

Influjó de la irradiación con UV de 2.537 Å sobre *Nicotiana rustica* L. II. Ácidos nucleicos y proteínas *

J. Barceló, C. Morales, M.ª T. Piñol, M.ª J. Alemán y M. Serrano

Laboratorio de Fisiología Vegetal
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
Barcelona (España)

(Recibido el 20 de agosto de 1971)

J. BARCELO, C. MORALES, M.ª T. PIÑOL, M.ª J. ALEMÁN and M. SERRANO. *Influence of UV Radiation (2.537 Å) on Nicotiana rustica L. II. Nucleic Acids and Proteins.* R. esp. Fisiol., 28, 29-32. 1972.

The radiation with fractionary doses of UV of 2,537 Å causes malformations and slowness in growth in *Nicotiana rustica* L. plants, which are more noticeable the higher the doses is. It seems that UV of 2,537 Å is a obstacle to the synthesis of the nucleic acids, since the contents in plants subjected to this radiation decreases proportionally to the intensity of the radiation. Concurrently there is a slowness in the growth and a decrease in the absolute contents of protein.

Si bien aún no se ha establecido con seguridad el mecanismo molecular de la «inactivación» por la irradiación UV de corta longitud de onda (2.800-2.000 Å), la mayoría de autores se inclinan por la producción de alteraciones «estructurales» en las moléculas de ácidos nucleicos y proteínas, puesto que ambas sustancias absorben fuertemente en las bandas de 2.600 y 2.800 Å. En efecto, se citan fenómenos de «dimerización» (2), sobre todo de las bases pirimídicas, que podrían obstaculizar el curso normal de los procesos de autoduplicación del ADN, síntesis del ARN y de las proteínas, o bien, incluso,

afectar directamente a la actividad enzimática por modificaciones de las uniones entre las cadenas peptídicas que componen los propios enzimas. No obstante, de día en día se van señalando más fenómenos de inactivación por el UV lejano, que son «reactivables» por el UV de larga longitud de onda, o por la luz visible.

Dada la importancia fisiológica de los ácidos nucleicos y las proteínas, y de su papel fundamental en la regulación del metabolismo normal, y con mucha probabilidad en los fenómenos de la «inactivación» por el UV lejano, y de la «reactivación» por exposición subsiguiente a luz natural, en el presente trabajo se ha estudiado el curso de dichas sustancias en plantas jóvenes de *Nicotiana rustica* L.

* Trabajo realizado con ayuda del Fomento de la Investigación en la Universidad.

que habían recibido dosis diarias de UV lejano desde la época de siembra. En un trabajo anterior (1), se consideró el influjo de la irradiación UV de 2.537 Å sobre el crecimiento y contenido de pigmentos liposolubles de esta misma planta, bajo idénticas condiciones experimentales.

Material y métodos

Las condiciones para el cultivo e irradiación han sido las mismas que se indican en una publicación anterior (1).

Preparación del material para el análisis. Las muestras se tomaron en la fase de planta joven, en las fechas y tiempos de irradiación ya descritos (1). En todos los casos se procedió con ocho plantas (hojas + tallo) que representaban por sus medidas y aspecto la magnitud media de los cultivos. Se sumergieron en alcohol de 80 %, hirviendo, durante 5 minutos, a fin de estabilizarlas. Se dejaron en refrigerador 24 horas. Se homogeneizaron en un homogeneizador Servall Omni-mixer sumergido en un baño de metanol a -15°C . El homogeneizado se llevó a volumen conocido con alcohol de 80 %.

Extracción de los ácidos nucleicos. Se toma una parte alícuota del homogeneizado, se centrifuga, y el residuo se reextrae repetidas veces con alcohol de 80 %, hasta lograr que quede exento de clorofilas. Para la extracción de los ácidos nucleicos se sigue el método propuesto por SCHMIDT y THANNHAUSER (7). Para ello, el residuo obtenido, después de los lavados con alcohol de 80 %, se trata durante 10 minutos con ácido tricloroacético al 5 % en frío. Se centrifuga. La operación se repite otras dos veces. El ácido tricloroacético se elimina por lavado con etanol-éter (2:1) y centrifugación. En el residuo el ARN se hidroliza incubando con KOH 0,3 N durante 17 horas a 37°C . Se centrifuga y guarda el sobrenadante. El re-

siduo se lava dos veces con agua destilada, se centrifuga y los sobrenadantes se añaden al obtenido primeramente. Se desecha el residuo. El líquido se acidifica a pH 3 con ácido perclórico, precipitando el ADN y perclorato potásico. Se centrifuga; en el sobrenadante se encuentra el ARN. El residuo se trata con ácido tricloroacético al 5 % durante 10 minutos. Se centrifuga y se lava con alcohol-éter (2:1); se centrifuga nuevamente. En el residuo queda el ADN. Para la hidrólisis del ADN se sigue el método propuesto por MAYER y POLJAKOFF-MAYBER (5). Del residuo se extrae dos veces el ADN con ácido perclórico 2 N a 70°C , durante media hora. Se reúnen los extractos.

Determinación del ADN y ARN. El ADN se determina con el reactivo de difenilamina, según el método de SCHNEIDER (8), modificado por BURTON (3). Las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro Zeiss PMQII a 600 m μ . El ARN se determinó según SCHMIDT y TANNHAUSER (7), mediante lectura directa en el espectrofotómetro a 260 y 340 m μ .

Determinación del N-proteico. El residuo obtenido de la centrifugación de una parte alícuota del homogeneizado se trata con ácido tricloroacético al 10 % durante 16 horas a 2°C . Se centrifuga y el residuo se vuelve a tratar con ácido tricloroacético al 5 %, durante 20 minutos, en baño de agua a 90°C . En el residuo de «sólo proteínas» se determina el nitrógeno por el método de Kjeldahl. Para ello se efectúa la digestión según LANG (4), en un aparato «Electrothermal», que permite una regulación uniforme e igual en todos los matraces. La destilación se verifica según Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (6). Se recoge el destilado sobre una solución de ácido bórico al 1 % y se titula con ácido sulfúrico N/70, usando como indicador una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno.

Determinación del N-soluble. El sobrenadante alcohólico, junto con los líquidos de lavado del residuo, se evapora a 35° C a presión reducida; se recoge el residuo que queda con 5-10 ml de agua caliente. En una parte del extracto se determina el N por el método de Kjeldahl de acuerdo con la técnica descrita.

Resultados y discusión

Los valores de ADN y ARN por planta (hojas + tallo) (tabla I) difieren en los distintos ensayos, siendo tanto más bajos cuanto mayor es la dosis de irradiación que han recibido. Sin embargo, la proporción en que aumenta el ADN y ARN es muy parecida para todos los ensayos correspondientes a la misma muestra. Esta relación no se mantiene para las plantas del ensayo UV-5, debido, quizás, a que la alta dosis de irradiación que han recibido ha provocado en ellas perturbaciones que interfieren toda armonía o relación metabólica. Se puede concluir que la disminución o retardo del crecimiento, ocasionado por la irradiación

con UV lejano, ha afectado a la multiplicación celular, reduciéndola, a juzgar por los niveles de ADN y ARN. Otro hecho observado es que la proporción en que se produce el aumento de ADN y ARN disminuye durante el curso de crecimiento, de modo que es tanto menor cuanto más avanzado es el tiempo de toma de la muestra. Este hecho es una consecuencia lógica del curso natural de crecimiento.

El porcentaje de ADN y ARN (tabla II) es tanto mayor cuanto más alta es la dosis de irradiación y más avanzado el tiempo de toma de la muestra, es decir, las dos condiciones que marcan la mayor diferencia de peso, respectivamente, de crecimiento, entre las plantas irradiadas y las control. Este hecho es enteramente lógico y no desvirtúa la conclusión del apartado anterior relativa al influjo de la irradiación sobre la multiplicación celular, ya que el aumento de ADN y ARN y la reducción del crecimiento pueden no corresponderse, como de hecho sucede, debido a la compleja acción que la irradiación UV ejerce sobre la planta.

El contenido de nitrógeno insoluble (proteico) (tabla III) por planta (hojas +

Tabla I. ADN y ARN por planta (hojas + tallo) ensayada, expresado en microgramos.

Ensayo	Primera muestra		Segunda muestra		Tercera muestra		Cuarta muestra	
	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN
Control	37,5	77	99,0	175	162,0	267	162,0	318
UV-1	37,5	70	107,0	140	150,0	222	156,0	291
UV-3	25,0	47	68,6	92	99,0	187	150,0	199
UV-5	12,4	25	18,7	21	37,5	60	49,8	115

Tabla II. ADN y ARN expresado en porcentaje de peso seco de planta (hojas + tallo).

Ensayo	Primera muestra		Segunda muestra		Tercera muestra		Cuarta muestra	
	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN
Control	0,05	0,10	0,09	0,17	0,16	0,23	0,10	0,20
UV-1	0,05	0,09	0,13	0,18	0,14	0,22	0,10	0,18
UV-3	0,06	0,11	0,13	0,18	0,18	0,35	0,25	0,33
UV-5	0,05	0,10	0,16	0,16	0,20	0,30	0,37	0,87

Tabla III. Nitrógeno proteico por planta (hojas+tallo) ensayada, expresado en miligramos y en porcentaje de peso seco.

Ensayo	Primera muestra		Segunda muestra		Tercera muestra		Cuarta muestra	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Control	1,377	1,83	3,029	2,95	4,285	3,90	5,776	3,70
UV-1	1,296	1,80	2,592	3,12	3,820	3,80	5,729	3,67
UV-3	0,891	2,22	1,863	3,72	2,841	5,40	2,921	4,70
UV-5	0,648	2,70	0,540	4,15	1,107	5,67	1,062	7,92

Tabla IV. Nitrógeno soluble por planta (hojas+tallo) ensayada, expresado en miligramos y en porcentaje de peso seco.

Ensayo	Primera muestra		Segunda muestra		Tercera muestra		Cuarta muestra	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Control	0,648	0,86	0,712	0,69	0,972	0,75	3,115	1,99
UV-1	0,783	1,10	0,648	0,78	0,998	0,99	1,620	1,04
UV-3	0,486	1,15	0,486	0,97	0,650	1,23	0,810	1,35
UV-5	0,324	1,35	0,162	1,24	0,478	2,41	0,192	1,43

tallo) es tanto más elevado cuanto más avanzada es la fase de crecimiento, dentro del período estudiado y tanto más bajo cuanto más alta es la dosis de irradiación, como sucedía para ADN y ARN. Expresado en porcentaje, el contenido de N-proteico es también tanto mayor cuanto más avanzado es el tiempo de toma de la muestra, pero también mayor cuanto más alta es la dosis de irradiación. La proporción en que aumenta el N-proteico decrece durante el crecimiento, pero se mantiene igual en todos los ensayos correspondientes a la misma muestra, con la excepción del ensayo UV-5. Todo sucede de modo muy parecido a los ácidos nucleicos, como era de esperar, dadas las vinculaciones que existen entre unos y otros componentes.

El N-soluble (tabla IV), dado su carácter de fracción móvil y más fácilmente variable, no sigue un curso tan regular como el proteico. Sin embargo, salvo una depresión del valor por planta y en porcentaje en la muestra segunda, para la que no hallamos explicación, el curso en todos sentidos es muy parecido al seguido por el N-proteico.

Resumen

La irradiación con dosis fraccionarias de UV de 2.537 Å provoca malformaciones y retardo en el crecimiento de las plantas de *Nicotiana rustica* L., tanto mayores cuanto más elevadas son estas dosis. El UV de 2.537 Å parece obstaculizar la síntesis de ácidos nucleicos, pues el contenido en las plantas sometidas a irradiación es tanto menor cuanto mayor ha sido ésta. Concomitantemente hay un retraso en el crecimiento y disminución en el contenido por planta de N-proteico.

Bibliografía

1. BARCELÓ, J., MORALES, C., PIÑOL, M.^a T. y SERRANO, M.: *R. esp. Fisiol.*, 28, 21, 1972.
2. BEUKERS, R. y BERENDS, W.: *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 550, 1960.
3. BURTON, K.: *Biochem. J.*, 62, 315, 1956.
4. LANG, C. A.: *Analytical Chemistry*, 30, 1692, 1958.
5. MAYER, A. M. y POLJAKOFF-MAYBER, A.: *Physiologia Plantarum*, 15, 283, 1962.
6. Of. Meth. of Anal. of the Ass. Agric. Chem., 7.^a edic., 13, 1950.
7. SCHMIDT, B. y THANNHAUSER, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 161, 83, 1945.
8. SCHNEIDER, W. C.: *J. Biol. Chem.*, 161, 293, 1945.