

119 2e)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA BENCILADENINA SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LA DNA POLIMERASA NUCLEAR
EN EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ DURANTE
LAS PRIMERAS HORAS DE LA GERMINACION

FALLA DE ORDEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SILVIA TERESA RAMOS PEREZ

AÑO - 1990



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.

INDICE

ABREVIATURAS	PAG
INTRODUCCION	
ESTRUCTURA DE UNA SEMILLA ANGIOSPERMA	1
GERMINACION	2
ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION	4
DNA POLIMERASAS. GENERALIDADES	7
DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES	15
ACCION DE FITORREGULADORES	20
ANTECEDENTES	26
HIPOTESIS	28
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y METODOS	
MATERIAL BIOLÓGICO	29
SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y REACTIVOS EMPLEADOS	29
MÉTODOS	
OBTENCION DE EJES EMBRIONARIOS	33
IMBIBICION DE EJES EMBRIONARIOS	33
METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION DE NUCLEOS DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ	34
METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE DNA ACTIVADO	35
ENSAYO DE DNA POLIMERASA TIPO ALFA	35
ENSAYO DE DNA POLIMERASA TIPO BETA	36
EFECTO DE INHIBIDORES	
AFIDICOLINA	36
DIDESOXITIMIDINA 5'-TRIFOSFATO (ddTTP)	36
DETERMINACION DE PROTEINA EN LOS EXTRACTOS POR LA TECNICA DE LOWRY MODIFICADA	36
METODOLOGIA PARA MARCAR DNA ACTIVADO	37
METODOLOGIA PARA DETECTAR NUCLEASAS EN LOS EXTRACTOS	38
CINETICA ENZIMATICA	39
RESULTADOS	
ENSAYO PARA DETECTAR PRESENCIA DE NUCLEASAS EN LOS EXTRACTOS	40
ENSAYO DE ENDONUCLEASA	41
CINETICA ENZIMATICA	43
EFECTO DE BENCILADENINA EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA DNA POLIMERASA NUCLEAR Y CITOPLASMATICA	43
EFECTO DE INHIBIDORES EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA DNA POLIMERASA NUCLEAR Y CITOPLASMATICA	47
DISCUSION	55
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	60

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
ara-CTP	arabinosilcitosina 5'-trifosfato
ASB	albúmina de suero de bovino
ATP	trifosfato de adenosina
BA	Benciladenina
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
ddNTP	didesoxinucleósido 5'-trifosfato
ddTTP	didesoxitimidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfato
DOC	desoxicolato de sodio
dTTP	desoxitiimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
M	concentración Molar
N	concentración Normal
NEM	N-etilmaleimida
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetilaminometano)

INTRODUCCION

Los cereales son los frutos de algunas plantas herbáceas cultivadas, del grupo de las Angiospermas pertenecientes a la familia de las Gramíneas. Como miembro de este grupo se encuentra el maíz, botánicamente llamado *Zea mays L.*, es una planta monóica, sus semillas son monocotiledoneas y de cariópsides desnudas.

Este producto es originario de América, en donde se cultiva ampliamente y de donde se extendió a Africa, India, Australia y a las partes más templadas de Europa (Kent, 1971).

El maíz es uno de los productos más importantes ya que ocupa el tercer lugar en la producción mundial de granos y semillas.

ESTRUCTURA DE UNA SEMILLA ANGIOSPERMA

El desarrollo de la semilla se inicia a partir de un óvulo fertilizado. La semilla generalmente está constituida por tres partes: La cubierta de la semilla o testa, el endospermo y el embrión (también llamado germen) que llegará a ser una nueva planta.

Cada una de estas partes tienen una constitución hereditaria distinta, así como una función fisiológica definida. La testa también llamada pericarpio está formada totalmente por tejido procedente de la planta madre que produjo la semilla y por lo general se desarrolla de los integumentos del óvulo. Esta cubierta protege a la semilla, tanto antes como después de la siembra, limita la entrada de organismos patógenos y da a la semilla un cierto grado de impermeabilidad tanto al agua como a los gases, ejerce una influencia regulatoria sobre el metabolismo y el crecimiento de tejidos internos y órganos de la semilla (Bewley y Black, 1978).

El endospermo hereda dos tercios de la planta madre y un tercio del padre. Esta estructura es el principal reservorio energético para el desarrollo del embrión, proporciona diversas sustancias, principalmente almidón en grandes cantidades, además de proteínas y pequeñas cantidades de aceite, minerales y otros componentes químicos (Aldrich, 1974).

El embrión recibe una contribución de ambos padres, es decir se deriva de la fusión del núcleo de los gametos femenino y masculino. Un extremo del embrión, la plúmula, da origen al tallo y a las hojas, y el otro extremo forma la raíz de la planta (Bidwell, 1979).

Por lo tanto en la semilla, se encuentran ya formadas las partes que habrán de convertirse en una nueva planta (Aldrich, 1974).

GERMINACION

La semilla es una estructura en reposo. Por lo regular está sumamente deshidratada, compuesta principalmente de tejido de reserva y rodeada por una cubierta esencialmente impermeable. Los procesos metabólicos están suspendidos o tienen lugar muy lentamente, la semilla está en una condición de vida latente, debido principalmente a su carencia de agua y oxígeno (Bidwell, 1979).

El concepto "Germinación" no es fácil de definir, sin embargo se dice que cuando una semilla toma agua (imbibición), se desencadenan los procesos metabólicos entre ellos la síntesis de proteínas. Después de un corto periodo de tiempo el embrión emerge de la semilla, generalmente la parte radicular; se dice entonces que la semilla ha germinado (Bewley y Black, 1978).

El proceso de germinación lleva eventualmente al embrión al desarrollo de una planta (Mayer, 1975).

Para que una semilla pueda germinar es necesario ponerla en un medio ambiente que reúna ciertas condiciones; entre las más

importantes se encuentran el agua, la temperatura, el aire o composición gaseosa de la atmósfera, así como la luz para algunas semillas (Mayer, 1975).

El agua es esencial para la rehidratación como paso inicial en la germinación. La cantidad de agua absorbida por la semilla depende de tres factores: la composición de la semilla, la permeabilidad de ésta y la disponibilidad de agua en forma líquida o gaseosa en el medio ambiente.

La temperatura correcta es importante para la germinación; generalmente las semillas no germinan por debajo de una cierta temperatura, la cual es específica según la especie (Bidwell, 1979).

Los gases son necesarios para la respiración de las semillas como lo es para las plantas, ya que en una atmósfera carente de oxígeno no germinan.

No todas las semillas requieren la luz para germinar, algunas no son afectadas y unas pocas son inhibidas por la luz (Bidwell, 1979).

Los requerimientos anteriores varían para diferentes variedades de cada especie y están determinados por las condiciones que prevalecieron durante la formación de la semilla y por factores hereditarios.

Las semillas son resistentes a condiciones externas extremas, si se encuentran en un estado de desecación, sin embargo pueden presentar pérdida en su viabilidad y vigor. El período durante el cual una semilla puede permanecer viable para germinar es muy variable y depende de las condiciones de almacenamiento y del tipo de semilla (Mayer, 1975). El vigor de una semilla se puede describir como la condición máxima de las capacidades potenciales para que germine una semilla satisfactoriamente, en un rango amplio de condiciones ambientales, utilizando sus reservas alimenticias adecuadamente para formar una plántula que crezca normalmente.

ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION

Se ha observado que la fase de hidratación de la semilla viene acompañada por una gran actividad metabólica y por la participación enzimática a velocidades crecientes en las primeras etapas de la germinación, lo que marca la movilización de reservas (Córdoba, 1976).

La secuencia de eventos que parece ser común durante la germinación de un gran número de semillas de gramíneas, comprende: eventos precoces, entre los que se encuentran la hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación de DNA; y en eventos tardíos, que incluyen expansión celular, movilización de reservas y replicación de DNA (Osborne, 1983).

SINTESIS DE PROTEINAS

La síntesis de proteínas ocurre en la semilla poco después de la imbibición (Fujisawa, 1966; Marcus, 1969; Walton y Soofi, 1969). El tiempo exacto parece ser variable. Se tienen evidencias de que en embriones secos de trigo y de centeno (Marcus et al, 1966; Roberts et al, 1973; Sen et al, 1975 y Osborne, 1982) dichas síntesis comienzan dentro de los primeros minutos de imbibición (15 a 30 minutos). También se ha observado que los polirribosomas se encuentran ausentes en las semillas secas y que durante la imbibición, la formación de éstos se ve acompañada por la concomitante disminución en el número de ribosomas libres (Marcus y Feeley, 1964).

La capacidad de los tejidos imbibidos para sintetizar proteínas es medida proporcionándoles aminoácidos marcados radiativamente y posteriormente se determina que proporción de estos aminoácidos se han incorporado a las proteínas. Para que la sustancia radiactiva penetre rápidamente a los tejidos vivos, por lo común se usan tejidos aislados, tales como embriones de cereales y ejes embrionarios de leguminosas. Estos tejidos aislados toman agua y sustratos más rápidamente que las semillas completas y quedan

imbibidos totalmente (Murray, 1984).

La síntesis de proteínas se inicia rápidamente después de que la imbibición ha comenzado. Es muy probable que la mayoría de los componentes bioquímicos y estructurales necesarios para la síntesis están presentes en la semilla seca. No obstante, las preparaciones ribosomales de embriones secos de trigo son incapaces de sintetizar proteínas, aunque la actividad de estas preparaciones aumenta rápidamente con la imbibición y en forma paralela se presenta un incremento en la proporción de polirribosomas presentes (Murray, 1984).

SINTESIS DE RNA

Como se expresó anteriormente, no ocurre síntesis de proteínas en la semilla seca, sino que comienza cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien al RNA mensajero (RNA_m) y se formen los primeros polirribosomas.

Existe evidencia de que los embriones secos de trigo contienen una variedad diversa de RNA mensajeros y se ha especulado que probablemente existen dos clases de RNA_m: RNA_m residuales y RNA_m almacenados. Los primeros no son esenciales para los procesos de germinación y pueden ser degradados después de iniciada la imbibición. Por otra parte, la traducción a proteínas al inicio de la germinación de embriones se considera que puede estar programada por RNA_m almacenados en la semilla seca (Brooker et al, 1977).

La evidencia de la existencia de RNA_m almacenado en las semillas viene de experimentos en los cuales, embriones de trigo se trataron con concentraciones de α -amanitina y cordicepina suficientemente altas para inhibir la síntesis de RNA_m en más de un 80%. Los embriones se colocaron en las soluciones inhibitorias preliminarmente durante 30 minutos, para permitir que el inhibidor penetrara en los tejidos. Durante los siguientes 40 minutos a 25°C

se observó que la formación de polirribosomas fue tan rápida como en los controles, indicando que el RNAm almacenado era en gran medida el responsable de la síntesis de proteínas en este periodo (Brooker et al, 1977).

Contrariamente, Cheung et al (1979) mostraron evidencias de que en embriones de trigo después de 40 minutos de imbibición, la síntesis de proteínas era dirigida por RNAm sintetizado de *ovo* más que por RNAm almacenado.

Como podemos darnos cuenta no es fácil determinar la importancia tanto de los RNAm almacenados presentes en el embrión seco como de los RNAm sintetizados de *ovo* para el proceso de germinación.

Van de Walle y colaboradores (1976), señalan que en ejes embrionarios de maíz la mayoría de las moléculas de RNA sintetizadas en la radícula durante la primera hora de imbibición, corresponden a RNA heterogéneo. Estudios posteriores muestran que el RNA heterogéneo nuclear, que es el más abundante en las primeras horas de la germinación, es modificado para luego usarlo como RNAm (Dommes y Van de Walle, 1983).

SINTESIS DE DNA Y DIVISION CELULAR

La síntesis de proteínas y RNA se reinicia tan pronto como los tejidos se imbiben, pero la síntesis replicativa de DNA comienza más tarde. Este hecho se hace evidente para la mayoría de las gramíneas (Osborne, 1984).

La expansión de la radícula en la semilla ocurre inicialmente por elongación de las células, y su salida subsecuente a través de la cubierta de la semilla podrá o no estar acompañada por división celular (Bewley y Black, 1986). La replicación del DNA es un requisito necesario para que la división celular suceda (Bewley y Black, 1986).

El tiempo en el cual se inicia la síntesis replicativa del DNA es variable de acuerdo a la especie y va desde 4 hasta 12 horas

después de iniciada la imbibición (Chen y Osborne, 1970; Buchowicz et al, 1978; Baiza et al, 1989).

Con respecto al maíz, se tiene evidencia de que la replicación del DNA (medida por la incorporación de un nucleótido marcado) puede dispararse desde las 9 horas de imbibición (Vázquez y López, 1986). Sin embargo, al comienzo de la imbibición existe un pequeño incremento en la incorporación de marca, y se supone que esta síntesis prereplicativa de DNA es de tipo reparativo (Zaraín et al, 1987).

Se ha encontrado que los embriones de las semillas poseen sistemas de reparación del DNA, los cuales actúan momentos después de que los tejidos se hidratan (Velemínsky y Gichner, 1978).

La síntesis de DNA tanto en las etapas iniciales como en las tardías de la germinación, involucra la concertada activación de un gran número de actividades enzimáticas diferentes, entre las cuales participan las DNA polimerasas que tienen una función fundamental.

DNA POLIMERASAS

Generalidades

Las DNA polimerasas han sido encontradas en todos los organismos procariontes y eucariontes estudiados, guardando ciertas similitudes entre sí aunque pueden variar en algunas de sus propiedades físicas y químicas (Hubscher, 1983).

Todas las DNA polimerasas catalizan la síntesis de DNA a partir de la incorporación de los cuatro desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a un molde de DNA, en presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} y Mn^{2+} , de acuerdo a las reglas de apareamiento de Watson y Crick (A con T y C con G). Requieren de un iniciador (llamado también cebador) que puede ser un pequeño fragmento de DNA o RNA que contenga un extremo con un grupo hidroxilo libre en la posición 3' de la desoxirribosa, para poder polimerizar.

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

El proceso de duplicación del DNA ocurre de manera secuenciada y ordenada, este proceso se ha dividido en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. En organismos procariontes, los eventos que definen cada uno de las etapas han sido ampliamente estudiados, sin embargo en organismos eucariontes, debido a su complejidad los conocimientos son escasos.

De manera resumida, la síntesis de DNA se lleva a cabo sobre una horquilla de replicación. El DNA se sintetiza sobre una cadena continua en la dirección 5'-3' antiparalela a la cadena molde, y sobre una cadena discontinua donde la síntesis ocurre formando fragmentos de DNA conocidos como fragmentos de Okazaki, que son formados a partir de un oligómero de RNA que sirve como iniciador.

Una vez que los fragmentos de Okazaki han sido sintetizados por la DNA polimerasa, el RNA iniciador se libera de la cadena naciente a la misma velocidad que los fragmentos de Okazaki se unen para aumentar la longitud de la cadena.

Las DNA polimerasas representan solo un componente de la compleja maquinaria involucrada en la replicación del DNA, ya que existen diversas proteínas que intervienen en este proceso, como son las DNA ligasas, helicasas, topoisomerasas, etc.

Tres tipos de DNA polimerasas han sido descritas para procariontes y designadas como DNA polimerasa I, II y III, de acuerdo al orden en que fueron descubiertas. Ver cuadro I (Kornberg, 1980). Debido al fácil manejo de éstos organismos, a su corto tiempo de generación y a la posibilidad de obtener células con mutaciones condicionales letales de los genes que codifican para cada una de las funciones, los procariontes han sido muy bien estudiados.

(Los signos + y - representan presencia o ausencia de actividad)

PROPIEDADES	pol.I	pol.II	pol.III
FUNCIONES ENZIMATICAS			
polimerización 5'-3'	+	+	+
exonucleasa 5'-3'	+	-	+
exonucleasa 3'-5'	+	+	+
UTILIZACION DE MOLDES SINTETICOS			
dúplex intacto	-	-	-
cadena sencilla cebada	+	-	-
dúplex con cortes	+	-	-
REQUERIMIENTO DE COFACTORES			
efecto de KCl { 20 mM	60	60	100
% del óptimo { 50 mM	80	100	50
{ 100 mM	100	70	10
{ 150 mM	80	50	0
EFFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LAS ENZIMAS			
2-desoxianálogos	-	+	+
ara-CTP	-	+	-
bloqueadores de grupos sulfhidrilo	-	+	+
CARACTERISTICAS			
Tamaño (Kd)	109	120	140

CUADRO I. Algunas propiedades de las DNA polimerasas I, II y III de Escherichia coli (Kornberg, 1980).

En organismos eucariontes, tanto la purificación como la caracterización de las DNA polimerasas es más complicado, no obstante, se han podido distinguir 4 tipos de DNA polimerasas diferentes. En todos los sistemas estudiados se han nombrado a las DNA polimerasas en forma distinta.

En el caso de células animales, en especial de mamíferos se han utilizado las letras griegas para clasificar a las DNA polimerasas. En el presente trabajo se usará la misma clasificación.

DNA POLIMERASA ALFA

Esta enzima es la más activa de las polimerasas de eucariontes y la más relacionada con la replicación del cromosoma. Fue la primera de las DNA polimerasas de mamíferos que se describió (Bollum, 1960). Durante mucho tiempo la localización de esta enzima fue motivo de controversia, aunque algunos autores mostraron su localización nuclear (Shioda et al, 1980). Eschler et ál (1977) sugirieron una localización citoplasmática de la enzima además de su localización nuclear. Métodos inmunoquímicos más recientes suponen que la DNA polimerasa α puede estar localizada en la región perinuclear del citoplasma (Brown et al, 1981).

Este tipo de enzima es altamente soluble ya que cuando se realizan extractos celulares acuosos, la mayor parte de la enzima se encuentra en la fracción citoplasmática. Esta DNA polimerasa parece estar siempre presente en células que están en crecimiento, tanto en eucariontes inferiores como en mamíferos.

La DNA polimerasa α se ha aislado la mayoría de las veces en forma de un complejo polipeptídico (Wong et al, 1988; So y Downey, 1988). Generalmente este complejo consiste de: a) un polipéptido catalítico que *in vitro* es un fosfolípido de función desconocida que oscila entre 125-180 kd; b) una fosfoproteína de 77 kd de

función desconocida y c) dos polipéptidos de 55 y 49 Kd. Se ha visto que el polipéptido de 49 Kd posee actividad de DNA primasa (Nashever y Grosse, 1988). DNA polimerasa α estrechamente unida a DNA primasa se ha aislado de diferentes fuentes (Conaway y Lehman, 1982; Yagura, 1983; Suzuki et al, 1985).

La DNA primasa se encarga de sintetizar pequeños fragmentos de oligorribonucleótidos, los que funcionan como cebadores para que la DNA polimerasa forme los fragmentos de Okazaki.

La replicación del DNA por el complejo DNA polimerasa-DNA primasa involucra síntesis de DNA cebador por la primasa, seguido por la replicación de la cadena de DNA por la DNA polimerasa.

Se ha observado que todos los inhibidores específicos para la DNA polimerasa α también inhiben la replicación del DNA (Ikegami et al, 1978).

La DNA polimerasa α contiene grupos sulfhidrilo en su sitio activo por lo que es muy sensible a agentes bloqueadores de éstos grupos como es N-etilmaleimida (NEM) (Bollum, 1975). Es sensible a inhibidores de la replicación del DNA, como afidicolina, el cual muestra una inhibición competitiva con dCTP y no competitiva para los otros dNTP's (Ikegami et al, 1978). También es inhibida por arabinosilnucleótidos (Yoshida et al, 1977; Okura y Yoshida, 1978) y por altas concentraciones de cationes monovalentes. Es resistente a didesoxinucleótidos (So y Downey, 1988) y muestra un requerimiento absoluto por el Mg^{2+} .

DNA POLIMERASA BETA

Esta enzima es 10 veces menos activa que la DNA polimerasa α en el mismo tipo de células en crecimiento; por esta razón, la DNA polimerasa β no se ha correlacionado con la replicación; en cambio se le ha relacionado con funciones de reparación y recombinación de DNA (Kornberg, 1980).

La mayor actividad para esta enzima se ha registrado en períodos

de máxima actividad de reparación, en linfocitos humanos que han sido irradiados con luz ultravioleta (Bertazzoni et al, 1976).

El nivel de DNA polimerasa β no muestra grandes cambios durante las diferentes fases del ciclo celular y sólo se incrementa en células en las que se induce reparación de DNA. Existen evidencias de que la DNA polimerasa β funciona sólo en la reparación de tramos cortos, pero tanto α como β están involucradas en la reparación de tramos largos (Mosbaugh y Linn, 1984).

La DNA polimerasa β se localiza exclusivamente en el núcleo unida fuertemente a cromatina (Foster y Gurney, 1974). La enzima purificada está libre de actividad nucleolítica. A diferencia de la polimerasa α , la polimerasa β no es capaz de extender cadenas de DNA a partir de un cebador.

La DNA polimerasa β es una proteína pequeña, consiste en un polipéptido sencillo con peso molecular aproximado de 40 Kd y un coeficiente de sedimentación de 4S. Prefiere como molde sintético un DNA con huecos, al igual que la DNA polimerasa α .

Se ha visto que en presencia de Mg^{2+} la polimerasa β es completamente distributiva insertando un solo desoxinucleótido y disociándose del molde posteriormente (Wilson et al, 1988).

La DNA polimerasa β es estimulada por altas concentraciones de cationes monovalentes a diferencia de la DNA polimerasa α . No requiere de grupos sulfhidrilo para su actividad por lo que no es inhibida por agentes bloqueadores de estos grupos. No es afectada por ara-NTP's ni por afidicolina, pero en presencia de ddNTP's (por ejemplo ddTTP) es fuertemente inhibida. Posee una gran resistencia a agentes químicos como: ácido fosfonocético, urea 5M alcohol o acetona al 20-25 %, pero su actividad disminuye en presencia de fosfatos. Es estable en solución en un rango de pH de 4.5 a 10.5. Tiene un punto isoeléctrico básico.

de máxima actividad de reparación, en linfocitos humanos que han sido irradiados con luz ultravioleta (Bertazzoni et al, 1976).

El nivel de DNA polimerasa β no muestra grandes cambios durante las diferentes fases del ciclo celular y sólo se incrementa en células en las que se induce reparación de DNA. Existen evidencias de que la DNA polimerasa β funciona sólo en la reparación de tramos cortos, pero tanto α como β están involucradas en la reparación de tramos largos (Mosbaugh y Linn, 1984).

La DNA polimerasa β se localiza exclusivamente en el núcleo unida fuertemente a cromatina (Foster y Gurney, 1974). La enzima purificada está libre de actividad nucleolítica. A diferencia de la polimerasa α , la polimerasa β no es capaz de extender cadenas de DNA a partir de un cebador.

La DNA polimerasa β es una proteína pequeña, consiste en un polipéptido sencillo con peso molecular aproximado de 40 Kd y un coeficiente de sedimentación de 4S. Prefiere como molde sintético un DNA con huecos, al igual que la DNA polimerasa α .

Se ha visto que en presencia de Mg^{2+} la polimerasa β es completamente distributiva insertando un solo desoxinucleótido y disociándose del molde posteriormente (Wilson et al, 1988).

La DNA polimerasa β es estimulada por altas concentraciones de cationes monovalentes a diferencia de la DNA polimerasa α . No requiere de grupos sulfhidrilo para su actividad por lo que no es inhibida por agentes bloqueadores de estos grupos. No es afectada por ara-NTP's ni por afidicolina, pero en presencia de ddNTP's (por ejemplo ddITP) es fuertemente inhibida. Posee una gran resistencia a agentes químicos como: ácido fosfonoacético, urea 5M alcohol o acetona al 20-25 %, pero su actividad disminuye en presencia de fosfatos. Es estable en solución en un rango de pH de 4.5 a 10.5. Tiene un punto isoelectrico basico.

DNA POLIMERASA GAMMA

La DNA polimerasa γ representa entre el 1 y 2 % del total de DNA polimerasas en células de vertebrados.

La actividad de la enzima se correlaciona con la replicación del DNA. Algunos estudios sugieren que la DNA polimerasa γ se encuentra en la mitocondria, en donde se encarga de la replicación del DNA mitocondrial en células animales, y que no está involucrada en la síntesis de DNA nuclear aunque también se ha encontrado a la enzima en esta fracción (Hübscher et al, 1979; Geuskens et al, 1981).

La enzima aislada muestra una naturaleza heterogénea al igual que la DNA polimerasa α (Weissbach, 1977). Se ha reportado que tiene un peso molecular de 110-300 Kd (Spadari et al, 1974). Wernette et al (1988) suponen que la polimerasa γ de *Drosophila melanogaster* es un heterodímero que consiste de una subunidad catalítica de 125 Kd y otra subunidad de 35 Kd cuyo papel funcional no es conocido.

La DNA polimerasa γ , además de utilizar moldes de DNA naturales y sintéticos, utiliza ribohomopolímeros sintéticos como poli(rA), poli(rC) (Gerard, 1975; Knopf et al, 1976), sin embargo no se ha descrito que sea capaz de copiar moldes naturales de RNA. Aparentemente no posee actividad nucleolítica y tiene un punto isoeléctrico ácido.

La DNA polimerasa γ es estimulada por cationes mono y divalentes, así como por fosfato en presencia de KCl, lo que la hace distinguirse de la DNA polimerasa α que es inhibida por elevadas concentraciones de cationes monovalentes y de la DNA polimerasa β que es inhibida por fosfatos. En cambio, la DNA polimerasa γ es inhibida por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo y ddTTP pero no es inhibida por afidicolina, efectivo inhibidor de la DNA polimerasa α .

DNA POLIMERASA DELTA

Byrnes et al (1976) reportaron por vez primera una enzima con actividad de exonucleasa 3'-5' asociada con la capacidad de polimerización del DNA, presente en médula ósea de conejo, a la que denominaron DNA polimerasa δ . Esta actividad de nucleasa juega un importante papel en la fidelidad de la replicación y la prevención de mutaciones. Lee et al (1980) aislaron esta enzima de timo de ternera. Recientemente se ha podido aislar a partir de otras fuentes (Crute et al, 1986; Lee y Toomey, 1987) entre las cuales las enzimas presentan algunas variaciones como peso molecular y utilización de moldes.

Se han reportado dos tipos de DNA polimerasas δ denominadas como I y II. La DNA polimerasa δ I se asocia con una actividad de primasa la cual es inhibida por anticuerpos monoclonales contra DNA polimerasa α , mientras que la DNA polimerasa δ II que es la que presenta actividad de exonucleasa 3'-5' no se ve afectada (Crute et al, 1986). Lo anterior supondría que la DNA polimerasa δ I es más bien una forma de DNA polimerasa α , en donde su asociación con la DNA primasa podría explicarse.

Si la DNA polimerasa δ es un precursor de la DNA polimerasa α o si es una enzima distinta la cual tiene una función especial aún no es claro, sin embargo, la presencia de una DNA polimerasa α asociada con una exonucleasa podría explicar la alta fidelidad en la replicación del DNA. También se ha sugerido que las DNA polimerasas α y δ actúan en la horquilla de replicación, donde la DNA polimerasa α replica la cadena continua y la DNA polimerasa δ la discontinua (Focher et al, 1988).

La DNA polimerasa δ presenta similitudes con la DNA polimerasa α , entre las que se encuentran un alto peso molecular (alrededor de 152 Kd) y su coeficiente de sedimentación de 7S, es una proteína ácida, tiene gran sensibilidad a NEM, afidicolina y arabinosilnucleótidos, no es afectada por ddNTP's (So y Downey, 1988). Como parte constitutiva del complejo posee una actividad de DNA primasa (Crute et al, 1986).

Aunque las DNA polimerasas α y δ tienen muchas similitudes, muchas evidencias sugieren que se trata de enzimas diferentes debido a características que no comparten, entre ellas están la actividad de exonucleasa 3'-5' intrínseca a la polimerasa δ , anticuerpos monoclonales contra DNA polimerasa α no inhiben la actividad de la DNA polimerasa δ (Wahl et al, 1986; Lee y Toomey, 1987) y anticuerpos policlonales contra DNA polimerasa δ de timo de ternera no inhiben a la DNA polimerasa α de la misma especie. Aunado a esto, la DNA polimerasa δ presenta diferencias en especificidad de molde. En sustratos de DNA tales como dA-dT o dG-dC alternados, o poli(dA) cebado con segmentos de oligo(dT) se logra la mayor actividad de polimerización de esta enzima, mientras que el molde preferente de la DNA polimerasa α es el DNA de timo de ternera activado (Kornberg, 1980).

Ver resumen de algunas propiedades de estas cuatro polimerasas en el cuadro II.

DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES

Es una tarea difícil clasificar las DNA polimerasas de plantas siguiendo el mismo criterio usado en el caso de las enzimas de animales, debido a que las DNA polimerasas aisladas de eucariotes inferiores o plantas no presentan las mismas características que las de los animales.

DNA POLIMERASA ALFA

A partir de varias especies vegetales se han purificado DNA polimerasas que presentan varias características similares con la DNA polimerasa α de animales, encontrando que todas las polimerasas tipo α aisladas de vegetales presentan un peso molecular alto y son fuertemente inhibidas por NEM (Litvak y Castroviejo, 1987).

Se ha encontrado que para los casos de trigo, espinaca, arroz y

PROPIEDADES	α	β	γ	δ
LOCALIZACION	NUCLEAR	NUCLEAR	MITOCONDRIAL NUCLEAR	NUCLEAR
FUNCION	REPLICACION NUCLEAR DEL DNA	REPARACION DEL DNA	REPLICACION MITOCONDRIAL	REPARACION DEL DNA
P.M. (Kd)	150-1000	45	> 110	250-290
Asociación con primasa	Si	NO	Si	NO
UTILIZACION DE TEMPLADOS				
DNA activado	Si	Si	Si	Si
RNA nat. con primer de desoxinucleót.	NO	NO	NO	NO
Molde de DNA con primer de RNA	Si	Si	Si	Si
EFFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LAS ENZIMAS				
NEM	Si	NO	Si	Si
ddTTP	NO	Si	Si	
ara-CTP	Si	NO	NO	
afidicolina	Si	NO	NO	Si
Butil-dATP	Si	NO	NO	NO

CUADRO II. Algunas propiedades de las DNA polimerasas de animales (Litvak y Castroviejo, 1987).

coliflor, la afidicolina, un inhibidor específico de DNA polimerasas α de animales, inhibe a la DNA polimerasa de alto peso molecular. Para el caso de nabo, la afidicolina, ha mostrado inhibir una actividad de DNA polimerasa, aunque el tamaño de la enzima no ha sido determinado (Litvak y Castroviejo, 1987).

Al igual que las DNA polimerasas α de animales, las enzimas tipo α estudiadas en sistemas vegetales no reconocen un molde de poli(rA)-oligo(dT). Las DNA polimerasas tipo α reportadas para trigo, son inactivas en presencia de este molde, aunque últimamente se ha reportado que pueden usarlo eficientemente si la temperatura de incubación rutinariamente utilizada en los ensayos se disminuye. Por lo anterior, es importante el estudio de diferentes parámetros para concluir si un molde es o no usado por la enzima (Litvak y Castroviejo, 1987).

En general es aceptado que la mayor actividad de la DNA polimerasa α de animales está localizada en la fracción nuclear. El mismo tipo de estudios no se han podido realizar en plantas debido a la dificultad de purificar núcleos con buen rendimiento.

Métodos autorradiográficos han mostrado en arroz que una DNA polimerasa sensible a afidicolina, se encuentra exclusivamente en núcleo; iguales resultados se han encontrado en cultivos de células de soya. La síntesis de DNA en núcleos de células de soya es resistente a didesoxitimidina trifosfato (ddTTP), inhibidor de las DNA polimerasas β y γ pero no de la DNA polimerasa α . Resultados preliminares con núcleos purificados de trigo indican la presencia de una DNA polimerasa fuertemente inhibida por afidicolina (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA polimerasas con actividad asociada de exonucleasa se ha encontrado en trigo y arroz. Estas enzimas no han sido purificadas a homogeneidad, por lo que la presencia de la exonucleasa pudiera atribuirse a una contaminación (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA POLIMERASA BETA

Existen muchas evidencias acumuladas en años recientes concernientes a la existencia de DNA polimerasa tipo α en plantas. Sin embargo es más difícil hacer una afirmación para el caso de DNA polimerasa β (Litvak y Castroviejo, 1987).

Se ha definido a una DNA polimerasa β de animales, como a una enzima de bajo peso molecular, localizada en el núcleo y altamente resistente a NEM. Más tarde se encontró que es resistente a afidicolina e inhibida por ddTTP (Litvak y Castroviejo, 1987).

Han sido encontradas DNA polimerasas de bajo peso molecular en remolacha, chícharo, tabaco y trigo (Litvak y Castroviejo, 1987).

Las DNA polimerasas tipo β encontradas en plantas tienen un peso molecular aproximado a 50 Kd. En coliflor se encontró una enzima de 70 Kd con algunas propiedades de DNA polimerasa β . El parámetro de peso molecular, debe considerarse con cuidado ya que otro parámetro de importante consideración, es la actividad proteolítica presente en los extractos de plantas. Para trigo, una DNA polimerasa de 50 Kd ha sido purificada casi a homogeneidad. El efecto de inhibidores y la especificidad de molde tuvieron claras diferencias comparándola con las dos DNA polimerasas tipo α purificadas de trigo (Castroviejo et al, 1979).

DNA polimerasas de bajo peso molecular son inhibidas sólo por altas concentraciones de NEM en remolacha y chícharo. En chícharo la DNA polimerasa tipo β está fuertemente unida a cromatina, como en el caso de algunas DNA polimerasas β de animales, no obstante se desconoce su papel funcional (Litvak y Castroviejo, 1987).

El papel de la DNA polimerasa tipo β de plantas en la reparación no ha sido comprobado. No obstante, algunos resultados reportan que la síntesis reparativa de DNA inducida por luz ultravioleta en protoplastos de tabaco es resistente a afidicolina (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA POLIMERASA GAMMA

La DNA polimerasa γ de animales se encuentra en la fracción nuclear y mitocondrial. Una DNA polimerasa de 100 kd caracterizada en trigo (Castroviejo et al. 1979), se asemeja a la DNA polimerasa γ de animales debido a su estimulación por KCl, por el fuerte poder inhibitorio de ddTTP y bromuro de etidio, por su resistencia a afidicolina y por su eficiencia para sintetizar sobre moldes de poli(rA)-oligo(dT). Sin embargo, la DNA polimerasa de trigo no se localiza en mitocondria y su papel funcional es desconocido. Se sabe que es capaz de utilizar a bajo nivel moldes naturales de RNA y puede asociarse con actividad de DNA primasa (Litvak y Castroviejo, 1987; Graveline et al, 1984).

La DNA polimerasa de cloroplastos de espinaca muestra características semejantes a las DNA polimerasas γ de animales (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA POLIMERASAS DE MITOCONDRIA Y CLOROPLASTO

Se ha encontrado una DNA polimerasa con un peso molecular aparente de 180 Kd, purificada a partir de mitocondria de trigo, que es incapaz de reconocer poli(rA)-oligo(dT) como molde sintético, característica principal de las DNA polimerasas tipo γ . En cambio, es resistente a afidicolina, sensible a ddTTP y bromuro de etidio, al igual que las polimerasas mitocondriales de animales. Una enzima similar se ha encontrado en mitocondria de células de arroz (Litvak y Castroviejo, 1987).

No obstante estas evidencias, no es posible aún clasificar a la DNA polimerasa mitocondrial de plantas como una DNA polimerasa γ típica.

Por otra parte, se ha aislado una enzima con un peso molecular aproximado a 105 kd de cloroplastos de espinaca, que es capaz de utilizar eficientemente un molde sintético de poli(rA)-oligo(dT),

es sensible a NEM y resistente a afidicolina (Litvak y Castroviejo, 1987).

Otra DNA polimerasa parcialmente purificada a partir de cloroplastos de chicharo de aproximadamente 87 Kd, no reconoce como molde poli(rA)-oligo(dT), es fuertemente inhibida por NEM y bromuro de etidio e insensible a afidicolina (McKown y Tewari, 1984).

No es claro si la diferencia en el reconocimiento de molde observado en las DNA polimerasas de cloroplasto, sea debida a diferencias intrínsecas de las enzimas o al alto grado de purificación; opcionalmente podría ocurrir una proteólisis parcial durante la purificación con lo cual podría explicarse tanto la diferencia de cerca de 20 Kd en el peso molecular de ambas enzimas como sus actividades (Litvak y Castroviejo, 1987).

ACCION DE FITORREGULADORES

En las plantas superiores, las células son capaces de interaccionar de diversas formas. Se ha distinguido un grupo de moléculas orgánicas activas en pequeñas cantidades y que coordinan el crecimiento y desarrollo de las plantas.

En 1881, Charles Darwin fue el primer investigador que postuló la existencia de este tipo de sustancias. En 1934, el alemán Kögl extrajo sustancias de crecimiento de materiales biológicos, cristalizando entre ellas la heteroauxina que identificó como ácido indolacético (Weaver, 1976).

Actualmente existen gran cantidad de compuestos sintéticos que producen algun efecto regulador en el crecimiento de las plantas (Weaver, 1976).

La expresión "regulador de crecimiento de las plantas" o "fitorregulador" puede emplearse para designar a cualquier sustancia, sea natural o sintética, que pueda modificar los procesos fisiológicos de cualquier planta (Weaver, 1976).

Se reconocen 5 grupos básicos de fitorreguladores clasificados de acuerdo a su naturaleza química y a sus efectos fisiológicos:

"Auxinas".- Promueven la elongación celular de tallos y coleóptilos. Inhiben la formación de las yemas laterales y crecimiento de la raíz. Intervienen en la diferenciación celular.

"Giberelinas".- Estimulan en general la germinación y el crecimiento del tallo, yemas laterales y raíz. A nivel molecular estimulan la síntesis de algunas hidrolasas.

"Etileno".- A concentraciones bajas estimula la germinación y el crecimiento de brotes; en tratamientos largos suprime la germinación. Provoca la caída prematura de las hojas, frutos jóvenes y otros órganos. Estimula la floración y la maduración de frutos.

"Acido Abscisico".- Inhibe la germinación y el crecimiento posiblemente debido a la inhibición de las enzimas hidrolíticas (Weaver, 1976). Se sugiere que actúa afectando el metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas (Van Overbeek et al, 1967; Barlow y Pilet, 1984).

"Citocininas".- Intervienen en el crecimiento de raíz y tallo. Estimulan la división celular. Intervienen en la diferenciación celular y desarrollo de cloroplastos.

CITOCININAS

El descubrimiento de las citocininas parte de la observación de que los compuestos que contienen adenina, pueden modificar la expresión del desarrollo (Bidwell, 1979).

La primera citocinina, fue descubierta a partir de una muestra de DNF envejecido en la década de 1950 por Folke Skoog, posteriormente el compuesto activo se identificó como 6-turfurilaminopurina conocida también como cinetina (Weaver, 1976).

No pasó mucho tiempo sin que se sintetizaran otras citocininas nuevas y más activas, una de las primeras fué la ó-bencilaminopurina. Se demostró que este compuesto, también conocido como Benciladenina (BA) o Verdán, resulta eficaz prolongador de la vida de almacenamiento de vegetales frondosos y otros constituyentes de las plantas (Weaver, 1976).

La primera citocinina cristalina se extrajo de semillas de *Zea mays* y se le denominó "zeatina". La zeatina que ya se ha sintetizado *in vitro*, es un compuesto aproximadamente diez veces más activo que la cinetina (Weaver, 1976).

Aunque la acción de las citocininas se asocia especialmente a la estimulación de la división celular, se ha demostrado que estimulan muchos procesos metabólicos, incluso la síntesis de proteínas, DNA y RNA.

EVENTOS EN LOS QUE PARTICIPAN LAS CITOCININAS

División celular

Las concentraciones extremadamente bajas ($5 \cdot 10^{-11}$) de zeatina, provocan la división celular en médula de diferentes tejidos de tabaco y en explantes de zanahoria, sin zeatina u otra citocinina se produce sólo un incremento ligero de estos tejidos. Se requiere citocinina tanto en la iniciación como en la continuación de la división celular (Weaver, 1976).

Diferenciación celular

Las citocininas influyen en la diferenciación celular del cultivo. Interactúan con las auxinas mostrando efectos diferentes. por ejemplo, Skoog y Miller (1957) encontraron en cultivos de médula en diferentes tejidos de tabaco que cuando la cantidad de citocininas es menor en proporción que las auxinas se produce un desarrollo de raíces, pero cuando es elevada se desarrollan tanto

yemas como brotes. Cuando la relación es intermedia, se desarrollan tejidos de callos no diferenciados (Weaver, 1976).

Las citocininas provocan también la elongación de algunas hojas y de segmentos de tallos. Estas respuestas se deben en gran parte a la expansión celular (Weaver, 1976).

Efectos antisenescentes

Las citocininas, retrasan el envejecimiento de tejidos vegetales. La aplicación de la BA, evita la senescencia en hojas viejas de plantas de frijol (Bidwell, 1979).

Se sabe que las citocininas evitan la formación de enzimas hidrolíticas como nucleasas y proteasas, interfiriendo por lo tanto de manera indirecta con la desintegración de los polímeros (Bidwell, 1979).

Mobilización de sustancias

Las citocininas son importantes para el fenómeno de transporte de sustancias a diferentes partes de la planta (Weaver, 1976).

Una sugerencia es que la citocinina puede estimular la formación de moléculas de proteínas transportadoras involucradas en el movimiento activo de metabolitos (Bidwell, 1979).

Las citocininas causan una inmovilización de los nutrientes, o bien, su transporte a las áreas tratadas con éstas, siendo otro factor que actúa para evitar la senescencia (Weaver, 1976).

Citocininas y luz

Las citocininas interactúan con la luz, y en algunos casos la sustituyen, durante el control de una gran cantidad de fenómenos biológicos. Tal es el caso de las semillas en ciertas variedades de lechuga que requieren luz para germinar. Sin embargo pueden germinar en la oscuridad cuando son tratadas previamente con

cinetina (Weaver, 1976). Las citocininas provocan también la síntesis de pigmentos (Horgan, 1984) y el desarrollo de cloroplastos (Pathier, 1979).

Citocininas y ácidos nucleicos

Se ha encontrado que el contenido de ácidos nucleicos se incrementa al aplicar exógenamente citocininas a tejidos vegetales (Khan y Heit, 1969; Grierson et al, 1977; Tsuji et al, 1979; Yokoyama et al, 1980). El tratamiento con citocininas a hojas de frijol y a cotiledones de pepino induce un incremento considerable en el contenido de RNA total (Zwar, 1973; Yokoyama et al, 1981). Además, se ha visto que al aplicar cinetina, existe un incremento en el contenido de DNA, el cual coincide con la división celular (Phillips y Torrey, 1973).

Asimismo se ha reportado que existe una relación del fitorregulador con el ciclo celular (Parker et al, 1978). Nishinari y Syono (1986) reportaron que existe un drástico incremento de citocininas, en los límites de la fase G₂/M y otros más ligeros, durante la fase S del ciclo celular.

Se ha sugerido, que las citocininas previenen el efecto inhibitor del ácido abscísico (ABA), aumentando el contenido de ácidos nucleicos (Albanell et al, 1985; Khan, 1967; Sussex et al, 1975).

POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE CITOCININAS

El mecanismo de acción de las citocininas se desconoce a la fecha. Como muchos otros mecanismos de acción el fitorregulador puede unirse a una molécula receptora y posteriormente desencadena una actividad biológica.

Existen varias hipótesis acerca del posible mecanismo de acción entre las cuales destacan las siguientes:

Se ha reportado que las citocininas estimulan la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Al parecer, el efecto de las citocininas en relación a la síntesis de proteínas es a nivel traduccional. Los resultados de la alteración de la actividad de los ribosomas por citocininas apoyan esta proposición (Klambt, 1981).

Se sabe que las citocininas se unen a los ribosomas y al parecer una molécula de citocinina se une a cada ribosoma. Las citocininas actúan en las células de Acetabularia sin núcleo y posiblemente también en ribosomas citoplasmáticos. Se ha demostrado que la síntesis de RNA en núcleos *in vitro* se estimula por citocininas, por lo que se presume que pueden actuar en ribosomas nucleares (Weaver, 1976).

Otros fisiólogos han sugerido un posible mecanismo de acción de las citocininas que se relaciona con su presencia en el RNA de transferencia (Weaver, 1976). No obstante, se ha encontrado que en cultivos vegetales, las citocininas se incorporan al RNAt en muy baja proporción y ésta no es muy específica (Horgan, 1984).

Se cree que las citocininas, pueden modificar las propiedades de la RNA polimerasa, a través de la unión de un aceptor o cofactor localizado en el citoplasma, afectando a la enzima directamente o a través de la modificación de la cromatina a la cual se une la RNA polimerasa. Por lo que se dice que el fitorregulador estimula la síntesis total de RNA (Kulaeva, 1981).

Se han aislado proteínas de hojas de tabaco y centeno, con alta afinidad para citocininas, pero su función no es clara.

ANTECEDENTES

Se tiene conocimiento, que la germinación de una semilla puede afectarse por la aplicación exógena de fitorreguladores y es posible que, el control natural de la germinación involucre una interacción de ellos, pudiendo ser promotores y/o inhibidores de tal evento (Khan, 1967; Addicott, 1972).

Se han obtenido evidencias experimentales en relación al efecto que tienen algunos fitorreguladores, durante la germinación de semillas, un ejemplo de ello son las citocininas.

Algunos reportes indican que las citocininas promueven la síntesis de ácidos nucleicos y la germinación de la semilla (Van Standen, 1983; Köhler et al, 1982; Galli, 1984). En el laboratorio se han realizado estudios con Benciladenina (BA), que es una citocinina sintética, sobre algunos aspectos del metabolismo del DNA.

Se ha encontrado que la BA promueve la germinación de ejes embrionarios deteriorados de maíz, al menos de 3 a 4 veces con respecto a ejes deteriorados sin BA (Zaraín, 1987).

Por otro lado, Galli (1984) propuso que existe un incremento en la síntesis de DNA nuclear en cotiledones de sandía crecidos en agua y BA, la cual es diferente a la síntesis replicativa.

Zaraín et al (1987) realizaron análisis cualitativos por cromatografía en BND-celulosa para distinguir y caracterizar el tipo de síntesis de DNA que se lleva a cabo durante el inicio de la germinación de maíz (0-3horas), ya que existen evidencias de que esa síntesis puede ser de tipo reparativo (Osborne et al, 1984; Vázquez Ramos y Osborne, 1986; Zaraín, 1987). Para realizar lo anterior, se utilizaron ejes embrionarios γ -irradiados (baja viabilidad) en los que, predominó marcadamente, una síntesis de tipo reparativo y ejes no irradiados (alta viabilidad) en los que

no fue posible diferenciar una síntesis predominante (tipo reparativa o replicativa). En cambio, cuando se adicionó la BA a ambos tipos de ejes (γ -irradiados y no irradiados), ésta provocó un incremento en la síntesis de DNA total que parecía ser preferencialmente de tipo reparativo.

Posteriormente, estudios realizados por Reyes (1988), indican que la BA estimula la síntesis de DNA total, a cualquier tiempo durante las primeras 12 horas de germinación, en ejes embrionarios de maíz tanto normales como γ -irradiados; no obstante la cinética de la estimulación es diferente en ambos.

También encontró que la actividad específica de la DNA polimerasa en extractos totales, se incrementa al agregar la BA. Así pues, la DNA polimerasa parece estar involucrada en el incremento de la síntesis de DNA que se observa al añadir la BA a dichos tejidos. No obstante, se desconoce a que tipo de DNA polimerasa puede afectar la BA.

El presente trabajo se llevó a cabo con el propósito de determinar a que tipo de DNA polimerasa puede afectar dicho fitorregulador. Para efectuar lo anterior, se aislaron núcleos de ejes embrionarios de maíz imbibidos en presencia y ausencia de la BA por 3, 6 y 24 horas. Se midió la actividad específica de la enzima, tanto en la fracción nuclear como en la citoplasmática. Además con la finalidad de distinguir entre diferentes actividades de DNA polimerasas, se usaron algunos inhibidores específicos de las DNA polimerasas de animales.

H I P O T E S I S :

Dado que existen evidencias de que la citocinina Benciladenina al ser agregada exógenamente a ejes embrionarios de maíz, estimula la actividad de la DNA polimerasa en los extractos totales de dichos tejidos (ejes embrionarios), postulamos que la DNA polimerasa localizada en núcleos es preferencialmente estimulada por dicho fitorregulador.

O B J E T I V O S :

-Conocer si la estimulación en la actividad específica de la DNA polimerasa por efecto de la Benciladenina ocurre en núcleos y/o en citoplasma.

-Medir la actividad específica de la DNA polimerasa, con ensayos tipo α y β , de los extractos nucleares y citoplasmáticos. A la vez determinar a que tiempo de la germinación temprana de ejes embrionarios de maíz, la enzima es más sensible al efecto estimulatorio de la Benciladenina.

-Determinar a que tipo de DNA polimerasa corresponden las actividades específicas mostradas, de acuerdo al efecto de algunos inhibidores clásicos de las DNA polimerasas α y β de animales.

MATERIALES Y METODOS

A) MATERIAL BIOLÓGICO.

Para los experimentos se utilizaron semillas de maíz de la variedad "Chalqueño" que fueron adquiridas en PRONASE (Productora Nacional de Semillas de la SARH)

B) SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y REACTIVOS EMPLEADOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

B.1) Solución amortiguadora de imbibición (SAI).

Tris-HCl (pH=7.6)	50.0	mM
KCl	50.0	mM
MgCl ₂	10.0	mM
Sacarosa	2.0	mM
Cloranfenicol	10.0	µg/ml

B.2) Solución de Benciladenina (BA).

La BA se disuelve en HCl (1 N) ajustando el pH a 6 con NaOH (al 1%) y se diluye con agua destilada hasta alcanzar una concentración de 1×10^{-3} M. Esta solución se esteriliza a través de filtros Millipore.

Se prepara una solución control de la misma manera que la anterior en ausencia de BA.

B.3) Solución amortiguadora de imbibición con BA.

A la solución de BA de concentración 1×10^{-3} M se le lleva, con SAI a una concentración final de 1×10^{-4} M.

B.4) Soluciones requeridas para la extracción de núcleos.

B.4.1) Solución amortiguadora para la homogeneización de ejes embrionarios de maíz (Buffer 1).

Tris-HCl (pH=7.5)	50.0	mM
KCl	20.0	mM
MgCl ₂	20.0	mM
2-Mercaptoetanol	10.0	mM
Sacarosa	1.2	M
Glicerol	30.0	%

B.4.2) Solución amortiguadora para la homogeneización de núcleos (Buffer 2).

Tris-HCl (pH=7.5)	50.0	mM
MgCl ₂	5.0	mM
2-Mercaptoetanol	0.5	mM
PMSF	0.1	mM
EDTA	0.1	mM
Glicerol	5.0	%

B.5) Solución amortiguadora de diálisis.

Tris-HCl (pH=7.6)	50.0	mM
MgCl ₂	5.0	mM
2-Mercaptoetanol	0.5	mM
PMSF	0.1	mM
Glicerol	5.0	%

B.5.1) Preparación de bolsas de diálisis.

Las bolsas se hierven tres veces con NaHCO₃ por 10 minutos aproximadamente y tres veces con EDTA 5 mM. Por último se guardan en una solución que contiene EDTA 5 mM y etanol al 20 % y se mantienen en refrigeración a 4°C.

B.6) Líquido de centelleo.

2,2'-p-fenil-bis(5-fenoxazol) (POPOP)	0.1	g
2'-difeniloxazol (PPD)	5.0	g
Tolueno	1.0	l

B.7) Solución amortiguadora para activación del DNA.

Tris-HCl (pH=7.5)	50.0	μ M
MgCl ₂	5.0	μ M
Albumina de suero bovino (ASB)	0.5	mg/ml
DNA de timo de ternera	0.25	mg/ml

B.8) Soluciones utilizadas para medir la actividad de la DNA-polimerasa:

B.8.1) Solución amortiguadora de reacción para DNA polimerasa α .

Tris-HCl (pH=7.6)	50.0	mM
KCl	20.0	mM
MgCl ₂	10.0	mM
ATP	1.0	mM
2-Mercaptoetanol	0.4	mM
dATP	0.1	mM
dCTP	0.1	mM
dGTP	0.1	mM
Glicerol	4.0	%
DNA activado	10.0	μ g/ml
(metil- ³ H)TTP(80 Ci/mmol; NEN Dupont USA).	5.0	μ Ci/ml

B.8.2) Solución amortiguadora de reacción para DNA polimerasa β .

Tris-HCl (pH=8.5)	50.0	mM
KCl	100.0	mM
MgCl ₂	20.0	mM
ATP	1.0	mM
2-Mercaptoetanol	0.4	mM
dATP	0.1	mM
dCTP	0.1	mM
dGTP	0.1	mM
Glicerol	4.0	%
DNA activado	10.0	μ g/ml
(metil- ³ H)TTP(80 Ci/mmol; NEN Dupont USA).	5.0	μ Ci/ml

B.8.3) DNA de esperma de salmón. 2.0 mg/ml
(disuelto en agua destilada)

B.9) Reactivos para determinar proteínas por el método de Lowry modificado (Peterson, 1979).

B.9.1) Reactivo A.

Se mezclan proporciones iguales de NaOH 0.8 N, SDS 10%, agua destilada y una solución de cobre-tartrato-carbonato (CTC, B.9.3.1)

B.9.2) Reactivo B.

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.0	vol.
Agua destilada	5.0	vol.

B.9.3) Soluciones complementarias:

B.9.3.1) Solución de cobre-tartrato-carbonato (CTC).

Carbonato de sodio	10.0	%
Sulfato de cobre pentahidratado	0.1	%
Tartrato de sodio-potasio	0.2	%

(La solución es estable por 2 meses a temperatura ambiente)

B.9.3.2) Desoxicolato de sodio (DOC). 0.15 %

B.9.3.3) Acido tricloroacético (TCA). 72.0 %

B.9.4) Solución proteica para la construcción de la curva patrón.

Albúmina de suero bovino (ASB) (disuelta en agua destilada)	0.2	mg/ml
--	-----	-------

B.10) Solución amortiguadora para nucleasa.

Tris-HCl (pH=7.6)	50.0	mM
KCl	20.0	mM
MgCl ₂	10.0	mM
ATP	1.0	mM
2-Mercaptoetanol	0.4	mM
Glicerol	4.0	%
DNA marcado con (metil- ³ H)TTP (80 Ci/mmol; NEN Dupont USA)	30.0	µg/ml

B.11) Solución amortiguadora para endonucleasa.

Tris-HCl (pH=7.6)	50.0	mM
KCl	20.0	mM
MgCl ₂	10.0	mM
ATP	1.0	mM
2-Mercaptoetanol	0.4	mM
Glicerol	4.0	%
Plásmido de DNA	1.0	µl/25µl

B.12) Solución de carga para geles.

EDTA	50.0	%
Sacarosa	37.0	%
Azul de bromofenol	0.1	%
SDS	0.01	%

B.13) Solución amortiguadora para electroforesis (Tris-borato-EDTA).

Tris base	89.0	mM
Acido bórico	89.0	mM
EDTA	2.0	mM

C) METODOS

C.1) Obtención de ejes embrionarios.

La extracción de los ejes embrionarios de maíz se llevó a cabo por disección manual. Generalmente la extracción de los ejes se realizó uno o dos días antes del experimento y cuando los ejes no se utilizaron inmediatamente se mantuvieron en un desecador a 4°C.

C.2) Imbibición de ejes embrionarios.

Para cada experimento se incubó una muestra control y otra muestra con BA (B.1., B.3).

Generalmente para cada muestra se utilizó un gramo de ejes

embrionarios, se lavaron con agua destilada y se colocaron entre dos discos de papel filtro Whatman (No. 1) dentro de una caja Petri de 5 cm de diámetro y se añadió 0.8 ml de SA1 en presencia o ausencia de BA a ejes incubados por 3 horas, 1 ml a ejes incubados durante 6 horas y 1.6 ml a ejes incubados durante 24 horas.

Las manipulaciones anteriores se realizaron en condiciones de esterilidad, utilizando un mechero de Bunsen. Los discos de papel filtro así como las cajas Petri fueron esterilizados previamente en autoclave.

La incubación de las muestras se realizó en una bañó maría con temperatura regulada a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ en presencia de luz.

Una vez que el tiempo de incubación terminó, los ejes se procesaron de inmediato o bien se congelaron a -70°C hasta su uso.

C.3) Metodología para la extracción de núcleos de ejes embrionarios de maíz.

Cada muestra de ejes embrionarios se homogeneizó con 2 ml de Buffer 1 (B.4.1) durante 2 minutos aproximadamente en un mortero pre-enfriado a 4°C . El homogenado se filtró a través de dos capas de papel miracloth con ayuda de vacío, los residuos del mortero se lavaron dos veces con 2 ml de buffer 1, filtrándose cada lavado; y finalmente el residuo contenido en el papel miracloth se lavó con 4 ml de buffer 1. El filtrado se recibió en un matraz Kitasato de 125 ml frío, posteriormente el filtrado se pasó a un tubo Corex de 15 ml frío; y se centrifugó a $20\ 000 \times g$ durante 40 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman modelo J2-21 usando un rotor JA-20.

Una vez terminada la centrifugación se separó el sobrenadante (fracción citoplasmática) el cual se guardó en refrigeración a 4°C hasta dializarlo.

Por otro lado la pastilla que contenía los núcleos se resuspendió en 1.5 ml de Buffer 2 (B.4.2), y se transfirió a un tubo de

policarbonato.

El sedimento nuclear resuspendido se congeló (a -70°C) y descongeló (a temperatura ambiente), esta operación se realizó 3 veces. Posteriormente se centrifugó a $100\ 000 \times g$ durante 2 horas en una ultracentrífuga Beckman modelo TL-100, utilizando un rotor de ángulo fijo.

El sobrenadante nuclear resultante, así como el citoplasmático se dializaron en bolsas (B.5.1), contra 1 litro de Buffer de diálisis (B.5) durante 15-18 horas.

C.4) Metodología para la obtención de DNA activado.

1 mg de DNA de timo de ternera se disolvió en 4 ml de Buffer de activación (B.7), una vez ya disuelto se agregaron 4 μl de DNAasa (0.05 mg/ml), se incubó a 37°C durante 15 minutos y se calentó a 77°C por 5 minutos, inmediatamente después se enfrió en hielo. Se guardó en congelación a -20°C hasta su uso.

C.5) Determinación de la actividad de la DNA polimerasa.

C.5.1) Ensayo de DNA polimerasa tipo α .

Se agregó a cada tubo una mezcla de reacción cuyo volumen total fue de 100 μl conteniendo 48 μl de solución amortiguadora de reacción α (B.8.1), 40 μl de extracto crudo de DNA polimerasa (extracto nuclear o citoplasmático) y 12 μl de agua destilada.

Los tubos se incubaron a 37°C en un baño maría por 30 minutos para que se llevara a cabo la reacción, la cual se detuvo adicionando 100 μl de DNA de esperma de salmón (B.8.3) y 3 ml de TCA al 10% frío. Los tubos permanecieron en hielo al menos 30 minutos.

La radiactividad incorporada en forma insoluble en TCA se recuperó filtrando las muestras con un sistema Millipore en filtros de

fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron 2 veces con TCA al 5% (5 ml) y 3 veces con etanol al 96% (5 ml). Se secaron y se colocaron en viales conteniendo líquido de centelleo (5 ml).

Se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo líquido, Packard Tri-Carb. Se calculó la actividad enzimática (A.E) dividiendo las cpm entre la cantidad de proteína contenida en el extracto.

C.5.2) Ensayo de DNA polimerasa tipo β .

Se determinó igual que para la DNA polimerasa α (C.5.1) cambiando solamente la solución amortiguadora de reacción β (B.8.2).

C.5.3) Efecto de inhibidores.

La actividad de las DNA polimerasas tipo α y β se ensayó en la forma anteriormente descrita (C.5.1 y C.5.2), con excepción de que a la mezcla de reacción se le añadieron diferentes inhibidores para determinar su efecto.

C.5.3.1) Afidicolina, concentración final de 1.47×10^{-4} M disuelta en dimetil-sulfóxido (DMSO).

Para este inhibidor se incluyó un control adicional al que se le agregó la cantidad equivalente del solvente utilizado. El dato obtenido se usó para calcular el efecto del inhibidor.

C.5.3.2) Didesoxitimidina trifosfato (ddTTP), concentración final de 3.12×10^{-8} M disuelto en agua destilada.

C.6) Determinación de proteína en los extractos por la técnica de Lowry modificada. (Peterson, 1977).

Se elaboró una curva patrón con una solución de ASB (B.9.4). Para lo cual se tomaron alícuotas de la solución de ASB y se completó

el volumen a 1 ml con agua destilada, para obtener un rango de concentración de 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.

Por otro lado se tomaron alícuotas de 50 μl para extractos nucleares y 20 μl para extractos citoplasmáticos, y se llevaron a un volumen final de 1 ml con agua destilada. A cada muestra se agregó desoxicolato de sodio (DOC) al 0.15 % (0.1 ml) y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Transcurrido este tiempo se agregó TCA al 72% (0.1 ml), se agitó y se dejó precipitar 30 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga a 4°C. El sobrenadante se eliminó y los tubos se dejaron 10 minutos a 60°C para secar el precipitado, a cada tubo se añadió 1 ml de agua destilada y 1 ml de reactivo A (B.9.1), se agitaron y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente se agregó 0.5 ml de reactivo B (B.9.2), se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente para que desarrollaran la reacción colorimétrica. Se leyó la absorbencia de las muestras a 750 nm.

En cada uno de los extractos se determinó el contenido de proteínas.

C.7) Metodología para marcar DNA activado.

Se preparó una solución amortiguadora para DNA polimerasa α (B.8.1) conteniendo 3 veces mas DNA activado que en la solución original (30 $\mu\text{g/ml}$), todo esto se hizo en un volumen de 198 μl al que se agregaron 2 μl de DNA polimerasa-I (el fragmento klenow) obteniendo un volumen total de 200 μl , contenidos en un tubo eppendorf, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Una vez terminado el periodo de incubación, las proteínas se extrajeron 2 veces con fenol (200 μl), a la fase acuosa se añadió acetato de amonio 3M (10 μl), etanol absoluto (420 μl) y se guardó a -70°C por 30 minutos para precipitar el DNA. Después se centrifugó en una microfuga IEC a máxima velocidad, durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó en un desecador con vacío durante 5 minutos.

Finalmente se resuspendió el DNA activado marcado en 200 μ l de un Buffer que contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM de KCl y 10 mM de $MgCl_2$ (B.B.1) y se congeló a $-20^\circ C$ hasta su uso.

C.8) Metodología para detectar nucleasas en los extractos nucleares.

C.8.1) Nucleasas en extractos nucleares.

Se agregó a cada tubo una mezcla de reacción cuyo volumen fué de 100 μ l, la cual contenía 58 μ l de solución amortiguadora para nucleasa (B.10), 2 μ l de agua destilada y 40 μ l de extracto nuclear de 50 ejes embrionarios imbibidos con SAI (extracto control) por 3, 6 o 24 horas. Se incluyó una muestra control a la que se agregó una cantidad de agua equivalente a la del extracto.

De aquí en adelante las operaciones subsecuentes se realizaron de la misma forma que para el ensayo de actividad de DNA polimerasa α (C.5.1) que incluye desde la incubación hasta la obtención de las cuentas por minuto (cpm).

C.8.2) Ensayo de endonucleasa.

Se preparó una mezcla de reacción la cual contenía 13 μ l de solución amortiguadora para endonucleasa (B.11) y 12 μ l de extracto nuclear de 100 ejes embrionarios imbibidos con SAI por 3, 6 o 24 horas.

Cada una de las tres muestras se incubó a $37^\circ C$ por 30 minutos para que se llevara a cabo la reacción, posteriormente a $80^\circ C$ por 10 minutos para detener la reacción. Se centrifugó 25 segundos aproximadamente, en una microfuga IEC a máxima velocidad.

Una vez centrifugadas las muestras se les añadió 2 μ l de solución de carga para geles (B.12) y se colocaron las muestras en los pozos del gel (C.9).

C.8.3) Electroforesis para determinar presencia de endonucleasas.

Se pesó agarosa y se le agregó un volumen necesario de solución para electroforesis (B.13) para formar un gel al 1 %. En un matraz se calentó la mezcla hasta punto de ebullición (quedando la agarosa completamente disuelta), se enfrió aproximadamente a 50°C y se vertió en una cámara para electroforesis, una vez que el gel solidificó, se sumergió en solución para electroforesis y se procedió a cargar 25 μ l de cada muestra al gel (muestras obtenidas en el ensayo de endonucleasa, C.8.2).

Se corrió la electroforesis aplicando un amperaje constante de 15 mA durante 6 horas.

Cuando finalizó la corrida el gel se lavó con agua destilada y se tinció con una solución de bromuro de etidio (10 μ g/ml) durante 35 a 40 minutos. Posteriormente el resultado de la electroforesis se observó por medio de un transiluminador de luz ultravioleta.

C.9) Cinética enzimática

Se utilizaron extractos nucleares de 3, 6 y 24 horas de imbibición, en ausencia de BA. Para cada extracto se utilizaron 50 ejes embrionarios de maíz.

Se realizaron ensayos de DNA polimerasa tipo α (C.5.1), en los que se incubaron diferentes muestras a 37°C en un baño maría durante diferentes periodos de tiempo (10, 20, 25, 30 y 60 minutos).

Las manipulaciones siguientes se llevaron a cabo de la misma forma que para el ensayo de DNA polimerasa tipo α (ver C.5.1), que incluye la precipitación del material radiactivo incorporado en forma insoluble en TCA hasta la obtención de las cuentas por minuto (cpm).

RESULTADOS

ENSAYO PARA DETECTAR PRESENCIA DE NUCLEASAS EN LOS EXTRACTOS

Debido a que el material utilizado en los ensayos para determinar la actividad de la DNA polimerasa fueron " extractos crudos ", se determinó la posible existencia de nucleasas en éstos. Se preparó una mezcla de reacción que contenía DNA activado marcado con (metil-³H)TTP (C.B.1) y una muestra de extracto crudo de DNA polimerasa nuclear correspondiente a 3, 6 o 24 horas de imbibición de ejes embrionarios de maíz.

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla 1, indican que no hay pérdida de marca a los diferentes tiempos de imbibición (3, 6 y 24 horas) usando como control una muestra de DNA marcado al que no se le agregó extracto proteico (C.B.1).

		extracto nuclear crudo de DNA polimerasa		
tiempo de imbibición	control (sin extracto)	3 hrs	6 hrs	24 hrs
cpm	1464	1628	1646	1597

Tabla 1. Ensayo de nucleasa en extractos nucleares a diferentes tiempos de imbibición (promedio de dos ensayos).

ENSAYO DE ENDONUCLEASA

El resultado negativo que se obtuvo en el experimento anterior no descartaba la presencia de endonucleasas en los extractos. Con este fin, se preparó una mezcla de reacción (C.8.2) que contenía, un plásmido de DNA circular covalentemente cerrado y extracto nuclear crudo de DNA polimerasa de 3, 6 y 24 horas de imbibición. Posteriormente, los productos de reacción se analizaron mediante la técnica de electroforesis, en gel de agarosa al 1% (C.8.3). El resultado de la electroforesis se observó por medio de un transiluminador de luz ultravioleta.

La figura 1 pertenece a una fotografía de un gel de agarosa al 1% en el cual el carril 1 corresponde al control (no contiene extracto nuclear crudo de DNA polimerasa), donde se observan tres bandas: la banda superior corresponde a unidades multiméricas de DNA, la banda intermedia corresponde a un DNA relajado circular covalentemente cerrado y la tercera banda pertenece a un DNA superenrollado circular covalentemente cerrado. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a extractos provenientes de 3, 6 y 24 horas de imbibición respectivamente. En los tres casos se observa que, virtualmente desaparece la banda superior; que corresponde a unidades multiméricas, posteriormente se observa una banda de un DNA relajado circular covalentemente cerrado, seguida de ésta aparece una banda que pertenece a un DNA lineal, después aparecen bandas no muy claras que pudieran representar cortes en el DNA y por último, aparece una banda de un DNA superenrollado circular covalentemente cerrado.

El hecho de que la banda superior desaparezca casi completamente y aparezcan múltiples bandas de DNA lineal, podría indicar la presencia de un tipo de endonucleasas de corte único o más probablemente; la presencia de topoisomerasas, que produjeran una serie de estados topológicos del DNA, ya que como antes se mencionó, se utilizó para el ensayo un DNA preferencialmente circular, covalentemente cerrado.



Figura 1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%. Carril 1: control (no contiene extracto proteico). Carriles 2, 3 y 4 corresponden a extractos nucleares de 3, 6 y 24 horas de imbibición de ejes embrionarios de maíz respectivamente.

CINETICA ENZIMATICA

Con el objeto de conocer si había linealidad en la incorporación de marca al DNA en el ensayo, decidimos realizar ensayos de DNA polimerasa tipo α (C.6.1), variando el tiempo de incubación. Los tiempos de incubación estudiados fueron: 10, 20, 25, 30 y 60 minutos.

En la figura 2 se puede apreciar con claridad que la incorporación del nucleótido radioactivo al DNA sigue un comportamiento de tipo lineal, en ensayos conteniendo extractos de ejes embrionarios imbibidos durante 3, 6 y 24 horas respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que no se afecta la incorporación de la marca al molde de DNA, aunque existan nucleasas en los extractos para el tiempo que dura el ensayo de DNA polimerasa (30 minutos).

EFFECTO DE LA BENCLADENINA (BA) EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA DNA POLIMERASA NUCLEAR Y CITOPASMATICA.

La actividad específica (A.E) se midió relacionando la radiactividad incorporada e insoluble en ácido tricloroacético (TCA) durante el ensayo en forma de cuentas por minuto (cpm), entre la cantidad de proteínas (μg) de la muestra del extracto crudo de DNA polimerasa (C.5.1).

En este conjunto de experimentos, en primer lugar se probó el efecto de la BA en la A.E. de la DNA polimerasa con un ensayo tipo α , de extractos nucleares y citoplasmáticos (C.3). Para llevar a cabo lo anterior, se utilizaron ejes embrionarios, imbibidos en presencia y ausencia de BA (C.2) durante 3 horas.

La figura 3 muestra un incremento del 49% en la A.E. de la DNA polimerasa en el extracto nuclear, cuando los ejes se imbibieron con BA durante 3 horas. Para el extracto citoplasmático fue del

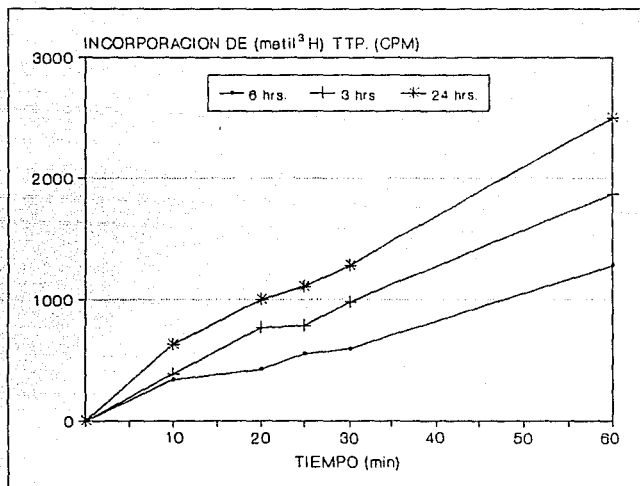


Figura 2. Curva de actividad enzimática contra tiempo. La fuente de enzima fueron extractos nucleares de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 3, 6 y 24 horas (Ensayo de DNA polimerasa tipo α).

12 % bajo las mismas condiciones.

Los datos anteriores nos muestran que existe una estimulación preferencial en la A.E. de la DNA polimerasa nuclear, en extractos de ejes imbibidos con BA durante 3 horas, mientras que en los extractos citoplasmáticos la estimulación por BA es menor.

Al observar que la estimulación por la BA se presentó preferencialmente en la A.E. de la DNA polimerasa nuclear, los siguientes experimentos consistieron en saber a que tiempo durante las primeras 24 horas de la germinación, la DNA polimerasa responde mayormente al efecto estimulador de BA. Con este fin se midió la A.E. de DNA polimerasa, con ensayos tipo α y β , en extractos nucleares y citoplasmáticos de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 3, 6 y 24 horas, en ausencia y presencia de BA.

Rutinariamente los ensayos tipo α y β se realizaron en las condiciones óptimas para DNA polimerasa α y una variación del ensayo β de animales. La diferencia entre los dos ensayos estriba en que la mezcla de reacción para el ensayo tipo α tiene una menor concentración de sales y un pH menos alcalino que para el ensayo tipo β (B.B.1 y B.B.2). Usualmente para el ensayo tipo β se utiliza una fuerza iónica de 100 mM de KCl y un pH de 8.5; y se lleva a cabo una preincubación de la mezcla de reacción con N-etilmaleimida (NEM), inhibidor de DNA polimerasa α de animales, con el fin de inactivar esta polimerasa (Vázquez, A. y Vázquez-Ramos, 1988). Sin embargo, en el caso de plantas y en especial en maíz se ha encontrado que NEM inhibe totalmente la actividad enzimática de DNA polimerasa, a cualquier pH y fuerza iónica (Meléndez López, S.G., manuscrito en preparación). En un trabajo previo de este laboratorio, se determinó que el pH de 8.5 y la utilización de fuerza iónica alta (>100 mM) inhibe más de 75% a una DNA polimerasa parcialmente purificada, por lo que se decidió utilizar esta modificación del ensayo para DNA polimerasa β con el propósito de tratar de diferenciar entre posibles enzimas presentes.

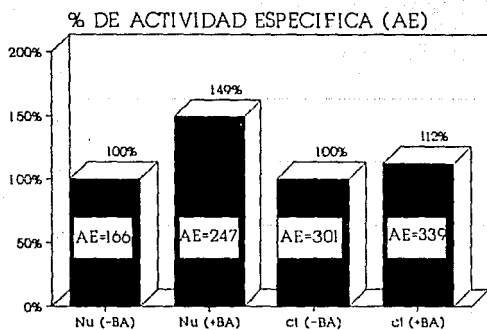


Figura 3. Porcentaje de actividad específica de la DNA polimerasa, en extractos nucleares (Nu) y citoplasmáticos (Ct), de ejes embrionarios de maíz inhibidos por 3 horas en ausencia y presencia de Bencladenina (BA). (Ensayo tipo α).

Aunque en realidad no sabemos si existen dos tipos diferentes de enzimas o sólo se trate de una sola enzima, que responde de manera diferente a la variación de sales y de pH.

Los datos que a continuación se presentan son el promedio de al menos 3 experimentos independientes.

En la tabla 2A observamos que la A.E. de la DNA polimerasa nuclear en los ensayos tipo α y β se estimula por BA. La mayor estimulación se presenta a 3 y 24 horas de imbibición. A las 3 horas de imbibición la A.E. de la DNA polimerasa, para el ensayo tipo α se estimula 32% y en el ensayo tipo β se estimula 24%. Los resultados a 24 horas de imbibición son de 36% y 37% de estimulación para el ensayo tipo α y β respectivamente. La estimulación a 6 horas es menor con 17% y 10% para el ensayo α y β respectivamente.

En la tabla 2B podemos observar que el comportamiento en la A.E. de la DNA polimerasa, en los ensayos tipo α y β en extractos citoplasmáticos, es diferente con respecto a los extractos nucleares. En los diferentes tiempos de imbibición, para el ensayo tipo α no se presenta estimulación por BA en la A.E. de la DNA polimerasa en extractos citoplasmáticos, y para el ensayo tipo β sólo se presenta estimulación por BA a 6 horas de imbibición siendo ésta de 9%.

En las tablas 2A y 2B los datos entre paréntesis corresponden al promedio de A.E. de los ensayos, dado como cpm/ μ g de proteína.

EFFECTO DE INHIBIDORES DE LAS DNA POLIMERASAS DE ANIMALES EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA DNA POLIMERASA NUCLEAR Y CITOPASMATICA.

Se ha observado que NEM y ara-CTP inhibidores de las DNA polimerasas α de animales, tienen un alto poder inhibitorio (alrededor de 90%) sobre la actividad de las enzimas aisladas a partir de extractos totales de ejes embrionarios de maíz de 3 y 24 horas de imbibición (Vázquez A., 1986).

A % DE ESTIMULACION

DNA polimerasa nuclear	tiempo de imbibición		
	3 hrs	6 hrs	24 hrs
ensayo tipo			
α	32 ± 14 (A.E. = 346)	17 ± 8 (A.E. = 390)	36 ± 12 (A.E. = 119)
β	24 ± 6 (A.E. = 181)	10 ± 2 (A.E. = 154)	37 ± 24 (A.E. = 108)

B % DE ESTIMULACION

DNA polimerasa citoplasmática	tiempo de imbibición		
	3 hrs	6 hrs	24 hrs
ensayo tipo			
α	0 (A.E. = 68)	0 (A.E. = 63)	0 (A.E. = 24)
β	0 (A.E. = 22)	9 ± 6 (A.E. = 19)	0 (A.E. = 20)

Tabla 2. Porcentaje de estimulación de la actividad específica (A.E.) de la DNA polimerasa por Benciladenina (BA), en extractos de ejes embrionarios de maíz. A) DNA polimerasa nuclear y B) DNA polimerasa citoplasmática.

Además, se ha visto que la actividad de la DNA polimerasa de extractos nucleares y citoplasmáticos de ejes embrionarios de maíz, es fuertemente inhibida por NEM (Meléndez López, S.G., comunicación personal).

Las DNA polimerasas aisladas de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de la germinación, son sensibles a afidicolina, inhibidor de DNA polimerasa α de animales, siendo inhibidas 10% a 3 horas y 60% a 24 horas después de establecida la imbibición (Vázquez A., 1986).

Otros estudios realizados en el mismo modelo indican que ddTTP, inhibidor clásico de la DNA polimerasa β de animales, muestra diferencias en la inhibición de la enzima aislada a cero horas de la germinación (Coello Coutiño, 1989).

Debido a estos antecedentes se decidió usar afidicolina y ddTTP en el presente trabajo, con el fin de distinguir entre diferentes actividades de la DNA polimerasa nuclear.

Se determinó la A.E. de la DNA polimerasa haciendo ensayos tipo α y β en presencia de los inhibidores antes mencionados (C.5.3), en extractos nucleares y citoplasmáticos obtenidos de ejes embrionarios de maíz, imbibidos en presencia y ausencia de BA durante 3, 6 y 24 horas. La acción de estas sustancias sobre las DNA polimerasas de animales han sido muy bien caracterizadas (Ikegami et al, 1978; Ohashi et al, 1978).

Las figuras 5A y 5B muestran que afidicolina, fuerte inhibidor de la DNA polimerasa α de animales, presenta diferente grado de inhibición en la A.E. de la DNA polimerasa para los ensayos α y β , tanto en extractos nucleares como en citoplasmáticos.

En la figura 5A se observa que en extractos nucleares de muestras tratadas en presencia o ausencia de BA, los valores de inhibición por afidicolina en la A.E. de la DNA polimerasa, tanto para el ensayo tipo α como para el tipo β , son en general muy variables en los tres diferentes tiempos de imbibición, encontrando valores de inhibición desde 24% hasta 41%.

En la figura 5B se observa que en los extractos citoplasmáticos de muestras tratadas en presencia y ausencia de BA, la A.E. de la enzima tanto del ensayo tipo α como del ensayo tipo β , presenta también diferentes valores de inhibición por afidicolina (desde 24% hasta 56%). Es notable que a 24 horas de imbibición la A.E. de esta enzima es en general más sensible al efecto de dicho inhibidor con respecto a 3 y 6 horas después de establecida la imbibición.

Es importante mencionar que afidicolina se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO), ya que es insoluble en agua. Por lo que fue necesario hacer un segundo control, al cual se le adicionó una cantidad equivalente del solvente en lugar de dicho inhibidor. De manera interesante se observó siempre un efecto estimulador de la A.E. de la DNA polimerasa con DMSO, preferencialmente en la fracción nuclear, el cual fue generalmente de 50% o más. Lo anterior hace suponer que la actividad de esta enzima, se favorece en un medio hidrofóbico. Todos los resultados al utilizar afidicolina están corregidos con respecto al control con DMSO

En lo que se refiere a ddTTP, inhibidor clásico de la DNA polimerasa β en animales, éste muestra un porcentaje de inhibición muy alto (entre 90% y 100%) tanto en núcleos como en citoplasma para todos los casos (ver figura 6A y 6B).

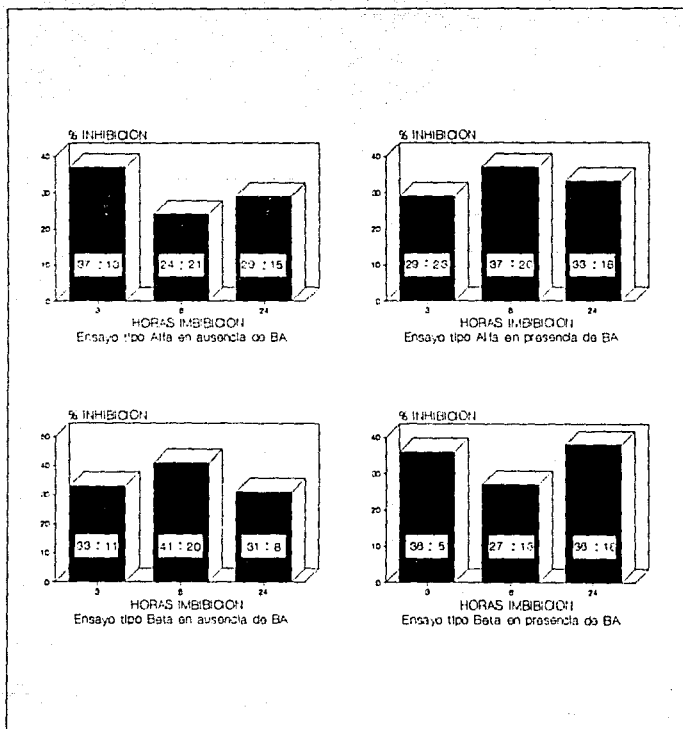


Figura 5A. Inhibición por Afidicolina de la actividad específica de la DNA polimerasa nuclear de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 3, 6 y 24 horas.

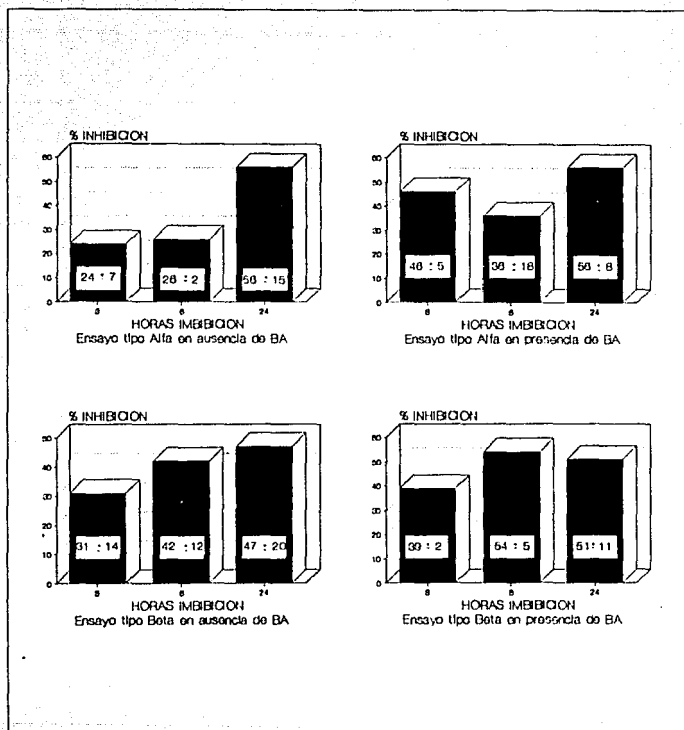


Figura 5B. Inhibición por Afidicolina de la actividad específica de la DNA polimerasa citoplasmática de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 3, 6 y 24 horas.

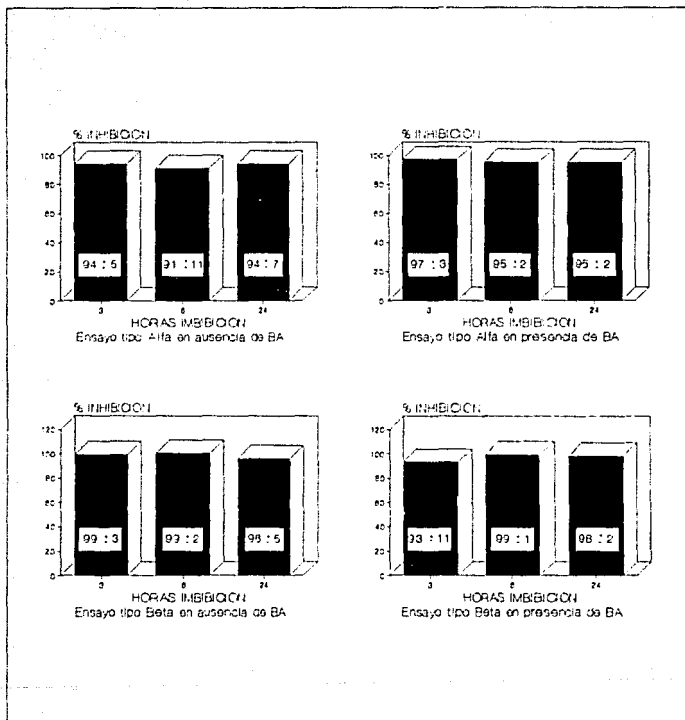


Figura 5A. Inhibición por ddTTP de la actividad específica de la DNA polimerasa nuclear de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 3, 6 y 24 horas.

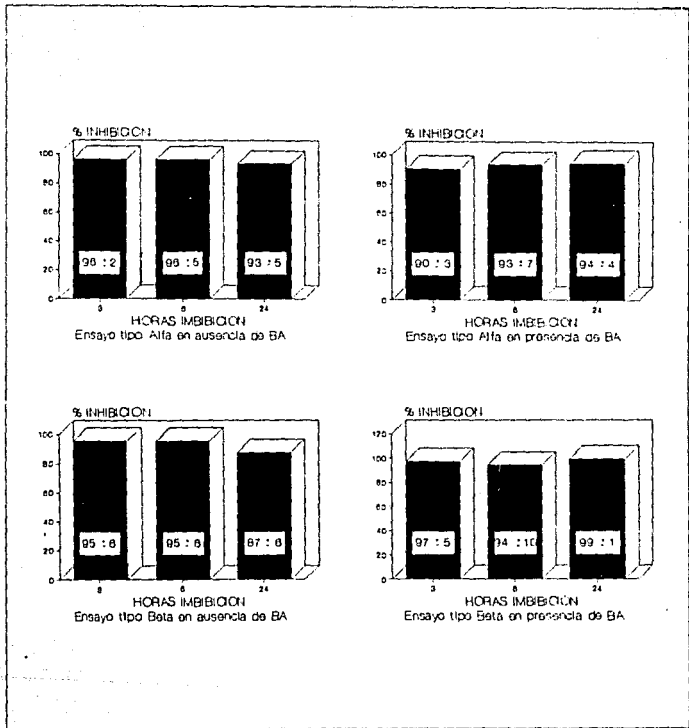


Figura 6B. Inhibición por ddTTP de la actividad específica de la DNA polimerasa citoplasmática de ejes embrionarios de imbibidos por 3, 6 y 24 horas

DISCUSION

Se sabe que el contenido de ácidos nucleicos se incrementa al aplicar exógenamente citocininas a tejidos vegetales (Yokoyama et al, 1960; Ihan y Heit, 1969; Grierson et al, 1977; Tsuji et al, 1979).

Existen evidencias de que la citocinina Benciladenina (BA) estimula la síntesis de DNA y la actividad específica (A.E.) de la DNA polimerasa, en extractos totales de ejes embrionarios de maíz (Reyes Jimenez, 1988).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, la BA estimula preferencialmente la A.E. de la DNA polimerasa en extractos nucleares con respecto a extractos citoplasmáticos de ejes embrionarios de maíz imbibidos a 3, 6 y 24 horas.

Es necesario mencionar que la A.E. de las DNA polimerasas, nuclear y citoplasmática, se determinaron por medio de ensayos tipo α y β . En ambos casos se observó la misma tendencia de los resultados.

En la tabla 2 se puede observar que para el ensayo tipo β los valores de A.E. y porcentaje de estimulación por BA, por lo general siempre fueron menores, con respecto al ensayo tipo α . En estos resultados se observó que la A.E. de la DNA polimerasa del ensayo tipo β , fue menor en un rango de 9% a 70% aproximadamente; y en lo que respecta al efecto por BA, los porcentajes de estimulación para el ensayo tipo β están entre 7% y 8% más abajo que para el ensayo de tipo α .

Lo anterior no necesariamente indica la presencia de otra enzima, ya que puede tratarse de una enzima trabajando menos eficientemente, debido a las condiciones del ensayo. No obstante existe evidencia indirecta que señala la presencia de al menos dos enzimas, tanto en extractos nucleares como en citoplasmáticos (Meléndez López y Coello Coutiño, comunicación personal).

El mayor porcentaje de estimulación por BA en la A.E. de la enzima nuclear se presentó tanto a 3 como a 24 horas de imbibición, los resultados son muy similares entre sí. La estimulación por BA a 6 horas de imbibición es menor. Es difícil decir en base a lo anteriormente expuesto, cual de las enzimas; si existe más de una, es la que fué estimulada por BA.

En cuanto a los extractos citoplasmáticos, sólo se presentó estimulación por BA a 6 horas de imbibición para el ensayo tipo β , lo cual hace suponer, que posiblemente hubo contaminación del extracto citoplasmático con el extracto nuclear.

Zarain (1987), ha sugerido que el inicio de la germinación (0-3 horas) es el mejor tiempo para que se manifieste la estimulación de la BA en ejes embrionarios de maíz. En este trabajo, se encontró que a 3 horas de imbibición la estimulación por BA en la A.E. de la DNA polimerasa nuclear es mayor que a 6 horas. Por otra parte, se ha encontrado que al menos durante las primeras 6 horas de imbibición de ejes embrionarios de maíz, no existe síntesis de *novó* de la DNA polimerasa en extractos totales (Reyes Jimenez, 1988), por lo que la estimulación de la enzima en presencia de la BA, puede ser debido directa o indirectamente, a la estimulación de la enzima *per se*.

Vázquez Ramos y S. López (1986) encontraron que entre 12 y 15 horas después de establecida la imbibición de ejes embrionarios de maíz, se inicia la síntesis replicativa de DNA. Estudios citológicos de estos tejidos muestran que las primeras mitosis marcadas, ocurren a las 24 horas de imbibición (Baiza et al. 1989), por lo tanto, al existir división celular habrá una mayor cantidad de DNA total e igualmente se espera encontrar una actividad enzimática alta, lo que sugiere que a 24 horas de imbibición la BA causa estimulación en la duplicación de DNA y se vea estimulada la actividad de la DNA polimerasa nuclear.

Por otra parte, inhibidores clásicos de las DNA polimerasas de animales como lo son afidicolina para la enzima α y ddITP para la

enzima β , fueron utilizados en los ensayos de A.E. de la DNA polimerasa en extractos de ejes embrionarios de maíz para ayudar a determinar el tipo de DNA polimerasa presente.

La DNA polimerasa nuclear es moderadamente sensible al efecto inhibidor de afidicolina, tanto para el ensayo de tipo α como para el de β , en muestras tratadas con y sin BA para los 3 diferentes periodos de germinación realizados.

En lo referente a los extractos citoplasmáticos, la inhibición por afidicolina en la A.E. de la DNA polimerasa para ensayos α y β , muestra diferencias en dichos valores, que es mayor a 24 horas de imbibición que para 3 y 6 horas de imbibición, en muestras tratadas en presencia y ausencia de la BA.

Por su parte, ddTTP inhibe altamente la A.E. de la DNA polimerasa en los ensayos tipo α y β , tanto en extractos nucleares como en citoplasmáticos imbibidos en presencia y ausencia de la BA a los 3 tiempos de germinación estudiados.

Resumiendo, la DNA polimerasa encontrada es fuertemente inhibida por ddTTP, por lo que se descarta la posibilidad de que se trate de una DNA polimerasa α clásica de animales. Tampoco se puede decir que se trata de una DNA polimerasa β debido a que esta enzima es fuertemente inhibida por NEM (Melendez López, manuscrito en preparación), además de que afidicolina la inhibe entre 25% y 50%.

Recientemente se ha descrito en el laboratorio, que esta enzima puede utilizar ribohomopolímeros sintéticos como poli(rA)-oligo(dT), característica de la enzima y pero no de la DNA polimerasa β de animales (Melendez López, manuscrito en preparación).

Por lo anterior, las características de la enzima la definen más como una DNA polimerasa tipo γ . Esta enzima en mamíferos es altamente inhibida por NEM, ddTTP y puede utilizar ribohomopolímeros sintéticos, aunque no es afectada por afidicolina (Litvak y Castroviejo, 1987). Por lo anterior es importante hacer notar que las DNA polimerasas de plantas, se

comportan de manera atípica en presencia de inhibidores específicos de las enzimas de animales. Se hace imprescindible la purificación de las DNA polimerasas de plantas y su posterior caracterización, para tener una idea más clara del número y tipos presentes en éstas.

Finalmente, a manera de comentario; se ha observado que el dimetilsulfóxido (DMSO), estimula la actividad de la DNA polimerasa de tipo ó aislada de placenta humana (Lee et al, 1986), incidentalmente, tal efecto estimulatorio también se hace presente en la actividad de la DNA polimerasa nuclear.

CONCLUSIONES

1).- La Benciladenina (BA) estimula la actividad específica (A.E.) de la DNA polimerasa nuclear en extractos de ejes embrionarios de maíz. La estimulación a las 3 y 24 horas de la germinación es mayor.

Al parecer la BA no afecta la A.E. de la DNA polimerasa en extractos citoplasmáticos de ejes embrionarios de maíz.

2).- Con el uso de inhibidores clásicos de las DNA polimerasas de animales no fue posible distinguir diferentes actividades de las DNA polimerasas de extractos de ejes embrionarios de maíz. Con ésto puede concluirse que las DNA polimerasas de plantas no responden de igual manera al efecto de inhibidores que las de su contraparte animal.

3).- La DNA polimerasa presente en núcleos podría ser de tipo γ , aunque no es posible aún descartar la presencia de otra DNA polimerasa en núcleos.

BIBLIOGRAFIA

- Addicott, F.T. (1972). Biochemical aspects of the abscisic acid in: D.J. Carr (ed), Plant growth substances. Springer-Verlag. pp.272-280.
- Albanell, E., Plaixats, J. and Andrés, J. (1985). Interaction of ABA and 6-benzyl-aminopurine on the metabolism of *Leuca minor*. Plant Cell Phys. 26: 1557-1564.
- Aldrich, S.R. and Earl, R.L. (1974). "Producción moderna del maíz". Editorial Hemisferio Sur, Argentina. pp.308-309.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during Germination. J. Plant. Physiol. 135 (4): 426-421.
- Barlow, P.W. and Pilet, P.E. (1984). The effect of abscisic acid on the cell growth, cell division and synthesis in the maize root meristem. Physiol. Plant. 62: 125-132.
- Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedrali-Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A. and Spadari, S. (1976). Variations of DNA polymerase α and β during prolonged stimulation of human lymphocytes. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 785-789.
- Bewley, J.D. and M. Black (1978). "Physiology and Biochemistry of seeds in relation to Germination". Vol.1. Springer-Verlag, London. pp. 115-117.
- Bewley, J. and M. Black (1986). Seeds Physiology of Development and Germination. Plenum Press. New York. pp. 168.
- Bidwell, R.G. (1979). "Fisiología Vegetal". AGT editor. México, D.F. pp.75-77, 409-448, 569-598.
- Bollum, F.J. (1960). Calf thymus polymerase. J. Biol. Chem. 235:2399-2403.
- Bollum, F.J. (1975). Mammalian DNA polymerases. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 15: 109-144.
- Brooker, J.D., Cheung, C.P. and Marcus, A. (1977). In "Physiology and Biochemistry of seed Dormancy and Germination". North Holland Publishing Co., Amsterdam. pp. 346-356.
- Brown, M.B., Bollum, F.J. and Chang, L.M. (1981). Intracellular localization of DNA polymerase α . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 3049-3052.
- Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J. (1978).

Characterization of the early synthesized DNA in germinating *triticum aestivum* embryos. *Phytochem.* 17: 1481-1484.

- Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L. and So, A.G. (1976). A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase δ . *Biochemistry* 15: 2817-2823.

- Castroviejo, M., Tharaud, D., Tarrago-Litvak, S. (1979) Multiple Deoxyribonucleic acid polymerases from quiescent wheat embryos. *Biochem. J.* 181: 183-191.

- Chen, D., and Osborne, D. (1970). Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos. *Nature.* 226: 1157-1160.

- Cheung, C.P., Wu, J, and Suhadolnik, A. (1979). Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during early hours of germination of wheat embryos. *Nature.* 277: 66-67.

- Coello, C.P. (1989.) Purificación parcial de la DNA polimerasa presente en ejes embrionarios de semillas no germinadas de maíz. Tesis Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.

- Córdoba, C.C. (1975). "Fisiología vegetal". Edit. H. Blume, Madrid. pág.5.

- Conaway, R.C. and Lehman, -I.R. (1982). A DNA primase activity associated with DNA polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2523-2527.

- Crute, J.J., Wahl, A.E. and Bombara, R.A. (1986). Purification and characterization of two new high molecular weight forms of DNA polymerase δ . *Biochem.* 25: 26-36.

- Dommes and Van de Walle, C. (1983) Newly synthesized mRNA is translated during the initial imbibition phase of germinating wheat embryos. *Plant. Physiol.* 173: 484-487

- Eschler, D.C., Fisher, P.A. and Korn, K. (1977). Effect of DNA polymerase α from cultured human cells. *J. Biol. Chem.* 252: 4011-4014.

- Focher, F., Ferrari, E., Spadari, S. and Hubscher, U. (1988). Do DNA polymerases δ and α act coordinately as leading and lagging strand replicases?. *FEBS letters.* 229: 6-10.

- Foster, D.N. and Gurney, T.Jr. (1974). Sizes of DNA polymerase from nucleic insolated by a non-aqueous method. *J. Cell. Biol.* 63: 2 part. 2 abst.: 103a.

- Fujisawa, H. (1966). Role of nucleic acid and protein metabolism in the initiation of growth at germination. *Plant Cell Physiol.* 7: 185-197.

- Galli, M.G. (1984). Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and BA. *Planta.* 160: 193-199.

- Gerard, G.F. (1975). Poly(2'-D-methylcytidylate)oligodeoxyguanylate, a template primer specific for reverse transcriptase, es not utilized by Hela cell γ DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 706-711.
- Geukens, M., Hardt, W., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1981). An autoradiographic demonstration of nuclear DNA replication by DNA polymerase γ . *Nucleic Acid Res.* 9: 1599-1613.
- Graveline, J., Tarrago-Litvak, Castroviejo, M. and Litvak, S. (1984). DNA primase activity from wheat embryos. *Plant Molec.Biol.* 3: 207-215.
- Grierson, D., Chambers, S.E. and Penniket, L.P. (1977). Nucleic acid and protein synthesis in discs cut from mature leaves of *Nicotina t.* and cultured on nutrient agar with and without kinetin. *Planta.* 134: 29-34.
- Horgan, H. (1984). Cytokinins. In: *Advanced plant physiology.* Ed. by Wilkins Malcom B. The Pitman Press, Rev. *Biochem.* 48: 783-836.
- Hübscher, U. (1983). DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: Mode of action and biological implication. *Experientia.* 39: 1-25.
- Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1979). Functional roles of DNA polymerases β and γ . *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 2316-2320.
- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Ogura, M., Nagano, H. and Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature.* 275: 458-460.
- Kent, N.L. (1971). "Tecnología de cereales". Ed. Acribia, España. pp.1, 7, 22.
- Khan, A.A. (1967). Antagonism between cytokinins and germination inhibitors. *Nature.* 216: 166-167.
- 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.
- Klämbt, D. (1981). Cytokinins and the hormone receptor concept: szweykowska, A. (1981). The cytokinins control of protein synthesis. In: *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins.* Guern, J. and Péaud-Lenoel, C. *Metabolism and Molecular Activity of Cytokinins.* Springer-Verlag, New York.
- Knopf, K-W., Yamada, M. and Weissbach, A. (1976). Hella cell DNA polymerase γ : Further purification and properties of the enzyme. *Biochem.* 15: 4540-4548.
- Köhler K.H., Müller, V., Hecker, M. and Brenhardt, D. (1982). Synthesis of proteins, RNA and DNA in dormant and after ripened

Caryophyllaceae seeds. Biol. Plant. (Praha). 24: 354-362.

- Kornberg, A. (1980). DNA replication. Mechanism and operations in DNA replication. W.H. Freeman and company. San Francisco. pp. 167-229.
- Kulaeva, O.N. (1981). Cytokinins action on transcription and traslation. In: Metabolism and molecular action of cytokinins. Ed. by J. Guern and C. Péaud-Lencel. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 219-227.
- Lee, M. and Toomey, N. (1987). Human Placental DNA polymerase δ : Identification of a 170 Kilodalton Polypeptide by Activity Staining and Immunobloting. Biochem. 19: 1906-2001.
- Lee, M. and Toomey, L.M. and Fenna, M.J. (1986). Isolation and characterization of human placental DNA polymerase δ . J. Cell. Biochem. Supp. 10 B. Abst. I-321. p. 235.
- Litvak, S. and Castroviejo, M. (1987) DNA polymerases from plant cells. Mutat. Res. 181: 81-91.
- Marcus, A. (1969). Seed germination and capacity for protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol. 23: 143-160.
- Marcus, A. and Feeley, J. (1964). Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51: 1075-1079
- Marcus, A., Feeley, J. and Volcani, J. (1966). Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetic of amino acid incorporation, ribosome activation and polysome formation. Plant Physiol. 41: 1167-1172.
- Mayer, A. M. and Poljakoff-Mayber, A. (1975). The greminating of seeds. Second edition. Pergamon Press. U.K. pp.21-35.
- Mckown, R.L. and Tewari, K.K. (1984). Purification and properties of a pea chloroplast DNA polymerase α . Nucleic Acid Res. 12: 3341-3352.
- Meléndez López, S. G. Actividad de las DNA polimerasas nucleares de ejes embrionarios de maíz durante las primeras horas de la germinación. Tesis Maestría. Fac. Química. Manuscrito en preparación.
- Mosbaugh, D. W. and Linn, S. (1984). Gap-filling DNA synthesis by HeLa DNA polymerase α in an *in vitro* base excision. DNA repair scheme. J. Biol. Chem. 259: 10247-10351.
- Murray, D.R. (1984). "Seed Physiology". Vol. II. Academic Press, Australia. pp. 77-115.
- Nashever, H. and Grosse, F. (1988). DNA polymerases α -primase from calf thymus. Determination of the Polypeptide responsible for primase activity. J. Biol. Chem. 263: 8981-8988.

- Nishinari, N. and Syono, K. (1986). Induction of cell division synchrony and variation of cytokinin contents through the cell cycle in tobacco cultured cell. *Plant Cell Physiol.* 22: 147-153.
- Ohashi, M., Taguchi, T. and Ikegami, S. (1978). Aphidicolin a specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 1084-1090.
- Okura, A. and Yoshida, S. (1976). Differential inhibition of DNA polymerases of calf thymus by 9- β -D-arabinofuranosyl adenina-5'-triphosphate. *J. Biochem.* 84: 727-732.
- Osborne, D. J. (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61: 3568-3577.
- Osborne, D. J. (1982). DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. *Embrionic Development.* 577-592.
- Osborne, D. J., Dell'Aquila, A. and Helder, R. H. (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early germination in seeds. *FEBS Symposium on DNA 1983. Folia Biologica (Praba) Special Publication.* 155-169.
- Parker, C.W., Lethman, D.S., Gollnow, B.I., Summons, R.E., Duke, C.C., and Macleod, J.K. (1978). Regulators of cell division in plant tissues. *Planta.* 142: 239-251.
- Pathier, B. (1979). Phytohormones and chloroplast development. *Bioch. Physiol. Pflanzen.* 174: 174-214.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* wich is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.
- Phillips, R. and L.G. Torrey (1973). DNA synthesis, cell division and specific cytodiferentiation in cultured pea root cortical explants. *Dev. Biol.* 31: 3336-3347.
- Reyes, J.J. (1988). Estimulación de la síntesis de DNA, durante las primeras horas de la germinación de *Zea mays* por Benzil-Adenina. Tesis Licenciatura. Fac. ciencias. UNAM.
- Roberts, B.E., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973). Protein synthesis and the viability of rye grains: Loss of activity of protein-synthesizing systems *in vitro* associated with a loss of viability. *Biochem. J.* 131: 275-286.
- Sen, S., Payne, P. and Osborne, D.J. (1975). Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos.
- Shioda, M., Nagano, H. and Mano, Y. (1980). Association of DNA polymerase α and β with rough endoplasmis reticulum in sea-urchin eggs and changes in subcellular distribution during early embryogenesis. *Eur. J. Biochem.* 108: 345-355.
- Skoog, F. and Miller, D.O. (1957). Chemical regulation of

growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*.
Symp. Exptl. Biol. 11: 118-31.

- So, A. and Downey, K. (1988). Mammalian DNA polymerases α and δ
current status in DNA replication. *Biochem.* 27: 4591-4595.

- Spadari, S., Müller, R. and Weissbach, A. (1974). The
dissimilitude of the low and high molecular weight
deoxyribonucleic acid-dependent deoxyribonucleic acid polymerases
of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 249: 2991-2992.

- Sussex, Ian, Clutter Mary and Walbot Virginia. (1975). BA
reserval of abscisic inhibitor of growth and RNA synthesis in
Leuca polyhyza. *J. Exp.Bot.* 56: 575-578.

- Suzuki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F. and Yamada, M. (1985).
Dissociation and reconstruction of a DNA polymerase α -primase
complex. *J. Biochem.* 98: 581-584.

- Tsuji, H., Naito, K., Hatekeyama, I. and Ueda, K. (1979).
BA-induced increase in DNA content per cell in intact bean leaves.
J. Exp.Biochem. Biophys. Acta. 324: 171-183.

- Van de Walle, C. and Bernier, C. (1976). Sequence of
reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination
of the maize embryo. *Plant Physiol.* 73: 484-487.

- Van Overbeek, J., Loeffler, J.E. and Mason (1967). Dormin
(Abscisin II), inhibitor of plant DNA synthesis. *Science.* 156:
1497-1499.

- Van Standen, J. (1983). Seeds and cytokinins. *Physiol. Plant.*
58: 340-346.

- Vázquez, A. (1986). Aislamiento y caracterización de la
actividad de DNA polimerasa de maíz. Tesis Maestría. Fac. Química.
UNAM.

- Vázquez, A. and Vázquez-Ramos, J. (1988). Characteristics of
the major DNA polymerases found during early and late maize
germination. *Can. J. Bot.* 66: 1186-1191.

- Vázquez-Ramos, J. y López, M.S. (1986). Inhibición *in vitro* de
la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de
maíz por novobiocina y ara-CTP. *Revista de la Sociedad Química de
México.*

- Vázquez-Ramos, J. and Osborne, D. (1986). Analysis of the DNA
synthesized during early germination of rye embryos using
BND-cellulose chromatography. *Mutnt. Res.* 166: 39-48.

- Velemisky, J. and Gichner, T. (1978). DNA repair in
mutagen-injured higher plants. *Mutation Res.* 55: 71-84.

- Wahl, A., Crute, J., Sabatino, R., bodner, J., Marraciano. R.,
Harwell, L., Lord, E. and Bambara, R. (1986). Properties of two
forms of DNA polymerases δ from calf thymus. *Biochem.* 25: 7821.

- Walton, D.C. and Soofi, G.S. (1969). Germination of *Phaseolus vulgaris* III. The role of nucleic acid and protein synthesis in the initiation of axes elongation. *Plant Cell Physiol.* 19: 29-38.
- Weaver Robert, J. (1976). "Reguladores de crecimiento de plantas en la agricultura". Edit. Trillas, México D.F. pp. 20-35, 102-106, 123-126.
- Weissbach, A. (1977). Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 25-47.
- Wernette, C., Conway, M. and Kuguni, L. (1988). Mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos: Kinetic processivity and fidelity of DNA polymerization. *Biochem.* 27: 6046-6054.
- Wilson, S., Abbot, J. and Widen, S. (1988). Progress toward molecular biology of DNA polymerase β . *Biochem. et Biophys. Acta.* 949: 149-157.
- Wong, S., Wahl, A., Yuan, P., Arai, N., Pearson, B., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, W. and Wang, T. (1988). Human DNA polymerase α gene expression is cell proliferation dependent and it's primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J.* 7: 37-47.
- Yagura, T., Tnaka, S., Kozu, T. Seno, T. and Korn, D. (1983). Tight association of DNA primase with a subspecies of mouse DNA polymerase α . *J. Biol. Chem.* 258: 6698-6700.
- Yokoyama Mineyuki, Naito Kunihiko and Suzuki Hiroshi. (1980). Effects of BA on chlorophyll, DNA, RNA and protein constant on attached young bean (*Phaseolus v. L.*) leaves. *Ann. Bot.* 45: 649-653.
- Yokoyama Mineyeki, Naito Kunihiko and Suzuki Hiroshi (1991). Benzyladenine-enhanced cell proliferation and suppressed greening in attached young bean leaves. *Plant Cell Physiol.* 22: 623-627.
- Yoshida, S., Yamada, M. and Mosaki, S. (1977). Inhibition of DNA polymerase α and β of calf thymus by 1- β -arabinofuranosyl-cytosine 5'-triphosphate. *Biochem. Biophys. Acta.* 477: 144-150.
- Zarain Herzberg, M., Bernal-Lugo, I. and Vázquez-Ramos, J. (1987). Effect of BA on the DNA synthesis during early germination of maize embryos axes. *Mut. Res.* 181: 103-110.
- Zarain Herzberg, M. (1987). Papel de los fitorreguladores en la inducción de la reparación de DNA en semillas de maíz. Tesis Maestría. Fac. Química. UNAM.
- Zwar, J.A. (1973). Effects of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith. *J. Exp. Bot.* 24: 701-702.