

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS**

**“Efecto de una auxina sobre la síntesis de DNA y los niveles  
de proteínas del ciclo celular (transición G1/S) durante la  
germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz (*Zea  
mays*)”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

PRESENTA:

**Q. GUILLERMINA YAZMÍN ARELLANO SALAZAR**

**México, D.F.**

**Octubre 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del **Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos** y fue aceptado como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas por el siguiente jurado:

PRESIDENTE: Dra. Amelia Farrés González-Saravia

VOCAL: Dr. Mario Rocha Sosa

SECRETARIO: Dr. Luis Felipe Jiménez García

SUPLENTE: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUPLENTE: Dra. Carmen Gómez Eichelmann

ASESOR DE TESIS: **DR. JORGE VÁZQUEZ RAMOS**

*Gracias Dios mío por permitirme realizar este sueño.*

*A mi hijo, el gran amor de mi vida,  
haces de ser madre la experiencia más maravillosa de mi vida.*

*A mi Mami,  
gracias por su incondicionalidad, sus consejos, su amor...*

*A mi hermano,  
gracias porque siempre estás...*

*A mi Papi<sup>†</sup>, mi Abue<sup>†</sup> y mi hermano<sup>†</sup>,  
porque sé que siempre están conmigo.*

***DAIRO,***

***Gracias por haberme acompañado y apoyado todo este tiempo,  
haz sido el gran motor que me ha motivado,  
apoyado y comprendido  
durante esta etapa de mi vida,  
y sin ti este trabajo no habría sido posible.***

***Te amo.***

*Gracias Doctor por todo lo que aprendí a lo largo de este tiempo,  
las experiencias más difíciles  
son las más enriquecedoras.*

*Gracias en especial a ti Dairo,  
sin tu ayuda este trabajo no hubiera sido posible.*

*Gracias a mis compañeros del laboratorio 114,  
Naty, Pilo, Luzma, Paco y Aurorita,  
por la ayuda y enseñanzas que me brindaron.*

*Gracias en especial a ti Dairo,  
sin tu ayuda este trabajo no hubiera sido posible.*

*Gracias a mi comité tutorial,  
la Dra. Amelia Farrés González-Saravia y al Dr. Mario Rocha Sosa,  
por contribuir en mi formación.*

*Gracias al jurado que revisó esta tesis,  
por enriquecerla con todos sus comentarios.*

*Gracias Dra. Carmen Gómez Eichelmann,  
por valorar mi trabajo.*

*Gracias Doctora Cesy,  
por creer en mi.*

*Gracias a Mayte, del laboratorio de Cultivos Vegetales  
por haberme enseñado a manejar las hormonas vegetales.*

*Gracias a la Química Laurel Fabila  
por el apoyo técnico para la elaboración de esta tesis.*

*Gracias a la Q.F.B. Elvia Lazo García y al MVZ Emilio Venegas Cureño  
del laboratorio de Microbiología Molecular  
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
(responsable Dr. Antonio Verdugo Rodríguez),  
por permitirme realizar las densitometrías necesarias  
para la elaboración de esta tesis.*

*Gracias al CONACyT y a la DGEP  
por las becas otorgadas para la realización de este proyecto.*

*Gracias al Departamento de Bioquímica  
por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.*

*Gracias Maestra Tina,  
por su apoyo y cariño constantes.*

*Gracias Mario<sup>†</sup>,  
porque donde quiera que estés sé que me sigues echando porras.*

*Gracias Maestro Benjamín,  
por su cariño y consejos.*

*Gracias Maestra Rayito y Maestro Eduardo,  
por escucharme y aconsejarme.*

*Gracias Maestra Silvia, Maestro Adolfo y Doctora Gloria,  
por siempre estar al pendiente de mis problemas.*

*Gracias Rox,  
porque siempre me estás apoyando, escuchando, aconsejando y  
tolerando,  
es una bendición haberte conocido.*

# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Germinación.....	1
1.2 Ciclo Celular.....	5
1.3 Regulación del ciclo celular.....	7
1.3.1 Transición G1/S.....	7
1.3.2 Fase S.....	13
1.3.3 Transición G2/M.....	16
1.4 El ciclo celular en plantas.....	17
1.4.1 Proliferación celular.....	17
1.4.2 Las ciclinas.....	18
1.4.3 Interacción de las ciclinas con proteínas CDKs.....	21
1.4.4 La proteína relacionada al retinoblastoma RBR.....	22
1.4.5 Papel de E2F en el ciclo celular.....	23
1.4.6 Replicación del DNA.....	24
1.5 Reguladores del crecimiento de plantas (PGRs) u hormonas vegetales.....	27
1.5.1 Citocininas.....	28
1.5.2 Auxinas.....	31
1.5.3 Auxinas y citocininas.....	33
1.5.4 Ácido indol-3-acético.....	36
1.5.5 Percepción de auxina y ciclo celular.....	37
1.5.6 Auxina y expresión de genes del ciclo	38

celular.....	
1.5.7 Respuesta a auxina, degradación de proteínas y ciclo celular.....	39
1.5.8 Modelo de la acción de la auxina.....	41
1.6 Fuente carbonada.....	44
1.6.1 Procesos afectados por las vías de respuesta a azúcares y por hormonas vegetales.....	45
1.6.2 Azúcares y regulación hormonal de semillas en germinación.....	46
1.6.3 Mecanismos para las interacciones y vías de respuesta entre azúcares y hormonas.....	47
1.6.4 Influencia de los azúcares en el metabolismo y transporte de hormonas.....	48
1.6.5 Influencia de las hormonas en el metabolismo y transporte de azúcares.....	49
1.6.6 Regulación de la expresión de componentes de las vías de respuesta a hormonas por azúcares y viceversa.....	50
1.6.7 Componentes comunes entre las vías de respuesta.....	51
1.6.8 Regulación de las ciclinas D en cultivos celulares.....	52
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>55</b>
2.1 Papel de algunas proteínas dentro del ciclo celular durante la germinación de maíz.....	56
2.2 Modificación de la velocidad de germinación y el ciclo celular....	60
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>63</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>64</b>
4.1 General.....	64
4.2 Particulares.....	65

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>66</b>
5.1 Material biológico.....	66
5.2 Métodos.....	66
5.2.1 Imbibición de ejes embrionarios de semillas de maíz.....	66
5.2.2 Efecto del ácido indol-3-acético en la síntesis de DNA durante la germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz.....	67
5.2.3 Preparación de extractos crudos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de imbibición: 0, 3, 6, 9 y 12 horas.....	68
5.2.4 Cuantificación de proteína.....	68
5.2.5 Electroforesis.....	69
5.2.6 Western blot.....	69
<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
6.1 Efecto de la auxina sobre la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semilla de maíz: Determinación de la estimulación de la síntesis de DNA por AIA en ejes embrionarios de maíz.....	71
6.1.2 Determinación de la concentración óptima de AIA para la estimulación de la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz.....	73
6.2 Comparación de la influencia de AIA, BA o su mezcla en la síntesis de DNA en un medio con sacarosa o sin sacarosa.....	74
6.3 Comparación de la estimulación de la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz en presencia o ausencia de sacarosa a 15 y 30 horas de incubación.....	76
6.4 Evaluación de los niveles de proteínas marcadoras del ciclo celular durante la germinación de maíz: Efecto de auxina.....	79
6.4.1 Western blot anti-PCNA.....	80
6.4.2 Western blot anti-Polimerasa alfa.....	82
6.4.3 Western blot anti-Ciclina A1.....	84
6.4.4 Western blot anti-Ciclina D2;1.....	86

6.4.5 Western blot anti-Ciclina D4;1.....	88
6.4.6 Western blot anti-Ciclina D5;2.....	90
<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>92</b>
7.1 Efectos de la auxina, su combinación con benciladenina y la sacarosa en la síntesis de DNA.....	92
7.2 Efecto de la auxina sobre los niveles de proteínas del ciclo celular.....	94
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>101</b>

## **ABREVIATURAS**

---

<b>ABREVIATURA</b>	<b>NOMBRE</b>
ABA	Ácido abscísico
ABP1	Proteína de unión a auxina
AIA	Ácido indol-3-acético
ARF	Factores de respuesta a auxina
AuxREs	Elementos con respuesta a auxina
BA	Benciladenina
BRs	Brasinoesteroides
BSA	Albúmina sérica bovina
CAK	Cinasa activadora de Cdk
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CKs	Citocininas
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ET	Etileno
JA	Ácido jasmónico
MCM	Proteínas de Mantenimiento de Minicromosomas
MPF	Factor promotor de la mitosis
NES	Señales de exportación nuclear
NLS	Señales de localización nuclear
Orc	Complejo de reconocimiento al origen
PcG	Complejo Policomb de mamíferos
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PGR	Reguladores de crecimiento de plantas

ABREVIATURA	NOMBRE
RBR	Proteína relacionada a la proteína del retinoblastoma, en plantas
RFC	Factor de replicación C
RPA	Proteína de replicación A
Rubisco	Ribulosa 1-5 Bi-fosfato carboxilasa/oxigenasa
[9R]Z	9-ribosilzeatina
<i>cis</i> [9R-5`P]Z	9-ribosil- <i>cis</i> -zeatina 5` fosfato
Z	Zeatina

## **RESUMEN**

---

El establecimiento de una plántula implica que los procesos de proliferación celular que darán origen a las diferentes estructuras vegetales están ocurriendo ordenadamente. Estos procesos se inician cuando la semilla es plenamente embebida y se eliminan todos aquellos inhibidores que pudo haber acumulado durante su formación. El proceso germinativo es, de esta manera, una etapa del desarrollo vegetal donde la activación del ciclo celular y de sus reguladores es fundamental para la supervivencia de la planta, y que culmina cuando las células realizan la primera ronda de división celular, coincidiendo con la protrusión de la radícula (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Las plantas, como otros organismos multicelulares, usan señalizaciones de largo alcance para la comunicación entre órganos distantes (e.g. raíces y tallos) y para coordinar su crecimiento (Vogler and Kulheimer, 2003). Entre los compuestos de señalización utilizados por las plantas se encuentran las hormonas vegetales. Las auxinas son hormonas vegetales que regulan el desarrollo de las plantas a múltiples niveles y parecen tener un papel directo en la regulación de la división celular (Dudits et al., 1993). Además, se han reportado como promotoras del ciclo celular, causando una inducción rápida de la expresión de la histona H3 y de Cdc2 (John et al., 1993). Por otro lado, los azúcares pueden ser compuestos de señalización que tienen efectos marcados en todos los estados del ciclo de vida de las plantas, desde la germinación y el crecimiento hasta la reproducción y formación de semillas (Yu et al., 1996). Distintos experimentos han indicado que, aunque la división celular no es necesaria para que ocurra una germinación visible, el establecimiento del ciclo celular sí es un evento esencial, por lo que el estudio del mismo durante la germinación es fundamental. Es por ello que nos interesó estudiar el comportamiento de proteínas marcadoras del ciclo

celular en ejes embrionarios de semillas de maíz (*Zea mays*) durante la transición G1/S del mismo, cuando son influenciadas por hormonas vegetales, particularmente las auxinas (ácido indol-3-acético: AIA) y su mezcla con citocininas (BA), así como la influencia que ejerce la fuente carbonada (sacarosa ) durante ese proceso. Los resultados indican que ambas hormonas estimulan importantemente la síntesis de DNA en las etapas tempranas de la germinación y que esta estimulación depende de la presencia de sacarosa. No obstante, durante una germinación normal (en ausencia de adición de hormonas) la presencia de sacarosa no influye en la síntesis de DNA, por lo que pareciera que la estimulación del ciclo celular por hormonas y el avance de la germinación podrían ser eventos independientes. Por otro lado, se probaron diferentes marcadores del ciclo celular, de G1 y S, y se comprobó que sólo algunos de ellos responden a la estimulación por auxinas, particularmente la ciclina D5;2 y la DNA polimerasa  $\alpha$ , lo que podría explicar, al menos parcialmente, el mecanismo por el que las auxinas estimulan al ciclo celular en las etapas tempranas de la germinación.

# **INTRODUCCIÓN**

---

## **1.1 GERMINACIÓN.**

La germinación de las semillas es un evento de suma importancia en el ciclo de vida de una planta y en su posibilidad de perpetuar la especie. Este proceso empieza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente protruyendo la radícula. El proceso incluye numerosos eventos, por ejemplo, hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares (reparación de membranas, de DNA, etc.), respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular. El resultado combinado de estos eventos es la conversión de un embrión deshidratado, con un metabolismo casi nulo, en un embrión con un metabolismo activo y vigoroso.

La germinación puede ser definida desde muchos puntos de vista. El bioquímico indica que es una serie de eventos moleculares que anteceden a la primera ronda de división celular (Meléndez-López y Vázquez-Ramos, 1991); el fisiológico señala que la germinación de una semilla es la liberación del embrión desde un estado de reposo que refleja el cambio de un metabolismo casi nulo, hasta un metabolismo óptimo que permite la continuación del crecimiento (Jann and Amen, 1977); y por último, el punto de vista agronómico considera que la germinación implica la emergencia y desarrollo de las estructuras provenientes del embrión, manifestando así la capacidad de la semilla para formar una plántula bajo condiciones favorables (ISTA, 1985).

Una vez que el metabolismo de la germinación se activa con la entrada de agua, la síntesis de proteínas tiene lugar y aumenta conforme avanza la germinación (Datta et al. 1983; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Se ha sugerido que la síntesis de

proteínas que ocurre durante las primeras horas de la germinación está respaldada por mRNAs preformados durante el desarrollo de la semilla y por mRNAs transcritos *de novo* (Spiegel and Marcus, 1975; Datta et al. 1983; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Masumori et al. 1992), mientras que la síntesis de proteínas que se presenta en etapas tardías de la germinación es casi sólo dependiente de la transcripción de nuevos mensajeros, exclusivos de la germinación, aunque algunos mRNAs preformados durante la embriogénesis pueden ser traducidos en etapas tardías de la germinación (Caers et al. 1979; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Así, durante las primeras horas de la germinación, el patrón de las proteínas existentes no exhibe cambios cualitativos importantes, mientras que a tiempos tardíos sí existen cambios (Spiegel and Marcus, 1975; Sánchez de Jiménez et al. 1981; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

Otro de los eventos que se inicia en tiempos tempranos de la germinación es la síntesis de DNA. Al respecto, se ha reportado que la síntesis temprana de DNA es de tipo reparativo (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Zaráin et al., 1987) y organelar (Zlatanova et al. 1987), siendo la síntesis replicativa del DNA un evento tardío. En semillas de maíz se ha reportado que la duplicación del DNA se inicia entre las 15 y 20 horas de imbibición, alcanzan su máximo a las 40 horas (Viaza et al. 1989).

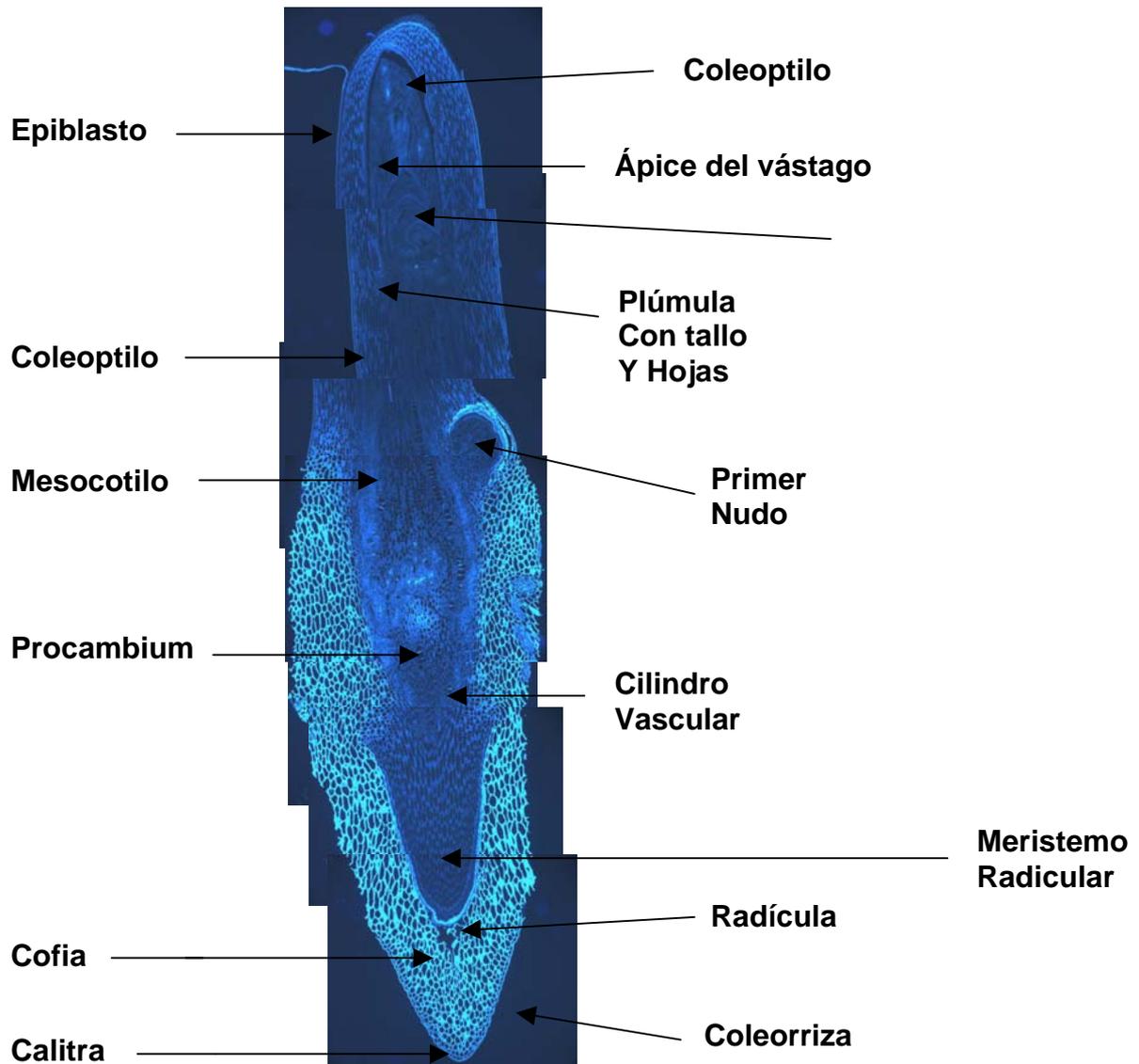
En un estado avanzado de la germinación se inicia otro evento celular de suma importancia desde un punto de vista bioquímico, que puede marcar el fin de ésta: la división celular. La división celular señala entonces el inicio del crecimiento del eje embrionario por proliferación celular para dar origen a una nueva plántula. En el caso concreto de ejes embrionarios de maíz (Figura 1) se ha reportado que la división celular se inicia a las 28 horas de imbibición (Baíza et.al. 1989).

El proceso de germinación puede llegar a su fin sin problemas si las condiciones ambientales de humedad, temperatura y oxígeno son adecuadas. Sin embargo, si alguno

de los factores llega a escasear, en particular la humedad (Hegarty, 1978), la germinación puede afectarse desde una disminución en su velocidad, hasta su inhibición total (Karssen et al. 1989). Si las condiciones óptimas de germinación son restituidas, las semillas podrán o no germinar, dependiendo del grado de avance en el proceso germinativo que se haya alcanzado antes del estrés, así como su duración.

El hecho de que el proceso germinativo pueda o no seguir, dependiendo del grado de avance de la germinación, sugiere que existe un punto de compromiso, antes del cual los procesos de germinación pueden suceder sin alterar la viabilidad de las semillas en caso de que éste fuera interrumpido, sobre todo por un déficit hídrico; mientras que si la germinación rebasa dicho punto y se presenta el déficit hídrico, el poder germinativo de las semillas podría disminuir considerablemente, e incluso llevar a las semillas a la pérdida total de la viabilidad.

A continuación se muestra un esquema del eje embrionario de semilla de maíz (Figura 1).



**Figura 1. Corte longitudinal de un eje embrionario de semilla de maíz. Microscopía de fluorescencia. Partes del eje embrionario de semilla de maíz: Meristemos:** Los meristemos más importantes son el apical (parte de arriba del eje), radicular (en la raíz), laterales (crecimiento de ramas y hojas). Son zonas de crecimiento continuo durante toda la vida de la planta, de hecho son las zonas por donde crece la planta. **Epiblasto:** Es la estructura localizada en el tallo que contiene las primeras hojas ya formadas con el primordio del tallo. **Coleoptilo:** Este tejido da origen al tallo de la planta. **Mesocotilo:** Es la zona limitante entre el tallo y la raíz. **Cofia:** Estructura localizada en la raíz, por donde la planta absorbe los nutrientes. **Calitra:** Zona localizada en la punta de la raíz que promueve la perforación de la tierra por donde la raíz se va a pasar. **Coleoriza:** Estructura de la raíz que envuelve a la cofia. **Cilindro vascular y procambium:** Estas estructuras son las que dan origen a la vasculatura de la planta, que son el xilema y floema. (Tesis de Doctorado del M. en C. Dairo Jesús Orjuela Henry, aún sin publicar).

## 1.2 CICLO CELULAR

El ciclo celular tiene como finalidad la división de una célula para dar origen a dos células hijas genéticamente idénticas a la progenitora y es un proceso sumamente conservado. En eucariontes, el ciclo celular está definido por cuatro fases que bien podrían considerarse como una fase de duplicación del material genético (Fase S) y una fase de repartición equitativa de éste entre las dos células hijas (fase M), separadas ambas por dos fases, G1 y G2, en las que se regulan los tiempos y el orden de estos procesos. Cuando en una célula se ha iniciado el camino hacia la proliferación, la entrada a la fase G1 se da a partir de un estadio celular denominado fase G0, en el cual la célula no se divide. Dentro de la fase G1 se encuentra una etapa temprana en la que se revisa el estado metabólico general de las células, se monitorea su tamaño y el ambiente que las rodea, antes de avanzar hasta una etapa tardía, donde se presentan mecanismos reguladores que permitirán el inicio de la duplicación del DNA, o fase S. En la fase G1, los eventos tempranos están separados de los tardíos por un punto de restricción (R), este punto marca el límite después del cual la célula está comprometida a completar íntegramente el ciclo celular. Una vez que se completa la síntesis del DNA, se presenta otra fase de revisión (G2), cuya función es asegurarse de que la duplicación de DNA haya sido completada de manera fidedigna y donde se encuentran controles moleculares que aseguran que las dos nuevas moléculas de DNA se encuentren intactas antes de entrar a la fase de división cromosómica o fase M. Finalmente, tras la citocinesis, las células hijas se encuentran nuevamente en la fase G1 temprana donde se decidirá si se inicia una nueva ronda de divisiones o se toma el camino hacia una fase G0 no comprometida con el ciclo celular.

Una célula en división puede abandonar el ciclo celular hacia un estado de desarrollo vegetativo o de diferenciación, y las decisiones para ello ocurren en la fase G1. Al parecer, el punto de restricción R en esta fase funciona como un punto de bifurcación. Antes de consumir la ejecución de R la célula puede emprender el camino hacia diferentes estados celulares como la quiescencia, la diferenciación o la meiosis, mientras que la conclusión de R obliga a la célula a cumplir un riguroso programa de división celular.

La decisión de la vía que una célula puede tomar está regulada en parte por diversos factores externos como hormonas, circunstancias nutricionales y por diferentes tipos de estrés; sin embargo, estos factores afectan a la fase G1 antes del punto R pero no tienen efectos reguladores cuando éste ha sido completado y la célula se ha comprometido a dividirse.

Diversos estudios han indicado claramente que, tanto los controles moleculares que regulan el avance sobre R como aquéllos que regulan los tiempos de duración de las otras fases del ciclo, están mediados por cascadas de fosforilación de proteínas. Estos sistemas de control del ciclo celular convergen en complejos clave formados por una ciclina y una cinasa dependiente de ciclinas (Cdk), los complejos ciclina/Cdk (Pines, 1993).

Debido a la importante función que tienen, las Cdks deben ser finamente reguladas, y como su nombre lo indica requieren de una ciclina para ser activadas. La ciclina, además de activar a la Cdk, también ayuda a su estabilización, a su localización celular y le confiere especificidad de sustrato (Pines, 1995). La actividad del complejo también es regulada por fosforilación y desfosforilación, y el complejo es totalmente activo sólo después de que es fosforilado en la Thr 160 o 161 (Draetta et al. 1988; Krek and Nigg, 1991) y desfosforilado en Thr 14 y Tyr 15 (Gould and Nurse, 1989). Las

Cdks responsables de la progresión de la fase G1 y entrada a la fase S son las Cdk4 y Cdk6, las cuales son activas en presencia de las ciclinas tipo D; en la transición G1/S y durante S, el complejo activo está formado por Cdk2 unida a ciclina E o a una ciclina A; en la transición G2/M el complejo activo es el de Cdk1 (o Cdc2) unido a ciclina A o bien unido a ciclina B. La función de cada uno de los complejos en las diferentes etapas del ciclo celular permite que los procesos se realicen de manera controlada para que la división celular se lleve a cabo exitosamente.

## **1.3 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR**

### ***1.3.1 Transición G1/S.***

En la fase G1 se encuentran dos importantes puntos de control: el paso sobre el punto de restricción R que separa G1 temprano de G1 tardío, que compromete a la célula hacia la vía de división celular, y la transición de G1 tardío a la fase S. Como se mencionó, los complejos ciclina/Cdk tienen un papel determinante en esta regulación.

Al complejo proteico ciclina D y una cinasa Cdk4 o Cdk6 se le identifica como la puerta de entrada al ciclo celular y es quien regula el punto R previo al compromiso de continuar con el ciclo (Hutchison and Glover, 1995). La tarea principal de este complejo ciclina-cinasa es la de fosforilar y así inhibir a una proteína con función anti-proliferativa, la proteína del retinoblastoma o pRB para así permitir el avance del ciclo hacia la fase S. pRB es una proteína que tiene la característica de unir a una serie de proteínas que participan en la regulación de la transcripción y de esta manera influye tanto positiva como negativamente en la expresión génica celular. En particular, pRB secuestra un tipo de factores transcripcionales fundamentales para el establecimiento de

la fase S, los pertenecientes a la familia E2F-DP. La fosforilación de pRB permite la liberación de E2F-DP, de tal forma que ahora sea posible su acción como factor transcripcional, promoviendo genes cuyos productos proteicos participan en G1/S tardía. Entre los genes que son expresados como resultado de la acción del factor E2F-DP se encuentran varios cuyos productos proteicos participan en el reconocimiento y activación de los orígenes cromosomales y en la replicación del DNA, como son los que codifican para las proteínas Orc, las MCM (mantenimiento de minicromosomas), la DNA polimerasa  $\alpha$  (la enzima con actividad de polimerasa-primasa), la DNA ligasa, la timidina cinasa, la timidilato sintasa, y el antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA, proteína esencial para el metabolismo del DNA y que tiene funciones importantes en procesos celulares como la replicación del DNA, su reparación y el control del ciclo celular (Prelich and Stilman, 1988; Shivji et al. 1992; Xiong et al. 1992). Inicialmente se le describió como un factor que estimulaba la actividad e incrementaba la procesividad de las DNA polimerasas tipo  $\delta$  y  $\epsilon$  (Tan et al. 1986; Prelich et al. 1987; Burgers, 1991). En esta función actúa como un “sliding clamp” o pinza móvil que rodea al DNA de manera dependiente del factor de replicación C (RFC) estimulando el paso de la DNA polimerasa a lo largo de la horquilla de replicación.

La expresión de los genes codificantes para otras ciclinas, como son las ciclina E y A, también es modulada por el factor E2F-DP. Estas ciclinas, junto con sus respectivas cinasas del tipo Cdk2, participan de manera importante en la regulación de la entrada de las células a la fase S (Hutchison and Glover, 1995). De hecho, el factor E2F-DP promueve la expresión de la ciclina E y la de su propio gen, de tal forma que en células en proliferación, como aquéllas que han superado el punto de restricción (R) la expresión de la ciclina E es periódica y máxima en la transición G1/S; en este intervalo, la ciclina E se encuentra asociada con su cinasa.

Con la reciente adición de dos miembros nuevos, la familia de E2F consiste de ocho proteínas en mamíferos, cuya función puede ser promover, o bien reprimir la transcripción. E2F 1-6 son los que se caracterizaron inicialmente, mientras que E2F7 (de Bruin et al. 2003; Logan et al. 2004) y E2F8 (en ratón) (Maiti et al. 2005) han sido recientemente identificados y muestran poca homología con sus tradicionales contrapartes. Todos los miembros establecidos (E2F1-6) poseen un extremo amino terminal de unión a DNA y dominios de dimerización de la proteína, seguidos de una caja marcada (“marked box”), una región conservada involucrada en la dimerización y el plegamiento del DNA. Con excepción de E2F6, todos poseen un dominio carboxilo terminal de transactivación, el cual contiene la región de unión a proteínas llamada “pocket”. Otras diferencias estructurales incluyen la presencia de señales de localización nuclear (NLS) (Müller et al. 1997) y dominios de unión a ciclina A en las regiones amino terminal de E2F1-3 (Leone et. al. 2000). El gen de E2F3 codifica dos productos proteicos diferentes, y la forma más pequeña, E2F3b, carece del dominio de unión a ciclina A. Las proteínas E2F4 y E2F5 están marcadas con señales de exportación nuclear (NES) y cuentan con dominios de heterodimerización con miembros del polipéptido DP para asegurar su traslocación al núcleo. La presencia de señales de localización asegura el continuo movimiento núcleo-citoplasma que es importante para modular efectivamente la actividad de los E2Fs de una manera dependiente del ciclo celular (Verona et al. 1997).

Basados en las diferencias de secuencia que aparentemente determinan su función, la familia de E2F está dividida en tres grupos: E2F1-3 comprende al grupo activador debido a su habilidad de inducir la entrada a la fase S en células quiescentes (Johnson et al. 1993; Qin et al. 1994; DeGregori et al. 1997) y ser inhibidos por la acción de p16<sup>INK4a</sup> (inhibidor de CKDs) (Lukas et al. 1996). Por otro lado, E2F4 y E2F5

constituyen el grupo represor, que parece ser importante para la salida del ciclo celular y procesos de diferenciación terminales, como adipogénesis (Fajas et al. 2002; Landsberg et al. 2003) y maduración de eritrocitos (Humbert et al. 2000). Por último, E2F6 (Morkel et al. 1997; Cartwright et al. 1998), que también actúa como represor, es único debido a su capacidad para interactuar con miembros del complejo policomb de mamíferos (PcG) y no con “pocket proteins” (Trimarchi et al. 2001; Tsantoulis et al. 2005).

De esta manera los complejos E2F-DP son considerados parte del mecanismo por el cual las células pueden proliferar o diferenciarse y especializarse.

La ciclina E y su cinasa asociada fosforilan también a pRB, aunque en sitios diferentes a los fosforilados por la ciclina D-cinasa, muy probablemente acelerando su inactivación (Kitagawa et al. 1996). Esta relación positiva que existe entre ciclina E y E2F produce un rápido incremento de ambas actividades según las células se acercan a los límites de G1/S. En este estado de compromiso irreversible de entrar a la fase S, la inactivación por fosforilación de pRB cambia de ser dependiente de mitógenos (ciclina D-cinasa) a ser independiente de éstos (ciclina E-cinasa). Aparentemente las ciclinas A y B, con sus cinasas asociadas, también contribuyen a la fosforilación de pRB, asegurando de esta manera que esta proteína se mantenga inactiva por el resto del ciclo.

Recientemente, la proteína pRB ha recibido mucha atención al demostrarse que no es simplemente una proteína inhibidora del ciclo celular, sino que asociada a otras proteínas, entre las que se encuentran las variantes de E2F, participa activamente en el control de la expresión génica y probablemente también en el remodelaje cromatínico (Kaelin, 1999).

La ciclina A, cuya función es necesaria en la transición hacia la mitosis, es también una proteína importante en la fase S. La síntesis de esta ciclina en G1 tardía es

esencial para la entrada de las células hacia la fase S (Girard et al. 1991), y su presencia se relaciona con la propiedad de adhesión que muestran las células en esta etapa (Zhu et al. 1996). Además de la fosforilación de pRb por las ciclinas E y A asociadas a Cdk2, los substratos que fosforilan estos complejos no se conocen aún; sin embargo, se acumula evidencia que indica que éstos deben de estar relacionados con la activación de los orígenes de replicación y con la localización de las proteínas que participan en la replicación del DNA.

Una vez que las células han entrado a la fase S, se requiere de la inactivación de la ciclina E y del factor E2F para la progresión del ciclo. La ciclina E es rápidamente destruida por el sistema de proteólisis dependiente de ubiquitina, después de que la ciclina es marcada para su degradación mediante fosforilación por su propia cinasa asociada (Won and Reed, 1996). Por otra parte, el complejo de ciclina A-Cdk2, el cual se acumula durante la fase S, une a E2F y fosforila a una de sus subunidades proteicas, impidiendo así su unión al DNA y por lo tanto, su actividad de transactivación (Krek et al. 1995). Al eliminar la acción de estos dos complejos proteicos, las células estarían asegurando que el impulso bioquímico que les permite pasar de la fase G1 a la de S sólo ocurre en etapas definidas, impidiendo, igualmente, la acumulación innecesaria de productos génicos que de otra manera podrían ocasionar la desregulación del ciclo celular.

La inactivación de pRB no elimina del todo el requerimiento celular de factores de crecimiento presentes en el medio, indicando de esta manera que otros eventos en adición a la fosforilación de pRB contribuyen al control en el punto de restricción (R). De hecho, existen al menos dos familias de proteínas cuya función primordial es la de inhibir los complejos ciclina-cinasa, para así controlar el avance del ciclo. Una de éstas la constituye el grupo de proteínas compuesto por p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>, que tienen

como blanco a los complejos de ciclina D-Cdk4/6 y de ciclina E-Cdk2. De éstas, p21<sup>Cip1</sup> es la más conocida dado que su expresión depende de la previa acción del supresor tumoral p53, también llamado “el guardián del genoma”. Durante G1, el complejo ciclina D-Cdk4(6) se encuentra frecuentemente asociado con p21<sup>Cip1</sup> y también a PCNA, ésta última puede servir como el punto de encuentro de múltiples enzimas para el metabolismo del DNA (replicación, reparación, recombinación) y de factores regulatorios como las ciclinas-Cdks.

El daño al DNA nuclear o perturbaciones en su metabolismo provoca en las células una respuesta de “emergencia”, por la cual el paso hacia la fase S, o bien hacia la fase M se detiene, dependiendo de la etapa del ciclo celular en que las células se encuentren. Esta respuesta es mediada, por la acción de p53, proteína que actúa inhibiendo el avance del ciclo. Aunque originalmente fue descrita como una proteína presente en la mayoría de los tumores malignos (Hollstein et al. 1991), p53 es en realidad un modulador transcripcional, y actúa ya sea para activar o para reprimir la transcripción de genes específicos; entre los genes que activa se encuentra precisamente p21<sup>Cip1</sup>. p53 es el paradigma de proteínas de “checkpoint”, aquellas proteínas no esenciales, cuya función es la de vigilar el avance del ciclo celular, y que participan en él sólo en casos de emergencia, como lo pueden ser el daño al DNA o la detención de su replicación.

La acumulación de p21 es parte del mecanismo por el que p53 detiene a las células en G1 (el Deiry et al. 1993). p21 se encuentra presente en complejos formados por diferentes ciclinas-cinasas: ciclina D-Cdk4/6, ciclina E-Cdk2 y ciclina A-Cdk2; en todos estos complejos también se encuentra presente PCNA. La evidencia indicaba que la función de p21 era la de impedir el paso de las células de G1 a S, sin embargo, recientemente se ha demostrado que más que un inhibidor p21, actuaría como una

proteína importante en la estructuración del complejo ciclina D-Cdk4/6 y quizás también en su transporte al núcleo (Cheng et al. 1999). Existen también datos experimentales que demuestran que p21 puede directamente inhibir la replicación del DNA al interactuar con PCNA (Waga et al. 1994).

Por su parte, p27<sup>Kip1</sup> podría ser el factor más involucrado en el control del punto de restricción. p27<sup>Kip1</sup> se encuentra presente en altos niveles en células quiescentes, pero los niveles decaen cuando comienza la proliferación y la cantidad residual es secuestrada por el complejo de ciclina D, y evita así la inhibición por p27 de la actividad de cinasa en los complejos que contienen ciclinas E y A (Kato et al. 1994). La remoción de factores de crecimiento de los cultivos celulares provoca la degradación de la ciclina D, y por tanto la liberación de p27<sup>Kip1</sup>, además del incremento de su síntesis, lo que ocasiona que las células se estacionen en G1, o bien, salgan hacia G0.

La otra familia de inhibidores de ciclinas-cinasas está compuesta por una serie de cuatro proteínas Ink4 de bajo peso molecular: p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> y p19<sup>Ink4d</sup> (p19ARF) que también actúan como supresores de tumores. La función de estos inhibidores de proliferación está más localizada hacia la fase G1 temprana, donde el complejo ciclina D-Cdk4/6 es su blanco más importante, impidiendo de esta manera el establecimiento del compromiso de proliferación. Al parecer, su acumulación es dependiente del estado nutricional celular. La expresión de las diferentes proteínas Ink4 parece ser tejido específica, por lo que no son redundantes (Sher, 1996).

### ***1.3.2 Fase S.***

La iniciación de la fase S es el resultado de varios eventos moleculares independientes que preparan los orígenes de replicación para poder ser reconocidos y

activados. Al menos, catorce diferentes proteínas participan directamente en el reconocimiento de los orígenes: seis proteínas Orc (Orc 1-6, complejo de reconocimiento al origen), seis proteínas MCM (MCM 2-7, proteínas de Mantenimiento de Minicromosomas), y los productos de los genes *cdc6* y *cdt1* (Fujita, 1999). El reconocimiento del origen es necesario, pero no suficiente, para iniciar la replicación. La mayoría de estas proteínas se unen al origen de replicación del DNA en telofase o en G1 temprana, y están esperando una señal para proseguir; aparentemente la señal es la activación de dos actividades de cinasa en G1 tardía que fosforilan a sus proteínas blanco y promueven el inicio de la replicación del DNA. Una de estas cinasas es la formada por ciclina E-Cdk2 y la otra, el complejo formado por Cdc7-Dbf4 (o DDK, cinasa dependiente de Dbf4), una cinasa que no forma complejos con ciclinas. El resultado es la activación de la mayoría de las proteínas Orc, MCMs y la proteína Cdc6 (Takisawa et al. 2000). La DDK parece ser activada después de la fosforilación por una ciclina-Cdk. De esta forma, las proteínas MCM 4, 6 y 7 despliegan una actividad de helicasa que separa el DNA de doble cadena de manera bidireccional (Fujita, 1999). El desensamblaje resultante de las proteínas unidas al origen promueve la síntesis de DNA, pero lo más importante, evita la reiniciación de la replicación de los cromosomas, asegurándose que ésta ocurra una sola vez por ciclo celular (Fujita, 1999; Takisawa et al. 2000).

La separación de las hebras del DNA en el origen permite que las proteínas replicativas interactúen con la hebra sencilla de DNA. Al parecer, la llegada de la proteína heterotrimérica RPA (proteína de replicación A) es el primer evento. La presencia de RPA asegura la entrada de la DNA primasa, la enzima responsable de la síntesis del oligorribonucleótido (cebador o “primer”) que va a funcionar como anclaje

del extremo 3'-OH terminal para la reacción de polimerización catalizada por las DNA polimerasas

(Kornberg and Baker, 1992). La DNA primasa es una proteína heterodimérica que es parte de la heterotetramérica DNA polimerasa  $\alpha$  replicativa. Esta enzima es cargada al DNA por la proteína producto del gen *cdc45* (Mimura and Takisawa, 1998).

La actividad de DNA primasa en la DNA polimerasa  $\alpha$  sintetiza un cebador de RNA de entre 15 a 30 nucleótidos que es extendido con 20 a 30 desoxinucleótidos por la actividad de polimerasa de la DNA polimerasa  $\alpha$  (Waga and Stillman, 1998). Una característica ineludible de las DNA polimerasas replicativas debe ser su capacidad para adicionar, al menos, cientos de desoxinucleótidos sin desengancharse del templado del DNA. Las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  son enzimas replicativas en eucariontes que poseen esta característica. La DNA polimerasa  $\delta$  es una enzima heterotrimérica de alta fidelidad que mantiene su asociación continua al templado de DNA por asociación con la proteína PCNA. Aparentemente, la DNA polimerasa  $\epsilon$ , una proteína heteropentamérica, también puede hacer uso de PCNA (Kelman, 1997; Waga and Stillman, 1998). El papel de PCNA en estos complejos es el de formar un homotrímero que rodea al DNA en la estructura de transición entre hebra sencilla y doble generada por el cebador en el que protruye el extremo 3'-OH terminal (Kelman, 1997). La DNA polimerasa  $\delta$  (ó  $\epsilon$ ) reconoce este complejo DNA-PCNA, y utilizando a PCNA como pinza móvil se desliza a lo largo del DNA añadiendo desoxinucleótidos nuevos. El montaje de PCNA sobre el DNA requiere de la acción de un complejo proteico heteropentamérico, RFC (Factor de Replicación C) que también puede desmontar a PCNA de las horquillas de replicación terminadas (Kornberg and Baker, 1992). Este proceso aplica para ambos sentidos de las cadenas de replicación. En la hebra retardada la replicación avanza por medio de los fragmentos de Okazaki que se unen por la acción de la DNA ligasa 1; los cebadores de

RNA son removidos previamente por la acción de enzimas del tipo RNAsa H (Waga and Stillman, 1998).

Las ciclinas-Cdks, al parecer también participan en la regulación de eventos que suceden durante la replicación del DNA. El complejo ciclina A-Cdk2 ha sido implicado en la fosforilación de proteínas como RFC, y probablemente de las proteínas MCM y las DNA polimerasas, para disminuir o inhibir su actividad (Schub et al. 2001). Tal vez el papel de la ciclina A-Cdk2 durante la fase S es el de permitir el intercambio enzimático para madurar los fragmentos de Okazaki al final de los replicones.

### ***1.3.3 Transición G2/M.***

En esta transición se encuentra otro de los puntos de restricción del ciclo celular. Nuevamente, el papel regulador final está sustentado por un complejo ciclina-Cdk. La transición G2/M está regulada universalmente por el complejo ciclinaB-p34<sup>cdc2</sup> (originalmente MPF, Mitosis-Promoting Factor; Nurse, 1990). MPF se acumula durante las fases S y G2 en el citoplasma, pero se mueve al núcleo al comienzo de la profase (Pines and Hunter, 1991) localizándose en la lámina nuclear, en el huso mitótico y otras estructuras. La actividad de MPF se elimina por destrucción de la ciclina al final de M, permitiendo el reingreso de las células a la fase G1.

Durante la fase G2, la actividad del complejo está regulada diferencialmente por fosforilación:

- Una actividad reguladora positiva (CAK, Cdk Activating Kinase) fosforila en residuos de treonina (Kaldis et al. 1996).
- Una actividad reguladora negativa fosforila en residuos de treonina 14 y tirosina 15 (Norbury et al. 1991). La transición hacia la fase M se logra con

la defosforilación de los residuos Thr 14 y Tyr 15, por medio de la proteína fosfatasa específica cdc25 (Russell and Nurse, 1986).

## **1.4 EL CICLO CELULAR EN PLANTAS.**

Las estrategias y señales generales del control del ciclo celular y su maquinaria básica están altamente conservadas en todos los eucariontes y el hecho de que las plantas no son la excepción se corroboró al secuenciar el genoma de *Arabidopsis thaliana*.

A pesar de la conservación evolutiva de la maquinaria del ciclo celular, los mecanismos de la regulación individual varían considerablemente entre las especies en dos aspectos principales, en primer lugar, la regulación de la disponibilidad de los componentes del ciclo celular en diferentes tipos celulares y organismos por regulación transcripcional y traduccional, proteólisis, modificaciones post-traduccionales y localización subcelular; y en segundo lugar, las diferencias en modular la función de una serie de blancos que eventualmente conllevan a diferentes consecuencias río abajo, particularmente en el contexto de organismos completos (Gutierrez, 2005).

### ***1.4.1 Proliferación celular.***

La multicelularidad es probablemente una de las fuentes de las diferencias evolutivas en la regulación de la proliferación celular. En organismos multicelulares, la proliferación celular debe ser coordinada con la diferenciación celular, crecimiento de los órganos y programas de desarrollo específicos. Mientras la organogénesis en animales ocurre largamente durante la embriogénesis, en plantas, la iniciación de

órganos y el crecimiento es un proceso continuo y reiterativo que ocurre postembriónicamente a lo largo de toda la vida del organismo, y que puede durar cientos de años en algunas especies, hecho que se sustenta en la existencia de nichos de células madre en los meristemos (Weigel et al. 2002). Las células madre mantienen su potencial proliferativo y generan continuamente nuevas células que salen de la división celular, dejan los meristemos y siguen diferentes patrones de crecimiento en respuesta a señales ambientales, de desarrollo y hormonales. Además, las células vegetales tienen otro tipo de presiones que las diferencian de las células animales: tienen vida sésil, por lo que han desarrollado mecanismos de respuesta efectivos para adaptarse a cambios ambientales como luz, gravedad, heridas, nutrientes y condiciones de estrés, y muchas veces en estas respuestas se modifican los patrones de división celular; poseen también una pared rígida que impide a las células moverse, por lo que la organogénesis depende de la división celular y la expansión de células en el sitio de formación de nuevos órganos (Gutierrez, 2005).

#### ***1.4.2 Las ciclinas.***

Los puntos más importantes en el control de la progresión del ciclo celular en eucariontes son, antes de la síntesis del DNA (transición G1/S) y antes del inicio de la mitosis (transición G2/M) (Pines, 1995; Huntley and Murray, 1999). Las ciclinas, como ya se mencionó, son proteínas limitantes que regulan estas transiciones a través de la activación de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La mayoría de los organismos contienen diferentes grupos de ciclinas que generalmente tienen funciones especializadas. Los genomas de las plantas superiores también contienen diferentes grupos de genes de ciclinas que han sido clasificados de acuerdo a características

estructurales y nombrados de acuerdo al grupo más similar de ciclinas de mamíferos (Renaudin et al. 1996). De cualquier forma, las ciclinas de plantas forman grupos filogenéticamente diferentes a los de ciclinas de mamíferos, sugiriendo que su función se especializó después de la divergencia evolutiva de los linajes de plantas y animales. Más aún, cada grupo de ciclinas de plantas tiende a tener muchos más miembros que su equivalente en animales. Así, la familia de ciclinas D en mamíferos está representada por tres miembros, pero por más de diez en *Arabidopsis*; por lo tanto, es difícil inferir la función de estas ciclinas únicamente por su homología (Koroleva, et al 2004).

En mamíferos las ciclinas D forman complejos activos con CDK4 y CDK6, los cuales fosforilan a la proteína del retinoblastoma (pRB) e inactivan su función supresora sobre el factor transcripcional E2F, permitiendo la expresión de genes requeridos para la transición G1/S. Estos mecanismos fundamentales de control que gobiernan la división celular en animales también están conservados en plantas superiores, y el ciclo celular es altamente influenciado por factores ambientales como temperatura, disponibilidad de nutrientes y agua, y también por reguladores de crecimiento de plantas (PGRs u hormonas) (Meijer and Murray, 2000).

Las ciclinas D se expresan a lo largo del ciclo celular en células vegetales proliferando activamente y su expresión puede ser modulada por señales de crecimiento (Soni et al. 1995; Fuerst et al. 1996; Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000; Sorrell et al. 1999; Gaudin et al. 2000) de una manera análoga a como las ciclinas D de mamíferos son reguladas por factores de crecimiento extracelulares (Motokura and Arnold, 1993; Sewing et al. 1993). La estimulación de los complejos ciclina D-CDKs por señales mitógeno-inducidas puede ser a múltiples niveles, incluyendo transcripción de genes, traducción, estabilidad y ensamblajes del complejo, así como su importación al núcleo (Sher and Roberts, 2004). Su expresión también responde a reguladores de crecimiento

en plantas y a carbohidratos (De Veylder et al. 1999; Gutierrez et al. 2005; Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000; Soni et al. 1995).

Las plantas poseen varios tipos de ciclinas, entre las cuales los tipos A-, B- y D- poseen el papel más importante en la regulación del ciclo celular (de Jager et al. 2005). En *Arabidopsis thaliana* las ciclinas tipo D (CYCDs) se han clasificado en siete clases, de la ciclina D1 a la D7 (Wang et al. 2004; Vandepoele et al. Renaudin et al. 1996): Arath;CycD1;1, Arath;CycD2;1, Arath;CycD5;1, Arath;CycD6;1 y Arath;D7;1, tres genes para la ciclina D3 (Arath;CycD3;1-3) y dos genes para la ciclina D4 (Arath;CycD4;1-2).

La mayoría de las ciclinas tipo D en plantas tienen como característica la presencia de la secuencia LxCxE o una secuencia muy parecida cercana al extremo amino terminal y que les sirve de unión con la proteína relacionada a pRB en plantas, RBR (Meijer and Murray, 2000). Todas las ciclinas contienen una región homóloga de aproximadamente 100 aminoácidos conocida como caja de ciclinas (Wang et al. 2004), la cual está involucrada en las interacciones con CDK (Less and Harlow, 1993; Jeffrey et al. 1995; Renaudin et al., 1998) Algunas también presentan una secuencia PEST (regiones ricas en estos cuatro aminoácidos: prolina-ácido glutámico-serina-treonina (Rechsteiner and Rogers, 1996; Rogers et al. 1996)) y/o una caja de destrucción (D-box), la cual es característica de proteínas de recambio rápido (Vandepoele et al. 2002; Wang et al. 2004).

#### ***1.4.3 Interacción de las ciclinas con proteínas CDKs.***

Estudios en levaduras, *Drosophila* y mamíferos han demostrado que las vías de señalización que regulan la progresión del ciclo celular convergen finalmente en el

control de la actividad de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Esta actividad de cinasa de las CDKs depende de su unión a las ciclinas. De igual forma que en vertebrados, las plantas expresan también diferentes tipos de CDKs (Mironov et al. 1999); así, diferentes parejas de ciclinas-CDKs pueden regular la división celular en cada punto del ciclo. Basados en su estructura primaria, las CDKs de plantas se han clasificado en seis clases, nombradas CDKA-CDKF (Joubés et al. 2000, Vandepoele et al. 2000). La CDK-A contiene un motivo conservado PSTAIRE importante para la unión a ciclinas y parece tener participación en ambas transiciones, G1/S y G2/M. En contraste, la expresión de CDK-B, la cual tiene secuencias PSTAIRE alteradas (PP/STA/TLRE) está restringida de S tardía a M; CDK-C (PITAIRE) y CDK-E (SPTAIRE) están relacionadas con la CDK-9 y CDK-8 de vertebrados respectivamente, y sus funciones precisas aún son desconocidas. Recientemente, una nueva clase de CDK ha sido definida como CDK-G, basados en el motivo conservado PLTSLRE y su homología con la proteína asociada p58/GTA de humano (GTA = galactosiltransferasa), un miembro de la subfamilia de cinasas relacionada a p34(Cdc2) (Menges et al. 2005).

La actividad de las CDKs también es regulada por fosforilación. Una cinasa activadora de CDK (CAK, ahora renombrada CDK-D) fosforila un residuo conservado de treonina en la región del T-loop, lo cual bloquea la entrada del sustrato a la porción catalítica cuando el residuo de treonina no está fosforilado, actividad ejercida por una proteína fosfatasa, CDC25 (Lees, 1995). Así, la CAK juega un papel esencial en la regulación del ciclo celular a través de la activación de las CDKs (Umeda et al. 2005).

Otro nivel de regulación de la actividad de los complejos ciclinas-CDKs se lleva a cabo por los inhibidores de CDKs, los cuales inhiben estequiométricamente la actividad de las CDKs. Los inhibidores de CDKs de *A. thaliana*, denominados KRP1-7 o ICK1-7, comparten una pequeña región de identidad con los inhibidores de CDKs tipo

p27<sup>Kip/Cip</sup> en animales. KRP4 y KRP5 están presentes en células mitóticas activas, KRP1 y KRP2 en células llevando a cabo endociclos, y el resto está presente en ambas (Ormenese et al. 2004).

#### **1.4.4 La proteína relacionada al retinoblastoma, RBR.**

La familia de proteínas Rb está conformada por la proteína conocida como pRb o p105 y por pRb2/p130 y p107, así como por sus proteínas ortólogas, las cuales muestran similitudes tanto estructurales como funcionales a pRb.

Miembros de la familia han sido encontrados en animales y plantas, y se conoce una proteína relacionada en el alga *Chlamydomonas*. Estas proteínas se unen y son inactivadas por proteínas virales, y además se unen a factores transcripcionales y reprimen su función, e inclusive pueden formar complejos con ciclinas, con cinasas dependientes de ciclinas y con desacetilasas de histonas. Los miembros de la familia forman parte de la vía de transducción de señales conocida como la vía de Rb, la cual es importante en la regulación del ciclo celular y tiene participación en la supresión del crecimiento, diferenciación y apoptosis en distintos organismos y tipos celulares (Claudio et al. 2002).

El primer indicio de la existencia de proteínas relacionadas a Rb en plantas fue el descubrimiento de la secuencia LxCxE (leucina- cisteína-ácido glutámico) en proteínas que, como se sabe, promueve la unión entre proteínas tipo Rb y las ciclinas tipo D en plantas (Dahl et al. 1995; Soni et al. 1995; Xie et al. 1995). Posteriormente se identificaron proteínas relacionadas a Rb en tejidos de maíz (RBR), y la interacción entre RBR de maíz con ciclinas tipo D fue demostrada por ensayos de doble híbrido en levadura (Ach et al. 1997; Huntley et al. 1998). Además, RBR de tabaco puede ser

fosforilada *in vitro* por el complejo CDK-A-Ciclina D3;1 de tabaco (Nakawami et al. 1999). El descubrimiento de que RBR de maíz se expresa diferencialmente en tejidos de plantas, confirmó la idea de que esta proteína debe de estar involucrada también en diferenciación, como lo está en células animales (Huntley et al. 1998).

#### ***1.4.5 Papel de E2F en el ciclo celular.***

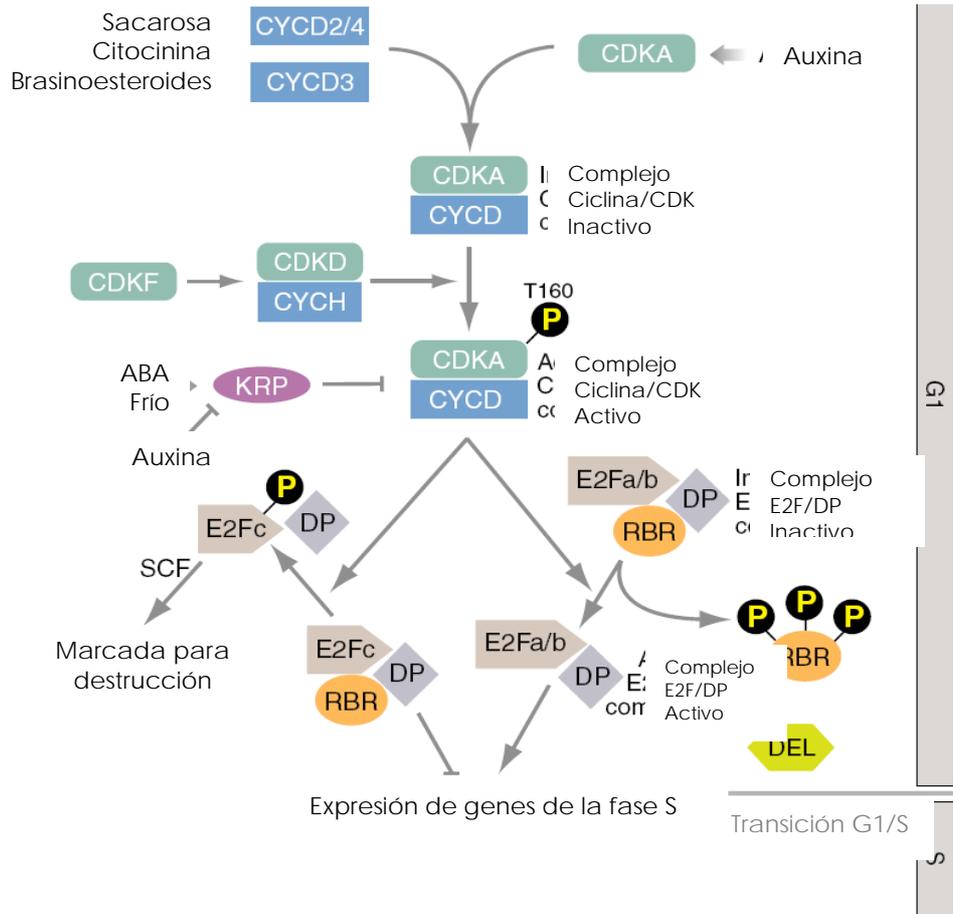
Los factores transcripcionales E2F tienen una función clave en la modulación de la expresión de una compleja red de genes blanco que afectan la proliferación celular, diferenciación y morfogénesis. *A. thaliana* contiene seis genes E2F y dos genes DP (a y b). E2Fa/b/c tienen una organización típica al unirse al DNA, en su heterodimerización con DP (a ó b), y en su interacción con los dominios de transactivación de RBR (de Jager et al. 2001; Mariconti et al. 2002). Los otros tres miembros, E2Fd/e/f, son típicos en tener por duplicado el dominio de unión al DNA y por no dimerizar con DP (de Jager et al. 2001; Mariconti et al. 2002; Kosugi and Ohashi, 2002a).

E2Fa, en cooperación con DPa regula positivamente genes de la fase S del ciclo celular e induce divisiones celulares ectópicas en varios órganos post-proliferativos (De Veylder et al. 2002). El represor transcripcional E2Fc (Mariconti et al. 2002; Kosugi and Ohashi, 2002b) es abundante en células bajo arresto y es degradado rápidamente por el proteasoma al reactivarse el ciclo celular a través del marcado por el complejo SCF<sup>SKP2</sup> (Del Pozo et al. 2002). E2Ff se expresa en células de hipocotilos y raíces, donde el crecimiento depende de la expansión de células diferenciadas a lo largo del eje longitudinal.

#### ***1.4.6 Replicación del DNA.***

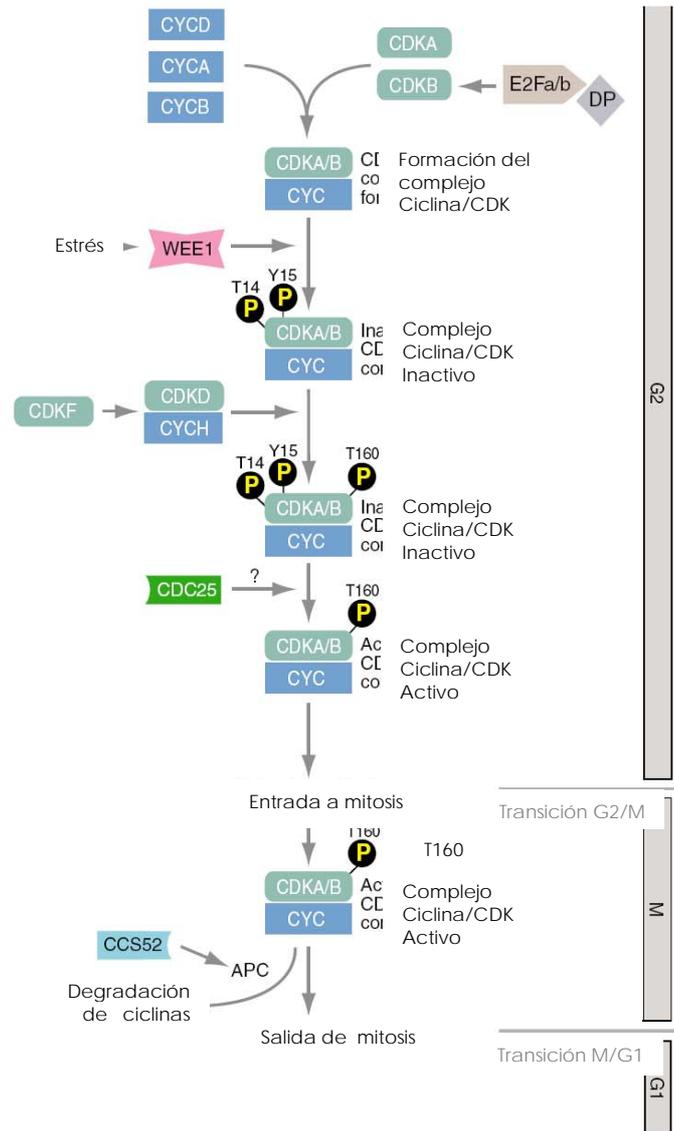
El inicio de la replicación del DNA se permite que ocurra una única vez durante cada ciclo. Los complejos de pre-replicación (pre-RC), regulan la replicación del DNA, y están conformados por un complejo de reconocimiento al origen (ORC), CDC6, CDT1 y MCM (Bell and Dutta, 2002), todos los cuales están conservados en plantas. La expresión ectópica ya sea de CDC6 (Castellano et al. 2001) o CDT1 (Castellano et al. 2004), los cuales son blanco de E2F, es suficiente para disparar endociclos extra así como afectar la morfogénesis de manera específica según el tipo celular. Por ejemplo, las células de la epidermis de las hojas, con un potencial limitado de células madre, o células subsidiarias que producen meristemoides satélite que eventualmente forman estomas, son estimuladas a proliferar (Castellano et al. 2004). Por otro lado, células de la epidermis de las hojas que están programadas para desarrollar diferenciación asociada a endociclos (tricomas) disparan ciclos extra de endo-replicación (Castellano et al. 2004). Así, la actividad del complejo de pre-replicación parece ser clave en coordinar proliferación celular y diferenciación, así como los patrones celulares y el desarrollo de órganos.

A continuación se muestran esquemáticamente las transiciones G1-S y G2-M del ciclo celular en plantas.



**Figura 2. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas.**

En presencia de factores de crecimiento como sacarosa, auxinas, citocininas y brasinoesteroides (BR). Las ciclinas tipo D se asocian con CDK tipo A (CDKA) formando un complejo inactivo CDKA/CYCD. Este complejo es probablemente activado vía fosforilación de la cinasa activadora CDK-activadora, la cual involucra a CDKF y a CDKD asociados con una ciclina tipo H (CYCH). La activación total del complejo CDKA/CYCD requiere la fosforilación de la subunidad de la CYCD por una cinasa aún no conocida (no mostrado en la figura). En respuesta a estímulos antimitogénicos como el ácido abscísico (ABA) y frío, las KRPs pueden inhibir los complejos activados CKD/CYCD; estos complejos disparan la transición G1-S por dos diferentes vías. Por un lado, la fosforilación del complejo CDKA/CYCD puede iniciar la destrucción del complejo represor transcripcional E2Fc/DP/RBR por la proteína E3-ubiquitin ligasa, y por otra parte, la fosforilación de RBR libera la actividad transcripcional de los complejos E2Fa-b/DP/RBR. Como resultado se activa la expresión de los genes de la fase S. Los factores transcripcionales atípicos E2F-like DEL podrían regular de una manera más fina la expresión de un subconjunto de genes E2F blanco (Inzé and De Veylder, 2006).



**Figura 3. Representación esquemática de la regulación de la transición G2-M en plantas.**

Durante la fase G2 del ciclo celular, las ciclinas tipo A, B y probablemente tipo D (CYCA, CYCB y CYCD) se asocian tanto con la CDKA y la CDKB. Algunas CDKBs están bajo el control transcripcional de la vía de E2F, probablemente proporcionando un mecanismo por el cual las transiciones G1-S y G2-M se comunican. La vía de la cinasa activadora, que involucra a CDKF y CDKD asociada con una ciclina tipo H (CYCH), controla la actividad de los diferentes complejo CDK/CYC. La actividad de las CDK puede ser regulada negativamente por fosforilación de la cinasa WEE1, la cual es disparada cuando el DNA pierde integridad. La cinasa relacionada CDC25, si existe, y la cual remueve los grupo fosfato inhibitorios, todavía necesita ser identificada. Una vez que los complejos CDK/CYC son activados, disparan la transición G2-M a través de la fosforilación de una gran variedad de sustratos. La salida de mitosis requiere la destrucción proteolítica las ciclinas. Esta destrucción es iniciada por la activación del complejo promotor de la anaphase (APC). A través de la asociación con la proteína CCS52 (Inzé and De Veylder, 2006).

## **1.5 REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS (PGRs) U HORMONAS VEGETALES.**

El establecimiento de una plántula implica que los procesos de proliferación celular que darán origen a las diferentes estructuras vegetales están ocurriendo ordenadamente. Estos procesos se inician cuando la semilla es plenamente embebida y se eliminan todos aquellos inhibidores que pudo haber acumulado durante su formación. El proceso germinativo es, de esta manera, una etapa del desarrollo vegetal donde la activación del ciclo celular y de sus reguladores es fundamental para la supervivencia de la planta.

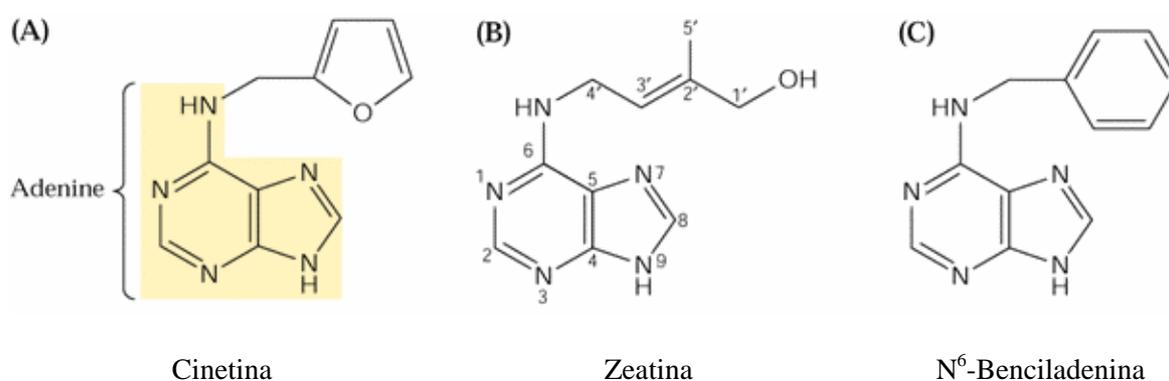
Muchos de estos procesos biológicos son regulados por hormonas vegetales y por factores ambientales que influirán en la expresión y actividad de las proteínas del ciclo celular, aportando valiosa información sobre la relación entre los eventos fisiológicos y los eventos moleculares.

Las hormonas vegetales clásicas son moléculas pequeñas no proteicas que tienen efectos específicos en una variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo (Vogler y Kuhlemeier, 2003). Entre los grupos mejor descritos tenemos a las giberelinas, las auxinas, las citocininas, el ácido abscísico, el etileno y los brasinoesteroides. También existen algunos péptidos como la sistemina.

### ***1.5.1 Citocininas.***

El término citocinina fue propuesto por Skoog y colaboradores y define a un grupo de compuestos que promueven la citocinesis en las células vegetales y producen efectos similares a aquéllos producidos por la zeatina (Z).

En los 50s se encontró que la leche de coco estimulaba el crecimiento de embriones inmaduros de *Datura* y que aumentaba la proliferación de células de zanahoria *in vitro* (Buchanan, 2000). Aproximadamente al mismo tiempo, Skoog demostró que extractos de células de levadura tratados en combinación con ácido indol-3-acético (AIA) provocaban una división celular continua en cultivos celulares de tabaco. Skoog mostró subsecuentemente que estos factores naturales no definidos podían ser reemplazados por la cinetina, N<sup>6</sup>-furfuriladenina, un producto formado por el rompimiento de DNA en autoclave. Aunque la cinetina es un subproducto derivado del 2-desoxiadenilato, su actividad biológica recuerda a la de la zeatina (Z), un inductor endógeno de la división celular que en 1963 fue aislado de semillas de maíz inmaduras. Son compuestos que se pueden definir estructuralmente como derivados de la adenina con una cadena base de isopentenilo unida a un grupo N<sup>6</sup>-amino. Aunque las citocininas de plantas con un grupo bencilo o hidroxibencilo unido al grupo N<sup>6</sup>-amino son raras, la benciladenina (BA) ha sido usada frecuentemente en estudios bioquímicos y fisiológicos. En la actualidad se han identificado alrededor de 200 tipos de citocininas; entre las naturales se encuentra la Zeatina 6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina), y las sintéticas como es la cinetina (6-furfurilaminopurina) (Figura 4).

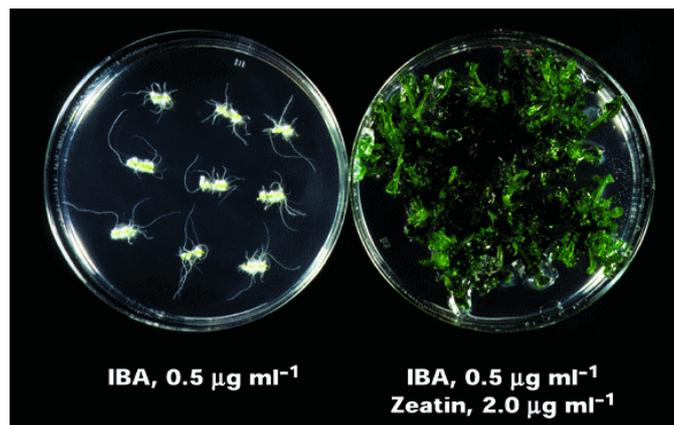


**Figura 4.** Estructura de algunas citocininas. (A) Cinetina, una citocinina sintética generada cuando el DNA es autoclaveado. (B) Zeatina, primer citocinina endógena aislada de las plantas. (C) N<sup>6</sup>-Benciladenina (BA), compuesto sintético con actividad de citocinina (Buchanan, 2000).

Las citocininas naturales se encuentran en altas concentraciones en regiones meristemáticas y tejidos en crecimiento y división como son raíces, hojas jóvenes, frutos en desarrollo y semillas en germinación. Están ampliamente distribuidas en plantas superiores, musgos, hongos y en muchos procariontes (Salisbury y Ross, 1992).

La manifestación fisiológica producida por la planta en respuesta a la aplicación de las citocininas depende tanto de la especie como del tipo de citocinina aplicada (Davies, 1995, Salisbury y Ross, 1992; Haberer y Kieber, 2002). Entre los efectos que produce dicha aplicación *in vivo* se encuentran el aumento de la apertura estomática y promueven la biogénesis de cloroplastos (Seyer and Lescure, 1984). Otros efectos son la división celular y formación de órganos, germinación de semillas (Van Standen, 1983), alargamiento de células y órganos, iniciación y crecimiento de la raíz, desarrollo de yemas y tallos, retardo o inhibición de la senescencia de órganos, especialmente de hojas, y promoción de la translocación de nutrientes y sustancias orgánicas. También estimulan la síntesis de proteínas, síntesis de RNA y síntesis de DNA (Zwar, 1973; Naito et al. 1978; Galli, 1984), retrasan la senescencia (Fletcher, 1969; Yokoyama et al. 1981), promueven la expresión de genes que codifican para la nitrato reductasa y la rubisco (Ribulosa 1-5 Bi-fosfato carboxilasa/oxigenasa) (Longo et al. 1990; Lu et al. 1990; Ohya and Suzuki, 1991).

En conjunción con auxinas, las citocininas promueven la división celular de plantas, también influyen la diferenciación de células vegetales en cultivo. Una proporción de citocinina/auxina elevada promueve el desarrollo del tallo, la auxina sola promueve el crecimiento de raíz (Figura 5), y una proporción equimolar de ambas hormonas provoca la diferenciación de callos de células no diferenciados. También se sabe que las citocininas suprimen la dominancia apical inducida por auxina (Buchanan, 2000).

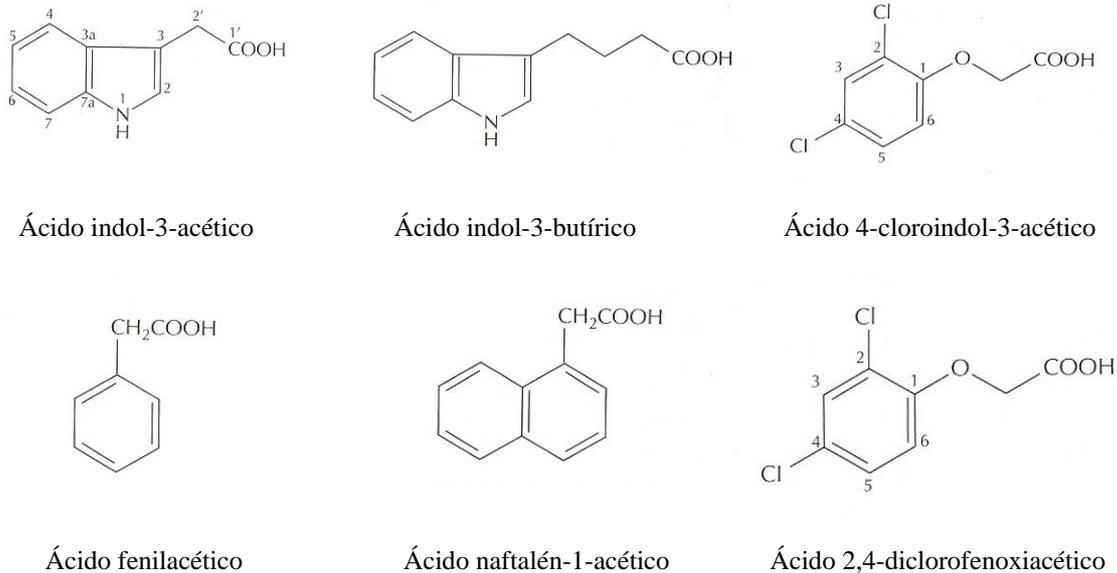


**Figura 5.** La producción de callos de *Arabidopsis* es in **Zeatina, 2.0 µg ml<sup>-1</sup>** medio conteniendo auxina (IBA) y citocinina. Cuando los callos son subcultivados en medio conteniendo exclusivamente auxina, se producen raíces (izquierda); cuando se subcultivan en medio conteniendo altas proporciones de citocinina con respecto a auxina (zeatina), proliferan los tallos (derecha) (Buchanan, 2000).

### 1.5.2 Auxinas.

Durante el siglo XIX, Theophili Ciesielski estudió las respuestas geotrópicas de las plantas, y Charles Darwin y su hermano Francis Darwin, investigaron tanto fototropismo como geotropismo. Estas investigaciones sentaron las bases del trabajo de Fritz Went, quien en 1926 obtuvo de coleótilos de avena un factor difusible promotor del crecimiento, subsecuentemente nombrado **auxina**. La auxina primaria presente en la mayoría de las plantas fue identificada como ácido indol-3-acético (AIA) (Figura 6). El AIA es activo en cantidades de nanogramos en un rango de bioensayos, y está asociado con una variedad de procesos fisiológicos que incluyen dominancia apical, tropismos, inducción de la división celular y de la elongación celular, la formación del embrión, elongación del tallo, iniciación de la raíz y desarrollo de las raíces laterales (LR), para el desarrollo del tejido vascular y de frutos, pueden inhibir o promover (vía estimulación de etileno) abscisión de hojas y frutos, y expresión del sexo, y en altas concentraciones estimulan la producción de etileno (Moore y Thomas, 1989). Las auxinas sintéticas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 1-naftalén-acético, son usadas

ampliamente en horticultura para inducir raíces y promover el establecimiento y desarrollo del fruto. Su uso, en cambio, en concentraciones elevadas, es efectivo como herbicida contra malezas de hoja ancha.



**Figura 6.** Ácido indol-3-acético (AIA), la auxina distribuida más ampliamente en el reino vegetal y compuestos relacionados. El ácido indol-3-butírico, ácido 4-cloroindol-3-acético y el ácido fenilacético, muestran menor presencia en la naturaleza, así como actividad parecida a la auxina. Las auxinas sintéticas, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalén-1-acético, son usados comercialmente como reguladores del crecimiento de las plantas en dosis bajas, y como herbicidas en altas concentraciones (Buchanan, 2000).

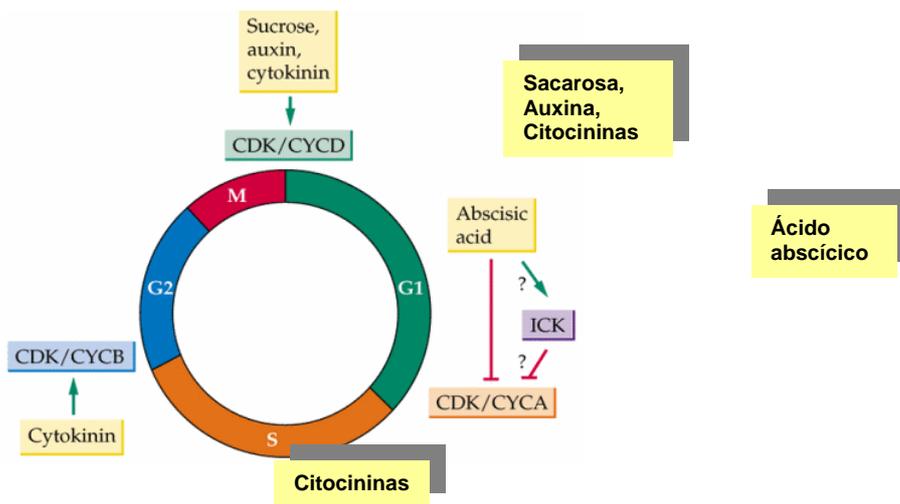
Las auxinas son producidas en zonas meristemáticas de tallos y transportadas hacia abajo del tallo a otras partes de la planta. La concentración de auxina difiere de planta a planta, en los diferentes tejidos, la estación del año y en la etapa de crecimiento de la planta. Se han encontrado ampliamente distribuidas en plantas con y sin semilla así como en bacterias, hongos y algas (Moore y Thomas, 1989).

El contenido de AIA en los diferentes tejidos de las plantas es regulado por varios procesos. La poza de AIA es alimentada por síntesis de novo a partir de L-triptofano, otros precursores no provenientes del triptofano y por la hidrólisis de conjugados de AIA. El AIA se inactiva por varias vías catabólicas y por conjugación. El contenido de AIA en tejidos específicos puede ser también influenciado por un sistema

basipetal de transporte polar que resulta en el movimiento descendente del AIA desde los meristemos apicales y hojas jóvenes hacia el sistema de la raíz.

### 1.5.3 Auxinas y citocininas.

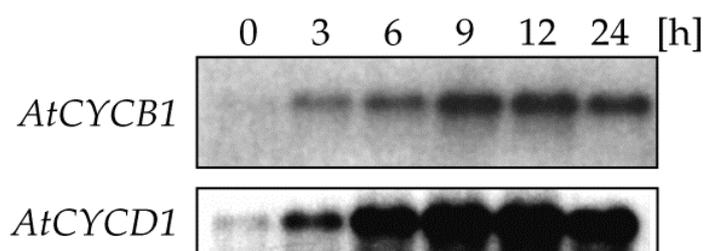
Las auxinas y las citocininas parecen tener un papel directo en la regulación de la división celular (Figura 7). Se ha observado que cultivos celulares de plantas recientemente establecidos requieren de ambas hormonas para continuar la proliferación y el retiro de auxinas o citocininas del medio fresco de cultivos celulares de tabaco, por ejemplo, resulta en su arresto en la fase G1 o bien en la fase G2 del ciclo celular, respectivamente. La ausencia de citocininas en los cultivos celulares de tabaco correlaciona con un aumento en la fosforilación de la tirosina 15 de la CDK, lo cual inhibe su actividad de cinasa y si estos cultivos en arresto son tratados con citocininas, se reduce la fosforilación de la tirosina y se reanuda la división celular (Buchanan, 2000).



**Figura 7.** El tratamiento de plantas intactas con hormonas vegetales no estimula el crecimiento en todos los tejidos. Por ejemplo, la aplicación de auxinas a raíces induce la formación de ramificaciones en las raíces pero inhibe la actividad del meristemo apical. Cambios en la expresión de los reguladores de la división celular como las ciclinas (Fig. 3), y una división celular generalizada son respuestas tempranas a los tratamientos con esta hormona. Aunque el cambio en las concentraciones de auxinas afecta claramente la actividad de la división celular, la naturaleza de la respuesta no es uniforme y depende del tejido (Buchanan, 2000).

En *Arabidopsis*, las citocininas también son necesarias para estimular la expresión de la ciclina D3 requerida para la fase G1 del ciclo celular. La expresión constitutiva de esta ciclina libera el requerimiento de citocininas en explantes de tejidos (Buchanan, 2000).

El tratamiento de plantas intactas con hormonas vegetales no estimula el crecimiento en todos los tejidos. Por ejemplo, la adición de auxinas en raíces induce la formación de raíces secundarias, pero inhibe la actividad del meristemo apical. Sin embargo, aunque el cambio de las concentraciones de auxina afecta claramente la actividad de la división celular, la naturaleza de la respuesta no es uniforme y depende del tejido a estudiar (Figura 8).



**Figura 8.** Estimuladores del crecimiento de las plantas afectan la expresión de los reguladores del ciclo celular. La acumulación de los mRNAs de la ciclina mitótica *AtCYCB1* y la ciclina de G1 *AtCYCD1* aumentan después de la estimulación de la raíz con auxinas en *Arabidopsis*. La acumulación es mayor después de las 12 horas de estimulación y después disminuye (Buchanan, 2000).

La bacteria del género *Rhizobium* y géneros relacionados, estimulan la formación de nódulos en la raíz involucrados en la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. Esta interacción simbiótica, la cual incluye la rápida activación de la división celular en células corticales de la raíz, es activada por factores Nod o lipooligosacáridos que son activos a muy bajas concentraciones. Consecuentemente, esta cascada de señalización podría modular la proporción endógena de auxinas/citocininas, ya que el tratamiento de raíces de leguminosas con inhibidores del transporte de auxinas o con rhizobia que producen las citocininas, también produce la generación de estructuras tipo nódulos.

Las citocininas reducen el tamaño de las pozas endógenas de auxinas. Plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *ipt* de *A. tumefaciens*, sobreproducen citocininas. Comparadas con las plantas silvestres, éstas transgénicas contienen concentraciones significativamente bajas de AIA libre, y, en la mayoría de los casos, conjugados de AIA. La velocidad de biosíntesis de AIA también se reduce, como se determinó por estudios de incorporación de  $^2\text{H}_2\text{O}$ , a una auxina exógena [ $^{13}\text{C}_6$ ]AIA que se degrada más lentamente en las plantas *ipt*-transformadas. Así, cantidades elevadas de citocininas, primordialmente Zeatina, [9R]Z (9-ribosilzeatina) y *cis*[9R-5`P]Z (9-ribosil-*cis*-zeatina 5`fosfato, no sólo reducen el tamaño de las pozas endógenas de AIA y de sus conjugados, sino que parecen disminuir el grado de recambio del AIA (Buchanan, 2000).

Justo como la sobre-expresión de las citocininas antagoniza la síntesis de AIA, la sobre-expresión de AIA parece regular negativamente la producción de citocininas. Plantas de tabaco que sobreproducen AIA porque están expresando los genes *iaaH* e *iaaM*, exhiben menor actividad de citocinina oxidasa y presentan concentraciones bajas de Zeatina endógena y citocininas relacionadas, en comparación con las plantas silvestres. Una disminución en la actividad de la citocinina oxidasa produce una reducción de la degradación de citocininas y un aumento de las pozas endógenas. Pero esto no ocurre en plantas transgénicas de tabaco sobreproduciendo AIA; en éstas tanto las concentraciones de las pozas endógenas de citocininas como de la actividad de la citocinina oxidasa decaen. Esto provee una prueba, aunque indirecta, de que la citocinina oxidasa degrada preferencialmente citocininas exógenas. A la fecha, el mecanismo mediado por AIA para la reducción de las pozas endógenas de citocininas, se desconoce (Buchanan, 2000).

#### ***1.5.4 Ácido indol-3-acético.***

El ácido indol-3-acético o auxina, como ya se mencionó, posee un papel importante en la mayoría de los aspectos del desarrollo de la planta. El papel de la auxina en el desarrollo de la planta ha sido bien conocido por varias décadas a nivel fisiológico, pero apenas recientemente el mecanismo de percepción y de transducción de la señal ha empezado a ser dilucidado a nivel molecular. La identificación de un receptor permaneció incierta por mucho tiempo, aunque la mejor candidata era la proteína ABP1 (proteína de unión a auxina). Los estudios en ese entonces demostraron que células BY2 con niveles indetectables de ABP1 se dividen más lentamente y forman células más pequeñas (Chen et al. 2001). De cualquier forma, la síntesis de DNA en estas células mutantes BY2 parece ser la misma que en las células control, sugiriendo que la fase S de ciclo celular no es afectada. Los autores especularon que ABP1 afecta la generación de la pared celular, y entonces la capacidad de la célula para dividirse, un proceso que involucra la generación de pared celular formada *de novo*.

En la última década, se han identificado varias mutantes con señalización afectada por auxinas, y se han clonado varios genes involucrados en la respuesta a auxina. Interesantemente, y de alguna manera no anticipada, estos datos han demostrado que la degradación específica de proteínas a través de la vía de la ubiquitina (Ub) juega un papel central en la transducción de la señal de auxina (Dharmasiri y Estelle, 2002).

#### ***1.5.5 Percepción de auxina y ciclo celular.***

Como un concepto central, se puede establecer que la señalización empieza con la unión de un ligando a un receptor activando una cascada de fosforilaciones que

resulta en la regulación transcripcional. En el caso de la auxina, se identificó un receptor putativo, ABP1, hace más de una década sin que existiera una clara confirmación de su función como tal (Lobler and Klambt, 1985). No obstante, con un papel bioquímico de ABP1 aún incierto, es más probable que esta proteína pudiera mediar la división celular de una forma indirecta, ya que mutantes homocigotas nulas en ABP1 muestran patrones aberrantes en la división celular durante la embriogénesis temprana. Además, suspensiones celulares de tabaco con una ABP1 antisentido muestran defectos en la elongación y división celular mediadas por auxina (Chen et al. 2001), y transcritos de ABP1 se acumulan en sitios de iniciación de raíces laterales en girasoles, sugiriendo que la sensibilidad de ciertos tipos celulares a auxinas podría verse aumentada en estados definidos durante el desarrollo de la planta (Thomas et al. 2003). También, el desarrollo de plantas que carecen de ABP1 muestra defectos en la elongación celular, fallan en la organización del plan básico del cuerpo de la planta, y subsecuentemente degeneran. Sin embargo, la división celular ocurre en estas plantas, indicando que alguna vía de auxina que regula la división celular aún funciona (Callis, 2005).

De cualquier forma, sea o no real la existencia de un receptor(es), datos nuevos sobre el potencial involucramiento de proteínas GTP en controlar la percepción a auxina a través de la división celular han sido proporcionados. Se sabe que las proteínas G acoplan señales a través de receptores de membrana con efectores río abajo. En el modelo clásico, la unión de un ligando a una proteína G acoplada a un receptor resulta en la conversión de proteínas G inactivas con GDP a la conformación activa con GTP. La unión de GTP resulta en la liberación de la subunidad alfa y su posterior activación. La hidrólisis del GTP regresa al complejo a su estado original inactivo (Stryer, 1995). En *Arabidopsis*, la subunidad alfa de una proteína G heterotrimérica putativa (GPA) fue identificada como un regulador positivo de la división celular (Ullah et al. 2001). Más

recientemente, se demostró que la subunidad beta del mismo complejo (AGB) impedía esta actividad y tenía una función en la atenuación de la señal de auxina a través de la división celular. Esta atenuación dependiente de la subunidad beta parece suceder río arriba del control de auxina sobre los niveles basales del mRNA de GPA (Ullah et al., 2003). Además, se ha demostrado que la aplicación de auxina es capaz de reprimir la transcripción de la subunidad beta y al mismo tiempo inducir mRNAs de la subunidad alfa. Esto revela la existencia de una auto-regulación de este patrón represivo. Más aún, la actividad de la subunidad alfa y su efecto en proliferación celular parece estar controlado por una proteína con siete pases transmembranales - Reguladora de la Señalización de proteínas G – (RGS) (Chen et al. 2003). Las proteínas RGS aceleran la desactivación de subunidades alfa, reduciendo así la señalización por receptores unidos a proteínas G. Aún no ha sido demostrado si esta parte en la señalización del receptor es afectada por auxina.

#### ***1.5.6 Auxina y expresión de genes del ciclo celular.***

Poco se sabe acerca de cómo es que las hormonas vegetales interactúan con la maquinaria del ciclo celular a nivel post-transcripcional, pero existen algunos datos de su acción directa sobre la transcripción, en el apagado o encendido de genes del ciclo celular. Se ha demostrado que la auxina induce la expresión de varias ciclinas mitóticas: CYCA2;1, CYCA2;2, CYCB1;1, CYCB2;1, CYCB2;2 (Ferreira et. al., 1994a, b; Richard et. al., 2002; Roudier et al., 2003) y también de CDKA;1 (Martinez et. al., 1992; Hemerly et al., 1993; Richard et. al., 2002). Además, los niveles de la ciclina tipo D mostraron responder fuertemente a la adición de auxina, pero la inducción pudo haber sido provocada por o en combinación con otros mitógenos como las citocininas,

brasinoesteroides y/o sacarosa (Soni et al., 1995; Fuerst et al.; 1996; Hu et al., 2000; Richard et al., 2002). Asimismo, la CDKB1;1, exclusiva de plantas, es inducida sólo débilmente por la auxina sola, pero una inducción sinérgica ocurre cuando es aplicada en combinación con citocininas.

La situación es menos clara para los inhibidores de CDKs o KRPs. En *Arabidopsis* se han identificado siete KRPs (De Veylder et al., 2001) y se han encontrado diferentes patrones de acumulación de transcritos a los diferentes tratamientos con mitógenos. Al menos, en cultivos en suspensión, la auxina parece inducir la expresión de KRP1 mientras que reprime la expresión de KRP2 (Richard et al., 2002). Esta reacción fundamentalmente diferente al tratamiento con auxina sugiere que cada uno de las KRPs pudiera jugar un papel único en la regulación del ciclo celular.

### ***1.5.7 Respuesta a auxina, degradación de proteínas y ciclo celular.***

La vía de ubiquitina-proteasoma marca proteínas específicas para su destrucción programada en respuesta a estímulos internos o externos (Hershko and Ciechanover, 1998; Hare et al. 2003). La ubiquitina es un péptido pequeño que es activado de manera dependiente de ATP por una enzima activadora E1. Subsecuentemente, la ubiquitina activada se transfiere a una enzima E2 conjugadora y, en el paso final, la proteína seleccionada es unida a E3, o ubiquitina ligasa, siendo covalente y específicamente modificada por poliubiquitinación (Del Pozo et al. 2005). Las proteínas marcadas por poliubiquitinación son entonces degradadas por el proteasoma 26S (Hershko and Ciechnover, 1998). Sólo 10 años atrás, la proteólisis era considerada como un evento raro en plantas, involucrado en respuestas a la hormona auxina; pero en nuestros días, se

sabe que la vía Ub-proteasoma juega un papel crucial en muchos procesos biológicos importantes durante el desarrollo de la planta y en respuestas ambientales, como señalización hormonal, control del ciclo celular, floración, desarrollo de raíces laterales, resistencia a enfermedades, respuesta a la luz, regulación del ciclo circadiano y fertilización, entre otros (Sullivan et al. 2003).

Como ya se dijo, la auxina activa la degradación de proteínas específicas vía el proteasoma 26S (Dharmasiri and Estelle, 2002). La SCF<sup>TIR1</sup> E3-ligasa posee un papel dominante en el marcado de proteínas nucleares de vida corta (Aux/IAAs) vía la oligoubiquitinación para su degradación por el proteasoma 26-S (Leyser, 2002). Esta E3-ligasa es un complejo compuesto de cuatro proteínas (SKP1, una culina (Cdc53), RBX1 y un miembro de la familia de proteínas de caja F, TIR1 – *transport inhibitor response 1*) (del Pozo and Estelle, 2000). A la fecha, las únicas proteínas que se conocen blanco del complejo SCF<sup>TIR1</sup> son miembros de la familia de genes Aux/IAA (Tian et al. 2003, Zenzer et al. 2003, Gray et al. 2001) consistente de 29 miembros con cuatro dominios conservados (Hagen and Guilfoyle, 2002) y están considerados como represores de la actividad de los factores de transcripción con respuesta a auxina (ARFs). Los ARFs son factores transcripcionales activos cuando forman dímeros con miembros de su misma familia consistente de 23 miembros, en *Arabidopsis* (Hagen and Guilfoyle, 2002). La acción inhibitoria de las proteínas Aux/IAA encuentra su origen en romper los dímeros de ARFs, resultando en heterodímeros inactivos.

No se sabe si los reguladores del ciclo celular por sí mismos pudieran ser blanco de proteólisis dependiente de auxinas ni si su expresión es controlada por el sistema Aux/IAA-ARF. Aunque sin tener ninguna prueba de su funcionalidad, en la región promotora de un número considerable de genes de ciclo celular se han encontrado elementos con respuesta a auxina (AuxREs) (Richard et al. 2002), sugiriendo que la

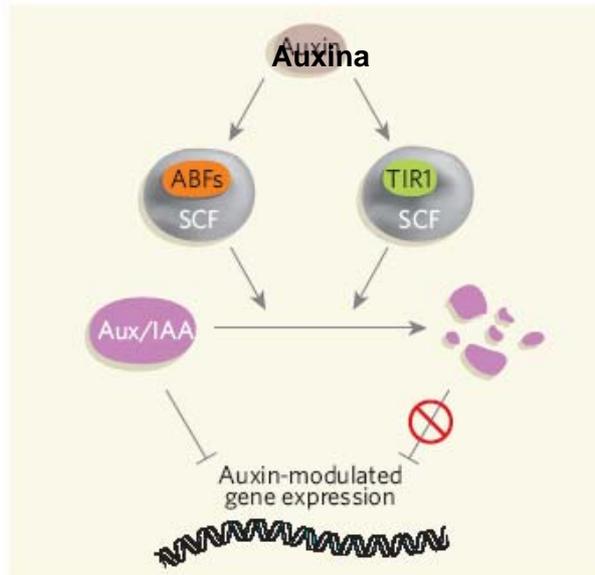
activación transcripcional de algunos de ellos es controlada directamente por factores de transcripción tipo ARF.

Por otro lado, del Pozo et al. (2002) pudieron demostrar que la abundancia del inhibidor del ciclo celular AtE2Fc es controlada por un complejo SCF. E2Fc actúa para reprimir la entrada de las células dentro de la fase S, por inhibición competitiva con la subunidad DPa del factor transcripcional E2Fa/DPa. Los autores pudieron demostrar que E2Fc es fosforilado *in vitro* tanto por CDKA;1/CYCA2;2 como por CDKA;1/CYCD2;1 y que esta fosforilación es esencial tanto para el reclutamiento de la proteína de caja F AtSKP2, como para su degradación vía ubiquitinación. Por inducción de la expresión de CDKA;1 y de ciclinas, la auxina puede promover la degradación de este inhibidor y estimular el paso a través de la transición G1/S.

#### ***1.5.8 Modelo de la acción de la auxina.***

Como ya se ha discutido con anterioridad, las auxinas producen cambios rápidos en la expresión de genes, y se han identificado dos familias de proteínas involucradas en esta respuesta: los factores con respuesta a auxina (ARFs) y las proteínas Aux/IAA (Hagen and Guilfoyle, 2002). Además, los genes que codifican a las proteínas Aux/IAA son genes de respuesta temprana, ya que su expresión aumenta rápidamente durante la exposición a la hormona. De acuerdo a esto, las proteínas Aux/IAA podrían modular la expresión de genes de respuesta tardía que codifican factores involucrados directamente en división celular y crecimiento. Esto implicaría que estas proteínas suprimen la expresión de genes inducidos por auxina (Tiwari et. al. 2001), y que concentraciones elevadas de auxina aceleran su destrucción (Gray et. al., 2001; Zenser et. al., 2001). Por lo tanto, las proteínas Aux/IAA funcionan no sólo como mensajeros positivos río abajo,

sino también como reguladores negativos, y su abundancia debe declinar, al menos al principio, si la auxina va a ser percibida. Como ya se dijo también, la proteína TIR1 forma parte de esta vía de respuesta (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). Cuando las concentraciones de auxina son bajas, los genes de respuesta a auxina están reprimidos. Esta represión puede ser resultado de la dimerización vía los dominios III y IV de los represores de auxina Aux/IAA con los activadores transcripcionales ARFs. Cuando se elevan las concentraciones de auxina, la transcripción es rápidamente desreprimida/activada (i.e. dentro de los 2-5 minutos después de la aplicación de auxina exógena). La auxina entonces se une a TIR1 en presencia de las proteínas Aux/IAA, y de alguna forma cambia su actividad, y es esta alteración del complejo TIR1-SCF por la unión no covalente con auxina, la responsable del aumento en la destrucción de las proteínas Aux/IAA vía el ubiquitina-proteasoma (Dharmasiri et al., 2005; Kepinsky and Leyser, 2005). De esta forma se libera el efecto inhibitor de las proteínas Aux/IAA, permitiendo la disociación de los represores Aux/IAA de sus contrapartes ARFs, ocurriendo así la respuesta a auxina. La activación podría ser potenciada por la unión adicional de ARFs activadores (i.e. por la dimerización a través de los dominios III y IV) a la unión DNA-ARF (Ulmasov et al., 1999). La percepción a auxina es de esta manera, única entre las vías mediadas por el complejo SCF. En la vía canónica, es una modificación covalente de la proteína blanco la que promueve su interacción con el complejo SCF; en la respuesta a auxina, no se ha observado ningún tipo de modificación covalente en la proteína blanco, en su lugar, el responsable del aumento en la destrucción de las proteínas Aux/IAA es el complejo SCF conteniendo a TIR1 (Figura 9).



**Figura 9.** La auxina actúa directamente **Modulación de la expresión génica por auxina** contienen tanto a TIR1 o factores relacionados de unión a auxina (ABFs). Esto cataliza la destrucción de las proteínas Aux/IAA, las cuales estaban inhibiendo directamente los genes que intervienen en la respuesta a auxina. El efecto inhibitorio de Aux/IAA es liberado, permitiendo que ocurra la respuesta a auxina (Callis, 2005).

En este modelo, los genes *Aux/IAA* que contienen secuencias TGTCTC en los elementos de respuesta a auxina, AuxREs, podrían ser activados en respuesta a la hormona, resultando en un incremento en el mRNA y en la proteína. De esta manera, las proteínas Aux/IAA podrían, en algún punto, regular negativamente la expresión de sus propios genes a través de una retroalimentación negativa. Este *loop* de retroalimentación podría ocurrir sólo cuando los niveles de auxina fueran bajos, basados en las observaciones de que durante la presencia continua de niveles elevados de auxina, los genes tempranos de respuesta a auxina permanecen activos por al menos varias horas (Walker and Key, 1982; Theologis et al., 1985; Abel et al., 1995).

## 1.6 FUENTE CARBONADA.

La producción de azúcares durante la fotosíntesis es una actividad fundamental en la vida de la planta. Los procesos de producción de azúcares, transporte, consumo y

almacenamiento son dinámicos y están fuertemente unidos a la fisiología celular, identidad de órganos y estados de desarrollo. La habilidad de una planta de monitorear y responder a los niveles de azúcares puede servir como mecanismo de control para integrar condiciones ambientales externas incluyendo luz, otros nutrientes y estrés biótico y abiótico, mediante el desarrollo de programas intrínsecos dirigidos por múltiples hormonas vegetales (Zhou, et al., 1998). En plantas, los azúcares son vistos como fuentes de energía y de intermediarios metabólicos, así como componentes de almacenamiento, y actualmente se conocen también como moléculas señal, ya que modulan una amplia variedad de procesos vitales como germinación de semillas, desarrollo de semillas, diferenciación de raíz y hojas, transición floral, embriogénesis y senescencia, así como respuestas a luz, estrés y patógenos (León and Sheen, 2003), de ahí su importancia como fuentes de energía.

El mecanismo de respuesta a azúcares en las plantas es complicado por el hecho de que las plantas parecen responder a niveles o flujos de azúcares solubles por no sólo una, sino varias vías de respuesta (Gibson, 2004). Otro aspecto que complica la caracterización de las vías de respuesta a azúcares es el hecho de que estas vías “interactúan” o exhiben “intercomunicación” con muchas otras vías de respuesta (Gibson, 2004). Por ejemplo, la vía de respuesta a azúcares interactúa con vías de respuesta para otros nutrientes clave como las de nitrógeno (Coruzzi and Bush, 2001; Coruzzi and Zhou, 2001). Las vías de respuesta a azúcares también interactúan con vías de respuesta al ambiente, como aquella involucrada en la respuesta a luz (Elolis et al. 2002; brocard-Gifford et al. 2003). Estudios recientes han proporcionado evidencias significativas de interacciones entre las vías que responden a azúcares y la respuesta a fitohormonas que tienen impacto en el flujo de las vías metabólicas (Gazzarini and McCourt, 2001; Finkelstein and Gibson, 2002; León and Sheen, 2003).

### ***1.6.1 Procesos afectados por las vías de respuesta a azúcares y por hormonas vegetales.***

La investigación en un gran número de organismos ha indicado que el progreso a lo largo del ciclo celular es regulado, en parte, en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, en levadura, una señal derivada de la glucosa regula positivamente la expresión de componentes críticos de la maquinaria reguladora del ciclo celular, facilitando el progreso hacia Start (Newcomb et al., 2003). Además, evidencias recientes indican que la disponibilidad de nutrientes juega un papel importante en el control del ciclo celular en organismos multicelulares, incluyendo tanto a los animales (Stocker and Hafen, 2000) como a las plantas (Meijer and Murray, 2000; Riou-Khamlichi et al., 2000; Halford and Dickinson, 2001). Por lo tanto, no es sorprendente que la disponibilidad de nutrientes importantes, como los azúcares, ayuden a regular el progreso a través de transiciones críticas del desarrollo así como a través del ciclo celular. Por ejemplo, la acumulación diferencial ya sea de sacarosa o glucosa ayudan a regular la transición del crecimiento a partir de la división celular, hacia el crecimiento por expansión celular y la acumulación de reservas en embriones vegetales (Wobus and Weber, 1999; Borisjuk et al., 2003). Interesantemente, la glucosa y sacarosa parecen desempeñar diferentes papeles durante la embriogénesis. Imágenes de alta resolución de la distribución de las concentraciones de glucosa en los cotiledones en desarrollo de haba han mostrado que los tejidos no diferenciados mitoticamente activos contienen altos niveles de glucosa, mientras que los tejidos menos diferenciados contienen bajos niveles de glucosa. En cambio, imágenes de los gradientes de sacarosa en los cotiledones de haba durante la primera fase de almacenamiento del desarrollo, han revelado que los niveles más altos de sacarosa se encuentran en las células que se

están expandiendo más activamente; estas concentraciones elevadas también correlacionan con el aumento en la acumulación de almidón. Estos descubrimientos sugieren que elevadas concentraciones de sacarosa son importantes para promover la diferenciación celular (Borisjuk et al., 2000).

### ***1.6.2 Azúcares y regulación hormonal de semillas en germinación.***

Los azúcares y las hormonas vegetales también interactúan en la regulación de la germinación de semillas. Algunos azúcares inhiben la germinación de semillas cuando están presentes en concentraciones muy bajas. Por ejemplo, menos del 5% de semillas silvestres de *Arabidopsis* sembradas en un medio conteniendo manosa 10mM ó 2-desoxiglucosa, germinaron. En contraste, casi el 100 % de este tipo de semillas sembradas en 3-O-metilglucosa o 6-desoxiglucosa 10mM germinaron. Como la manosa y la 2-desoxiglucosa, pero no así la 3-O-metilglucosa ó 6-desoxiglucosa han sido citadas ampliamente como sustratos de las hexocinasas, estos resultados sugieren que la manosa y la 2-desoxiglucosa inhiben la germinación de semillas por algún paso mediado por la vía de transducción de señales de azúcares mediada por la hexocinasa (Pego et al., 1999). De cualquier manera, estudios de este tipo con análogos de la glucosa, aunque útiles, son difíciles de interpretar.

Por otro lado, es ampliamente conocido que ABA inhibe la germinación de semillas (Finkelstein et al., 2002), sorprendentemente, algunos azúcares análogos pobremente metabolizados también inhiben la germinación de semillas (Pego et al., 1999) y la glucosa retarda la velocidad de germinación en *Arabidopsis* (To et al., 2002; Price et al., 2003), la glucosa exógena permite a semillas silvestres de *Arabidopsis* germinar en presencia de otras concentraciones inhibitorias de ABA (Garcarrubio et al.,

1997; Finkelstein and Lynch, 2000). Aunque la base molecular de este efecto aún debe de ser determinada, el hecho de que la concentración óptima de glucosa para compensar los efectos inhibitorios de ABA sea relativamente baja, sugiere que el efecto no es enteramente nutricional (Finkelstein and Lynch, 2000).

### ***1.6.3 Mecanismos para las interacciones y vías de respuesta entre azúcares y hormonas.***

Como se ha expuesto, las vías de respuesta a azúcares y hormonas “interactúan” o exhiben “intercomunicación” en la regulación de varios procesos. De cualquier forma, poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales interactúan estas vías. La evidencia con la que se cuenta sugiere que estas interacciones podrían estar directamente relacionadas, en algunos casos, y de manera indirecta, en otros. Por ejemplo, un componente de una vía de respuesta podría interactuar directamente con un componente de otra vía de respuesta para formar un complejo. Alternativamente, otra(s) vías de respuesta podrían interactuar indirectamente alterando los niveles del mismo segundo mensajero (Gibson, 2004).

### ***1.6.4 Influencia de los azúcares en el metabolismo y transporte de hormonas.***

Uno de los mecanismos por los cuales los azúcares afectan la respuesta de las hormonas es alterando sus niveles, la localización y/o el transporte de éstos. Por ejemplo, por largo tiempo se ha postulado que el tratamiento con sacarosa o glucosa en cebada inhibe la síntesis o liberación de giberelinas desde el escutelo (Radley, 1969). También se ha demostrado que la aplicación de glucosa exógena lleva a un descenso en

los niveles de giberelinas en embriones de cebada (Perata et al., 1997) y de arroz (Yu et al., 1996). Además, se ha postulado que la sacarosa afecta la respuesta a giberelinas al modificar la conjugación de las mismas, por ejemplo, la aplicación de sacarosa exógena a jitomates causa un descenso en las giberelinas bioactivas con un incremento en los niveles de sus conjugados, potencialmente inactivos (Simko, 1994).

También se ha demostrado que la glucosa afecta los niveles de ABA. En embriones de arroz, la adición de glucosa ha mostrado correlacionar con un descenso en los niveles de ABA (Toyofuku et al., 2000). De forma interesante, el efecto opuesto se ha observado en *Arabidopsis*, donde la adición de glucosa exógena a plántulas muy jóvenes causa un aumento en los niveles de ABA (Arenas-Huertero et al., 2000; Cheng et al., 2002). Además, se ha observado que niveles elevados de glucosa inducen la expresión de algunos genes biosintéticos de ABA en *Arabidopsis* (Cheng et al., 2002). Recientemente se demostró que la glucosa exógena retarda la velocidad a la cual disminuyen los niveles de ABA en semillas en germinación de *Arabidopsis* (Price et al., 2003), sugiriendo estos resultados que el incremento en los niveles de ABA en las plántulas de *Arabidopsis* en presencia de glucosa exógena podrían ser debidos más a un descenso en la degradación de ABA y no a un descenso en su síntesis.

#### ***1.6.5 Influencia de las hormonas en el metabolismo y transporte de azúcares.***

Se han implicado a varias hormonas vegetales en la regulación del metabolismo y/o transporte de azúcares. En particular, se ha sugerido por largo tiempo que las citocininas tienen un papel importante en la regulación de las interacciones entre las fuentes y pozas de azúcares (Roitsch and Ehneß, 2000). En *Chenopodium rubrum*, se ha observado que las citocininas inducen la expresión tanto de una invertasa de la pared

celular como de un transportador de hexosas, dando una evidencia de un mecanismo por el cual las citocininas pueden ayudar a regular el transporte (Ehneß and Roitsch, 1997). A ABA también se le ha implicado en la regulación del transporte y metabolismo de azúcares. El tratamiento de semillas de arroz en germinación con ABA y glucosa provoca una mayor acumulación de azúcares en el escutelo que el tratamiento con glucosa sola, sugiriendo que ABA estimula la toma de glucosa del medio. Además, el tratamiento con el análogo de ABA (+)-trifluoro-ABA más glucosa lleva a un aumento en las concentraciones de sacarosa, sugiriendo que ABA estimula la formación de sacarosa o bien disminuye su degradación (Kashem et al., 1998). Además de las fitohormonas exógenas que afectan los niveles y el metabolismo de azúcares, la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* con respuesta a ABA ha revelado alteraciones en los niveles de azúcares solubles (Brocard-Gifford et al., 2003) y de almidón (Keith et al., 1994; Meinke et al., 1994; Brocard- Gifford et al., 2003). Estos resultados nos proveen mayor evidencia de que ABA posee un papel importante en la regulación del metabolismo de azúcares.

#### ***1.6.6 Regulación de la expresión de componentes de las vías de respuesta a hormonas por azúcares y viceversa.***

Los azúcares también afectan las vías de respuesta a hormonas influyendo en la expresión y/o los niveles de actividad de los componentes de esas vías. Por ejemplo, se ha demostrado que la glucosa exógena induce la expresión del gen *ABI3* (Cheng et al., 2002) y *ABI4* (Arenas-Huertero et al., 2000; Cheng et. al., 2002) en plántulas de *Arabidopsis*, afectando posiblemente la sensibilidad del tejido al ABA endógeno. La glucosa exógena también incrementa la expresión de *ABI5* en *Arabidopsis* (Brocard et al., 2002; Cheng et al., 2002). De cualquier manera, el estrés también estimula la

expresión de *ABI5*, lo cual sugiere que el efecto de la glucosa en la expresión de *ABI5* puede no ser específica (Brocard et al., 2002). También se ha observado que tanto la glucosa como la sacarosa afectan la expresión de tres proteínas MYB de arroz, las cuales están implicadas tanto en la respuesta a glucosa como a giberelinas (Lu et al., 2002). A su vez, se ha demostrado que las hormonas vegetales regulan la expresión de componentes putativos de las vías de respuesta a azúcares. Por ejemplo, se ha demostrado que ABA incrementa los niveles de los transcritos del grupo 2 de la proteína cinasa relacionada a SNF1 de trigo *PKABAI* (Anderberg and Walter-Simmons, 1992). De manera similar, se ha demostrado que las citocininas incrementan la expresión del grupo 3 de las proteínas cinasas relacionadas a SNF1 *AtSRI* de *Arabidopsis* (Chikano et al., 2001) y de *WPK4* de trigo (Ikeda et al., 1999). En levadura, se ha demostrado que SNF1 posee un papel en la respuesta a azúcares (Carlson, 1998) y que el grupo 1 de las proteínas cinasas relacionadas están implicadas en la respuesta a azúcares en plantas (Halford et. al., 2003). Aunque los papeles biológicos del grupo 2 y el grupo 3 de las proteínas cinasas SNF relacionadas en plantas es poco claro, se ha encontrado que *WPK4* complementa una mutante de *snf1* en levadura, lo cual sugiere que *WPK4* pudiera estar implicada en las vías de respuesta a azúcares en plantas (Ikeda et al., 1999).

#### ***1.6.7 Componentes comunes entre las vías de respuesta a hormonas por azúcares o viceversa .***

Evidencias recientes sugieren que algunos factores deben actuar como componentes de más de una vía de respuestas (Gibson, 2004). Una mutación en el gen *ICX1* de *Arabidopsis* provoca una mayor acumulación de antocianinas en respuesta tanto a sacarosa como a citocinina. Estos resultados se han interpretado sugiriendo que

ICX1 actúa como un regulador negativo de ambas vías de respuesta (Wade et al., 2003). Previamente, *Arabidopsis* expresando el gen de la hexocinasa *ICX1* en antisentido, mostró ser insensible a glucosa (Jang et al., 1997). Más recientemente, mutantes de *hxx1* mostraron ser insensibles a auxina e hipersensibles a citocinina, sugiriendo que HXX1 podría afectar las tres vías al ser un componente común de señalización (Moore et al., 2003). De forma similar, mutaciones en el gen *ABI4* de *Arabidopsis*, el cual codifica para un factor transcripcional (Finkelstein et al., 1998), confiere una mayor resistencia a los efectos inhibitorios de ABA sobre la germinación de semillas (Finkelstein, 1994) y a glucosa y sacarosa sobre el desarrollo de plántulas jóvenes (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001). De cualquier manera, los resultados descritos anteriormente no indican si ICX1, HXX1 y/o ABI4 actúan directa o indirectamente en la respuesta a hormonas y azúcares.

De manera interesante, un homólogo de ABI4 en maíz ha mostrado unir elementos de promotores que regulan la respuesta de ABA y azúcares, sugiriendo que ABI4 podría actuar directamente en ambas vías (Niu et al., 2002).

También se ha sugerido que componentes de la vía de ubiquitinación/proteasoma de degradación de proteínas actúan en ambas vías de respuesta, de azúcares y hormonas (Ellis et al., 2002). Por ejemplo, mutaciones en el gen *ASK1* de *Arabidopsis*, el cual codifica una subunidad del complejo SCF ubiquitín ligasa, provoca una disminución en la respuesta a auxina (Gray et al., 1999). También se ha demostrado que la proteína ASK1 coinmunoprecipita con una proteína cinasa relacionada a SNF1 en extractos de *Arabidopsis* (Farrás et al., 2001). Como las proteínas cinasas relacionadas a SNF1 han sido implicadas en las vías de respuesta a azúcares (Halford et al., 2003), estos resultados sugieren que tal vez ASK1 podría estar implicada en ambas vías de respuesta, a auxina y a azúcares. Finalmente, las vías de

respuesta podrían actuar vía segundos mensajeros comunes. Por ejemplo, se ha sugerido que el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa en ambas vías de respuesta, tanto de hormonas como de azúcares. La aplicación de sacarosa exógena a suspensiones de cultivos celulares de arroz inhibe la toma de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que ésta última se estimula en respuesta al ayuno de sacarosa (Mitsui et al., 1999). De forma similar, se conoce cierto número de vías de respuesta a ABA y giberelinas, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lovegrove and Hooley, 2000).

#### ***1.6.8 Regulación de las ciclinas D en cultivos celulares.***

En células humanas, las ciclinas tipo D actúan como sensores de factores de crecimiento, dependiendo su expresión más de estímulos extracelulares que del estado de la célula dentro del ciclo celular; por lo que se ha propuesto que las ciclinas tipo D proveen la unión entre los estímulos ambientales y el ciclo celular.

Similar a la respuesta de las ciclinas tipo D de células de mamíferos a factores de crecimiento del tipo suero, las ciclinas D de plantas son reguladas en respuesta a señales exógenas que se conoce afectan el crecimiento de las células vegetales. Las auxinas y las citocininas son importantes reguladores del crecimiento vegetal y son requeridas por la mayoría de los cultivos de células vegetales. Además de estas hormonas vegetales, la sacarosa es de central importancia en el metabolismo de las plantas, pues es el producto mayoritariamente sintetizado y transportado durante la fotosíntesis, y una posible molécula de señalización en la regulación de un gran número de genes.

Usando cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis*, se demostró que la sacarosa puede inducir tanto a la Ciclina D2 como a la Ciclina D4 en condiciones de privación de nutrientes. Un análisis más detallado de combinaciones de azúcares y PGRs en cultivos celulares que fueron privados de citocininas, auxinas y sacarosa por

48 h mostraron que la Ciclina D3 fue inducida específicamente por citocininas y la Ciclina D2 por sacarosa. Recientemente, análisis más detallados mostraron que la inducción de la Ciclina D3 por citocininas depende de la presencia de sacarosa, y que la sacarosa por sí misma también puede inducir a la ciclina D3. Cuando se utilizó cicloheximida en concentraciones que inhiben tanto la síntesis de proteínas como la progresión del ciclo celular, los niveles de Ciclina D2 y Ciclina D3 aún fueron estimulados por sacarosa. De estos experimentos se puede concluir que ni la progresión del ciclo celular ni la síntesis *de novo* de proteínas son requeridas para incrementar los niveles del mRNA de las Ciclinas D2 y D3, y es consistente con sus papeles propuestos como sensores del estado nutricional en el control del ciclo celular. La respuesta de la Ciclina D2 y de la Ciclina D3 a diferentes estímulos sugieren que cada una de ellas está involucrada en vías separadas de transducción de señales, una conclusión soportada por las diferentes respuestas de los genes a la presencia de inhibidores de proteínas fosfatasas (Riou-Khamlichi et al, 2000).

Por todo lo citado anteriormente, se sugiere que la sacarosa es el candidato más favorable para la regulación de la velocidad de la división celular, debido a que su disponibilidad en células en división en los meristemos de tallo y de raíz sería un reflejo de la capacidad fotosintética total de la planta y por consiguiente de las condiciones ambientales a las cuales está expuesta.

## **ANTECEDENTES**

El proceso que ocurre entre el nacimiento de una célula y su subsecuente división define un ciclo celular. Éste está caracterizado por una serie de eventos unidireccionales, que aseguran la correcta duplicación de la célula, incluyendo material citoplasmático y nuclear y, en el caso de las plantas, también la pared celular. En años recientes, se ha vuelto evidente que la proliferación celular es influenciada por el fondo genético así como por señales extracelulares. En el desarrollo postembrionario de las plantas, el crecimiento del organismo requiere de la coordinación de la proliferación celular con la diferenciación celular de una manera continua; esta potencial proliferación es influenciada por varias fitohormonas, teniendo las auxinas y citocininas (CKs) un papel clave, ampliamente documentado, en controlar la expresión transcripcional de varios genes del ciclo celular. Además, otras hormonas, como el ácido abscísico (ABA), el etileno (ET), el ácido jasmónico (JA) y los brasinoesteroides (BRs), cuyas acciones están mucho menos caracterizadas, ejercen su efecto sobre la progresión y/o arresto del ciclo celular (Gutiérrez, 2005).

Distintos experimentos han indicado que, aunque la división celular no es necesaria para que ocurra una germinación visible, el establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el posterior crecimiento, por lo que el estudio del ciclo durante la germinación es esencial. La germinación de una semilla tiene como propósito fundamental la reproducción de la planta que fue originada por esta misma. El proceso de germinación implica el despertar de la semilla en estado latente y la reanudación de los procesos de desarrollo, esto implica que la semilla contiene, o debe adquirir de forma pronta, la memoria biológica del programa morfogénico que reproduce a la planta. Como consecuencia de la entrada de agua, las células de los tejidos de las

semillas se alargan y finalmente se dividen, un proceso que es seguido por la protrusión de la raíz, evento que define la terminación del proceso de germinación.

### ***2.1 Papel de algunas proteínas dentro del ciclo celular durante la germinación de maíz.***

Una de las aproximaciones para definir el papel de las proteínas del ciclo celular en plantas, es el estudio de sus niveles, expresión, actividad y asociaciones durante un evento de desarrollo particular como es la germinación.

Dentro de nuestro grupo de investigación se ha estudiado el comportamiento de varias proteínas de maíz que intervienen durante la progresión del ciclo celular, y que las utilizamos como marcadores del mismo. Entre las proteínas que hemos estudiado están PCNA, la DNA polimerasa  $\alpha$ , así como varias ciclinas, entre ellas la Ciclina A1, la Ciclina D2;1, la Ciclina D4;1, la Ciclina D5;1 y la Ciclina D5;2, entre otras; y de algunas de ellas hemos definido la tendencia de sus niveles cuando son influenciadas por diversos agentes externos, como pueden ser la presencia de hormonas (p. ej. benciladenina o ácido abscísico) o bajo preacondicionamiento, sabiendo que este tipo de factores pueden afectar la progresión natural del ciclo celular y como consecuencia observar algún cambio en la germinación del eje embrionario de maíz.

Con respecto a PCNA, se sabe que es un componente esencial para cada aspecto del metabolismo del DNA, además de que se encuentra presente durante la fase S del ciclo celular, siendo la pinza móvil requerida para la procesividad de la DNA polimerasa  $\delta$  ( $\delta$  ó  $\epsilon$ ) durante la síntesis del DNA (Tan et al., 1986; Prelich et al., 1987; Shivji et al., 1992; Smith et al., 1994). También se le encuentra asociada a proteínas de la fase G1 del ciclo celular, como son los complejos ciclinas-cinasas (Cyc/Cdks) (Kelman, 1997) donde su actividad ayuda seguramente al ensamblaje/remoción de los

complejos de proteínas-DNA (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003) además de que interviene en los procesos de reparación (Shivji et al., 1992; Smith et al., 1994) y recombinación del DNA (Kelman, 1997), interactuando con múltiples proteínas (Sánchez et al., 2002).

A la fecha se han aislado cDNAs de PCNA de arroz, chícharo y maíz (Suzuka et al., 1989; Shimizu and Mori, 1998; López et al., 1995, 1997) y se ha visto que codifican para una proteína altamente conservada. En maíz se han reportado dos cDNAs de PCNA, ambos muestran patrones de expresión similares en tejidos proliferativos y virtualmente una secuencia de aminoácidos idéntica (López et al., 1997). PCNA está presente en niveles bajos en ejes embrionarios de semillas secas de maíz y durante la germinación normal sus niveles se incrementan gradualmente alcanzando un máximo al tiempo en el que las células entran a la fase S del ciclo celular, aproximadamente entre las 15 y 20 horas de germinación (Herrera et al., 2000).

Otro evento importante dentro del ciclo celular es la replicación del DNA, que se lleva a cabo durante la fase S del mismo, la cual ocurre una vez que se ha confirmado, durante G1, que el estado metabólico de la célula es óptimo para proliferar. Dentro de la geminación, la replicación del DNA es un evento relativamente tardío, empezando varias horas después de la imbibición de las semillas (Osborne, 1982). En maíz este proceso empieza entre las 12-15 h después de la imbibición (Baíza et al., 1989; Georgieva et al., 1994) y es un evento fundamental que precede la división celular y el establecimiento de la plántula. En este sentido, la expresión y/o regulación de las DNA polimerasas replicativas es de gran importancia.

Las DNA polimerasas en plantas han sido poco estudiadas, sin embargo, se han reportado DNA polimerasas  $\alpha$  para diferentes especies (Bryant, 1980; Litvak and Castroviejo, 1987) y han sido purificadas de arroz (Amileno et al., 1979), coliflor

(Yamaguchi et al., 1979), trigo (Laquel et al., 1990; Balmlukhanov et al., 1992), chícharo (Bryanto et al., 1992) y maíz (Coello et al., 1992).

La DNA polimerasa  $\alpha$  de maíz (DNA polimerasa 2) aislada de ejes embrionarios, es una holoenzima de aproximadamente 400 kDa compuesta por varias subunidades, de las cuales una proteína de 90 kDa presenta la actividad catalítica (Coello et al., 1994), siendo ésta de baja procesividad (Coello and Vázquez-Ramos, 1995a, 1995b); además de tener fuertemente asociada una actividad de DNA primasa (García et al., 1997). Además hemos reportado con anterioridad que los niveles de esta proteína no varían conforme la germinación avanza (Coello and Vázquez-Ramos, 1995a) por lo que seguramente es una proteína muy estable, ya que se encuentra presente también en semilla seca, y probablemente ha estado ahí por varios días o semanas, lo cual sugiere una síntesis y degradación balanceada de la proteína a lo largo de la germinación (Coello and Vázquez-Ramos, 1995a); y que permanece como remanente de las últimas divisiones celulares del embrión y/o en los procesos generales de reparación del DNA que ocurren previamente (o concomitantemente) con la maduración de la semilla y procesos de secado (García et. al., 2006).

Finalmente, la DNA polimerasa alfa de maíz es regulada a nivel post-traducciona, ya que su actividad se incrementa conforme la germinación avanza (Coello et. al., 1992), sugiriendo que puede ser su asociación con otras proteínas, y/o su modificación por fosforilación (Coello and Vázquez-Ramos, 1995a), u otra forma de modificación proteica, necesarias para su actividad de polimerasa (García et al., 2006).

Otras proteínas interesantes y cuyo papel es determinante dentro de la regulación del ciclo celular son las ciclinas, las cuales forman complejos clave integrados por una subunidad catalítica, una cinasa dependiente de ciclina (Cdk), y la subunidad regulatoria que es la ciclina (Pines, 1993).

Se ha propuesto que la ciclina D es una de las primeras proteínas que perciben el ambiente exterior y pueden actuar como sensores de factores de crecimiento integrando las señales externas con la maquinaria del ciclo celular (Sherr and Roberts, 1999). Siendo así, es natural que la expresión de la ciclina D sea activada por factores de crecimiento (Prober and Edgar, 2001, Dewitte and Murray, 2003).

De forma similar que en mamíferos, las ciclinas D en plantas responden a señales como hormonas y niveles de carbohidratos. En cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis*, la adición de citocinina al medio conteniendo sacarosa induce la transcripción del gen de la ciclina D3, pero la expresión de las ciclinas D2 y D4 es inducida únicamente por sacarosa (Soni et al., 1995; De Veylder et al., 1999; Riou-Khamilichi et. al., 1999; Riou-Khamilichi et. al., 2000).

Las ciclinas D en metazoarios están presentes sólo durante la fase G1, formando un complejo activo con Cdk4 o Cdk6, siendo posteriormente degradadas vía proteólisis (Dile et. al., 1997). Por otro lado, en plantas las ciclinas D aparentemente están presentes a lo largo de todo el ciclo celular (Sorrel et al., 1999), aunque reportes recientes han indicado que la ciclina D3;1 es inestable, siendo blanco del proteasoma (Planchais et. al., 2004).

En maíz se ha estudiado a la ciclina D2;1 tanto a nivel transcripcional como de acumulación de proteína. Lo que se ha observado a nivel de proteína, es que la ciclina D2;1 está presente en ejes embrionarios secos, y sus niveles se incrementan a las 6 h de germinación, disminuyendo gradualmente hacia las 24 h. En tanto que a nivel transcripcional, el mRNA de la ciclina D2;1 no es detectable en semilla seca ni a las 3 h de germinación; incrementando su expresión notablemente hacia las 6 h de germinación y fluctuando sus niveles posteriormente hasta las 24 h, lo cual puede estar indicando un

requerimiento temprano de la ciclina para iniciar los eventos del ciclo celular (Gutiérrez et. al., 2005).

A nivel transcripcional, también se han estudiado otras ciclinas de maíz, particularmente la ciclina D4;1, la ciclina D5;1 y la ciclina D5;2. Lo que hemos observado es que se expresan a diferentes niveles en condiciones de germinación normal. Por ejemplo, la ciclina D5;1 no varía a lo largo de la germinación normal, en cambio, la expresión de la ciclina D4;1 en ejes embrionarios secos es escasa y durante la germinación normal sus niveles son muy bajos, aunque es la única ciclina cuyo mRNA se acumula consistentemente durante este proceso. Por último, el transcrito de la ciclina D5;2 está presente sólo durante la germinación temprana y sus niveles decaen fuertemente conforme progresa la germinación, lo cual nos sugiere que su función sólo es necesaria durante las primeras horas, cuando la fase G1 ocurre (Reyes et. al., 1991; Sánchez et al., 2005). Esto lo que sugiere es que las ciclinas D5;1 y la D2;1 están sujetas a una regulación menos severa durante la germinación (Quiroz et. al., 2006).

## ***2.2 Modificación de la velocidad de germinación y el ciclo celular.***

Ahora bien, cuando el estado fisiológico de los ejes embrionarios de maíz durante la germinación se modifica, los tiempos en que ocurren los diferentes eventos del ciclo celular pueden también sufrir variaciones. El deterioro y/o envejecimiento de semillas provocan un retardo en el establecimiento del ciclo celular, lo que finalmente se manifiesta en un tiempo de germinación más largo (Vázquez-Ramos, 2003).

Por otro lado, tanto la incubación en presencia de fitorreguladores como las citocininas así como el precondicionamiento de semillas, provocan un acortamiento importante de la fase G1 del ciclo, de tal forma que la fase S comenzará hacia las 4

horas de germinación, en lugar de las 12-15 horas que normalmente tarda en comenzar. El mecanismo molecular involucrado en iniciar estos cambios se desconoce, pero podemos ahora observar el efecto que se produce en la presencia y actividad de las proteínas del ciclo celular bajo condiciones en que la germinación se acelera (Vázquez-Ramos, 2003).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la germinación de maíz mediante la adición de benciladenina (BA), un fitoregulador mitogénico sintético perteneciente al grupo de las citocininas. Los resultados obtenidos indican que BA induce un incremento en la síntesis total de DNA en más del 50% con relación al control, así como un incremento en la síntesis reparativa de DNA en ejes embrionarios de maíz  $\gamma$ -irradiados, mientras que en los ejes control cambia el tipo de síntesis de un tipo indefinido a uno reparativo (Zúñiga-Aguilar y Vázquez-Ramos, 1995).

Por otro lado, cuando los ejes embrionarios se imbiben en presencia de benciladenina (BA), la fase S se adelanta, empezando hacia las 6 horas de germinación, tiempo en el cual PCNA alcanza un máximo en sus niveles (Herrera et al., 2000). Sin embargo, la imbibición de los ejes embrionarios en presencia de ácido abscísico no altera los niveles de PCNA con respecto a la germinación normal. Es a este mismo tiempo cuando la actividad de las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$  se incrementa varias veces, efecto debido aparentemente a modificaciones proteicas postraduccionales (Coello et al., 1995a; García et. al., 1997).

Ahora bien, en cuanto a la ciclina D2;1, se ha observado que, a nivel de proteína, la adición de benciladenina o de ácido abscísico no modifica sus niveles, lo cual nos indica que la regulación de la acumulación de esta proteína durante la germinación no es influenciada por estas hormonas (Gutiérrez et. al., 2005). Sin embargo, a nivel transcripcional, la expresión del mRNA se incrementa considerablemente con la adición

de benciladenina, lo cual sugiere que el control de la expresión del gen de la ciclina D2;1 está sujeto a la regulación por citocininas (Gutiérrez et. al., 2005). En *Arabidopsis* la expresión del mRNA de la ciclina D2 es estimulada por sacarosa pero no por citocininas (Riou-Khamlichi et al., 1999, Oakenfull et al., 2002), mientras que la expresión de la ciclina D3 de *Arabidopsis* es inducida con citocininas sólo en presencia de sacarosa (Riou-Khamlichi et al., 1999), lo cual muestra diferencias entre maíz y *Arabidopsis* en respuesta a factores bioquímicos externos. De hecho, la inducción de la expresión del gen de la ciclina D2;1 de maíz requiere también tanto de sacarosa como de citocininas, lo cual sugiere que la regulación de la ciclina D2;1 de maíz es similar a la de la ciclina D3 de *Arabidopsis* (Gutiérrez et. al., 2005).

Es por todo lo citado anteriormente que nos interesó observar los cambios en los niveles de proteínas del ciclo celular cuando son influenciadas por otra hormona, en este caso la auxina, que como se sabe, interviene en casi cada aspecto del desarrollo de una planta, entre ellos proliferación, división celular así como especialización celular (Callis, 2005), su mezcla con una citocinina, particularmente la benciladenina, estudiada ya con anterioridad, así como el papel de la sacarosa dentro de este proceso, para poder dilucidar, en parte, cómo se ve afectado el ciclo celular dentro de la germinación de maíz.

## **HIPÓTESIS**

---

- ❖ Se espera que la adición de auxina, así como la ausencia de sacarosa en ejes embrionarios de semillas de maíz modifique el ciclo celular durante la germinación, así como los niveles de proteínas de ciclo celular, como son, PCNA, DNA Polimerasa  $\alpha$ , Ciclina A1, Ciclina D2;1, Ciclina D4;1 y Ciclina D5;2.

# **OBJETIVOS**

---

## **4.1 GENERAL.**

- Estudiar el efecto que producen la auxina y la fuente carbonada sobre la síntesis de DNA durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz. Bajo estas condiciones se estudiará el comportamiento de proteínas del ciclo celular durante la germinación temprana.

## **4.2 PARTICULARES.**

- Estudiar los efectos del ácido indol-3-acético (AIA) sobre la síntesis de DNA durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz.
- Evaluar la importancia de la sacarosa como fuente carbonada en la estimulación de la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz.
- Comparar los efectos del ácido indol-3-acético y su mezcla con benciladenina, en presencia o ausencia de sacarosa, en la síntesis de DNA durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz.
- Estudiar el efecto en el comportamiento de las proteínas del ciclo celular: PCNA, DNA Polimerasa  $\alpha$ , Ciclina A1, Ciclina D2;1, Ciclina D4;1 y Ciclina D5;2, durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz en presencia de ácido indol-3-acético (AIA).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5.1 Material biológico.**

Las semillas de maíz de variedad Chalqueño utilizadas en este trabajo fueron obtenidas directamente de un agricultor del valle de Chalco y presentaron una viabilidad mayor al 95 %.

## **5.2 Métodos.**

### **5.2.1 Imbibición de ejes embrionarios de semillas de maíz.**

Los ejes embrionarios se obtuvieron por disección manual de semillas de maíz y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. Para la imbibición de los ejes embrionarios, éstos se lavaron una vez con hipoclorito de sodio al 0.5% y cinco veces con agua destilada estéril. El exceso de agua se eliminó secando los ejes sobre papel filtro estéril dentro de una caja de Petri, y posteriormente se les adicionó buffer de imbibición (50mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 50mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2% Sacarosa) y se incubaron en una estufa (L-C Incubator Lab-Line Instruments, Inc.) a 25 °C a diferentes tiempos, a saber, 3, 6, 9, 12, 15 y 30 horas. En el caso de los ejes tratados con auxina, ésta se les adicionó junto con el buffer de imbibición a diferentes concentraciones de acuerdo al ensayo ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $1 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L).

### **5.2.2 Efecto del ácido-indol-3-acético en la síntesis de DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.**

Se desinfectaron lotes de 10 ejes embrionarios con NaClO al 0.1 % durante 30 s, posteriormente se lavaron 5 veces con agua estéril durante 30 s cada vez. Al final de los lavados se escurrieron sobre papel filtro estéril durante 15 minutos. Una vez secos, se colocaron 10 ejes embrionarios sobre papel filtro estéril dentro de una caja de Petri y se saturaron con el buffer de imbibición conteniendo la hormona y [metil-<sup>3</sup>H] timidina (solución acuosa 5 mCi / 5.0 mL, Amersham Biosciences) durante 15 horas (por triplicado, 300 µL por cada 10 ejes). Pasada la incubación, se lavaron dos veces con agua desionizada y se agregó 1 mL de solución de lisis (NaCl 0.15 mol/L, EDTA 0.1 mol/L y SDS 0.5 %) para homogeneizarlos. Esto se hizo en un mortero a 4 °C. Posteriormente se pasó el homogenizado a un tubo de ensaye de 10 mL y se agregó 1 mL de TCA al 20 % incubándose por 1h a 4°C. Pasado este tiempo se filtraron (equipo de filtración Millipore) y se lavaron 4 veces con TCA al 5 % y dos veces con etanol al 90 %. Se secaron los papeles filtro por 1 h/60 °C y se introdujeron en tubos de centelleo con 5 mL de solución de centelleo (2,2'-p-fenilén-bis(5-feniloxazol) (POPOP) al 0.1 %, 2,5-difeniloxazol (PPO) al 0.5 % disueltos en tolueno). Finalmente se cuantificó la incorporación de [metil-<sup>3</sup>H] timidina al DNA, mediante el uso de un contador de centelleo Beckman LS6000 IC.

### **5.2.3 Preparación de extractos crudos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de imbibición: 0, 3, 6, 9 y 12 horas.**

Se colocaron 10 ejes embrionarios de maíz en buffer de imbibición en un mortero a 4 °C. Posteriormente se agregó 1 mL de solución de extracción de proteínas (25mmol/mL Tris-HCl pH 7.5, 25 mmol/mL de KCl, 15 mmol/mL de MgCl<sub>2</sub>, 75 mmol/mL NaCl, 5 mmol/mL de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O pH 8, 1mmol/mL de DTT, 0.2 % Tritón X-100, 250 mmol/mL sacarosa, 60 mmol/mL glicerol, 50 mmol/mL NaF, 200 µmol/µL Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/mL EGTA y una tableta de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete de Boehinger-Mannheim, por cada 50 mL de buffer)) y se homogeneizaron. Finalmente se centrifugaron a 30,000 rpm/4 °C en una centrífuga Sorvall Super 21 de Dupont, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf almacenándolo a -70 °C.

### **5.2.4 Cuantificación de proteína.**

Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) en los extractos proteicos de ejes embrionarios germinados a los diferentes tiempos arriba mencionados, usando BSA (albúmina sérica bovina) como estándar.

### **5.2.5 Electroforesis.**

Se prepararon las muestras (30 µg de proteína + buffer de carga (Tris-HCl 200 mM, pH 6.8, DTT 400 mM, SDS al 8 %, glicerol al 40 % y la mínima cantidad de azul de bromofenol) (Sánchez et al., 2005) y se cargaron en un gel

de poliacrilamida al 12 %. Se separaron cada una de las muestras por electroforesis SDS-PAGE por 4 hrs / 80V, en una cámara para electroforesis Mini-Protean II de Bio-Rad.

### **5.2.6 Western blot.**

Se activaron las membranas de Immobilon-P (Millipore) en metanol por 3 minutos, y una vez activadas se depositaron en solución de amortiguador de transferencia (glicina al 1.4 %, Tris-HCl al 2.5 % pH = 8.3, metanol al 20 % disueltos en agua) durante aproximadamente 5 min. Por otro lado, los geles se incubaron en solución de transferencia por 5 minutos. Los geles se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) durante una hora / 10V / 75 mA, en un aparato Trans-blot SD semi dry transfer cell de Bio-Rad colocando el electrodo que corresponde al ánodo, 6 papeles Whatman 3MM sobre el electrodo, la membrana de Immobilon-P, después el gel sobre la membrana, y por último 3 papeles Whatman 3MM sobre el gel, finalmente se colocaba el electrodo que corresponde al cátodo y se transfirieron las proteínas de un gel a 75mA / 1h (2 geles 150 mA / 1h) (Sánchez et al., 2005).

Después de terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución que contenía PBS 1X (NaCl al 8 %, KCl al 0.2 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 2.7 %,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  al 0.3 % disueltos en  $\text{H}_2\text{O}$ ), mas leche semidescremada al 5% y Tween 20 al 0.9% por 1 hora. Después se colocó el primer anticuerpo (anticuerpos policlonales) 12 horas en esta solución a 4 °C en agitación constante. Terminada la incubación se realizaron 3 lavados con 10 mL PBS 1X / 15 min, 10 mL PBS 1X + NaCl 0.5 mol/L / 15 min, y 10 mL PBS 1X / 15 min. y

se colocó el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa 1:10,000 (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h. Posteriormente, se realizaron los mismos lavados que se hicieron para el primer anticuerpo. Finalmente, en un cuarto oscuro, se le adicionó a la membrana un solución quimioluminiscente (ECL™ Western Blotting Detection Reagents de Amersham Biosciences), y se revelaron las proteínas sobre películas auto-radiográficas (Hyperfilm™ de Amersham Biosciences) (Sánchez et al., 2005).

Una vez teniendo el resultado de cada Western blot por cuadruplicado se procedió a determinar la densitometría de cada juego de ensayos, para verificar la tendencia en el cambio de los niveles de proteína y poder así hacer un análisis sobre cada resultado obtenido. Las densitometrías se realizaron en un analizador de Geles Bio-Rad, No. de serie 423BR0330, Modelo Fluor-S™ Multimager, mediante el programa Diversity Database de Bio-Rad.

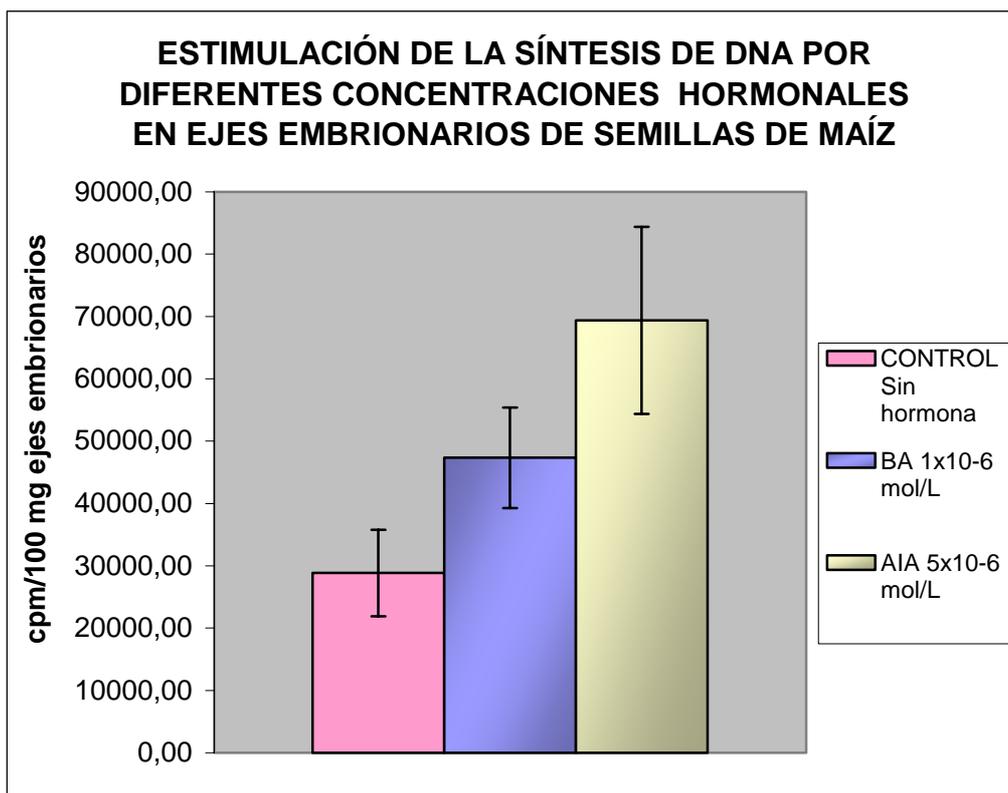
## **RESULTADOS**

---

### **6.1 EFECTO DE LA AUXINA SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA EN EJES EMBRIONARIOS DE SEMILLA DE MAÍZ: *Determinación de la estimulación de la síntesis de DNA por AIA en ejes embrionarios de maíz.***

Con el fin de determinar si el ácido indol-3-acético (AIA) ejercía algún efecto sobre la síntesis de DNA y por lo tanto en el ciclo celular, se llevaron a cabo ensayos en donde se evaluaron los niveles de síntesis de DNA a través de la incorporación de timidina tritiada en la hebra recién sintetizada de DNA por medio de un contador de centelleo, sabiendo que es un nucleótido exclusivo de la síntesis de DNA, y que es entre las 12 y 15 h de imbibición cuando inicia la síntesis *de novo* del DNA (Baíza et. al., 1989; Georgieva et. al. 1994) por lo que en ese tiempo era posible monitorear el fenómeno que queríamos evaluar. Para ello se incubaron diferentes lotes de 10 ejes embrionarios (10 mg) de semillas de maíz bajo tres diferentes condiciones: (a) condiciones control, sólo con el buffer de imbibición que se utiliza convencionalmente en nuestro laboratorio para promover la germinación y que contiene sacarosa al 2%, (b) utilizando un control positivo, en este caso la benciladenina ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) que como ya se mencionó promueve la síntesis de DNA en más de un 50% (Zúñiga-Aguilar y Vázquez-Ramos, 1995) y (c) en presencia de AIA ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L), realizando todos estos ensayos por triplicado. En todos los casos se adicionaron 30  $\mu$ Ci/mL de timidina tritiada, respetando las concentraciones de cada hormona y la solución final se aforaba a 1 mL con el buffer de imbibición y se adicionaban 900  $\mu$ L de solución final a cada lote de 10 ejes embrionarios de maíz.

Lo que podemos observar en la Figura 10 es que ambas hormonas estimularon la síntesis de DNA con respecto al control, BA estimuló en un 64% y AIA en un 140 %, ambas en presencia de sacarosa.



**FIGURA 10.** Estimulación de la síntesis de DNA por BA y AIA a diferentes concentraciones en ejes embrionarios de semillas de maíz.

### 6.1.2 *Determinación de la concentración óptima de AIA para la estimulación de la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz.*

Una vez que se observó que el AIA estimulaba la síntesis de DNA, se buscó dentro de un barrido de concentraciones la más adecuada a utilizar y establecer así las condiciones de nuestros posteriores experimentos. Se probaron concentraciones de  $1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $1 \times 10^{-6}$  mol/L y  $1 \times 10^{-7}$  mol/L en diferentes lotes de ejes embrionarios de maíz realizando los ensayos por triplicado y adicionando  $30 \mu\text{Ci/mL}$  de timidina tritiada por cada 10 ejes embrionarios/mL de solución final en buffer de imbibición.

Lo que se pudo observar de estos ensayos (datos no mostrados), es que las tres concentraciones utilizadas estimularon la síntesis de DNA por arriba del 100%, por lo

que se decidió escoger la menor,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L, con el fin de afectar lo menos posible la bioquímica de nuestro sistema.

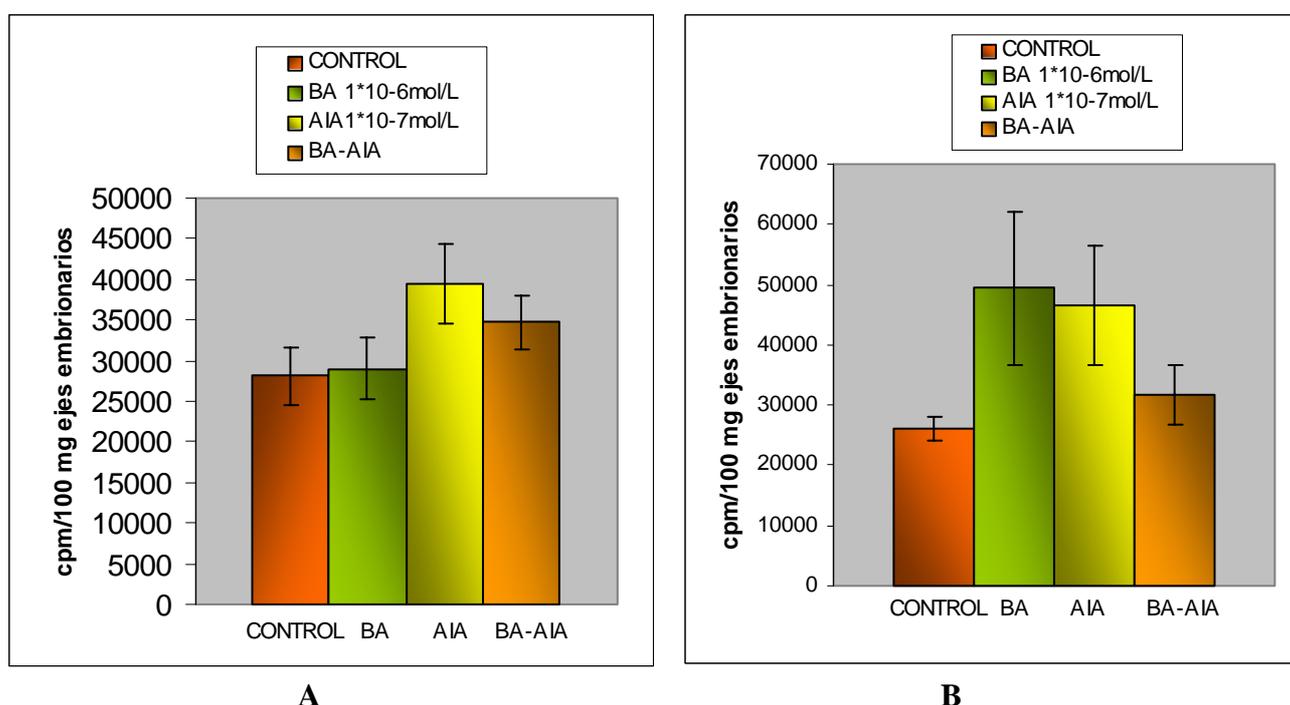
## 6.2 COMPARACIÓN DE LA INFLUENCIA DE AIA, BA O SU MEZCLA EN LA SÍNTESIS DE DNA EN UN MEDIO CON SACAROSA O SIN SACAROSA.

Teniendo en cuenta que la auxina ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) estimula la síntesis del DNA en conjunción con sacarosa (presente en el buffer de imbibición), considerando el antecedente de que la sacarosa es la fuente de energía para todos los procesos metabólicos de las plantas, además de que particularmente se ha observado en *A. thaliana* que su acción conjunta con BA estimulan la progresión del ciclo celular (Riou-Khamlichi et. al., 2000) y que en *Zea mays* promueve, también en conjunción con BA, la expresión de la ciclina D2;1 (Gutiérrez et. al., 2005), decidimos probar si en ejes embrionarios de maíz tanto la auxina, así como la mezcla BA-AIA tenían la capacidad de promover la síntesis de DNA, pero ahora tanto en presencia como en ausencia de sacarosa.

Para ello se siguió la misma metodología mencionada anteriormente con diferentes lotes de 10 ejes embrionarios de maíz cada uno y realizando por triplicado cada experimento. En este caso y de acuerdo al número tan elevado de cuentas por minuto que promovió la auxina en los ensayos anteriores, decidimos bajar la concentración de timidina tritiada adicionada a los ejes embrionarios, de  $30 \mu\text{Ci/mL}$  a  $15 \mu\text{Ci/mL}/10$  ejes embrionarios/mL de solución final en buffer de imbibición con o sin sacarosa.

De estos ensayos podemos observar que en el medio **sin sacarosa** (Figura 11A) la BA no estimula la síntesis de DNA, en cambio AIA sí es capaz de hacerlo en ausencia de sacarosa (Figura 11A). Además se observa que la estimulación que produce

la mezcla BA-AIA, en ausencia de sacarosa, no es aditiva ni sinérgica, sino que está por debajo de la que produce la auxina por sí sola en estas mismas condiciones. Por otro lado, en el medio **con sacarosa** (Figura 11B), el AIA y la BA estimulan individualmente la síntesis de DNA, y la estimulación que producen estas hormonas de manera individual es equiparable. Nuevamente, la estimulación que produce su mezcla es menor que la estimulación individual (Tabla 1).



**Figura 11.** Efecto de la sacarosa y las hormonas BA, AIA y su mezcla en la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz: (A) Medio sin sacarosa; (B) Medio con sacarosa.

CONDICIONES	MEDIO SIN SACAROSA	MEDIO CON SACAROSA
BA [1 X 10 <sup>-6</sup> mol/L]	3.3 %	85.2 %
AIA [1 X 10 <sup>-7</sup> mol/L]	33.3 %	77.7 %
BA-AIA [1 X 10 <sup>-6</sup> mol/L- 1 X 10 <sup>-7</sup> mol/L]	16.6 %	22.22 %

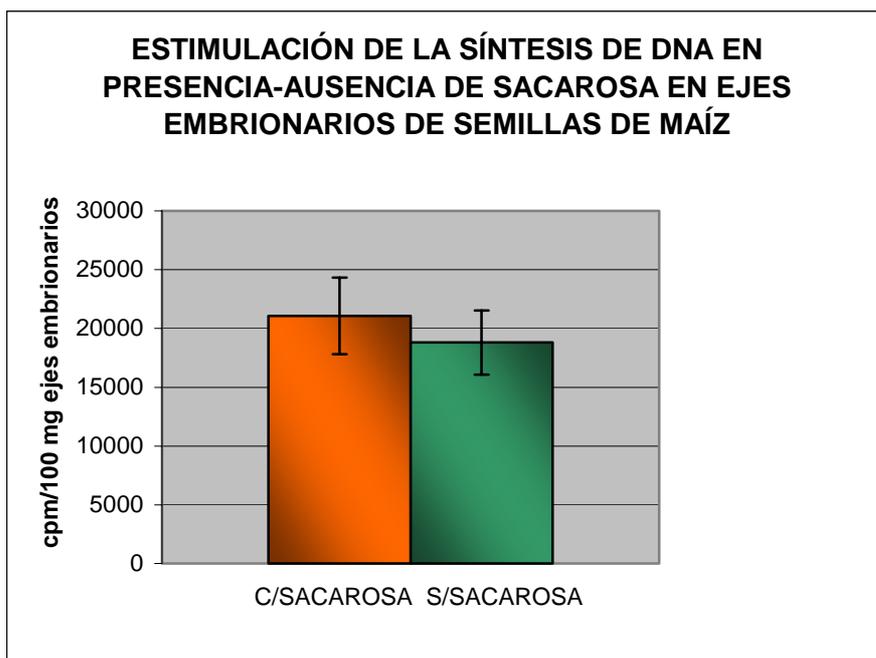
**Tabla 1.** Porcentaje de estimulación en la síntesis de DNA por BA, AIA y su mezcla en un medio sin sacarosa y con sacarosa.

### **6.3 COMPARACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE DNA EN EJES EMBRIONARIOS DE SEMILLAS DE MAÍZ EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SACAROSA A 15 Y 30 HORAS DE INCUBACIÓN.**

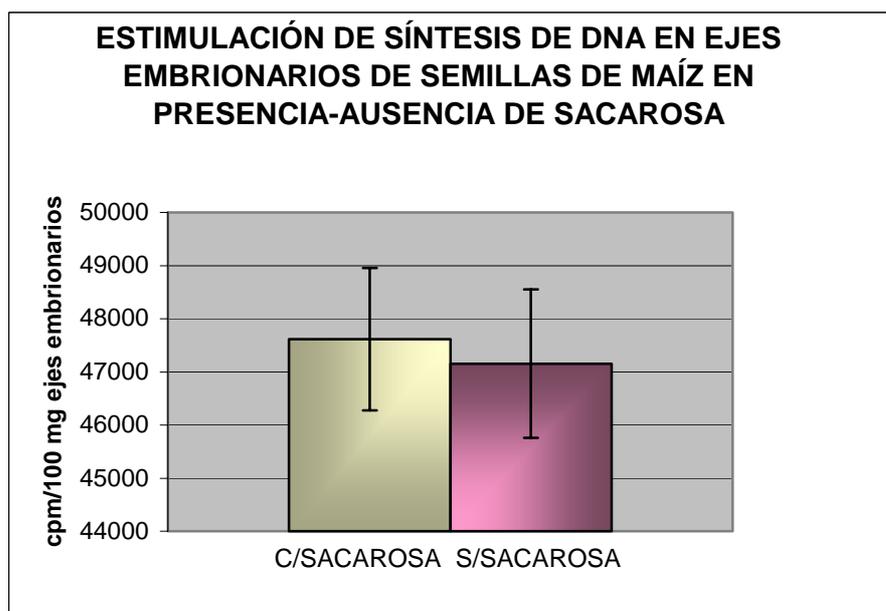
Como se puede observar en las figuras 11A y 11B, las muestras control tanto en ausencia como en presencia de sacarosa indican niveles similares en la síntesis de DNA, por lo que decidimos verificar si la sacarosa era determinante en este proceso, y sabiendo que las semillas de maíz concluyen el período de germinación aproximadamente a las 30 h de imbibición, procedimos a evaluar la influencia de la sacarosa como fuente de energía en la estimulación de la síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz a tiempos más largos de germinación, 15 h y 30 h, con el fin de cubrir por completo el proceso de replicación del DNA.

El ensayo se hizo de igual forma que los anteriores, con lotes diferentes de ejes embrionarios de maíz y por triplicado.

Lo que pudimos observar es que la síntesis de DNA, en ausencia o presencia de sacarosa (Figura 12), es prácticamente la misma, ya sea a 15 h o 30 h, de tal forma que al parecer la presencia-ausencia de sacarosa no produce cambios significativos en el metabolismo del DNA del embrión de maíz bajo estas condiciones.



**A: 15 h de incubación.**



**B: 30 h de incubación.**

**Figura 12.** Estimulación en la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz en presencia-ausencia de sacarosa a diferentes – tiempos de incubación: (A) 15 horas de incubación; (B) 30 h de incubación.

También podemos observar que el número de cuentas por minuto registrado para la incubación de 30 h resulta el doble del registrado por la incubación por 15 h, lo cual resulta congruente con lo esperado para el ensayo.

De acuerdo a los resultados anteriores, al no observar cambios significativos en la síntesis de DNA en ausencia-presencia de sacarosa, decidimos evaluar si los niveles de algunas proteínas marcadoras del ciclo celular con las que contamos en el laboratorio, bajo estas mismas condiciones, sufrían algún cambio, y por lo tanto, la sacarosa pudiera intervenir de alguna manera en la regulación del ciclo celular. Para este fin se utilizaron marcadores de las fases G1 y S del ciclo celular, sin embargo, los resultados indicaron que la ausencia- presencia de sacarosa no modificaba los niveles de los marcadores del ciclo celular durante la germinación (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió enfocar el trabajo al efecto único del ácido indol-3-acético sobre proteínas del ciclo celular durante la transición G1/S. Los ensayos se realizaron en presencia de sacarosa y no se incluyó la BA dado que esta hormona ha sido utilizada en trabajos anteriores y los resultados ya han sido descritos.

A continuación se muestran los resultados de los experimentos de Western blot realizados para las proteínas PCNA, DNA Polimerasa  $\alpha$ , Ciclina A1, Ciclina D2;1, Ciclina D4;1 y Ciclina D5;2.

#### **6.4 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS MARCADORAS DEL CICLO CELULAR DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ: EFECTO DE AUXINA.**

Con el fin de evaluar si los niveles de diferentes proteínas marcadoras del ciclo celular se veían afectados por la presencia de auxina durante la transición G1/S del ciclo celular, la cual sucede entre las primeras 9-12 h de germinación, se prepararon extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación (3 h, 6 h, 9 h y 12 h) y con diferentes condiciones: (a) semilla seca (SS), (b) germinación control (GC) y (c) germinación en presencia de auxina ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L). En el caso de la germinación control como en el de la germinación con auxina, se utilizó el buffer de

imbibición con sacarosa al 2%, ya que como se demostró anteriormente, la ausencia de sacarosa tiende a disminuir el efecto de la auxina sobre la síntesis de DNA.

Se realizaron ensayos de Western blot por cuadruplicado para cada proteína, para evaluar si era posible observar cambios en los niveles de cada una de éstas durante los tiempos ya descritos, además de realizar la densitometría correspondiente a cada conjunto de cuadruplicados.

#### **6.4.1 WESTERN BLOT ANTI-PCNA.**

Lo que podemos observar en la Figura 13 correspondiente al Western blot anti-PCNA, tanto en condiciones de semilla seca, germinación control y germinación con auxina, es que sus niveles permanecen constantes, es decir, no presentan ninguna tendencia de acuerdo a la desviación estándar presentada por la densitometría, por lo que no es posible adjudicar algún cambio en los niveles de la proteína bajo las condiciones y tiempos estudiados.

#### **6.4.2 WESTERN BLOT ANTI-POLIMERASA ALFA.**

En este ensayo nuevamente evaluamos los niveles de proteína bajo las mismas condiciones ya citadas, semilla seca, germinación control y germinación con auxina a 3 h, 6 h, 9 h, y 12 h, con el fin de determinar si la auxina producía algún cambio en los niveles de la DNA polimerasa alfa, recordando que, bajo condiciones de germinación normal, es una proteína que permanece a niveles constantes (Coello and Vázquez-Ramos, 1995a).

En la Figura 14, lo que podemos observar es que los niveles de proteína son muy semejantes durante la germinación control, y en presencia de auxina los niveles iniciales son menores que el tiempo cero (semilla seca) y se incrementan gradualmente hasta las 12 h de germinación.

#### **6.4.3 WESTERN BLOT ANTI-CICLINA A1.**

En este ensayo, que siguió la misma dinámica que los anteriores, lo que podemos observar en la Figura 15 es que los niveles de la ciclina A1 son constantes, tanto en semilla seca como en la germinación normal y en la germinación con auxina, lo cual se corrobora con la densitometría correspondiente, ya que las fluctuaciones dentro de la misma no son significativas.

#### **6.4.4 WESTERN BLOT ANTI-CICLINA D2;1.**

Con respecto a este ensayo, el cual se realizó bajo las mismas condiciones que los anteriores, lo que podemos observar en la Figura 16, es que los niveles de Ciclina D2;1 aumentan conforme avanza la germinación control hasta las 6 h, para posteriormente caer a niveles semejantes a la semilla seca hacia las 12 h de germinación control. Lo anterior es congruente con los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, donde la Ciclina D2;1 presenta un pico a las 6 h de germinación control (Gutiérrez et. al., 2005).

Por otro lado, los niveles de Ciclina D2;1 en presencia de auxina no muestran fluctuación alguna a lo largo del periodo estudiado, con excepción de 12 h de germinación en presencia de auxina, en donde los niveles caen ligeramente.

#### **6.4.5. WESTERN BLOT ANTI-CICLINA D4;1.**

En este ensayo, que siguió la misma dinámica que los anteriores con el fin de evaluar los cambios que pudiera sufrir la ciclina D4;1 a nivel de proteína, lo que se observa en la Figura 17 es que los niveles en semilla seca son similares a los presentados tanto en la germinación control como en presencia de auxina.

#### **6.4.6 WESTERN BLOT ANTI-CICLINA D5;2.**

Por último, lo que observamos en la Figura 18 en cuanto a los niveles de Ciclina D5;2 en condiciones de germinación control, es que existe un ligero incremento en las primeras 6 h, y como sucedió para la Ciclina D2;1, los niveles bajan hacia las 12 h de germinación.

Por otro lado, los niveles de Ciclina D5;2 en ejes tratados con AIA de 3 h a 9 h son mayores que los observados en semilla seca y parecen llegar a un pico hacia las 9 h de germinación.

Finalmente, los niveles correspondientes de esta ciclina en ejes tratados con auxina, son mayores, en todas las horas, a aquéllos mostrados por los ejes control.

**CONDICIONES: GERMINACIÓN CONTROL – AUXINA**

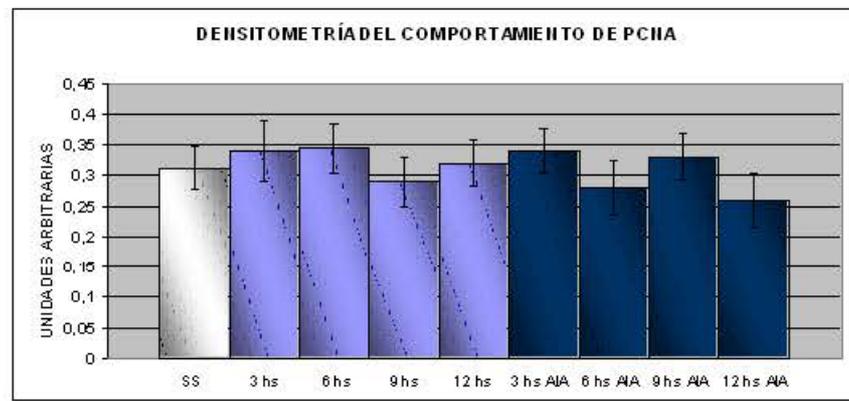
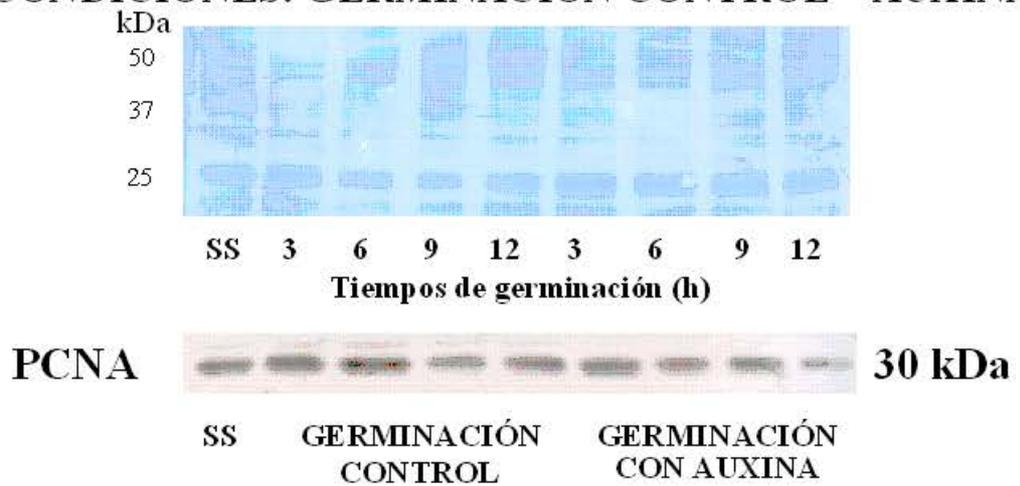


FIGURA 14. Efecto de AIA en los niveles de la Polimerasa  $\alpha$  durante la germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz: A) Gel teñido con azul de Coomasie, B) Western blot, C) Densitometria.

## **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **7.1 EFECTOS DE LA AUXINA, SU COMBINACIÓN CON BENCILADENINA Y LA SACAROSA EN LA SÍNTESIS DE DNA.**

Con el fin de verificar si la auxina podría tener algún papel dentro del ciclo celular, y sabiendo que la benciladenina ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) promueve la síntesis de DNA en más de un 50% (Zúñiga-Aguilar y Vázquez-Ramos, 1995), se trataron lotes de ejes embrionarios de maíz en presencia de auxina utilizando timidina tritiada para poder seguir el fenómeno, teniendo como control lotes de ejes embrionarios de maíz imbibidos en el buffer de imbibición convencional que utilizamos en el laboratorio y que contiene sacarosa, así como un control positivo que en nuestro caso fue la benciladenina. Se observó que la auxina producía una estimulación en la replicación del DNA de más del 100% cuando se usó una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, y que esta estimulación también se daba a concentraciones de AIA de  $1 \times 10^{-7}$  mol/L y  $1 \times 10^{-6}$  mol/L, por lo que se decidió trabajar con la menor,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L, con el fin de afectar lo menos posible la bioquímica endógena de nuestro sistema, el eje embrionario de maíz.

Una vez que comprobamos que la auxina modificaba la síntesis de DNA de manera positiva, y sabiendo que BA produce un efecto similar, teniendo como antecedente el papel que la sacarosa desempeña en conjunción con BA promoviendo la progresión del ciclo celular en *A. thaliana* (Riou-Khamlichi et. al., 2000), decidimos probar los efectos que provocaban en la síntesis del DNA la combinación de BA-sacarosa, AIA-sacarosa y la mezcla BA-AIA-sacarosa, la ausencia de sacarosa.

De los resultados obtenidos se observa que BA necesita actuar conjuntamente con la sacarosa para producir la estimulación en la síntesis de DNA, de otra manera no

produce ningún efecto estimulador (Figura 11). En cambio, la auxina tiene la capacidad de estimular la síntesis de DNA tanto en presencia como en ausencia de sacarosa (Figura 11), sólo que lo hace en una proporción mayor en presencia de sacarosa. Esto nos hace pensar que la vía por la que el eje percibe a la BA y permite su acción debe de depender de la presencia de sacarosa o de sus metabolitos y que sólo así BA puede ejercer su efecto estimulador en este proceso; en cambio, con AIA no parece pasar lo mismo; aparentemente la sacarosa coadyuva para que la auxina ejerza su efecto, sin embargo, aún en su ausencia, AIA puede estimular la síntesis del DNA aunque no tan eficientemente. Lo anterior sugiere que la sacarosa (o sus metabolitos) promueve una acción mitogénica con las fitohormonas, que es diferente a la estimulación de la germinación *per se*. Resultados semejantes han sido reportados por Gutiérrez et. al., 2005 y Quiroz y Vázquez-Ramos, 2006.

Ahora bien, el efecto que producen estas hormonas de manera individual en presencia de sacarosa es semejante, lo que nos indica que para que cualquiera de estas hormonas ejerza un efecto óptimo en este proceso es importante la presencia de sacarosa.

Al aplicar la mezcla de ambas hormonas, lo que se observó fue que, en ausencia de sacarosa, la mezcla BA-AIA produce una estimulación mínima. Por otro lado, en presencia de sacarosa, esta mezcla estimula en un porcentaje ligeramente más elevado que en el ensayo en ausencia de sacarosa. Dado que BA en ausencia de sacarosa no es capaz de provocar estimulación de la síntesis de DNA, tal vez podríamos atribuir la estimulación observada cuando utilizamos la mezcla AIA-BA en ausencia de sacarosa, sólo a la auxina.

Adicionalmente, como se mencionó en la introducción, cantidades elevadas de citocininas, primordialmente zeatina, no sólo reducen el tamaño de las pozas endógenas

de AIA y de sus conjugados, sino que parecen disminuir el grado de recambio de AIA, justo como la sobre-expresión de citocininas reduce la síntesis de auxinas y viceversa (Buchanan, 2000), lo que podría indicar que los dos fitorreguladores se están obstruyendo mutuamente, debido a que se están adicionando de manera exógena cantidades similares, y por lo tanto, no se observa una estimulación importante en la síntesis de DNA en el momento de adicionar la mezcla de ambas hormonas, o bien, que de acuerdo a nuestra primera observación, el hecho de que la BA no ejerza ningún efecto estimulador sobre la síntesis de DNA en ausencia de sacarosa, el efecto que se está observando está siendo debido únicamente a la acción de la auxina, y de forma disminuida por la presencia de BA.

## **7.2 EFECTO DE LA AUXINA SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR.**

La acción de las hormonas vegetales sobre proteínas del ciclo celular permite regular varias etapas del desarrollo de la planta. Sabiendo esto se hicieron ensayos de Western blot para distintas proteínas marcadoras del ciclo celular con las que se cuenta en nuestro laboratorio, para poder determinar si su comportamiento se veía modificado por la acción hormonal durante la germinación de maíz. La primer condición que se probó fue la presencia-ausencia de sacarosa para las primeras horas de germinación (9-12 h), tiempo en el que se cubre la transición G1/S del ciclo celular, además de ser el tiempo durante el cual comienza la replicación del DNA (12-15 h) y en el que ya se había observado un interesante efecto sobre la síntesis de DNA. Esta condición experimental, sin embargo, no produjo ningún cambio significativo dentro de los niveles de las proteínas estudiadas. Fue interesante observar que aún a tiempos más largos de germinación en presencia-ausencia de sacarosa (15 h y 30 h), la síntesis de

DNA no se modificaba significativamente, lo cual puede explicarse a que debido al tamaño del eje embrionario de maíz, éste cuenta con las reservas energéticas suficientes para que el proceso de germinación no se vea afectado por ninguna de estas condiciones, es decir, que su proceso de desarrollo dentro de este intervalo de tiempo, y bajo estas condiciones no es determinado por la sacarosa exógena adicionada en el buffer de imbibición para promover la germinación, y por lo tanto, el progreso del ciclo celular.

También se puede observar que el número de cuentas por minuto registrado para la incubación de los ejes embrionarios por 30 h es el doble del registrado para la incubación por 15 h, lo cual resulta congruente, pues es el doble de tiempo que llevan los ejes embrionarios dentro de este proceso metabólico, y por lo tanto, conforme el tiempo avanza será mayor la cantidad de DNA replicado con miras a continuar con la siguiente fase del ciclo celular, y en la cual todo el contenido de DNA celular tiene que estar duplicado.

Cabe mencionar el hecho de que al buffer de imbibición utilizado tradicionalmente en nuestro laboratorio para imbibir los ejes embrionarios y promover así su germinación se le ha adicionado sacarosa al 2 % de manera rutinaria, y con los resultados obtenidos de este trabajo se demuestra el hecho de que puede prescindirse de la misma dentro de los componentes del buffer.

Ahora bien, de acuerdo a los resultados anteriores, al no observar cambios en la síntesis de DNA en ausencia de sacarosa, y al no haber encontrado variaciones en los niveles de proteínas bajo estas condiciones, presencia-ausencia de sacarosa, decidimos enfocar el trabajo al efecto del ácido indol-3-acético sobre algunas proteínas del ciclo celular durante las primeras horas de germinación, en el intervalo de 3 h a 12 h, tiempo en el que se observaron, como ya se dijo, cambios interesantes en la síntesis del DNA.

Las proteínas que se estudiaron fueron PCNA, DNA polimerasa  $\alpha$ , Ciclina A1, Ciclina D2;1, Ciclina D4;1 y Ciclina D5;2.

La primer proteína que se estudió fue PCNA, que se sabe de trabajos anteriores realizados en el laboratorio, que es una proteína que se va incrementando gradualmente conforme progresa la germinación, principalmente después de las 12 h de imbibición, hasta llegar a un máximo hacia las 24 h (Herrera et. al., 2000). Lo que se observó en nuestros resultados es que, dentro de los tiempos estudiados PCNA permanece constante aún en presencia de auxina. Lo anterior resulta interesante dado que resultados anteriores han mostrado que la adición de BA incrementa a tiempos tempranos los niveles de PCNA. (Sánchez et. al., 2004). Por lo tanto, el mecanismo por el que la auxina estimula la síntesis de DNA debe diferir del que es activado por citocininas.

De los resultados obtenidos de los Western blots para la Ciclina A;1 así como para la Ciclina D4;1, lo que se observó fue que tanto durante la germinación control como para el tratamiento con auxina los niveles de proteína permanecieron constantes, es decir, no existió ninguna tendencia en la variación de sus niveles. En contraste, durante la germinación normal, la expresión del transcrito de la Ciclina D4;1 presenta una acumulación consistente durante este proceso hasta las 24 h de germinación, por lo que su expresión parece ser un evento tardío en la germinación, es decir, es una ciclina de la transición G2-S (Quiroz et al., 2006).

Ahora bien, de los resultados obtenidos para la Ciclina D2;1, se observó que durante la germinación control presenta un pico a las 6 h y de ahí sus niveles comienzan a disminuir, lo cual ya se había reportado con anterioridad, y que podría ser debido a que existe un requerimiento temprano de la Ciclina D2;1 para iniciar los eventos tempranos del ciclo celular (Gutiérrez et. al., 2005). Por otro lado, su transcrito presenta

un modesto incremento durante las primeras 12 horas de germinación, reduciéndose sus niveles hacia las 18 h, lo cual sugiere que es una ciclina de la fase G1 o de la transición G1-S (Gutiérrez et al., 2005 y Quiroz et. al., 2006).

Por otro lado, bajo las condiciones de germinación con auxina, al igual que con las ciclinas A1 y la D4;1, tampoco se observó ningún cambio significativo en los niveles de proteína, por lo que aparentemente la auxina no actúa a nivel de proteína con estas tres ciclinas. En cuanto al comportamiento del transcrito de la ciclinas D2;1 y D4;1, se ha reportado que presentan una expresión tardía siendo seguramente eventos que tienen lugar a tiempos avanzados de la germinación (Quiroz et. al., 2006).

Otra de las proteínas que se evaluó fue la DNA polimerasa  $\alpha$ . Se ha descrito con anterioridad que sus niveles a lo largo de la germinación permanecen constantes, ya sea por una síntesis y degradación balanceada de la proteína, o bien por una gran estabilidad de la misma (García et. al., 2002). Esto lo pudimos corroborar dentro de los tiempos estudiados de germinación normal. Interesantemente la DNA polimerasa alfa presenta un incremento gradual a medida que avanzan las horas de germinación en los ejes tratados con auxina, observándose un máximo a las 12 h del tratamiento. Esto podría explicar el incremento en la síntesis de DNA observada, y por lo tanto una entrada adelantada a la fase S.

En cuanto a la Ciclina D5;2, lo que observamos es que los niveles de la proteína se elevan modestamente durante la germinación control hasta las 6 h, decayendo posteriormente como sucede con la Ciclina D2;1. En presencia de auxina, el incremento es mayor durante el mismo periodo, con un pico a las 9 h, pero sin observarse esa caída a las 12 h de germinación control. Este comportamiento nos sugiere un requerimiento temprano de la ciclina como en el caso de la Ciclina D2;1, y al parecer la auxina estimula el incremento en estos niveles. Esto contrasta con la expresión de su mRNA,

en donde, durante la germinación control su transcrito no varía durante este proceso, lo cual sugiere una expresión constitutiva. Sin embargo, durante la germinación en presencia de auxina, los niveles de su mRNA se incrementan durante las primeras horas de germinación (6 h aproximadamente) cayendo posteriormente su expresión (Quiroz et. al., 2006), teniendo gran coincidencia este comportamiento con el que muestra la proteína, y siendo por lo tanto, la única ciclina cuyos niveles de proteína coinciden con la expresión de su transcrito, sugiriendo esto un requerimiento temprano de la Ciclina D5;2 para iniciar los eventos del ciclo celular (Quiroz et. al., 2006).

En conclusión, lo que podemos observar es que la regulación de estas ciclinas durante la germinación de ejes embrionarios de maíz se modula diferencialmente a nivel transcripcional y a nivel de proteína.

## **CONCLUSIONES.**

---

- ❖ El ácido indol-3-acético estimula la síntesis de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz tanto en ausencia como en presencia de sacarosa, siendo la estimulación mayor en presencia de sacarosa.
- ❖ La benciladenina estimula la síntesis de DNA sólo en presencia de sacarosa.
- ❖ La combinación de ambas hormonas, AIA y BA no produce ningún incremento significativo en la síntesis de DNA, ya sea en ausencia o en presencia de sacarosa, por lo que probablemente sus vías de señalización se antagonizan y así se anula el efecto observado con las hormonas en forma individual.
- ❖ La sacarosa o sus metabolitos, parecen promover una acción mitogénica en conjunción con AIA, diferente a la estimulación de la germinación *per se*.
- ❖ El eje embrionario de maíz cuenta con las reservas energéticas suficientes para llevar a cabo el proceso de germinación por lo que no hay necesidad de adicionarle fuente carbonada extra.
- ❖ Los niveles de las proteínas de ciclo celular PCNA, Ciclina A1 y Ciclina D4;1, permanecen constantes en las condiciones y durante los tiempos estudiados, esto es germinación control y germinación en presencia de auxina durante la transición G1/S del ciclo celular, lo cual es un indicativo de que la auxina no produce ningún cambio a este nivel durante el proceso germinativo.
- ❖ Los niveles de la DNA polimerasa  $\alpha$  observan un ligero y paulatino incremento durante las primeras 12 h de germinación en presencia de auxina, lo cual coincide con los tiempos a los cuales la auxina estimula la síntesis de DNA, lo cual sugiere que el AIA está estimulando la síntesis de esta proteína, para el proceso de replicación del DNA.

- ❖ Se corroboró que la Ciclina D2;1 presenta un incremento a las 6 h de germinación normal cayendo sus niveles hacia las 12 h (Gutiérrez et. al., 2005), lo cual es indicativo de un requerimiento temprano de esta proteína para los primeros eventos del ciclo celular (Gutiérrez et. al., 2005). Con auxina no se observa ninguna modificación importante en los niveles de la ciclina.
- ❖ De acuerdo con el comportamiento observado en los niveles de la Ciclina D5;2 durante la germinación control, pareciera ser que existe un requerimiento temprano de la ciclina, lo cual coincide con el comportamiento que presenta la Ciclina D2;1. En cambio, durante la germinación con auxina sus niveles, aunque constantes, son ligeramente más elevados que durante los tiempos correspondientes a la germinación control, lo cual nos podría estar indicando una estimulación en la síntesis de la Ciclina D5;2 por el AIA.
- ❖ Finalmente, podemos concluir que existe una regulación diferencial en la transcripción y posterior traducción de las ciclinas D de maíz.

## REFERENCIAS.

---

- a. Kosugi, S. and Ohashi, Y. 2002. E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J. Biol. Chem.* **277**: 16553-16558.
- Amileni, A., Sala, F., Cella, R. and Spadari, S. 1979. The major DNA polymerase in cultured plant cell: partial purification and correlation with cell multiplication. *Planta (Berl.)* **146**: 521-527.
- Anderberg, R.J., Walker-Simmons, M.K. 1992. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 10183-10187.
- Arenas-Huertero, F. Arroyo, A. Zhou, L., Sheen, J. and León, P. 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormona ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development* **14**: 2085-2096.
- b. Kosugi, S. and Ohashi, Y. 2002. Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP protein confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol.* **128**: 833-843.
- Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, J. M. and Sánchez de Jiménez, E.. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* **135**: 416-421.
- Balmukhanov, T., Erekenov, A. and Ajtkhozina, A. 1992. Isolation of DNA polymerase alpha from germinated wheat embryos. *Mol. Biol. Reports* **16**: 11-16.
- Bell, S.P. and Dutta, A. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 333-374.
- Bernal-Lugo, I. y Loza-Tavera, H. Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Facultad de Química. UNAM. México, D.F. 2001. pp. 166-176.
- Brocard, I.M., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. 2002. Regulation and role of the *Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, stress response. *Plant Physiology* **29**: 1533-1543.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. 2003. Regulatory networks in seeds integrating developmental abscisic acid, sugar, and light signalling. *Plant Physiology* **131**: 78-92.

- Bryant, J.A. 1980. Biochemical aspects of DNA replication with particular reference to plants. *Biol. Rev.* **55**: 237-284.
- Bryant, J.A., Fitchett, P.N., Hughes, S.G. and Sibson, D.R. 1992. DNA polymerase  $\alpha$  in pea es part of a large multiprotein complex. *J. Exp. Bot.* **43**: 31-40.
- Buchanan, G. J. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA (2000). pp. 558-559, 873-875, 884-895.
- Burgers, P.M.J. 1991. Saccharomyces cerevisiae replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *J. Biol. Chem.* **266**: 22698-22706.
- Caers, L. I., Peumans, W.J. and Carlier, A. R. 1979. Preformed and newly synthesized RNA in germination wheat embryos. *Planta* **144**: 491-496.
- Callis, J. 2005. Auxin action. *Nature* **435**: 436-437.
- Carlson, M. 1998. Regulation of glucose utilization in yeast. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 560-564.
- Castellano, M.M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A. and Gutierrez, C. 2004. DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell* **16**: 2380-2393.
- Castellano, M.M., del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., Brown, S. and Gutierrez, C. 2001. Expression and stability of *Arabidopsis* CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell* **13**: 2671-2686.
- Catwright, P., Müller, H., Wagener, C., et al. E2F6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* **17**(5), 611-623.
- Chaubet-Gigot, N. 2000. Plant A-type cyclins. *Plant Molecular Biology* **43**: 659-675.
- Cheng, E-H., Endo, A., Zhou, L., et al. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signalling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* **14**: 2723-2743.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M. and Sherr, C.J. 1999. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* **18**(6): 1571-1583.

- Chikano, H., Ogawa, M. Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T. and Sano, H. 2001. Two novel genes encoding SNF-1 related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of *AtSR1* and *AtSR2* transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by *AtSR2*. *Molecular and General Genetics* **264**: 674-681.
- Claudio, P.P., Tonini, T. and Giordano, A. 2002. The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biology* **3**(9): reviews 3012.1-3012.9.
- Coello, P. and Vázquez-Ramos, J.M. 1995b. Studies on the processivity of maize DNA polymerase 2, an  $\alpha$ -type enzyme. *Plant Physiol* **109**: 645-650.
- Coello, P., García, E. and Vázquez-Ramos, J.M. 1994. Preparation of an antibody against a maize DNA polymerase catalytic subunit. *Can. J. Botany* **72**: 818-822.
- Coello, P., Rodríguez, R., García, E. and Vázquez-Ramos, J.M. 1992. A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Molecular Biology* **20**: 1159-1168.
- Coello, P., Vázquez-Ramos, J.M. 1995a. Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasin activity during germination. *Eur J Biochem* **231**: 99-103.
- Coruzzi, G. and Bush, D.R. 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signalling in plants. *Plant Physiology* **125**: 61-64.
- Coruzzi, G.M. and Zhou, L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signalling in plants: emerging "matrix effects". *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 247-253.
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J.J., Vázquez-Ramos, J.M. 1998. Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol Plant* **102**: 573-581.
- Dahl, M., Meskiene, I., Börgre, L., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H. and Heberle-Bors, E. 1995. The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* **7**: 1847-1857.
- Datta, K., L. Marsh and A. Marcus. 1983. Early growth of wheat axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant physiol.* **72**: 394-397.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakio, L., et al. 2003. Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* **278**(43), 42041-42049.

- de Jager, S. M., Menges, M., Bauer, U.M. and Murray, J.A. 2001. *Arabidopsis* E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol. Biol.* **47** 555-568.
- de Jager, S.M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., Murray, J.A.H. (2005). The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol* **16**: 385-396.
- De Veylder, L. et al. 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* **21**, 1360-1368.
- De Veylder, L., beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, P., Landrieu, I., van der Schueren, e., Maes, S., Naudts, M. and Inzé, D. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1653-1667.
- De Veylder, L., de Almeida Enler, J., Bursens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G. and Inzé, D. 1999. A new D-type cyclin of 2005.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., et al. 1997. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(14), 7245-7250.
- Del Pozo, J.C. and Estelle, M. 2000. F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plan Mol Biol.* **44**(2): 123-128.
- Del Pozo, J.C., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. 2002. *Arabidopsis* E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**(12): 3057-3071.
- Del Pozo, J.C., Lopez-Matas, A., Ramirez-Parr, E. and Gutierrez, C. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* **123**: 173-183.
- Dewitte, W. and Murray, J.A. 2003. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol.* **54**: 235-64. Review.
- Dharmasari, S. and Estelle, M. 2002. The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol Biol.* **49**(3-4): 401-409.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M. 2005. The F-Box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**(7041): 441-445.

- Diehl, J.A., Zindy, F. and Sherr, C.J. 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11**: 957-972.
- Draetta, G. and Beach, D. 1988. Activation of Cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: Cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* **54**: 17-26.
- Dudits, D., Bögre, L., bakó, L., dedeoglu, d., Magyar, Z., Kapros, T., Felföldi, F., Györgyey, J. 1993. Key components of cell cycle control during auxin-induced cell division. In: JC Ormrod and D Francis (eds) *Molecular and Cell Biology of the Cell Cycle*. Dordrecht: Kluwer, pp. 111-131.
- Ehneß, R. and Roitsch, T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *The Plant Journal* **11**: 539-548.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4):817-25.
- Ellis, C. Turner, J.G. and Devoto, A. 2002. Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Molecular Biology* **50**: 971-980.
- Fajas, L., Landsberg, R.L., Huss-Garcia, Y., et al. 2002. ESFs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* **3**(1), 39-49.
- Ferreira, P., Hemerly, A., Engler, J.D., Bergounioux, C., Bursens, S., Vanmontagu, M., Engler, G., Inzé, D. 1994a. Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell-cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11313-11317.
- Ferrerira, P., Hemerly, A., engler, J.D., Vanmontagu, M., Engler, G., Enzé, D. 1994b. Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin en cyc1At. *Plant Cell* **6**: 1763-1774.
- Finkelstein, R.R. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The plant Journal* **5**: 765-771.
- Finkelstein, R.R. and Gibson, S.I. 2002. ABA and sugar interactions regulating development: crosstalk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 26-32.

- Finkelstein, R.R. and Lynch, T.J. 2000. Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiology* **122**: 1179-1186.
- Fuerst, R.A., Soni, R., Murray, J.A., and Lindsey, K. 1996. Modulation of cyclin transcript levels in cultures cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **112**: 1023-1033.
- Fujita, M. 1999. Cell cycle regulation of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *Frontiers in Bioscience* **4**: 816-823.
- García, E., Laquel, P., Castrovierjo, M., Plasencia, J. and Vázquez-Ramos, J. 2002. Maize replicative alpha-type DNA polymerase: separation of polymerase and primase activities and recognition of primase subunits. *Physiol Plant* **114**: 533-539.
- García, E., Quiroz, F., Uchiyama, Y., Sakaguchi, K. and Vázquez-Ramos, J.M. 2006. Expression of a maize  $\delta$ -type DNA polymerase during seed germination. *Physiologia Plantarum* **127**: 268-276.
- Garcarrubio, A., Legaria, J.P. and Covarrubias, A.A. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* **203**: 182-187.
- Gaudin, V., Lunness, P.A., Fobert, P.R., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H., Coen, E., and Doonan, J.H. 2000. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiol.* **122**: 1137-1148.
- Gazzarrini, S. and McCourt, P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 387-391.
- Georgieva, E.I. López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G. and Loidl, P. 1994. Maize embryo germination. I. Cell cycle analysis. *Planta (Berl.)* **192**: 118-124.
- Gibson, S.I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* **55**(395) 253-264.
- Gibson, S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 93-102.
- Gibson, S.I., Laby, R.J. and Kim, D. 2001. The *sugar-insensitive 1 (sis1)* mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochem Res Commun* **280**: 196-203.

- Girard, F., Strusfeld, U., Fernández, A. and Lamb, N.J.C. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**: 1169-79.
- Gould, K. L., and Nurse, P. 1989. Protein tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2 protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**: 39-45.
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., risseuw, e., banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H. and Estelle, M. 1999. Identification of an SCRF ubiquitin-ligase complex requires for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* **13**: 1678-1691.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M. 2001. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**(6861): 271-276.
- Gutiérrez, Crisanto. 2005. Coupling cell proliferation and development in plants. *Nature Cell Biology* **7**(6): 535-541.
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F. and Vázquez-Ramos, J.M. 2005. Maize Cyclin D2 Expression, Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones During Germination. *Plant Cell Physiol.* **46**(1): 166-173.
- Hagen, Gretchen and Guilfoyle, T. 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* **49**: 373-385.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurrea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Paul, M. ñand Zhang, Y. 2003. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany* **54**: 467-475.
- Hemerly, A., Ferreira, P., Engler, J.D., Vanmontagu, M. Engler, G. Inzé, D. 1993. Cdc2a expression in *Arabidopsis* es linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**: 1711-1723.
- Herrera, I., Sánchez, M.P., Molina, J., Plasencia, J., Vázquez-Ramos, J.M. 2000. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum* **110**: 127-134.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* **253** (5015): 49-53.

- Hu, Y., Bao, F. and Li, J. 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**: 693-701.
- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeedens, S. 2000. The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *The Plant Journal* **23**: 577-586.
- Humbert, P., Rogers, C., Ganiatsas, S., et al. 2000. E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol Cell* **6**(2), 281-291.
- Huntley, R.P., and Murray, J.A.H. 1999. The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 440-446.
- Hutchison, C. and Glover, D. M. Cell Cycle control. Oxford University Press, England, 1995.
- Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T., and Sano, H. 1999. Sucrose and cytokinin modulation of *WPK4*, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from wheat. *Plant Physiology* **121**: 813-820.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1985. International roles for seed testing. *Seed Sci. and Technol.* **13**: 299-355.
- Inzé, D. and De Veylder, L. 2006. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 77-105.
- Jang, J-C., León, P., Zhou, L. and Sheen, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* **9**: 5-19.
- Jann, C. R. and Amen, E. R. 1977. What is germination? In A: Khan. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. North-Holland Publishing Co., New York. Pp 263-280.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N.P. 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* **376**: 313-320.
- John, P.C.L., Zhang, K., Dong, C., Diederich, L. and Wightman, F. 1993. P34<sup>cdc2</sup> related proteins in control of cell-cycle pregression, the switch between division and differentiation in tissue-development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. *Aust J Plant Physiol* **20**: 503-526.

- Johnson, D., Schwarz, J., Cress, W., et al. 1993. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**(6444), 349-352.
- Kaelin, W. G. Jr. 1999. Functions of the retinoblastoma protein. *BioEssays* **21**, 950-958.
- Kapros, T., Bögre, L., Németh, K., Bakó, L., Györgyey, J., Wu, S.C., Dudits, D. 1992. Differential expression of histone H3 gene variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Physiol* **98**: 621-625.
- Kashem, M.A., Hori, H., Itoh, K., Hayakawa, T., Todoroki, Y., Hirai, N., Ohigashi, H. and Mitsui, T. 1998. Effects of (+)-8`8`8`-trifluoroabscisic acid on  $\alpha$ -amylase expression and sugar accumulation in rice cells. *Planta* **205**: 319-326.
- Kato, J., Matsuoka, M., Polyak, K., Massagué, J. and Sherr, C.J. 1994. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**: 487-496.
- Keith, K., Kraml, M., Dengler, N.G. and McCourt, P. 1994. *fusca3*: a heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**: 589-600.
- Kelman, Z. 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**: 629-640.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H. K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kato, J., Segawa, K., Yoshida, E. Nishimura, S. and Taya, Y. 1996. The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J.* **15**: 7060-7069.
- Kornberg, A. and Baker, T. 1992. DNA replication. 2<sup>nd</sup>. Edition. New York, W. H. Freeman.
- Koroleva, O.A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D. Shaw, P. and Doonan, J.H. *CycD1*, a Putative G1 Cyclin from *Antirrhinum majus*, Accelerates the Cell Cycle in Cultured Tobacco BY2 Cells by Enhancing Both G1/S Entry and Progression through S and G2 Phases. *The Plant Cell* **16**: 2364-2379.
- Krek, M. and Nigg, E. A. 1991. mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* **10**: 3331-3341.

- Krek, W., Xu, G. and Livingston, D.M. 1995. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* **83**(7):1149-58.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D. and Gibson, S.I. 2000. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal* **23**: 587-596.
- Landsberg, R.L., Sero, J.E., Danielian, P.S., et al. 2003. The role of E2F4 in adipogenesis is independent of its cell cycle regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(5), 2456-2461.
- Laquel, P., Castroviejo, M. and Litvak, S. 1990. Further biochemical characterization of wheat DNA primase: possible functional implication of copurification with DNA polymerase A. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4867-4876.
- Lees, E.M. and Harlow, E. 1993. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of CDC2 kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1194-1201.
- León, P. and Sheen, J. 2003. Sugar and Hormone connections. *Trends in Plant Science* **8**: 110-116.
- Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., et al. 2000. Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol* **20**(10), 3626-3632.
- Leyser, O. 2002. Molecular genetics of auxin signalling. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 377-398.
- Litvak, S. and Castroviejo, M. 1987. DNA polymerases from plant cells. *Mut. Res.* **181**: 81-91.
- Lobler, M. and Klambt, D. 1985. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L). 2. Localization of a putative auxin receptor. *J Biol Chem* **260**: 9854-9859.
- Logan, N., Delavaine, L., Graham, A., et al. 2004. E2F-7: A distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* **23**(30), 5138-5150.
- Lovegrove, A. and Hooley, R. 2000. Gibberrellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science* **5**: 102-110.
- Lu, C-A, Ho, T-hD, Ho, S-L and Yu, S-M. 2002. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of  $\alpha$ -amylase gene expression. *The Plant Cell* **14**: 1963-1980.

- Lukas, J., Petersen, B., Holm, K., et al. 1996. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* **16**(3), 1047-1057.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., et al. 2005. Cloning and characterization of mouse E2F8, anovel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem.* **6**;280(18): 18211-20.
- Mariconti, L. et al. 2002. The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J. Biol. Chem.* **277**: 9911-9919.
- Martinez, M.C., Jorgensen, J.E., Lawton, M.A., Lawton, M.A., Lamb, C.J. and Doerner, P.W. 1992. Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7350-7364.
- Masumori, M., N. Yamamoto and S. Sasaki. 1992. Stored mRNA in pine seeds: prolonged preservation in dry seeds and disappearance during germination. *Plant Cell Physiol.* **33**: 485-488.
- Meijer, Marcel and Murray, James A. H. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* **43**: 621-633, 2000.
- Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C. and Yeung, E.C. 1994. *Leafy cotyledon* mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**: 1049-1064.
- Meléndez-López, S. and Vázquez-Ramos, J. M. 1991. Nuclear DNA polymerase activities of germination in maize embryo axes. *J. Plant Physiol.* **137**: 581-585.
- Mimura, S. and Takisawa, H. 1998. *Xenopus* Cdc 45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *EMBO J.* **17**: 5699-5707.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, f., Hall, Q., Cheng, W-H, Liu, Y-X, Hwahg, I., Jones, T. and Sheen, J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signalling. *Science* **300**: 332-336.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A., et al. 1997. An E2F-like repressor of transcription. *Nature* **390**(6660): 567-568.
- Motokura, T., and Arnold, A. 1993. Cyclin D and oncogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**: 5-10.

- Müller, H., Moroni, M., Vigo, E., et al. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* **17**(9), 5508-5520.
- Niu, X., Helentjaris, T. and Bate, N.J. 2002. Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *The Plant Cell* **14**: 2565-2575.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C. and Murray, J.A.H. 2002. Plant D-type cyclins (CycDs) and the control of G1 progression. *Phisio. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **357**: 749-760.
- Osborne, D.J. 1982;85. DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. *Prog Clin Biol Res.* 577-592.
- Pego, J.V., Weisbeek, P.J. and Smeeckens, SCM. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology* **119**: 2197-2208.
- Perata, P., Matsukura, C., Vernieri, P. and Yamaguchi, J. 1997. Sugar repression of a gibberellin-dependent signalling pathway in barley embryos. *The Plant Cell* **9**: 2197-2208.
- Pines, J. 1993 Cyclins and cyclin-dependent kinases: Take your partner, *Trends Biochem. Sci.* **18**, 195.
- Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin dependent kinases - A biochemical view. *Biochem. J.* **308**: 697-711.
- Planchais, S., Samland, A.K. and Murray, J.A.H. 2004. Differential stability of *Arabidopsis* D –type cyclins: CycD3;1 is a highly unstable protein degrades by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J.* **38**: 616-625.
- Prelich, G., and Stillman, B. 1988. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell* **53**: 117-126.
- Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. and Stillman B. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* **326**: 517-520.
- Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M. and Stillman, B. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* **326**: 517-520.

- Price, J., Li, T-C, Kang, S.F., Na, J.K. and Jang, J-C. 2003. Mechanisms of glucose signalling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 1424-1438.
- Prober, D.A. and Edgar, B.A. Growth regulation by oncogenes--new insights from model organisms. 2001. *Curr Opin Genet Dev.* **11**(1):19-26. Review.
- Qin, X., Livingston, D., Kaelin, W., et al. 1994. Deregulated transcription factor E2F1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(23): 10918-10922.
- Radley, M. 1969. The effect of the endosperm on the formation of gibberellin by barley embryos. *Planta* **86**: 218-223.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. 1996. PESTsequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci* **21**: 267-271.
- Renaudin, J.P., et al. 1996. Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1003-1018.
- Renaudin, J.P., Savoure, A., Philippe, H., Van Montague, M., Inzé, D. and Rouze, P. 1998. Characterisation and classification of plant cyclin sequences related to A- and B-type cyclins. In: D. Francis, D. Dudits, and D. Inzé (Eds.) *Plant Cell Division*, Portland Press, London, pp. 67-98.
- Richard, C., Lescot, J., Inzé, d., de Veylder, L. 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org* **69**: 167-176.
- Riou-Khamlichi, C. Menges, M., Healy, J.M. and Murray, J.A.H. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4513-4521.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., and Murray, J.A.H. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, S. J. M. and Murray, J. A. H. 2000. Sugar Control of the Plant Cell Cycle: Differential Regulation of *Arabidopsis* D-type Cyclin Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* Vol. **20**(13): 4513-4521.
- Rogers, S.W., Wells, R. and Rechsteiner, M. 1996. Amino acid sequences common to rapidly degrading proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368.

- Roitsch, T. and Ehneß, R. 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* **32**: 359-367.
- Rook, F., Corke, f., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, MW. 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *The Plant Journal* **26**: 421-433.
- Roudier, F., Fedorova, E., Lebris, M. Lecomte, P., Gyorgyey, J., Vaubert, D., Horvath, G., Abad, P., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. 2003. The *Medicago* species A''-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol* **131**: 1091-1103.
- Roudier, F., Fedorova, E., Lebris, M., Lecomte, Ph., Györgyey, D., Horvath, P., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. 2003. The *Medicago* Species A2-Type Cyclin Is Auxin Regulated and Involved in Meristem Formation But Dispensable for Endoreduplication-Associate Developmental Programs. *Plant Physiology* **131**: 1091-1103.
- Sánchez de Jiménez, E. and R. Aguilar. 1984. Protein Synthesis Patterns: Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* **75**: 231-234.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., and López, S. 1981. Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **99**: 445-450.
- Sánchez, M.P.; Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. and Vázquez-Ramos, J.M. 2002. PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology* **50**: 167-175.
- Schub, O., Rohaly, G., Smith, R.W.P., Schneider, A., Dehde, S., Dornreiter, I.L. and Nasheuer, H.P. 2001. Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase  $\alpha$ -primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 38076-38083.
- Sewing, A., Burger, C., Brusselbach, S., Schalk, C., Lucibello, F.C., and Muller, R. 1993. Hyman cyclin D1 encodes a labile nuclear protein whose synthesis is directly induced by growth factors and suppressed by cyclic AMP. *J. Cell Sci.* **104**: 545-555.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* **274**(5293): 1672-7.

- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression. *Genes Dev.* **13**: 1501-1512.
- Shivji, K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**:367-374.
- Shivji, M. K. K., Kenny, M. K. and Wood, R. D. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**: 367-374.
- Simko, I. 1994. Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. *Journal of Plant Growth Regulation* **13**: 73-77.
- Smith, M.B., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.-Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. and Formace, A.J. 1994. Interaction of the p53 regulated protein GADD45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**: 1376-1380.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., and Murray, J.A. 1995. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**: 85-103.
- Sorrel, D.A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C., and Murray, J.A. 1999. Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **119**: 343-352.
- Spiegel, S. and A. Marcus. 1975. Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature* **256**: 228-230.
- Sullivan, J.A., Shirasu, K. and Deng, X.W. 2003. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet* **4**: 948-958.
- Takisawa, H., Mimura, S. and Kubota, Y. 2000. Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 690-696.
- Tan, C. K., Castillo, C., So, A. G., and Downey, K. M. 1986. An auxiliary protein for DNA polymerase- $\delta$  from fetal calf thymus. *J. Biol. Chem.* **261**: 12310-12316.
- Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G. and Downey, K.M. 1986. An auxiliary protein for DNA polymerase- $\delta$  from fetal calf thymus. *J. Biol. Chem.* **261**: 12310-12316.

- Theologis, A., Huynh, T.V. and Davis, R.W. 1985. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. Mol. Biol.* **183**: 53-68.
- Tian, Q., Haggal, P. and Reed, J.W. 2003. Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *Plan J* **36**: 643-651.
- Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. 2001. AUX/IAA Proteins Are Active Repressors, and Their Stability and Activity Are Modulated by Auxin. *The Plant Cell* **13**(12): 2809-2822.
- To, J.P.C., Reiter, W-D and Gibson, S.I. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biology* **2**:4.
- To, J.P.C., Reiter, W-D and Gibson, S.I. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biol* **2**(1):4.
- Toyofuku, K., Loreti, E., Vernieri, P., Alpi, A., Perata, P. and Yamaguchi, J. 2000. Glucose modulates the abscisic acid-inducible *Rab16A* gene in cereal embryos. *Plant Molecular Biology* **42**: 451-460.
- Trimarchi, J., Fairchild, B., Wen, J., et al. 2001. The E2F transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Sci USA* **98**(4), 1519-1524.
- Tsantoulis, P. K. and Gorgoulis, V.G. 2005. Involment of E2F transcription factor family in cancer. *European Journal of Cancer* **41**: 2403-2414.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. 1999. Activation and repression of transcription by auxin response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5844-5849.
- Vanneste, S., Maes, L., De Smet, I., Himanen, K., Naudts, M., Inzé, D. and Beeckman, T. 2005. Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* **123**: 139-146.
- Vázquez-Ramos, J. M. and D. J. Osborne. 1986. Analysis of the DNA synthesized during early of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mut. Res.* **166**: 39-47.
- Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez, M.P. 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed science Research* **13**: 113-130.

- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., et al. 1997. E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol cell Biol* **17**(12), 7268-7282.
- Vogler, H. and Kuhlemeier, C. 2003. Simple hormones but complex signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 51-56.
- Wade, H.K., Sohal, A.K. and Jenkins, G.I. 2003. Arabidopsis *ICX1* is a negative regulator of several pathways regulating flavonoid biosynthesis genes. *Plant Physiology* **131**: 707-715.
- Waga, S. and Stillman, B. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 721-751.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-578.
- Walker, J.C. and Key, J.L. 1982. Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A) RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7185-7189.
- Weigel, D. and Jürgens, G. 2002. Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-754.
- Won, K. A. and Reed, S.I. 1996. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J.* **15**(16): 4182-4193.
- Xie, Q., Suarez-Lopez, P. and Gutierrez, C. 1995. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO Journal* **14**: 4073-4082.
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. 1992. D-types cyclins associate with multiple protein kinase and the replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**: 505-514.
- Yamaguchi, M., Chou, M-Y., Matsumoto, H. and Fukasawa, H. 1979. Partial purification and characterization of DNA polymerases from the cauliflower inflorescence. *Japan J. Genet.* **54**: 97-108.
- Yu, S-M et al. 1991. Metabolic derepression of  $\alpha$ -amylase gene expression in suspension-cultures cells or rice. *J Biol Chem* **266**: 21131-21137.

- Yu, S-M, Lee, Y-C, Fang, S-C, Chan, M-T, Hwa, S-F- and Liu, L-F. 1996. Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant Molecular Biology* **30**: 1277-1289.
- Zaráin, H.M., I. Bernal-Lugo and J. M. Vázquez-Ramos. 1987. Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mut. Res.* **181**: 103-110.
- Zenzer, N., Dreher, K.A., Edwards S.R. and Calle, J. 2003. Acceleration of Aux/IAA proteolysis is specific for auxin and independent of AXR1. *Plant J* **35**: 285-294.
- Zenzer, N., Ellsmore, A. and Callis, J. 2001. Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**(20): 11795-11800.
- Zhou, L., Jang, J-C, Jones, T.L. and Sheen, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10294-10299.
- Zhu, X., Ohtsubo, M., Böhmer, R. M., Roberts, J.M. and Assoian, K. 1996. Adhesion-dependent Cell Cycle Progression Linked to the Expression of Cyclin D1, Activation of Cyclin E-cdk2, and Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein. *J. Cell Biol.* **133**: 391-403.
- Zlatanova, J. S., P. V. Ivanov, L. M. Stoilov, V. Chimshirova and B. Stanchev. 1987. DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Mol. Biol.* **10**: 139-144.