una relación de las citocininas con el ciclo celular - (Nishinari y Syono, 1986).

Se ha hecho un gran esfuerzo para dilucidar el modo de acción de las citocininas y saber cual es el evento inicial de su actividad biológica. El primer reporte de un factor de unión para citocininas en ribosomas fue el de Berridge et al (1970) quienes encontraron una serie de sitios no saturables con aparentemente una baja afinidad a citocininas. Más recientemente se han aislado dos grupos de proteínas con alta afinidad a citocininas en ribosomas de células de tabaco (Hamaguchi et al, - 1985).

Otra posible relación de las citocininas se encontró con el fenómeno del envejecimiento (Scrivastana, 1968), donde se encontró una asociación de ribonucleasas y de soxirribo-nucleasas con cromatina y su supresión por - citocininas. Posteriormente se ha visto que benzil-adenina ejerce efecto sobre la síntesis de ciertas proteí

nas, induciéndolas, suprimiéndolas o activándolas, pero aún no se conocen los factores involucrados para la modulación de esta expresión genética (Chen y Lisner, - - 1985). El conocimiento de los mecanismos de acción de las citocininas, ya sea durante la germinación o desarrollo de las semillas serán de gran valor para aclarar algunos aspectos de su actividad biológica en éste y futuros trabajos.

2.6 CROMATOGRAFIA EN BND-CELULOSA

La cromatografía en BND-celulosa se ha utilizado para el estudio de discontinuidades en el DNA, ya que las regiones de crecimiento en el DNA pueden ser separadas -- del DNA total, como cadena sencilla de DNA (Scudiero y Strauss, 1974). Las características de la resina junto con el uso de inhibidores de la replicación del DNA, se han aprovechado para realizar estudios de reparación de DNA, como se dijo antes; tanto en células animales (Scudiero et al, 1975; Strauss, 1981), como en células vegetales (Vázquez y Osborne, 1986).

Esta resina adhiere tenazmente DNA de cadena sencilla, y con menos fuerza DNA de cadena doble. Utilizando DNA marcado durante diferentes ^{tiempos} (tipos) de la germinación es posible obtener marca principalmente en el DNA de cadena doble, que se ha tomado como proveniente de un proceso reparativo, y es eluido con NaCl 1M, pudiendo entonces separarlo del DNA de cadena sencilla que es elu ido con NaCl 1M más 50% de formamida, con marca como -- proveniente de la síntesis replicativa (Fragmentos de Okazaki) (Osborne, 1980/81; Vázquez y Osborne, 1986).

El principio de como los ácidos nucleicos son fraccio-

nados sobre columnas de BND- celulosa (benzoilato naftoilato DEAE celulosa) no es claro; sin embargo se ha observado que la unión de tRNAs a la resina se favorece marcadamente por los grupos naftoilato y benzoilato, más que por los grupos hidroxilo libres de la celulosa (Tener et al, 1966) y que el fraccionamiento de los ácidos nucleicos esta basado en su estructura secundaria (Sedat et al, 1967) y se relaciona a la proporción de regiones de cadena sencilla en el DNA. Se esta manera ha sido posible separar la forma replicativa del DNA del fago-lambda que se une fuertemente a la resina (Kiger et al, 1969).

La afinidad de la resina a la cadena sencilla de DNA - está influenciada por el número de oligonucleótidos. - Así el tamaño de la cadena sencilla puede ser estimado ya que la elusión de estas regiones que estan fuertemente unidas a la resina está en relación con la concentración del solvente utilizado para su elusión (Iyer y - - Rupp, 1971). El tipo de cadena unido a la resina también puede ser identificado por su sensibilidad a nucleasas específicas para cadena sencilla de DNA (Karran et al, 1977).

Los solventes más utilizados para llevar a cabo el desprendimiento de la cadena sencilla de la resina son: cafeína, etanol y formamida, obteniéndose con éstos un rendimiento diferente de elusión, siendo la formamida la - mas apropiada por su fácil manejo y rendimiento; su - - efecto principal es el de solvatar preferencialmente bases no apareadas del DNA.

La metodología de la cromatografía en BND-celulosa requiere que el DNA se encuentre fraccionado; este rompimiento se provoca por pasajes sucesivos a través de una

aguja No. 20. Conforme se fracciona más el DNA, es posible distinguir más fácil cualquier región de DNA y se aumenta la proporción de DNA que es eluida de la resina con NaCl 1M más formamida (Pyeritz et al, 1972). El rompimiento del DNA depende de la temperatura, pH, diámetro de la aguja y fuerza iónica. A pH neutro y con una fuerza iónica de 0.3 M de NaCl, el desgarramiento que se produce en las moléculas de DNA es mínimo, obteniéndose fragmentos de 2×10^7 de peso molecular (Strauss, 1981).

Esta técnica es adaptable a un gran número de muestras, las columnas son fácilmente preparadas y corridas; no es necesario el uso del colector de fracciones; permite el fraccionamiento del DNA de cadena doble y sencilla y es posible conocer la proporción de reparación, cuando no se ha iniciado o se inhibe la síntesis replicativa. Es posible utilizar una mínima cantidades de pequeñas muestras, aproximadamente 50 μ g de DNA o menos, en cada corrida y la capacidad de unión de 0.7 g de resina es de 1mg de DNA de esperma de salmón, con una eficiencia del 100% (Strauss, 1981).

2.7 ANTECEDENTES INMEDIATOS

Miranda Ham, L. (1984) reportó que durante la pérdida de viabilidad de los ejes embrionarios de maíz, se presentaba una fragmentación del DNA, existiendo semejanza en cuanto a la falta de integridad del material genético entre ejes embrionarios de semillas de baja viabilidad y ejes embrionarios de semillas dañadas por luz U.V. Demostró también que hay un incremento en la síntesis temprana de DNA en ejes embrionarios de baja viabilidad y en los tratados con luz U.V. Por lo anterior se sugirió que antes de que dé inicio la replicación del DNA -

en estos ejes, debe de existir un proceso de tipo reparativo del DNA, durante las primeras horas de germinación.

La evidencia experimental de Vázquez y López (1986) apoyó esta sugerencia, al efectuar experimentos con nucleos aislados de ejes embrionarios de alta y baja viabilidad imbibidos por 3 y 15 horas. Inhibidores de la síntesis de DNA, como son la Novobiocina y ara-CTP, redujeron solo ligeramente la síntesis en los núcleos de 3 horas; sin embargo, este efecto inhibidor se incrementó notablemente en embriones incubados por 15 horas, bloqueando totalmente la síntesis de DNA.

Estos resultados sugirieron diferencias en los sistemas de síntesis de DNA durante periodos iniciales de imbibición de ejes embrionarios de maíz.

García Rendón (1985) reportó que el almacenamiento inapropiado de semillas de maíz en condiciones de alta temperatura y/o humedad, producían deterioro en las semillas de maíz, que se manifestaba en la disminución de viabilidad y capacidad de crecimiento de las mismas y parecía estar relacionada esta disminución de viabilidad con la integridad del DNA y la capacidad de su síntesis. El deterioro provocado por estos tratamientos se reflejó también en una incapacidad de sintetizar RNA y proteínas en las primeras 15 horas de germinación - (Muro, R.M., 1986).

Con estos antecedentes se tenía ya indicio que al provocar un daño en el material genético de maíz, disminuía la viabilidad de las semillas, así como la integridad del DNA y se incrementaba una síntesis temprana de DNA, antes de dar inicio a lo que debe - - -

ría ser la síntesis replicativa. Por lo tanto, este trabajo se dirigió a distinguir y caracterizar los tipos de síntesis de DNA que ocurren durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, tanto en semillas de alta viabilidad como en aquellas que han sufrido daño en su material genético y cuya viabilidad se ve reducida.

Aunado a estos antecedentes se tenían las evidencias experimentales que existen en relación al efecto que tienen ciertos fitoreguladores durante la germinación, como lo son el ABA y BA. Ya que el ABA se ha caracterizado como inhibidor de crecimiento y síntesis de ácidos nucleicos (Van Overbeck et al, 1967) y a las citoquininas como promotores de la germinación y de la síntesis de DNA (Van Staden, 1983; Koehler et al, 1982; Galli, 1984), se probó su efecto sobre los diferentes tipos de síntesis de DNA que ocurren durante la germinación temprana en este sistema.

H I P O T E S I S

Se propone como hipótesis de trabajo, la existencia de una síntesis reparativa de DNA, durante el proceso de la germinación temprana en semillas de maíz, y que ésta - se ve influenciada por la aplicación exógena de fito - rreguladores a ejes embrionarios de maíz.

O B J E T I V O

Se proponen como objetivos de este trabajo:

- Estudiar los posibles tipos de síntesis de DNA durante las primeras horas de la germinación (0-15 h) de ejes embrionarios de maíz de: a) alta viabilidad y b) de - baja viabilidad, radiados con rayos gamma).

- Detectar el posible efecto de los fitoreguladores sobre la síntesis temprana de DNA, durante las primeras horas de la germinación.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

5.1.1 QUIMICOS.

BND-celulosa (Benzoilato naftoilato DEAE-celulosa), -
proteínasa K-tipoXL, cloranfenicol, ácido abscísico y
citocininas fueron compradas en Sigma Chemical Co., -
St Louis Missouri, USA. Tris (hidroximetil) metilamina
y formamida fueron compradas en Merck, México, D.F. --
Insta-Gel fue de Packard Instruments, Co. Illinois, USA
y desoxiadenosina (³H) fue de Amersham Bucks, U.K. To-
dos los reactivos fueron de grado analítico.

5.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

Zea mays (var. Chalqueño) fue amablemente provisto por
PRONASE, Productora Nacional de Semillas, Coyoacan, -
México, D.F. Con un porcentaje de germinación del 90%
Los ejes embrionarios fueron seleccionados manualmente
y si estos no eran usados inmediatamente, se mantenían
en refrigeración a 4°C en un desecador conteniendo -
CaCl₂.

5.2 METODOS

5.2.1 RADIACION DE EJES EMBRIONARIOS

Los ejes embrionarios contenidos en cajas Petri de plás-
tico fueron expuestos a radiación gamma proveniente de
una fuente de Cobalto de un irradiador Gamma Cell 200
(AECL), por un periodo de 120 minutos para alcanzar una
dosis máxima de radiación de 1000 Grays.

5.2.2 IMBIBICION DE EJES EMBRIONARIOS

Lotes de 10 ejes embrionarios fueron desinfectados con NaClO (0.5%) por 30 segundos y después fueron lavados exhaustivamente con agua desionizada estéril. El exceso de agua fue removido presionando los ejes embrionarios contra un papel Whatman No. 1 estéril. Las muestra de 10 ejes embrionarios fueron incubadas sobre un disco de papel Whatman No. 1 estéril, en pequeños frascos estériles tapados con, teniendo 120 μ l de solución amortiguadora de imbibición (SAI):

KCl (50mM), MgCl₂ (10mM), Tris/HCl (50mM) pH 7.6, sacrosa (2%) y cloranfenicol (10mg/ml). Las muestras se incubaron por diferentes periodos en un baño María (J. M. Ortiz) con temperatura regulada a 27°C.

Los ejes embrionarios fueron marcados con desoxiadenosina (³H) (10 μ Ci/ml, 24.3 Ci/mmol) desde el comienzo del periodo de incubación (0-10, 0-3, 0-15, 0-20, 0-25, 0-40 horas) o en forma de pulsos por los últimos 30 minutos del periodo de incubación de la siguiente manera: los ejes embrionarios fueron imbibidos en SAI y 30 minutos antes del término del periodo de incubación (0-1, 0-3, 0-15 horas) fueron secados contra un papel Whatman No.1 y puestos nuevamente sobre un disco de papel filtro con 100 μ l. de SAI conteniendo desoxiadenosina (³H) (50 μ Ci/ml, 24.3 Ci/mmol para experimentos de 0-15 horas - o (100 μ Ci/ml, 24.3Ci/mmol) para experimentos de 0-1, 0-3 horas y se dejaron incubar hasta el término del periodo experimental. Al concluir el periodo experimental los ejes embrionarios se lavaron con amortiguador NET pH 7.8 (0.3 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 μ M (tris/HCl) que contenían 40 μ g/ml de desoxiadenosina no radiactiva, sobre un filtro buchner.

5.2.3 PREPARACION DEL HOMOGENADO

En los ensayos se va a contar la incorporación total de desoxiadenosina (^3H) en el material insoluble en TCA, los ejes embrionarios se homogeneizaron a 4°C en un mortero con 1 ml de amortiguador de lisis pH 7.5 - (NaCl 0.15M, EDTA 0.1M y SDS 0.5%). Al homogenado se le agrego 1 ml de TCA 20% (que contenía $40\mu\text{g/ml}$ de de soxiadenosina no radiactiva) y se mantuvo en frio por 30-60 minutos. Para la medida de la toma total de magca se tomó una alicuota de $100\mu\text{l}$ (después que se agregó el TCA), fue puesta sobre un disco fibra de vidrio-Whatman GF/A (2.4 cm), este fue secado en el horno a -60°C por una hora y una vez secos se contaron en via--les que contenían 5ml de liquido de centelleo (1,4-bis (2-(5feniloxazolil) benceno (PCPOP) (0.1g), 2.5 difeniloxazol (PFC) (5.0 g) y Tolueno (1L), en un contador de centelleo Packard, Tri-Carb. El precipitado con TCA - fue filtrado al vacio a través de un disco de fibra de vidrio Whatman GF/A; lavado con TCA 5% (10 ml) y en se guida con etanol 96% (10 ml). El filtro se secó y se contó de la misma manera que en el caso anterior.

5.2.4 PREPARACION DE MUESTRAS PARA CROMATOGRAFIA.

En los experimentos de fraccionamiento a través de la columna de BND-celulosa, el homogenado fue preparado - como se describió antes, excepto que unicamente se le agregó 0.5 ml de amortiguador de lisis. A continuación se añadieron $15\mu\text{l}$ de una solución de 2mg/ml de Proteínas K y incubaron a 40°C por 2 horas en un baño María. Posteriormente, estos homogenados se resuspendieron en 2.5 ml de amortiguador NET pH 7.6 y se centrifugaron a 500rpm por 1 minuto en la centrífuga IEC centra 4 con el rotor IEC 221 para quitar restos tisulares.

Los sobrenadantes fueron pasados a través de una aguja No. 20, 6 veces, manteniéndolos en hilo, y luego separaron a través de la columna de BND-celulosa.

5.3 CROMATOGRAFIA EN BND-CELULOSA

La resina BND-celulosa y las columnas fueron preparadas como lo describió Vázquez y Osborne (1986). Las columnas fueron hechas con jeringas de plástico de 5-ml conteniendo 2 ml de resina y se lavaron con 20 ml de amortiguador A pH 7.8 (NaCl 0.3 M, EDTA 1 mM, tris/HCl 10 mM). Las muestras fueron puestas sobre las columnas lentamente y lavadas con 20 ml de amortiguador B (amortiguador A, pero contiene NaCl 1M en lugar de NaCl 0.3 M) y con 20 ml de amortiguadores C (amortiguador B más 50% de formamida). Se colectaron fracciones de 2 ml manualmente y a cada una se le agregó 0.1 ml de BSA (1%), posteriormente a las muestras se les agregó 1 ml de TCA (20% W/V). Las muestras permanecieron por 2 horas a 4°C, fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos en la centrífuga IEC CENTRA 4 con el rotor 1EC221, las pastillas se resuspendieron en 2 ml de PCA (10%). Ellas fueron calentadas a 70°C por 30 minutos, enfriadas sobre hielo y centrifugadas nuevamente a 3000 rpm por 5 minutos bajo las mismas condiciones. De cada uno de los sobrenadantes de las muestras se tomó 1 ml para combinarlo con 10 ml de líquido de centelleo para muestras acuosas Insta-Gel. Estas mezclas se agitaron vigorosamente y se contaron para radioactividad en un contador de centelleo. El sobrenadante restante se usó para determinar DNA por el método de Giles y Myers (1965).

5.4 PREPARACION DE FITORREGULADORES.

El ABA fue disuelto en 100µl de KOH 1M, se ajustó el pH a 5.5 con HCl 1 N, después se diluyó hasta obtener una concentración final de 10^{-3} M en amortiguador de fosfatos pH 5.5 o citratos pH 5.5, conteniendo KCl - (50 mM), $MgCl_2$ (10mM), sacarosa (2%) y clorafenicol - (10µg/ml). Todo se esteriliza a través de filtros Millipore.

Los ejes embrionarios sometidos a tratamientos con ABA fueron incubados en la solución anterior en sustitución de la SAI.

BA fue disuelta en HCl, 1N, ajustando, posteriormente el pH a 6.0 con 1% de NaOH (w/v). Esta solución se diluyó con H_2O hasta una concentración final de 10^{-3} M, y se esterilizó a través de filtros Millipore. Los ejes embrionarios tratados con BA fueron incubados en SAI.

5.5 INHIBICION DE EJES EMBRIONARIOS EN CAJAS DE PETRI.

Ejes embrionarios estériles fueron colocados en cajas de Petri con discos de papel Whatman No. 3 estéril con teniendo 1ml de SAI con o sin fitorreguladores. Se in cubaron a 27°C en una incubadora con luz (Freas 818, Precision Scientific Company), por diferentes periodos. Las muestras conteniendo ABA se incubaron en la obscuridad.

5.6 OPTIMIZACION DE LA METODOLOGIA.

La resina BMD-celulosa se ha utilizado en estudios -

sobre la reparación de DNA en células humanas (Scudiero et al, 1975; Strauss, 1981) y también para analizar el DNA sintetizado durante la germinación temprana en centeno (Vázquez y Osborne (1986).

La característica esencial de esta resina es la de distinguir entre DNA de cadena sencilla y cadena doble; - en experimentos utilizando pulsos de marca radiactiva, la cadena sencilla se ha tomado como proveniente de - fragmentos de Okazaki y es eluida con NaCl 1M más 50% de formamida y la cadena doble de DNA marcada radioac-tivamente, como proveniente de un proceso reparativo y es eluida con NaCl 1M.

Para comprobar el buen funcionamiento de la BND-celulosa, se usó DNA de esperma de salmón (Sigma) en forma nativa y desnaturalizada por calor. Ambos fueron cargados por separado sobre columnas de BND-celulosa. Del DNA nativo se recuperó un 80% del inicialmente cargado, como se pu-do comprobar por el ensayo de difenilamina para cuantifi-cación de DNA: de éste un 77% se eluyó con NaCl 1M, de-mostrándose que éste DNA se encuentra en su mayor parte como doble cadena. Del DNA desnaturalizado se recuperó un 91% del total cargado y de éste se eluyó un 78% con NaCl 1M más 50% de formamida o regiones de DNA de cade-na sencilla, como se esperaba y solo un 13% se encontró como DNA de cadena sencilla.

Al iniciar los estudios utilizando el DNA proveniente de los ejes embrionarios de maíz se presentaron 2 difi-cultades metodológicas: a) El homogenado de los ejes de maíz tapaban la columna y b) el marcaje con timidi-na radiactiva era muy débil aún a altas concentraciones. La forma como se resolvieron estos problemas se descri-be a continuación.

5.6.1.1 PATRONES DE ELUSION DEL DNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

a) Al utilizar la resina BND-celulosa en nuestros estudios con DNA extraído de ejes embrionarios de maíz, se encontró que el homogenado que se cargaba en la columna contenía demasiados restos tisulares, que no permitían el buen funcionamiento de la columna, haciendo la elusión del DNA excesivamente lenta, hasta interrumpirse por completo.

Tratando de resolver este problema se probaron dos alternativas; la primera de ellas, fue trabajar únicamente con regiones meristemáticas de los ejes embrionarios, a las cuales se les marcaba durante los últimos 30 minutos con timida (^3H), para así reducir el contenido de restos tisulares en la muestra que se cargaba en la columna, y aumentar la actividad específica de la timidina (^3H) en las regiones meristemáticas. La segunda alternativa, fue hacer una centrifugación previa del homogenado de los ejes embrionarios completos antes de pasarlos por la columna.

El primer procedimiento nos llevó a obtener una serie muy variable de patrones de elusión de DNA, que no nos permitía sacar conclusiones del proceso fisiológico que ocurría en estos ejes.

Por el contrario, al centrifugar el homogenado de los ejes embrionarios completos por 1 minuto a 500 rpm, se eliminó gran parte de los restos tisulares, sin perder cantidades significativas de la marca incorporada al DNA y de esta manera se aseguró que la resina trabajará más rápido y eficientemente, permitien-

do una constancia en los patrones de elusión de DNA.

- b) En experimentos iniciales se utilizó como marca radiactiva timidina (^3H), ya que para ensayos de incorporación de marca en el DNA por tiempos largos - en ejes embrionarios de maíz da buen resultado. Sin embargo, cuando se marca con timidina (^3H) por tiempos cortos (30 minutos), la cantidad de marca incorporada es muy pequeña, aún utilizando concentraciones de marca de alrededor de ($100\mu\text{Ci/ml}$).

Para experimentos con la cromatografía en BND-celulosa se requirió de tiempos de marcaje cortos (pulsos de 30min) por lo que resultaba de poca utilidad este isótopo radiactivo.

En otros trabajos se reportó la utilización del isótopo desoxiadenosina (^3H) para efectuar estudios de la velocidad de síntesis de DNA, con mayor eficiencia de incorporación que con la timidina (^3H) (Strugala y Buchowicz, 1984); por lo anterior se decidió probar este marcador en estos estudios. El resultado fue un aumento de la cantidad de marca en el material precipitable con TCA de alrededor de 4 veces comparada con la marca incorporada usando timidina (^3H), cuando se incubaba por tiempos largos (20h) y aproximadamente 15-veces de aumento en la incorporación de marca durante tiempos muy cortos (10-30 min.), resolviendo así el problema de marcaje con timidina (^3H).

Después de resolver estos problemas metodológicos, - el siguiente paso fue obtener los patrones de elusión del DNA de ejes, imbibidos por diferentes tiempos, - utilizando para esto ejes radiados con rayos gama y ejes control (no radiados). Los tiempos de incubación

usados fueron 0-1, 0-3 y 0-15 horas, dando pulsos radiactivos durante los últimos 30 min del tiempo incubación respectivo.

RESULTADOS

6.1 PATRONES DE SINTESIS DE DNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ NO RADIADOS Y RADIADOS, INCUBADOS DE 0-1, 0-3 Y 0-15 H.

Durante la germinación temprana de ejes embrionarios de maíz, se pueden distinguir dos fases de síntesis de DNA, como se puede observar en la curva de síntesis de DNA, obtenida al incubar y marcar ejes embrionarios por diferentes periodos (fig 1). Se utilizó la cromatografía en BND-celulosa para definir la naturaleza de estas dos fases de síntesis de DNA.

Al marcar con desoxiadenosina (^3H) en los últimos 30 minutos del tiempo de imbibición de ejes embrionarios radiados e incubados por 0-3 horas (periodo pre-replicativo), y el homogenado de estos ejes fraccionado por la cromatografía en BND-celulosa, se obtuvo un patrón de síntesis de DNA donde la mayor parte de la marca incorporada en el DNA eluye con NaCl 1M y se representa por la relación $\frac{1M}{F} = 1.87 \pm 0.61$, donde 1 M es la cantidad de marca incorporada en el DNA eluido con NaCl 1M o DNA de cadena doble y F es la cantidad de marca incorporada en el DNA eluido con NaCl 1M más 50% de formamida o DNA de cadena sencilla, definiéndose claramente este patrón como de tipo reparativo (fig. 2A).

Un patrón de síntesis de DNA de tipo replicativo se obtuvo cuando se incubaron por 0-15 horas ejes embrio-

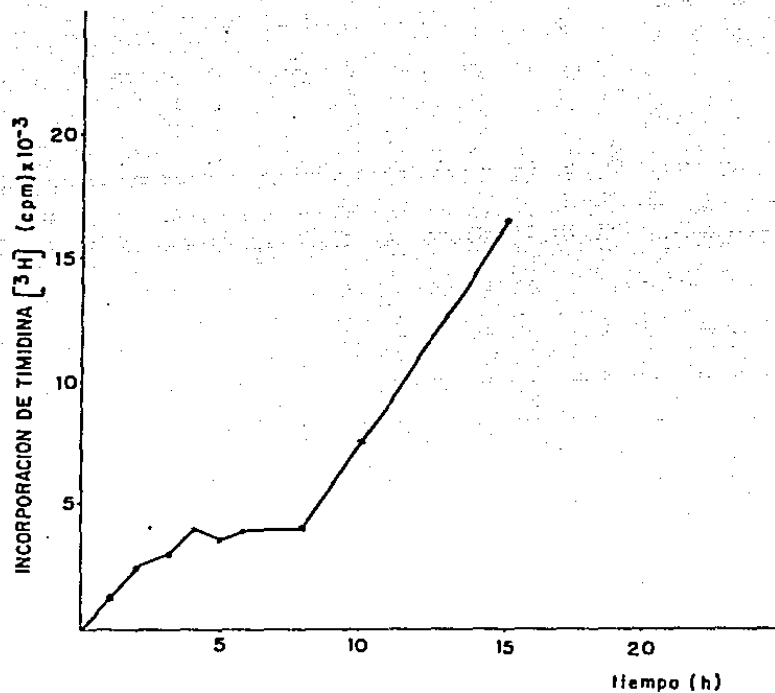


FIG. 1 Curva de síntesis de DNA de ejes embrionarios marcados en forma continua con desoxiadenosina ^3H - por los tiempos señalados

Fig. 2

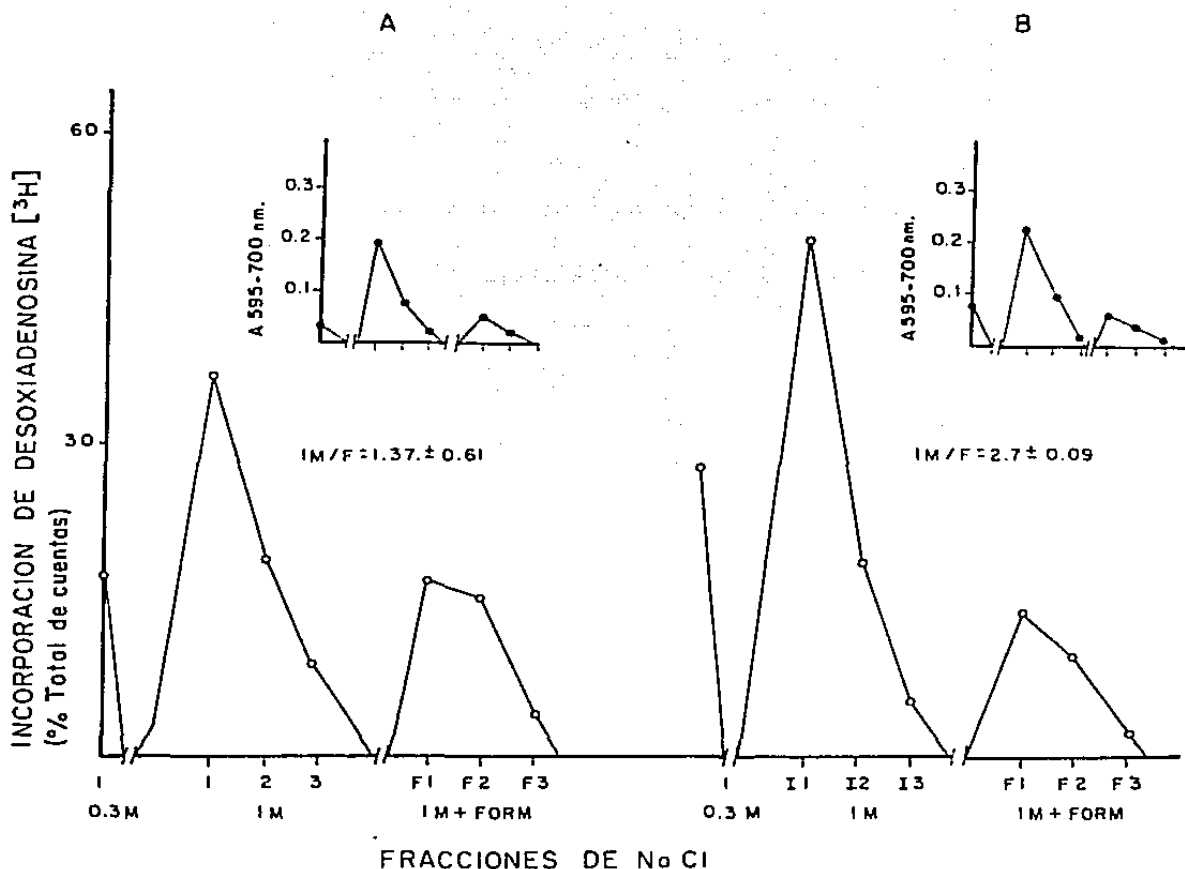


FIG. 2 Patrones de elusión del DNA de ejes embrionarios radiados, imbibidos por 0 - 3 horas, y el efecto de benzil adenina. Los ejes gamma radiados fueron imbibidos por 0 - 3 horas en ausencia (A) y en presencia (B) de benzil adenina ($1 \times 10^{-4}M$) y marcados con desoxiadenosina (3H) durante los últimos 30 min. del tiempo de imbibición. Promedio - del total de cuentas para A = 1 692 cpm y para B = 2 286. Los insertos representan la distribución de DNA medido por difenilamina.

narios de maíz, dando un pulso con desoxiadenosina (^3H) durante los últimos 30 minutos del tiempo de imbibición. Aquí la mayor parte de la marca se encontró en las fracciones eluidas con NaCl 1M más 50% de formamida o DNA de cadena sencilla, obteniéndose una relación de marca en doble cadena con respecto a cadena sencilla de DNA de $\frac{1\text{M}}{\text{F}} = 0.53 \pm 0.082$ (fig. 3A). Por otro lado el patrón de elusión de DNA de ejes embrionarios radiados incubados por 0-15 horas, mostró que la marca en las fracciones obtenidas de la cromatografía se redujo en un 90%, tanto en las eluidas con NaCl 1M como en las de NaCl 1M más 50% de formamida, sin poder definirse una síntesis predominante (fig. 3B). Este resultado indicó que el daño en los ejes embrionarios fue demasiado severo y que no se recuperaron al menos durante las primeras 15 horas.

Ahora bien, en los patrones de síntesis de DNA obtenidos de ejes embrionarios incubados 0-1 y 0-3 horas (periodo pre-replicativo), la cantidad de marca que eluyó con NaCl 1M y la cantidad de marca que eluyó con NaCl 1M más 50% de formamida fue muy parecida, no pudiendo definirse un tipo de síntesis predominante (fig. 4A y B).

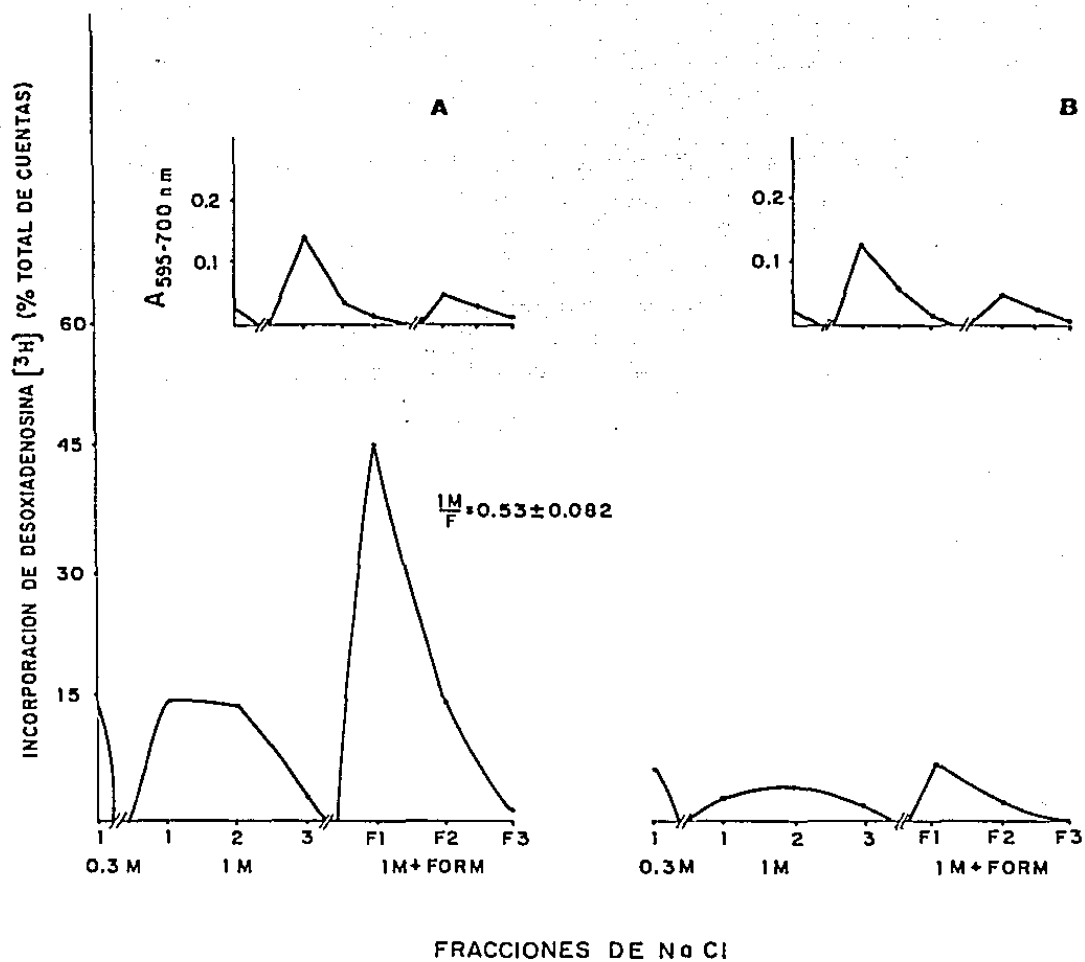


FIG. 3 Patrones de elusión del DNA de ejes embrionarios no radiados (A) e radiados (B) incubados por 0-15 h., y marcados durante los últimos 30 minutos con desoxiadenosina (^3H). Promedio del total de cuentas fué A= 16309 cpm y B= 1756 cpm. Los insertsos representan la distribución del DNA medido por difenilamina.

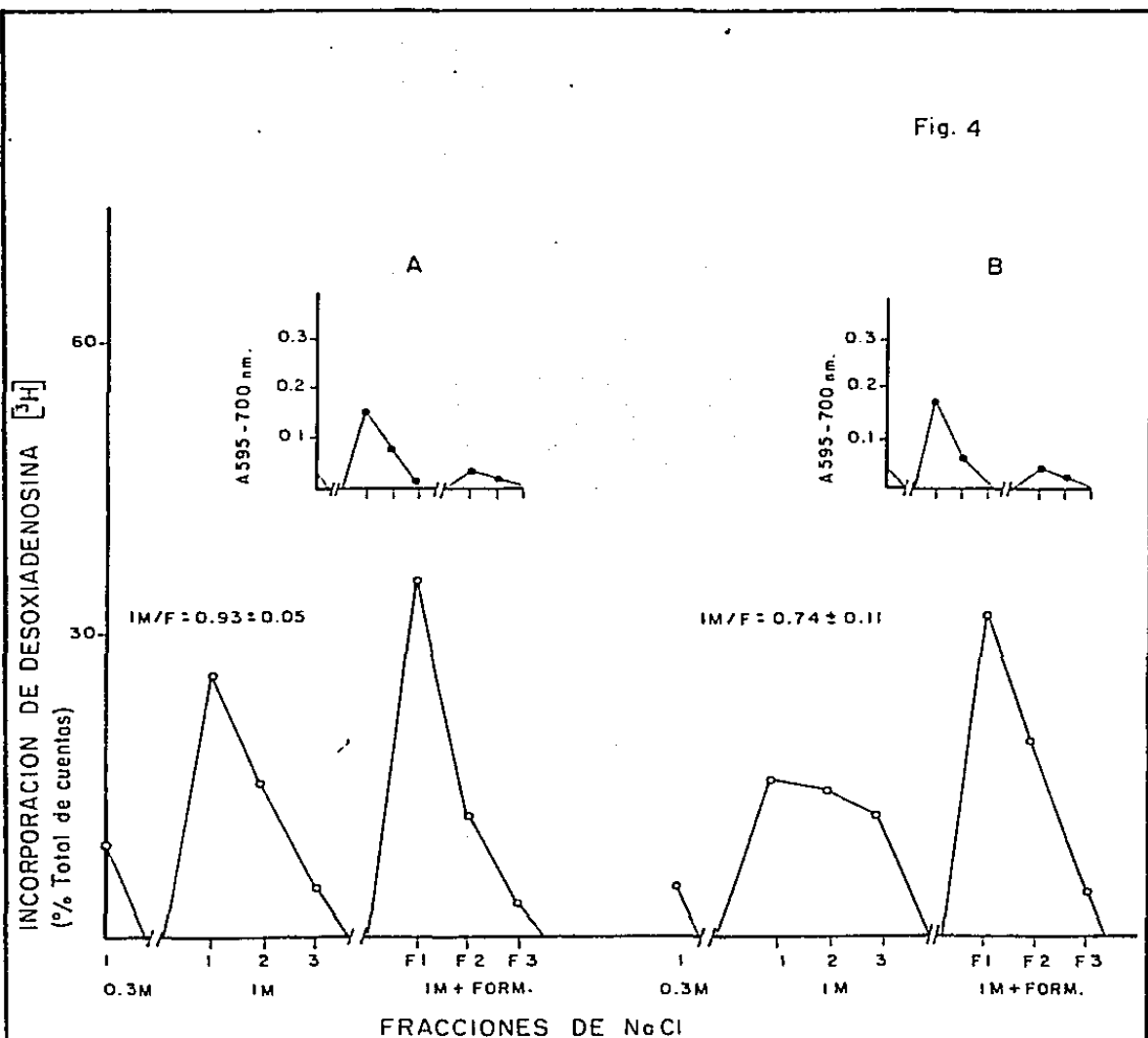


FIG. 4 Patrones de elusión del DNA de ejes embrionarios imbibidos por 0 - 1 (A) y 0 - 3 (B) horas. Marcados con desoxiadenosina ^3H durante los últimos 30 minutos del tiempo de incubación. Promedio del total de cuentas para A = 3, 213 y B = 1 259 cpm. Los insertos representan la distribución del DNA medido por difenilamina.

6.2 EFECTO DE ABA Y BA EN LA GERMINACION DE EJES - EMBRIONARIOS DE MAIZ.

Se ha reportado al ácido abscísico (ABA) como un inhibidor de germinación, crecimiento y de síntesis de DNA (Warring, 1965; Van Overbeck et al, 1967) y a la benziladenina (BA) como un promotor de la germinación y estimulador de la síntesis de DNA (Van Standen, 1983; Van Overbeck et al, 1967; Albanell, 1985). Se probaron los efectos de estos fitorreguladores, ABA y BA, sobre la germinación de ejes embrionarios de maíz que han sufrido daño en su material genético por radiación gama o en aquellos a los que no se les ha sometido a este tratamiento. Se encontró que BA estimuló la germinación de ejes embrionarios radiados y no radiados incubados por 48 horas, al menos 3-4 veces (figura 5). Siendo más notable este efecto sobre los ejes radiados. ABA por el contrario inhibió totalmente la germinación de ejes embrionarios de maíz incubados por 48 horas.

Asimismo se quiso ver el papel de estos fitorreguladores, ABA y BA sobre la síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz incubados por diferentes tiempos.

6.3 EFECTO DE ABA Y BA SOBRE LA SINTESIS DE DNA EN EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

Al incubar con ABA ejes embrionarios de maíz, imbibidos por 0-3 horas, se encontró que este fitorregulador no tuvo efecto sobre la síntesis pre-replicativa de DNA que ocurre durante este tiempo de incubación, siendo este resultado congruente con lo reportado para centeno (Vázquez y Osborne, 1986). Sin embargo - ABA inhibió aproximadamente en un 50% la síntesis de DNA de ejes embrionarios incubados por mas de 15 ho-

A

B

FIG. 5 Efecto de los fitorreguladores en la germinación.

(A). Estimulación de la germinación de ejes embrionarios tratados con BA e incubados por 48 h. y el efecto inhibitorio de ABA.

(B). Estimulación de la germinación de ejes embrionarios radiados tratados con BA e incubados por 48 h.

ras (tiempos replicativos del DNA) (Baiza et al, 1986) (tabla 1).

Con BA, el resultado que se obtuvo fue propiciar una estimulación de la síntesis de DNA de ejes embrionarios radiados y no radiados incubados por 0-3, 0-15, 0-20 horas. Sobre todo en ejes radiados incubados por 0-3 horas se obtuvo un drástico incremento en la incorporación de marca al DNA de más del 100% (ver tabla 1). Estos incrementos no fueron debidos a cambios en las capacidades de entrada de la marca, ya que la relación incorporación/toma no difirió significativamente en presencia y ausencia de BA.

Ya que el efecto de BA fue el de estimular la síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz, se probó su efecto sobre los patrones de síntesis de DNA de ejes embrionarios radiados y no radiados incubados por 0-3 horas, para definir que tipo de síntesis estimula BA, preferencialmente en estos ejes.

6.4 EFECTO DE BA SOBRE LOS PATRONES DE SINTESIS DE DNA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ RADIADOS Y NO RADIADOS INCUBADOS POR 0-3 HORAS.

BA incrementó al proporción de marca que eluye como DNA de doble cadena o proveniente de un proceso reparativo, del patrón de elusión de ejes radiados incubados por 0-3 horas. Si se compara la relación de marca eluida de ejes radiados, $\frac{M}{F} = 1.87 \pm 0.61$ contra la obtenida cuando estos ejes se incuban con BA, 2.79 ± 0.69 , se puede sugerir que la acción de BA fue estimular un tipo de síntesis reparativa de DNA (figura 2).

EFECTO DE FITORREGULADORES SOBRE LA SINTESIS DE DNA.

| EJES EMBRIONARIOS | TIEMPO DE IMBIBICION | INCORPORACION % | BENZILADENINA 10^{-4} M % de aumento | ACIDO ABSCISICO 10^{-3} M % inhibición |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|--|---|
| - Control no-rad. | 3H | 100 % | | |
| - no-rad. c/(fitorregulador) | 3H | | 11 % | 0.0% |
| - Control no-rad. | 20H | 100 % | | |
| - no-rad. c/(fitorregulador) | 20H | | 25 % | nd |
| - Control no-rad. | 25H | 100 % | | |
| - no-rad. c/(fitorregulador) | 25H | | nd | 48% |
| - Control no-rad. | 40H | 100 % | | |
| - no-rad. c/(fitorregulador) | 40H | | nd | 56% |
| - Control rad. | 3H | 100 % | | |
| - Rad. c/(fitorregulador) | 3H | | 136 % | 0.0% |
| - Control rad. | 15H | 100 % | | |
| - Rad c/(fitorregulador) | 15H | | 45 % | nd |

TABLA 1 Incorporación de desoxiadenosina (3 H) en ejes embrionarios (no- radiados e radiados), imbibidos por 0-3, 0-15, 0-20, 0-25, 0-40 horas en presencia y ausencia de benziladenina o ácido abscísico.

Como BA probablemente estimuló la síntesis reparativa de DNA en ejes embrionarios irradiados, se esperaba que BA pudiera ayudar a definir más claramente la presencia de una síntesis reparativa en el patrón de ejes embrionarios no radiados incubados por 0-3 horas.

La figura 6 muestra que efectivamente BA provocó un cambio en el patrón de elusión de DNA marcado de la cromatografía en BND-celulosa. Eluyó más marca en las fracciones que corresponden a DNA de doble cadena con respecto al de cadena sencilla; sugiriendo estos resultados que en presencia de BA la síntesis reparativa es el tipo de síntesis preferencial que ocurre en estos ejes embrionarios.

Para descartar la posibilidad de que el tipo de síntesis que se estuviera captando en estos patrones proviniera de una síntesis replicativa muy rápida, no distinguible con 30 minutos de pulso radiactivo, se aplicaron pulsos por tiempos más cortos: 10, 20, 30 minutos. El resultado mostró que solo patrones de tipo reparativo, los cuales se obtenían independientemente del tiempo marcaje (figura 7).

Fig. 6

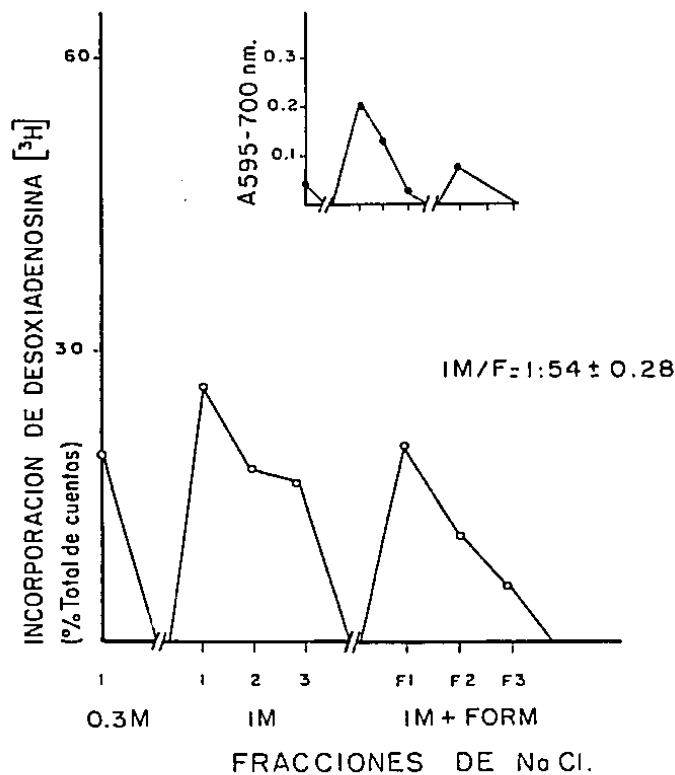


FIG. 6 Patrón de elusión del DNA ejes embrionarios imbibidos por 0 - 3 horas, tratados con benzil-adenina y marcados con desoxiadenosina (³H) durante los últimos 30 minutos. Promedio del total de cuentas igual a 1378 cpm. Los insertos representan la distribución del DNA medida por difenilamina.

Fig. 7

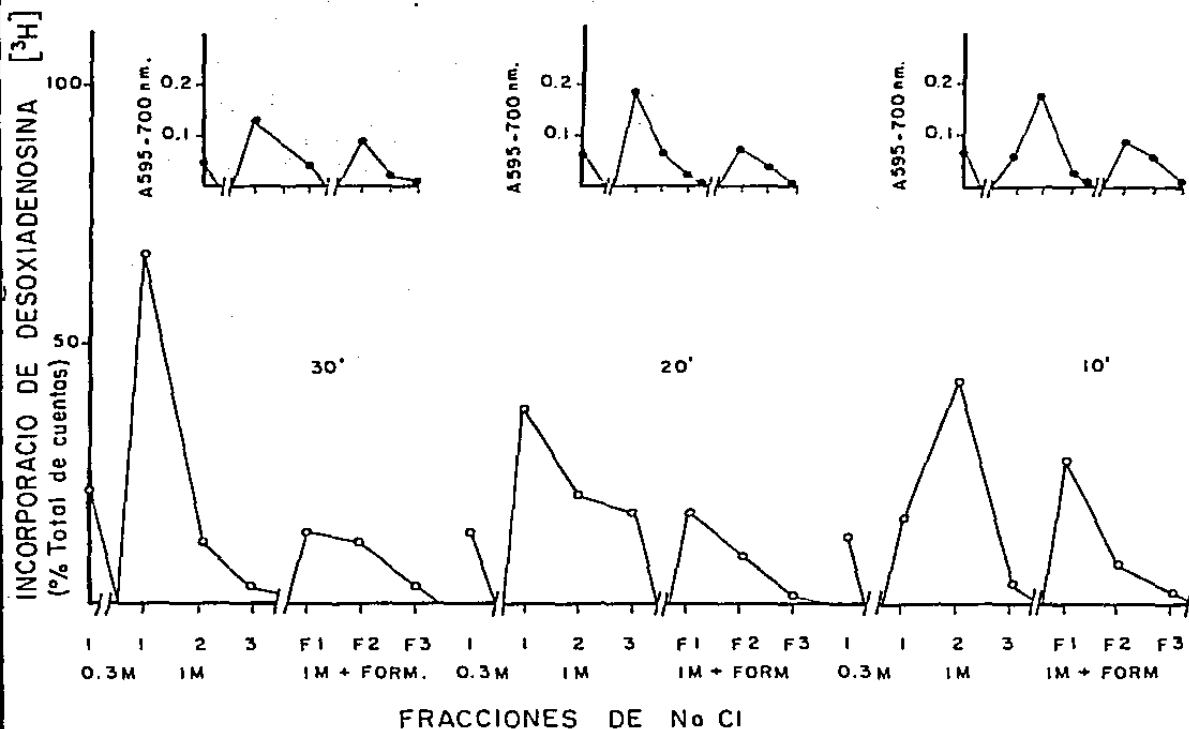


FIG. 7 Patrones de elusión del DNA de ejes embrionarios imbibidos por 0 - 3 horas y tratados con benzil adenina y marcados durante los últimos 30, 20 y 10 minutos. Los insertos representan la distribución del DNA medido por difenilamina.

D I S C U S I O N

En este trabajo se examinaron los diferentes patrones de elusión de DNA marcado obtenidos de la cromatografía en BND-celulosa.

La metodología utilizada nos proporcionó una serie de relaciones de marca incorporada tanto en el DNA de cadena doble, como en el DNA de cadena sencilla, que se discuten en función de la intensidad de incorporación en cada uno de los diferentes picos de DNA. Estos finalmente se interpretan como un tipo de síntesis preferencial.

Nuestros resultados nos muestran la existencia de 3-diferentes patrones de síntesis de DNA según la calidad de la semilla. El patrón de síntesis reparativa obtenido en las primeras horas de germinación de ejes embrionarios que se les ha sometido a un tratamiento (irradiación gama) con el cual se están induciendo alteraciones en las moléculas de DNA, indica que en el sistema biológico (ejes embrionarios) se están activando mecanismos de reparación para recuperar la integridad del DNA. Esta reparación, o llenado de huecos producto del daño producido por la irradiación gama, se manifiesta como una alta incorporación de marca en el eluido de DNA de doble cadena (fig 2). - Estos mecanismos deben estar presentes en todo momento en las semillas, manifestándose más intensamente en aquellas a las que se les ha sometido a tratamientos donde se lesiona el material genético. Así también, el DNA esté expuesto a sufrir en una alta proporción una serie de lesiones espontáneas que deben ser reparadas eficientemente, ya que de su capacidad de reparación depende la estabilidad genética de la

semilla que eventualmente será plántula.

Sin embargo, no se puede distinguir claramente la existencia de una síntesis reparativa en nuestro sistema de ejes embrionarios de maíz no radiados, incubados por 0-3 horas. Mas bien, la relación de marca obtenida pareciera indicar que ésta obedece a una síntesis replicativa durante periodos pre-replicativos del DNA nuclear.

Debido a que las divisiones celulares durante la germinación de ejes embrionarios de maíz se inician en forma irregular, existe la posibilidad de que parte de esta síntesis temprana encontrada en ejes embrionarios incubados por 0-3 horas, represente una síntesis replicativa de células desfasadas en ciclo celular o, represente una síntesis organelar temprana. Si bien el tejido embrionario de maíz es asincrónico para dividirse, la posible síntesis replicativa que hubiere sería sensible a la inhibición provocada por ABA y esta no se presenta según los resultados obtenidos con este fitoregulador en tiempos pre-replicativos del DNA (ver tabla 1). La síntesis organelar puede ser cuantificada por el uso de inhibidores específicos de síntesis de DNA organelar (Meyer y Simpson 1969) o bien efectuando experimentos de autorradiografía. Sin embargo, la manera experimental como se abordó esta posibilidad fue efectuando una cinética de pulsos de marca, suficientemente cortos para detectar una síntesis replicativa rápida (se discutirá más adelante).

También este patrón de síntesis no definido, pudiera deberse a una amplificación génica, de parte del genoma que van a ser utilizados durante etapas tem-

pranas de la germinación, o a una multiplicación e inserción de elementos transponibles (transpones), sin embargo si esto fuera así, esta síntesis nuclear se ría sensible a ABA. Por último podría deberse a un artefacto de la técnica, donde pequeños fragmentos de DNA de cadena sencilla unidos a una región de doble cadena de DNA posiblemente reparado provoquen - que esta marca en el DNA se manifieste como marca en el DNA de cadena sencilla. Cualquiera de estas posi bilidades, está enmascarando la proporción de síntesis reparativa que pu diera estar presente y por esta metodología no podemos detectarla como tal.

La síntesis replicativa en ejes embrionarios parece comenzar alrededor de las 12-15 horas después (Vázquez y López, 1986) y las primeras mitosis se observan 3-5 horas después (Baiza et al, 1986). En los patrones de elusión de ejes embrionarios incubados por 15 horas efectivamente encontramos un patrón de síntesis replicativa. Sin embargo, si los ejes embrionarios son radiados e incubados por el mismo periodo esta síntesis no ocurre, posiblemente porque la semilla no ha acabado de recuperarse del daño pro ducido por la radiación gama y por lo tanto no se ha dado inicio a la síntesis replicativa y eventos pos teriores.

Es interesante analizar el efecto que tiene BA sobre ejes radiados. Este fitorregulador promueve la germinación hasta en 3-4 veces, cuando los ejes radia dos han sido incubados en presencia de BA por 48 ho ras; así también promueve un incremento en la sínte sis de DNA, encontrándose una mayor incorporación de marca en ejes embrionarios durante tiempos tempranos. Lo anterior sugiere que estos periodos son los mas

propicios para manifestar el efecto que produce - BA y que la recuperación en la capacidad germinativa depende en mucho de que ocurra en forma correcta.

Otro fitorregulador, ABA, fue de gran utilidad ya que ayudó a definir y diferenciar los distintos - estados metabólicos del DNA. La síntesis replicativa en ejes embrionarios de maíz es inhibida por ABA, mientras tanto la síntesis observada en ejes embrionarios incubados por 0-3 horas, no se vio inhibida por el fitorregulador. Este resultado es similar al reportado para centeno (Vázquez y Osborne, (1986). Este hecho puede interpretarse en relación a las posibilidades mencionadas antes de que parte de esta síntesis represente una síntesis organelar, encubriendo la síntesis reparativa, no sensible a ABA.

Los resultados con estos fitorreguladores corroboran que los mecanismos de acción biológica del ABA y BA pueden estar relacionados directa o indirectamente con la bioquímica de la síntesis del DNA.

Es importante resaltar el hecho de que el patrón- de síntesis de ejes no radiados incubados por 0-3 horas, según la cromatografía en BND-celulosa, donde no podíamos definir claramente una síntesis predominante, puede ser drásticamente modificado por la adición de BA. Ahora más marca eluye como DNA de doble cadena (síntesis reparativa), independientemente que se apliquen pulsos de marca por 10, 20 ó 30 minutos, desechando así la posibilidad de que la síntesis promovida en estos ejes embrionarios, tratados con BA, represente una síntesis organelar.

Si bien se ha reportado a BA como un estimulador - de una síntesis temprana de DNA (Galli, 1984), no se ha dado indicio de la naturaleza de esta síntesis. Los resultados descritos anteriormente sugieren fuertemente que BA no solamente promueve un incremento en la síntesis de DNA, sino principalmente un tipo de síntesis reparativa. Esta sugerencia también está apoyada por el resultado que se obtuvo con este fitorregulador sobre el patrón de DNA-marcado obtenido de ejes gamma radiados, en el cual el patrón de tipo reparativo se favorece y se incrementa notablemente con BA.

Con estas evidencias podemos especular sobre el mecanismo de acción de estimuladores de la germina--ción, como lo son las citocininas (BA). Inicialmente se había pensado que estos actuaban en procesos tales como la división celular. Según nuestros resultados pareciera que también actúa de manera muy importante sobre todo ^{los} eventos anteriores a que de inicio la división celular.

Sugerimos que la acción de BA sobre semillas, donde su DNA ha sido roto o alterado, es acelerar de alguna manera el proceso normal de reparación, así - que las etapas siguientes en la secuencia de eventos pueden efectuarse y con esto la germinación pueda ocurrir. Esto no excluye la posibilidad de que BA estimule otros procesos metabólicos (por ejem.- oxidación de NADH por peroxidasas) concomitante -- con la síntesis reparativa de DNA, así que el efecto general sobre la germinación sea el resultado de muchos efectos estimulatorios a diferentes niveles.

CONCLUSIONES

Tres diferentes tipos de síntesis de DNA fueron - obtenidas usando la cromatografía en BND-celulosa, durante la imbibición de ejes embrionarios.

- Un patrón de tipo replicativo se obtuvo cuando ejes embrionarios de maíz se incubaron por 0-15 - horas.
- Un patrón de tipo reparativo se obtuvo cuando ejes embrionarios radiados se incubaron por 0-3- horas.
- Un tercer tipo de síntesis (no definida) se en contró cuando ejes embrionarios no radiados fueron incubados por 0-1 0 0-3 horas.
- BA estimuló la germinación y la síntesis de DNA de ejes embrionarios radiados y no radiados.
- ABA no tuvo efecto sobre la síntesis temprana - de DNA (0-3h), pero si inhibió la síntesis de DNA que se efectua en ejes incubados por más de 15 horas, y la germinación de ejes embrionarios incuba dos por 48 horas.
- BA estimuló el patrón de síntesis reparativo de ejes radiados, incubados por 0-3 horas y modificó bruscamente el patrón obtenido en ejes no radiados, e incubados por 0-3 horas, obteniéndose ahora un- patrón de tipo reparativo. Este patrón no se vio modificado aún cuando se aplicaron pulsos por 10, 20, 30 minutos.
- Se sugiere que una síntesis reparativa esté - presente durante la germinación temprana, antes que la replicación del DNA y la división celular se inicien.

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

- Addicott, F.T. (1972). Biochemical aspects of the action of abscisic acid, in: D.J. Carr (ED), Plant growth substances, 1970. Springer Verlag, Berlin, pp. 272-280.
- Addicott, F.T. and Lyon, J.L. (1969). Physiology of abscisic acid related substances. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 139-164.
- Albanell, E., Plaixats, J. and Andrés, J. (1985) Interaction of abscisic acid and 6 benzyl--aminopurine on the metabolism of Lemna minor. Plant Cell Physiol. 26, 1557-1564.
- Baiza, A., Aguilar, R. and Sánchez, E. (1986). - Histones and the first cell cycle in maize germination. Physiol. Plant, in press.
- Barlow, P.W. and Pilet, P.E. (1984). The effect of abscisic acid on the cell growth, cell division and DNA synthesis in the maize root meristem. Physiol. Plant 62, 125-132.
- Berjak, P. and Villers, T.A. (1972). Ageing in plant embryos. II Age induced damage and its repair during early germination, New Phytol. 71, 135-144.
- Berridge, M.V., Ralph, R.K. and Letham, D.S. - (1970). The binding of kinetin to plant - ribosomes. Biochem. J. 99, 75-84.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1978). Physiology and Biochemistry of seed in relation to - germination. VOL. 1, Development, Germination and growth, Springer Verlag, pp. 1-3, 7-13, 107, 115-117, 132-171.

- Brunk, C.F. and Hanawalt, F.C. (1967). Repair of damaged DNA in a eukaryotic cell: Tetrahymena pyriformis. Science 158, 663-664.
- Caldecott, R.S. and Smith., L. (1952). A study of X ray induced chromosomal aberration in barley. Cytologia (Japan) 17, 224-242.
- Castroviejo, M., Traraud, D., Mocquot, B. and Lituak, S. (1979). Factors affecting the onset of deoxyribonucleic acid synthesis during wheat embryo germination. Biochem. J. 181, 193-199.
- Chean, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978). DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. Nature 272, 593-599.
- Chen, C.M. and Leisner, S.M. (1985). Cytokinin-modulated gene expression in excised pumpkin cotyledons. Plant Physiol. 77, 99, 103.
- Chen, D. and Osborne, D.J. (1970). Ribosomal genes and DNA replication in germinating wheat embryos. Nature 225, 336-340.
- Ching, T.M. (1972). Metabolims of germinating seeds, in: T.T. Kozlowski (ed), Seed Biology, Vol 1, Academic Press, New York, pp.116-117.
- Cook, J.S. (1970). Photoreactivation in animal cells, in; A.C. Geise (ed), Photophysiology, vol. 3, Academic Press, New York, pp.191-233.
- Datta, K., Marsh, I. and Marcus, A. (1983). Early growth of wheat embrionic axes and the synthesis of RNA and DNA. Plant Phisiol. 72, 394-397.

- Davey, J.E. and Brown, N.A.C. (1982). Cytokinins in seed development and germination, in: - A.A. Khan (ed), The Physiology and Biochemistry of seed development, Dormancy and Germination, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 137-156.
- De Vries, H. (1901) Die mutations theorie Vol 1, Vertand Co.
- El-Metainy, a., Takagi, M. Tano, S. and Yamaguchi, A. (1971). Radiation induced single strand - break in the DNA of dormant barley seeds, Mutation Res. 13, 327-344.
- Galli, M.G. (1984). Synthesis of DNA in excised - watermelon cotyledons grown in water and - - benzyl-adenine. Planta 160, 193-199.
- García, R.M. (1985). Relación entre viabilidad de germinación y síntesis de ADN en embriones de maíz. Tesis de licenciatura. Fac. Química UNAM.
- Giles, K.W. and Myers, A. (1985). An improved - diphenyl amine method for the estimation of DNA. Nature (lond) 206, 93.
- Gringgs, H.G. and Bender, M.A. (1973). Photoreactivation of ultraviolet induced chromosomal aberrations. Science, (New York) 179, 86-88
- Hamaguchi, N., Iwamura, H. and Fujita, T. (1985). Fluorescent anticytokinins as a probe for - binding. Isolation of cytokinins binding proteins from the soluble fraction and identification of cytokinin binding site on ribosomes of tobacco callus cells. Eur. J. Biochem. - 153, 565-572.

- Harvey, B.M.R., Lu, E.C. and Fletcher, R.A. (1974) Benzyl adenine accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons. *Can. J. - Bot.* 52, 2581-2586.
- Horgan, R. (1984). Cytokinins, in: M.B. Willkins (ed), *Advanced plant physiology*, Pitman Pres, Bath, London, pp. 53-75.
- Iyer, V.N. and Rupp, W.D. (1971). Usefulness of benzoylated naphthoylated DEAE-cellulose to distinguish and fractionate double-stranded DNA bearing different extent of single stranded regions. *Biophys. Acta* 228, 117-126.
- Karran, R., Higgins, W.P. and Strauss, B. (1977) Intermediates in excision repair by human cells: use of S₁ nuclease and benzoylated naphthoylated cellulose to reveal single strand breaks. *Biochemistry* 15, 4483-4490.
- Khan, A.A. (1967). Antagonisms between cytokinins and germination inhibitors. *Nature* 216, 166-167
- Khan, A.A. (1971), Cytokinins: Permissive role in seed germination. *Science* 171, 853-859.
- Khan, A.A. and Heit, C.E. (1969). Selective effect of hormones on nucleic acid metabolism during germination of pear embryos. *Biochem. J.* - 113, 707-712.
- King, J.A. and Sinsheimer, R.L. (1969). Vegetative lambda DNA. IV. Fractionation of replicating lambda DNA on benzoylated naphthoylated DEAE-cellulose. *J. Mol. Biol.* 40, 467-490

- Köhler, K.H., Müller, V., Hecker, M. and Bernhardt, D. (1982). Synthesis of proteins, RNA and DNA in dormant and after ripened Caryophyllaceae seeds. Biol. Plant (Praha). 24, 354-362.
- Lindahl, T. (1982). DNA repair enzymes. Ann.Rev. Biochem. 51, 61-87.
- Lindahl, T. and Nyberg, B. (1972). Biochemistry - 11, 3610-3618.
- Longo, G.P., Pedrett, M., Rossi, G. and Longo, C.P. (1979). Effect of Benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. Planta 145, 209-217.
- Marcus, A., Feeley, J. and Volcani T. (1966). - Protein synthesis in imbibed seeds. 11. Kinetics of amino acid incorporation ribosome - activation and polysome formation. Plant - Physiol. 41, 1167-1172.
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1975). In: The Germination of seeds, Pergamon, Press, - pp. 21-26.
- Myer, R. and Simpson, M. (1969). DNA biosynthesis in mitochondria Biochem. Biophys Res. Com 34, 238-244.
- Miranda, H.L. (1984). Estudio sobre la síntesis de ADN en la germinación de embriones de - semillas de maíz. Tesis de Licenciatura. - Fac. Química. UNAM.

- Mory, Y.Y., Chen, D. and Sarid, S. (1972). Onset of deoxyribonucleic acids synthesis in germinating wheat embryos P. *Phxsiol* 49, 20-23.
- Muro, R.M. (1986). Efecto del deterioro de semillas sobre los sistemas de síntesis de proteínas en maíz. Tesis de licenciatura. Fac. Química UNAM.
- Natarajan, A.T., Darrouidi, F., Mullender, L.H.F. and Meijers, M. (1986). The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. *Mutation Res.* 160, 231-236.
- Navashin, M.S. (1933). Ageing of seeds is a cause of chromosome mutations. *Planta* 20, 233-243.
- Nichols, C. (1941). Spontaneous chromosome aberrations in Allium. *Genetics* 26, 89-100.
- Nishinari, N. and Syono, K. (1986). Induction of cell division synchrony and variation of cytokinin contents through the cell cycle in tobacco cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 27, 147-153.
- Osborne, D.J. (1962). Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in Xanthium leaves during senescence. *Plant Physiol.* 37, 595-602.
- Osborne, D.J. (1982). DNA integrity in plant embryo and the importance of DNA repair, in: *Embryonic Development, Part B, Cellular Aspect*, Liss, - New York, pp. 577-592.

- Osborne, D.J. (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61, 3568-3577.
- Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai, R. - - (1980/81). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (Secale cereale). *Isr. J. Bot.* 29, 259-272
- Osborne, D.J., Dell Aquila, A. and Elder, R.H. (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds, *Folia Biologica, Proc. FEBS Symposium on DNA, Spec. Publ.*, pp. 155-164.
- Painter, R.B. (1974). DNA damage and repair in eukaryotic cells. *Genetic* 78, 139-148.
- Patau, K., Das, N.K. and Skoog, F. (1957). Induction of DNA synthesis by kinetin and indol-acetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant* 10, 949-966.
- Prescott, D.M. (1976). The cell cycle and the control of cellular reproduction, in: E.W. Caspary (ed), *Advances in Genetics*, vol.18, Academic Press, New York, pp. 100-159.
- Roberts, E.H. (1972). Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability, in: E.H. Roberts (ed), *Viability of seeds*. Syracuse University Press, pp. 253-265.
- Roberts, E.H. and Osborne, D.J. (1973). Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The viability of transferase enzymes during senescence. *Biochem J.* 135, 405-410.

- Sánchez de J.E., Aguilar, R. and López, S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 99, 445-450.
- Scrivastana, B.I.S. (1968). Increase in chromatin associated nuclease activity of excised barley leaves during senescence and its suppression by kinetin. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 32, 533-538
- Scudiero, D. and Strauss, B. (1974). Accumulation of single stranded regions in DNA and the block to replication in a human cell line with methylmethane sulfonate. *J. Mol. Biol.* 83, 17-34
- Scudiero, D. Henderson, E., Norin, A. and Strauss, B. (1975). The measurement of chemically induced DNA repair synthesis in human cells by BND-cellulose chromatography. *Mutation Res.* 29, 473-488.
- Schrodinger, E. (1945). What is life? Cambridge, Eng: Cambridge University Press.
- Sedat, J.W., Kelly, R.B. and Sinsheimer, R.L. (1967). Fractionation of nucleic acid on Benzoylated Naphthoylated DEAE-cellulose. *J. Mol. Biol.* 26, 537-540.
- 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 L.) embryos. *Biochem. J.* 166, 33-38.

- Shaeffer, G.W. and Sharpe, F.T. Jr. (1969). Rea
lex of axillary bud inhibition with benzyla
denine in tobacco. Bot. Gaz. 130, 107-110.
- Soyfer, V.N. (1979). DNA damage and repair in higher
plants, in: J. Lett and H. Adler (eds), Advan
ces in radiation research, Academic Pres, --
New York, pp. 219-272.
- Soyfer, V.N. (1983). Influence of physiological
conditions on DNA repair and mutagenesis in
higher plants. Physiol. Plant 58, 373-380
- Soyfer, V.N. and Cieminis, K.G.K. (1974). Dark -
repair in higher plants, Dokl. Akad. Nauk.
USSR. 215, 1261-1264.
- Steward, G.R. and Smith, H. (1972). Effect of -
abscisic acid on nucleic acid synthesis and the
induction of nitrate reductase in Lemna poly-
rhiza. J. Exp. Bot. 23, 875-885.
- Strauss, B.S. (1977). Molecular Biology of the
response of cells to radiation and radiomime
tic chemicals. Cancer 40, 471-480.
- Strauss, B.S. (1981). Use of benzoylated naphtr^oy
lated DAE-cellulose, in: Errol, C. Friedberg
and P.C. Hanawalt (eds), DNA repair, A labo
ratory manual of research procedures, vol.1,
Part B, Dekker, New York, pp. 319-339.
- Stragula, K. and Buchwcz, J. (1984). The use of
³H Deoxy adenosine to measure the rate of
DNA synthesis in germinating wheat embryos.
Plant Science Letters 34, 17-23.

- Sussex, I., Clutter, M. and Walbot, V. (1975). Benzuladenine reversal of abscisic inhibition of growth and RNA synthesis in germinating bean axes. *Plant Physiol.* 56, 575-578.
- Tano, S. and Yamaguchi, H. (1977). Repair of radiation induced single strand breaks in DNA of barley embryo. *Mutation res.* 42, 71-78.
- Tener, G.M., Gillam, I., von Tigerstrom, M., Millward, S. and Wimmer, E. (1966). Purification of rRNA_s on Benzoylated DEAE-cellulose. *Fed. Proc.* 25, 519.
- Toole, H. (1924). The transformations and course of development of germinating maize. *Amer. Jour. Bot.* 1, 325-350.
- Van Standen, J. (1983). Seeds and cytokinins. *Physiol. Plant* 58, 340-346.
- Van Overbeek, J., Loeffler, J.E. and Mason, M.I.R. (1967). Dormin (abscisic acid), inhibitor of plant DNA synthesis. *Science* - 156, 1497-1499.
- Vázquez, J. y López, S. (1986). Inhibición in vitro de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por Novobiocina y ara-CTP. *Rev. Soc. Quim. Mex.*, en prensa.
- Vázquez, J. 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

- Veleminsky, J. and Gichner, J. (1978). DNA repair in mutagen higher plants. *Mutant Res.* 55, 71-84.
- Villiers, T.A. (1968). An autoradiographic study of the effect of the plant hormone abscisic acid on nucleic acid and protein metabolism. *Planta* 82, 342-354.
- Villiers, T.A. (1974). Seed aging: chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiol.* 53, - 875-878.
- Walton, D.C. (1980/81) Does ABA play a role in seed germination? *Israel J. Bot.* 29, 168-180.
- Walton, D.C., Soofi, G.S. and Sondheimer, E. - (1970). The effect of abscisic acid on growth and nucleic acid synthesis in excised embryonic bean axes. *Plant Physiol.* 45, 37-40.
- Wareing, P.F., Good, J. and Manuel, J. (1968)- Some possible physiological roles of abscisic acid, in: *Biochemistry and Physiology of Plant Growth substances*, Runge Press, DTd, Ottawa, pp. 1561-1579.
- Wolff, S. and Cleaver, J.E. (1973). Absence of DNA repair replication after chemical mutagen damage in Vicia faba. *Mutation res.* 20, 71-76.
- Yamaguchi, H., tataru, A. and Naito, T. (1975) Unscheduled DNA synthesis induced in barley

seed by gamma rays and 4-nitroquinoline 1
oxide. Japan J. Genetics 50, 307-318.

- Zwar, J.A. (1973). Effects of cytokinins on
the nucleic acid of tobacco pith. J. Exp.
Bot. 24, 701-710.

EFFECT OF BENZYL ADENINE ON THE DNA SYNTHESIS DURING
EARLY GERMINATION OF MAIZE EMBRYO AXES

MARTHA ZARAIN H., IRMA BERNAL-LUGO AND JORGE M.
VAZQUEZ-RAMOS¹

Departamento de Bioquímica Vegetal, DEPg, Facultad de
Química, Ciudad Universitaria, Av. Insurgentes Sur y
Copilco, 04510 México D.F., México.

¹ to whom correspondence should be addressed.

SUMMARY

The nature of the DNA synthesised during early maize germination has been investigated making use of BND-cellulose chromatography, defining early germination as the first three hours of imbibition; axes have been pulse-labelled for the last 30 min of the incubation period. The pattern of labelled DNA obtained for gamma-irradiated axes is typical of a repair-type synthesis whereas that of non-irradiated axes would be defined as a replicative-type synthesis except that it is insensitive to ABA. However, when benzyl adenine is added to these two types of tissues (irradiated and non-irradiated axes) from the beginning of the incubation period, the result is an increase in the label incorporated, enhancing the repair type pattern in irradiated axes but most important, switching the "replicative pattern" of non-irradiated axes to an unambiguous repair-type pattern. This occurs irrespective of whether the pulse-label is given 10, 20 or 30 min before the end of the incubation period. The role of benzyl adenine on early germination and repair synthesis is discussed.

INTRODUCTION

DNA replication is a process that begins relatively late during the germination of cereal seeds (Chen and Osborne, 1970; Clay et al, 1975; Osborne, 1982). However, there is a low but constant level of DNA synthesis starting soon after seed imbibition and continues until replicative synthesis takes place (Shattuck and Katterman, 1982; Osborne et al, 1980/81). The nature of this early DNA synthesis is still unknown although studies have been carried out trying to elucidate it.

The early DNA synthesis observed in gamma-irradiated rye embryos during the first hour of imbibition has been characterized as a repair type synthesis (Osborne et al, 1980/81; Osborne et al, 1984). However, the type of DNA synthesis occurring in non-irradiated one to two hours imbibed rye embryos is difficult to define due perhaps to the possibility that in this time some kind of replicative as well as repair type DNA synthesis might be taking place (Vázquez and Osborne, 1986).

DNA synthesis in nuclei of maize embryo axes imbibed for 0-3 hours (no cell division is taking place at this time, Ealiza et al, 1986) is more resistant to inhibitors of replicative synthesis than synthesis in nuclei just before cell division takes place (15 hours) (Vázquez and López, 1986). However, results obtained when inhibitors are used should be taken with caution since artifacts or side effects could be produced.

One way to avoid these side effects and to gain a better understanding on the type of synthesis that takes place during early germination of seeds is by using natural compounds that affect these processes such as plant growth regulators. For example, inhibition of DNA synthesis by ABA has been reported in bean embryonic axes, ash seed and in wheat grains (Van Staden, 1983; Khan, 1971; Davey and Brown, 1982).

ABA also inhibits the replicative type of DNA synthesis in rye (D.J. Osborne, personal communication) but it has no effect at all in the early DNA synthesis (Vázquez and Osborne, 1986). On the other hand, cytokinins seem to improve germination (Van Staden, 1983), to promote an early DNA synthesis in cotyledons of watermelon seeds (Galli, 1984) and to stimulate cell division in tobacco cells (Patau et al, 1957; Zwař, 1973).

In order to obtain further information on the nature of the DNA synthesis taking place early during maize germination we have studied the effect of ABA and cytokinins on this synthesis. Germination in maize embryo axes offers the advantage over other cereals to show a period of more than 8 hours before the replicative DNA synthesis begins. The results of our studies are reported in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals.

Benzoylated naphthoylated DEAE cellulose, Proteinase K-type XI, chloramphenicol, abscisic acid and cytokinin were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, USA. Tris (hydroxymethyl) methylamine and formaldehyde were from Merck, Mexico, D.F. Insta-Gel was from Packard Instruments Co., Illinois, USA and (³H) deoxyadenosine was from Amersham International, Amersham Bucks, U.K. All other reagents were of analytical grade.

Plant Material.

Zea mays (Var. Chalqueño) was kindly provided by Productora Nacional de Semillas (PRONASE), Coyoacan Mexico, D.F. It had a percentage germination of 90%. Maize embryo axes were hand selected and if not used immediately, were maintained in dessication over solid CaCl₂ at 4° C.

Irradiation of embryo axes.

Embryo axes in plastic petri dishes were exposed to gamma irradiation from a cobalt source in a Gamma Cell 200 (AECL) irradiator for a period of 120 min to achieve an irradiation dose of 1000 Grays.

Imbibition of embryo axes.

Axes (10 per sample) were surface sterilized with 0.5% NaClO by shaking for 30 seconds and then washing 4 times with 4 ml volumes of sterile water. Excess of water was removed by blotting the embryos against sterile Whatman

paper No. 1 and dried back by maintaining the embryos in the sterile hood for 30 min. They were then incubated at 27°C on a disc of sterile Whatman paper No. 1 with 120µl of imbibition buffer (IB): KCl (50mM), MgCl₂ (10mM), Tris/HCl (50mM) pH 7.6, sucrose (2%) and chloramphenicol (10µg/ml).

The embryo axes were labelled with (³H) deoxyadenosine either from the beginning of the incubation period (0-1 or 0-3 hours) (10µCi/ml, 24.3 Ci/mmol) or in pulses for the last 30 min of the incubation periods in the following way: embryo axes were imbibed in IB and 30 min before the end of the incubation period, they were blotted against Whatman paper No. 1, put on a new disc with 100 µl of IB containing (³H) deoxyadenosine (50µCi/ml, 24.3 Ci/mmol) and incubated until the end of the experimental period.

Preparation of homogenate.

When (³H) deoxyadenosine incorporation into TCA insoluble material was to be followed, embryo axes were homogenised at 4°C in a mortar and pestle with 1 ml of lysis buffer pH 7.5 (NaCl (0.15M) EDTA (0.1M) and SDS (0.5%). The homogenate received 1 ml of 20% TCA (containing 40µg/ml cold deoxyadenosine) and kept on ice for 30-60 min. To measure total uptake, 100 µl of the homogenate (before adding TCA) were taken and put onto a disc of Whatman GF/A (2.4 cm) dried and counted. The TCA precipitate was vacuum filtered through Whatman GF/A, washed with 5% TCA and 20% ethanol (10 ml each) dried and counted using 5 ml of

scintillation fluid.

For BND-cellulose fractionation, the homogenates were prepared as described before except that 0.5 ml of lysis buffer was used. These suspensions received 15 μ l of a solution of 2 mg/ml Proteinase K and were incubated at 40°C for 2 hours.

Homogenates were resuspended in 2.5 ml of buffer NET pH 7.8 (0.5 M NaCl, 0.1M EDTA, 10mM Tris/HCl), centrifuged at 500rpm for 1 min to get rid of cell debris and the supernatants sheared by passing 6 times through a 20G needle (on ice). The 500 rpm precipitate had little, if any, of the total uptake of radioactivity. At this point, these samples were ready to be loaded onto the columns.

BND-cellulose chromatography.

BND-cellulose and the columns were prepared as described in Vázquez and Osborne, (1986). Briefly, the columns contained approximately 2 ml of resin and were washed with 20 ml of buffer A pH 7.8 (0.3 M NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris/HCl). The samples were then loaded onto the columns, washed with 20 ml of buffer A and the DNA eluted by passing 20 ml of buffer B (buffer A but containing 1 M NaCl instead of 0.3 M NaCl) and 20 ml of buffer C (buffer B + 50% formamide). Fractions (2 ml) were collected and to each 50 μ g/ml BSA was added and then 1 ml of TCA (20% w/v). The samples were stored at 4°C for 2 hours, centrifuged at 3000 rpm for 15 min and the pellet resuspended in PCA(10%).

They were then heated at 80°C for 30 min, cooled on ice, centrifuged again at 3000 rpm for 5 min and 1 ml of each supernatant combined with 10 ml of Insta-Gel and counted for radioactivity. The remaining supernatant was used to determine DNA by the method of Giles and Myers (1965).

ABA was dissolved in phosphate buffer pH 5.7 at a concentration of 1×10^{-3} M; benzyl adenine was dissolved in HCl 0.001N pH 6.0 at a concentration of 1×10^{-4} M.

RESULTS

Each stage of imbibition of maize embryo axes shows its very particular pattern of labelled DNA^{3H} when this is fractionated on BND-cellulose columns. This pattern can be related to the type of synthesis taking place at that particular time. Briefly, label appearing after elution with 1M NaCl (double-stranded (ds) DNA) means repair type synthesis whereas label appearing after elution with 1M NaCl + formamide (single-stranded (ss) DNA + associated (ds) DNA) represents replicative type synthesis (Scudiero et al, 1975).

Patterns of DNA synthesis in 0-3 hours imbibed maize embryo axes and the effect of ABA.

The patterns of DNA isolated from maize axes imbibed for different periods of time (pre-replicative period: 0-1 and 0-3 hours) and pulse labelled with (³H) deoxyadenosine during the last 30 min of the incubation period showed that after one hour of imbibition there was almost equal amount of label incorporated into DNA eluted with both 1M NaCl (ds DNA) and 1M NaCl + formamide (ss + ds DNA) peaks (fig. 1A).

At 3 hours, the pattern of eluted DNA shows that the label associated with the ss + ds DNA peak is higher than that in the ds DNA peak (fig. 1B). Total DNA loaded into the column is mainly double-stranded as shown by the diphenylamine assay described in the inserts (figs. 1A and 1B).

To show that this early DNA synthesis in the maize embryo axes was not of a replicative type, incubation of axes was

carried out in the presence of ABA. The amount of (^3H) deoxyadenosine incorporated into TCA-insoluble material was essentially the same (table 1) whether the axes were imbibed with or without ABA ($1 \times 10^{-5}\text{M}$). The patterns after PND-cellulose chromatography were virtually identical (result not shown). This lack of ABA effect on the pre-replicative DNA synthesis has also been reported for rye embryos (Vázquez and Osborne, 1986).

Effect of benzyl adenine on the early DNA synthesis in embryo axes

Since benzyl adenine had been demonstrated to stimulate early DNA synthesis in cotyledons of watermelon seeds (Galli, 1984), we decided to test its effect in maize axes.

Embryo axes were incubated for 0-3 hours in the presence of benzyl adenine ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) and radioactive label. The total counts incorporated into DNA were scored. Table 2 shows that there was an increase of about 11% in the counts incorporated into TCA-insoluble material.

The effect of benzyl adenine was also tested on gamma-irradiated maize axes imbibed for 0-3 hours and the result was a dramatic increase in the counts incorporated to more than 100%.

This increase was not due to changes in the uptake capacity since the ratio of incorporation to uptake did not differ significantly in the presence and absence of benzyl adenine.

Additionally, ABA had no effect at all on the synthesis occurring in gamma-irradiated axes imbibed for the same length of time (result not shown).

Effect of benzyl adenine on the pattern of DNA synthesis in gamma-irradiated axes.

To find out if the repair type of synthesis could be preferentially stimulated by benzyl adenine, DNA isolated from gamma-irradiated axes was fractionated by BND-cellulose chromatography. The axes were imbibed for 0-3 hours in the absence and presence of benzyl adenine ($1 \times 10^{-4} M$) and the DNA was pulse-labelled for the last 30 min of the incubation period. Figure 2A shows the pattern for non benzyl adenine-treated gamma-irradiated axes. Under these conditions the ratio of 1M NaCl/formamide is 1.90, indicating that the pattern corresponds to a repair type synthesis (compare with fig. 1B). The pattern obtained for benzyl adenine-treated gamma-irradiated axes shows a further increase in the ratio of 1M NaCl/formamide to a value of 2.50 (fig. 2B), therefore indicating a greater repair synthesis. This result suggests that the action of benzyl adenine is to stimulate repair type synthesis. The inserts represent the DNA measured by the diphenylamine assay which is mainly double-stranded.

Effect of benzyl adenine on the pattern of DNA synthesis in non-irradiated maize axes.

The pattern of the 0-3 hours DNA synthesis in non-irradiated maize axes is similar to that shown in rye in which

it was suggested that the pattern was the result of a mixture of an atypical replicative synthesis together with repair synthesis (Vázquez and Osborne, 1986).

Since benzyl adenine stimulates the repair type DNA synthesis in gamma-irradiated axes (fig. 2B), we hypothesized that benzyl adenine could help us to define in a clearer way the presence of a repair type synthesis in the pre-replicative stage of germination, i.e. we would expect a change in the DNA pattern shown in fig. 1B.

Figure 3 indicates that indeed a change in the pattern has occurred and now more label elutes in the ds DNA peak than in the ss + ds DNA peak, suggesting that in the presence of benzyl adenine, the repair type synthesis is the main synthesis taking place.

Since it could still be argued that this type of pattern could be due to the activation of an early unscheduled replicative synthesis, i.e. organellar, the following experiment was carried out: maize axes were incubated for 0-3 hours in the presence of benzyl adenine ($1 \times 10^{-4} M$) and 10, 20 or 30 min before the end of the incubation period the axes were removed, blotted against Whatman paper No.1 and reincubated in the presence of inhibition buffer (100 ul) containing (3H) deoxyadenosine and benzyl adenine. If a replicative synthesis was taking place at this time, axes pulse-labelled for only 10 min should show the typical replicative pattern and as time passes the pattern of the label incorporated into DNA would

switch and now resemble a repair type pattern since organelle replicative synthesis should be faster than nuclear one and most label, originally present in Okazaki fragments, should be covalently ligated to the ds DNA. If on the other hand, the synthesis stimulated by benzyl adenine was of a repair type, then no change in the pattern should occur, whether labelling for 10, 20 or 50 min.

The result of this experiment is shown in fig. 4 and it can be observed that the pattern of label incorporated into DNA is of a repair type regardless of the pulse-labelling time. This result adds further support to our suggestion that benzyl adenine stimulates repair DNA synthesis during early germination.

DISCUSSION

The nature of the early, pre-replicative DNA synthesis in maize embryo axes has been followed by using fractionation of DNA by END-cellulose chromatography. With this resin it is possible to distinguish a repair-type synthesis when 3 hours imbibed gamma-irradiated axes are used (fig. 2A). It is not as simple to distinguish unambiguously the type of synthesis taking place in non-irradiated axes imbibed for the same period of time since the patterns indicate a replicative-type synthesis (fig. 1B). However, replicative synthesis in maize axes appears to start 12-15 hours after imbibition (J.M.V.R., manuscript in preparation) and first mitoses can be observed 3-5 hours later (Baiza et al, 1985). Besides, true replicative synthesis is strongly inhibited by ABA (D.J. Osborne, personal communication) while the synthesis observed in 3 hours imbibed axes (whether irradiated or not) does not respond to ABA. This result, although unexpected, is similar to that already reported and discussed for rice embryos (Vázquez and Osborne, 1986).

In this context, it is very important to point out to the fact that the pattern of synthesis in non-irradiated 3 hours imbibed axes can be drastically modified by the addition of benzyl adenine. Although it had been reported that benzyl adenine stimulated early DNA synthesis (Calli, 1984) no clue had been given as to the nature of this synthesis. Our results strongly suggest that benzyl adenine is promoting not

only an increased synthesis but mainly a repair-type synthesis since most label now elutes in the ds DNA peak, independently of whether the pulse-label was applied for 10, 20 or 30 min. This suggestion is also supported by the result of the effect of the phyto regulator on the DNA pattern shown by the gamma-irradiated axes in which the repair-type pattern is further enhanced.

Additionally, this type of synthesis is the result of a stably incorporated label into the DNA as demonstrated by pulse-chase experiments (results not shown).

It is important to stress the effect of benzyl adenine on seed germination. The phyto regulator seems to accelerate the germination process ^(100%) besides increasing the rate of DNA synthesis ^{100%} (Van Staden, 1983). Furthermore, gamma-irradiated maize axes treated with benzyl adenine germinate much faster than non-treated irradiated axes so that only 10% of the latter germinate after 72 hours whereas nearly 50% do it when benzyl adenine is present (our unpublished results).

Since a broken or altered DNA in a seed might cause a faulty germination due to its effect on transcription and indirectly, translation (Osborne, 1983), it could be suggested that the action of benzyl adenine on these seeds is to accelerate somehow the repair process so that the following steps on a dependent sequence of events take place at the right time and thus germination can be successfully achieved. This does not exclude the possibility that benzyl adenine could

stimulate other metabolic processes besides DNA synthesis so that the overall effect on germination could be the result of several, dependent or independent, stimulatory effects.

REFERENCES

1. Baiza, A., R. Aguilar and E. Sánchez de Jimenez (1986) Histones and the first cell cycle in maize germination, *Physiol. Plant.*, In Press.
2. Chen, D., and D.J. Osborne (1970) Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos, *Nature*, 226, 1157-1160.
3. Clay, W.F., F.R.H. Katterman and J.R. Hamett (1975), Nucleic acid metabolism during germination of Pima Cotton (*Gossypium barbadense*), *Plant Physiol.* 55, 231-236.
4. Davey, J.E., and N.A.C. Brown (1982), Cytokinins in seed development and germination, in: *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*, A.A. Ed., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 137-156.
5. Galli, G.M. (1984), Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and benzyl adenine, *Planta*, 160, 193-199.
6. Giles, K.W., and A. Myers (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of DNA, *Nature (London)*, 206, 93.
7. Khan, A.A. (1971), Cytokinins: permissive role in seed germination, *Science*, 171, 855-859.
8. Osborne, D.J. (1982), DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair, in: *Embryonic Development, Part B, Cellular Aspects*, Liss, New York, pp. 577-592.

9. Osborne, D.-J. (1983), Biochemical control systems operating in the early hours of germination, *Can. J. Bot.*, 61, 5568-5577.
10. Osborne, D.-J., A. Dell'Aquila and R.H. Elder (1984), DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds, *Folia Biologica, Proc. FEBS Symposium on DNA, Spec. Publ.*, pp. 155-169.
11. Osborne, D.-J., R. Sharon and R. Ben-Ishai (1980/81), Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*), *Israel J. Bot.*, 29, 259-272.
12. Patai, K., N.K. Das and F. Skoog (1957) Induction of DNA synthesis by kymetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissue, *Physiol. Plant.*, 10, 949-966.
13. Scudiero, D., E. Henderson, A. Norin and B. Strauss (1975) The measurement of chemically induced DNA repair synthesis in human cells by BND-cellulose chromatography, *Mutation Res.*, 29, 473-488.
14. Shattuck, V., and F.R. Katterman (1982) Enhanced unscheduled DNA synthesis in the cotyledons of *Gossipium barbadense* L. by ethyl methanesulphonate (EMS), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109, 1017-1025.
15. Van Staden, J. (1983), Seeds and cytokinins, *Physiol. Plant.*, 58, 340-346.

16. Vázquez-Ramos, J.M., and D.J. Osborne (1986), Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography, *Mutation Res.*, 166, 39-47.
17. Vázquez-Ramos, J.M., and S. López (1986), Inhibición in vitro de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y ara-CTP, *Rev. Soc. Quim. Mex.* In Press.
18. Zwar, J.A. (1973), Effects of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith, *J. Exp. Bot.*, 24, 701-710.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Patterns of elution of DNA from 0-1 (A) and 0-3 (B) hours imbibed maize axes pulse-labelled during the last 30 min. Pulse-labelling with (^3H) deoxyadenosine and processing was as indicated in Material and Methods. Average of total counts were A= 5215 and B= 1259 cpm. The result is the average of 5 independent experiments. Inserts represent the distribution of DNA as measured by diphenylamine.

Figure 2. Patterns of elution of DNA from gamma-irradiated maize axes imbibed for 0-3 hours and the effect of benzyl adenine. Gamma-irradiated axes were imbibed for 0-3 hours in the absence (A) and presence (B) of benzyl adenine ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) and pulse-labelled with (^3H) deoxyadenosine during the last 30 min of the incubation period. Processing was as indicated in Material and Methods. Average of total counts for A= 1692 cpm and for B= 2286. The result is the average of 5 independent experiments. Inserts represent the distribution of DNA as measured by diphenylamine.

Figure 3. Pattern of elution of DNA from 0-3 hours imbibed, benzyl adenine treated axes pulse-labelled during the last 30 min. Pulse-labelling with (^3H) deoxyadenosine and processing was as indicated in Material and Methods. Average of total counts was 1578 cpm. The result is the average of 3 independent experiments. Inserts represent the distribution of DNA as measured by diphenylamine.

Figure 4. Patterns of elution of DNA from 0-3 hours benzyl adenine-treated maize axes pulse-labelled during the last 30, 20 and 10 min. Pulse-labelling with (^3H) deoxyadenosine (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) and processing was as indicated in Material and Methods. Total counts were 8013, 5359 and 2345 cpm for 30, 20 and 10 min labelling respectively. Inserts represent the distribution of DNA as measured by diphenylamine.

TABLE 1

(³H) deoxyadenosine incorporated by control and ABA treated axes (0-5 hours incubation period)

| | CONTROL (HCl 10^{-3} N) cpm | ABA (1×10^{-5} M) | %CHANGE |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------|
| EXPERIMENT 1 | 1706 | 1779 | +4.3 |
| EXPERIMENT 2 | 1602 | 1472 | -8.1 |
| MEAN | 1654 | 1626 | -1.7 |

TABLE 2

(³H) deoxyadenosine incorporated by 2-3 hours imbibed axes (irradiated or not) in the presence of benzyl adenine.

| Sample (axes) ¹ | (³ H) deoxyadenosine incorporation ² | Incorporation/Uptake | |
|----------------------------|---|----------------------|-------------|
| | | HCl | Benz. Aden. |
| a) Non-irradiated | 111% ± 5.8 | 0.69 ± 0.15 | 0.70 ± 0.20 |
| b) Irradiated | 236% ± 39.0 | 0.42 ± 0.06 | 0.44 ± 0.08 |

1. n = 7 experiments for non-irradiated axes,
n = 3 experiments for irradiated axes.

2. The numbers represent the increase in counts incorporated (%) considering the label in non-benzyl adenine-treated axes (irradiated or not) as 100%. Average counts for a) = 5322 and for b) = 5388

fig 1

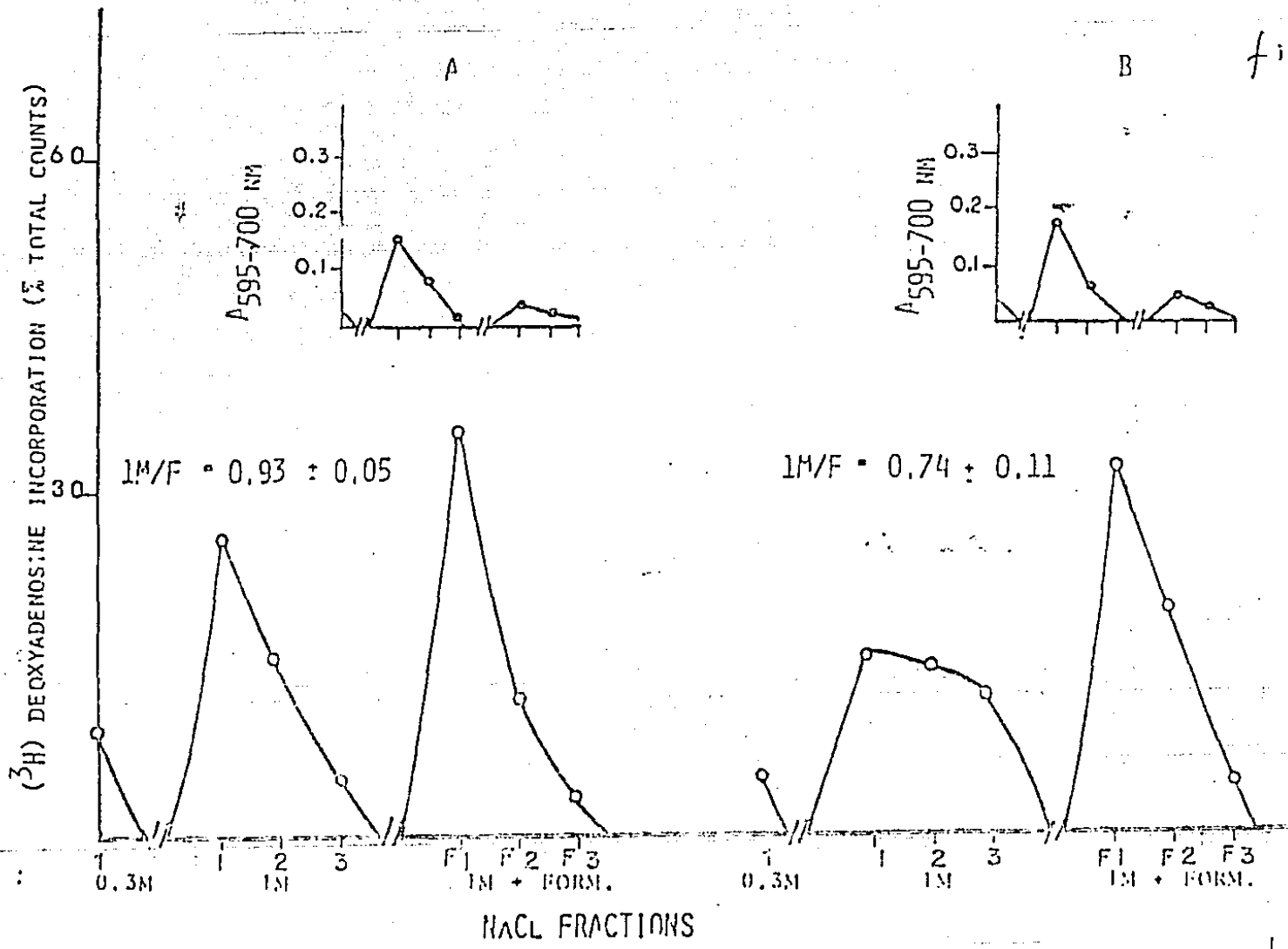


fig 2

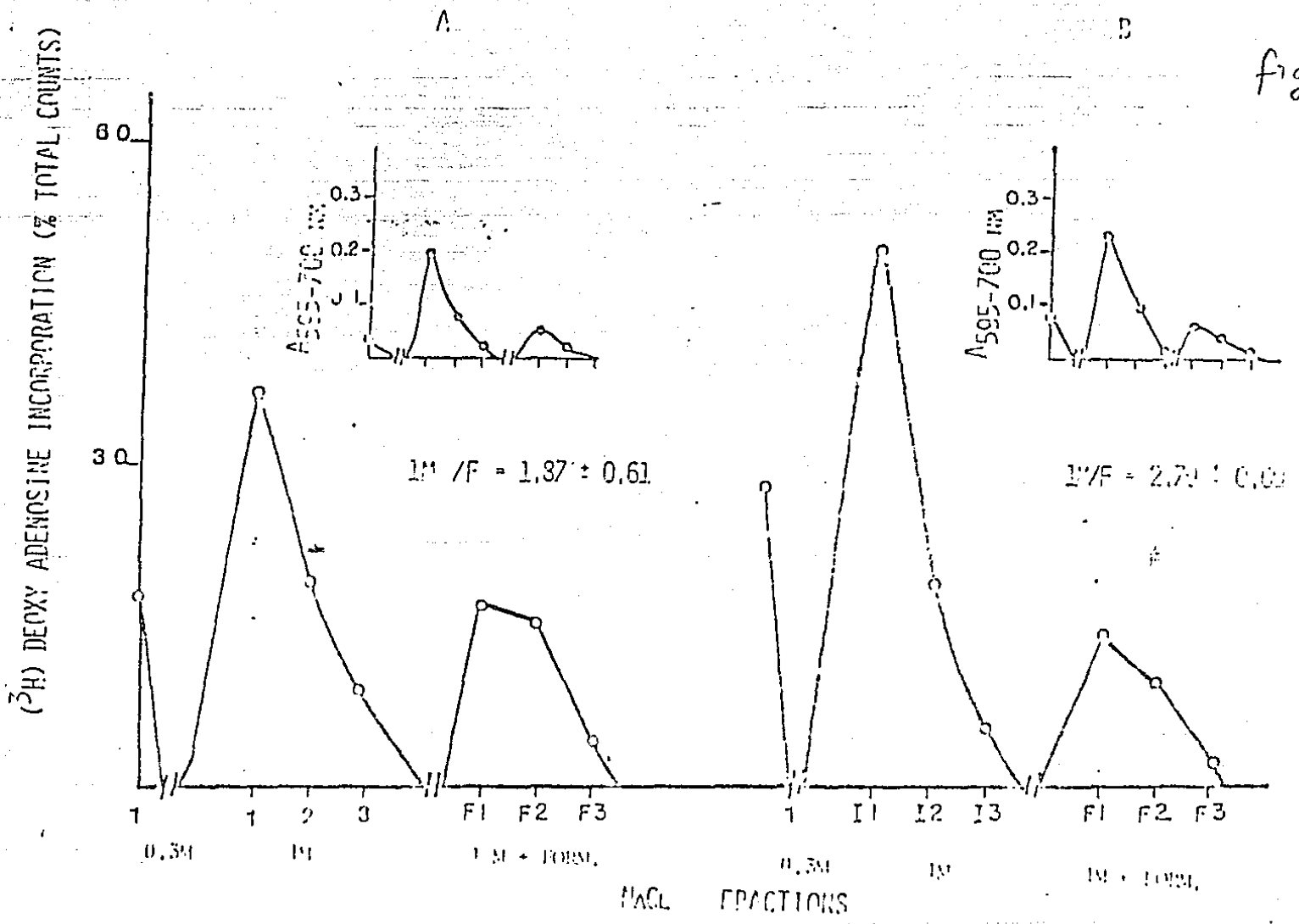


fig 3

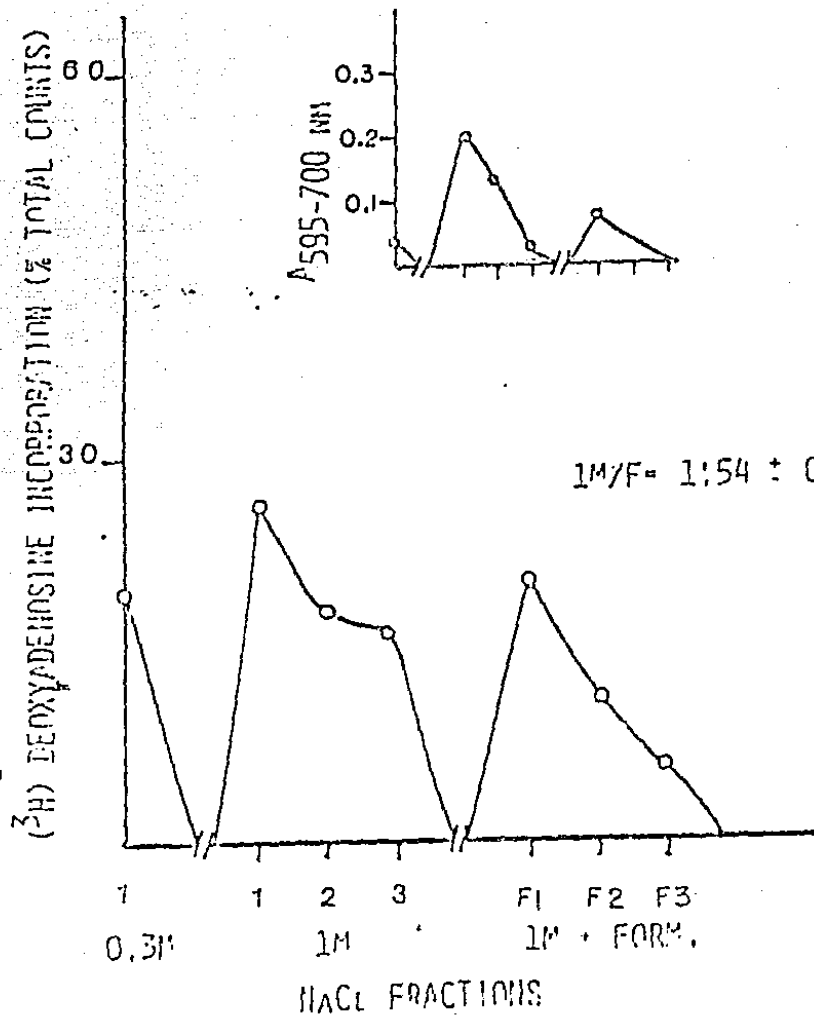


fig 4

